SAĞLIK BİLİMLERİ ALANINDA ULUSLARARASI AKADEMİK ÇALIŞMALAR VE TEORİK BİLGİLER-I

EDİTÖRLER
Doç. Dr. H.Turan AKKOYUN
Doç.Dr.Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN
Dr.Öğr.Üyesi.Şule MELEK

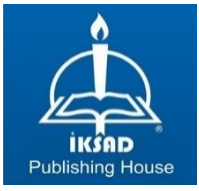


İKSAD
Publishing House

SAĞLIK BİLİMLERİ ALANINDA ULUSLARARASI AKADEMİK ÇALIŞMALAR VE TEORİK BİLGİLER-I

EDİTÖRLER
Doç. Dr. H.Turan AKKOYUN
Doç.Dr.Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN
Dr.Öğr.Üyesi.Şule MELEK

YAZARLAR
Prof. Dr. Elif ÇADIRCI
Prof. Dr. Funda KIRAL
Doç. Dr. H. Turan AKKOYUN
Doç. Dr.Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN
Doç. Dr. Emin ŞENGÜL
Doç. Dr. Ahmet TOPAL
Doç. Dr. Serdar ALTUN
Doç. Dr. Aydın Şükrü BENGÜ
Doç. Dr. Yakup ASLAN
Dr. Öğr. Üyesi Sidar GÜL
Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül KILIÇLI
Dr. Öğr. Üyesi.Alican BİLDEN
Dr. Yasemin ÜSTÜNDAĞ
Dr. Mehmet KARTAL
Öğr. Gör. Dr. İlhan SABANCILAR
Öğr. Gör. Mahmut ÇOBAN
Arş.Gör.Dilek CANLAR AKAR
Yüksek Lisans Öğrencisi Merve AKALAN



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)
TURKEY 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: 978-625-367-190-7
Cover Design: İbrahim KAYA
July / 2023
Ankara / Türkiye
Size = 16 x 24 cm

Bu kitapta yer alan bölümlerde kullanılan kaynakların, görüşlerin, bulguların, sonuçların, tablo, şekil, resim ve her türlü içeriğin sorumluluğu yazar veya yazarlarına ait olup ulusal ve uluslararası telif haklarına konu olabilecek mali ve hukuki sorumluluğu da yazarlara aittir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ
Doç. Dr. H.Turan AKKOYUN
Doç.Dr.Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN
Dr.Öğr.Üyesi.Şule MELEK……..1

BÖLÜM 1
KANSER ÇALIŞMALARINDA MODEL ORGANİZMA OLARAK ZEBRA BALIĞI
Doç. Dr. Ahmet TOPAL.....3

BÖLÜM 2
KORTİKOTROPİN SALGILATICI HORMON VE KANSER
Doç. Dr. Emin ŞENGÜL
Prof. Dr. Elif ÇADIRCI.....15

BÖLÜM 3
CABBAGE (*BRASSİCA OLERACEA VAR*. CAPİTATA F. ALBA)
Doç.Dr.Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN
Doç.Dr.H.Turan AKKOYUN.....29

BÖLÜM 4
TIBBİ ÖNEMİ OLAN SİLYMARİN (SM)
Doç.Dr.Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN
Doç.Dr.H.Turan AKKOYUN.....47

BÖLÜM 5
KANSER HAKKINDA
Doç. Dr. Serdar ALTUN
Dr. Kadir KÖŞGER.....61

BÖLÜM 6
VİTAMİNLERİN KEŞFİ, TARİHSEL GELİŞİMİ ve ÖNEMİ
Doç. Dr. Aydın Şükrü BENGÜ
Öğr. Gör. Mahmut ÇOBAN 73

BÖLÜM 7
***ASPRGİLLUS NİGER* AMİLOGLUKOZİDAZIN KARBOKSİLLENMİŞ ÇOK DUVARLI KARBON NANOTÜPLER İLE İMMOBİLİZASYONU**
Doç. Dr. Yakup ASLAN.....91

BÖLÜM 8
***SACCHAROMYCES CEREVISIAE* İNVERTAZIN KARBOKSİLLENMİŞ ÇOK DUVARLI KARBON NANOTÜPLER İLE İMMOBİLİZASYONU**
Doç. Dr. Yakup ASLAN
Merve
AKALAN.....119

BÖLÜM 9
BÜTÜNCÜL YAKLAŞIM İLE HİPEREMEZİS GRAVİDARUM
Dr.Öğr.Üyesi.SİDAR GÜL
Dr.Öğr.Üyesi.Ayşegül KILIÇLI.....157

BÖLÜM 10
HÜCRE KÜLTÜRLERİ VE PARAZİTOLOJİDEKİ KULLANIMI
Öğr. Gör. Dr. İlhan SABANCILAR
Dr.Öğr.Üyesi.Alican BİLDEN.....175

BÖLÜM 11
MODERN ÇAĞIN BİYOBELİRTEÇLERİ MikroRNA'lar ve KARACİĞER HASTALIKLARINDAKİ ROLLERİ
Arş.Gör.Dilek CANLAR AKAR
Prof. Dr. Funda KIRAL.....187

BÖLÜM 12
KEDİ ALERJİSİ VE BENGAL KEDİSİ
Dr. Mehmet KARTAL.....219

BÖLÜM 13
SALDIRGANLIĞIN NÖROANATOMİSİ
Dr. Yasemin ÜSTÜNDAĞ
Dr. Mehmet KARTAL.....239

ÖN SÖZ

Değerli bilim insanları ve sevgili 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. Her biri kendi alanlarında uzman akademisyenler tarafından kaleme alınan bu kıymetli eserler pek çok alana kaynak oluşturabilecek niteliktedir. Kitabın oluşmasında emeği geçen değerli yazarlara ve yayınlanmasını sağlayan İKSAD Yayınevine teşekkür ederiz. Bilimde multidisipliner ve hatta interdisipliner bakış açısı getireceğini düşündüğümüz birbirinden kıymetli bölümler içeren **Sağlık Bilimleri Alanında Uluslararası Akademik Çalışmalar Ve Teorik Bilgiler 1** isimli kitabımızı bilim dünyası ve okurlarımız ile paylaşmaktan onur duyarız.

EDİTÖRLER
Doç. Dr. H.Turan AKKOYUN
Doç.Dr.Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN
Dr.Öğr.Üyesi.Şule MELEK

BÖLÜM 1

KANSER ÇALIŞMALARINDA MODEL ORGANİZMA OLARAK ZEBRA BALIĞI

Doç. Dr. Ahmet TOPAL

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

GİRİŞ

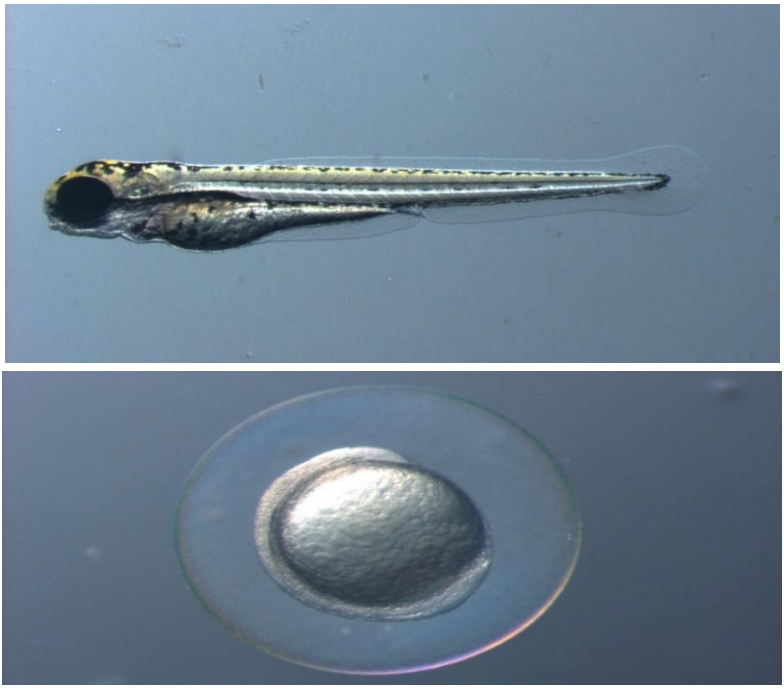
Zebra balığı (*Danio rerio*); sazangiller familyasından, Hindistan ile Burma'nın Ganj Nehri'nde bulunan küçük, tropikal, teleost (kemikli) bir balıktır. Zebra balığı üç aylıkken cinsel olgunluğa ulaştıktan sonra haftada bir kez çiftleşir ve tek bir dişi yüzlerce yumurta üretebilir. Beş gün içinde gelişim süreçlerini tamamlayan şeffaf embriyolar mikroskop altında kolaylıkla izlenebilir hale gelmektedir (Liu ve ark., 2011).



Şekil 1. Yetişkin zebra balığı (Grunwald ve Eisen, 2002)

Zebra balığının omurgalı model organizma olma potansiyeli ilk olarak 1960'ların sonlarında George Streisinger tarafından fark edilmiştir (Grunwald ve Eisen, 2002). Son on yılda, biyomedikal araştırmalarda en önemli omurgalı model organizmalardan biri olan zebra balığı modern biyolojik araştırmalarda kullanılmakla beraber çok sayıda hastalık mekanizması ve temel gelişim süreçlerinin aydınlatılmasında da rol oynadığı tespit edilmiştir. Bir omurgalı model sistemi için zebra balığı; bakımı ve barınmasının kolay olması, kısa yaşam döngüsü, şeffaf embriyo ve larvalar, genetik ve hücre biyolojisi araştırmaları için ciddi avantajlar sunmakta ve hücresel morfoloji ve hareketin kolayca görselleştirilmesini sağlamaktadır. Ek olarak, büyük ölçekli ileri genetik taramaların, gelişimsel morfogenez ve sinyal ağlarının yeni yönlerini

ortaya çıkaran mutantları keşfetmek için son derece verimli olduğu kanıtlanmıştır (Postlethwait ve ark., 2000). Zebra balığı modeli, kanser biyolojisi ve antikanser ilaç araştırmaları da dahil olmak üzere birçok insan hastalığını incelemek için güçlü bir model olarak kullanılmaktadır (Astell ve Sieger, 2020). Buna ilaveten insan genlerinin yaklaşık %70 inin zebra balıkları ile fonksiyonel benzerlik göstermesi balığı model organizma olarak cazip hale getirmektedir.



Şekil 2. Zebra balığı larvası ve yumurtası

1. Kanser Araştırmalarında Zebra Balığı

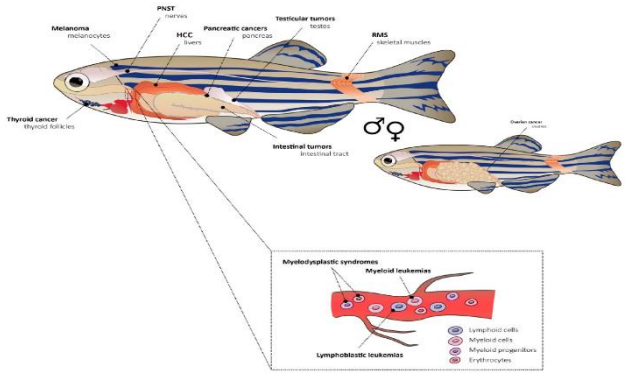
Zebra balığı (*Danio rerio*); embriyogenez, nörogenez ve organ oluşumunu kontrol eden yeni mekanizmaların araştırılmasına imkân sağladığı, ileri genetik ve embriyolojik açıdan görüntülemeye uygun olduğu için bir biyoloji modeli olarak kullanılmıştır. Kanser araştırmalarında zebra balığını model yapan birkaç faktör vardır; 1) Zebra balığının embriyolarının şeffaf olduğu için tümör hücresi davranışının doğrudan gözlemlenmesini sağlamaktadır. 2) Zebra balığının hızlı üretimi, genetik ve ilaç taraması için oldukça ölçeklenebilir bir platform oluşturmaktadır. 3) Balık ve insan

arasındaki kanser sinyal yollarının önemli ölçüde korunması, tümör oluşumunun yeni moleküler mekanizmalarının tanımlanmasına izin vermektedir (Casey ve ark., 2020).Zebra balığı kanser modelleri, insan kanserlerini etkileyen yeni mekanizmaların keşfini hızlandırmış ve klinik deneyler için yeni ilaçların araştırılmasına yol açmıştır (Shin ve ark., 2012; Solin ve ark., 2015; Schultz ve ark., 2018). Zebra balığında kanseri oluşturmak için mutant ve transgenik hatların geliştirilmesi ve tümör hücrelerinin nakli gibi çeşitli yaklaşımlar vardır (Tablo 1). Embriyolar, şeffaf olmaları, mikroskop altında rahat görülmeleri ve tümör oluşum sürecinin görselleştirilmesi gibi faktörlerden dolayı, kanser embriyolarda daha hızlı gelişmekte ve indüksiyondan 2 gün sonra tümör oluşumunu göstermektedir (Lam ve ark., 2006; Letrado ve ark., 2018). Ayrıca zebra balıklarında kanser oluşturmak için kimyasal mutagenesis, viral vektör mutagenezi gibi farklı yollar vardır. Şimdiye kadar araştırmacılar, suya 7,2-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA), N-ethyl-N-nitrosourea gibi kanserojen maddeler ekleyerek birkaç kanser türünün gelişimini sağlamışlardır (Letrado ve ark., 2018). Zebra balığında yapılan ileri genetik taramalar, etilnitrosoüre (ENU) veya N-metil-nitrozoguanidin (MNNG) gibi yaygın mutajenlerin kullanımının, örneğin adenom veya rabdomiyosarkom (RMS) gibi çeşitli neoplazmaların gelişmesine neden olduğunu ortaya çıkarmıştır (Beckwith ve ark., 2000). Ayrıca, N-nitrosodietilaminin (DEN) pankreas ve karaciğer karsinomlarını indüklediği, N-nitrosodimetilaminin (NDMA) ise karaciğer kanserlerini indüklediği gösterilmiştir (Mizgireuv ve Revskoy, 2006). Kanser hücrelerinin zebra balığı embriyosunun vücuduna yayılıp yayılmadığını belirlemek için, hücreler bir flüoresan proteini ile etiketlenir veya kimyasal bir boya maddesi ile boyanır ve kanser hücrelerinin metastazı, enjeksiyondan sonraki iki gün içinde embriyo gövdesi içinde görüntülenir. Bu balıklar daha sonra konfokal mikroskop kullanılarak görüntülenerek Fiji gibi bir yazılım aracılığıyla analiz edilebilir ve böylece metastatik hücrelerin sayısı belirlenir (Al-Thani ve ark., 2021).

Tablo 1. Zebra balıklarında transgenik kanser modelleri (White ve ark., 2013).

Kanser	Onkogen	Kanser biyolojisinde kullanımı
Melanom	Mitfa-BRAF^{V600E} mitfa:EGFP:NRAS^{Q61K} kita–Gal4 × uas-HRAS	Genetik ve kimyasal değiştirici ekranlar
Pankreas	ptf1a–KRAS^{G12V}–GFP	Genetik değiştirici ekranlar
T hücreli lenfoma veya lösemi	-rag2-myc -rag2-lox–dsRED2-lox–EGFP-mMyc × hsp70-cre -rag2-NOTCH1 -rag2-myc × rag2-bcl2	-Kanser modelleme ve in vivo görüntüleme -Uyarılabilir kanser modeli -Bcl-2 ile NOTCH1 etkileşimi -Lösemi yayılma mekanizmaları
B hücreli lösemi	Xenopus Spp. EF1α or zebrafish B actin– TEL–AML1 (ETV6–RUNX1)	B hücreli lösemide mekanizmaları başlatan
Rabdomiyosarkom	ag2–KRAS^{G12D}	Tümör başlatan hücre popülasyonlarının tanımlanması
Nöroblastom	dβh:EGFP–MYCN	MYCN ve ALK işbirliği
Lipoma	krt4–myrAKT1	Lipom ve/veya obeziteyi tedavi etmek için ilaçların araştırılmasına yönelik platform
Miyeloproliferatif neoplazmalar	sp1–NUP98–HOXA9	Hematopoez ve anormal DNA hasarı tepkisindeki kusurlardan NUP98–HOXA9 kaynaklı onkogenez
Kortikotrop adenom ve neoplazmalar	POMC–PTTG	Kortikotrop tümörlerin olası tedavisi olarak CDK inhibitörlerinin tanımlanması
Testis germ hücreli tümör	fugu flck–SV40 large T	Testis tümörlerinin değiştirici ekranları için platform
Karaciğer	fabp10:TA; TRE:xmrk; krt4:GFP	İndüklenebilir EGFR-homolog hepatoselüler kanser modeli

Histolojik ve genomik seviyelerde insanlara çok benzeyen, elliden fazla genetiği değiştirilmiş insan kanseri zebra balığı modeli oluşturulmuştur (White ve ark., 2013). Langenau ve ark., 2003'de, T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) zebra balığında ilk kanser modeli olarak rapor edilmiştir. Burada rekombinasyon aktive edici gen 2 (rag2) promotörü, fare proto-onkogen Myc'nin T ve B lenfositlerinde ekspresyonu yönlendirmek için kullanılmıştır. (Langenau ve ark., 2003). Zebra balığı ve memeliler tümörle ilgili ortak bir moleküler yolağı paylaşırlar ve zebra balığı karaciğeri tümörlerinde 130 dan fazla farklı gen, insan karaciğer tümörlerine benzer ekspresyonlar göstermektedir. Transgenik zebra balığı modellerinin, insan hepatoselüler karsinomu ile moleküler benzer yolakları paylaştığı tespit edilmiştir (Zheng ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada, Myc geninin aşırı ekspresyonu, zebra balığında T-hücresi lösemisine neden olduğu ve dimetilbenzantrasen'in balıklarda bağırsak kanserini tetiklediği tespit edilmiştir (Muth-Köhne ve ark., 2013). Zebra balığındaki ilk kanser modellerinden biri, tümör baskılayıcı 53 (TP53) mutasyona sahip zebra balıklarıdır. TP53, insan kanserlerinde bulunan en sık mutasyona uğramış tümör baskılayıcı gendir. Bu mutant tp53-/- hayvanları, genellikle sarkomun bir alt tipi olarak tanınan periferik sinir kılıfı tümörü (PNST) geliştirir. Zebra balığı fenotipi, TP53 ile inaktive edilmiş hastalarda gözlemlenen durumu kısmen özetlemektedir (Berghmans ve ark., 2005).Hepatoselüler karsinom, dünya çapında hakim olan karaciğer kanser türlerinden biridir. Zebra balığının hepatoselüler karsinom (HCC) çalışması için iyi bir model olduğu kanıtlanmıştır. Zebra balığında, fabp10a promotörünün ekspresyonu altında insan riboz-5-fosfat izomeraz A'nın (RPIA) karaciğere özgü ekspresyonunun hepatokarsinojeneze sebep olabileceği gösterilmiştir (Chou ve ark., 2018).



Şekil 3. Kanserin farklı doku ve organlarda zebra balığı modelleri (Hason ve Bartunek, 2019).

2. Zebra Balığı Ve Kanser Modellemede Yeni Yöntemler

Zebra balıklarında ileri ve geri genetik taramalar yapmak ve çeşitli genlerin kanserle ilgili fenotiplerdeki rolünü doğrudan değerlendirmek mümkündür. Şu anda, zebra balıklarında gen manipülasyonu için en yaygın kullanılan teknikler antisense morpholino oligonucleotides (MOs) (Nasevicius and Ekker, 2000), zinc finger nucleases (ZFNs) (Doyon ve ark., 2008), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) (Huang ve ark., 2011), ve clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) (Ablain ve ark., 2015) yöntemleridir. MOs 'lar, in vivo olarak mRNA translasyonunu bloke edebilen küçük sentetik oligonükleotitlerdir. Zebra balıklarında kullanılan MOs'lar uygun doğrulama ile ve uygun kontrollerin kullanılmasıyla çok sayıda deneysel embriyonun gerçekten hızlı bir şekilde üretilmesini kolaylaştırabilirler. Zebra balığında hedeflenen mutajenez için ilk yöntem olarak ZFNs, gen bozulması örneğinde başarıyla kullanılmış ve ortaya çıkan homozigot mutant embriyolarda pigmentasyon bulunmamıştır. Dolayısıyla ZFN, zebra balığındaki gen bozulmasına uygulanabilmektedir. Yapılan bir çalışmada bir zebra balığı nörofibromatozis 1 (NF1) modeli, nf1a ve nf1b genlerinin ZFN tarafından hedeflenmesiyle üretilmiştir. Mutant embriyolar, oligodendrosit hiperplazisi ve melanofor hipoplazisi gibi NF1 hastalarında gözlemlenenlere benzer fenotipler sergilemiştir (Shin ve ark., 2012; Hason ve Bartunek, 2019).TALEN neredeyse on yıldır kullanılan en popüler yöntemlerden biridir. TALEN'lerin omurgalı genomunda kalıtsal gen

bozulmaları üretebildikleri ilk kez zebra balığında gösterilmiştir. İlk olarak cadherin 5 (cdh5) mutant zebra balığı deneysel olarak oluşturulmuş ve vasküler kusurlar, kalp ödemi ve dolaşımdaki kan hücrelerinin kaybı ile kendini göstermiştir. Bu yüzden, TALEN'lerin somatik dokularda yüksek bir başarı oranıyla mutasyonlar oluşturabilmesi önemli bir gerçektir (Bedell ve ark., 2012). TALEN teknolojisi ile PNST ve sık görülen bir pediatrik beyin kanseri türü olan medulloblastoma dahil olmak üzere beyin tümörü modelleri oluşturulmuştur. Zebra balığı tp53-/- arka planında cdkn2a/b geni inaktive edilmiş ve bu da PNST gelişiminde hızlanmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Bu mutantlar, spesifik olarak medulloblastoma benzeri beyin tümörleri geliştirmişlerdir (Shim ve ark., 2017; Hason ve Bartunek, 2019).Son beş yılda oldukça hızlı bir şekilde gelişen CRISPR/Cas9 tekniği zebra balığı hastalığı modellemesinde yaygın olarak kullanılmıştır (Yin ve ark., 2016). Bu teknik ile yüksek verimlilikle aynı anda birden fazla geni hedeflemek mümkündür. Melanomun hala tam olarak tanımlanmamış bazı genetik alt tipleri vardır Ablain ve ark. melanomdaki kanser genlerinin tanımlanmasına yönelik bir çalışma yapmışlar ve SPRED1'in işlevini in vivo olarak değerlendirmek için zebra balığı kullanmışlardır. Bunun için Modeling Approach in Zebrafish for Rapid Tumor Initiation (MAZERATI) adlı yeni bir CRISPR tabanlı platform kullanılmıştır. Bu sistem; biri Cas9 ve gRNA ifadesine sahip, diğeri ilgili onkogeni ifade eden iki MiniCoopR vektörü kullanmaktadır. CRISPR vektörleri, doku kısıtlamalı zebra balığı promotörlerinin kontrolü altına yerleştirilmiş bir cas9 sekansı ile zebra balığı U6 promotör güdümlü bir gRNA kaseti birleştirilerek dokuya özgü gen inaktivasyonu için geliştirilmiştir. Yazarlar SPRED1'in tümör baskılayıcı olarak fonksiyon gördüğünü tespit etmişlerdir (Ablain ve ark., 2018).

3.KAYNAKÇA

Ablain, J., Durand, E.M., Yang, S., Zhou, Y., Zon, L.I. (2015). A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish. *Developmental cell*, *32*(6), 756-764.

Ablain, J., Xu, M., Rothschild, H., Jordan, R.C., Mito, J.K. Daniels, B.H., Bell, C.F., Joseph, N.M., Wu, H., Bastian, B.C., Zon, L.I.,Yeh, I. (2018). Human tumor genomics and zebrafish modeling identify SPRED1 loss as a driver of mucosal melanoma. *Science*, 362, 1055-1060.

Al-Thani, HF., Shurbaji, S., Yalcin, H.C. (2021). Zebrafish as a Model for Anticancer Nanomedicine Studies. *Pharmaceuticals* (Basel). 28;14(7), 625.

Astell, K.R. ve Sieger, D. (2020). Zebrafish In Vivo Models of Cancer and Metastasis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 3;10(8), a037077.

Beckwith, L.G., Moore, J.L., Tsao-Wu, G.S., Harshbarger, J.C. ve Cheng, K.C. (2000). Ethylnitrosourea induces neoplasia in zebrafish (Danio rerio). *Labor. Investig*. 80, 379-385.

Bedell, V.M., Wang, Y., Campbell, J.M., Poshusta, T.L., Starker, C.G., Krug, R.G 2nd., Tan, W., Penheiter, S.G., Ma, A.C., Leung, A.Y., Fahrenkrug, S.C., Carlson, D.F., Voytas, D.F., Clark, K.J., Essner, J.J.,Ekker, S.C. (2012). In vivo genome editing using a high-eciency TALEN system. *Nature*, 491, 114-118.

Berghmans, S., Murphey, R.D., Wienholds, E., Neuberg, D., Kutok, J.L., Fletcher, C.D., Morris, J.P., Liu, T.X., Schulte-Merker, S., Kanki, J.P., Plasterk, R., Zon, L.I., Look, A.T. (2005). tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 407-412.

Casey, M.J. ve Stewart, R.A. (2020). Pediatric Cancer Models in Zebrafish. *Trends Cancer*, 6(5), 407-418.

Chou, Y.T., Chen, L.Y., Tsai, S.L., Tu, H.C., Lu, J.W., Ciou, S.C., Wang, H.D., Yuh, C.H. (2018). Ribose-5-Phosphate Isomerase a Overexpression Promotes Liver Cancer Development in Transgenic Zebrafish via Activation of ERK and beta-catenin Pathways. *Carcinogenesis*, 40, 461-473.

Doyon, Y., McCammon, J.M., Miller, J.C., Faraji, F., Ngo, C., Katibah, G.E., Amora, R., Hocking, T.D., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Amacher, S.L. (2008). Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol*. 26,

702-708.

Hason, M. ve Bartůněk, P. (2019). Zebrafish Models of Cancer-New Insights on Modeling Human Cancer in a Non-Mammalian Vertebrate. *Genes (Basel)*, 15;10(11), 935.

Huang, P., Xiao, A., Zhou, M., Zhu, Z., Lin, S., Zhang, B. (2011). Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat. Biotechnol*. 29, 699-700.

Muth-Köhne, E., Sonnack, L., Schlich, K., Hischen, F., Baumgartner, W., Hund-Rinke, K., Schäfers, C., Fenske, M. (2013). The toxicity of silver nanoparticles to zebrafish embryos increases through sewage treatment processes. *Ecotoxicology*, 22, 1264-1277.

Nasevicius, A. ve Ekker, S.C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat. Genet*. 26, 216-220.

Lam, S.H., Wu, Y.L., Vega, V.B., Miller, L.D., Spitsbergen, J., Tong, Y., Zhan, H., Govindarajan, K.R., Lee, S., Mathavan, S., Murthy, K.R., Buhler, D.R., Liu, E.T., Gong, Z. (2006). Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. *Nat Biotechnol*. 24, 73-5.

Langenau, D.M., Traver, D., Ferrando, A.A., Kutok, J.L., Aster, J.C., Kanki, J.P., Lin, S., Prochownik, E., Trede, N.S., Zon, L.I., Look, A.T. (2003). Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science*, 299, 887-890.

Letrado, P., de Miguel, I., Lamberto, I., Díez-Martínez, R.,Oyarzabal, J. (2018). Zebrafish: Speeding Up the Cancer Drug Discovery Process. *Cancer Res*. 1;78(21), 6048-6058.

Liu, S. ve Leach, S.D. (2011). Zebrafish models for cancer. *Annu Rev Pathol*. 6, 71-93.

Postlethwait, J.H., Woods, I.G., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y.L., Kelly, P.D., Chu, F., Huang, H., Hill-Force, A.,Talbot, W.S. (2000). Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res*. 10(12), 1890-902.

Schultz, L.E., Haltom, J.A., Almeida, M.P., Wierson, W.A., Solin, S.L., Weiss, T.J., Helmer, J.A., Sandquist, E.J., Shive, H.R., McGrail, M. (2018). Epigenetic regulators Rbbp4 and Hdac1 are overexpressed in a zebrafish model of RB1 embryonal brain tumor, and are required for neural progenitor survival and proliferation. *Dis Model Mech*. 15;11(6), dmm034124.

Shim, J., Choi, J.H., Park, M.H., Kim, H., Kim, J.H., Kim, S.Y., Hong, D., Kim,

S., Lee, J.E., Kim, C.H., Lee, J.S. ve Bae, Y.K. (2017). Development of zebrafish medulloblastoma-like PNET model by TALEN-mediated somatic gene inactivation. *Oncotarget*, 8, 55280-55297.

Shin, J., Padmanabhan, A., de Groh, E.D., Lee, J.S., Haidar, S., Dahlberg, S., Guo, F., He, S., Wolman, M.A., Granato, M., Lawson, N.D., Wolfe, S.A., Kim, S.H., Solnica-Krezel, L., Kanki, J.P., Ligon, K.L., Epstein, J.A.,Look, A.T. (2012). Zebrafish neurofibromatosis type 1 genes have redundant functions in tumorigenesis and embryonic development. *Dis. Models Mech*. 5, 881-894.

Solin, S.L., Shive, H.R., Woolard, K.D., Essner, J.J., McGrail, M. (2015). Rapid tumor induction in zebrafish by TALEN-mediated somatic inactivation of the retinoblastoma1 tumor suppressor rb1. *Sci Rep*.

Yin, L., Maddison, L.A., Chen, W. (2016). Multiplex conditional mutagenesis in zebrafish using the CRISPR/Cas system. *Methods Cell Biol*. 135, 3-17.

Zheng, W., Li, Z., Nguyen, A.T., Li, C., Emelyanov, A. ve Gong, Z. (2014). Xmrk, Kras and Myc transgenic zebrafish liver cancer models share molecular signatures with subsets of human hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 9, e91179.

White, R., Rose, K., Zon, L. (2013). Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. *Nat Rev Cancer*. 13(9), 624-36.

BÖLÜM 2

KORTİKOTROPİN SALGILATICI HORMON VE KANSER

Doç. Dr. Emin ŞENGÜL

Prof. Dr. Elif ÇADIRCI

[1]Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Fizyoloji ABD/Erzurum. Türkiye. email: emin.sengul@atauni.edu.tr, ORCID 1: 0000-0003-1566-1816

[2]Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD/Erzurum. Türkiye. email: ecadirci@atauni.edu.tr, ORCID 2: 0000-0003-0836-7205

1. KORTİKOTROPİN SALGILATICI HORMON (CRH)

Adenohipofiz hücreleri tarafından adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve β-endorfin salgılanmasını uyaran 41-amino asitli bir peptit, 1981'de bir grup araştırmacı tarafından koyun hipotalamusunda karakterize edildi (Vale ve ark., 1981). Kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) olarak isimlendirilen bu hormon, 192 amino asitlik bir preprohormondan türetilir ve paraventriküler çekirdeklerdeki parvoselüler nöronlarda yüksek miktarlara bulunur (Sasaki ve ark., 1984). Periferik dokularda da üretilen CRH, periferde en fazla plasentada üretilmektedir. Dolaşımda CRH'a özgü bir bağlayıcı protein (CRHBP) mevcuttur. CRHBP, aynı zamanda ürokortin 1, ürotensin 1 ve sauvagini de bağlayan yüksek düzeyde korunmuş bir proteindir ve CRH reseptörlerinin aktivasyonunu önleyerek inhibitör bir etki gösterir (Ketchesin ve ark., 2017). CRH salınım mekanizmaları detaylı bir şekilde araştırılmış ve özellikle hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) ekseninin kontrolünün ana düzenleyici mekanizma olduğu belirlenmiştir (Kageyama ve ark., 2021). Hipotalamusun periventriküler bölgesinde bulunan GABAerjik internöronlar, bazal koşullar altında CRH salınımı üzerine inhibitör etkilidirler (Herman ve ark., 2002; Kakizawa ve ark., 2016). Canlının maruz kaldığı stresin bir sonucu olarak, sinyaller hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinin (PVN) nöroendokrin hücrelerine ulaşan yüksek sinir merkezlerinden ayrılır ve CRH üretimini ve salınımını uyarır (Aguilera ve Liu, 2012). Portal dolaşıma salınan CRH, adenohipofize ulaşır, kortikotropik hücreler üzerindeki spesifik reseptörlerine bağlanır ve ACTH salınımını uyarır. Sistemik dolaşıma salınana ACTH, adrenal bezin korteksinde adrenal glukokortikoid sentezini ve salgılanmasını düzenler.CRH, ürokortin 1 (UCN1), ürokortin 2 (UCN2) ve ürokortin 3 (UCN3)'ü içeren bir peptit hormon ailesidir. Reseptör ailesi ise CRHR1, CRHR2 ve CRHBP'yi içerir (Choy ve ark., 2020). CRH, hipokampus, amigdala ve striatal çekirdek gibi merkezi sinir sisteminde yaygın olarak eksprese edilir (Ovejoy ve Balment, 1999; Gunn ve ark., 2017). UCN1 41 amino asitli bir peptittir ve daha sonra beyin, beyincik ve hipokampus gibi merkezi bölgelerde ve kalp, adrenal bez ve iskelet kası gibi periferik dokularda eksprese edilir (Skelton ve ark., 2000; Martınez ve ark., 2004). 38 amino asitli peptid olan UCN2 ve UCN3, beyin, hipotalamus, beyin sapı, hipotalamus, hipofiz, kalp, plasenta, mide, deri, ovaryum, adrenal bez ve böbreklerde eksprese edilmiştir (Hauger ve ark., 2003; Fukuda ve ark., 2005). CRHR1 ve CRHR2 reseptörleri, G proteinine bağlı reseptörlerin B1 ailesine aittir. CRHR1 esas olarak merkezi sinir sisteminde yer alır ve HPA ekseninde önemli bir rol oynarken, CRHR2 reseptörü çoğunlukla periferik dokularda eksprese edilmiştir (Takefuji ve Murohara, 2019). 37 kDa'lık bir glikoproteindir olan CRHBP merkezi sinir sisteminde büyük miktarlarda eksprese edilir ve periferik dokularda ise özellikle hipofiz, karaciğer ve plasentada izole edilmiştir (Xia ve ark., 2018; Behan ve ark., 1993). CRH ailesi üyeleri, reseptörleri aracılığıyla sistemik dokular ve hedef organlarda etkili olur ve homeostazın korunmasında

önemli rol oynarlar (Davidson ve ark., 2009). UCN'ler ve reseptörleri, HPA ve tiroid ekseninin işlevlerinin düzenlenmesinde rol oynarken gastrointestinal, genital ve diğer sistemlerin fizyopatolojisinde de etkilidirler. UCN1'in intraserebroventriküler enjeksiyonu, CRH kadar olmamakla birlikte artmış kortizol sekresyonuna sebep olur. UCN1/CRHR1'in tiroid kan akımını ve kalsitonin sekresyonunu düzenlediği bilinmektedir (Chrousos ve Zoumakis, 2017).Vücudun homeostazı bozulduğunda, CRH ailesi üyeleri stres tepkisinin koordinasyonuna katılır. Çoğu hücrede CRH ailesi üyeleri, cAMP/PKA/CREB sinyal yolağını aktive ederek biyolojik etkiler meydana getirir ve bu yolun aktivasyonu hücre çekirdeğinde gen transkripsiyonunun düzenlemesine neden olur (Taché ve Million, 2015). Çalışmalar neticesinde CRH/CRHR'nin, cAMP/PKA/p38MAPK sinyal yolunu aktive edebildiği ve ERK aktivasyonu ile hücre proliferasyonunda önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Hillhouse ve Grammatopoulos, 2006). Ayrıca bu yolun aktivasyonu mast hücrelerinde vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) salınımını indüklemektedir (Fang ve ark., 2017). CRH ailesi üyeleri nitrik oksit sentaz (NOS)'ın ekspresyonunu ve aktivitesini düzenleyerek hücrelerin cGMP içeriğinin değişmesine neden olur. NO/cGMP sinyal yolunun aktivasyonu ise periferik arterlerin aktivasyonunda önemli rol oynar (Chen ve ark. 2005).

2. Kanser Biyolojisinde CRH

Araştırmalar neticesinde CRH, peptit hromon ailesi ve CRH reseptörlerinin bazı kanser hücrelerinde tespit edilmiş ve buna bağlı olarak CRH ailesi ile kanser arasında ilişki olacağı belirlenmiştir. Yapılan araştırmalarda ovaryum kanserinde CRH saptanmış ve bu kanser hücrelerinde Fas ligandlarının (FasL) ekspresyonunu artırdığı ve CRHR1 aracılığıyla Fas aracılı apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Suda ve ark., 1986; Minas ve ark., 2007). İnsan servikal karsinom hücrelerinde (HeLa) CRH ve FasL aktivasyonu arasında ilişki olduğu, HeLa hücreleri CRH'ye maruz kaldığında, hem FasL transkripsiyonunda hem de FasL translasyonunda önemli bir artış olduğu bildirilmiştir (Taliouri ve ark., 2012). CRHR1'in kolite bağlı kanser (CAC) gelişimindeki rolü, CRHR1 Knock-out farelerde araştırılmış (Liu ve ark., 2014), CRHR1'in makrofajları uyararak proinflamatuar sitokinleri saldırdığı ve NFkB-BCL2 ve STAT3 sinyallerini aktive ederek apoptozu azalttığı ve proliferasyonu artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, iki tip kolon kanseri hücre hattında (DLD1 ve HCT116 hücreleri) CRH/CRHR1 sinyalinin potansiyel rolünün araştırıldığı çalışmada, CRH'nin CRHR1 reseptörü üzerinde NF-κB/IL-6/JAK2/STAT3 sinyali yolu aracılığıyla hücre proliferasyonunu ve NF-κB/VEGF sinyali yolu aracılığıyla ise tümör anjiyogenezini uyardığı rapor edilmiştir (Fang ve ark., 2017). Aynı araştırmada CRH, CRHR1 ve UCN ekspresyonunun karsinomatöz dokularda normal ve perikarsinomatöz dokulara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

3. BAZI KANSER TÜRLERİNDE CRH'IN ROLÜ

3.1. Kolorektal kanser

Kolorektal kanser, dünya çapında kanser ölümleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır (Dekker ve ark., 2019). Araştırmacılar, ileum submukozasında, miyenterik pleksusta ve lamina propriadaki sinir liflerinde CRH ve UCN2 ekspresyonunu tespit etmişlerdir (Herman ve ark. 2016). Ayrıca CRH, insan kolon kromafin hücrelerinde lokal olarak üretilebilir (Diwakarla ve ark. 2017) ve insan kolonunun lamina propriasındaki makrofajlarda CRHR1 reseptörü bulunur (Fang ve ark., 2017). Yapılan araştırmalar neticesinde kolon kanseri hücrelerinde CRHR2 ekspresyonunun normale kıyasla azaldığı tespit edilmiştir (Rodriguez ve ark. 2015). Kronik stresin irritabl bağırsak sendromu (IBS) ve inflamatuar bağırsak hastalığına (IBD) sebep olduğu bilinmektedir. IBS ve IBD kolorektal kanserin sebepleri arasındadır. Kronik streste organizmada normalden fazla salınan CRH'nin bu hastalıkların birlikteliğinde kolerektal kanser gelişmesinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Baritaki ve ark. 2019). Kronik stres, CRH/CRHR1'in aktivasyonunu, tümör nekroz faktör-alfa (TNF-α) ve proteaz salınımını artırabilir. TNF-α ve proteaz, komşu hücrelerin sıkı bağlantı mekanizmasını tahrip edebilir ve buna bağlı olarak bağırsak epitel bariyerinin işlev bozukluğu sonucunda gelişen epitel bariyerinin geçirgenliği artar ve bu da mikrobiyal infiltrasyona ve translokasyona yol açar (Tache ve ark., 2018). Merkezi sinir sisteminde, CRH parasempatik nöronları aktive eder ve bağırsak motor nöronlarından asetilkolin (ACh) salınımını uyarır. ACh salınımının artması kolonik taşınmayı hızlandırabilir, böylece kolonik inflamasyonu indükler (La Fleur ve ark., 2005). Ülseratif kolitli hastaların lamina propriasındaki makrofajlarda CRHR1 reseptörü ve UCN1 ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (Saruta ve ark., 2004). Kronik inflamasyon, tümör oluşumunun ve gelişiminin ana nedenlerinden biridir. CRH ve UCN2'nin kolit oluşumunu ve gelişimini teşvik edebildiği bildirilmiştir (Fukudo, 2007). Kolorektal kanserde UCN2/CRHR2, UCN2'nin doza bağlı bir şekilde Fas üretimini indükler. UCN2/CRHR2'nin artan ekspresyonu, kolorektal kanser hücrelerinde Fas aracılı immün kaçışı tersine çevirebilir (Pothoulakis ve ark., 2018). CRH/CRHR1 kombinasyonu, IL-1β ve IL-6 (Quintanar ve Guzmán-Soto, 2013) gibi inflamatuar faktörlerin salınım yeri olan immün hücreleri uyaran MAPK ve ERK/NF-KB sinyal yolaklarını aktive eder (Catz ve Johnson, 2001).Kolon kanserinde proliferasyon, migrasyon, invazyon ve apoptozis üzerinde CRH protein ailesinin etkisi vardır. Kolorektal kanser hücre hattında yapılan bir çalışmada, UCN2/CRHR2'nin IL-6/STAT3 sinyal yolu tarafından indüklenen proliferasyon, migrasyon ve invazyonu inhibe ettiği belirlenmiştir (Rodriguez ve ark., 2015). UCN2/CRHR2 sinyal iletimi, kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve metastazını engelleyebilir (Kobayashi ve ark., 2020). Anjiyogenez, tümör oluşumunun ve gelişiminin temelidir ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), etkili bir anjiyojenez indükleyicisidir. CRH, cAMP/PKA/p38MAPK sinyal yolunu

aktive ederek insan mast hücrelerinden VEGF salınımını indükler (Cao ve ark., 2006). Tümör epitel hücrelerinde CRH'nin artan ekspresyonu, endotelyumun kemotaksisini uyarabilir ve anjiyogenezi daha da artırabilir (Zhou ve Fang, 2018).

3.2. Endometriyal karsinom

Endometriyal karsinom, genital sistem kanserleri arasında en sık görülen kanser tiplerinden birisidir (Njoku ve ark., 2020). CRH ve UCN, normal uterusta ve endometrial karsinomada eksprese edilir. CRHR1 ve CRHR2 normal endometriyal hücrelerin sitoplazmasında tespit edilmiştir (Florio ve ark. 2006). Endometriyal karsinomda CRHR1 ekspresyonunda artış meydana gelir. Bir çalışmada da endometriyal kanserde CRHR2 ekspresyonunun daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Miceli ve ark., 2009). Progesteronun, CRH'nin ekspresyonunu ve üretimini uyarabildiği ifade edilmektedir (Makrigiannakis ve ark., 1999). CRH'ın CRHR1 aracılığıyla cAMP-PKA yolağını aktive ederek hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Graziani ve ark., 2002). UCN1/CRHR2 hücrelerin göçünü inhibe ederken, CRH tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder ve matriks metaloproteinaz (MMP)-2 ve MMP-9 seviyelerini artırarak tümör hücrelerinin metastazını destekler (Graziani ve ark. 2007).

3.3. Hepatosellüler kanser

Hepatoselüler karsinom (HCC), enfeksiyöz ve nonenfeksiyöz kaynaklı kronik karaciğer hastalıklarından gelişen malign bir hastalıktır (Massarweh ve El-Serag, 2017) ve kanser nedenli ölümler arasında üçüncü sırasında yer almaktadır (Couri ve Pillai, 2019). UCN1, CRHR1 ve CRHR2 reseptör proteinleri, hepatositlerin, kan damarlarının ve safra kanallarının sitoplazmasında ve hücre zarlarında ekspre edilmiştir. Aynı zamanda UCN1, CRHR1, CRHR2 ve CRHBP transkripsiyonu, Kupffer hücrelerinde (KC'ler) belirlenmiştir (Charalampopoulos ve ark., 2006). Karaciğerde zararlı bir uyarım meydana geldiğinde, UCN1 otokrin veya parakrin tarzda bağışıklık yanıtı oluşturabilir. CRHR1 ve CRHR2 aracılı lipopolisakarit, TNF üretimini inhibe edebilir (Zhao ve ark., 2013) ve Malign karaciğer tümörlerinde, UCN1 ve CRHR1 reseptörleri, hücre büyüme faktörlerini ve immün süreçleri etkileyerek karaciğer kanseri oluşumu ve gelişimi üzerine etkili olur (Simopoulos ve ark., 2009). İki karaciğer kanseri hattı (SMMC-7721 ve HepG2) çalışmasında, UCN1/CRHR2'in hücre proliferasyonunu inhibe edebildiği rapor edilmiştir (Paschos ve ark., 2013). CRH'ın CRHR1 aracılığıyla p38MAPK'yı aktive ettiği (Dermitzaki ve ark. 2002) ve aktive edilmiş p38MAPK'nın, Fas ligandının üretimine aracılık ederek Fas ligand aracılı apoptozis, kronik viral hepatit ve akut karaciğer yetmezliği gibi bazı karaciğer hastalıklarının patogenezinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir.CRHBP beyin, plasenta, karaciğer, böbrek ve diğer organlarda ekspre edilmiştir ve kanser oluşum ve gelişimi ile de yakından ilişkilidir (Xia ve ark., 2018). Karaciğer

kanserli hastalarda CRHBP gen ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını bulmuştur (Sarathi ve Palaniappan, 2013) ve düşük CRHBP ekspresyonu olan karaciğer kanseri hastalarının, yüksek CRHBP ekspresyonu olan hastalardan daha kısa hayatta kalma süresine sahip olduğu doğrulanmıştır (Xia ve ark., 2018).

3.4. Meme kanseri

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (Anastasiadi ve ark., 2017). Meme kanseri hastalarının biyopsilerinde CRH aile üyelerinin varlığı belirlenmiştir. Meme kanseri biyopsilerinde CRH reseptörlerinin ekspresyonu araştırıldığı bir çalışmada, CRHR1 ekspresyonunun benign biyopsilerin %23,1'inde ve malign biyopsilerin %23,1'inde bulunduğu ve CRHR2 ekspresyonunun benign biyopsilerin %22,2'sinde ve malign biyopsilerin %36,0'ında bulunduğu rapor edilmiştir (Kaprara ve ark., 2010). Bir başka araştırmada ise araştırmalarda CRH'nın CRHR1 aktivasyonu aracılığıyla meme kanseri hücrelerinin hücre büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Graziani ve ark., 2007). CRH ve reseptörleri CRHR1/CRHR2, transforme büyüme faktörü β1 (TGF-β1) tarafından uyarıldığında, E-kadherin ekspresyonunu artırdığı ve N-kadherin ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur (Jin ve ark., 2014).

3.5. Böbrek kanseri

Renal hücreli karsinom böbrekte en yaygın görülen renal solid tümördür (Gray ve Harris, 2019). UCN3, böbrekte hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda ekspre edilmiş olup özellikle renal tübüler epitel hücrelerinde bulunmaktadır (Faraj Tabrizi ve ark., 2020). UCN3, reseptörü CRHR2'ye bağlanarak VEGF üretimini ve buna bağlı olarak anjiyogenezi azaltır (Hao ve ark., 2008). Böbrek kanseri hastalarında, renal hücrelerde VEGF önemli ölçüde artar. VEGF inhibitörleri ve immünoterapi kombinasyonu böbrek kanseri hastalarının tedavisi için araştırılmaktadır (Dudani ve ark., 2019). Böbrek kanserli hastalarda, serum ve idrarda UCN3 ekspresyonu, normalden önemli düzeyde düşüktür (Takahashi ve ark., 2004). CRHBP, böbrek kanseri oluşum ve gelişiminde önemli rol oynar. CRHBP, normalde glomerüllerde ve podositlerde bulunmaktadır ve kanser hücrelerindeki ekspresyonu önemli ölçüde azalır. CRHBP'nin bu azalma derecesi, kanserin evresi ve metastaz yeteneği ile pozitif olarak ilişkilidir (Faraj Tabrizi ve ark. 2020). CRHBP'nin aşırı ekspresyonu, renal hücreli karsinomun çoğalmasını, göçünü ve istilasını önleyebilir. CRHBP ayrıca p53 sinyal yolunun aracılık ettiği mitokondriyal apoptoz yolunu aktive eder ve böbrek kanseri hücrelerinin apoptozunu uyarır. Bu nedenle, CRHBP'nin renal hücreli karsinomun oluşum ve gelişimini engelleyebileceği düşünülmektedir (Yang ve ark., 2020).

3.6.Glioma

Glioma, beyin ve omurilikte en sık görülen primer tümördür (Chen ve ark., 2017). CRH ve reseptörü CRHR1, normal ve patolojik koşullarda beyin dokusunda ekspre edilir. Gliomalarda, CRHR1 ekspresyonu önemli ölçüde artar (Feng ve ark., 2018) ve glioma hayvan modelinde, tedavi amacıyla CRH uygulamasından sonra, CRH'nin steroidlere benzer antitümör terapötik etkileri olduğu bulunmuştur (Faraj Tabrizi ve ark., 2020). CRH uygulanan glioma hücrelerinde p53 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (Feng ve ark., 2018). p53 aktivasyonu, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyebilir ve ayrıca tümör tedavisi için çok önemli olan anjiyogenez ve DNA onarımının inhibisyonunda önemli bir rol oynar (Lee ve ark., 2006). İnsan glioma U87 hücre hattında CRH uygulaması, hücre proliferasyonunu inhibe eder ve p53 sinyal yolu aracılığıyla apoptozu indükler (Feng ve ark., 2018).

4.SONUÇ

Kanserin biyolojisinde CRH ailesi üyelerinin rollerinin bulunur ve farklı kanser tiplerinde CRH ailesi üyelerinin doku özgüllüğü vardır. CRH ailesi üyelerinin, hücrelerin proliferasyon, migrasyon ve apoptoz gibi birçok süreci etkileyebildiği görülmektedir. Aynı zamanda kanser oluşum ve gelişim süreçlerini etkileyerek kanserin fizyopatolojisinde önemli roller oynamaktadır. CRH ailesi üyelerinin kanserin teşhis ve tedavi süreçlerine yön verebilmesi ve tedavi ajanı olabilmeleri için bu alanda yapılacak daha ileri düzey araştırmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

5.KAYNAKLAR

Aguilera, G., Liu, Y. (2012). The molecular physiology of CRH neurons. Front. *Neuroendocrinol*, 33, 67–84.

Anastasiadi, Z., Lianos, G.D., Ignatiadou, E., Harissis, H.V., Mitsis, M. (2017). Breast cancer in young women: an overview. *Updates Surg*, 69, 313–317.

Baritaki, S., de Bree, E., Chatzaki, E., Pothoulakis, C. (2019). Chronic stress, inflammation, and colon cancer: a CRH system-driven molecular crosstalk. *J. Clin. Med*, 8, 1669.

Behan, D.P., Potter, E., Lewis, K.A., Jenkins, N.A., Copeland, N., Lowry, P.J., Vale, W.W. (1993). Cloning and structure of the human corticotrophin releasing factor-binding protein gene (CRHBP). *Genomics*, 16, 63–68.

Cao, J., Cetrulo, C.L., Theoharides, T.C. (2006). Corticotropin-releasing hormone induces vascular endothelial growth factor release from human mast cells via the cAMP/protein kinase A/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Pharmacol*, 69, 998–1006.

Catz, S.D., Johnson, J.L. (2001). Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor κB and its significance in prostate cancer. *Oncogene*, 20, 7342–7351.

Charalampopoulos, I., Androulidaki, A., Minas, V., Chatzaki, E., Tsatsanis, C., Notas, G., Xidakis, C., Kolios, G., Kouroumalis, E, Margioris, A.N., Gravanis, A. (2006). Neuropeptide urocortin and its receptors are expressed in rat Kupffer cells. *Neuroendocrinology*, 84, 49–57.

Chen, R., Smith-Cohn, M., Cohen, A. L., Colman, H. (2017). Glioma subclassifications and their clinical significance. *Neurotherapeutics*, 14, 284-297.

Chen, Z.W., Huang, Y., Yang, Q., Li, X., Wei, W., He, G.W. (2005). Urocortin-induced relaxation in the human internal mammary artery. *Cardiovasc. Res*, 65, 913–920.

Choy, K.W., Tsaı, A.P., Lın, Pb, Wu, M.Y., Lee, C., Alias, A., Pang, C.Y., Liew, H.K. (2020). The role of urocortins in ıntracerebral hemorrhage. *Biomolecules*, 10: 96.

Chrousos, G.P., Zoumakıs, E. (2017). Milestones in CRH research. *Curr. Mol. Pharmacol*, 10, 259–263.

Couri, T., Pillai, A. (2019). Goals and targets for personalized therapy for HCC. *Hepatol. Int*, 13, 125–137.

Davidson, S.M., Rybka, A.E., Townsend, P.A. (2009). The powerful cardioprotective effects of urocortin and the corticotropin releasing hormone (CRH) family. *Biochem. Pharmacol*, 77, 141–150.

Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L., Kasi, P. M., Wallace, M. (2019). Colorectal cancer. *Lancet*, 394, 1467–1480.

Dermitzaki, E., Tsatsanis, C., Gravanis, A., Margioris, A.N. (2002). Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and

apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem*, 277, 12280–12287.

Diwakarla, S., Fothergill, L.J., Fakhry, J., Callaghan, B., Furness, J.B. (2017). Heterogeneity of enterochromaffin cells within the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol. Motil*, 29, 10.1111/nmo.13101.

Dudani, S., Graham, J., Wells, J.C., Bakouny, Z., Pal, S.K., Dizman, N., ... Heng, D.Y. (2019). First-line immuno-oncology combination therapies in metastatic renal-cell carcinoma: results from the international metastatic renal-cell carcinoma database consortium. *Eur. Urol*, 76, 861–867.

Fang, X., Hong, Y., Dai, L., Qian, Y., Zhu, C., Wu, B., Li, S. (2017). CRH promotes human colon cancer cell proliferation via IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway and VEGF-induced tumor angiogenesis. *Mol. Carcinog*, 56, 2434–2445.

Faraj Tabrizi, P., Mohebbi Tafrechi, A., Peters, I., Atschekzei, F., Kuczyk, M.A., Serth, J., Tezval, H. (2020). Cancer-specific loss of urocortin 3 in human renal cancer. *Adv. Ther*, 37, 288-299.

Faraj Tabrizi, P., Mohebbi Tafrechi, A., Peters, I., Atschekzei, F., Kuczyk, M.A., Serth, J., Tezval, H. (2020). Cancer-specific loss of urocortin 3 in human renal cancer. *Adv. Ther*, 37, 288–299.

Feng, Y., Wang, L., Liu, X., Wu, Q., Zhang, H., Hu, F., Sun, X. (2018). Human corticotrophin releasing factor inhibits cell proliferation and promotes apoptosis through upregulation of tumor protein p53 in human glioma. *Oncol. Lett*, 15(6), 8378-8386.

Florio, P., De Falco, G., Leucci, E., Torricelli, M., Torres, P. B., Toti, P., ... Petraglia, F. (2006). Urocortin expression is downregulated in human endometrial carcinoma. *J. Endocrinol*,190, 99.

Fukuda, T., Takahashi, K., Suzuki, T., Saruta, M., Watanabe, M., Nakata, T., Sasano, H. (2005). Urocortin 1, urocortin 3/stresscopin, and corticotropin-releasing factor receptors in human adrenal and its disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab,* 90, 4671–4678.

Fukudo S. (2007). Role of corticotropin-releasing hormone in irritable bowel syndrome and intestinal inflammation. *J. Gastroenterol*, 17, 48–51.

Gray, R.E., Harris, G.T. (2019). Renal Cell Carcinoma: Diagnosis and Management. *Am. Fam. Physician*, 99, 179–184.

Graziani, G., Tentori, L., Muzi, A., Vergati, M., Tringali, G., Pozzoli, G., Navarra, P. (2007). Evidence that corticotropin-releasing hormone inhibits cell growth of human breast cancer cells via the activation of CRH-R1 receptor subtype. *Mol. Cell. Endocrinol*, 264(1-2), 44-49.

Graziani, G., Tentori, L., Muzi, A., Vergati, M., Tringali, G., Pozzoli, G., Navarra, P. (2007). Evidence that corticotropin-releasing hormone inhibits cell growth of human breast cancer cells via the activation of CRH-R1 receptor subtype. *Mol. Cell. Endocrinol*, 264, 44–49.

Graziani, G., Tentori, L., Portarena, I., Barbarino, M., Tringali, G., Pozzoli, G., Navarra, P. (2002). CRH inhibits cell growth of human endometrial adenocarcinoma cells via CRH-receptor 1-mediated activation of cAMP-PKA pathway. *Endocrinology*, 143, 807–813.

Gunn, B.G., Cox, C.D., Chen, Y., Frotscher, M., Gall, C.M., Baram, T.Z., Lynch, G. (2017). The endogenous stress hormone CRH modulates excitatory transmission and network physiology in hippocampus. *Cereb. Cortex*, 27, 4182–4198.

Hao, Z., Huang, Y., Cleman, J., Jovin, I.S., Vale, W.W., Bale, T.L., Giordano, F.J. (2008). Urocortin2 inhibits tumor growth via effects on vascularization and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 105, 3939–3944.

Hauger, R.L., Grigoriadis, D.E., Dallman, M.F., Plotsky, P.M., Vale, W.W., Dautzenberg, F.M. (2003). International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol. Rev*, 55, 21–26.

Herman, J.P., McKlveen, J.M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., Myers, B. (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr. Physiol*, 6, 603–621.

Herman, J.P., Tasker, J.G., Ziegler, D.R., Cullinan, W.E. (2002). Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration: Glutamate-GABA connections. *Pharmacol. Biochem. Behav*, 71, 457–468.

Hillhouse, E.W., Grammatopoulos, D.K. (2006). The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr. Rev*, 27, 260–286.

Jin, L., Chen, J., Li, L., Li, C., Chen, C., Li, S. (2014). CRH suppressed TGFβ1-induced Epithelial–Mesenchymal Transition via induction of E-cadherin in breast cancer cells. *Cell Signal*, 26, 757–765.

Kageyama, K., Iwasaki, Y., Daimon, M. (2021). Hypothalamic regulation of corticotropin-releasing factor under stress and stress resilience. *Int. J. Mol. Sci*, 22, 12242.

Kakizawa, K., Watanabe, M., Mutoh, H., Okawa, Y., Yamashita, M., Yanagawa, Y., Itoi, K., Suda, T., Oki, Y., Fukuda, A. A. (2016). novel GABA-mediated corticotropin-releasing hormone secretory mechanism in the median eminence. *Sci. Adv*, 2, e1501723.

Kaprara, A., Pazaitou-Panayiotou, K., Chemonidou, M.C., Constantinidis, T.C., Lambropoulou, M., Koffa, M., ... Chatzaki, E. (2010). Distinct distribution of corticotropin releasing factor receptors in human breast cancer. *Neuropeptides*, 44(5), 355-361.

Ketchesin, K.D., Stinnett, G.S., Seasholtz, A.F. (2017). Corticotropin-releasing hormone-binding protein and stress: From invertebrates to humans. *Stress*, 20, 449–464.

Kobayashi, M., Matsubara, N., Nakachi, Y., Okazaki, Y., Uchino, M., Ikeuchi, H., Song, J., Kimura, K., Yasuhara, M., Babaya, A., Yamano, T., Ikeda, M., Nishikawa, H., Matsuda, I., Hirota, S., Tomita, N. (2020). Hypermethylation of corticotropin releasing hormone receptor-2 gene in ulcerative colitis associated colorectal cancer. *In Vivo*, 34, 57–63.

La Fleur, S.E., Wick, E.C., Idumalla, P.S., Grady, E.F., Bhargava, A. (2005). Role of peripheral corticotropin-releasing factor and urocortin II in intestinal inflammation and motility in terminal ileum. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 102, 7647–7652.

Lee, Y.J., Lee, S.J., Jhon, G. J., Lee, Y.S. (2006). Enhanced radiosensitization of p53 mutant cells by oleamide. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*, 64, 1466–1474.

Liu, Y., Fang, X., Yuan, J., Sun, Z., Li, C., Li, R., Li, L., Zhu, C., Wan, R., Guo, R., Jin, L., Li, S. (2014). The role of corticotropin-releasing hormone receptor 1 in the development of colitis-associated cancer in mouse model. *Endocr. Relat. Cancer*, 21, 639–651.

Makrigiannakis, A., Margioris, A.N., Chatzaki, E., Zoumakis, E., Chrousos, G.P., Gravanis, A. (1999). The decidualizing effect of progesterone may involve direct transcriptional activation of corticotrophin-releasing hormone from human endometrial stromal cells. *Mol. Hum. Reprod*, 5, 789–796.

Martınez, V., Wang, L., Mıllıon, M., Rıvıer, J., Taché, Y. (2004). Urocortins and the regulation of gastrointestinal motor function and visceral pain. *Peptides*, 25, 1733–1744.

Massarweh, N.N., El-Serag, H.B. (2017). Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Control*, 24, 1073274817729245.

Miceli, F., Ranelletti, F.O., Martinelli, E., Petrillo, M., Scambia, G., Navarra, P., Ferrandina, G. (2009). Expression and subcellular localization of CRH and its receptors in human endometrial cancer. *Mol. Cell. Endocrinol*, 305, 6–11.

Minas, V., Rolaki, A., Kalantaridou, S.N., Sidiropoulos, J., Mitrou, S., Petsas, G., Jeschke, U., Paraskevaidis, E.A., Fountzilas, G., Chrousos, G.P., Pavlidis, N., Makrigiannakis, A. (2007) Intratumoral CRH modulates immuno-escape of ovarian cancer cells through FasL regulation. *Br. J. Cancer*, 97, 637–645.

Njoku, K., Abiola, J., Russell, J., Crosbie, E.J. (2020). Endometrial cancer prevention in high-risk women. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*, 65, 66–78.

Ovejoy, D.A., Balment, R.J. (1999). Evolution and physiology of the corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol*, 115: 1–22.

Paschos, K. A., Chouridou, E., Koureta, M., Lambropoulou, M., Kolios, G., & Chatzaki, E. (2013). The corticotropin releasing factor system in the liver: expression, actions and possible implications in hepatic physiology and pathology. *Hormones*, 12: 236–245.

Pothoulakis, C., Torre-Rojas, M., Duran-Padilla, M.A., Gevorkian, J., Zoras, O., Chrysos, E., Chalkiadakis, G., Baritaki, S. (2018). CRHR2/Ucn2 signaling is a novel regulator of miR-7/YY1/Fas circuitry contributing to reversal of colorectal cancer cell resistance to Fas-mediated apoptosis. *Int. J. Cancer*, 142, 334–346.

Quintanar, J.L., Guzmán-Soto, I. (2013). Hypothalamic neurohormones and immune responses. *Front. Integr. Neurosci*, 7, 56.

Rodriguez, J.A., Huerta-Yepez, S., Law, I.K., Baay-Guzman, G.J., Tirado-Rodriguez, B., Hoffman, J.M., Iliopoulos, D., Hommes, D.W., Verspaget, H.W., Chang, L., Pothoulakis, C., Baritaki, S. (2015). Diminished expression of CRHR2 in human colon cancer promotes tumor growth and EMT via persistent IL-6/Stat3 signaling. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol*, 1, 610–630.

Sarathi, A., Palaniappan, A. (2019). Novel significant stage-specific differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 19, 663.

Saruta, M., Takahashi, K., Suzuki, T., Torii, A., Kawakami, M., Sasano, H. (2004). Urocortin 1 in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 89, 5352–5361.

Sasaki, A., Liotta, A.S., Luckey, M.M., Margioris, A.N., Suda, T., Krieger, D.T. (1984). Immunoreactive corticotropin-releasing factor is present in human maternal plasma during the third trimester of pregnancy. *J. Clin. Endocr*, 59, 812–814.

Simopoulos, C., Christodoulou, E., Lambropoulou, M., Tsaroucha, A. K., Kakolyris, S., Polychronidis, A., Karayiannakis, A.J., Chatzaki, E. (2009). Neuropeptide urocortin 1 and its receptors are expressed in the human liver. *Neuroendocrinol*, 89, 315–326.

Skelton, K.H., Owens, M.J., Nemeroff, C.B. (2000). The neurobiology of urocortin. *Regul. Pept*, 93, 85–92.

Suda, T., Tomori, N., Yajima, F., Odagiri, E., Demura, H., Shizume, K. (1986). Characterization of immunoreactive corticotropin and corticotropin-releasing factor in human adrenal and ovarian tumours. *Acta Endocrinol*, 111, 546–552.

Tache, Y., Larauche, M., Yuan, P.Q., Million, M. (2018). Brain and gut CRF signaling: biological actions and role in the gastrointestinal tract. *Curr. Mol. Pharmacol*, 11, 51–71.

Taché, Y., Million, M. (2015). Role of corticotropin-releasing factor signaling in stress-related alterations of colonic motility and hyperalgesia. *J. Neurogastroenterol. Motil*, 21, 8–24.

Takahashi, K., Totsune, K., Murakami, O., Saruta, M., Nakabayashi, M., Suzuki, T., ... Shibahara, S. (2004). Expression of urocortin III/stresscopin in human heart and kidney. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 89, 1897–1903.

Takefuji, M., Murohara, T. (2019). Corticotropin-releasing hormone family and their receptors in the cardiovascular system. *Circ. J,* 83, 261–266.

Taliouri, E., Vrekoussis, T., Vergetaki, A., Agorastos, T., Makrigiannakis, A. (2012). Corticotropin-releasing hormone (CRH) is expressed in the human cervical carcinoma cells (HeLa) and upregulates the expression of Fas ligand. *Tumour Biol*, 34, 125–130.

Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, 213, 1394–1397.

Xia, H.B., Wang, H.J., Fu, L.Q., Wang, S.B., Lı, L., Ru, G.Q., He, X.L., Tong, X.M., Mou, X.Z., Huang, D.S. (2018). Decreased CRHBP expression is predictive of poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol. Lett*, 16, 3681–3689.

Yang, K., Xiao, Y., Xu, T., Yu, W., Ruan, Y., Luo, P., Cheng, F. (2020). Integrative analysis reveals CRHBP inhibits renal cell carcinoma progression by regulating inflammation and apoptosis. *Cancer Gene Ther*, 27, 607–618.

Zhao, Y., Wang, M.Y., Hao, K., Chen, X.Q., Du, J.Z. (2013). CRHR1 mediates p53 transcription induced by high altitude hypoxia through ERK 1/2 signaling in rat hepatic cells. *Peptides*, 44, 8–14.

Zhou, J.N., Fang, H. (2018). Transcriptional regulation of corticotropin-releasing hormone gene in stress response. *IBRO Rep*, 5, 137–146.

BÖLÜM 3

CABBAGE (*BRASSİCA OLERACEA VAR*. CAPİTATA F. ALBA)

Doç. Dr. Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN
Doç. Dr. H. Turan AKKOYUN

[1]Siirt Üniversitesi, Faculty of Veterinary Medicine Department of Basic Sciences ABD/Siirt. Türkiye.email:mahireakkoyun@siirt.edu.tr, ORCID 1: 0000-0001-5150-5402
[2]Siirt Üniversitesi, Faculty of Veterinary Medicine Department of Basic Sciences ABD/Siirt.Türkiye.email:turanakkoyun@hotmail.com, ORCID 2: 0000-0002-4547-8003

1. CABBAGE (*BRASSİCA OLERACEA VAR*. CAPİTATA F. ALBA)

Lahana (Brassica oleracea var. capitata L.), esas olarak dünyanın kuzey ekstratropikal bölgesinde yayılan ve Atlantik'in Avrupa kıyılarında ve Akdeniz'de yetişen yabani türlerden kaynaklanan Brassicaceae familyasına aittir(Leike, 1988). Turpgiller olarak adlandırılan Brassicaceae familyası, yaklaşık 338 cins ve 3700'den fazla tür ile tüm dünyada en çok yetiştirilen ve tüketilen türlerden biri olarak öne çıkıyor(Shankar ve ark.,2019;Ayadi ve ark.,2022). Brassica oleracea türünün mevcut çeşitleri**(Tablo1).**(Alexandra ve ark.,2020).

No.	Popular name	Latin name
1	Wild cabbage	*Brassica oleracea var*. oleracea
2	Cabbage	*Brassica oleracea var*. capitata f. alba
3	Savoy Cabbage	*Brassica oleracea var*. capitata f. sabauda
4	Red Cabbage	*Brassica oleracea var*. capitata f. rubra
5	Cone Cabbage	*Brassica oleracea var*. capitata f. acuta
6	Ornamental kale	*Brassica oleracea var*. acephala
7	Brussels sprout	*Brassica oleracea var*. gemmifera
8	Broccoli	*Brassica oleracea var*. italica
9	Kohlrabi	*Brassica oleracea var*. gongylodes
10	Cauliflower	*Brassica oleracea var*. botrytis
11	Gai Ian	*Brassica oleracea* var. *alboglabra*
12	Collard greens	*Brassica oleracea var*. viridis
13	Jersey cabbage	*Brassica oleracea var*. longata
14	Kale	*Brassica oleracea var*. sabellica
15	Lacinato kale	*Brassica oleracea var*. palmifolia
16	Perpetual kale	*Brassica oleracea var*. ramosa
17	Marrow cabbage	*Brassica oleracea var*. medullosa
18	Tronchuda kale	*Brassica oleracea var*. costata
19	Broccoflower	*Brassica oleracea var*. botrytis *x italica*
20	Broccolini	*Brassica oleracea var*. italica × *alboglabra*
21	Kalette	*Brassica oleracea var*. viridis *x gemmifera*

Beyaz lahana, adını Latince 'capita' (baş) kelimesinden alan capitata grubuna aittir. Kelimenin tam anlamıyla söylendiği gibi, yapraklar şekil, renk ve yaprak dokusu bakımından değişebilen karakteristik lahana kafalarına (Şekil 1a) dönüşür ve bu da çeşitli iklim koşullarında yetiştirme potansiyeline sahip çok sayıda lahana çeşidinin ortaya çıkmasına neden olur (Samec ve ark.,2017; Björkman ve ark.,2011). Beyaz lahana, bilinen en eski kültür bitkilerinden biridir. B. oleracea eski zamanlardan beri yetiştirilmektedir. Lahananın kesin tarihini takip etmek zordur. Brassica cinsinin mahsulleri kayıtlara göre, Hindistan'da MÖ 3000'e kadar kullanıldı. Lahananın atalarının yaklaşık 8000 yıl önce Avrupa kıyılarında yetiştiğine dair bazı inanışlar vardır(Samec ve ark.,2017; Al-Shehbaz,2011).



Şekil 1. Beyaz lahana (Brassica oleracea var. capitata f. alba)(Samec ve ark.,2017)

Beyaz lahana (Brassica oleracea L. var. capitata f. alba), Brassicaceae familyasının Avrupa'da tüketilen en önemli sebze ürünlerinden biridir ve Hırvatistan'da uzun bir yetiştirme geleneğine sahiptir. Esas olarak yerel üreticilerin artan uygulamaları, tüketici tercihleri, kabul edilebilir fiyat ve yerel pazarlardaki bulunabilirliği nedeniyle popülerdir(Samec ve ark.,2014). Lahana, Yunan, Roma ve Mısır uygarlıklarının geleneksel tıbbında kabızlık ve diğer gastrointestinal sorunları gidermek için yaygın olarak kullanılmıştır (UuH-Narvaez ve Segura, 2021). Lahana ve lahana ürünleri hem pazarlama hem de beslenme açısından ilgi çekicidir çünkü lahananın sağlık üzerinde birçok yararlı etkisi vardır(Jnako ve ark.,2011). Beyaz lahana birçok ülkenin kültüründe ve geleneksel mutfağında önemli bir yere sahiptir ve geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Uygun fiyatı ve yerel pazarlarda bulunabilmesi nedeniyle beyaz lahana, insan beslenmesinde önemli bir bitkisel besin kaynağı olarak öne çıkmaktadır. Uzun süre ham olarak saklanabilir ve bu nedenle yıl boyunca

kullanılabilir. Salatalarda taze olarak kullanılmasının yanı sıra genellikle kaynatılır, tavada kızartılır veya fermente ürün olarak tüketilir(Hatfield,2004; Cavender,2006; Passalacqua ve ark.,2007). Brassicaceae familyasına ait Brassica L. cinsi, tarım ve bahçecilikte önemli rol oynamanın yanı sıra ekonomiye de katkı sağlamaktadır. Çeşitli agronomik özelliklere sahip başlıca sebze ve yağlı tohum ürünlerini içeren çok sayıda türü içerir (El-Esawi,2015). Ticari üreticiler arasında popüler olan serin mevsim ürünü olup bununla birlikte, taze ve işlenmiş formlarda kullanılmak üzere dünyanın herhangi bir yerinde yetiştirilebilir (Lounsbury ve ark.,2021). Lahana, farklı iklim ve toprak koşullarına uyum sağlaması nedeniyle dünya çapında bilinen bir sebze ürünü olup Etiyopya, lahana üretimi için uygun edafik ve iklim koşullarına sahiptir ve lahana, yüksek organik madde içeriğine sahip ağır killi topraklara göre hafif kumu tercih eder (Tan,1999; Saha ve ark.,2021). İdeal olan toprak pH değeri 5,5 ile 6,5 arasındadır ve pH'ı 6.5'in üzerinde olan topraklarda yapraklar kararır (Alemayehu ve ark.,2021; Ackah,2021; Gelaye ve Tadele, 2022). Beyaz lahana ayrıca, antioksidan, antikanser ve potansiyel anti-obezite özellikleri gösteren polifenolikler, glukosinolatlar, karotenoidler ve C vitamini gibi fitokimyasallardaki zenginlik nedeniyle daha popüler hale gelmiştir(Samec ve ark.,2014).

1.1.Polifenoller

Polifenoller, sebzelerin, meyvelerin, tahılların ve içeceklerin doğal olarak oluşan kimyasal bileşenleridir. Bunlar, kendilerine bağlı tekli veya çoklu hidroksil (OH) grupları ile bir veya daha fazla aromatik halka yapısı içeren en az 10.000 maddeden oluşan karmaşık bir kategoridir. Sebze ve meyvelerin çoğu, ikincil metabolik yan ürünler olarak polifenoller içerir. Bitkiler, farklı iç (serbest radikaller) veya çevresel (ultraviyole ışınları, mantarlar, böcekler ve hayvanlar) streslere karşı korunmak için genellikle polifenolleri sentezler. Ayrıca polifenoller, özellikle gıda ve kozmetik formülasyonlarında olmak üzere bitkilerin organoleptik özelliklerinde de önemli bir rol oynayabilir(Pandey ve Rizvi,2009a ; Rana ve ark.,2022). Bitkilerde bol miktarda bulunan organik bileşikler olan polifenoller, son yıllarda beslenmede gelişmekte olan bir ilgi alanı haline gelmiştir. Artan sayıda araştırma, polifenol tüketiminin metabolizma, kilo, kronik hastalık ve hücre çoğalmasının düzenlenmesi yoluyla sağlıkta hayati bir rol oynayabileceğini

göstermektedir(Lecour ve Lamont,2011;Cory ve ark.,2018). Son 20 yılda Araştırmacılar çeşitli meyve ve bitki bazlı gıdalarda polifenoller ve miktarları ile ilgilenmektedirler.Polifenollerin antioksidan etkilerinin ve bunların kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi oksidatif stres ile ilişkili birçok hastalığın önlenmesindeki olası işlevlerinin tanınması, bu ilginin ana açıklamasıdır. Beyaz lahana, glukozinolatlar ve türevlerine kıyasla iyi bir fenolik bileşik kaynağı olarak da tanımlanmıştır(Alexandra ve ark.,2020; Samec ve ark.,2017).

1.2.Glukosinolatlar

Glukosinolatlar (GS'ler), Brassicales takımından bitkilerde yaygın olarak bulunan doğal, kükürt açısından zengin anyonik ikincil metabolitlerdir(Maina ve ark.,2020). Glukozinolatlar yapısal olarak, tiyo-oksim-O-sülfatların β-S-glukozitleridir. Temel olarak amino asitlerden sentezlenirler. Genel olarak yan zincirlerine göre alifatik, indolik ve aromatik glukosinolatlara ayrılırlar.Bu da öncü amino asitler metionin, triptofan ve fenilalaninden kaynaklanır. Bitkinin farklı kısımları arasında Glukosinolatların profili ve bolluğu, değişiklik gösterir(Van Dam ve ark.,2009;Förster ve ark.,2015). Brokoli, lahana, Çin lahanası, turp, su teresi ve roka gibi ekonomik açıdan önemli pekçok sebzeyi barındıran Brassicaceae familyasını içerir (Blazevic ve ark.,2020). Anti-kanserojen özelliklere sahip bileşikler için Glukosinolatlar, öncü görevi görürler (Soundararajan ve Kim,2018). Yapılan çalışmalar bu aileye ait sebzelerle yapılan zengin bir diyetin kanser riskini azalttığını göstermektedir (Bosetti ve ark.,2012;Hsu ve ark.,2007;Kirsh ve ark.,2007;Lam ve ark.,2010;Seow ve ark.,2002;Liu ve ark.,2020).

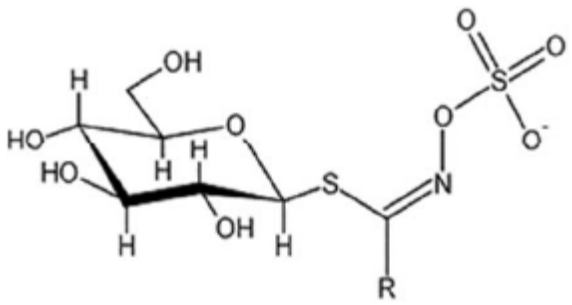


Figure 1: Glukosinolatların genel yapısı(Sanlier ve Guler,2018)

1.3. Karotenoidler ve C Vitamini

Karotenoidler, renk yoğunluğunun genellikle karotenoid sayısıyla ilişkili olduğu bitkilerde, mantarlarda, bakterilerde ve alglerde doğal olarak bulunan, yağda çözünen, yüksek oranda doymamış kırmızı, turuncu veya sarı pigmentlerdir. Karotenoidler doğal olarak sebze ve meyvelerde bol miktarda bulunur. Ayrıca bazı fotosentetik bakteri ve algler de bu bileşiklerin iyi kaynaklarıdır (Martin,2009; Bhatt ve Patel,2020). Birçoğu A vitamini öncüleridir (yani β-karoten, γ-karoten ve β-kriptoksantin) ve konjuge çift bağları nedeniyle hem radikal süpürücü hem de singlet oksijen söndürücüdürler. Düşük serum β-karoten seviyeleri, sigara içenler arasında artan miyokard enfarktüsü riskinin yanı sıra daha yüksek kanser ve kardiyovasküler hastalık oranlarıyla ilişkilendirilmiştir(Rice-Evans ve ark.,1997;Podsedek,2007). Karotenoidler, terpenlerle birlikte en baskın yağda çözünen ikincil bitki metabolitleridir. 700'den fazla karotenoid tanımlanmıştır, ancak günlük diyette sadece 100 kadar karotenoid rol oynamaktadır(Bohn,2008;Kaulmann ve ark.,2014). 1980'lerden bu yana, sağlığı geliştiren olası bileşikler olarak karotenoidlere olan ilgi önemli ölçüde artmıştır(Melendez-Martinez ve ark.,2022). Karotenoidler elektron taşıma ajanları olarak hareket ederler ve organları, dokuları ve hücreleri singlet oksijen, oksijen radikalleri ve lipid peroksitlerin zarar verici etkisinden korumada çok önemli roller oynarlar (Milani ve ark.,2017; Zhuang ve ark.,2022). C vitamini Szent-Gyorgyi (1928) tarafından keşfedilmiştir. Yapısal olarak glikozla ilişkili altı karbonlu bir bileşiktir ve birbiriyle dönüştürülebilir iki bileşikten oluşur (Stangeland ve ark.,2008).C vitamini, 2 L izomerinden oluşan bir redoks sistemini temsil eder:indirgenmiş durumda askorbik asit (C vitamini) ve oksitlenmiş durumda dehidroaskorbik asit (DHA)(Schlueter ve Johnston,2011). C vitamini oral veya intravenöz olarak uygulanabilir ve doyurucu bir aktif taşıma mekanizması yoluyla ince bağırsakta verimli bir şekilde emilir. C vitamininin düşük oral dozlarının (4 - 64 mg) emilim etkinliği %98'e kadar çıkabilir (Padayatty ve ark.,2004; Adikwu ve Deo ,2013).Gıda koruyucu olarak yaygın olarak kullanılan izoaskorbik (e;ritorbik) asit, L-askorbik asit ile benzer antioksidan özelliklere sahiptir(Sauberlich ve ark.,1989;Rock ve ark.,1996). C vitamini, biyosentetik yoldaki bir anahtar enzimin kaybı nedeniyle insanlar tarafından sentezlenemeyen temel bir besindir (Carr ve Maggini,2017). C vitamini, sayısız işlevinden sorumlu olan bir

elektron donörüdür (Amrein ve ark.,2018). Nörotransmiterlerin (noradrenalin, serotonin), kortizol, peptit hormonları (vazopressin) ve kolajenin biyosentezi için kofaktör/kosubstrattır. C vitamini suda çözünen en güçlü antioksidandır. Doğrudan radikalleri temizler ve diğer antioksidanları geri dönüştürür ve kollajen sentezini teşvik ederek ve endotelyal vazodilatasyon ve bariyer fonksiyonunu koruyarak endoteli korur (Amrein ve ark.,2018,Oudemans-van,2014). C vitamini çeşitli enzimlerin (örneğin belirli monoksijenazlar ve dioksijenazlar) gerekli indirgenmiş formlarında korunmasına yardımcı olur(Sauberlich,1994)**.**C vitamini ayrıca insanlarda katekolaminlerin (dopaminin norepinefrine dönüştürülmesi yoluyla), L-karnitin, kolesterol, amino asitler ve bazı peptit hormonlarının biyosentezi gibi birkaç önemli hidroksilasyon reaksiyonunda yardımcı faktör olarak hizmet eder(Grosso ve ark.,2013).

2.BRASSİCA OLERACEA VAR. CAPİTATA L.FARMAKOLOJİSİ

2.1.Antioksidan Aktivite

Brassica bitkilerinin, başta polifenoller, flavonoidler ve askorbik asit olmak üzere antioksidan fitokimyasalların varlığı nedeniyle antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Bu fitokimyasal bileşiklerin çoğu, hidrojen verme ve azaltma yeteneklerinden dolayı antioksidan görevi görür. Polifenoller, metal iyon şelatörleri gibi davranan ve serbest radikallere proton vererek lipit peroksidasyonu dahil olmak üzere oksidasyon reaksiyonlarına müdahale eden fitokimyasallardır. Fenoksi radikalleri, oksidasyon zincir reaksiyonunu durdurmak için nispeten kararlıdır. Bu nedenle, yeni oksidasyon zincir reaksiyonunun başlamasını durdururlar ve serbest radikalleri yakalayarak yayılma yollarını sonlandırırlar (Mandal ve ark.,2010;Nawaz ve ark.,2018). **S**erbest radikaller, eksik bir elektronu olan ve elektrokimyasal stabilitelerini elde etmek için kararlı moleküllerin bir elektronunu yakalama eğiliminde olan çok reaktif atomlar veya atom gruplarıdır ve bu, hücrelere zarar veren bir zincirleme reaksiyon başlatır. Bir antioksidan ajan, bu serbest radikallerin oluşumunu engeller veya yayılmasını engeller(Atasoy ve ark.,2019;Huang ve ark.,2005;Favela-Gonzalez ve ark.,2020). Son yıllardaki yoğun araştırmalar, serbest radikallerin insan metabolizmasındaki önemine odaklanmış ve aktivitelerinin karmaşık olduğunu ve çok sayıda faktörden etkilendiğini ortaya

koymuştur. Araştırmalar, sebzelerdeki fenolikler veya C vitamini gibi biyolojik olarak aktif bileşiklerin miktarı ile sebzelerin antioksidan özellikleri arasındaki ilişkiyi doğrulamıştır (Borowski ve ark.,2005;İsmail ve ark.,2004). Brassica sebzesinin sağlığa yararlı etkileri, temel olarak, karotenoidler, polifenolikler, flavonoidler, glukosinolatlar hidroliz ürünleri vb. gibi kanıtlanmış antioksidan aktiviteye sahip biyoaktif bileşiklerin varlığı ile ilişkilendirilmiştir(Podsedek,2007;Singh ve ark.,2007;Cartea ve ark.,2011)

2.2. Antikanser

Doğal ürünlerin kansere karşı koruyucu etkileri son yılda yapılan pek çok çalışma ve projede ortaya koymuştur. Kansere karşı koruyucu rol çoğunlukla, tipik olarak turpgillerden sebzelerde bulunan yüksek GLS içeriğine bağlanmıştır (Ishida ve ark.,2014). İn vitro biyoanalizler, potansiyel kanser terapötik aktivitesi için çeşitli ekstraktları veya doğal ürünleri taramak için yaygın olarak kullanılır. Bu analizler genellikle insan veya diğer hayvan tümörlerinden neoplastik hücre dizilerinin oluşturulduğu hücre kültürü sistemlerine dayanır. Test edilen bileşiklerin kültürde bu kanser hücrelerinin büyümesini (proliferasyonunu) önleme yeteneği, in vivo bir kanser terapötik ajanı olarak potansiyel değerin bir göstergesi olarak alınır (Lieberman ve ark. 2001). Beyaz lahana özleri, potansiyel kanser terapötik aktivitelerini belirlemek için çeşitli in vitro deneylere dahil edilmiştir (Samec ve ark.,2017; Lieberman ve ark.,2001). Birçok araştırma, yüksek miktarda turpgillerden sebze tüketmenin daha düşük kanser insidansı ile bağlantılı olduğunu bulmuştur. Brassica sebzeleri, hücrelerde DNA onarımına yardımcı olan ve kanser hücrelerinin büyümesini engellemeye yardımcı olan bir kimyasal olan indol-3-karbinol içerir. Brassica sebzesi, güçlü antiviral, antibakteriyel ve antikanser aktivitesi ile doğuştan gelen bağışıklık tepki sisteminin güçlü modülatörüdür(Sundaram ve ark.,2020).

2.3. Anti-Obezite Özellikleri

Obezite terimi 1998 yılında, “sağlığı bozan ve ölüm oranını artıran anormal veya aşırı yağ birikimi olarak tanımlanmıştır(Williams ve ark.,2013). Obezite, kendine verdiği zararlar ve başta sistemik hipertansiyon, koroner kalp hastalığı, solunum komplikasyonları ve tip 2 diabetes mellitus olmak üzere diğer tıbbi tehditlerle birlikteliği nedeniyle yetişkinler ve çocuklar arasında

dünya çapında ciddi bir sağlık sorunu olmasının yanı sıra; bazı kanser türlerinin artan insidansı ile ilişkilidir.Ayrıca obezite, artan sağlık bakım maliyetlerinin önemli bir nedeni olmuştur. Obezite prevalansı son yıllarda giderek artmaktadır. Bu nedenle, obezite insidansını önlemek ve azaltmak için yeni yollar bulmak çok önemlidir. Son zamanlarda obeziteyi tedavi etmek ve önlemek için tıpkı diyet ve egzersiz gibi bir takım stratejiler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu iki strateji her zaman faydalı değilse, bir sonraki seçenek farmakolojik tedavi olmalıdır(Jaradat ve ark.,2017;James ve ark.,2001; Jaradat ve ark.,2017b;Tapsel ve ark.,2014). Düşük kalori değeri ve çok sayıda fitokimyasal nedeniyle beyaz lahana, birçok geleneksel ve ticari kilo verme diyetinde yer alan popüler bir sebzedir(Greenly,2004). Chiplonkar ve ark. (1999) vejeteryan diyetlerine lahana eklenmesi, hem olmayan demirin biyolojik olarak kullanılabilir içeriğini önemli ölçüde artırdığı ve vejetaryenler veya demir eksikliği anemisinden muzdarip kısıtlı diyet uygulayan kişiler için önerilir(Chiplonkar ve ark.,1999). Suido ve ark. (2002), hiperkolesterolemik hastalarda brokoli ve lahana içeren konserve karışık yeşil sebze ve meyve içeceğinin serum lipid düzeyleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Otuz bir yetişkine 3 hafta boyunca günde iki kutu içecek (160 g/kutu) verilmiş ve serum toplam kolesterol seviyeleri ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını gözlemlenmişdir(Suido ve ark.,2002).

2.4.Gastrointestinal Aktivite

Brassica oleracea bitkileri, farklı kültürlerin geleneksel tıbbında gastrointestinal sorunları tedavi etmek için kullanıldığı bildirilmiştir(Samec ve ark.,2019c). Brassica oleracea'nın Brezilya halkı tarafından gastrit ve mide ülserlerinin tedavisinde en yaygın olarak kullanılan bitki olduğu bildirilmişdir(Silva ve ark.,2006). Yapılan başka bir çalışmada aspirinle indüklenen ülser modelinde Brassica oleracea'nın kurutulmuş yapraklarından elde edilen tozu değerlendirmiştir ve mide koruyuculuğunda artış gözlenmiştir(Akhtar ve Munir,1989). Enye ve ark.,2013;Oguwike ve ark.,2014).'ın yapmış oldukları çalışmada; Lahana özü, kimyasal ajanın neden olduğu ülser oluşumunu önemli ölçüde engellediği ve bu bitkinin mide rahatsızlıklarının tedavisinde faydasının olabileceğini belirtmişlerdir (Enye ve ark.,2013;Oguwike ve ark.,2014).

4.KAYNAKLAR

Ackah, M. A. (2021). Mineral nitrogen and salicylic acid rates and their effects on yield, quality and alternaria blight incidence in cabbage (Doctoral dissertation, University of Cape Coast).

Adikwu, E., Deo, O. (2013). Hepatoprotective effect of vitamin C (ascorbic acid). *Pharmacology & Pharmacy*, *4*(01), 84-92.

Akhtar, M.S., Munir, M. (1989). Evaluation op the gastric antiulcerogenic effects of Solanum nigrum, Brassica oleracea and Ocimum basilicum in rats. *Journal of ethnopharmacology*, *27*(1-2), 163-176.

Al-Shehbaz IA (2011) Brassicaceae (Mustard Family). In: eLS. Wiley, Chichester.

Alemayehu, Y. A., Asfaw, S. L., Terfie, T. A. (2021). Reusing urine and coffee processing wastewater as a nutrient source: effect on soil characteristics at optimum cabbage yield. *Environmental Technology & Innovation*, *23*, 101571.

Alexandra, Ș. I. M., Andreea Daniela, O. N. A.(2020). Cabbage (Brassıca Oleracea L.). Overvıew Of The Health Benefits And Therapeutıcal Uses. Hop and Medicinal Plants, Year XXVIII, No. 1-2.

Amrein, K., Oudemans-van Straaten, H. M., Berger, M. M. (2018). Vitamin therapy in critically ill patients: focus on thiamine, vitamin C, and vitamin D. *Intensive care medicine*, *44*, 1940-1944.

Atasoy, A. D., Yesilnacar, M. I., Atasoy, A. F. (2019). Essential element contents of Turkish black tea. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Non-alcoholic beverages* (pp. 63– 72). Duxford, UK: Elsevier Inc.

Ayadi, J., Debouba, M., Rahmani, R., & Bouajila, J. (2022). Brassica Genus Seeds: A Review on Phytochemical Screening and Pharmacological Properties. *Molecules*, *27*(18), 6008.

Bhatt, T.,Patel, K. (2020). Carotenoids: potent to prevent diseases review. *Natural Products and Bioprospecting*, *10*, 109-117.

Björkman, M., Klingen, I., Birch, A. N., Bones, A. M., Bruce, T.J., Johansen, T. J., Stewart, D. (2011). Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health–Influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry*, *72*(7), 538-556.

Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., Olsen, C. E., Burow, M., Rollin, P., & Agerbirk, N. (2020). Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. *Phytochemistry*, *169*, 112100.

Bohn, T. (2008). Bioavailability of non-provitamin A carotenoids. *Current Nutrition & Food Science*, *4*(4), 240-258.

Borowski J, Borowska EJ, Szajdek A (2005) Bromat Chem Toksyl 38:125–13.

Borowski, J., Szajdek, A., Borowska, E. J., Ciska, E., & Zieliński, H. (2008). Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (Brassica oleracea L.). *European Food Research and Technology*, *226*, 459-465.

Bosetti, C., Filomeno, M., Riso, P., Polesel, J., Levi, F., Talamini, R., ... & La Vecchia, C. (2012). Cruciferous vegetables and cancer risk in a network of case–control studies. *Annals of Oncology*, *23*(8), 2198-2203.

Carr, A. C., Maggini, S. (2017). Vitamin C and immune function. *Nutrients*, *9*(11), 1211.

Cavender, A. (2006). Folk medical uses of plant foods in southern Appalachia, United States. *Journal of Ethnopharmacology*, *108*(1), 74-84.

Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P (2011) Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules*, 16,251–280

Chiplonkar, S.A., Tarwadi, K. V., Kavedia, R. B., Mengale, S. S., Paknikar, K.M., Agte, V. V. (1999). Fortification of vegetarian diets for increasing bioavailable iron density using green leafy vegetables. *Food Research International*, *32*(3), 169-174.

Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., Mattei, J. (2018). The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. *Frontiers in nutrition*, *5*, 87.

El-Esawi, M. A. (2015). Taxonomic relationships and biochemical genetic characterization of Brassica resources: Towards a recent platform for germplasm improvement and utilization. *Annual Research & Review in Biology*, 1-11.

Enye, J. C., Chineke, H. N., Onubeze, D. P. M., Nweke, I. (2013). Evaluation of the healing effects of aqueous extracts of Musa Paradisiaca (unripe plantain) and Brassica oleracea (cabbage) on peptic ulcer. *IOSR J Dental Med Sci*, *8*(6), 40-46.

Favela-González, K. M., Hernández-Almanza, A. Y., De la Fuente-Salcido, N. M. (2020). The value of bioactive compounds of cruciferous vegetables (Brassica) as antimicrobials and antioxidants: A review. *Journal of Food Biochemistry*, *44*(10), e13414.

Förster, N., Ulrichs, C., Schreiner, M., Müller, C. T., Mewis, I. (2015). Development of a reliable extraction and quantification method for glucosinolates in Moringa oleifera. *Food chemistry*, *166*, 456-464.

Gelaye, Y., Tadele, E. (2022). Agronomic Productivity and Organic Fertilizer Rates on Growth and Yield Performance of Cabbage (Brassica oleracea var. capitata L.) in Northwestern Ethiopia. *The Scientific World Journal*, *2022*.

Greenly, L.W. (2004). A doctor's guide to diet plans from A-Z. J Chiropr Med 3:25–32.

Grosso, G., Bei, R., Mistretta, A., Marventano, S., Calabrese, G., Masuelli, L., Gazzolo, D. (2013). Effects of vitamin C on health: a review of evidence. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *18*(3), 1017-1029.

Hatfield G (2004) Encyclopedia of folk medicine: old world and new world traditions. ABC-CLIO, pp 59–60. ISBN 978-1- 57607-874-7.

Horubała A, (1999) Przem Ferm Owoc Warz 3:30–32.

Hsu, C. C., Chow, W. H., Boffetta, P., Moore, L., Zaridze, D., Moukeria, A., Brennan, P. (2007). Dietary risk factors for kidney cancer in Eastern and Central Europe. *American journal of epidemiology*, *166*(1), 62-70.

Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1841– 1856.

Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., Morimitsu, Y. (2014). Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding science*, *64*(1), 48-59.

Ismail, A, Zamaliah, M.M, Foong, C.H.W. (2004). *Food Chem* 87,581–58.

James, P. T., Leach, R., Kalamara, E., & Shayeghi, M. (2001). The worldwide obesity epidemic. *Obesity research*, *9*(S11), 228S-233S.

Janko, C., Jelica, G. V., Svetlana, G. (2011). Local cabbage (Brassica oleracea var. capitata L.) populations from Serbian Province of Vojvodina. *African Journal of Biotechnology*, *10*(27), 5281-5285.

Jaradat, N. A., Zaid, A. N., Hussen, F., İyad, A. L. İ. (2017). The effects of preservation methods of grapevine leaves on total phenols, total flavonoids and antioxidant activity. *Marmara Pharmaceutical Journal*, *21*(2), 291-297.

Jaradat, N., Zaid, A. N., Zaghal, E. Z. (2017). Anti-lipase activity for Portulaca oleracea, Urtica urens, Brassica napus and Lathyrus hierosolymitanus wild plants from Palestine. *Marmara Pharmaceutical Journal*, *21*(4), 828-836.

Kapusta-Duch, J., Kusznierewicz, B. (2021). Young shoots of white and red headed cabbages like novel sources of glucosinolates as well as antioxidative substances. *Antioxidants*, *10*(8), 1277.

Kaulmann, A., Jonville, M. C., Schneider, Y. J., Hoffmann, L., Bohn, T. (2014). Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of Brassica oleraceae and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. *Food chemistry*, *155*, 240-250.

Kirsh, V. A., Peters, U., Mayne, S. T., Subar, A. F., Chatterjee, N., Johnson, C. C., & Hayes, R. B. (2007). Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *99*(15), 1200-1209.

Lam, T. K., Ruczinski, I., Helzlsouer, K. J., Shugart, Y. Y., Caulfield, L. E., Alberg, A. J. (2010). Cruciferous Vegetable Intake and Lung Cancer Risk: A Nested Case-Control Study Matched on Cigarette SmokingCruciferous Vegetable Intake and Lung Cancer Risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, *19*(10), 2534-2540.

Lecour S, Lamont KT. Natural polyphenols and cardioprotection. *Mini Rev Med Chem.* (2011) 11:1191–9.

Leike, H. (1988). Cabbage (Brassica oleracea var. capitata L.). *Crops II*, 226-251.

Lieberman MM, Patterson GML, Moore RE (2001) In vitro bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other assay parameters on growth inhibitory activity. Cancer Lett 173:21–29

Liu, Y., Rossi, M., Liang, X., Zhang, H., Zou, L., Ong, C. N. (2020). An integrated metabolomics study of glucosinolate metabolism in different Brassicaceae genera. *Metabolites*, *10*(8), 313.

Lounsbury, N. P., Warren, N. D., Wolfe, S. D., Smith, R. G. (2020). Investigating tarps to facilitate organic no-till cabbage production with high-residue cover crops. *Renewable Agriculture and Food Systems*, *35*(3), 227-233.

Maina, S., Misinzo, G., Bakari, G., & Kim, H. Y. (2020). Human, animal and plant health benefits of glucosinolates and strategies for enhanced bioactivity: A systematic review. *Molecules*, *25*(16), 3682.

Mandal, S. M., Chakraborty, D., Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant signaling & behavior*, *5*(4), 359-368.

Martin L., Chapter 21—Carotenoids, in *The Chlamydomonas Sourcebook* (Second Edition) vol 2 (Academic Press, New York, 2009) pp. 799–817.

Meléndez-Martínez, A. J., Mandić, A. I., Bantis, F., Böhm, V., Borge, G. I. A., Brnčić, M., O'Brien, N. (2022). A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: Status quo, applications, patents, and research needs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *62*(8), 1999-2049.

Milani A, Basirnejad M, Shahbazi S, Bolhassani A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *Br J Pharmacol.* (2017) 174:1290–324.

Nawaz, H., Shad, M. A., Muzaffar, S. (2018). Phytochemical composition and antioxidant potential of Brassica. *Brassica Germplasm Characterization, Breeding Utilization*, *1*, 7-26.

Oguwike, F. N., Offor, C. C., Nwadighoha, A. N., Ebede, S. O. (2014). Evaluation of efficacy of cabbage juice (Brassica oleracea Linne) as potential antiulcer aggent and its effect on the haemostatic mechanism of male albino Wistar rats. *J Dental Med Sci*, *13*(1), 92-97.

Oudemans-van Straaten HM, Spoelstra-de Man AM, de Waard MC (2014) Vitamin C revisited. Crit Care 18:460

Padayatty, S. J., Sun, H., Wang, Y., Riordan, H. D., Hewitt, S. M., Katz, A., Levine, M. (2004). Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Annals of internal medicine*, *140*(7), 533-537.

Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009a). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2**(5), 270–278.

Passalacqua NG, Guarrera PM, De Fine G (2007) Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). Fitoterapia 78:52–68

Podsędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, *40*(1), 1-11.

Rana, A., Samtiya, M., Dhewa, T., Mishra, V., Aluko, R. E. (2022). Health benefits of polyphenols: A concise review. *Journal of Food Biochemistry*, *46*(10), e14264.

Rice-Evans, C. A., Sampson, J., Bramley, P. M., & Holloway, D. E. (1997). Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo?. *Free radical research*, *26*(4), 381-398.

Rock, C. L., Jacob, R. A., Bowen, P. E. (1996). Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, *96*(7), 693-702.

Saha, C., Bhattacharya, P., Sengupta, S., Dasgupta, S., Patra, S. K., Bhattacharyya, K., Dey, P. (2021). Response of cabbage to soil test-based fertilization coupled with different levels of drip irrigation in an inceptisol. *Irrigation Science*, 1-15.

Šamec, D., Bogović, M., Vincek, D., Martinčić, J., Salopek-Sondi, B. (2014). Assessing the authenticity of the white cabbage (Brassica oleracea var. capitata f. alba) cv.'Varaždinski'by molecular and phytochemical markers. *Food research international*, *60*, 266-272.

Šamec, D., Pavlović, I., Salopek-Sondi, B. (2017). White cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*): botanical, phytochemical and pharmacological overview, Phytochemistry reviews, 16(1),117-135.

Šamec, D., Urlić, B., & Salopek-Sondi, B. (2019). Kale (Brassica oleracea var. acephala) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement. *Critical reviews in food science and nutrition*, *59*(15), 2411-2422.

Sanlier, N., Guler, S. M. (2018). The benefits of Brassica vegetables on human health. *J. Hum. Health Res*, *1*(1), 1-13.

Sauberlich, H. E. (1994). Pharmacology of vitamin C. *Annual review of nutrition*, *14*(1), 371-391.

Sauberlich, H. E., Kretsch, M. J., Taylor, P. C., Johnson, H. L., Skala, J. H. (1989). Ascorbic acid and erythorbic acid metabolism in nonpregnant women. *The American journal of clinical nutrition*, *50*(5), 1039-1049.

Schlueter, A. K., & Johnston, C. S. (2011). Vitamin C: overview and update. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, *16*(1), 49-57.

Seow, A., Yuan, J. M., Sun, C. L., Van Den Berg, D., Lee, H. P., & Yu, M. C. (2002). Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis*, *23*(12), 2055-2061.

Shankar, S., Segaran, G., Sundar, R. D. V., Settu, S., Sathiavelu, M. (2019). Brassicaceae-A classical review on its pharmacological activities. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, *55*(1), 107-113.

Singh J, Upadhyay AK, Prasad K, Bahadur A, Rai M (2007) Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in *Brassica* vegetables. *J Food Compos Anal*, 20,106–112

Silva, M. S. D., Antoniolli, A. R., Batista, J. S., Mota, C. N. D. (2006). Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrintestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. *Acta botanica brasilica*, *20*, 815-829.

Soundararajan, P., Kim, J. S. (2018). Anti-carcinogenic glucosinolates in cruciferous vegetables and their antagonistic effects on prevention of cancers. *Molecules*, *23*(11), 2983.

Suido, H., Tanaka, T., Tabei, T., Takeuchi, A., Okita, M., Kishimoto, T., Higashino, K. (2002). A mixed green vegetable and fruit beverage decreased the serum level of low-density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolemic patients. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(11), 3346-3350.

Sundaram, C. S., Kumar, J. S., Kumar, S. S., Ramesh, P. L. N., Zin, T., & Rao, U. M. (2020). Antibacterial and anticancer potential of Brassica oleracea var acephala using biosynthesised copper nanoparticles. *Med. J. Malaysia*, *75*(6), 677-684.

Stangeland, T., Remberg, S. F., Lye, K. A. (2009). Total antioxidant activity in 35 Ugandan fruits and vegetables. *Food Chemistry*, *113*(1), 85-91.

Tan, D. K. Y. (1999). Effect of temperature and photoperiod on broccoli development, yield and quality in south-east Queensland.

Tapsell, L. C., Batterham, M. J., Thorne, R. L., O'shea, J. E., Grafenauer, S. J., & Probst, Y. C. (2014). Weight loss effects from vegetable intake: a 12-month randomised controlled trial. *European journal of clinical nutrition*, *68*(7), 778-785.

Uuh-Narvaez, J. J., Segura-Campos, M. R. (2021). Cabbage (Brassica oleracea var. capitata): A food with functional properties aimed to type 2 diabetes prevention and management. *Journal of Food Science*, *86*(11), 4775-4798.

Van Dam, N. M., Tytgat, T.O., Kirkegaard, J. A. (2009). Root and shoot glucosinolates: a comparison of their diversity, function and interactions in natural and managed ecosystems. *Phytochemistry Reviews*, *8*, 171-186.

Williams, D. J., Edwards, D., Hamernig, I., Jian, L., James, A. P., Johnson, S. K., Tapsell, L. C. (2013). Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. *Food Research International, 52(1)*, 323-333.

Zhuang, C., Yuan, J., Du, Y., Zeng, J., Sun, Y., Wu, Y., Chen, H. D. (2022). Effects of Oral Carotenoids on Oxidative Stress: A Systematic Review and Meta-Analysis of Studies in the Recent 20 Years. *Frontiers in Nutrition*, *9*.

BÖLÜM 4

TIBBİ ÖNEMİ OLAN SİLYMARİN (SM)

Doç. Dr. Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN
Doç. Dr. H. Turan AKKOYUN

[1]Siirt Üniversitesi, Faculty of Veterinary Medicine Department of Basic Sciences ABD/Siirt. Türkiye.email:mahireakkoyun@siirt.edu.tr, ORCID 1: 0000-0001-5150-5402
[2]Siirt Üniversitesi, Faculty of Veterinary Medicine Department of Basic Sciences ABD/Siirt.Türkiye.email:turanakkoyun@hotmail.com, ORCID 2: 0000-0002-4547-8003

1.1. SİLYMARİN (SM)

Silymarin (SM), Silybum marianum (devedikeni) bitkisinden ekstrakte edilen C25 içeren flavonoid karışımıdır(Surai,2015). Silymarin, antik çağda etkili ve şifalı bir bitki olarak bilinen süt devedikeni (Silybum marianum L.Gaertn) tohumlarından 1968 yılında izole edilmiş bir maddedir. Silimarinin kimyasal yapısı aydınlatılmış ve tatmin edici bir şekilde tanımlanmıştır(Gaballah ve ark.,1991).

1.2. Botanik Ve Morfoloji

Asteriaceae familyasından olan ve süt devedikeni Silybum marianum; Marian devedikeni, Mary devedikeni, Meryem devedikeni, Aziz Mary devedikeni, Kutsanmış süt devedikeni, Akdeniz süt devedikeni, alacalı devedikeni, Cardus marianus ve İskoç devedikeni gibi çeşitli başka isimlerle anılmaktadır. Silybum marianum parlak soluk yeşil yapraklara ve beyaz damarlı kırmızı ila mor çiçeklere sahiptir. Fars ve Arap ülkelerinde'de Meryem sıhhal ismiyle anılmaktadır (Simanek ve ark.,2000;Bahmani ve ark.,2015). Büyük yapraklı, sert dikenli ve tübüler çiçekli yıllık bir bitkidir ve Avrupa'nın Akdeniz bölgesine özgüdür, ancak Kaliforniya ve doğu Amerika Birleşik Devletleri'nde doğallaştırılmıştır (Taleb ve ark.,2018). Süt devedikeni, Asteracae familyasının en önemli bitkilerinden biri olup 200-250 cm yüksekliğe ulaşan geniş yapraklı bir türdür (Veres ve Tyr,2012;Abenavoli ve ark.,2010). Bazal yapraklar alternatif, büyük ve dikenli kenar boşlukları ile tüysüzdür. Yapraklar 50–60 cm uzunluğunda ve 20–30 cm genişliğinde olabilir. Süt devedikeni ayırt edici bir özelliği süt beyaz damarlarıdır.Gövde yaprakları daha küçüktür(Karkanis ve ark.,2011). Silybum cinsi iki türden oluşur:Silybum eburneum Coss. et Dur., yeşil yapraklı ve Silybum marianum L. Gaertn., beyaz-yeşil yapraklı. Cinsin adı, bir tassle anlamına gelen Yunanca silybon (veya silybos) kelimesinden gelmektedir. Polonya, yıllardır küresel pazarın %4'ü ve Avrupa bitkisel ürünler pazarındaki %25'lik payı ile büyük bir şifalı bitki üreticisi olmuştur(Bielski,2021). Bu bitkinin çiçek başları kırmızı-mor renktedir(Şekil 1)(Bahmani ve ark.,2015).



Şekil 1. Silybum marianum (devedikeni)(Bahmani ve ark.,2015)

1.3. Silybum Marianum (Devedikeni) Tarihi

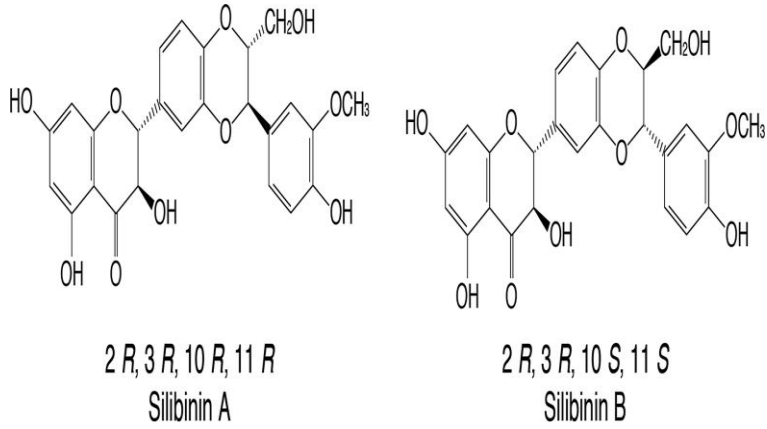
Süt devedikeni tıbbi kullanımı geniş bir geçmişe sahiptir. Bir Yunan filozofu ve Aristoteles'in halefi olan Theophrastus (MÖ 371-287), deve dikeninden Pternix27 adı altında bahsetmiştir. Yaşlı Pliny (MS 23-79) ve Dioscorides (MS 40-90) bu bitkiyi ve kullanımını tarif etmişlerdir. 16. yüzyılda deve dikeni hepatobilier hastalıklar için tercih edilen bir ilaç haline gelmiştir. 1652'de seçkin bir İngiliz şifalı bitki uzmanı olan Nicholas Culpeper, devedikeni karaciğer ve dalak tıkanıklıkları için mükemmel bir çare olduğunu rapor etmiştir. . Süt devedikeni Amerika'ya ise ilk olarak Avrupalı sömürgecilerle gelmiştir(Morazzoni ve Bombardelli,1995;Porwal ve ark.,2019).

1.4. Silybum Marianum (Devedikeni)'In Büyüme Bölgeleri

Silybum marianum (L.) Gaertn. (eşanlamlı Carduus marianus L.), ortak adı süt devedikeni, Güney Avrupa, Küçük Asya ve Kuzey Afrika'ya özgüdür ve Kuzey ve Güney Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda'da doğallaştırılmıştır (Groves ve Kaye,1989; Morazzoni ve Bombardelli,1995;Martin ve ark.,2000;Carrier ve ark.,2002;Martinelli ve ark.,2015).

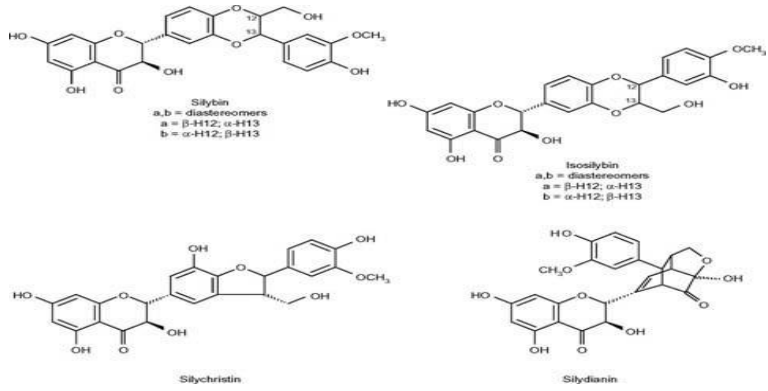
2.Kimyasal Yapısı

Silibinin, moleküler formülü C25H22O10 olan ve moleküler ağırlığı 482.44 g/mol olan bir polifenolik flavonoid antioksidandır(Pradhan ve Girish,2006;Gillessen ve Schemidt,2020). Silibinin'in kendisi iki diastereomerin, silibinin A ve silibinin B'nin yaklaşık eşmolar oranda karışımıdır (Şekil 2)(Kren ve Walterova,2005).



Şekil 2. Silibinin diastereoizomerlerinin, silibinin A ve silibinin B'nin kimyasal yapısı(Kren ve Walterova,2005).

Silymarin, süt devedikeni Silybum marianum'un tohumlarından ve meyvelerinden elde edilen standardize bir ekstrakttır ve ana bileşenleri olarak flavonolignans silybin, isosilybin, silydianin ve silychristin içerir(Şekil 3). Silimarinin ana bileşeni, ilacın %60 ila %70'ini oluşturan ve ana aktif bileşen olan silibindir (2 diastereomerin bir karışımıdır)(Wellington ve Jarvis,2001)



Şekil 3. Silymarin genel yapısı(Morazzoni,1995;Simamanek ve ark.,2000;Leng-Peschlow,1994).

3. Silymarin Emilimi Ve Metabolizması

Silimarin birincil bileşik olup çoğu paradigmada aktif olarak kabul edilir. Silimarinin farmakokinetik parametreleri ve silimarin içeren herhangi bir ürünün aktif maddesi her zaman silibinin olarak adlandırılır ve standardize

edilir (Saller ve ark.,2001). Silibinin haftada 1.44 g'a kadar günlük dozlarda oral yoldan verilmesi güvenlidir (Hoh ve ark.,2006). Silymarin %23-47 civarında oral absorpsiyonu ve hızlı faz II konjugasyonu vardır, bu da gözden geçirilmiş olan düşük biyoyararlanıma yol açar(Javed ve ark.,2011). Silimarin ve ana bileşeni olan silibinin kaynakları, metabolizması ve biyoyararlanımı halihazırda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir(Kren ve ark.,2013;Wen ve ark.,2008;Zhu ve ark.,2013). Süt devedikeni özünün oral uygulamasından sonra, flavonolignanların hızla emildiği ve silibinin 6 saatlik (Lorenz ve ark.,1984;Barzaghi ve ark.,1990;Flory ve ark.,1980), yarılanma ömrüyle (Zhu ve ark.,2013) elimine edildiği belirtilmiştir. Silibin ve türevlerinin ana biyotransformasyon yolunun konjugasyon olduğu belirlenmiştir (Kren ve ark.,2013). Silymarin çoğunlukla oral olarak uygulanır ve bağırsağın tüm bölgelerindeki gastrointestinal sistem (GIT) hücreleri tarafından hızla alınır. Bununla birlikte, alımı en yüksek duodenumdadır, bunu jejunum, ileum ve kolon takip eder(Luan ve Zhano,2006;Tvrdy ve ark.,2021).

4.FARMAKODİNAMİK ÖZELLİKLERİ

Silimarin 'in antioksidan(MacDonald-Ramos ve ark.,2021) özellikler, anti-inflamatuar (Katiyar,2005;Flora ve ark.,1998;Pradhan ve Girish,2006;Saller ve ark.,2001) özellikler, antifibrotik(Abenavoli ve ark.,2018) etkiler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkileri tanımlanmıştır.

4.1.Antioksidan Etkisi

Silimarinin antioksidan özellikleri, serbest radikallerin ortadan kaldırılmasına izin veren temizleyicileri kullanma yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Silymarin'in antioksidan aktiviteleri farklı potansiyel mekanizmalara sahiptir. Bunlar, serbest radikal oluşumunu önleyen reaktif oksijen türleri üreten enzimlerin inhibisyonunu, söz konusu serbest radikallerin temizlenmesini, bağırsak iyon şelasyonunu, koruyucu molekül sentezini teşvik etmeyi ve antioksidan enzim aktivasyonunu içerir(Tighe ve ark.,2020).Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, çoğunlukla detoksifikasyonda yer alan süreçlerle ilgili olarak, karaciğerdeki çeşitli temel biyokimyasal reaksiyonların doğal bir sonucudur. Yüksek düzeyde toksinlere (örn. alkol, hepatotoksik ilaçlar) veya serbest yağ asitlerinin yoğun oksidasyonuna (örn. insülin direnci) maruz kalma, anormal ROT üretimine yol açar; endojen antioksidanlar da

tükenebilir. Örneğin, etanolün hepatositler, Kupffer hücreleri, endotel hücreleri ve infiltre edici inflamatuar lökositler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde çeşitli serbest radikallerin oluşumunu teşvik ettiği yaygın olarak kabul edilmektedir (Gillessen ve Schmidt,2020;Teschke,2018).

4.2. Anti-inflamatuar Etkisi

Silimarinin antiinflamatuar aktivitesi için lökotrien ve prostaglandin sentezinin inhibisyonu, mast hücresinin stabilizasyonu, nötrofil göçünün inhibisyonu, IL-2, IL-4, IL-10 ve TNF gibi inflamatuar sitokinlerin baskılanması ve ayrıca Kupffer hücre inhibisyonu görülmektedir.Silymarin, Kupffer hücresinde lökotrien oluşumuna müdahale ederek, sırayla hepatik stellat hücre aktivasyonunu fibrogeneze inhibe ettiği rapor edilmiştir (De La Puerta ve ark.,1996;Dehmlow ve ark.,1996;Nasri,2015). NF-κB, enflamatuar ve immün reaksiyonların ana düzenleyicisidir. Silymarinin hem NF-κB DNA bağlanma aktivitesini hem de hepatoma hücre hattı HEP G2'de okadaik asit tarafından indüklenen bağımlı gen ekspresyonunu baskıladığı bulunmuştur. Ancak TNF-α tarafından indüklenen NF-κB aktivasyonu, silimarinden etkilenmemiştir, bu da silimarin tarafından yola bağımlı bir inhibisyon olduğunu göstermektedir (Saliou ve ark.,1998). Silimarin ile tedavi edilen erkek BALB/c farelerinde yapılan bir in vivo çalışmanın sonuçları, silimarine parenteral maruz kalmanın, düşük dozlarda T-lenfositlerin baskılanmasına ve daha yüksek dozlarda inflamatuar sürecin uyarılmasına yol açtığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, bağışıklık sisteminin bakteriyel enfeksiyona karşı yeteneği daha yüksek dozlarda artacaktır.(Johnson ve Osuchowski,2002;Parmar ve Gandhi,2008).

4.3.Antifibrotik Etkisi

Karaciğer fibrozu, karaciğer yapısının yeniden şekillenmesiyle sonuçlanarak hepatik yetmezliğe, portal hipertansiyona ve hepatik ensefalopatiye yol açabilir. Bu süreçler, hücrelerin ve aracıların karmaşık etkileşimini içerir (Johnson ve ark.,2002).İlk aşamada hepatik parankimal hücrelerin proliferasyonu olacaktır. Hepatik stellat hücrelerin (HSC) miyofibroblasta dönüştürülmesi, fibrogenezdeki merkezi olay olarak kabul edilir. Bu, profibrojenik prokollajen alfa I'in ve matalloproteinazlar-1'in doku inhibitörünün ekspresyonunu azaltır, büyük olasılıkla pro-fibrojenik sitokin

TGF-β1'in aşağı regülasyonu yoluyla. Kupffer hücreleri, stellat hücre proliferasyonunu ve aktivasyonunu teşvik eder ve silimarin'in bu seviyedeki karşılayıcı etkisi önemli bir rol oynayabilir. Klinik dozlardan sonra plazmada ulaşılan konsantrasyonlarda uygulandığında silibinin, reaktif oksijen türleri ve lökotrienler gibi stellat hücre aktivasyonunda yer alan Kupffer hücrelerinde aracıların üretimini inhibe eder. Lökotrien üretiminin inhibisyonu, araşidonik asitten lökotrien oluşumunu katalize eden enzim olan 5-lipoksijenazın inhibisyonundan kaynaklanır. İlginç bir şekilde, 5-lipoksijenaz inhibisyonunun Kupffer hücre büyümesinin durmasına ve apoptoza yol açtığı gösterilmiştir. Granülositler tarafından lökotrien üretimi de silybinin tarafından inhibe edilmiştir (Saller ve ark.,2001; Dehmlow ve Erhard,1996; Gebhardt,2002; Munter ve ark.,1986; Radko ve Cybulski,2007). Silymarin, NF-kB'yi inhibe eder ve ayrıca HSC aktivasyonunu geciktirir. Ayrıca protein kinazları ve sinyal iletiminde yer alan diğer kinazları inhibe eder ve hücre içi sinyal yollarıyla etkileşime girebilir (Gebhardt,2002).

5.KAYNAKLAR

Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N., Capasso, F. (2010). Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*, *24*(10), 1423-1432.

Abenavoli, L., Izzo, A. A., Milić, N., Cicala, C., Santini, A., Capasso, R. (2018). Milk thistle (Silybum marianum): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytotherapy Research*, *32*(11), 2202-2213.

Bahmani, M., Shirzad, H., Rafieian, S., Rafieian-Kopaei, M. (2015). Silybum marianum: beyond hepatoprotection. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, *20*(4), 292-301.

Barzaghi, N., Crema, F., Gatti, G., Pifferi, G., Perucca, E. (1990). Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin-phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, *15*, 333-338.

Bielski, S. (2021). Milk thistle (Silybum marianum L. Gaertn.) achene yield had a positive response to nitrogen fertilization, row spacing, sowing date, and weed control methods. *Industrial Crops and Products*, *160*, 113104.

Carrier D.J., Crowe T., Sokhansanj S., Wahab J., Barl B. (2002) Milk Thistle, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., flower head development and associated marker compound profile. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, **1**, 65– 74.

Dehmlow, C., Erhard, J., de Groot, H. E. R. B. E. R. T. (1996). Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology*, *23*(4), 749-754.

De La Puerta, R., Martinez, E., Bravo, L., Ahumada, M. C. (1996). Effect of silymarin on different acute inflammation models and on leukocyte migration. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *48*(9), 968-970.

Flora, K., Hahn, M., Rosen, H., Benner, K. (1998). Milk thistle (Silybum marianum) for the therapy of liver disease. *The American journal of gastroenterology*, *93*(2), 139-143.

Flory, P. J., Krug, G., Lorenz, D., Mennicke, W. H. (1980). Studies on elimination of silymarin in cholecystectomized patients. I. Biliary and renal elimination after a single oral dose. *Planta medica*, *38*(3), 227-237.

Gaballah, A. M., El-Banna, F. M., Hanna, L. T., & Sirag, S. M. (1991). Evaluation of the prophylactic and the possible therapeutic effects of silymarin in experimental liver cirrhosis. *Mansoura Medical Journal*, *20*(1), 13-28.

Gebhardt, R. (2002). Oxidative stress, plant-derived antioxidants and liver fibrosis. *Planta medica*, *68*(04), 289-296.

Gillessen, A., Schmidt, H. H. J. (2020). Silymarin as supportive treatment in liver diseases: A narrative review. *Advances in therapy*, *37*(4), 1279-1301.

Groves, R. H., Kaye, P. E. (1989). Germination and phenology of seven introduced thistle species in southern Australia. *Australian Journal of Botany*, *37*(4), 351-359.

Hoh, C., Boocock, D., Marczylo, T., Singh, R., Berry, D. P., Dennison, A. R., Gescher, A. J. (2006). Pilot study of oral silibinin, a putative chemopreventive agent, in colorectal cancer patients: silibinin levels in plasma, colorectum, and liver and their pharmacodynamic consequences. *Clinical Cancer Research*, *12*(9), 2944-2950.

Javed, S., Kohli, K., Ali, M. (2011). Reassessing bioavailability of silymarin. *Alternative medicine review*, *16*(3), 239.

Johnson, V. J., Osuchowski, M. F., He, Q., Sharma, R. P. (2002). Physiological responses to a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: II. Alterations in thymic differentiation correlate with changes in c-myc gene expression. *Planta medica*, *68*(11), 961-965.

Johnson, V. J., Osuchowski, M.F., He, Q., Sharma, R.P. (2002). Physiological responses to a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: II. Alterations in thymic differentiation correlate with changes in c-myc gene expression. *Planta medica*, *68*(11), 961-965.

Karkanis, A., Bilalis, D., Efthimiadou, A. (2011). Cultivation of milk thistle (Silybum marianum L. Gaertn.), a medicinal weed. *Industrial Crops and Products*, *34*(1), 825-830.

Katiyar, S. K. (2005). Silymarin and skin cancer prevention: anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects. *International journal of oncology*, *26*(1), 169-176.

Kren, V., Marhol, P., Purchartova, K., Gabrielová, E., Modriansky, M. (2013). Biotransformation of silybin and its congeners. *Current drug metabolism*, *14*(10), 1009-1021.

Křen, V., Walterová, D. (2005). Silybin and silymarin-new effects and applications. *Biomed papers*, *149*(1), 29-41.

Leng-Peschlow E.(1994). Alcohol-related liver diseases use of Legalon for therapy. *Pharmedicum*,*2*(3),22–7.

Lorenz, D., Lücker, P. W., Mennicke, W.H., Wetzelsberger, N. (1984). Pharmacokinetic studies with silymarin in human serum and bile. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, *6*(10), 655-661.

Luan, L. B., Zhao, N. (2006). The absorption characteristics of silybin in small intestine of rat. *Yao xue xue bao= Acta Pharmaceutica Sinica*, *41*(2), 138-141.

MacDonald-Ramos, K., Michán, L., Martínez-Ibarra, A., Cerbón, M. (2021). Silymarin is an ally against insulin resistance: A review. *Annals of hepatology*, *23*, 100255.

Martin R.J., Deo B., Douglas J.A. (2000) Effect of time of sowing on reproductive development of variegated thistle. *Agronomy New Zealand*, 30, 1– 5.

Martinelli, T., Andrzejewska, J., Salis, M., Sulas, L. (2015). Phenological growth stages of Silybum marianum according to the extended BBCH scale. *Annals of Applied Biology*, 166(1), 53-66.

Morazzoni P, Bombardelli E. Silybum marianum (Carduus marianus). Fitoterapia. 1995; LXVI: 3-42.

Münter, K., Mayer, D., Faulstich, H. (1986). Characterization of a transporting system in rat hepatocytes. Studies with competitive and non-competitive inhibitors of phalloidin transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *860*(1), 91-98.

Nasri, H. (2015). Silymarin and its properties; a nephrology viewpoint. *Journal of Renal Endocrinology*, *1*(1), e09-e09.

Parmar, M., Gandhi, T. (2008). Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine-A review. *Pharmacognosy Reviews*, *2*(3), 102.

Pradhan, S. C., Girish, C. (2006). Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian journal of medical research*, *124*(5), 491-504.

Porwal, O., Ameen, M. S. M., Anwer, E. T., Uthirapathy, S., Ahamad, J., Tahsin, A. (2019). Silybum marianum (Milk Thistle): Review on Its chemistry, morphology, ethno medical uses, phytochemistry and pharmacological activities. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, *9*(5), 199-206.

Radko, L., Cybulski, W. (2007). Application of silymarin in human and animal medicine. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, *1*(1).

Saliou, C., Rihn, B., Cillard, J., Okamoto, T., Packer, L. (1998). Selective inhibition of NF-κB activation by the flavonoid hepatoprotector silymarin in HepG2: Evidence for different activating pathways. *FEBS letters*, *440*(1-2), 8-12.

Saller, R., Meier, R., Brignoli, R. (2001). The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*, *61*, 2035-2063.

ŠIManek, V. I. L. Í. M., Kren, V., Ulrichová, J., Vicar, J., Cvak, L. (2000). Silymarin: what is in the name…? An appeal for a change of editorial policy. *Hepatology*, *32*(2), 442-444.

Surai, P. F. (2015). Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*, *4*(1), 204-247.

Taleb, A., Ahmad, K. A., Ihsan, A. U., Qu, J., Lin, N. A., Hezam, K., Qilong, D. (2018). Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *102*, 689-698.

Teschke, R. (2018). Alcoholic liver disease: alcohol metabolism, cascade of molecular mechanisms, cellular targets, and clinical aspects. *Biomedicines*, *6*(4), 106.

Tighe, S. P., Akhtar, D., Iqbal, U., Ahmed, A. (2020). Chronic liver disease and silymarin: A biochemical and clinical review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, *8*(4), 454.

Tvrdý, V., Pourová, J., Jirkovský, E., Křen, V., Valentová, K., Mladěnka, P. (2021). Systematic review of pharmacokinetics and potential pharmacokinetic interactions of flavonolignans from silymarin. *Medicinal Research Reviews, 41*(4), 2195-2246.

Vereš, T., Týr, Š. (2012). Milk thistle (Silybum marianum (L.) Gaertn.) as a weed in sustainable crop rotation. *Research journal of agricultural science, 44*(2), 118-122.

Wellington, K., Jarvis, B. (2001). Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs, 15*, 465-489.

Wen, Z., Dumas, T. E., Schrieber, S. J., Hawke, R. L., Fried, M. W., Smith, P. C. (2008). Pharmacokinetics and metabolic profile of free, conjugated, and total silymarin flavonolignans in human plasma after oral administration of milk thistle extract. *Drug Metabolism and Disposition*, *36*(1), 65-72.

Zhu, H. J., Brinda, B. J., Chavin, K. D., Bernstein, H. J., Patrick, K. S., Markowitz, J. S. (2013). An assessment of pharmacokinetics and antioxidant activity of free silymarin flavonolignans in healthy volunteers: a dose escalation study. *Drug Metabolism and Disposition*, *41*(9), 1679-1685.

BÖLÜM 5

Kanser Hakkında

Doç. Dr. Serdar ALTUN

Dr. Kadir KÖŞGER

[1] Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Patoloji ABD/Erzurum.Türkiye.email:serdar.altun@atauni.ed.tr ORCID 1: 0000-0002-8735-7031
[2]Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Aile Hekimliği ABD/Erzurum.Türkiye.email:kadirkosger@grv.atauni.edu.tr, ORCID 2: 0009-0006-5337-1624

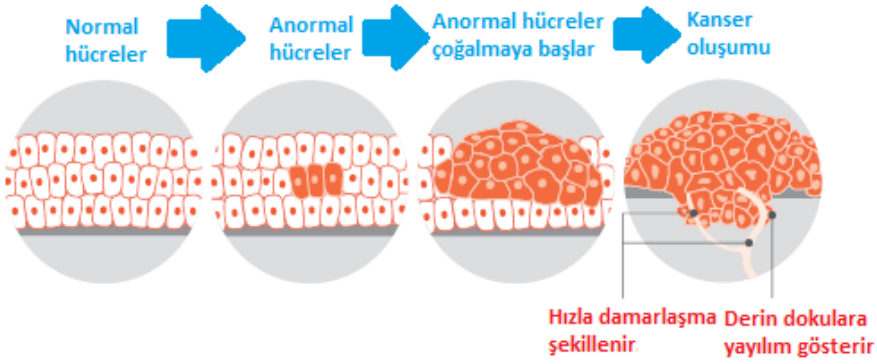
1. KANSER

Her canlı hayatını sürdürebilmesi için hücrelerinin daima yenilenerek bölünüp çoğalması gerekir. Organizmada yaşam süresini tamamlayan hücreler elemine edilerek vücuttan atılırlar ve bunların yerini yenileri alır (Shin ve ark.,2011). Bu döngü canlıların tüm yaşamı boyunca bu şekilde devam etmektedir. Hücrelerin elenme ve yerine yenilerinin oluşturulduğu bu döngü organizmada genlerin kontrolü altındadır. Bazı genler hücrelerin bölünüp çoğalma kontrolünü sağlarken bazıları hücrelerin aşırı çoğalmasını engeller (Dong Wook Shin ve ark.,2011).

1.1. Kanser Nasıl Oluşur

Canlılarda erken gelişim çağı dışında yaşlanan ve ömrünü tamamlayan hücrelerle onların yerini alan yeni üretilmiş hücreler nitelik ve nicelik yönünden az çok birbirine eşittir. Yani canlılarda kanser nasıl oluşuyor mekanizması açısından bakarsak kanser, elemine edilen hücrelerin yerine üretilen hücrelerin üremesinin istenenden fazla hale gelerek kontrol dışına çıkmasına, yani elemine edilen hücre sayısından çok hücre yapımı olmasına verilen addır (Hassanpour ve Dehghani., 2017). Bu kontrolü daha önce bahsettiğimiz gibi özel bazı genetik mekanizmalar sağlamaktadır. Kanser üzerine yapılan deneysel ve klinik hasta takibi gibi birçok veri göze alınarak yapılan bildirimlerde söz konusu genetik mekanizmaların bozulmasında beslenme, hava kirliliği, bazı viral hastalıklar, radyasyon, tarım ilaçları, gıda katkı maddeleri ve çeşitli toksinlerin rol oynadığı bildirilmektedir (Key TJ., 2011; Michael Hauptmann ve ark., 2016). Belirtilen bu durumların genlerin yapısını mutasyona uğratarak bozduğu ve bozulan genlerin hücrelerin aşırı üremelerini engelleyen bazı fonksiyonlarını gerçekleştiremediği için kanser oluştuğu en çok kabul gören mekanizma olduğu bildirilmektedir. Belirtilen kanser nedenleri canlı DNA'sına doğrudan etki ederek hasara uğratır. Bu hasar hücre içerisinde çeşitli DNA tamir mekanizmaları ile giderilmeye çalışılsa da süreklilik arz eden hasar olayları kritik düzeye ulaşan DNA hasarı normal hücrelerin kanserli hücreler haline dönüşmesine neden olur (Dite1ve ark., 2010). Yapılan araştırmalara göre sağlıklı bir insan vücudunda bulunan DNA tamir ve gen koruyucu mekanizmalar 24 saat içinde hasara uğramış DNA'nın yüzde 90 seviyesinde onarabilir ya da bağışıklık sisteminde özelleşmiş doğal katil olarak adlandırılan bazı savunma hücreler bu tip hücreleri tanıyarak onları çoğalmadan

öldürebilmektedirler. Canlılarda karmaşık organ ve sistemleri oluşturan hücreler toplamı göz önüne alındığında günlük yaşamda yaklaşık 10 bin civarı hücrede DNA hasarına bağlı mutasyonlar oluşur. Eğer hücrelerde DNA onarım enzim ve mekanizmaları yoksa ya da yetersiz çalışıyorlarsa bu mutasyonlar hızla kansere yol açar (Kanai ve Hirohashi., 2007). Organizmaları oluşturan hücrelerin DNA'sında oluşan hasarlar için onarım kapasiteleri sınırlıdır. Bu nedenle kansere karşı hücrelerin gen koruyucu mekanizmaları son derece önemlidir. Söz konusu genlerin korunmasındaki tamir mekanizmalarının etkili bir şekilde çalışabilmesi için en önemli faktör canlının doğru beslenmesi ve dolayısıyla besin maddeleri ile aldığı vitamin ve minerallerdir.



Şekil 1. Kanser oluşum basamakları.

1.2. Kanser hastalığında son yıllardaki hızlı artışın sebebi nedir?

Kanser hastalığı dünya genelinde kalp damar hastalıklarından sonra en çok ölüme neden olan hastalıktır. Yapılan araştırmalarda Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) 1900'lü yıllarda kanser hastalığı tanısıyla %3 olan ölüm oranı 2000'li yıllara gelindiğinde %24'e kadar çıkmıştır. Bazı çalışmalarda bu oranın yükselmesinde gelişmiş tanı yöntemlerinin daha yaygın kullanımının ayrıca, yaşam süresinde ki artışın olduğunu dile getirseler de hastalığın sekiz kat artmış olması olayın sadece bu bağlamda ele alınamayacağı gerçeğini akla getirmektedir (Cronin ve ark., 2022). Söz konusu artış gelişmiş statüdeki bazı ülkeler içinde geçerlidir. Yapılan genetik çalışmalar kanser vakalarında artışın sadece kalıtsal faktörlere de bağlanamayacağını ortaya koymaktadır. Az gelişmiş ülkelerde görülen kanser vakalarının az bildirilmiş olması yetersiz

tıbbı ve tanı imkânlarına bağlanmış olmasına karşın, yapılan vaka bildirimlerinde gelişmiş ülkelere göçen bu insanlarda kanser görülme sıklığının arttığını göstermiştir. Yapılan yaşam tarzı ve kanser görülme sıklığı istatistikleri kansere yol açan risk faktörleri ile birlikte; sağlıksız beslenme, obezite ve fiziksel hareketsizliğinde kanser görülme sıklığı ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Shin ve ark.,2011). Bu bilgiler ışığında kanser vakalarında ki artışın çevresel faktörler nedeniyle tetiklendiği ve engellenebilir olduğu bu bilimsel muammaya verilecek en akla yatkın cevaptır.

1.3. Kanser ve şeker ilişkisi

Son yıllarda dünya genelinde beslenme alışkanlığımızdaki olumsuz gelişme rafine şeker ve beyaz unlu gıda tüketiminin katlanarak artış göstermesidir (Nour ve ark., 2018). Yapılan araştırmalarda İngiltere'de 1815'te 5 kg civarında olan kişi başına yıllık şeker tüketimi 1970'te on kat artarak 50kg'ın üzerine çıktığı bildirilmiştir. Bu tarihler arası görülen artış eğilimi maalesef sonraki yıllarda atmaya devam etmiştir. ABD' de yapılan başka bir araştırmada şekerli meşrubat tüketiminin önceki yıllara oranla katlanarak arttığı sonucuna varılmıştır. Fazla şeker ve beyaz unlu gıdaları tüketmek başta kanser olmak üzere birçok hastalığın temel nedenidir (Susanna ve ark., 2006). Nobel ödüllü Alman bilim adamı Otto Warburg şeker tüketimi ile kanser hastalığının pozitif ilişkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bazı bilim çevreleri şeker ile kanser ilişkisini görmezden gelme yolunu seçmeyi tercih etsellerde daha sonra yapılan birçok çalışma da fazla şeker tüketiminin hücrelerde kanserleşme riskini arttırdığını tespit etmişlerdir (Burley., 1997; Stephan ve David, 1983). Kanser hastalığının şeker tüketimi ile ilişkisi iki kez Nobel Tıp Ödülü alan (1931 ve 1944) Alman Otto Warburg tarafından ortaya koyulmuştur. Warburg kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden farklı bir metabolizmaya sahip olduğunu ortaya koymuştur. Normalde hücreler enerji temini için oksijenli (aerobik), ve oksijensiz (anaerobik) metabolizma yollarını kullanabiliyorken, Kanser hücreleri yaşamlarını sürdürme ve çoğalma için ihtiyaç duydukları enerjiye sadece oksijensiz (anaerobik) metabolizma yolu ile elde edebilirler. Kanser oluşan organizmalarda şeker ihtiyacı normalin çok üzerindedir, kanserli hücreler eğer ihtiyacı olan şekeri vücuttan elde edemez ise hayatta kalamazlar ve ölmeye başlarlar. Organizmaya ihtiyaç fazlası ne kadar şeker girerse girsin kanserli hücreler bu durumu daima kendileri için avantaja çevirirler. Kanser

hücreleri normal hücrelere kıyasla 3-5 kat daha fazla şeker kullanırlar (Stephen ve David., 1983). Onkologlar bazı kanserlerin metastazlarını tespit etmek için Pozitron emisyon tomografisi (PET-CT) taramaları yaparlar. Bu görüntüleme yöntemi hastaya damardan radyoaktif bir madde ile işaretlenmiş glikoz verilerek gerçekleştirilir. Bu yöntemin temel dayanağı işaretlenmiş glikoz molekülünün kanser hücreleri tarafından emileceğinin bilinmesidir. Buna rağmen bu yöntemi kullanan birçok onkolog "şeker kanser yapar" diyen hekimlere hayalci gözü ile bakar. Diyette aşırı şeker tüketiminin tek zararı kanser dokusuna olan faydası değildir. Ayrıca, fazla un ve şeker tüketimi insülin direncine yani vücutta aşırı miktarda insülin hormonu üretilmesine yol açar (Burley., (1997). İnsülin direnci; Hücrelerin ihtiyaç fazlası üretilmesine rağmen insülini etkili bir şekilde kullanamaması durumudur. Hiperinsülinizm, (IGF-1) düzeyini artırır. Serbest IGF-1 bütün dokularda hücre üremesini kontrolsüz olarak artırarak kansere sebep olur. Normal tartılılarla karşılaşdığında vücut kitle endeksi 40'dan fazla olanlarda, yüzde 50-60 oranında daha fazla kanser görülmektedir. Sadece son 10 yılda Türkiye'deki şişmanlık 2 kat arttı. Kanserdeki artıştan sorumlu olan faktörlerden biri şişmanlıktır. Bahsi geçen bu bilgiler ile birlikte, kanser oluşumunda çok çeşitli faktörler etkili olduğundan, tek başına şeker tüketimi kanser riskini belirlemek için yetersizdir. Canlılarda kanser görülmesinde genetik faktörler, çevresel etkenler, sigara içme, alkol tüketimi, sağlıksız beslenme alışkanlıkları gibi birçok faktör rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle, kanserden korunmak için sadece şeker ve undan uzak kalmak yetersiz bir bakış açısıdır. Sağlıklı ve dengeli bir yaşam tarzı sürdürmek, doğal beslenmek, düzenli spor ve egzersiz yapmak, sigara ve alkol tüketimini sınırlamak kanser riskini azaltmada önemlidir. (Lina Jansen ve ark., 2015)

1.4. En yaygın kanser türleri nelerdir ve neden öldürücüdür

Kanser, birçok farklı tip ve alt tipte olabilir ve her tür kanserin oluşum mekanizması bir diğerinden farklı olabilir. Tanısı konan kanser vakalarının büyük oranında hastalığa neden olan kanser türü de belirlenmiştir. Dünya genelinde yapılan bildirilerde hastalığa yakalanan kişilerde en yaygın görülen kanser türleri sırasıyla; meme kanseri(%11.7), akciğer kanseri(%11,4), kolorektal kanser (%10.0), prostat kanseri (%7.3), mide kanseri (%5.6). Bu vakalarda en çok ölümle sonuçlanan kanser türleri ise sırasıyla; akciğer kanseri

(toplam kansere bağlı ölümlerin %18'i), kolorektal kanser (%9.4), karaciğer kanseri (%8.3), mide kanseri (%7.7), kadın meme kanseri (%6.9) (Lina Jansen ve ark., 2015; Susanna C Larsson., 2006; Siegelve Jemal., 2013; Mark ve Hung-Jui., 2017). Organizmayı oluşturan organlar birbirleriyle çeşitli ligament ve kas grupları bağlantıları ile birlikte kemik çatışı sayesinde anatomik bir bütün oluştururlar. Her organın vücut büyüklüğüne göre belirli bir sınırda büyüme şansı vardır. Ancak, normal bir organizma da büyüme sonucu kaplanan bu hacim komşu olduğu organın fizyolojik boşluklarını baskı altına alacak seviyede asla büyümez. Çünkü bu baskı diğer organları besleyen kan damarlarına baskı yaparak tıkayabilir ya da salgı yapan, kanallı, lümenli organlarda akması gereken yerlere akmasını engelleyebilir. Kanserlerin temel öldürme nedenleri arasında kontrolsüz çoğalan kanser dokusunun çevre doku ve organlara yapmış olduğu basınç gelmektedir. Sadece organları besleyen damarlar üzerine yaptığı baskı sonucu oluşan iskemi tablosu düşünüldüğünde organda oluşan yersel hücre ölümü sonucu organ yetmezliği, canlıyı hayati tehlikeye sokmak için yeterli bir sebeptir. Örneğin; kafatası içerisinde iyi korunmuş sabit bir kitle ile bulunan beyin dokusunda oluşan tümör kitlesi kendi hacmine yer açmak için kafatasını genişletemez ve dolayısıyla beyinde çoğalmaya başladığı yerde çevresine baskı yaparak ve beyinde bulunan hayati merkezlerin kansız kalmasına yol açarak canlının ölümüne yol açabilir. Bazı kanser türleri, vücuttaki hormon veya enzim üretim merkezlerini etkileyebilir. Bu durum, hormonal dengenin bozulmasına, organların normal işlevini yerine getirememesine ve hayati süreçlerin etkilenmesine yol açabilir. Örneğin, pankreas kanseri insülin üretimini etkileyebilir ve şiddetli hiperglisemiye (yüksek kan şekeri) neden olarak ölüme yol açabilir.

1.5. Kanserde tedavi yöntemleri nelerdir ve ne kadar etkilidir

Günümüzde kanser tedavisinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Kemoterapi ve radyoterapi bu yöntemler arasında en sık tercih edilen metotlar arasındadır, tümörün büyümesini kısmen yavaşlatabilir ancak, tümörü yok etme konusunda yüksek başarıya sahip olduğu söylenemez (Dong Wook Shin ve ark.,2011). Tümörü ortadan kaldırmada başarılı olduğu vakalarda bile tümörün tekrar oluşma yani nüks olasılığı her zaman vardır. Bu iki klasikleşen tedavi yönteminin kullanım etkinliği ve hasta yaşam kalitesini artırma gibi konularda tatmin edici sonuçlar verme oranı gün geçtikçe beklentilerin altına

kalmaktadır. Bununla birlikte tedavi esnasında hastalarda akut bir toksisite oluşabilmesi de önemli bir risk olarak kendini göstermektedir. Bu bilgiler ışığında araştırmacılar kansere karşı farklı tedavi seçenekleri denemektedir. Bunlardan birisi olan immünoterapi, bağışıklık sistemini kanserle savaşmaya teşvik eden bir tedavi yöntemidir. Son yıllarda immünoterapi, kemoterapi ve radyoterapi kadar yaygın kullanılmamakla birlikte, birçok kanser türünde tedavi seçeneği olarak kullanılmaya başlanmıştır. İmmünoterapi, bağışıklık sistemini kanser hücrelerini tanıyıp yok etmeye yönlendirme prensibi ile gerçekleştirilmektedir (Jon Zugazagoitia ve ark., 2016). Hedefe yönelik tedaviler: Hedefe yönelik tedaviler, kanser hücrelerinde bulunan belirli genetik değişikliklere veya proteinlere odaklanır. Bu tedaviler, kanser hücrelerini etkileyen spesifik hedeflere saldırmak için kullanılan ilaçlar veya tedavi yöntemleridir. Hedefe yönelik tedaviler, kanser hücrelerini öldürmekten daha ziyade üremelerini durdurmak ve normal yaşam sürelerini tamamlayarak bu hücrelerin elemine olmasını sağlamak amacıyla yapılmaktadır.

1.6. Kanserde tanı

Klinik olarak her kanser için tanı mümkün olmasa da birçok kanser türünde erken teşhis için bazı tedbirler alınabilir. Belirli bir yaşı geçmiş kadınların her yıl mamografi yaptırması kesinlikle önerilir. Dışkıda gizli kan arama gibi metotlar da barsak ve kolon kanser türleri için oldukça başarılı tanı yöntemleri arasındadır bununla birlikte kolonoskopi zararı olmayan bir yöntemdir. Fakat tanı metotları içerisinde bulunan görüntüleme sistemlerinin sık ve tekrar ederek kullanılması insanları yoğun radyasyona maruz bırakacağı unutulmamalıdır. Bu durumun da kansere davetiye çıkarttığını unutmamak gerekir (Van den Belt-Dusebout AW ve ark., 2009). Bu yöntemlere başvurmadan önce birey kendinde ki değişiklikleri dikkate almalıdır. Örneğin kadınlar kendi göğüslerini elle muayene etmeli önceden olmayan veya tespit edip takip ettiği büyüyen varsa doktora başvurmalıdır. Hızla zayıflama, ani tansiyon düşmesi veya çıkması gibi durumlarda, ciltte kahverengi iken büyüyen ve koyulaşan benler, büyümeye devam eden deri altı beze türü yapılar, dikkate alınmalı ve doktora başvurulmalıdır.

1.7. Kanserden korunmak için neler yapılabilir

• Sağlıklı beslenmeye dikkat edin, raf ömrünün uzun olması için koruyucu kimyasal içeren paketli gıdalardan uzak durun.

• Gerek glikoz şurubu, yoğun çözünmüş şekerli (kola vb.) gerekse tatlandırıcı olarak satılan gıdalardan uzak durun.

• Maalesef günümüzde yüksek verim amacıyla fazla miktarda tarım ilacı kullanılmakta. Bol bol taze meyve ve sebze tüketin fakat zirai ilaç konusunda daha seçici ve bilinçli olun bol temiz su ile iyice yıkamadan tüketmeyin.

• Rafine edilmiş sıvı yağlar (Ayçiçeği, mısır vb.) ve margarin gibi yağları asla kullanmayın. Zeytinyağı ve doğal ortamında yaşayan hayvani yağları (tereyağı, iç yağı, kuyruk yağı) tüketmeye özen gösterin. Bu tarz yağları tüketseniz bile hareketsiz bir hayat yaşıyorsanız zarar görmeniz kaçınılmazdır.

• Doğal olarak hazırlanmış fabrikasyon olmayan yoğurt, turşu ve sirke gibi probiyotiklerden zengin gıdaları sofranızdan eksik etmeyin.

• UHT ve Pastörize sütler sağlıklı olma ve besin değeri bakımından çiğ süt ile kıyaslanamasa bile çiğ sütten geçebilen zoonoz hastalıklar düşünüldüğünde bu konuda risk alınması tavsiye edilemez. Bu durum dolayısıyla süt yerine peynir, kaşar, yoğurt gibi gıdaları tercih edebilirsiniz.

•Kanser, çiğ yiyeceklerdense, pişmiş yiyecekleri sever. Pişirme işlemi, besinlerdeki enzimleri ve vitaminleri yok etmektedir. Aşırı pişmiş, yanmış ve kızarmış gıdalardan özellikle yanmış yağlardan uzak durun. Pişirme işlemi için mikrodalga fırın ve teflon kaplar kullanmayın.

• Kanser hücreleri hızlı çoğalmak için şeker kullanırlar bunu bilerek fazla şeker veya karbonhidrat içeren gıdaya dayalı diyet asla tavsiye edilemez.

• Yapılan araştırmalarda kanser hücrelerinin oksijen sevmediği tespit edilmiştir. Kanser hastalarının temiz ve oksijen yönünden zengin hava ihtiva eden ortamlarda bulunması yararlarına olacaktır.

• Aşırı sıcak ya da soğuk gıda tüketmekten kaçının. Bu şekilde gıda tüketmenin gırtlak ve mide kanserine yol açtığı bildirilmektedir.

• Düzenli uyku uyumaya özen gösterin ve aşırı stresten uzak durun.

• D vitamini seviyenizi ölçtürün eksiklik varsa takviye almaya özen gösterin.

•Alkol ve sigara kullanmayın, muhakkak günlük belirli bir egzersiz programınız olsun.

2.KAYNAKLAR

Burley V.J. (1997). Sugar consumption and cancers of the digestive tract. *European Journal of Cancer Prevention*, Vol. 6, No. 5, pp. 422-434.

Cronin, K.A., Scott, S., Firth, A. U., Sung, H., Henley, S.J., Sherman, R.L., Jemal, A. (2022). Annual report to the nation on the status of cancer, part 1: National cancer statistics. *Cancer*, *128*(24), 4251-4284.

Dite, G.S., Whittemore, A.S., Knight, J.A., John, E.M., Milne, R.L., Andrulis, I.L., Hopper, J.L. (2010). Increased cancer risks for relatives of very early-onset breast cancer cases with and without BRCA1 and BRCA2 mutations. *British journal of cancer*, *103*(7), 1103-1108.

Howlader, N., Noone, A.M., Krapcho M., et al, eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016. *National Cancer Institute*; 2019.

Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of cancer research and practice*, *4*(4), 127-129.

Kanai, Y., Hirohashi, S. (2007). Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state. *Carcinogenesis*. 28: 2434-2442.

Key, T. J. (2011). Fruit and vegetables and cancer risk. *British journal of cancer*, *104*(1), 6-11.

Larsson, S. C., Bergkvist, L., Wolk, A. (2006). Consumption of sugar and sugar-sweetened foods and the risk of pancreatic cancer in a prospective study. *The American journal of clinical nutrition*, *84*(5), 1171-1176.

Jansen, L., Castro, F. A., Gondos, A., Krilaviciute, A., Barnes, B., Eberle, A., GEKID Cancer Survival Working Group. (2015). Recent cancer survival in G ermany: An analysis of common and less common cancers. *International journal of cancer*, *136*(11), 2649-2658..

Jon, Z., Cristiano, G., Santiago, P., Irene, F., Sonia, M-P., Luis, P-A. (2016). *Clinical Therapeutics.* 38, 7.

Michael H., Johannesen T.B., Gilbert E.S., Stovall, M., E van Leeuwen F., Rajaraman, P., Smith, S., Weathers, R.E., Aleman, B.M.P., Andersson, M., E Curtis3,R., Dores, G.M., Fraumeni, J,F., Hall, P., Holowaty E.J., Joensuu, H., Kaijser, M., Kleinerman R.A., Langmark, F., Lynch C.F., Pukkala, E., Storm H.H., Vaalavirta, L., W van den Belt-Dusebout A.,

Morton Lindsay M., Sophie D Fossa., Lois B Travis. (2016). Increased pancreatic cancer risk following radiotherapy for testicular cancer. *British Journal of Cancer*. 115, 901–908.

Litwin, M. S., Tan, H. J. (2017). The diagnosis and treatment of prostate cancer: a review. *Jama*, *317*(24), 2532-2542.

Makarem, N., Bandera, E. V., Nicholson, J. M., Parekh, N. (2018). Consumption of sugars, sugary foods, and sugary beverages in relation to cancer risk: a systematic review of longitudinal studies. *Annual review of nutrition*, *38*, 17-39.

Shin, D.W., Kim, Y.W., Oh, J.H., Kim, S.W., Chung, K. W., Lee, W. Y., Cho, J. (2011). Knowledge, attitudes, risk perception, and cancer screening behaviors among cancer survivors. *Cancer*, *117*(16), 3850-3859.

Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. (2013). Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin*, 63,11-30

Seely, S., Horrobin, D.F. (1983). Diet and breast cancer: the possible connection with sugar consumption. *Medical hypotheses*, *11*(3), 319-327.

Van den Belt-Dusebout, A.W., Aleman, B.M., Besseling, G., De Bruin, M.L., Hauptmann, M., Van 't Veer, M.B., De Wit, R., Ribot, J.G., Noordijk, E.M., Kerst, J.M., Gietema, J.A., Van Leeuwen, F.E. (2009). Roles of radiation dose andchemotherapy in the etiology of stomach cancer as a second malignancy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 75(5),1420–1429.

Zugazagoitia, J., Guedes, C., Ponce, S., Ferrer, I., Molina-Pinelo, S., Paz-Ares, L. (2016). Current challenges in cancer treatment. *Clinical therapeutics*, *38*(7), 1551-1566.

BÖLÜM 6

VİTAMİNLERİN KEŞFİ, TARİHSEL GELİŞİMİ ve ÖNEMİ

Doç. Dr. Aydın Şükrü BENGÜ

Öğr. Gör. Mahmut ÇOBAN

[1]Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO, Bingöl, Türkiye,
Orcid no: 0000-0002-7635-4855, abengu@bingol.edu.tr,
[2]Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO, Bingöl, Türkiye,
Orcid no: 0000-0002-8205-1076, mcoban@bingol.edu.tr,

1.GİRİŞ

Yaşam için gerekli olan birçok temel fizyolojik fonksiyon için gerekli olan besinler arasında vitaminler yer alır. Diğer besin sınıflarından farklı olarak vitaminler yapısal işlevlere hizmet etmez ve enerji sağlamaz. Bunun yerine oldukça spesifik ve çeşitli kullanımları vardır ve diyette sadece küçük miktarlarda gereklidir. Bir çok vitamin metabolik fonksiyon kazanabilmek için aktivasyona ihtiyaç duymaktadır.Vitaminler bahsi geçen bu birkaç özelliği paylaşsalar da kimyasal yapıları ve kategorize edilmeleri diğer besin maddelerine göre karmaşıktır. Bazı vitaminler enzimlerin kofaktörü olarak görev alabilir; A, K, C, pantotenik asit, tiamin, riboflavin, niasin, B_{12} ve folik asit gibi. Bazı vitaminler antioksidan özelliğe sahiptir; A, E ve C vitamini gibi. A ve D vitaminleri hormon görevi de görürken, A vitamini ayrıca görmede fotoreseptif bir kofaktör işlevi de vardır.

1.1 Çığır Açan Bir Keşif, Vitaminler

Günümüzde birçok dilde ‘vitamin’ olarak kullanılan bu terim, 20. yüzyılda beslenme ile sağlık arasındaki karşılıklı etkileşimi düşündüren bir devrimden doğdu. Bu devrim, artık o kadar iyi anlaşılan ve meslekten olmayan kişiler tarafından bile sorgusuz sualsiz kabul edilen iki fenomenin gerçekleştirilmesini içeriyordu.

1.Diyet ile çok değerli besin maddeleri alırız

2.Bazı besinlerin yetersiz alımı spesifik hastalıklara sebep olabilir.

Günümüz dünyasında bu kavramların her biri apaçık görünebilir; ancak 19. yüzyılda mikrobiyolojide yapılan önemli keşiflere hala yanıt veren ve onlardan büyük ölçüde etkilenen bir dünyada, her biri sağlık alanındaki çağdaş düşünceden büyük bir sapmayı temsil ediyordu. 19 yy. fizyologları, gıdaları ve diyetleri yalnızca beş tür besin kaynağı olarak algıladılar; protein, yağ, karbohidrat, su ve kül. Bunların hepsi çoğu gıdanın nerdeyse yüzde yüzünü oluşturuyordu. Bu görüşe göre, yüzyılın başında, şimdiye kadar bilinmeyen besinlerin varlığına işaret ettiği görülebilen deneysel bulguların, bunun yerine, tanımlanamayan hastalığa sebep olan mikroplara karşı doğal panzehirlerin varlığını doğruladığı şeklinde yorumlanması anlaşılabilir. Bilimdeki önemli buluşların dünyaya bakış açısını yönlendirme hatta tuzağa düşürme yolları vardır, bu eğilime direnmek eleştirel ve sürekli sorgulayan zihinlere bağlıdır. Bu tür zihinlerin erken dönem beslenme araştırmalarına dahil olduğu,

görünürde faydalı yeni beslenme faktörlerinin keşfedilmesi üzerine çıkan hararetli tartışmalar ve sık sık yapılan polemiklerle kanıtlanmaktadır. Yine de, beslenme bilimi olarak ortaya çıkan şeyin sistematik gelişimi, bu tür deneysel gözlemleri yorumlamak için yeni bir entelektüel yapıya bağlıydı.

1.2 Yeni Bir Kavram Doğuyor, Vitamin

Daha sonra *tiamin* olarak adlandırılacak olanın doğasının açıklığa kavuşturulması, fizyolojide böylesine yeni bir yapının oranlanmasına sebep oldu. Yaygın düşünceden sapmanın etkisinin farkında olan bilim insanı Polonyalı biyokimyacı Casimir Funk, bu *'hayati amin*'in kimyasal doğasına ilişkin bulgularını genelleştirmeyi, diyetlerle ilişkili bu tür yardımcı faktörler ve birçokları için genel bir tanımlayıcı olarak *vitamine* terimini önerdi. Kısa bir süre sonra açıklanacak olan faktörlerin, hepsi nitrojen içermeyen, kimyasal olarak biraz heterojen bir grup içermesi, ilk başta *vitamine teorisi* olarak sunulan, daha sonra beslenmede anahtar bir kavram haline gelecek olan şeyin önemini azaltmaz: *vitamin* . Vitamin terimi çeşitli şekillerde tanımlanmıştır. Beslenmeyi doğru anlayabilmek için vitamin kavramı çok önemlidir, bu sebeple vitaminin gerçek tanımı bu anlayışın sonucu olarak gelişmiştir.

1.3 Vitaminlerin Tanımlanması

Beslenmenin bu yönüyle ilgili çalışmanın amaçları doğrultusunda, A vitamini şu şekilde tanımlanır:

A vitamini;

- Protein, yağ ve karbohidratlardan farklı bir *organik bileşiktir*.
- Gıdalarda çok az miktarda bulunan *doğal bir bileşendir*.
- Çok az miktarda olsa bile *normal fizyolojik fonksiyonların devamı* için esastır.
- Yokluğu veya kullanılamaması durumunda *özel eksiklik sendromları* oluşur.
- Konak tarafından normal fizyolojik *ihtiyaçları karşılamaya yetecek miktarda sentezlenmez.*

Bu tanım, bu besin sınıfını diğerlerinden (örneğin, proteinler ve amino asitler, esansiyel yağ asitleri ve mineraller) etkili bir şekilde ayırdığı ve çeşitli normal fizyolojik fonksiyonlardaki ihtiyaçları gösterdiği için vitamin çalışmalarında faydalı olacaktır. Dahası, vitaminleri kimyasal ortamın

hayvanların (insanlar dahil) hayatta kalmak için bağlı olması gereken kısmına yerleştirir, böylece vitaminleri hormonlardan ayırır.

1.4 Vitaminler İle İlgili Bazı Hatırlatmalar

Bununla birlikte, yararlılığına rağmen, bu işlevsel tanımın, özellikle son maddeyle ilgili olarak ciddi sınırlamaları olduğu, çünkü birçok tür gerçekten de vitaminlerin en azından bir kısmını sentezleyebildiği hemen anlaşılacaktır. Dört örnek bu noktayı göstermektedir:*C vitamini*, birçok hayvan türü askorbik asidi sentezleyebilir. Sadece L-glunolakton oksidaz enziminden yoksun olanlar (örneğin, kobay, insanlar) bunu yapamaz; sadece onlar için askorbik asit uygun şekilde *C vitamini* olarak adlandırılabilir.*D vitamini*, mütevazı miktarda güneş ışığına maruz kalan bireyler, hormon işlevi gören kolekalsiferol üretebilir. Sadece ultraviyole ışığa yeterince maruz kalmayan bireyler (örneğin, kapalı alanlarda yetiştirilen hayvanlar, günlerinin çoğunu içeride geçiren insanlar) D vitamini diyet kaynaklarına ihtiyaç duyar. *Kolin*, çoğu hayvan türü, kolini sentezlemek için metabolik kapasiteye sahiptir; ancak bazıları (örneğin civciv, sıçan) yetersiz miktarda metil verici bileşikle beslenirlerse bu kapasiteyi kullanamayabilirler. Ek olarak, civciv gibi bazıları birkaç haftalık olana kadar bu kapasiteyi tam olarak geliştiremez. Bu nedenle, genç civcivler ve sınırlı metil grupları sağlayan diyetlerle beslenen diğer türlerin bireyleri için *kolin* bir vitamindir.*Niasin,* tüm hayvan türleri nikotinik asit mononükleotidi (NMN) triptofan amino asitinden sentezleyebilir. Sadece bu metabolik dönüşümün özellikle etkisiz olduğu hayvanlar (örn. kedi, balıklar) ve diyetle düşük miktarda triptofanla beslenen diğerleri, diyette bir *niasin* kaynağına gereksinim duyar.

Tablo 1. Vitaminler: vitamerleri, provitaminleri ve işlevleri. (Combs, 2016)

Grup	Vitamerler	Provitaminler	Fizyolojik işlevleri
A vitamini	Retinol Retinal Retinoik asit	B- karoten Cryptoxanthin	Görme pigmentleri, epitel hücre farklılaşması
D vitamini	Kolekalsiferol (D_3) Ergokalsiferol (D_2)		Kalsiyum dengesi, kemik metabolizması
E vitamini	α- tokoferol γ- tokoferol		Membran antioksidanları
K vitamini	Filloquinon (K_1) Menaquinon (K_2) Menadion (K_3)		Kan pıhtılaşması, kalsiyum metabolizması

C vitamini	Askorbik asit Dehidroaskorbik asit		Kollajen ve karnitin oluşumunda, ilaç ve steroidlerin metabolizmasında, hidroksilasyonlarda indirgeyici.
B_1 vitamini	Tiamin		Transketolasyon ve 2- keto asitlerin (pirüvat gibi) dekarboksilasyonlarında koenzim
B_2 vitamini	Riboflavin		TCA döngüsü ve yağ asitlerinin redoks reaksiyonlarında koenzim
Niasin	Nikotinik asit Nikotinamid		Çeşitli dehidrojenaz enzimlerinin koenzimi
B_6 vitamini	Piridoksol Piridoksal Piridoksamin		Amino asit metabolizmasında koenzim
Folik asit	Folik asit Poliglutamil folasin		Tekli karbon metabolizmasında koenzim
Biotin	Biotin		Karboksilasyonlarda koenzim
Pantotenik asit	Pantotenik asit		Yağ asidi metabolizmasında koenzim
B_{12} vitamini	kobalamin		Propiyonat, amino asitler ve tekli karbon birimlerin metabolizmasında koenzim

Bu karşı örnekler akılda tutularak, *bir vitaminin tanımı*, hayvan türlerine, gelişim aşamasına, diyet veya beslenme durumuna ve fiziksel çevre koşullarına özgü çağrışımlara sahip olarak anlaşılabilir.

- Bazı bileşikler bir tür için vitamin iken diğer türler için değildir.
- Bazı bileşikler sadece spesifik diyet ve çevre şartları altında vitamindir.

2.Bilinen Vitaminler

On üç madde veya madde grubu artık genel olarak vitamin olarak kabul edilmektedir (tablo 1); diğerleri önerilmektedir. Bazı durumlarda, bilinen isim aslında niteliksel olarak karşılaştırılabilir metabolik aktivitelere sahip kimyasal olarak ilişkili bileşiklerin bir ailesi için isimsel tanımlayıcıdır. Örneğin, *E vitamini* terimi, farelerde cenin rezorpsiyonu ve civcivlerde miyopatiler gibi sendromların önlenmesinde aktif olan tokol veya tokotrienol analoglarını ifade eder. Bu durumlarda aynı vitamin ailesinin üyelerine vitamer adı verilir. Bazı

karotenoidler, A vitamininin metabolik olarak aktif formunu vermek üzere metabolize edilebilir; gerçek bir vitaminin böyle bir öncüsüne provitamin denir.

3. Beslenmenin Bir Bilim Olarak Ortaya Çıkışı

19. yüzyılın sonundan başlayarak sadece elli yıl içinde vitaminler keşfedildi. Keşifleri, geçmişe bakıldığında entellektüel gelişimin farklı dallarını izlemiş olarak görülebilecek yüzlerce insanın faaliyetlerinin sonucuydu. Bu dallar, her biri diyet ve sağlık arasındaki ilişkinin tanınmasından başlayarak, doğal dünyadaki gözlemlerden tümevarımsal olarak türetilen fikirlerden yayıldı. Ardından dallar, günümüzde deneysel beslenmede kullanılan temel yaklaşımları hem üreten hem de bu yaklaşımlardan yola çıkarak tekrarlanan analizlerle budandı. Bir kez budandıktan sonra, keşif kolu saf gözlemciye doğrudan görünebilir. Ancak bilimsel keşif bu şekilde de gerçekleşmez; bunun yerine, birçok katılımcının birçok dalda katkı sağladığı zikzak bir rota izleme eğilimindedir. Aslında, her katılımcının o andaki görüşü, birbirine dolanmış hipotezler ve gerçeklerden oluşan bir kıvılcım olabilir. Ortaya çıkan keşif dalının görünüşte basit görünümü, her biri bilimsel keşif süreci hakkında öğretici olabilecek yanlış başlangıçların ve desteklenmeyen hipotezlerin ölü dallarını atarak elde edilen bir yanılsamadır. Bu nedenle, vitaminlerin keşfiyle birlikte, beslenme, büyük ölçüde gözlemsel bir faaliyetten, giderek daha fazla deney yoluyla hipotez testine dayanan bir faaliyete geçti ve ampirizmden bilime geçti. Hem bilimsel keşif süreci hem de bilimsel bir disiplin olarak beslenmenin gelişim süreci, belki de en iyi şekilde vitaminlerin keşfedilme tarihiyle açıklanabilir.

3.1 Beslenme Biliminin Keşif Süreci; Ampirizm ve Deney

Tarih, bilimsel keşif sürecinin, doğal dünya hakkındaki genel fikirlerin, içindeki tikellerin gözlemlerinden sentezlenmesiyle başladığını gösteriyor - *ampirik bir aşama.* Vitaminlerin keşfinde, bu ilk aşama, her biri çeşitli toplumlarda uzun süredir yaygın olan gece körlüğü, iskorbüt, beriberi, raşitizm ve pellegra gibi insan hastalıkları ile diyet arasındaki ilişkilerin tanınmasıyla karakterize edildi. Keşif sürecindeki bir sonraki aşama, deneysel olarak test edilebilecek hipotezler oluşturmak için bu genellemelerin kullanılmasını içerir - *deneysel aşama*. Vitaminlerin keşfinde bu aşama, modern deneysel beslenmenin iki temel aracının geliştirilmesini zorunlu kıldı: hayvan modeli ve

saflaştırılmış diyet. Bu araçların her ikisinin mevcudiyetinin, her bir vitaminin keşfi için gerekli olduğu kanıtlanmıştır: bir hayvan modelinin geliştirilmesinin geç kaldığı durumlarda (örneğin, pellagra için), vitaminin kimliğinin aydınlatılması önemli ölçüde gecikmiştir.

3.1.1 Vitamin Keşfinin Ampirik Safhası

Beslenme araştırmalarının ampirik aşamasına girmesinin önündeki en büyük engel, 19. yüzyıl boyunca devam eden, gıdalar hakkındaki bilimsellikten önceki tutumların sağladığı katı tutum olduğu kanıtlandı. Birçok toplum, dünyanın belirgin şekilde zıt bölgelerindeki insan nüfusunun, çok farklı beslenme biçimleriyle yaşamalarına rağmen benzer sağlık standartlarını deneyimleme eğiliminde olduğunu gözlemlemişti. Bu gözlemler, sağlığın özellikle tüketilen gıda türlerinden etkilenmediğini göstermek için 19. yüzyıl fizyologları tarafından alınmıştır. Gıdaların, o zamanlar protein, mevcut enerji, kül ve sudan oluşan bilinen tek besin kaynağı olarak düşünülüyordu. Fransız bilim adamı Antoine Lavoisier liderliğindeki 'kimyasal devrim' bu besinlerin temel bileşenlerini ve metabolik kaderlerini araştırmaya başlarken, Alman kimyager Justus von Liebig'in geniş çapta okunan fikirleri, proteinin hem doku büyümesi ve onarımı hem de enerji üretimi ile ilişkili tek gerçek temel besin maddesi olarak görülmesiyle sonuçlandı. Yüzyılın ortalarında, Pasteur, Liebig, Koch ve diğerlerinin mikrobiyoloji alanındaki önemli keşifleri, dikkatleri diyet ve sağlık arasındaki potansiyel ilişkiye daha da fazla çekti. İlk kez, önce şarbon ve sonra diğerleri olmak üzere birçok hastalık mikrobiyal bir etiyoloji açısından anlaşılabildi. Yüzyılın sonuna gelindiğinde, tıpta muazzam bir değeri olduğu kanıtlanan mikrop teorisi, çoğu hastalığın etiyolojisine ilişkin hipotezleri yönlendirdi. Beslenme keşfinin endüktif aşamasına girmenin önündeki bir engel olarak bu anlayışın etkisi, tavukta beriberi benzeri bir hastalığı önlemek için pirinç kepeğinden suda çözünen bir faktör (tiamin vitamini) bulan Hollandalı doktor Christian Eijkman'ın durumuyla örneklendirilebilir.

3.1.2 Diyete Bağlı Hastalıklar

Yine de, insan hastalığının etiyolojisine ilişkin hakim görüşler üzerinde çok az etkiye sahip gibi görünseler de, 1800'lerin sonlarına gelindiğinde, diyet ve hastalık arasında birkaç ampirik ilişki kurulmuştu.Beslenme ile amipirik

olarak ilişkili hastalıklar: skorbüt, beriberi, gece körlüğü, kornea ülserasyonu, raşitizm ve pellegra.

3.2 Skorbüt

Birkaç yüzyıldır, diş eti ağrıları, ağrılı eklemler ve çoklu kanamaları içeren iskorbüt hastalığının diyete yeşil sebze veya meyveleri dâhil ederek önlenebileceği bilinmektedir. M.Ö 1150 de Eber papirüslerinde ve yine M.Ö. 450 de Hipokratın yazılarında tarif edilen bu hastalık eski toplumlarda sık görülmekteydi. Skorbüt hastalığı orta çağlarda özellikle kış mevsiminde kuzey Avrupa'da C vitaminince eksik beslenme kaynaklı sık görülmekteydi. Ayrıca denizciler arasında da uzun süre tuzlanmış ve kurutulmuş besinler tüketmek zorunda kaldığından skorbüt yaygındı. Portekizli ünlü seyyah Vasco de Gama 1458'deki bir seyahatinde denizcilerinin %60' dan fazlasını skorbütten kaybetmiştir. 1535-1536 yıllarında Fransız seyyah Jacques Cartier yenidünya keşfi seyahatleri esnasında 103 denizciden 25 ini kaybetmiştir. 1593'de İngiliz amiral Richard Hawkins'in yazdıklarına göre, kariyeri boyunca 10.000 den fazla denizcinin bu hastalıktan vefat ettiğini görmüştür. O yıllarda ölümcül olan bir hastalığın günümüzde pek de ismini duymuyor olmamız sevindirici olsa da tek bir vitamin eksikliğinin sonuçlarını düşünmek açısından çarpıcı bir örnektir. 1746'da skorbüt hastası İngiliz oniki denizciye gemide limon ve portakal diyeti iki hafta uygulanarak altıncı günde hastalığın iyileştiği gözlenmiştir. 1804 yılına kadar İngiliz deniz kuvvetlerine günlük limon suyu içirilmiştir. 19. yüzyılın başlarında, skorbüt hastalığının beslenmeyle ilgili bir sebebi ve tedavisi konusunda hiçbir şüphe kalmadı; yine de etiyolojisinin ve metabolik temelinin aydınlatılması için bir asırdan fazla zaman geçmesi gerekmiştir. Gıda kıtlığı durumlarında skorbüt salgınları devam etmiştir; İngiliz hapishanelerinde, Kaliforniya altınına hücum sırasında, Kırım savaşında askerler arasında ve Paris Kuşatması sırasında (1871) vatandaşlar arasında.

3.3. Beriberi

Eski Çin şifalı bitki uzmanlarınca (M.Ö. 2600) beriberi ile tutarlı belirtilerin (örneğin kalp yetmezliğine, nefes darlığına ve bazı durumlarda ödemlere yol açan bacaklarda başlangıçtaki zayıflık ve his kaybı) tanımlandığı söylenir. Kesinlikle, beriberi de kabuksuz ve beyaz pirincin ana gıda olduğu diyetlerle beslenen birçok Asya popülasyonunda yaygın olan tarihi bir hastalık

olmuştur. Örneğin 1860'lı yıllarda Japon deniz kuvvetlerinin % 30 ile 40'ı bu hastalıktan etkilenmiştir. 1870 lerde Dr. Kanehiro Takaki, beriberi ile beslenmenin ilişkili olduğunu fark eden ilk kişi oldu. Japon denizciler, beriberiye rastlanmayan Avrupadaki denizcilere göre daha az protein almaktaydı. Takaki denizde kontrolsüz bir çalışma yürüttü ve denizcilerin diyet menüsünü pirinç pahasına daha fazla et, yoğunlaştırılmış süt, ekmek ve sebze dahil ederek protein alımını artırmak için değiştirdi. Bu, beriberinin hem insidansını hem de ciddiyetini önemli ölçüde azalttı ve bunu, yetersiz diyet proteininin neden olduğu hastalığın teyidi olarak yorumladı. Takaki'nin diyet tavsiyelerinin Japon donanması tarafından benimsenmesi etkili oldu - hastalığı 1880'de bir gemi sorunu olarak ortadan kaldırdı - çağdaş bilgi ışığında makul olan sonucunun daha sonra yanlış olduğu ortaya çıktı.

3.4 Raşitizm

Büyüyen kemiklerin hastalığı olan raşitizm, çocuklarda uzun kemiklerin deformasyonu (örneğin, çarpık bacaklar, çarpık dizler, üst ve/veya alt kolların eğrilikleri), şişmiş eklemler ve/veya genişlemiş kafalar olarak kendini gösteren ve genellikle toplumlarının kentleşmesi ve sanayileşmesi ile yaygınlaşan bir hastalıktır. Geniş bir ölçekte ortaya çıkışı, skorbüt veya beriberi'den daha yeni ve coğrafi olarak daha kısıtlıydı. Hastalığın ilk yazılı açıklamasının, 1645'te Oxford Üniversitesi'nde tıp tezinde konu hakkında yazan Daniel Whistler'a ait olduğuna inanılmaktadır. Hastalığın tam bir açıklaması bundan kısa bir süre sonra (1650'de) Cambridge profesörü Francis Glisson tarafından yayınlandı, bu nedenle raşitizmlerin on yedinci yüzyılın ortalarında İngiltere'de bir halk sağlığı sorunu haline geldiği açıktır. Ancak, raşitizm en azından bu ölçekte daha önceki toplumları etkilememiş görünüyor. 1980'lerin sonunda İngiliz doktor T.A. Palm, Mısırlı ölülerin mumyalanmış kalıntılarında hastalık belirtisi olmadığını göstermiştir. 19. yüzyılın sonlarında, Londra'daki çocuklar arasında raşitizm vakası üçte birini aştı: yirminci yüzyılın başında, yaygınlık tahminleri %80'e kadar çıktı ve raşitizm "İngiliz hastalığı" olarak bilinir hale geldi. 1890'da Palm, raşitizmlerin yalnızca nispeten az güneş ışığının olduğu yerlerde (örneğin kuzey enlemlerinde) yaygın olduğuna işaret eden ilk kişi oldu. Palm, güneş ışığına maruz kalmanın raşitizmi önlediğini öne sürdü; ancak diğerleri, hastalığın kalıtım veya frengi gibi başka nedenleri olduğuna karar verdi. Yirminci yüzyıl boyunca, 1848'e kadar, batılı tıp camiasının çoğu,

Manchester'da yetişkin raşitizmi tedavi etmek için kullanılan ve Baltık ve Kuzey Denizi kıyılarındaki insanlar arasında uzun süredir popüler olan bir gıda ilacından (morina karaciğeri yağı) ya habersizdi ya da şüpheyle yaklaşıyordu. 1920'lere kadar raşitizm etiyolojisine ilişkin kafa karışıklığı netleşmeyecekti.

3.5 Pellegra

Deri ve ağız lezyonları ve mide-bağırsak ve zihinsel rahatsızlıklarla karakterize edilen bir hastalık olan pellagra da oldukça yakın bir zamanda insan toplumlarında yaygın hale geldi. 18. yüzyıldan önce halk geleneklerinde bile hastalığa dair hiçbir kayıt olmadığı görülüyor. ilk belgelenmiş tarifi, 1735'te, gözlemlerini Kral V. Philip'in sarayına atandıktan birkaç yıl sonra tanıştığı Fransız doktor François Thiery tarafından yayılan İspanyol doktor Gaspar Casal'a aitti. 1755'te Thiery, de Vandermonde dergisinde Casal'ın gözlemlerinin kısa bir açıklamasını yayınladı; bu, hastalık hakkında yayınlanan ilk rapor oldu. Casal'ın kendi açıklaması, ölümünden üç yıl sonra 1972'de yayınlanan, kuzey İspanya'nın salgın ve endemik hastalıkları hakkındaki kitabı Historia Natural y Medico de el Principado de Asturias'ta yer aldı. Casal, halk arasında mal de la rosa olarak adlandırılan hastalığı, cüzzamın tuhaf bir biçimi olarak görüyordu. 1771'de İtalyan hekim Francesco Frapolli tarafından benzer bir dermatolojik hastalık tanımlandı. Animadversiones in Morbum Volgo Pelagrum adlı çalışmasında, hastalığın kuzey İtalya'da yaygın olduğunu bildirdi. O bölgede yakın zamanda Amerika'dan getirilen mısır popüler bir ürün haline geldi ve ana tahıl olarak çavdarın yerini aldı. Bu hastalığın yerel adı pürüzlü deri anlamına gelen pelagra idi. 1740 gibi erken bir tarihte görüldüğüne dair bazı kanıtlar var. Her halükarda, 1784'te, o bölgede pelagra (şimdi pellagra olarak telaffuz ediliyor) yaygınlığı o kadar büyüktü ki, tedavisi için Legano'da bir hastane kuruldu. Pellagra tedavisindeki başarı, diyet dışındaki faktörlere, örneğin dinlenme, temiz hava, su, güneş ışığına atfedilmiş görünmektedir. Bununla birlikte, hastalık, yoksulluk ve mısır bazlı diyetlerin tüketimi ile ilişkilendirilmeye devam etti. Pellagra'nın İtalya'da bulunmasının ardından, hastalık 1829'da Hameau tarafından Fransa'da rapor edilmiştir. 1845 yılına kadar Fransız doktor Roussel, pellagra'yı Casal'ın mal de rosa'sı ile ilişkilendirdi ve benzer bir flemma salada da dahil olmak üzere bu hastalıkların ilişkili veya aynı olduğunu öne sürdü. Roussel, hipotezini doğrulamak için 1847'de yedi ayını Casal'ın kuzey İspanya'da mal de la rosa vakalarını

araştırmak için çalıştığı bölgede geçirdi; dönüşünde, Fransız Tıp Akademisi'ne vardığı sonucu destekleyen kanıtlar sundu. Daha sonra pellagra, 1858'de Theodari tarafından Romanya'da ve 1874'te Pruner Bey tarafından Mısır'da rapor edildi. Mısır ekiminin başladığı Yucatan Yarımadası'nda pellagra'nın hiçbir zaman endemik olmaması yıllarca açıklanamayacak bir meraktı; hastalık 1896'ya kadar orada rapor edilmedi. Pellagra'nın Amerika Birleşik Devletleri'nde ne kadar süredir endemik olduğu bilinmemektedir; ancak, yirminci yüzyılın başlarında yaygınlaştı. 1912'de J. W. Babcock, Güney Carolina devlet hastanesinin kayıtlarını inceledi ve hastalığın burada 1828 gibi erken bir tarihte ortaya çıktığı sonucuna vardı. Genel olarak pellagra'nın Amerikan İç Savaşı (1861-1865) sırasında veya sonrasında güney eyaletlerindeki gıda kıtlığıyla bağlantılı olarak ortaya çıktığına inanılmaktadır. George Searcy'nin Amerikan Tabipler Birliği'ne verdiği 1907 tarihli raporunda, hastalığın en azından Alabama'da endemik olduğunu açıklamıştır. 1909'a gelindiğinde, birçoğu Pellagra Komisyonlarını görevlendirmiş olan 20'den fazla eyalette tespit edildi ve Güney Karolina'da hastalık hakkında ulusal bir konferans düzenlendi. Bilim, ilk ortaya çıktığı dönem, pellagrayı yoksullukla ve ana temel gıda maddesi olarak mısıra bağımlılıkla ilişkilendirmişti. Bozuk mısırla ilişkili bir toksinin neden olduğuna dair fikirler erken dönemde ortaya çıksa da yine de yirminci yüzyılın başında başka hipotezler de popülerlik kazandı. Bunlar, belki de bir böcek vektörü olan bulaşıcı bir ajanın önerisini içermekteydi.

4.1900'de Yaygınlaşan Fikirler

Bu nedenle, 20. yüzyılın başlarında, dört farklı hastalık, belirli beslenme biçimleri ile bağlantılıydı. Dahası, 1900'e gelindiğinde, en az iki ve muhtemelen üç hastalığın diyetteki değişikliklerle tedavi edilebileceği artık bilinmekteydi (tablo 2).

Tablo 2. 1900'e kadar diyet ile ilişkisi bilinenler hastalıklar ve önlemleri (Combs, 2016)

Hastalık	**Sebep olan diyet**	**Bilinen önlemleri**
Skorbüt	tuzlanmış gıdalar	Taze sebze ve meyveler
Beriberi	beyaz pirinç temelli beslenme	Etler, sebzeler
Raşitizm	çok az kaliteli yağ	Yumurta, Morina karaciğeri yağı
Pellegra	mısır bazlı beslenme	—

Tablo 2'de listelenenlere ek olarak diğer hastalıkların, şimdi diyet tedavisi olarak adlandırılacak olan tedaviye yanıt verdiği eski çağlardan beri biliniyordu. Bir örnek, kaydedilen ilk tıbbi durumlardan biri olan gece körlüğü hastalığı, yani karanlığa uyum bozukluğudur. Eski Yunan, Roma ve Arap hekimlerinin yazıları, hayvan karaciğerinin hastalığın hem önlenmesinde hem de tedavisinde etkili olduğunun bilindiğini göstermektedir. Aslında, karaciğerin gece körlüğünün önlenmesi için kullanılması, çoğu denizci topluluğunun halk kültürünün bir parçası haline geldi. Artık kalıcı körlükle sonuçlanan ilgili bir durum olduğu bilinen kornea ülserasyonu, 18. ve 19. yüzyıllarda protein-enerji yetersiz beslenmesinin yanı sıra menenjit, tüberküloz ve tifo gibi hastalıklarla bağlantılı olarak kabul edildi. Rusya'da uzun Lenten oruçları (Hristiyanlıkta, 40 gün hayvansal gıdanın tüketilmediği bir oruç şekli) sırasında meydana geldi. Daha sonra, 1881'de morina balığı karaciğer yağının hem gece körlüğünün hem de erken kornea lezyonlarının tedavisinde etkili olduğu anlaşıldı. yüzyılın sonuna kadar bu yağ Avrupa'da rutin tedavi için kullanıldı. Ne yazık ki, bu bilginin çoğu göz ardı edildi ve hastalığın yeni mikrop teorisi tarafından harekete geçirilen bir tıp topluluğu tarafından önemi tam olarak takdir edilmedi. Bu hastalıkların etiyolojileri için alternatif teoriler popülerdi. Bu nedenle, yirminci yüzyıl başladığında, iskorbüt, beriberi ve raşitizme, normal sağlık için gerekli olan bir şeyin yokluğundan ziyade bir bakteri veya bakteriyel toksinin sebep olduğu yaygın olarak kabul edildi. Bazıları raşitizmin hipotiroidizme

bağlı olabileceğini düşünürken, diğerleri bunun egzersiz eksikliğinden veya aşırı laktik asit üretiminden kaynaklandığını düşündü. Bu teorilerden zor vazgeçildi ve bu süreçte çok sayıda ölümler yaşadı. Harris (1955), yukarıda özetlenen diyet-hastalık ilişkileri tarafından sunulan ipuçlarına ilgi eksikliğini açıklarken şöyle düşündü: 'Belki de bunun sebebi, insan zihninin, kötülüğe herhangi bir yararlı özelliğin yokluğundan ziyade bazı olumlu kötü etkenlerin neden olduğuna inanmasının daha kolay görünmesidir'.

4.1.Ampirizmin Sınırlamaları

Aslında, vitaminlerin keşfedilme süreci ampirik aşamasında olabildiğince ilerlemişti. Bunların etiyolojilerini anlamada daha fazla ilerleme, çeşitli hipotezlerin titiz bir şekilde test edilmesini, yani beslenme keşfinin tümdengelim aşamasına girilmesini gerektirecektir. Ancak bu hareket, üretken bilimsel deneyler için daha önce mevcut olmayan araçlar gerektiriyordu.

4.2.Vitamin Keşfinin Deneysel Aşaması

Tüm olası durumların incelenemediği (yani katı bir şekilde tümevarımsal akıl yürütmenin kullanıldığı) bir dünyada, doğal gerçekler yalnızca zaten doğru olduğu bilinen öncüllerin araya girmesiyle (yani tümdengelim yoluyla) öğrenilebilir. Hem tümevarım hem de tümdengelim yaklaşımları bağlantılı olabilir; yani gözlemden elde edilen olası sonuçlar, bilimsel deney sürecinde tümdengelim yoluyla test etmek için hipotezler olarak kullanılabilir.

4.3.Beslenme Araştırmalarının Gereklilikleri

Bilimsel deneylerin bilgilendirici sonuçlar vermesi için hem *tekrarlanabilir* hem de *uygun* olması gerekir. İlk noktanın değeri, *tekrarlanabilirlik*, apaçık olmalıdır. Doğal gerçekler sabit kabul edildiğinden, tekrarlanamayan sonuçlar onları ortaya çıkaracak şekilde yorumlanamaz. İkinci noktanın değeri, *uygunluk*, bir hipotezi gerçek dünya bağlamında test etmek mümkün olmadığında giderek daha önemli hale gelir. Bu gibi durumlarda, bilimde *model* olarak bilinen bir yapı olan nihai ilgi bağlamının bir temsilini kullanmak gerekli hale gelir. Modeller pratik zorunluluktan doğar, ancak doğrudan incelenemeyen durumların analojileri olarak hizmet etmeleri için dikkatle geliştirilmeleri gerekir.

4.4. Tanımlanmış Diyetler ile Tekrarlanabilirlik Sağlandı

Tekrarlanabilirlik beslenme deneyleri, tanımlanmış bileşime sahip diyetlerin kullanılmasıyla mümkün hale geldi. Beslenme araştırmalarında ortaya çıkan en faydalı tanımlanmış diyet türü saflaştırılmış diyettir. Bu tür diyetler, kimyasal bileşimi makul ölçüde iyi bilinebilen yüksek düzeyde rafine edilmiş bileşenler (örneğin, izole edilmiş proteinler, rafine şekerler ve nişastalar, rafine yağlar) kullanılarak formüle edildi. Deneysel beslenmeyi kolaylaştıran, tanımlanmış diyetlerin kullanılması oldu; bu tür diyetler, karşılaştırılabilir sonuçlar elde etmek için aynı veya diğer araştırmacılar tarafından defalarca hazırlanabilir. Tanımlanmış diyetlerin kullanımıyla elde edilen sonuçlar tekrarlanabilir ve bu nedenle öngörülebilirdi.

4.5. Uygun Hayvan Modelleri ile İlişki Düzeyi Sağlandı

Beslenme araştırmalarında uygunluk, insan tıbbında ilgili hastalıklara veya insan tıbbında veya hayvansal üretimde ilgili fizyolojik süreçlere uygun hayvan modellerinin tanımlanmasıyla mümkün hale gelir. Bunlardan ilki, insan hastalıklarını inceleyen keskin gözlemciler tarafından tamamen şans eseri keşfedildi. Nihayetinde, hayvan modellerinin kullanılması, vitaminlerin her birinin keşfedilmesine ve ayrıca yaklaşık 40 besinin her birinin beslenme rollerinin ve metabolik fonksiyonlarının aydınlatılmasına yol açacaktır. Uygun hayvan modellerinin dikkatli kullanımı, insan deneklerde veya ilgili diğer hayvan türlerinde başka türlü yapılamaz veya düşünülemez olan çalışmaları mümkün kılmıştır.

4.6. Beslenme Biliminin Doğuşunda Başlıca Kilometre Taşları

- Bazı hastalıkların diyetle ilgili olduğunun farkına varılması
- Uygun hayvan modellerinin geliştirilebilmesi
- Tanımlanmış diyetlerin kullanımı

Görüldüğü gibi 20. yy. bilim dünyasına yeni bakış açısı kazandıran ve deneysel bilimin doğmasına sebep olan vitaminlerin keşfi hızlı olmuştur. Vitaminlerin keşfedilmesi 1906 ile 1934 yılları arasında olmuş, sentezlenmeleri ise 1932 ile 1970 yılları arasında olmuştur. Tüm vitaminlerin izole edildikleri doku ve keşif sırası ile tablo 3 de gösterilmiştir.

Tablo 3. Vitaminlerin keşif sıralaması (Combs, 2016, Isler, 1982)

Vitamin	**İzole edilen doku**	**Keşif**	**İzolasyon**	**Yapısının tespiti**	**Sentezi**
Tiamin	Pirinç kepeği	1906	1926	1932	1933
C vitamini	Adrenal korteks, limon	1907	1926	1932	1933
A vitamini	Balık karaciğer yağı	1915	1937	1942	1947
D vitamini	Balık karaciğer yağı, maya	1919	1932	1932 (D_2)	1932
				1936 (D_3)	1936
E vitamini	Buğday tohumu yağı	1922	1936	1938	1938
Niasin	Karaciğer	1926	1937	1937	1867*
B_{12} vitamini	Yumurta albumini	1926	1948	1955	1970
Biotin	Karaciğer	1926	1939	1942	1943
K vitamini	Yonca filizi	1929	1939	1939	1940
Pantotenik asid	Karaciğer	1931	1939	1939	1940
Folik asit	Karaciğer	1931	1939	1943	1946
Riboflavin	Yumurta albumini	1933	1933	1934	1935
B_6 vitamini	Pirinç kepeği	1934	1936	1938	1939

*Niasinin kimyasının çoğu, besinsel rolleri tanınmadan önce biliniyordu.

5.KAYNAKLAR

Cashman, K. D. (2020). Vitamin D deficiency: defining, prevalence, causes, and strategies of addressing. *Calcified tissue international*, *106*(1), 14-29.

Combs Jr, G. F., McClung, J. P. (2016). *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. Academic press.

Isler, O., Brubacher, G. (1982). *Vitamine. 1. Fettlösliche Vitamine: 12 Tabellen*. Thieme.

Jackson MJ. The assessment of bioavailability of micronutrients: introduction. Eur J Clin Nutr 1997;51:S1–S2.

Jakobsen, J., & Saxholt, E. (2009). Vitamin D metabolites in bovine milk and butter. *Journal of food composition and analysis*, *22*(5), 472-478.

John E. Halver, The Vitamins, Fish Nutrition (Third Edition), Academic Press, 2003, Pages 61-141,

Moyer, M. W. (2014). Vitamins on trial. *Nature*, *510*(7506), 462.

Nagao, A. (2004). Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products. *The Journal of Nutrition*, *134*(1), 237S-240S.

Piro, A., Tagarelli, G., Lagonia, P., Tagarelli, A., & Quattrone, A. (2010). Casimir Funk: his discovery of the vitamins and their deficiency disorders. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *57*(2), 85-88.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2003, January). Food carotenoids: analysis, composition and alterations during storage and processing of foods. In *Forum of nutrition* (Vol. 56, pp. 35-37).

Rosenberg, H. R. (1942). Chemistry and physiology of the vitamins. *Chemistry and Physiology of the Vitamins.*

Tielsch, J. M., & Sommer, A. (1984). The epidemiology of vitamin A deficiency and xerophthalmia. *Annual review of nutrition*, *4*(1), 183-205.

BÖLÜM 7

ASPRGİLLUS NİGER AMİLOGLUKOZİDAZIN KARBOKSİLLENMİŞ ÇOK DUVARLI KARBON NANOTÜPLER İLE İMMOBİLİZASYONU

Doç. Dr. Yakup ASLAN[1]

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

1.GİRİŞ

Maltodekstrinler nişasta endüstrisinde nişastadan elde edilen oligosakkaritler olup, sporcu içeceklerinde enerji kaynağı olarak kullanıldıkları gibi, glukoz şurubu üretiminde de kullanılmaktadırlar.ANAG enzimi gıda endüstrisinde nişastayı hidroliz ederek glukoz şurubu üretiminde kullanılan önemli bir enzimdir. Endüstride immobilize enzimlerin üründen kolayca ayrılarak yüzlerce kez kullanılabilme, yüksek sıcaklık ve ekstrem pH aralıkları, mekanik darbeler gibi şiddetli koşullarda yüksek kararlılık ve sürekli prosese uygunluk nedeniyle düşük ürün maliyeti gibi avantajları nedeniyle ANAG da onlarca yıldan beri immobilize edilmeye çalışılmıştır. Fakat daha yüksek aktivite verimi elde edebilmek için ANAG ile ilgili immobilizasyon çalışmaları günümüzde de devam etmektedir.Enzim immobilizasyonu, enzim moleküllerinin sulu ortamlardaki hareketini kısıtlamak ve basitçe süzme yöntemiyle üründen ayırarak yüzlerce kez kullanabilmek için suda çözünmeyen katı bir matrise kimyasal bağlarla bağlamak veya matrisin içerisine hapsetmektir. Bir enzim immobilizasyon çalışmasının en önemli hedefleri, yüksek aktivite verimi elde edilmesi ve elde edilen immobilize enzimin, yüksek bir kullanım ve depolama kararlılığı göstermesidir. c-MWCNT yüksek miktarda enzim bağlama kapasitesine sahiptir. c-MWCNT ile bazı immobilizasyon çalışmalarda enzimin aktivitesinde immobilizasyonla 5-12 kat artış rapor edilmiştir. Literatüre göre ANAG'ın immobilizasyonunda çok sayıda matris kullanışmış, ancak c-MWCNT kullanılmamıştır.Bu projenin amacı, glukoz şurubu üretmek için endüstride kullanılabilir ekonomik bir immobilize enzim geliştirmekti.Bu kapsamda, ilk olarak ANAG enzimi optimum şartlarda maksimum immobilizasyon ve aktivite verimleriyle c-MWCNT üzerine immobilize edilerek immobilize enzim karakterize edildi. İkinci aşamada ise, immobilize ANAG enzimi kullanılıp, maltodekstrinin hidroliz koşulları optimize edilerek glukoz şurubu üretilmeye çalışıldı.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1.Nişasta

Nişasta, amilaz ve amilopektin isimli iki polimerik karbonhidratın (polisakkaritin) birleşimidir. Amiloz, glukoz monomer birimlerinin alfa-1.4 bağlantılılarla uç uca eklenmesinden oluşur. Amilozdan farklı olarak amilopektinde dallanma vardır; ana zincirde her 24-30 glukoz monomerinden birinde alfa-1.6 bağlantısı ile bir yan zincir başlar.Amiloz doğrusal bir moleküldür, ancak birbirini izleyen glukoz birbirlerinin açılı olma eğiliminden dolayı bir sarmal oluşturur. İki amiloz molekülü birbirine sarılarak bir çifte

sarmal da oluşturabilirler. Bu sarmalın iç yüzeyi hidrofobik olduğu için içinde yer alan su molekülleri kolaylıkla daha hidrofobik moleküllerle yer değiştirebilir. Nişasta testinde kullanılan iyot molekülleri amiloz sarmallarının içine dizilince mavi bir renk oluşur. Amiloz sarmalları arasında oluşan hidrojen bağları yüzünden içinde çok az su barındıran yoğun bir yapı oluşur.Amilopektinde dallanma noktalarından sonra birbirine paralel iki zincir birbirlerine sarılarak bir çifte sarmal oluştururlar. Amilopektin, bir çalı gibi, bir merkezden dallandıkça genişleyen bir şekle sahiptir. Dallanmakta noktalarında molekül düzensizdir, iki dallanma noktası arasında ise çifte sarmallar düzgün bir şekilde istiflenerek kristal bir yapı oluştururlar; bu yüzden mikroskopta nişasta taneciklerinde bu düzenli ve düzensiz bölgeler büyüme halkaları gibi görünür.Bu moleküller yapısından dolayı amilopektin, nişasta taneleri olarak depolanmasını sağlayan sarmal şekilli olur. Hem amilopektin hem de amiloz glukozun polimerleridir ve tipik bir amiloz polimeri 500-20.000 glukoz molekülünden, bir amilopektin moleküllü ise yaklaşık bir milyon glukozdan oluşur. Nişasta suda çözünmez.Sindirilmesi hidroliz yoluyla olur, bu reaksiyonu katalizleyen amilaz enzimleri glukozlar arasındaki bağları keserler. Farklı tip amilazlar nişastayı farklı biçimlerde parçalarlar. Nişasta parçalandıkça dekstrin, maltoz ve nihayet glukoza dönüşür.

2.2.Amiloglukozidazlar

Amiloglukozidaz, nişastanın hidrolizinde ve birçok uygulamada büyük ölçekte kullanılan önemli enzimlerdir (Gupta ve ark., 2015). Bir ekso-amilaz olan amiloglukozidaz (Aiyer, 2005), nişasta ve dekstrinlerin indirgeyici olmayan uçlarında α-1.4 bağlarına saldırır. Bir α -1.6 bağlantısına ulaştığında, bunu da keser, ancak α-1.4 bağlantısından daha düşük bir oranda (Emneus ve ark., 1993) keser. Enzimatik hidroliz sırasında, substratlar temel olarak D-glukoza dönüştürülür (Arıca ve ark., 1998).İmmobilize enzimlerin, reaksiyon karışımından kolaylıkla uzaklaştırılması, çok fazla tekrar tekrar kullanılma olasılığı, daha saf ürünlerin üretilmesi, ürün inhibisyonunun önlenmesi ve iki enantiyomerden birinin seçici olarak üretilmesi gibi çözünebilir enzimlere kıyasla bazı avantajları vardır (Brena ve ark., 2013). Literatüre göre *Aspergillus niger* amiloglukozidaz (ANAG) immobilizasyonu, çeşitli matris ve yöntemler kullanılarak çapraz bağlama (Gupta ve ark., 2013), fiziksel adsorpsiyon (Oh ve Kim, 2000; Wang ve ark.,2007), entrapment (Roy ve Gupta, 2004) ve kovalent bağlama (Arıca ve ark., 1998; Gupta ve ark., 2013; Svec ve ark., 1978; Rani ve ark., 2000; Arıca ve ark., 2000; Sanjay ve Sugunan, 2005; Milosavic ve ark.,2007; Tanrıseven ve Ölçer, 2008; Tardioli ve ark., 2011; Milosavic ve ark.,

2012; George ve Sugunan, 2014; Uygun ve ark., 2015) yaygın bir şekilde incelenmiştir.

2.3. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, yüzyıllardan beri gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Biyoteknolojideki gelişmeler 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 özgüldür. 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 pahallı teknikler kullanılarak üründen ayrılabildiğinden, ürünün maliyeti yükselmektedir. Bir diğer dezavantajı ise, pH ve sıcaklıktaki değişimlere, kullanım şartlarına ve saklama şartlarına bağlı olarak, aktivitelerinde önemli kayıpların meydana gelmesidir.İmmobilize enzimler kullanım ve saklama koşullarına, pH ve sıcaklık değişimlerine karşı daha kararlı olduklarından ve reaksiyon ortamından basit süzme metodu ile kolayca ayrılarak onlarca hatta yüzlerce kez kullanılabildiklerinden, 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 katkısı, enzim ve çözücü arasında non-kovalent etkileşimlerin bir sonucudur (Drevon,2002). Ancak bu yöntemde, aynı enzim örneğinin çok defa fazla kullanılması avantajı bulunmaz.Diğer bir yaklaşıma ise enzim immobilizasyonudur. İmmobilizasyon, enzim aktivitesini uzun süre korumak için, suda çözünmeyen bir matrikse adsorbsiyon, kovalent bağlanma veya matriks içine hapsederek enzimin hareketinin sınırlanmasıdır. Enzim immobilizasyonunda organik ve inorganik yapıda çok sayıda doğal veya yapay matriks kullanmaktadır. İmmobilize enzimler, kullanılan matriksin yapısına ve kullanılan 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 önlenebilir.

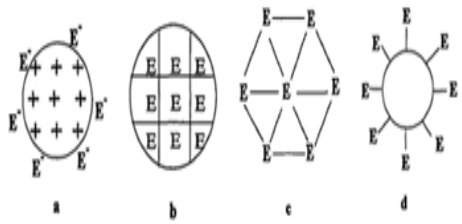
İmmobilizasyon çalışmaları 1960'ların ilk yarılarında başlamış ve günümüze kadar konu ile ilgili olarak, 10,000'in üzerinde makale ve patent yayınlanmıştır.Tosa ve arkadaşları (1967) tarafından Japonya'da İmmobilize *Aspergillus oryzae* aminoçilaz kolonlarının geliştirilmesi ve sentetik rasemik DL-aminoasitlerin aktif enantiyomerlere dönüştürülmesinde kullanılması, immobilize enzimlerle ilgili ilk endüstriyel uygulamadır.

2.3.1. Enzim İmmobilizasyon Metotları

İmmobilizasyon metotları genellikle, bağlanma reaksiyonunun tipine göre sınıflandırılır. Buna göre, enzim immobilizasyon metotları başlıca dört ana grupta toplanır: Adsorbsiyon, entrapment (bir polimerik jel veya kapsül içine hapsetme), çapraz bağlama ve kovalent bağlamadır (Şekil 2.1).

2.3.1.1. Adsorbsiyon

Adsorbsiyon metodu, enzimin en zayıf çekim kuvvetleriyle inert bir matrise fiziksel veya iyonik olarak bağlanmasıdır (Messing, 1976; Woodward, 1985). Adsorbsiyon oldukça basit ve ekonomik bir immobilizasyon yöntemidir. İmmobilizasyon, enzim çözeltisinin uygun pH ve sıcaklıkta matrisle karıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Enzimle matris arasında zayıf bağlar (Van der Waals ve Hidrojen Bağları) oluşur ve enzimler matristen kolaylıkla ayrılırlar. İyon değiştiriciler kolaylıkla proteinleri adsorbe ederler ve enzim immobilizasyonu için endüstride yaygın olarak kullanılırlar. Tablo 2.1'de, adsorbsiyon için kullanılan adsorbentler yer almaktadır.



Şekil 2. 1. Enzim immobilizasyon metotları. a.Adsorbsiyon, b.Entrapment, c.Çapraz bağlanma, d.Kovalent bağlanma.

Tablo 2. 1. Adsorbsiyonla immobilizasyonda kullanılan adsorbentler

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

2.3.1.3. Çapraz bağlama

Sulu çözeltilerde çözünebilen 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, 1979). 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.

$$E_1\text{-}NH_2 + OCH(CH_2)_3CHO + E_2\text{-}NH_2 \rightarrow E_1\text{-}N{=}HC(CH_2)_3CH{=}N\text{-}E_2 \quad (2.1)$$

2.3.1.4. Kovalent bağlama

Proteinlerin kovalent bağların oluşumuna dayanan yöntemlerle immobilizasyonu en çok kullanılan maddeler arasındadır. Bu yöntemlerin bir avantajı, enzim ve matris arasında oluşan bağların istikrarlı doğası nedeniyle, enzim kullanım üzerine çözeltiye salınmaz. Bununla birlikte, yüksek düzeyde bağlanmış etkinlik elde etmek için, katalitik aktivite için gerekli olan amino asit kalıntıları, matrise kovalent bağlantıya dahil edilmemelidir. Bu, bazı durumlarda yerine getirilmesi zor bir gereklilik olduğunu kanıtlayabilir. Bazen aktivite verimi geliştiren basit bir prosedür substrat analogları (Mattiasson, 1991) varlığında birleştirme reaksiyonu yapmaktır. İmmobilizasyon için kovalent yöntemler, üründe enzim bulunmaması için sıkı bir gereklilik olduğunda kullanılır.Matris üzerinde bulunan fonksiyonel gruplara bağlı olarak çok çeşitli reaksiyonlar geliştirilmiştir (Scouten, 1987). Birleştirme yöntemleri genel olarak iki ana sınıfa ayrılabilir: (1) bir polimere reaktif bir fonksiyon eklenerek matrisin aktivasyonu ve (2) aktive edilmiş bir grup üretmek için polimer omurgasının değiştirilmesi

2.3.1.5. Entrapment (Hapsetme)

Bir polimerin oluşumu sırasında, enzimin oluşan polimer içinde hapsedilmesine entrapment denir (O'Driscoll, 1976). Bu metot için en yaygın olarak kullanılan polimerlerden birisi aljinik asittir.

2.3.2. c-MWCNT'ler ile enzim immobilizasyonu

Nanopartiküller, immobilizasyon işlemi için ilginç ve önemli özellikleri olan yüksek yüzey alanı ve mekanik stabiliteye sahip oldukları için, enzim immobilizasyonu için mükemmel matrislerdir (Prlainovic et al., 2013). Literatürde, tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT) ve çok duvarlı karbon nanotüplerin (MWCNT) adsorpsiyon ve kovalent bağlama metotları ile enzim immobilizasyonunda kullanılması ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon, enzim çözeltisinin içerisinde matris bulunan tampon çözelti ile karıştırılarak uygun sürede inkübe edilmesiyle gerçekleştirilmektedir (Garlet ve ark., 2014). Kovalent immobilizasyon ile ilk önce, CNT'ler hidroksil (-OH), amino (-NH_2), karboksil (-COOH) gibi çeşitli fonksiyonel gruplar kullanılarak fonksiyonelleştirilmektedir. Daha sonra bu fonksiyonel gruplar ara moleküller ile kaplanmaktadır (Zniszczol ve ark. 2016). En son olarak da bu gruplara enzim bağlanmaktadır.Sağlam ve kararlı kimyasal yapısı ve yüksek yüzey alanı nedeniyle enzim bağlama kapasitesi yüksek olduğundan, c-MWCNT'ler enzim immobilizasyonu ile ilgili bir çok çalışmada kullanılmış ve bazı çalışmalarda enzimin aktivitesinde 5 ve 12 kat artış gerçekleşmiştir (Rastian ve ark., 2014; Jaime ve ark., 2016; Zniszczoł ve ark., 2016).

2.3.3. ANAG'ın immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar

Amiloglukozidaz (AG) (EC.3.2.1.3) geniş bir ölçekte glukoz üretimi için nişastanın hidrolizinde ve çoğu uygulamada kullanılan önemli bir enzimdir (Gubta ve ark., 2015). Bir ekzo-amilaz olan amiloglukozidazlar, dekstrinin indirgenmeyen uçlarında α-1,4-bağlarına saldırır. Bu bir alfa-1,6 bağlantısına ulaştığında, bunu da keser, ancak α-1,4 bağından daha düşük hızla (Emneus ve ark., 1993). Enzimatik hidroliz sırasında, substratlar esas olarak β-D-glukoza ve ayrıca bazı α-D-glukoza dönüştürülür (Arıca ve ark., 1998). Literatürde ANAG'ın çeşitli matriksler kullanılarak immobilizasyonu ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. ANAG, ilk olarak, epoksi, aldehit ve primer amino grupları içeren matriksler üzerine immobilize edilmiş ve en uzun aktivite yarılanma süresi (96.6 gün) gluteraldehit ile aktive edilmiş amino grupları taşıyan matriksle elde edilmiştir (Švec ve ark., 1978). Arıca ve ark. (1998),

ANAG'ı epiklorohidrin ile aktive edilmiş poli (2-hidroksietil metakrilat) hidrojelleri üzerine % 71 aktivite verimi ile immobilize etmişlerdir. ANAG, Rani ve ark. (1999) tarafından herhangi bir çapraz bağlayıcı reajant kullanmadan kitin üzerine % 98 aktivite verimi ile immbilize edilmiştir. Arıca ve ark. (2000), bir başka çalışmalarında ANAG'yı karbodiimid ve siyanojen bromür ile aktive edilmiş ayırıcı-kol bağlı manyetik poli metilmetakrilat mikroküreleri üzerine immobilize etmiş ve en yüksek aktivite verimini (% 73) siyanojen bromür ile aktive edilmiş matriks ile elde etmişlerdir. Rani ve ark (2000), ikinci çalışmalarında ANAG'ı fiziksel adsorpsiyon ile aktif karbon üzerine % 90 aktivite verimi ile immobilize etmişlerdir. Oh ve Kim (2000), ANAG'yı adsorpsiyon yöntemiyle immobilize etmiş fakat bağlanan enzim miktarının artmasıyla aktivite verimi % 89.7'den % 31.4'e düşmüştür. ANAG, başka bir çalışmada kalsiyum aljinat beadleri içerisine entrapment metoduyla immobilize edilmiş ve % 92 aktivite verimi elde edilmiştir (Roy ve Gupta, 2004). Sanjay ve Sugunan (2005), ANAG'ı Montmorillonit K-10 üzerine adsorpsiyon ve 3-amino propil trietoksi silan ile aktifleştirdikten sonra kovalent bağlama metotlarıyla immobilize etmişlerdir. Adsorpsiyonda % 95 kovalent bağlamada ise % 100 olan aktivite verimleri, 100 saat sonunda adsorpsiyonla immobilize enzimde % 95'e düşerken, kovalent bağla immobilize enzimde herhangi bir azalma olmamıştır. ANAG, Milosavic ve ark. (2007) tarafından 1,2-diaminoetan ile aktive edilen poli (Glisidilmetakrilat-co-etilen glikol dimetakrilat) üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edilmiş ve dört hafta boyunca aktivitesinde herhangi bir azalma olmadan kullanılmıştır. Wang ve ark. (2007), ANAG'ı manyetik şelasyon tanecikleri üzerinde metal afinite adsorpsiyon yoluyla % 84 aktivite verimiyle immobilize etmiş ve immobilize enzim 30 kez kullanıldığında aktivitesinin % 75.7'sini korumuştur.Tanrıseven ve Ölçer (2008), ANAG'ı polietilen glikol ve çözünür jelatin varlığında poliglutaraldehitle aktive edilen jelatin partikülleri üzerine kovalent olarak % 85 aktivite verimiyle immobilize etmiş ve immobilize enzim bir ay boyunca aktivitesini korumuşur. Asp ve Glu rezidüleri etilendiamin ile modifiye edilmiş ANAG, Tardioli ve ark. (2011) tarafından yüksek ölçüde aktive edilmiş glioksil-agaroz desteklerinde kovalent olarak % 80 aktivite verimiyle immobilize edilmiştir. serbest enzimin aktivitesi 55 oC'de 40 saat sonunda tamamen sıfıra düşerken immobilize enzimin aktivitesi % 50'ye düşmüştür. Milosavic ve ark. (2012), ANAG'ı per-iyodat varlığında poli (Glisidilmetakrilat-ko-etilen glikol dimetakrilat) üzerine % 64.25 bağlanma verimiyle kovalent olarak immobilize etmişlerdir.Gubta ve ark. (2013) çapraz bağlı ANAG agregatlarını manyetik nano partiküller üzerine % 92.8 aktivite

verimiyle kovalent bağlama ile immobilize etmişler ve immobilize enzim on kullanım sonuna kadar aktivitesinin yaklaşık olarak tamamını korumuş fakat daha sonra, aktivite kademeli olarak azalıp ellinci kullanım sonunda da % 70'e düşmüştür. Diğer bir çalışmada, ANAG, karbodiimid ve siyanojen bromür ile aktive edilmiş mezoporoz silis üzerinde sırasıyla % 57 ve % 73 aktivite verimleriyle immobilize edilmiş fakat kullanım ve saklama kararlılıkları belirlenmemiştir (George and Sugunan, 2014). Gubta ve ark. (2015), ANAG'ı çapraz bağlı agregatlar şeklinde % 65 aktivite verimi ile immobilize etmişler ve immobilize enzim 25 kullanım boyunca aktivitesini kaybetmemiştir. Bir diğer çalışmada ise ANAG, Poli (metil metakrilat-glisidil metakrilat), kriyojel üzerine kovalent bağlama metodu ile immobilize edilmiş ve başlangıç aktivitesi yirmi kullanım sonunda % 93'e, otuz gün saklama sonunda ise % 68'e düşmüştür (Uygun ve ark., 2015). Bu çalışmada, ANAG'ın C-MWCNT ile kovalent immobilizasyonunun koşulları optimize edilerek maltodekstrinden glukoz şurubu üretiminde kullanıldı.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

Aspergillus niger amiloglukozidaz Bio-Cat (Troy, USA) firmasından hediye olarak temin edildi. UV-VIS Spektrometresi (VWR, UV-6300PC), pH metre Hanna Intruments (HI11310) Woonsocket, Rhode Island, USAfirmasından, magnetik karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Standard) Heidolph UK-Radleys (Shire Hill, UK) firmasından, saf su cihazı (MDM, Mini Pure 1, MDM-0170), MDM Co. Ltd. (Suwon-si, South Korea) firmasından, hassas terazi (Shimadzu-ATX224) Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan)firmasından, orbital çalkalayıcılı ısıtmalı inkübatör (Mipro-MCI) Protek Lab Group; professional laboratory solutions company (Ankara, Turkey) firmasından, vakum pompası (Biobase, GM-0.50A) Biobase Biodustry Co. Ltd. (Shandong, China) firmasından, Bovin Serum Albumin (BSA), sodyum hidroksit, sodium dihidrojen fosfat, hidrokilorik asit, sodyum sülfit, fenaol ve D-glukoz Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) firmasından, 3.5-dinitrosalisilik asit (DNS) Alfa Aesar (Kandel, Germany) firmasından, sodyum potasyum tartarat (Rochelle salt) VWR Prolabo Chemicals (Leuven Belgium) firmasından. Sodyum azid Merck Millipore (Darmstadt, Germany) firmasından, karbon nanotüpler (30-50nm) Nanografi Co. Ltd. (Ankara, Türkiye) şirketinden satın alındı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. c-MWCNT'ler ile enzim immobilizasyonu

Enzim immobilizasyonunda bağlanma verimini ve aktivite verimini etkileyen koşullar (immobilizasyon çözeltisinin pH ve molaritesi, matris miktarı ve immobilizasyon süresi) sırayla değiştirilerek optimize edildi.

3.2.2. Protein (enzim) tayini

Protein miktarının tayini, Bradford (1976) metoduna göre, 0.2-1.4 mg/mL aralığındaki derişimlerde hazırlanan Bovine Serum Albümin standart çözeltilerinin çift ışık yollu UV spektrometresinde 595 nm dalga boyunda ölçülen absorbansları kullanılarak oluşturulan standart grafiğine ait doğru denklemine göre yapılmıştır.

3.2.3. İmmobilizasyon ve aktivite verimlerinin hesaplanması

İmmobilizasyondan önce ve sonra immobilizasyon çözeltilerindeki enzim miktarları kullanılarak bağlanma ve aktivite verimleri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\text{İmmobilizasyon Verimi (\%)} = \frac{\text{İmmobilizasyon için kullanılan enzim miktarı - Süzüntüdeki enzim miktarı}}{\text{İmmobilizasyon için kullanılan enzim miktarı}} \text{ x } 100$$

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

3.2.4.ANAG aktivitesinin tayini

ANAG aktivitesi**,** 200 µL serbest ANAG ve 5 mL % 1(w/v)'lik maltodekstrinin standart koşullarda (pH 5.5; sıcaklık 55 ^{o}C; süre 1 saat; ve çalkalama hızı 150 rpm) yapılan reaksiyonu ile tayin edildi. Bir IU ANAG aktivitesi, standart koşullarda, 5 mL % 1 (w/v)'lik maltodekstrin çözeltisinde 1 dakikada 1 µmol D-Glukoz oluşturan enzim miktarı (mg) olarak tanımlandı.

3.2.5. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu

3.2.5.1. Matris miktarının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

İmmobilizasyon, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerdeki 5'er mL 0.25 M'lık dört ayrı fosfat tampon çözeltilerine (pH 7.5) sırasıyla 25, 50, 75 ve 100 mg c-MWCNT ve 200'er µL (77.2 IU) enzim ilave edilerek, 55 ^{o}C'de 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 60 dakika süreyle

gerçekleştirildi. İmmobilizasyon sonunda, immobilize enzimler, por büyüklüğü 2 olan sinterli cam süzgeçler kullanılarak vakum altında süzülerek 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 süzüntülerde UV spektrometresi ile 595 nm'de absorbanslar ölçülerek protein miktarı hesaplandı.Standart aktivite tayin metoduna göre tayin edilen serbest ve immobilize enzimlerin bağıl aktiviteleri kullanılarak da Denklem (3.2)'ye göre aktivite verimleri hesaplanmıştır.

3.2.5.2. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

İmmobilizasyon, 200'er µL ANAG çözeltileri ile 25'er mg c-MWCNT'lerin farklı pH'lardaki 5 mL fosfat tamponları (0.025M)içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 2 saat süreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi. Aktiviteler , 200 µL serbest ve 0.513 g immobilize ANAG'ların 5 mL %(w/v) 1'lik maltodekstrin çözeltileri (pH 5.5) ile, bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 60 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan glukoz miktarları kullanılarak hesaplandı.

3.2.5.3. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

İmmobilizasyon, 200'er µL ANAG'lar 75 mg c-MWCNT'lerin 0.250 M'lık 5 mL fosfat tamponları (pH 4.0) içinde, bir inkübatörde oda sıcaklığında 150 rpm'de çalkalanarak farklı sürelerle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi. Aktiviteler, 200 µL serbest ve 0.513 g immobilize ANAG'ların 5 mL % (w/v) 1'lik maltodekstrin çözeltileri (pH 5.5) ile, bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55°C' de 60 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan glukoz miktarları kullanılarak hesaplandı.

3.2.5.4. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

İmmobilizasyon, 200'er µL ANAG çözeltileri ile 25'er mg c-MWCNT'lerin, farklı derişimdeki 5 mL fosfat tamponları (pH 4.0) içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 2 saat süreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi. Aktiviteler, 200 µL serbest ve 0.513 g immobilize ANAG'ların 5 mL % (w/v) 1'lik maltodekstrin çözeltileri (pH 5.5) ile, bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55°C'de 60 dakika süreyle

yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan glukoz miktarları kullanılarak hesaplandı.

3.2.5.5. Serbest ve İmmobilize ANAG'ın 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.

3.2.5.6. Optimum pH

Bağıl aktiviteler, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde 200'er µL (77.2 IU) serbest ve 0.513 g (83.1 IU) 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) fosfat tamponu ile hazırlanmış % 1 (w/v)'lik maltodekstrin çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 55 ^oC'de 1 saat süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda tayin edildi. Optimum pH aralığı, Bağıl aktivite (%) - pH grafiğinden belirlenmiştir.

3.2.5.7. Optimum sıcaklık

Bağıl aktiviteler, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde 200'er µL (77,2 IU) serbest ve 0,513 g (83,1 IU) immobilize enzimlerin 25mM fosfat tamponu (pH 6,5) ile hazırlanmış 5'er mL % 1 (w/v)'lik maltodekstrin çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde farklı sıcaklıklarda (50-55-60-65-70^oC) 1 saat süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda bağıl aktiviteler tayin edilerek, Bağıl aktivite (%) - Sıcaklık (^oC) grafiğinden optimum sıcaklık aralığı belirlenmiştir.

3.2.5.8. pH kararlılığı

200'er µL (77.2 IU) serbest ve 0.513 g (83.1 IU) immobilize ANAG'lar 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 2.5'er mL 25 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerinde, 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında (25 ^oC), 1 saat süreyle inkübe edildikten sonra, üzerlerine 25 mM'lık fosfat tamponu (pH 6.5) ile hazırlanmış 2.5'er mL % 2 (w/v)'lik maltodekstrin çözeltileri eklenerek 55 ^oC'de, 1 saat süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda, bağıl aktiviteler tayin edilerek, sıvı ve immobilize enzimin kararlı olduğu pH aralığı belirlenmiştir.

3.2.5.9. Isıl kararlılık

200'er µL serbest (77.2 IU) ve 0.513 g (83.1 IU) immobilize ANAG, 10 mL'lık vida kapaklı tıpalı cam şişelerde pH'ları 4.0 olan 2.5'şer ml 25 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerinde, 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde farklı sıcaklıklarda (30-40-50-60-70-80^oC) 1 saat süreyle inkübe edildikten sonra, üzerlerine 25 mM'lık fosfat tamponu (pH 6.5)

ile hazırlanmış 2.5'er mL % 2 (w/v)'lik maltodekstrin çözeltileri eklenerek 55 ^{o}C'de 1 saat süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda bağıl aktiviteler tayin edilerek, sıvı ve immobilize enzimin kararlı olduğu sıcaklık (^{o}C) aralığı belirlenmiştir.

3.2.5.10. Kinetik sabitler

200'er µL serbest (77.2 IU) ve 0.513 g (83.1 IU) immobilize ANAG başlangıç aktiviteleri, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde, pH'sı 6.5 olan 25 mM'lık fosfat tamponu ile hazırlanmış farklı derişimlerdeki (5-80 g/L) 5'er mL maltodekstrin çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 15 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda başlangıç hızları tayin edilerek, çizilen Lineweaver-Burk Grafiğine ait doğru denkleminden V_{max} ve K_m sabitleri hesaplanmıştır.

3.2.5.11. Kullanım kararlılığı

İmmobilize enzimin kullanım kararlılığı, standart koşullarda tekrarlanan 20 kez kullanımı sonunda tayin edilen bağıl aktiviteleri kullanılarak çizilen grafik ile belirlenmiştir. İmmobilize enzim her kullanımdan sonra por büyüklüğü 2 olan sinterli cam süzgeç kullanılarak vakum altında bol miktarda saf su ile yıkanmıştır.

3.2.5.12. Saklama kararlılığı

İmmobilize enzimin saklama kararlılığı, 20 gün 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 yıkanarak 5 mL 0.250 M'lık fosfat tamponu çözeltisi içerisinde buzdolabında +4 ^{o}C'de saklanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Protein tayini

Bradford (1976) metoduna göre elde edilen BSA standart grafiği Şekil 4.1'de görülmektedir. Grafikten elde edilen doğru denklemine (Denklem 4.1) ait belirleme katsayısı (R^2) 0.99424'tür.

$$Y = 0.29958X \quad (4.1)$$

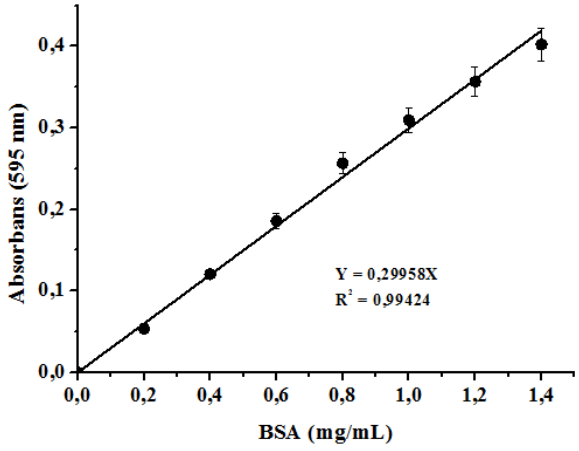
Çözeltilerdeki enzim konsantrasyonları Denklem 4.1 kullanılarak hesaplanmıştır. Buna göre, 200 µL serbest ANAG içeren 5.2 mL immobilizasyon çözeltisi içindeki enzim konsantrasyonu 6.842 mg/mL olarak hesaplandı. Toz halinde ANAG preparatındaki enzim konsantrasyonu da 684.2 mg/g olarak hesaplandı. Bu sonuç enzimi üreten firmanın beyanı (% 62-82'si enzim) ile de uyuşmaktadır.

4.2. Enzim Aktivitesinin Tayini

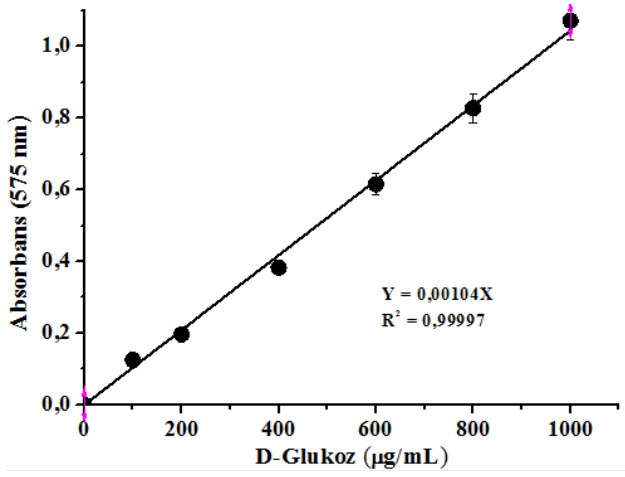
D-glukoz standart grafiği Şekil 4.2'de görülmektedir. Grafikten elde edilen doğru denkleminin (Denklem 4.2) belirleme katsayısı (R^2) 0.99997'tür.

$$Y = 0.00104X \quad (4.2)$$

Optimum aktivite analizi koşullarında 200 µL serbest ANAG reaksiyonunun sonunda oluşan D-glukoz miktarı D-glukoz standart grafiğine ait doğru denklemine (4.2) göre 87 µmol olarak bulunmuştur. Serbest ANAG aktivitesi, aşagıdaki denklemden 0.21 IU/mg enzim olarak hesaplandı. Ayrıca 1 g toz ANAG preparasyonu 684.2 mg serbest ANAG içerdiğinden, toz halinde ANAG aktivitesinin substrat olarak maltodekstrin için 143.7 IU/g olduğu hesaplandı. 1 IU aktivitesine sahip olan serbest ANAG miktarı da 32.30 mg olarak hesaplandı.



Şekil 4. 1. BSA standart grafiği



Şekil 4. 2. D-glukoz standart grafiği

$$Spesifik\ aktivite\ (IU/mg) = \frac{Aktivite\ (IU/g)}{Kullanılan\ preparasyondaki\ enzim\ miktarı(mg/g)}$$

$$Aktivite\ (IU/g) = \frac{Oluşan\ D-glukoz\ (\mu mol)}{Kullanılan\ enzim\ preparasyonu\ miktarı(mg)xReaksiyonsüresi\ (dk)}$$

4.3. İmmobilizasyon şartlarının optimizasyonu

4.3.1. Matris miktarının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

c-MWCNT miktarının immobilizasyon verimi üzerindeki etkisi Tablo 4.1'de gösterilmiştir. İmmobilizasyon verimi, artan miktardaki c-MWCNT ile değişmemiştir. Ancak c-MWCNT'nin arttığında 75 mg'a kadar aktivite veriminin arttığı daha sonra sabit kaldığı görülmüştür. En yüksek aktivite verimi (% 118.24) 75 mg c-MWCNT için elde edildi.

4.3.2. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon verimi üzerindeki etkisi tabloda gösterilmiştir. Tablo 4.2'ye göre, tamponun pH'sı ve immobilizasyon verimi arasında bir ilişki yoktur. Test edilen tüm pH değerlerinde immobilizasyon verimi %100'dür. Ancak en yüksek aktivite verimi (%78.70), pH 4'te elde edildi.

4.3.3. İmmobilizasyon tamponu molaritesinin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

Tablo 4.3'e göre, tamponun molariteleri ile immobilizasyon verimi arasında bir korelasyon yoktur, ancak molariteler arttığında aktivite verimi artmaktadır. Tüm molariteler için immobilizasyon verimi %100'dür. En yüksek aktivite verimi (% 109.17) 0.250 M tampon için elde edildi.

4.3.4. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon ve aktivite verimine etkisi

Tablo 4.4'e göre, denenen tüm sürelerde immobilizasyon veriminin %100 olduğu görülmüştür. Ancak aktivite verimi 2 saatteki sürelerden sonra

verime etkisi olmadığı elde edilmiştir. 2 saat immobilizasyonda %118,24 aktivite verimi elde edildi.

Tablo 4. 1 Matris miktarının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

c-MWCNT (mg)	İmmobilizasyon verim (%)	Aktivite verim (%)
25	100.00 ± 0.04	109.17 ± 0.02
50	100.00 ± 0.03	110.44 ± 0.03
75	100.00 ± 0.01	118.24 ± 0.04
100	100.00 ± 0.02	118.43 ± 0.01

Tablo 4. 2. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

İmmobilizasyon tamponu pH'sı	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)
4.0	100.00 ± 0.02	78.70 ± 0.03
5.0	100.00 ± 0.04	71.73 ± 0.02
5.5	100.00 ± 0.03	67.45 ± 0.04
6.0	100.00 ± 0.05	60.36 ± 0.03
7.0	100.00 ± 0.02	55.96 ± 0.05

Tablo 4. 3. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

Tampon Derişimi (M)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)
0.025	100.00 ± 0.04	78.70 ± 0.02
0.050	100.00 ± 0.03	91.54 ± 0.01
0.100	100.00 ± 0.01	103.16 ± 0,04
0.250	100.00 ± 0.02	109.17 ± 0.03

Tablo 4. 4 Matris miktarının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

c-MWCNT (mg)	İmmobilizasyon verim (%)	Aktivite verim (%)
25	100.00 ± 0.04	109.17 ± 0.02
50	100.00 ± 0.03	110.44 ± 0.03
75	100.00 ± 0.01	118.24 ± 0.04
100	100.00 ± 0.02	118.43 ± 0.01

Tablo 4. 5. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

İmmobilizasyon süresi (saat)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)
1	100.00 ± 0.03	94.22 ± 0.02
2	100.00 ± 0.01	118.24 ± 0.04

3	100.00 ± 0.02	118.24 ± 0.03

4.4. Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

4.4.1. Optimum pH

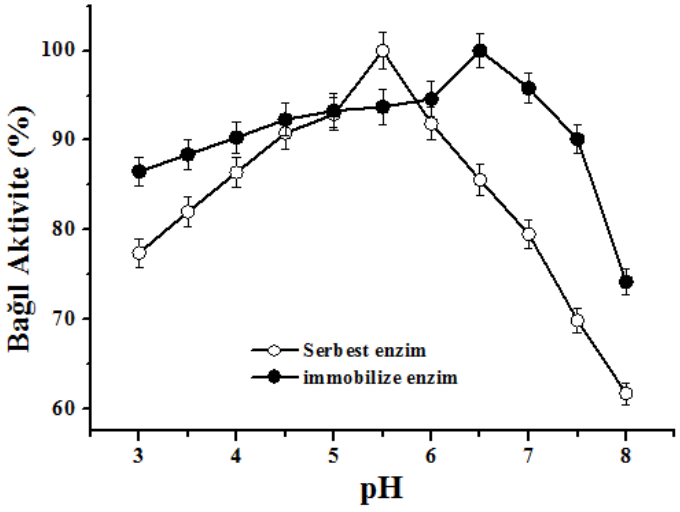
Şekil 4.3'te görüldüğü gibi ANAG'ın optimum pH'sı 5,5'ten 6.5'e yükselmiştir. Ayrıca immobilizasyon ANAG'ın denenen tüm pH aralığında aktivitesini yükseltmiştir.

4.4.2. Optimum Sıcaklık

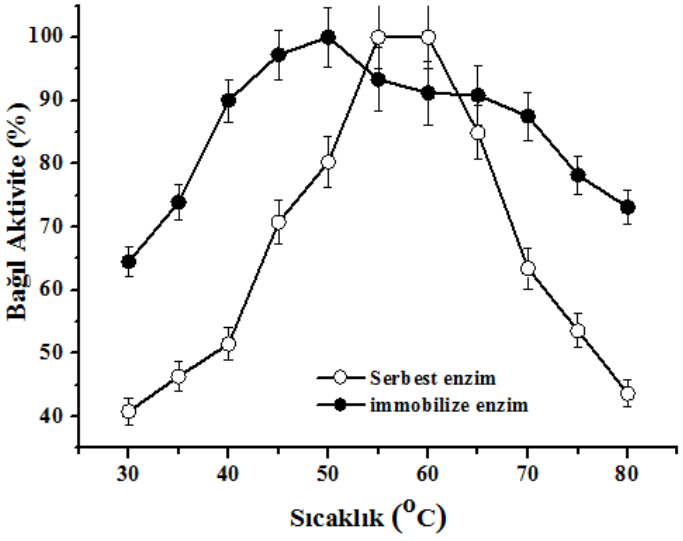
Şekil 4.4'e göre ANAG'ın optimum sıcaklığı 55-60 ^{o}C'den 50 ^{o}C'ye düşmüştür. Bu da immobilize ANAG'ın glkuoz şurubu üretiminde enerji maliyeti açısından daha avantajlı olduğunu göstermektedir.

4.4.3. pH Kararlılığı

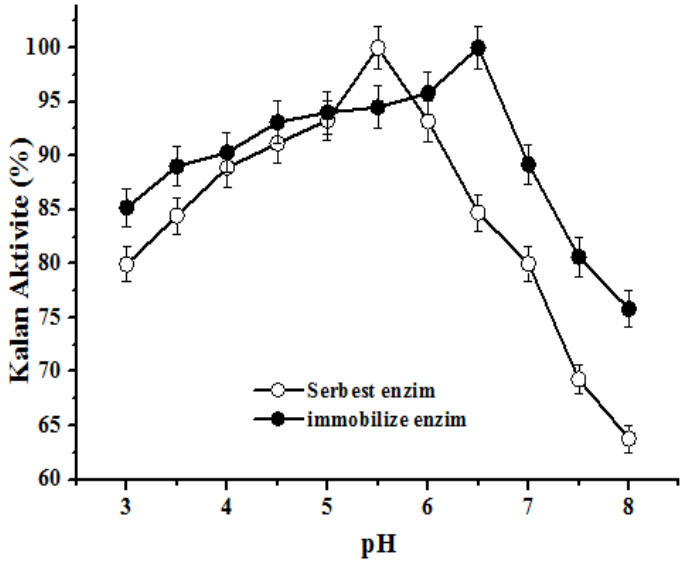
Şekil 4.5.'te görüldüğü gibi, denenen bütün pH değerlerinde immobilize enzimin serbest enzimden daha kararlı olduğu görülmektedir. Serbest enzimin pH 5.5 en kararlı immobilize enzimin ise pH 6.5'ta en kararlı olduğu ortaya konmuştur.



Şekil 4. 3. Serbest ve İmmobilize ANAG'ın optimum pH'sı



Şekil 4. 4. Serbest ve İmmobilize ANAG'ın optimum sıcaklığı

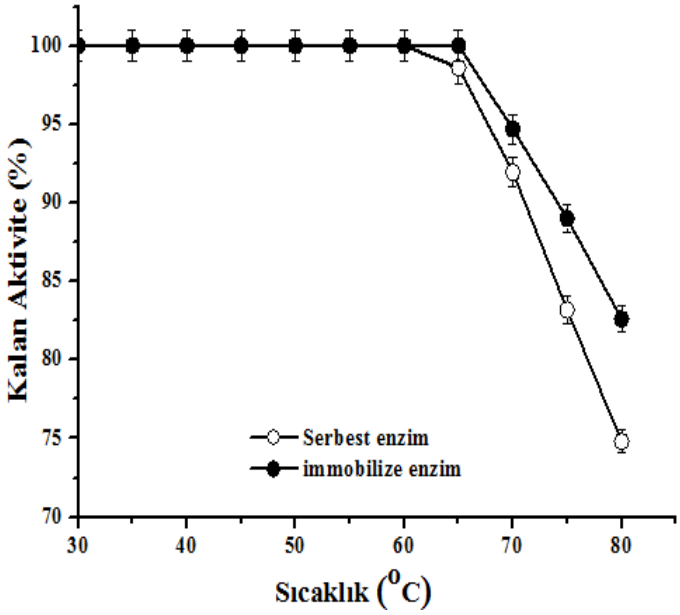


Şekil 4. 5. Serbest ve İmmobilize ANAG'ın pH kararlılığı

4.4.4. Isıl Kararlılığı

Şekil 4.6, sıcaklığın serbest ve immobilize enzimin sıcaklığın kararlığına etkisini göstermektedir. İmmobilize enzim daha yüksek sıcaklıklarda serbest enzimden daha kararlıdır. 65 °C de immobilize enzim aktivitesini

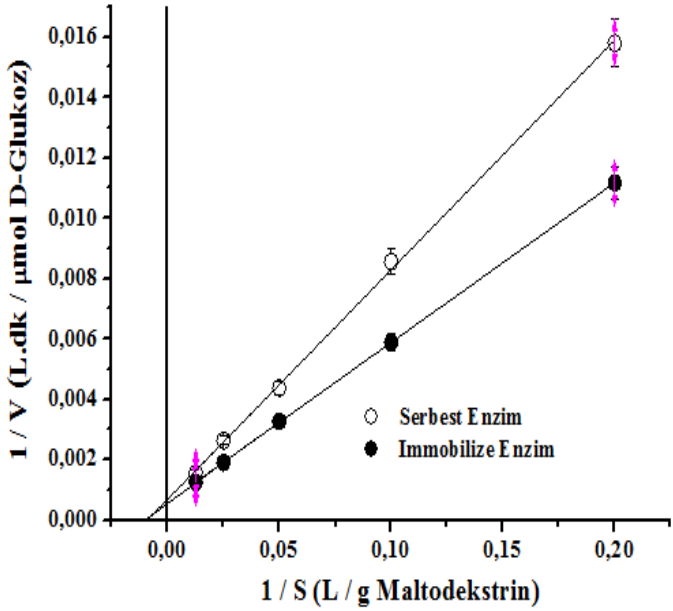
kaybetmezken daha yüksek sıcaklıklarda da immobilize enzimin serbest enzimden daha kararlı olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 6. Serbest ve İmmobilize ANAG'ın ısıl kararlılığı

4.4.5. Kinetik Sabitler

Serbest ve immobilize edilmiş ANAG için kinetik sabitler Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak belirlendi (Şekil 4.7). İmmobilizasyon K_m sabitinin değerini 116.3 g/L'den 98.4 g/L'ye düşürürken V_{max} değerini 1464.1 g/L.dk'dan 1733.1 g/L.dk'ya yükseltmiştir. Km değeri, bir enzimin substrata olan ilgisini göstermektedir. K_m küçüldükçe enzimin substrata olan ilgisi artar. İmmobilize ANAG'ın K_m değerinin serbest enziminkinden küçük, V_{max} değerinin ise büyük olması, immobilize enzimin serbest enzimden daha yüksek aktiviteye sahip olması ile birbirini desteklemektedir.



Şekil 4. 7. Serbest ve İmmobilize ANAG'ın Linewaver Burk Grafiği

4.4.6. Kullanım Kararlılığı

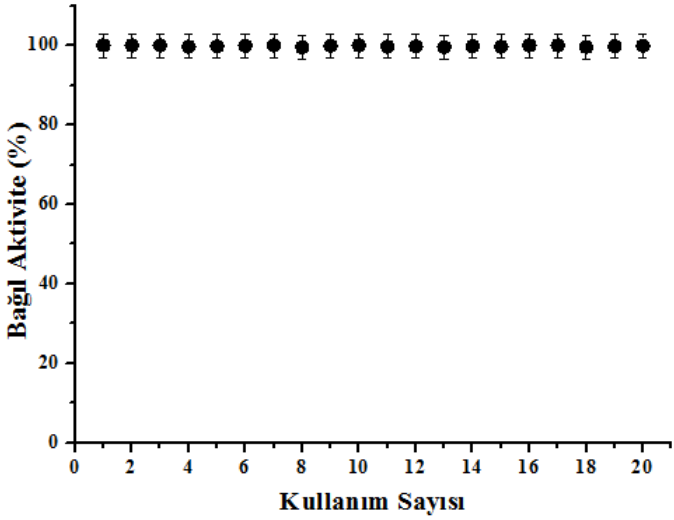
Şekil 4.8'e göre immobilize enzim optimum koşullarda tekrarlanan yirmi kullanım süresince aktivitesini kaybetmemiştir.

4.4.7. Saklama Kararlılığı

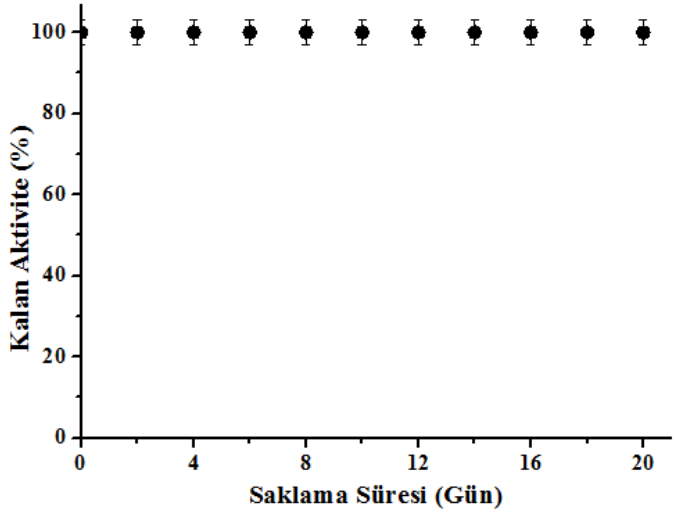
Şekil 4.9'da görüldüğü gibi, immobilize enzim optimum saklama koşullarında yirmi gün boyunca aktivitesini kaybetmemiştir.

4.4.8. Maltodekstrinden Glukoz Şurubu Üretimi

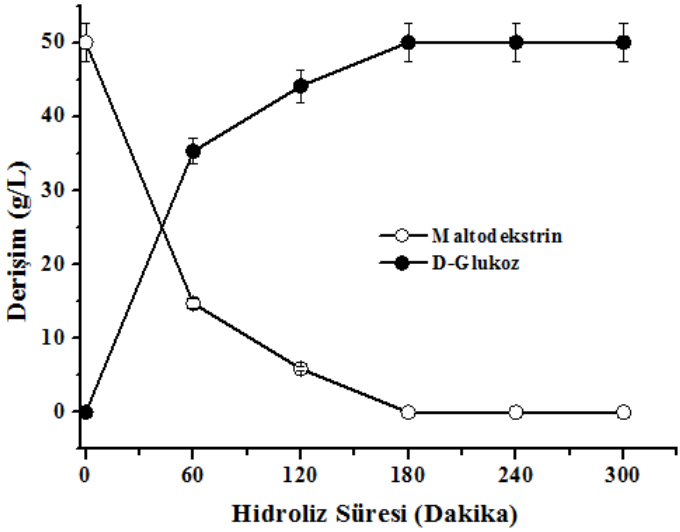
Şekil 4.10'a göre, immobilize ANAG kullanılarak 180 dakika sonunda maltodekstrinin tamamının glukoza dönüştüğü görülmektedir.



Şekil 4. 8. Serbest ve İmmobilize ANAG'ın Kullanım Kararlılığı



Şekil 4. 9. Serbest ve İmmobilize ANAG'ın saklama kararlılığı



Şekil 4. 10. Serbest ve İmmobilize ANAG'ın hidrolizi

5.SONUÇLAR

Aspergillus niger amiloglukozidazın immobilizasyon koşulları optimize edilerek %100 immobilizasyon ve % 118.24 aktivite verimi ile immobilize edilmiştir. Bu sonuç literatürde ANAG'ın immobilizasyonunda elde edilen en yüksek verimdir. İmmobilize enzim yüksek bir kullanım ve saklama kararlılığı gösterdi. Sonuç olarak,bu çalışmada elde edilen immobilize ANAG, endüstriyel glukoz şurubu üretiminde kullanılabilir.

TEŞEKKÜRLER

Yazarlar, bu çalışmayı 2018-SÜMÜH-027 nolu proje ile destekleyen Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkürü borç bilirler.

6. KAYNAKLAR

Arıca, M.Y., Alaeddinoğlu, N.G., Hasırcı, V. (1998). Immobilization of glucoamylase onto activated pHEMA/EGDMA microspheres: properties and application to a packed-bed reactor. *Enzyme and Microbial Technology,* 22,152-157.

Arıca, M.Y., Yavuz, H, Sleyman, Patir, S., Denizli, A. (2000). Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly_methylmethacrylate/ microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 127–138

Brena, B, Gonzalez-Pombo, P., Batista-Viera, F.(2013). Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: Guisan JM, editor. *Immobilization of Enzymes and Cells. New York, Humana Press,* 15-32.

Chui, W.K., Wan, L.S.C.(1997). Prolonged retention of cross-linked trypsin in calsium Aljinate microspheres. *J. Microencapsulation,* 14(1),51-61.

Drevon, G.F.(2002). Enzyme immobilization into polymers and coatings. Ph. D Thesis. University of Pittsburgh. U.S.,1-245

Emneus, J., Nilsson, G., Lund, L.G.A.(1993). Bow injection system for the determination of starch in starch from different origins with immobilized o-amylase and amyloglucosidase reactors. *Starch/StiirLe.* 45,267-270.

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.

George, R., Sugunan S. (2014). Kinetic and thermodynamic parameters of immobilized glucoamylaseon different mesoporous silica for starch hydrolysis:A comparative study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 106, 81-89.

Gupta, K., Jana, A.K., Kumar, S. Jana, M.M. (2015). Solid state fermentation with recovery of Amyloglucosidase from extract by direct immobilization in cross linked enzyme aggregate for starch hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 486–492.

Gupta, K., Jana A.K., Kumar S., Maiti M. (2013). Immobilization of amyloglucosidase from SSF of Aspergillus niger bycrosslinked enzyme aggregate onto magnetic nanoparticles usingminimum amount of carrier

and characterizations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*,98,30– 36.

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., and Terrones, M. (2004). Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation. *Journal of Materials Chemistry,* 14, 37-39.

Klibanov Alexander, M.(1983). Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science,* 219,722-727.

Mattiasson, B., Kaul, R. (1991). Determination of coupling yields and handling of labile proteins in immobilization technology., In: Protein immobilization: Fundamentals and Applications (Taylor, R. F., ed.), *Marcel Dekker, New York, NY,* 161–179.

Messing, R.A.(1976). Adsorption and inorganic bridge formations. In: Methods in Enzymology, volume XLIV, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, *New York, NY,* 148–169.

Milosavic, N., Prodanovi´c, R., Jovanovi´c, S., Vujcic, Z.(2007). Immobilization of glucoamylase via its carbohydrate moiety on macroporous poly(GMA-co-EGDMA). *Enzyme and Microbial Technology,* 40, 1422–1426.

Milosavic, N., Pristov, J.B., Velickovic, D.V., Dimitrijevic, A.S., Kalauzi, A., Radotic K.(2012). Study of the covalently immobilized amyloglucosidase on macroporous polymer by mathematical modeling of the pH optima. *Journal of Chemıcal Technology and Bıotechnology*, 87(10), 1450-1457.

O'Driscoll, K.F.(1976). Techniques of enzyme entrapment in gels. In: Methods in Enzymology, Volume XLIV, (Mosbach K., ed.), *Academic Press, New York, NY,* 169–183.

Oh, J.T., Jung-Hyun Kim, J.H.(2000). Preparation and properties of immobilized amyloglucosidase on nonporous PS/PNaSS microspheres. *Enzyme and Microbial Technology,* 27, 356–361.

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.

Rani, A.S., Das, M.L.M., Satyanarayana, S. (2000). Preparation and characterization of amyloglucosidase adsorbed on activated charcoal. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* 10, 471–476.

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 bysoft dielectric barrier discharge plasma: Generate compatibleinterface for lipase immobilization. *Biochemical Engineering Journal,* 90, 16–26.

Sanjay, G., Sugunan, S. (2005). Glucoamylase immobilized on montmorillonite: Synthesis, characterization and starch hydrolysis activity in a fixed bed reactor. *Catalysis Communications,* 6, 525–530.

Scouten, W.H.(1987). A Survey of Enzyme Coupling Techniques. In: Methods in Enzymology, volume 135, (Mosbach, K., ed.), *Academic Press, London,*. 30–65.

Švec Kálal J., Menyailova, I.I., Nakhapetyan, L.A.(1978). Immobilization of amyloglucosidase on poly [(glycidyl F. methacrylate) Co(ethylene dimethacrylate)] carrier and its derivative. *Biotechnology and Bioengineering,* 20(9), 1319–1328.

Tanrıseven, A., Ölçer, Z.(2008). A novel method for the immobilization of glucoamylase onto polyglutaraldehyde-activated gelatin. *Biochemical Engineering Journal,* 39, 430–434.

Tardioli, P. W., Vieira, M. F., Vieira, A. M. S., Zanin, G. M., Betancor, L., Mateo, C., Guisán, J. M. (2011). Immobilization–stabilization of glucoamylase: Chemical modification of the enzyme surface followed by covalent attachment on highly activated glyoxyl-agarose supports. *Process Biochemistry*, *46*(1), 409-412.

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.

Uygun, M., Akduman, B., Ergönül, B., Aktaş Uygun, D., Akgöl, S., Denizli, A. (2015). Immobilization of amyloglucosidase onto macroporous cryogels

for continuous glucose production from starch. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *26*(16), 1112-1125.

Wang, F., Guo, C., Liu, H. Z., & Liu, C. Z. (2007). Reversible immobilization of glucoamylase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *48*(1-2), 1-7.

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*(1), 11-16.

Woodward, J.(1985). Immobilized enzymes: adsorption and covalent coupling. In: Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach, (Woodward, J., ed.), IRL, Oxford, UK, 3–17.

Zniszczoł, A., Herman, A.P., Szymanska, K., Mrowiec-Białon, J., Krzysztof Z. Walczak, Andrzej Jarzebski, Sławomir Boncel,(2016). Covalently immobilized lipase on aminoalkyl-, carboxy- andhydroxy-multi-wall carbon nanotubes in the enantioselectivesynthesis of Solketal. *Enzyme and Microbial Technology,* 87-88, 61–69.

BÖLÜM 8

SACCHAROMYCES CEREVISIAE İNVERTAZIN KARBOKSİLLENMİŞ ÇOK DUVARLI KARBON NANOTÜPLER İLE İMMOBİLİZASYONU

Doç. Dr. Yakup ASLAN

Merve AKALAN

[1]Siirt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Siirt, Türkiye
Orcid no: 0000-0001-9668-9559, dr_yakup@siirt.edu.tr
[1]Siirt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Siirt, Türkiye
Orcid no: 0000-0002-3926-245X, merveakalan@gmail.com

1. GİRİŞ

İnvert şeker, eş molar glukoz ve fruktozdan oluşan, sükrozun enzim veya asitle hidrolizi sonucu elde edilen, sükrozdan daha tatlı ve daha çözünür olmasından dolayı gıda endüstrisinde tercih edilen bir bileşendir. Yapay bal üretimi, tatlıların doldurulması ve yumuşaklığın korunması gibi uygulamalarda kristalleşmeyi önlemede etkili olduğundan şekerleme endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İnvertazlar, sükrozun hidrolizinden sorumlu olan, endüstriyel uygulamalar için genel olarak maya suşlarından elde edilen enzimlerdir. Endüstride en yaygın olarak kullanılan invertaz, yüksek aktivitesi nedeniyle *Saccharomyces cerevisiae* invertaz (SCI)'dır. İmmobilizasyon, enzimlerin suda çözünmeyen bir polimerin üzerine veya içerisine kimyasal bağlanma veya fiziksel adsorpsiyon ile bağlanarak çözünmez hale getirilmesidir. İmmobilize enzimler gıda biyoteknolojisinde geçmişten günümüze yaygın olarak kullanılmaktadır. Çapraz bağlama, entrapment, kovalent bağlama ve adsorpsiyon yöntemleri ile günümüze kadar çok sayıda endüstriyel enzim immobilize edilerek kullanılmaktadır. İmmobilize enzim kullanmanın, süzerek reaksiyon ortamından ayrılmasıyla tekrar tekrar kullanılması, düşük ürün maliyeti, daha saf ürün elde edilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Literatürde SCI'nın immobilizasyonu ile ilgili çok çeşitli martikslerin ve metotların kullanıldığı çalışmalar yer almasına rağmen, elde edilen aktivite verimleri genellikle yüzde yüzün altındadır. Karbon nanotüpler yüksek enzim bağlama kapasiteleri, kararlılıkları ve enzimlere karşı doğal afiniteleri nedeniyle ilk icat edildikleri 1993 yılından beri enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanım alanı bulmuştur. Karboksile edilmiş çok duvarlı karbon nanotüp (c-MWCNT) üzerine immobilize edilen enzimlerin aktivitelerinde serbest enzimlere göre beş ile on iki kat aktivite artışı elde edildiği bildirilmiştir.Dolayısıyla, bu tez çalışmasının en büyük varsayımı, c-MWCNT üzerine immobilize edilecek olan SCI enziminin invert şeker üretiminde daha verimli kullanılabileceği ihtimalidir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında SCI enziminin c-MWCNT üzerine adsorpsiyon yöntemiyle yüzde yüz bağlanma verimi ve mümkün olan en yüksek aktivite verimi elde etmek için immobilizasyon koşullarının ve immobilize SCI kullanılarak sükrozdan invert şeker üretimi koşullarının optimizasyonu amaçlandı.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. İnvertaz Enzimi

Enzimler hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştiren, çoğunlukla protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler günümüzde çeşitli endüstriyel amaçlar için kullanılmaktadır. Serbest enzimlerin katalizledikleri reaksiyon sonunda üründen ayrılarak geri kazanılmaları ve tekrar kullanılmaları çok pahalı bir dizi karmaşık teknikleri gerektirmektedir. Bu da ürün maliyetini artırdığı için üründen ayrılmayıp genellikle ürünle beraber tüketilmektedirler. Ancak, bazı enzimlerin ürünle beraber tüketilmeleri sağlık açısından sakıncalar doğurabilmektedir. Ayrıca, enzimlerin sadece bir kez kullanılmaları, pahalı olmaları nedeni ile prosesleri ekonomik olmaktan çıkmaktadır. Bu nedenle, enzimlerin immobilize edilerek defalarca kullanılmaları, sürekli proseslerin oluşturulması açısından önem arz etmektedir. Günümüzde çok sayıda immobilize enzim endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadır.Endüstriyel olarak öneme sahip enzimlerden biri invertaz enzimidir. Invertaz (β-D-fruktofuranosidaz, sakarraz, invertin, sükraz; EC 3.2.1.26), hidrolaz grubuna aittir ve sükrozun, indirgen şekerler olarak bilinen eş molar glukoz ve fruktoz karışımına hidrolizinden sorumludur. Gıda ve içecek endüstrisinde yaygın olarak kullanılan, genellikle mayalardan elde edilen bir enzimdir. Sükrozun invertaz ile enzimatik hidrolizi, sükrozun α-(1,4) glikozid bağlarının parçalanması, invert şeker olarak bilinen bir eş molar glukoz ve fruktoz karışımının oluşumu ile sonuçlanır (Milovanovic ve ark., 2007). İnvertaz enzimi memeliler, sebzeler, böcekler, bakteriler ve mantarlarda da bulumaktadır ancak, endüstriyel invertazlar genellikle mayalardan elde edilmektedir (David, 2006). Endüstriyel invertaz, *Saccharomyces cerevisiae* tarafından üretilir (Rashad ve ark., 2006). Sükroz hidrolizi için majör özgünlüğe sahip olan SCI, sükrozun hidrolizini katalize eden bir glikoproteindir ve gıda endüstrisinde invert şeker üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Tanrıseven ve Doğan, 2001). Bu reaksiyon sonucunda, α-D-glukoz ve α-D-fruktoz elde edilirr. Fruktoz sükrozdan daha tatlı olduğu için, invert şekerin tatlılık derecesi daha yüksektir. Kristalleşmenin önlenmesi, tatlıların doldurulmasında, yumuşaklığın korunmasında önemli rol oynar. Ayrıca, invertaz, sükrozun substrat olduğu zaman suni bal üretimi, şeker üretimi için nemlendirici madde üretimi, kozmetik, kağıt ve ilaç üretimi gibi çeşitli

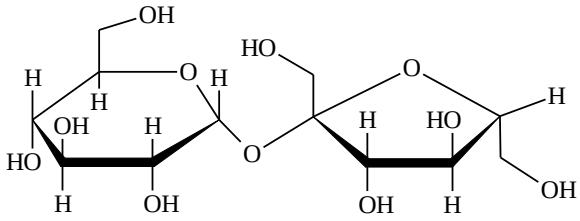
endüstriyel uygulamalarda da kullanılmaktadır (Kotwal ve Shankar, 2009).Maya invertazları diğer birçok enzimin aksine, glikoprotein olması nedeniyle, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında nispeten yüksek aktivite sergilerler ve asidik pH aralığı (3.5-5.5) ile 55-70 °C sıcaklık aralığında daha aktiftirler. Bu enzimler, sükroz inversiyonu için immobilize formda da büyük ölçekte kullanılabilmektedir (Vitolo ve ark., 1999).

2.2. Sükroz

Sükroz, bir glukozun α-(1,2) glikozidik bağı ile bir fruktoza bağlanması sonucu oluşan bir disakkarittir (Şekil 2.1). Sükroz doğal bir tatlandırıcı olup çoğu sebze ve meyvelerde bulunur. Endüstriyel üretiminde şeker kamışı ve şeker pancarı kullanılmaktadır. Sofra şekeri olarak kullanılmasının yanında, gıda üretiminde tatlandırıcı ve koruyucu olarak da kullanılır (Aslan, 2005). Sükrozun invertaz ile hidrolizinden invert şeker karışımı elde edilir. Molekül ağırlığı 342.3'tür (Doğan, 2000). Enzimatik sükroz hidrolizinde, serbest invertazlarının yanında immobilize formda invertazlar da kullanılmaktadır. Serbest ve immobilize edilmiş formlardaki invertaz katalizli hidroliz ile, asit hidroliziyle elde edilen renkli versiyona kıyasla, düşük konsantrasyonlarda 5-hidroksimetil-2-furfural (HMF) ve renk gelişimi olmaksızın yüksek kalitede şurup üretilmektedir (Kang, 2000).

2.3. İnvert Şeker

Bir disakkarit olan sükroz, invert şeker olarak bilinen 1:1'lik eş molar glikoz ve fruktoz karışımına ayrılabilmektedir. İnvert şeker, granüler sükrozdan daha tatlı ve daha çözünür olmasından dolayı şekerleme endüstrisinde çok önemli bir bileşendir. Özellikle şeker üreticilerinin yüksek viskoziteli solüsyonlarda şekerin kristalleşmesini geciktirmek amacıyla kullanılmaktadır (Toppare ve ark., 2003).



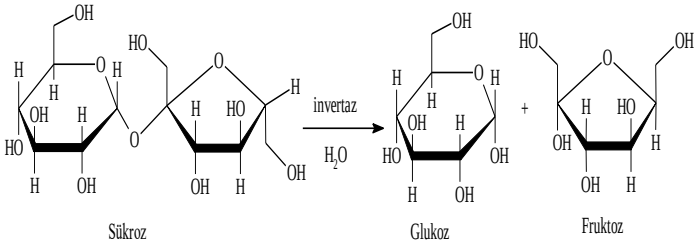
Sükroz

Şekil 2.1. Sükrozun molekül yapısı

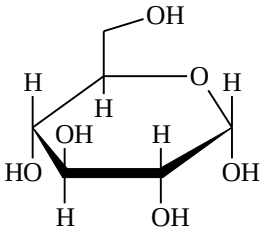
Enzim katalizörlüğünde elde edilen invert şeker karışımı, asit hidroliziyle elde edilen renkli ürünlerin aksine, renksiz olma avantajına sahiptir ve kullanılan yüksek konsantrasyonlarda sükrozdan daha düşük bir kristalliğe sahiptir. Bu bağlamda, immobilize invertaz kullanımı cazip bir seçenektir çünkü enzimin yeniden kullanımı ve katalizörün stabilitesi ve aktivitesindeki artış maliyet düşmesine yol açabilmektedir (Mazi ve ark., 2006).İnvertaz enzimi Şekil 2.2'de görülen, sükrozun invert şeker adı verilen eş molar glukoz ve fruktoza parçalanma reaksiyonunu katalizler. Aynı reaksiyon, ortamda invertaz bulunmaması durumunda da gerçekleşir, ancak invertazın katalizör etkisi sonucu reaksiyon hızı çok büyük oranda artar. Bu özelliğinden dolayı gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmasının yanında, şekerleme ürünlerinin raf ömrünü uzatmak amacıyla katkı maddesi olarak da kullanılır (Doğan, 2000).

2.4. Glukoz

Şekil 2.3'te görüldüğü gibi D-Glukoz (D-glukopiranoz), ($C_6H_{12}O_6$; MA=180.159 g/mol) altı karbondan oluşmuş bir şekerdir. Nişasta ve selüloz sırasıyla, anhidroglukopiranoz ünitelerinin α- ve β- bağları ile bağlanarak uzun zincirli polimer oluşturması ile meydana gelir. İnsan diyetinin büyük bölümünü glukozun serbest veya polimerleşmiş hali oluşturur.



Şekil 2.2. İnvertaz enzimi katalizörlüğünde sükrozun glukoz ve fruktoza parçalanması



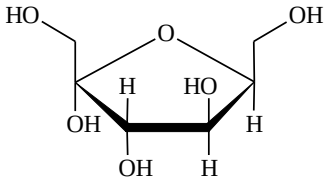
Şekil 2.3. Glukozun molekül yapısı

Glukoz ve glukoz içeren ürünler, endüstriyel olarak nişastadan üretilmektedir. Bu işlem için genelde mısır kullanılır. Mısır nişastası haricinde arpa, buğday, pirinç, patates nişastası veya diğer nişastalar da kullanılmaktadır. Dünyada üretilen mısır nişastasının % 70'i glukoz içeren tatlandırıcılara dönüştürülür (Doğan, 2000).

2.5. Fruktoz

Molekül yapısı Şekil 2.4'te görülen D - fruktoz, D - glukozdan sonra en önemli monosakkarittir. Fruktoz doğada özellikle meyvelerde (elma ve armut) serbest monosakkarit halinde bulunmaktadır. Serbest kristal β-D fruktopiranoz'un erime noktası 105 ˚C'dir. Fruktoz çözeltisinin tatlılığı sıcaklık, konsantrasyon ve asit miktarına bağlıdır. % 10'luk fruktoz çözeltisinin tatlılığı oda sıcaklığında sükrozdan 1.3 kat daha fazladır. Fruktoz, endüstriyel olarak sükroz, nişasta ve inülinden elde edilmektedir. Fruktoz düşük kaloride ve diyabetik olarak üretilen pek çok gıda ürününde kullanılmaktadır. Diğer yapay tatlandırıcılara kıyasla acımsı bir tadı yoktur. Ayrıca, fruktoz pişmiş gıdalardaki su kaybını engelleyerek raf ömrünün de uzatmaktadır. Sükrozdan daha tatlı olması, düşük sıcaklıktaki yüksek çözünürlüğü, yüksek donma

noktası sayesinde dondurma üretiminde de rahatlıkla kullanılmaktadır (Doğan, 2000).



Fruktoz

Şekil 2.4. Fruktozun molekül yapısı

2.6. Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon, enzim aktivitesini uzun süre korumak için, suda çözünmeyen bir martikse adsorpsiyon, kovalent bağlama, çapraz bağlama veya martiks içine hapsederek enzimin hareketinin sınırlanması işlemidir. Bir enzimin immobilizasyonu, hareketliliğini kimyasal veya fiziksel yöntemlerle kısıtlayarak elde edilir. Kontrollü salım sistemleri, çevresel kirleticilerin belirlenmesi ve biyosensör tasarımı gibi alanlarda uygulamalar için enzim özelliklerinin arttırılmasında kullanılır. Enzimin aktivitesi immobilizasyon işlemi sırasında düşebilse de, basitleştirilmiş ayırma, immobilize edilmiş enzimlerin reaksiyon ortamından kolay geri kazanılması gibi birçok avantaja sahiptir ve bunlar işletme maliyetini azaltmak için tekrar tekrar kullanılabilir. Ayrıca enzimler immobilizasyon ile kararlı hale getirilebilirler. Enzim immobilizasyonunda organik ve inorganik yapıda çok sayıda doğal veya yapay martiks kullanmaktadır (Eupergitler, karbon nanotüp, v.b.). Destek malzemeleri, optimum pH ve sıcaklık gibi parametreleri değiştirebilir (Birnbaum ve ark., 1993).

İmmobilize enzim kullanmanın avantajları;

- 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 önlenebilir.

İlk enzim immobilizasyonu 1916 yılında Nelson ve ark. tarafından invertaz enzimi ile yapılmıştır. Günümüze kadar, konu ile ilgili, on binlerce makale ve patent yayınlanmıştır.

2.6.1. Enzim İmmobilizasyon Metotları

İmmobilizasyon metotlarında farklı sınıflandırmalar yapılabilmesine rağmen genellikle bağlanma reaksiyonun tipine göre sınıflandırma yapılmaktadır. Adsorpsiyon, entrapment (bir polimerik jel veya kapsül içine hapsetme), bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanma ve kovalent bağlanma olmak üzere dört ana gruba ayrılır (Şekil 2.5). İmmobilizasyon metodunnun seçimi, enzimin ve martiksin yapıları, kullanılacakları prosesler gibi parametrelere bağlıdır. İmmobilize enzimler, kullanılan martiksin yapısına ve immobilizasyon metoduna bağlı olarak, serbest enzimlere göre optimum şartları, kinetik sabitleri ve ürün bileşimleri bakımından farklı özellikler gösterebilirler.

2.6.1.1. Adsorpsiyon

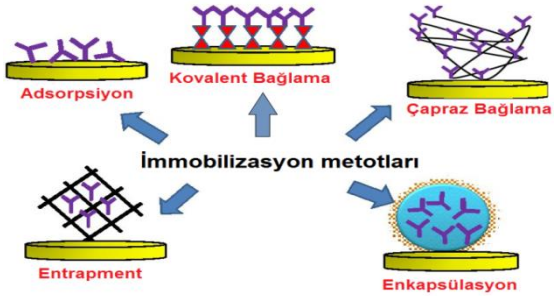
Adsorpsiyon metodu, enzimin en zayıf çekim kuvvetleriyle inert bir martikse bağlanmasını esas alan, oldukça basit ve ekonomik bir immobilizasyon yöntemidir. İmmobilizasyon, enzim çözeltisinin uygun pH ve sıcaklıkta martiksle karıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Enzimle martiks arasında van der Waals ve hidrojen bağları gibi zayıf bağlar oluşur ve böylece enzimler martiksten kolaylıkla ayrılırlar. İyon değiştiriciler kolaylıkla proteinleri adsorbe ederler ve enzim immobilizasyonu için endüstride yaygın olarak kullanılırlar (Aslan, 2005). İmmobilizasyon teknikleri arasında, adsorpsiyon diğer yöntemlerden daha yüksek bir ticari potansiyele sahiptir, çünkü adsorpsiyon işlemi daha basit ve daha ucuz bir yöntemdir. Ayrıca aktiviteyi korur ve en önemlisi, immobilizasyondan sonra destek materyali de tekrar tekrar kullanılabilir (Marquez ve ark., 2008). Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonda yaygın olarak kullanılan adsorbentler Tablo 2.1'de görülmektedir.

2.6.1.2. Çapraz bağlama

Sulu çözeltilerde çözünebilen enzimler, bifonksiyonel çapraz-bağlayıcı reaktifler kullanılarak birbirlerine kovalent olarak bağlandıklarında çözünmez hale gelirler (Chui ve Wan, 1997). Glutaraldehit bu amaç için kullanılan çapraz-bağlayıcı reaktiflerden biridir (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.

2.6.1.3. Entrapment (Hapsetme)

Bir polimerin oluşumu sırasında, enzimin oluşan polimer içerisine hapsedilmesine entrapment denir (O'Driscoll, 1976). Bu metot için en yaygın olarak kullanılan polimerlerden birisi aljinik asittir. Aljinatlar, toksik olmayan doğal ve ekonomik polimerlerdir. Aljinat jellerinin (bead, kapsül, fiber) gözeneklerinin büyük olması, fosfat gibi bazı anyonlar içeren reaksiyon ortamlarında kararlılığının düşük olması, kullanılmalarını sınırlayan faktörlerdendir. Aljinat kullanılarak enzimler değişik metotlarla immobilize edilebilir. Enzim, aljinat çözeltisiyle karıştırılarak kalsiyum klorür çözeltisine damlatıldığında kalsiyum aljinat beadleri oluşur. Enzim, kalsiyum klorür ile karıştırılarak aljinat çözeltisine damlatıldığında ise kalsiyum aljinat kapsülleri oluşur. Enzim-Aljinat-gliserol karışımı, kalsiyum klorür çözeltisine şırınga ile iplik şeklinde enjekte edildiğinde, kalsiyum aljinat fiberleri oluşur. Oluşan bead, fiber veya kapsülün gözenek büyüklüğü, kullanılan aljinat ve kalsiyum klorür çözeltisinin derişimine bağlıdır. Molekül kütlesi 300 kDA'dan küçük olan enzimler aljinat jellerinden kaçabilmektedir. Bu nedenle, kalsiyum aljinat ile immobilizasyon genellikle hücrelerin immobilizasyonunda kullanılır (Blandino ve ark., 2000; Hayashi ve ark., 1994).



Şekil 2.5. Enzim immobilizasyon metotları (Dutra, 2015)

Tablo 2.1. Adsorpsiyonla immobilizasyonda kullanılan adsorbentler

Etkileşme	Adsorbentler
Fiziksel Adsorpsiyon	**Doğal Martiksler**
	Aktif Karbon
	Silika jel
	Aluminyum
	Cam
	Nişasta
	Modifiye Martiksler
	Konkanavalin A
	Sefaroz
	Tannin
	Amino hekzil selüloz
	Fenoksiasetil selüloz
İyonik Bağlanma	**Katyon Değiştiriciler**
	CM-selüloz
	Doveks 50
	Amberlit CG-50
	Anyon Değiştiriciler
	DEAE-selüloz
	DEAE-sefadeks
	Amberlit

2.6.1.4. Kovalent bağlama

Enzimler genellikle amino, sülfidril, karboksil, hidroksil veya imidazol gruplarıyla, doğal ve yapay çok sayıda katı martikse kovalent bağlanmayla immobilize edilebilirler. Üzerinde aktif gruplar bulunduran martiksler, uygun

tampon çözeltide enzimlerle muamele edilerek enzim immobilizasyonu gerçekleştirilir (Katchalski-Katzir ve Kraemer, 2000).Üretan prepolimerler kovalent immolizasyonda yaygın olarak kullanılan martikslerindendir. Prepolimerler, diizosiyanat türevlerinin, aktif hidrojen bulunduran çeşitli bileşiklerle (glikol, poliglikol, poliol) reaksiyonlarından elde edilirler ve yapılarında izosiyanatlar bulunur. Prepolimerler su ile muamele edildiğinde süngerimsi yapıda polimerler meydana gelir. Ortamda enzim bulunduğunda, enzimin aktif hidrojen bulunduran gruplarıyla, izosiyanat grupları kovalent bağlar oluştururlar.

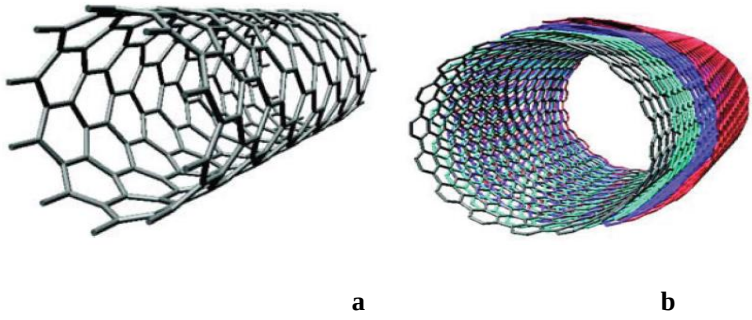
2.7. c-MWCNT'ler ile Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon prosedürleri, temel olarak biyokatalizörlerin ayrılması, tekrar kullanılması ve sürekli işlemlerin geliştirilmesi amacıyla kararlılıklarının iyileştirilmesi için geliştirilmiştir. Son yıllarda, enzim immobilizasyon teknolojisinin odağı nanoyapılı malzemelerin kullanımına yönelmiştir. Nanomalzemeler enzim immobilizasyonu için destek olarak yoğun ilgi kazanmıştır, çünkü yüksek yüzey alanı enzim yükünü ve immobilize edilmiş enzimin katalitik davranışını olumlu yönde etkilemektedir (Stamatis ve ark., 2010).Enzimlerin yapısı gereği denatürasyonunun gerçekleşebilmesine rağmen, CNT'ler yüksek sıcaklıklarda ve organik çözücülerde geleneksel düz desteklerden çok daha fazla kararlılık sağlayabilirler (Asuri ve ark., 2006).Karbon nanotüpler, tek duvarlı veya çok duvarlı grafen levhaların kesintisiz silindirlere yuvarlanmasıyla oluşturulmuş iki türe ayrılmaktadır. Şekil 2.6'da görüleceği üzere, bu silindirik yapılar tek duvarlı karbon nanotüp (SWCNT) ve çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) olarak adlandırılmaktadır (Yellampalli, 2011). Tek duvarlı karbon nanotüp, yaklaşık 1-2 nm çapında, tek bir grafen tabakasının fulleren uçları ile kendi etrafında döndürülmüş halidir. Çok duvarlı karbon nanotüpler ise, farklı çaplara sahip tek duvarlı karbon nanotüplerin iç içe geçmesi ile oluşan formdur. Tek duvarlı nanotüpün avantajı, yüksek spesifik yüzey alanına sahip olması iken çok duvarlı nanotüplerin avantajı kolay ayrıştırılmasıdır (Weiser D., 2015). c-MWCNT'lerin enzim immobilizasyonunda avantajları aşağıda gösterilmiştir.

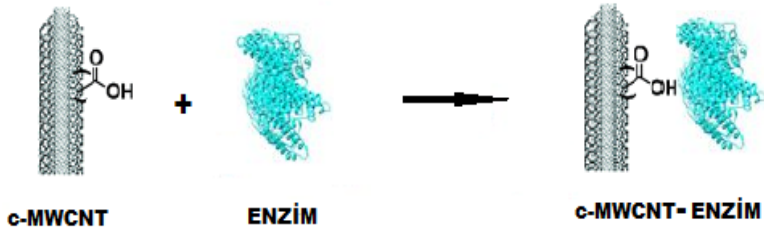
- Geniş spesifik yüzey alanı
- Daha yüksek miktarda enzim bağlama kapasitesi
- Yüksek spesifik aktivite

- Yüksek kullanım ve saklama kararlılığı
- Yüksek iletkenlik kararlılığı

Nanopartiküller yüksek yüzey alanına ve immobilizasyon işlemi için önemli özelliklere ve mekanik kararlılığa sahip olduklarından enzim immobilizasyonu için mükemmel martikslerdir (Prlainovic ve ark., 2013). Literatürde enzim immobilizasyonu için adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemlerinde tek duvarlı karbon nanotüplerin (SWCNT) ve çok duvarlı karbon nanotüplerin (MWCNT') kullanımı hakkında çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Şekil 2.7'de görüldüğü gibi, adsorpsiyonla immobilizasyon, enzim ile martiksin tampon çözeltide inkübe edilmesiyle gerçekleştirilir (Garlet ve ark., 2014). SCI son 90 yıl boyunca her türlü immobilizasyon tekniği ile çok sayıda farklı destekler ile immobilize edilmesine rağmen c-MWCNT üzerine immobilizasyonu ile ilgili bir çalışma literatürde bulunamadı.



Şekil 2.6. Karbon nanotüpler. **a.** Tek duvarlı karbon nanotüp (SWCNT), **b.** Çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT).



Şekil 2.7. Adsorpsiyon yöntemi ile c-MWCNT üzerine enzim immobilizasyonu.

2.8. c-MWCNT ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Wang ve ark. (2011)'ın çalışmalarında c-MWNT üzerine *genview* kaynaklı papain immobilizasyonu sonucu % 18.8 bağlanma verimi, % 78.9 aktivite verimi elde etmişler ve 7 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin % 61'ini koruduğunu göstermişlerdir.Rastian ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada c-MWCNT üzerine *Candida rugosa* lipaz enzimi immobilize etmişler ve çalışma sonunda % 52 bağlanma verimi alırken % 48 aktivite verimi elde etmişlerdir.Garlet ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada *Aspergillus niger* inulinazı c-MWCNT üzerine immobilize ederek % 90 bağlanma verimi sağlamışlardır ve immobilize enzimin 5 hafta sonunda dahi başlangıç aktivitesini koruduğu sonucuna varmışlardır. Rastian ve ark. (2014) yaptıkları bir başka çalışmada ise c-MWCNT üzerine *Candida rugosa* lipaz enzimini immobilize ederek % 86.7 bağlanma verimi ve % 492.5 aktivite verimi elde etmişlerdir. Çalışmanın devamında immobilize enzim 7 kullanım sonrasında başlangıçtaki aktivitesinin % 123.7'e indiğini bildirmişlerdir.Azevedo (2014), c-MWCNT üzerine fungal peroxidase enzimini immobilize ettiği çalışmanın sonucunda % 100 bağlanma verimi elde etmiştir. İmmobilize enzimin 9 kullanım sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği, 40 gün sonrasında ise aktivitenin % 34'e düştüğünü bildirmişlerdir.Feng ve ark. (2015), c-MWCNT üzeine α-Amylase ve glucoamylase enzimini immobilize ederek % 95.1 aktivite verimi elde etmişlerdir. İmmobilize enzimin 8 kullanım sonrasında aktivitesini kaynetmediğini göstermişlerdir. Jamie ve ark. (2016), c-MWCNT üzerine *Candida rugosa* lipaz enzimini immobilize etmişler ve % 85.6 bağlanma verimi, % 500 aktivite verimi elde etmişlerdir. Zniszczol ve ark. (2016), yaptıklaları çalışmada c-MWCNT üzerine *Pseudomonas fluorescens* lipaz enzimini immobilize etmişlerdir. Immobilizasyon sonunda % 59 bağlanma verimi elde ederken % 1200 aktivite verimi elde etmişlerdir. Immobilize enzimin 8 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin % 60'a düştüğünü göstermişlerdir.c-MWCNT geniş spesifik yüzey alanı nedeniyle daha yüksek miktarda enzim bağlama kapasitesine, yüksek spesifik aktiviteye ve yüksek kullanım ve depolama kararlılığına sahip olduğundan diğer martikslerle yapılan immobilizasyon çalışmalardan daha yüksek aktiviteye ve kararlılığa sahip immobilize SCI elde edilmesi mümkündür. Bu özellik ise immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalarında aktivitenin uzun süre korunabilmesi ve enzim maliyetinin düşürülmesi açısından çok önemlidir.

2.9. SCI'nın İmmobilizasyonu ile İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar

Tarihte ilk SCI immobilizasyonu bilim insanları Nelson ve Grift (1916) tarafından yapılmıştır. Bu immobilizasyonda adsorpsiyon yöntemi kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda mayadan elde edilen invertazın aktivitesinin enzimin odun kömürüne veya bir kolloide adsorbe olup olmamasından etkilenmeyeceğini kanıtlamışlardır.Tanrıseven ve Doğan (2001), yaptıkları çalışmada SCI'ı aljinat kapsüller içine immobilize ederek, immobilizasyon veriminin yüksek (% 87) ve enzim aktivitesinde de azalma olmaksızın 36 gün aktif olduğu sonucuna varmışlardır. Tanrıseven ve ark. (2001), invert şeker üretmek için poli (3-metiltienil metakrilat)/poli (3-tiofenasetik) (PMTM-PTAA) immobilizasyon martiksini SCI'ın kovalent immmobilizasyonunda kullanmış ve çalışma % 87 immobilizasyon verimliliği ile sonuçlanmıştır. Ayrıca aktivite için optimum koşulların immobilizasyondan etkilenmediğini ancak immobilize enzimin daha yüksek pH ve sıcaklık değerlerinde daha kararlı olduğunu tespit etmişlerdir.Akgöl ve ark. (2001), yaptıkları çalışmalarında, yeni geliştirilen manyetik poli (vinilalkol) (PVAL) mikrokürecikler üzerine sükrozun hidrolizi için SCI enzimini kovalent bağlanma ile ve % 74 aktivite verimiyle immobilize etmişlerdir. Optimum sıcaklığın ise immobilize enzim için serbest enzimden 5 °C daha büyük olduğu saptanırken, optimum pH değeri ise serbest enzim için 5.0 iken immobilize enzim için 5.5 olarak bulunmuştur. Ayrıca, ısıl kararlılık ve depolama kararlılığının immobilizasyon ile arttığı belirtilmiştir.Mansour ve Dawoud (2003), SCI'ı celite ve poliakrilamid üzerine immobilize ederek aktivite veriminin sırasıyla % 92 ve % 81 olduğunu, hem serbest hem de immobilize enzim için optimum pH ve sıcaklığın sırasıyla 4.6 ve 60 °C olduğunu ve immobilize edilen enzimin 90 gün boyunca oda sıcaklığında saklandığında ve peş peşe 20 kez kullanıldığında başlangıç aktivitesini kaybetmediğini bildirmişlerdir.Bayramoğlu ve ark. (2003), çalışmalarında SCI enzimini kovalent bağlanma ile poli(hidroksietil metakrilat-*co*-glisidil metakrilat) poli (HEMA-GMA) film üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin optimum sıcaklığı serbest enzime göre 5 °C artış gösterirken optimum pH değerinin aynı kaldığı saptanmıştır. İmmobilize enzimin aktivitesinin serbest emsallerine göre daha kararlı olduğu tespit edilmiştir. Depolanma kararlılığı olarak 28 günün sonunda immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin % 32'sini

kaybettiği belirlenmiştir. Kolay immobilizasyon protokolü, epoksi gruplarının yoğunluğundan dolayı ve bunun kolaylıkla değiştirilerek monomer/komonomer oranın ayarlanabilir olması, daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında yüksek immobilizasyon kapasitesine sahip olması, biyoteknolojik çalışmalar için iyi bir mekanik dayanıklılık göstermesi gibi özelliklerin uygulama avantajları gösterilebileceği kanıtlanmıştır.Milovanovic ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada, kalsiyum aljinat boncukları içine SCI'ın immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda 40 ardışık döngüden sonra bile invertaz aktivitesinin % 90'ını koruduğunu göstermişlerdir.Hertz ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada, SCI'yı iyonotropik jelasyon yöntemiyle hazırlanan ve glutaraldehit ile aktive edilen kitosan nanopartiküller üzerinde kovalent olarak immobilize etmiş ve immobilizasyon sonunda termal ve depolama stabiliteleri, enzimin optimum pH ve sıcaklığının değişmediğini, K_m'nin 3 kat arttığını V_{max}'ın ise değişmediğini göstermişlerdir.Tanrıseven ve ark. (2013), yaptıkları bir başka çalışmada ise, SCI'ın supermacroporous poliakrilamid kriyojel içinde immobilizasyonu için yeni bir yöntem geliştirilmiş ve invert şeker üretmek için kullanılmıştır. Yöntemin % 100 immobilizasyon ve % 74 aktivite verimiyle sonuçlandığı, immobilize invertazın, başlangıç aktivitesini 30 gün boyunca ve peş peşe 30 kullanım sonunda koruduğu fakat immobilizasyonun optimum sıcaklık üzerinde etkisi olmadığı ve hem serbest hem de immobilize enzim için 60 °C olduğu sonucuna varmışlardır. Tanrıseven ve ark. (2008)'nın, yaptıkları bir başka çalışmada SCI'nın poli (3-metiltiyenil metakrilat) - poli (3-tiofenasetik asit) (PMTM-PTAA) üzerine kovalent immobilizasyonu % 87 immobilizasyon verimi ile sonuçlanmış ve enzimin optimum pH (4.5) ve sıcaklık (55 °C) değerlerinin immobilizasyondan etkilenmemiştir. Ancak immobilize SCI'nın yüksek pH ve sıcaklıklarda daha aktif olduğu görülmüştür. Serbest ve SCI için kinetik parametreler Linewear-Burk grafiği kullanılarak belirlenmiş ve K_m değerleri serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 35 ve 38 mM olarak belirlenmiştir. V_{max} değerleri ise serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 29 ve 24 mg glukoz/mg enzim olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda, sükrozdan glukoz ve fruktoz üretimi için immobilize enzim kullanılabileceği kanısını varılmıştır. 50 kez peş peşe tekrarlanan reaksiyonlarda ve bir ay boyunca depolanma sonucunda da tüm aktivitesini koruduğu gösterilmiştir. Sugunan ve Sanjay (2006), yaptıkları çalışmada

invertazı mikro gözenekli asitle aktive edilmiş montmorillonit kil (K-10) üzerine hem adsorpsiyon hem de kovalent bağlama yöntemi ile immobilize etmişler ve daha sonrasında immobilize enzim ile sükroz hidrolizini gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda immobilize edilmiş enzimlerin daha yüksek pH ve sıcaklıkta da kararlı olduklarını ve optimum pH ve sıcaklığın yükseldiğini belirtmişlerdir. İmmobilize edilen enzimin 20 gün boyunca aktivitesinde önemli bir kayıp olmaksızın 5 °C'de pH 5 ve 6 tamponunda depolanabilir olduğunu ileri sürmüşlerdir. Literatür araştırmamızın bir sonucu olarak, SCI enzimi bir çok farklı martiks ve metot kullanılarak immobilize edildiği, ancak aktivite verimlerinin % 100'ün altında olduğu görülmektedir. Ayrıca, SCI enziminin bu zamana kadar c-MWCNT üzerine immobilizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamadı. Dahası, c-MWCNT'lerin geniş yüzey alanları dolayısıyla daha fazla enzim bağlama kapasitesine sahip olması, yüksek kararlılık nedeniyle mekanik darbelere dayanıklı olması, sulu çözeltilerde çok iyi dağılmaları ve çözeltinin her tarafına doğru Brown Hareketi yapması, substrat ve ürünler için kütle transferi problemi göstermemesi gibi nedenlerden ötürü bazı enzimlerin aktivitesinin immobilizasyon sonucu 5-12 kat arttığı bildirildiğinden, bu tez çalışmasında SCI'nın c-MWCNT üzerine immobilizasyonunda da serbest enzime göre daha yüksek aktivite verimi elde edilebilme ihtimalinin varlığı bizi bu tez çalışmasına yönlendirdi. Yaptığımız tez çalışmasında SCI'nın c-MWCNT üzerine immobilizasyon koşulları ve immobilize SCI kullanılarak sükrozdan invert şeker üretimi koşullarının optimizasyonu amaçlandı.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

Saccharomyces cerevisiae invertaz Bio-Cat firmasından hediye olarak temin edildi. UV-VIS Spektrometresi (VWR, UV-6300PC), pH metre Hanna Intruments (HI11310) Woonsocket, Rhode Island, saf su cihazı (MDM, Mini Pure 1, MDM-0170), MDM Co. Ltd. (Suwon-si, South Korea) firmasından, USAfirmasından, magnetik karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Standard) Heidolph UK-Radleys (Shire Hill, UK) firmasından, hassas terazi (Shimadzu-ATX224) Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan) firmasından, orbital çalkalayıcılı ısıtmalı inkübatör (Mipro-MCI) Protek Lab Group; professional laboratory solutions company (Ankara, Turkey) firmasından, vakum pompası (Biobase, GM-0.50A)

Biobase Biodustry Co. Ltd. (Shandong, China) firmasından, Bovin Serum Albumin (BSA), sodium dihidrojen fosfat, hidrokilorik asit, sodyum hidroksit, sodyum sülfit, fenol ve D-glukoz Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) firmasından, 3.5-dinitrosalisilik asit (DNS) Alfa Aesar (Kandel, Germany) firmasından, sodyum potasyum tartarat (Rochelle salt) VWR Prolabo Chemicals (Leuven Belgium) firmasından. Sodyum azid ve sükroz Merck Millipore (Darmstadt, Germany) firmasından, karbon nanotüpler (iç çapı 5-15 nm, dış çapı 28-48 nm, uzunluk 10-25 □m) Nanografi Co. Ltd. (Ankara, Türkiye) şirketinden temin edildi.

3.2. Metotlar

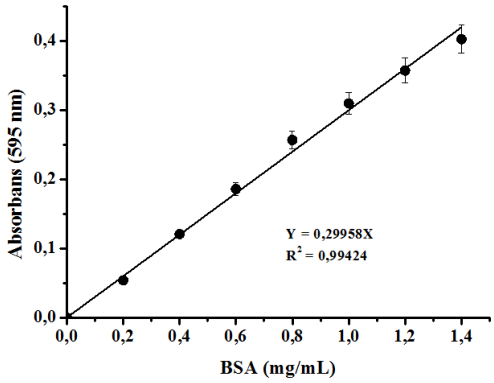
3.2.1. SCI'nin c-MWCNT'ler ile immobilizasyonu

Enzim immobilizasyonunda bağlanma verimini ve aktivite verimini etkileyen koşullar (immobilizasyon çözeltisinin pH'sı ve molaritesi, Martiks miktarı ve immobilizasyon süresi) sırasıyla değiştirilerek optimize edildi.

3.2.2. Protein (enzim) tayini

Protein derişimleri, 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 absorbansları kullanılarak oluşturulan standart grafiğine (Şekil 3.1) ait doğru denklemine (3.1) göre hesaplandı.

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



Şekil 3.1. BSA standart grafiği

3.2.3. SCI aktivitesinin tayini

İnvertaz aktivitesi**,** 200 µL serbest SCI ve 5 mL % 1 (w/v)'lik sükrozun standart koşullarda (pH 4.5; sıcaklık 55˚C; süre 30 dakika ve çalkalama hızı 150 rpm) yapılan reaksiyonu ile tayin edildi. Oluşan indirgen şeker derişimleri Şekil 3.2'de görülmekte olan D-Glukoz derişimi Miller'in (1959) metoduna göre standart grafiğine ait doğru denkleminden (3.2) hesaplandı. Bir IU SCI aktivitesi, standart koşullarda, 5 mL % 1 (w/v)'lik sükroz çözeltisinde 1 dakikada 1 µmol D-Glukoz oluşturan enzim miktarı (mg) olarak tanımlandı. SCI aktivitesi 3.3 eşitliğine göre hesaplandı.

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

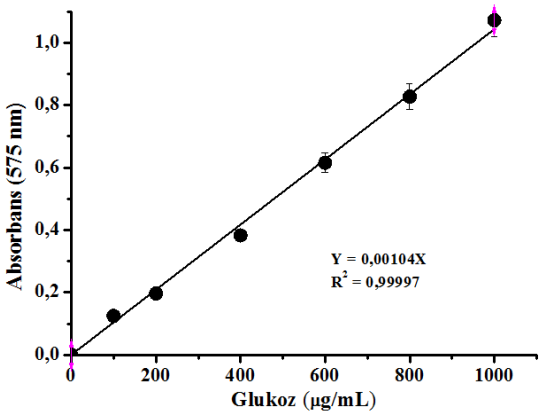
$$Aktivite\ (\mu mol/mg.dk) = \frac{İndirgen\ şeker\ (\mu mol)}{Kullanılan\ enzim\ (mg)\ x\ reaksiyon\ süresi\ (dk)} \quad (3.3)$$

3.2.4. İmmobilizasyon ve aktivite verimlerinin hesaplanması

İmmobilizasyon immobilizasyon çözeltileri ve süzüntülerdeki enzim miktarları kullanılarak bağlanma ve aktivite verimleri Aslan ve Ömerosmanoğlu (2018)'nun metoduna göre sırasıyla Denklem (3.4) ve Denklem (3.5) kullanılarak hesaplandı.

$$Immobilizasyon\ verimi\ (\%) = \frac{(Immobilizasyonda\ kullanılan\ enzim - Süzüntüdeki\ enzim)}{Immobilizasyonda\ kullanılan\ enzim}\ x\ 100 \quad (3.4)$$

$$Aktivite\ verimi\ (\%) = \frac{Immobilize\ enzimin\ aktivitesi}{Sıvı\ enzimin\ aktivitesi}\ x100 \quad (3.5)$$



Şekil 3.2. Glukoz standart grafiği

3.2.5. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu

3.2.5.1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 200'er µL SCI çözeltileri ile 25'er mg c-MWCNT'lerin farklı pH'lardaki (4.0-4.5-5.0-5.5-6.0) 5 mL fosfat tamponları (25 mM) içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi. Aktiviteler, 200 µL serbest ve 0.235 g immobilize SCI'lerın 5 mL %(w/v) 1'lik sükroz çözeltileri (pH 4.5) ile bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan glukoz miktarları kullanılarak hesaplandı.

3.2.5.2. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200'er µL SCI çözeltileri ile 25'er mg c-MWCNT'lerin, farklı derişimdeki 5 mL fosfat tamponları (pH 4.5) içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi.Aktiviteler, 200 µL serbest ve 235 mg immobilize SCI'lerin 5 mL % (w/v) 1'lik sükroz 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.

3.2.5.3. Martiks miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerdeki 5'er mL 0.25 M'lık dört ayrı fosfat tampon çözeltilerine (pH 4,5) sırasıyla 25, 50, 75 ve 100 mg c- MWCNT ve 200'er µL (10.31 IU) enzim ilave edilerek, oda sıcaklığında 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 30 dakika süreyle yürütülen reaksiyonla gerçekleştirildi.İmmobilizasyon sonunda, immobilize enzimler, por büyüklüğü 2 olan sinterli cam süzgeçler kullanılarak vakum altında süzülerek 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 süzüntülerde UV spektrometresi ile 595 nm'de absorbanslar ölçülerek protein miktarı tayin edildi. Protein miktarları kullanılarak Denklem (3.4)'e göre immobilizasyon verimleri hesaplandı.Standart aktivite tayin

metoduna göre tayin edilen serbest ve immobilize enzimlerin bağıl aktiviteleri kullanılarak da Denklem (3.5)'e göre aktivite verimleri hesaplandı.

3.2.6. Serbest ve İmmobilize SCI'nin 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 enzimin karakterizasyonu sağlandı.

3.2.6.1. Optimum pH

Bağıl aktiviteler, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde 200'er µL (10.31 IU) serbest ve 0.235 g (18.33 IU) 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 sükroz çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda tayin edildi. Optimum pH aralığı, bağıl aktivite (%) - pH grafiğinden belirlendi.

3.2.6.2. Optimum sıcaklık

Bağıl aktiviteler, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde 200'er µL (10.31 IU) serbest ve 0.235 g (18.33 IU) immobilize enzimlerin 25mM fosfat tamponu (pH 4,5) ile hazırlanmış 5'er mL % 1 (w/v)'lik sükroz çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde farklı sıcaklıklarda (30-40-45-50-55-60-65-70-80^{o}C) 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda bağıl aktiviteler tayin edilerek, bağıl aktivite (%) - sıcaklık (^{o}C) grafiğinden optimum sıcaklık aralığı belirlendi.

3.2.6.3. pH kararlılığı

200'er µL (10.31 IU) serbest ve 0.235 g (18.33 IU) immobilize SCI'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 mL 25 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerinde, 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında (25^{o}C), 20 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, üzerlerine 100 mM'lık fosfat tamponu (pH 4.5) ile hazırlanmış 4 mL % 1.25 (w/v)'lik sükroz çözeltileri eklenerek 25^{o}C'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda, bağıl aktiviteler tayin edilerek, sıvı ve immobilize enzimin kararlı olduğu pH aralığı belirlendi.

3.2.6.4. Isıl kararlılık

200'er µL serbest (10.31 IU) ve 0.235 g (18.33 IU) immobilize SCI, 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 (30-40-45-50-55-60-65-70-80ºC 20 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, üzerlerine 100 mM'lık fosfat tamponu (pH 4.5) ile hazırlanmış 4'er mL % 1.25 (w/v)'lik sükroz çözeltileri eklenerek 55ºC'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda bağıl aktiviteler tayin edilerek, sıvı ve immobilize enzimin kararlı olduğu sıcaklık (ºC) aralığı belirlendi.

3.2.6.5. Kinetik sabitler

200'er µL serbest (10.31 IU) ve 0.235 g (18.33 IU) immobilize SCI başlangıç aktiviteleri, 10 mL'lik 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 sükroz çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 10 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda başlangıç hızları tayin edilerek, çizilen Lineweaver-Burk Grafiğine ait doğru denkleminden V_{max} ve K_m sabitleri hesaplandı.

3.2.7. İmmobilize SCI'nın kullanım kararlılığı

İmmobilize enzimin kullanım kararlılığı, standart koşullarda peşpeşe 20 kez kullanımı sonunda tayin edilen bağıl 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.

3.2.8. İmmobilize SCI'nın depolama kararlılığı

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

3.2.9. İmmobilize SCI kullanarak sükrozdan invert şeker üretimi

Sükroz derişimi, immobilize SCI miktarı ve hidroliz süresi invert şeker üretiminde verimi etkilediğinden, bu parametreler sırayla değiştirilerek etkileri belirlendi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Protein Tayini

Denklem (3.1)'e göre, 200 µL serbest SCI içeren 5.2 mL immobilizasyon çözeltisi içindeki SCI kütlesi 2.16 mg olarak hesaplandı. 1 g toz haldeki ticari enzim preparasyonundaki enzim miktarı ise 539.40 mg olarak hesaplandı.

4.2. Enzim Aktivitesinin Tayini

Optimum aktivite analizi koşullarında 200 µL serbest SCI reaksiyonunun sonunda oluşan indirgen şeker miktarı D-glukoz standart grafiğine ait doğru denklemine (4.2) göre 9.028 µmol olarak bulunmuştur. Serbest SCI aktivitesi, denklem (3.3)'ten 10.31 IU/mg olarak hesaplandı. Aktivite verimimiz % 177.69 olduğundan 235 mg ıslak SCI'nin içerdiği aktivite ise 18.33 IU olarak hesaplandı. Ayrıca 1 g ticari toz SCI preparasyonu 539.40 mg SCI içerdiğinden, toz halinde SCI aktivitesinin substrat olarak sükroz için 2578.29 IU/g olduğu hesaplandı. 1 IU aktivitesine sahip olan serbest SCI miktarı da 4.78 IU/ mg 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 gösterilmiştir. Tabloya göre immobilizasyon tamponunun pH'sı 4.0 iken % 29.45 olan immobilizasyon veriminin pH 4.5'e çıkarıldığında % 94.77'e yükseldiği ve pH 6.0'a kadar kademeli olarak azaldığı görülmektedir. Aktivite verimi pH 4.0'da % 98.31 iken pH 4.5'e çıkarıldığında % 141.85 olduğu görülmektedir. Daha yüksek pH değerlerinde ise aktivite veriminin kademeli olarak azaldığı görülmektedir. Genellikle immobilizasyon ve aktivite verimi enzimin optimum pH'sında daha yüksek çıkar. Dolayısıyla

Tablo 4.1 sonuçlarımızın literatürdeki genel bilgiyle uyuşmakta olduğunu göstermektedir (Mansour ve ark., 2003).

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

İmmobilizasyon Tamponu pH'ı	İmmobilizasyon Verimi*(%)	Aktivite Verimi**(%)
4.0	29.45 ± 0.02	98.31 ± 0.02
4.5	94.77 ± 0.04	141.85 ± 0.04
5.0	84.92 ± 0.03	84.92 ± 0.02
5.5	71.04 ± 0.04	51.69 ± 0.02
6.0	55.11 ± 0.05	35.38 ± 0.05

*İmmobilizasyon, pH'sı 4.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200'er µL SCI çözeltileri ve 25'er 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 4.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200 µL serbest ve 235 mg immobilize SCI'lerin 5 mL % (w/v) 1'lik sükroz 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.

4.3.2. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi

Tablo 4.2'ye göre, immobilizasyon derişimi ile immobilizasyon veriminin doğru orantılı olarak arttığı görülmektedir. 25 mM'lık tampon derişiminde % 94.77 immobilizasyon verim alınırken 100 mM'lık tampon derişiminde % 100 immobilizasyon verimine ulaşılmıştır. Bunun nedeni Martiks miktarı arttıkça Martiks enzim bağlama kapasitesinin artmasıdır.Aktivite verimi, yani birim kütledeki immobilize enzimden elde edilen en yüksek aktivite ise tampon derişimi ile ters orantılı olarak değişmektedir. 25 mM'da % 141.85 olan aktivite verimi 100 mM'da % 89.54'e düşmüştür. Bunun nedeni, tampon çözeltiler zayıf asit ve tuzdan oluştuğu için tuz derişimi arttıkça enzimin içerisindeki iyonik bağların koparak enzimin üç boyutlu yapısını değiştirmesi ve bu durumun da aktivite kaybına neden olmasıdır (Smalla ve ark., 1988). 25 mM'da enzimin tamamı immobilize

olmamasına rağmen aktivite verimi en yüksek olduğundan optimum tampon derişiminin 25 mM olduğu görülmektedir.

Tablo 4.2. Immobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi

Tampon Derişimi (mM)	İmmobilizasyon Verimi*(%)	Aktivite Verimi**(%)
25	94.77 ± 0.04	141.85 ± 0.04
50	96.45 ± 0.03	105.85 ± 0.01
75	98.39 ± 0.01	99.38 ± 0.04
100	100.00 ± 0.04	89.54 ± 0.02

*İmmobilizasyon, 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200'er µL SCI çözeltileri ile 25'er mg c-MWCNT"lerin, farklı derişimdeki 5 mL fosfat tamponları (pH 4.5) içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakikasüreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi

**Aktiviteler, 200 µL serbest ve 235 mg immobilize SCI'lerin 5 mL % (w/v) 1'lik sükroz 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.

4.3.3. Martiks miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

c-MWCNT miktarının immobilizasyon verimi üzerindeki etkisi Tablo 4.3'te gösterilmiştir. 25 mg c-MWCNT kullanıldığında % 94.77 olan immobilizasyon verimi 50 mg'a çıkarıldığında %100 olmuştur ve artan miktarlarda da değişmeden %100 verim alındığı görülmüştür. Bu durum kullanılan enzimin tamamının immobilize olduğunun kanıtıdır. Aktivite verimine bakıldığında 25 mg c-MWCNT kullanıldığında %141.85 olan verimin, 50 mg c-MWCNT kullanıldığında % 177.69'a yükseldiği fakat artan miktarda c-MWCNT kullanıldığında ise aktivite veriminin düştüğü görülmektedir. Bu durum c-MWCNT miktarının artmasıyla enzimin martiks üzerindeki fonksiyonel karboksil gruplarına daha sıkı bağlandığı ve dolayısıyla enzimin üç boyutlu yapısını değiştirmesi ve aktivitesini düşürmesi ile açıklanabilir.İmmobilizasyon etkinliğine etki eden koşulların optimizasyonu sonucunda % 100 immobilizasyon ve % 177.69 aktivite verimi elde dildi. SCI'nın immobilizasyonu ile ilgili literatürde yer alan çalışmalar arasında elde edilen en yüksek aktivite verimi, Mansour ve Dawoud (2003)'un, SCI'yı celite üzerine immobilizasyonunda elde ettikleri % 92'lik verimdir. Diğer çalışmalarda elde edilen aktivite verimleri ise daha düşüktür. Dolayısıyla, bu

tez çalışmasında elde ettiğimiz % 177.69 aktivite verimi bugüne kadar elde edilen en iyi sonuçtur.

4.4. Serbest ve İmmobilize SCI'nın Karakterizasyonu

4.4.1. Optimum pH

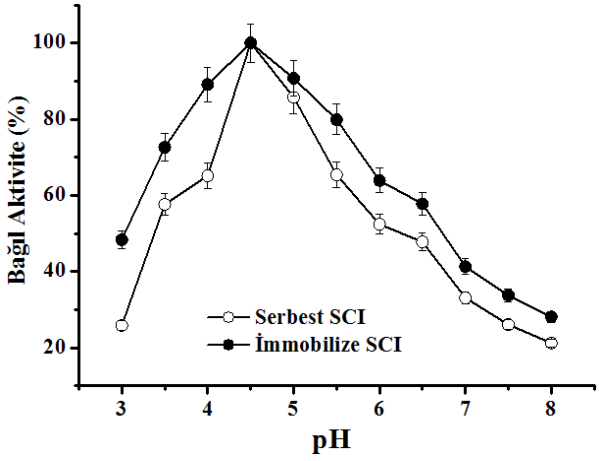
Şekil 4.3'e göre SCI'nın optimum pH'ı immobilizasyondan etkilenmemiştir. Elde edilen bu sonucun, SCI'nın immobilizasyonu ile ilgili literatürde yer alan bazı çalışmalardaki bulgularla kısmen örtüştüğü görülmektedir. Tanrıseven ve ark., (2013), poliakrilamid kriyogel içerisine immobilize ettikleri SCI'nın optimum pH'sının serbest halde 4.5 iken immobilize hale getirildiğinde 5.0 olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşın Hertz ve ark. (2013) ise kitosan nanopartikülleri üzerine immobilize ettikleri SCI'nın serbest ve immobilize haldeki optimum pH'nın değişmediğini belirtmişlerdir. Ayrıca şekil 4.3'te dikkat çeken bir diğer sonuç ise SCI'nın denenen bütün pH aralığında suda çözünmüş SCI'dan daha yüksek aktivite gösterdiğidir.

Tablo 4.3. c-MWCNT miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

c-MWCNT (mg)	İmmobilizasyon Verimi*(%)	Aktivite Verimi**(%)
25	94.77 ± 0.04	141.85 ± 0.04
50	100.00 ± 0.03	177.69 ± 0.03
75	100.00 ± 0.01	161.38 ± 0.04
100	100.00 ± 0.02	105.23 ± 0.01

*İmmobilizasyon, 200 uL SCI'ler ile farklı miktardaki c-MWCNT'lerin, 5 mL 0.250 M'lık sodyum fosfat tamponları (pH 4.5) içinde bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi.

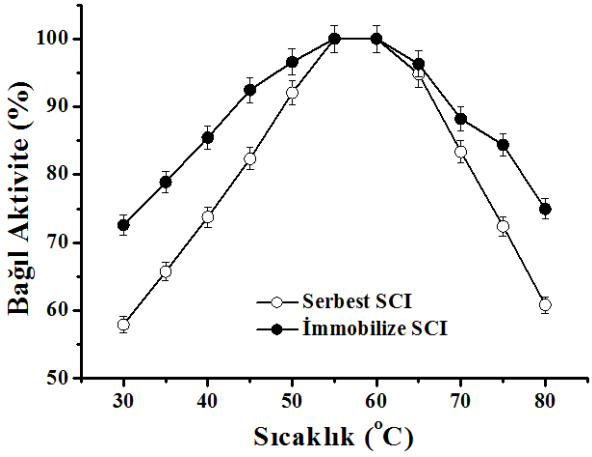
**Aktiviteler, pH'sı 4.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200 µL serbest ve 235 mg immobilize SCI'lerin 5 mL % (w/v) 1'lik sükroz çözeltileri (pH 4.5) ile bir inkübatörde 55 °C'de 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.



Şekil 4.1. SCI'nın aktivitesine pH'nın etkisi

4.4.2. Optimum sıcaklık

Şekil 4.2'de optimum sıcaklığın (55 ˚C) immobilizasyondan etkilenmediği görülmektedir. Arıca ve ark. (2003), 2-hidroksietilden oluşan reaktif bir filme invertazın kovalent immobilizasyonu sonucunda immobilize edilmiş invertazın optimum sıcaklığının 5 ˚C arttığını belirtirtmişlerdir. Bir başka çalışmada Mahmoud (2007), ahşap talaş atıklarını kullanarak adsorpsiyon yöntemiyle immobilize ettiği invertazın optimum sıcaklığını (60 ˚C) koruduğunu belirtmiştir. Şekil 4.2'ye göre ayrıca immobilize enzimin denenen bütün sıcaklık aralığında serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir. Literatürde, immobilizasyonun enzimin ısıl kararlılığını arttırdığından dolayı yüksek sıcaklıklarda immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre yüksek aktivite gösterdiği bilgisi de grafikteki sonucu pekiştirmektedir (Mansour ve ark., 2003).

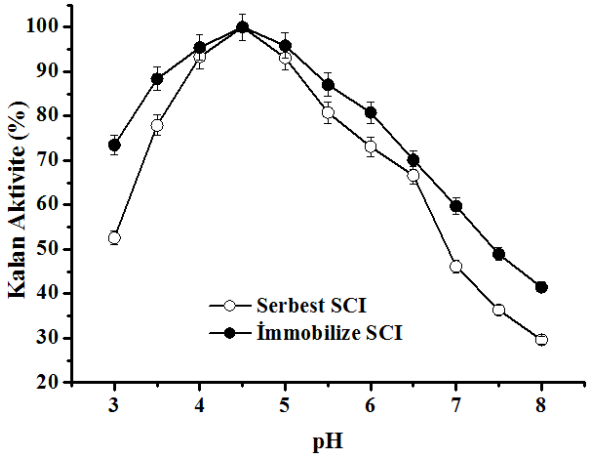


Şekil 4.2. SCI'nın aktivitesine sıcaklığın etkisi

4.4.3. pH kararlılığı

Şekil 4.3'te, incelenen tüm pH değerlerinde (3.0-8.0) immobilize enzimin serbest enzimden daha kararlı olduğu ve optimum pH'da (4.5) en yüksek kararlılığa sahip olduğu görülmektedir. Mansour ve Dawoud (2003), celite ve poliakrilamid üzerine adsorpsiyon yöntemiyle SCI enzimini immobilize ettikleri çalışmalarında, serbest enzimin 4.0 ila 5.5 pH değerinde kararlılık gösterirken, immobilize enzimin ise 4.0 ile 6.5 pH değerleri arasında kararlılık gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Bir başka çalışmada, kalsiyum alginat jel kapsüller içerisine immobilize edilen SCI'nin pH kararlılığı, elde ettiğimiz sonuca paralel olarak bulunmuştur. Tanrıseven ve ark (2001), serbest ve immobilize enzimin optimum pH'da (4.5) en yüksek kararlılığa ulaştığını, incelenen tüm pH değerlerinde immobilize enzimin serbest enzimden daha kararlı olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca şekil 4.5'te serbest ve immobilize

enzimin asidik pH'larda alkalin pH'lara oranla daha yüksek kararlılığa sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.3. SCI'nın kararlılığına pH'nın etkisi

4.4.4. Isıl kararlılığı

Şekil 4.4 sıcaklığın serbest ve immobilize SCI'nn kararlılığına etkisini göstermektedir. Şekilde, 60 ˚C'nin üzerindeki sıcaklıklarda immobilize enzimin serbest enzime göre daha kararlı yapıda olduğu görülmektedir. 80 ˚C'de serbest enzim aktivitesinin % 65'ini kaybetmişken immobilize enzim aktivitesinin % 60'dan fazlasını korumakta olduğu görülmektedir.

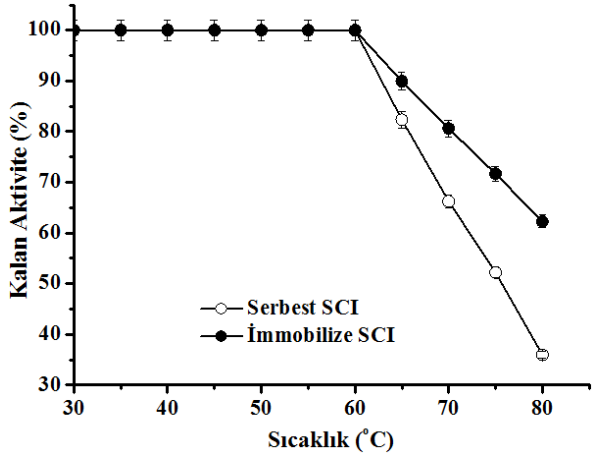
4.4.5. Kinetik sabitler

Serbest ve immobilize enzimin Michaelis-Menten (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) sabitleri Lineweaver-Burk Grafiği (Şekil 4.5) kullanılarak hesaplandı. İmmobilizasyon, K_m sabitinin değerini 215.5 mM'dan 140.9 mM'a düşürürken, V_{max} değerini 0.0339 µmol/mg.dk'dan 0.0481 µmol/mg.dk'ya yükseltmiştir. K_m değeri, bir enzimin substrata olan ilgisini göstermektedir. K_m küçüldükçe enzimin substratına olan ilgisi artar. İmmobilize SCI'nin K_m değerinin serbest enziminkinden küçük, V_{max} değerinin ise büyük olması, immobilize enzimin serbest enzimden % 77.69 daha yüksek aktiviteye sahip olması ile birbirini desteklemektedir. Benzer sonuçlara literatürde de rastlanmaktadır. Tanrıseven ve ark. (2008), invert şeker üretmek için SCI enzimini poli (3-metiltienil

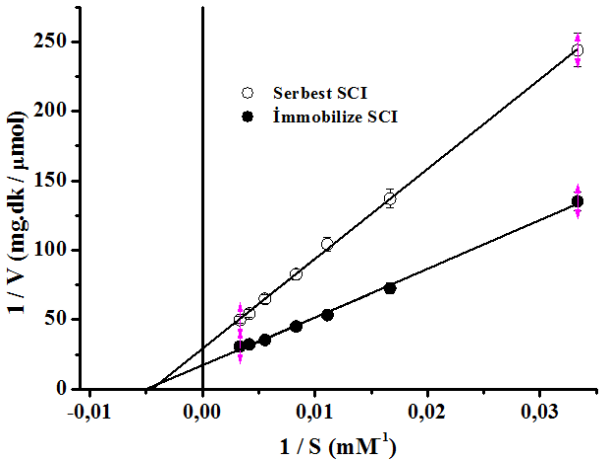
metakrilat)/poli (3-tiofenasetik) Martiksine kovalent olarak immobilize ettikleri çalışmada da immobilizasyon enzimin K_m değerini azaltmıştır.

4.5. İmmobilize SCI'nın Kullanım Kararlılığı

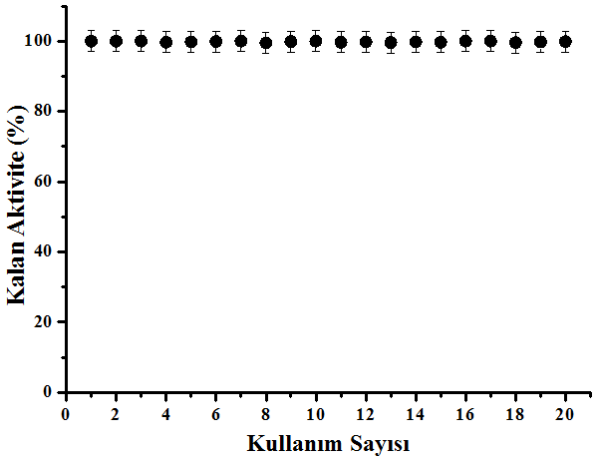
Şekil 4.6'da, immobilize enzimin optimum koşullarda peş peşe tekrarlanan yirmi kullanım süresince aktivitesini kaybetmediği görülmektedir. Literatürde yer alan Mansour ve



Şekil 4.4. SCI'nın kararlılığına sıcaklığın etkisi



Şekil 4.5. Serbest ve immobilize SCI'nın Lineweaver-Burk grafiği

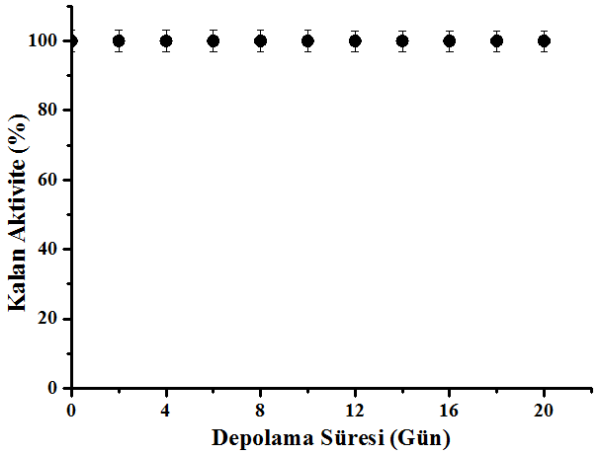


Şekil 4.6. İmmobilize SCI'nın kullanım kararlılığı

ark. (2003) da yaptıkları çalışmada poliakrilamid üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize ettikleri SCI enziminin 20 kez kullanımda hala aktivitesini yitirmediğini belirtmişlerdir.

4.6. İmmobilize SCI'nın Depolama Kararlılığı

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi, immobilize enzim optimum depolama koşullarında yirmi gün boyunca aktivitesini kaybetmediğinden, immobilize SCI'nın yüksek bir depolama kararlılığına sahip olduğu söylenebilir. İmmobilize enzimlerin endüstride teknolojik faydalarının değerlenmesinde en önemli parametrelerden biri depolama kararlılığıdır. Benzer sonuçlara literatürde de rastlanmaktadır (Boncel ve ark., 2016; Garlet ve ark., 2014). İmmobilizasyon sırasında enzimlerin veya proteinlerin denatürasyonunun gerçekleşmesine rağmen, CNT'ler enzimleri yüksek sıcaklıklarda ve organik çözücülerde konvansiyonel düz yüzeyli desteklerden daha fazla stabilize edebilirler (Asuri ve ark., 2006a; Asuri ve ark.,



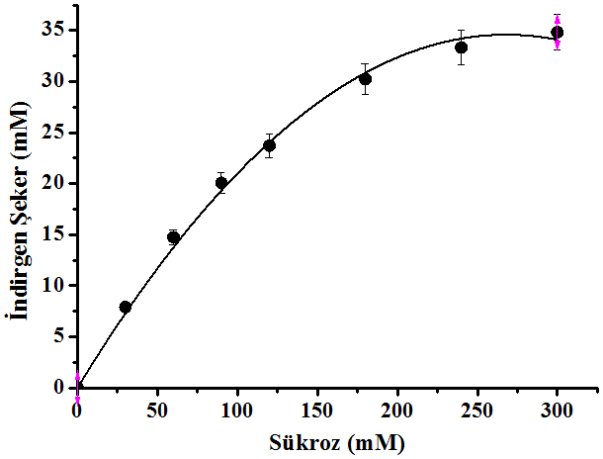
Şekil 4.7. İmmobilize SCI'nın depolama kararlılığı

2006b). CNT'lerin yüksek kıvrımlı yüzeylerinin sert koşullarda enzim denatürasyonu için elverişli olmadığı ve bitişik adsorbe edilmiş enzimler arasındaki yanal etkileşimleri bastırdığı varsayılmıştır. CNT'lerin artan kıvrımlı yüzeyleri, muhtemelen hareketsizleştirilmiş protein molekülleri arasındaki zararlı etkileşimlerin azalmasına katkıda bulunabilir, bu da CNT'lerde düz yüzeylerdekine kıyasla artan enzim stabilitesine yol açar.

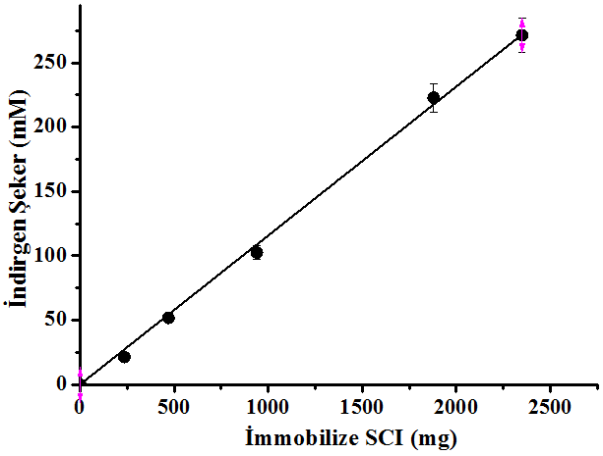
4.7. Sükrozdan İnvert Şeker Üretimi

Şekil 4.8'e göre sükroz derişimi arttıkça oluşan indirgen şeker derişimi de artmaktadır. En yüksek indirgen şeker üretimi 300 mM'da elde edildiğinden bir sonraki aşamada sükroz derişimi 300 mM olarak kullanılmıştır. Şekil 4.9'da ise, 300 mM'lık sükroz çözeltisinde immobilize SCI miktarı arttıkça üretilen indirgen şeker miktarının da doğrusal olarak arttığı görülmektedir. Oluşan sükroz derişimi, immobilize SCI miktarı ile 2350 mg'a kadar doğrusal olarak artarak sabitlendiğinden bir sonraki aşamada optimum immobilize SCI miktarı 2350 mg olarak kullanıldı. Şekil 4.10'da indirgen şeker üretimi üzerine hidroliz süresinin etkisi görülmektedir. 2350 mg immobilize enzim kullanarak 300 mM'lık sükroz ile reaksiyona koyarak 6 saat boyunca belirli aralıklarla indirgen şeker miktarı tayin edildi. Şekilde görüldüğü gibi, başlangıçta 300 mM olan sukroz derişimi, 4 saat sonra sıfıra inmiştir. Aynı süre içerisinde sükrozun tamamının indirgen şeker olan invert şekere (glukoz ve fruktoz) dönüştüğü görülmektedir. 1mol sükrozdan 1 mol glikoz ve 1 mol fruktoz oluştuğundan,

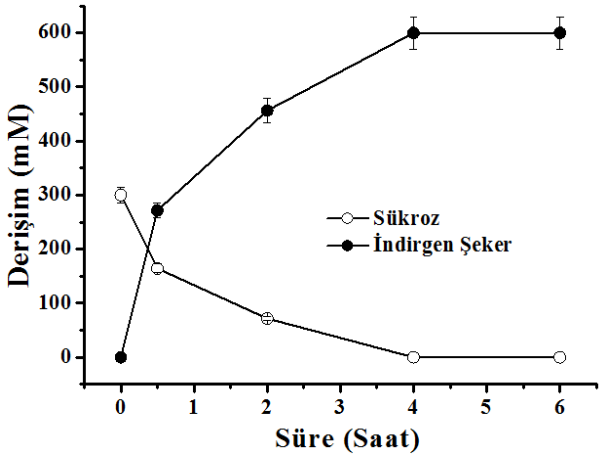
indirgen şekerin molaritesi sükrozun molaritesinin iki katı olacaktır. Dolayısıyla 300 mM sukrozdan 600 mM indirgen şeker elde edilmiştir. Yani 300 mM glukoz ve 300 mM fruktoz elde edilmiştir.



Şekil 4.8. İnvert şeker üretimine sükroz derişiminin etkisi



Şekil 4.9. İnvert şeker üretimine immobilize SCI miktarının etkisi



Şekil 4.10. İnvert şeker üretimine hidroliz sürenin etkisi

5. SONUÇLAR

SCI immobilizasyon koşullarını optimize ederek en yüksek immobilizasyon verimi (% 100) ve aktivite (% 177.69) verimi ile immobilize edilmiştir.İmmobilizasyon, enzimin optimum pH'ı (4.5) ve optimum sıcaklığı (55 °C) değiştirmemiştir.İmmobilizasyon, K_m sabitinin değerini 215.5 mM'dan 140.9 mM'a düşürürken, V_{max} değerini 0.0339 □mol / mg.dk'dan 0.0481 □mol / mg.dk 'ya yükseltmiştir.İmmobilize enzim, optimum koşullarda yirmi kez tekrarlanan kullanım süresince ve yirmi gün depolama süresince aktivitesini kaybetmemiş, yüksek bir kullanım ve depolama kararlılığı göstermiştir.Sükroz, 4 saat sonunda tamamen hidrolize olarak invert şekere dönüşmüştür.Sonuç olarak, bu çalışmada üretilen immobilize SCI'nin nişasta endüstrisinde kullanılabileceği söylenebilir.

TEŞEKKÜRLER

Yazarlar, 2018-SİÜFEB-076 nolu proje ile destekleyen Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkürü borç bilirler..

6. KAYNAKLAR

Akgöl, S., Kaçar, Y., Denizli, A., Arıca, M.Y.(2001). Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. *Food Chemistry*, 74, 281–288.

Asuri, P., Karajanagi, S.S., Yang, H., Yim, T.J., Kane, R.S., Dordick, J.S.(2006a). Increasing protein stability through control of the nanoscale environment, *Langmuir*, 22 (13), 5833‑5836.

Asuri, P., Karajanagi, S.S., Yang, H., Yim, T.J., Kane, R.S., Dordick, J.S.(2006b). Water-soluble carbon nanotube-enzyme conjugates as functional biocatalytic formulations, *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 804–11.

Aslan, Y.(2005). Pectinex Ultra SP-L'nin İmmobilizasyonu ve Prebiyotik Üretiminde Kullanımı, Doktora Tezi, *Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü*, Gebze, 3-8.

Aslan, Y., and Ömerosmanoğlu, D.(2018). Covalent immobilization of an alkaline protease from Bacillus licheniformis. *Turkish Journal of Biochemistry,* 43 (6), 595-604.

Azevedo, R.A.M.(2014). Immobilization of peroxidase on functionalized carbon nanotubes for synthesis of biocatalysts with high performance, M.Sc. Dissertation, *Porto University, Faculty of Engineering*, 1-123.

Bayramoğlu, G., Akgöl, S., Bulut, A., Denizli, A., Arıca, M.Y.(2003). Covalent immobilisation of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethy methacrylate and glycidyl methacrylate:properties and application in a continuous flow system, *Biochemical Engineering Journal*, 14, 117–126.

Birnbaum, S.(1993). Immobilisation of Macromolecules and Cells, In: Sleytr, U.B., Messner, P., Pum, D., Sara, M. (Eds.), Immobilized macromolecules: Application potentials, *Springer-Verlag London, New York*, 23-25.

Blandino, A., Macias, M., Cantero, D.(2000). Glucose oxidase release from calsium alginate gel capsules, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 319-24.

Boncel, S., and Herman, A. P.(2016). Nitrile N-Oxides in programmable one-pot functionalization of multi-wall carbon nanotubes via 1,3-dipolar cycloaddition, *RSC Advences*, 68, 64129-64132.

Chui, W.K., and Wan, L.S.C.(1997). Prolonged retention of cross-linked trypsin in calsium Alginate microspheres, *Journal of Microencapsulation*, 14(1), 51-61.

David, A. E., Wang, N. S., Yang, N. S., A.J. Yang, J.(2006). Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes, *Journal of Biotechnology*, 125, 395–407.

Doğan, Ş.(2000). İmmobilize İnvertaz Kullanarak İnvert Şeker Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, *Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü*, Gebze, 7-9.

Dutra, R. F., Mendes, R.K., Ferreira, D.C.M., Menezes, C.E.L., Soares, E.C.L., Cabral, D.G.A., Trindade, E.K.G., Rodriguez, B.A.K.(2015). *Nanomaterials for Advancing the Health Immunosensor*. In: Biosensors - Micro and Nanoscale Applications, edited by T. Rinken. London, IntechOpen, 347-373.

Feng, W., Ji, P.(2015). 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.

Griffin, E.G., and Nelson, M.J.(1916). Adsorption of invertase, *Journal of the American Chemical Society*, 38 (5), 1109–1115.

Hertz, F.P., Rodrigues, C.R., Klein, P.M., Alvas S.J., Valerio, G.S.(2013). High operational stability of invertase from Saccharomyces cerevisiae immobilized on chitosan nanoparticles, *Carbonhydrate Polymers*, 92, 462-468.

Hayashi, S., Sasao, S., Takasaki, Y., Mada, K.(1994). Long-term continous reaction of immobilized β-fructofuranosidase, *Biotechnology Letters*, 16(3), 227-8.

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 and Sustainable Energy*, 35(5), 1-9.

Kang, E.T., Chen, Y., Neoh, K.G., Tan, K.L.(2000). Covalent immobilization of invertase onto the surface-modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid, *European Polymer Journal*, 36, 2095-2103.

Katchalski-Katzir E., Kraemer D.M.(2000). Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10, 157–176.

Klibanov, A.M.(1979). Enzyme stabilization by immobilization, *Analylical Biochemistry*, 93, 1–25.

Mansour, H.E., and Dawoud, M.F.(2003). İmmobilization of invertase on celite and on polyacrylamide by an absorption procedure, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 446-450.

Mazi, H., Emregül, E., Rzaev, Z.M.O., Kibarer, G.(2006). Preparation and properties of invertase immobilized on a poly(maleic anhydride-hexen-1) membrane, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17 (7), 821-835.

Milovanovic, N., Bozic, Z.V.(2007). Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads, *Food Chemistry*, 104, 81–86.

O'Driscoll, K.F.(1976). Techniques of enzyme entrapment in gels. In: Methods in Enzymology, *Academic Press*, New York, XLIV, 169–183.

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(1), 279-285.

Rashad, M.M.N., Mohamed, U., Abdou, H.M.(2006). Purification and characterization of extra and intracellular beta-fructofuranosidase from Saccharomyces cerevisiae growing on Eichhornia crassipes leaf extract, *Advances in Food Sciences*, 33, 79–89.

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 bysoft dielectric barrier discharge plasma: Generate compatibleinterface for lipase immobilization, *Biochemical Engineering Journal*, 90, 16–26.

Shankar, V., and Kotwal, S.M.(2009). İmmmobilized invertase, *Biotechnology Advances*, 27, 311-322.

Smalla, K., Turkova, J., Coupek, J., Hermann, P.(1988). Influence of salts on the covalent immobilization of proteins to modified copolymers of 2-Hydroxyetyl methacrylate with ethylene dimethacrylate, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 10(1), 21-31.

Stamatis, H., Gournis, D., Enotiadis, A., Tsoufis, T., Pavlidis, V.(2010). Functionalized Multi Wall Carbon Nanotubes for Lipase Immobilization, *Advanced Biomaterials*, 12, 5.

Sugunan, J., and Sangay, G.(2006). Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10, *Food Chemistry*, 94, 573-579.

Tanrıseven, A., and Doğan, Ş.(2001). İmmobillization of invertase within calcium alginate gel capsules, *Process Biochemistry*, 36, 1081-1083.

Tanrıseven, A., Yılmaz, F., Günaydın, O., Dizge, N.(2001). immobilization of invertase onto poly (3-methylthienyl methacrylate)/poly (3-thiopheneacetic) matrix, *Biochemical Engineering Journal*, 40, 64-71.

Tanrıseven, A., Yılmaz, F., Sahin, M., Z., Ozmen, M., M., Olcer, Z.(2013). Highly efficient method towards in situ immobilization of invertase using Cryogelation, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171,2142-2152.

Tanrıseven, A., Dizge, N., Günaydın, O., Yılmaz, F.(2008). Immobilization of invertase onto poly(3-methylthienyl methacrylate)/poly(3-thiopheneacetic acid) matrix, *Biochemical Engineering Journal*, 40, 64-71.

Toppare, L., Alkan, S., Işık, S.(2003). Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices, *European Polymer Journal*, 39, 2375-2381.

Vitolo, M., Arruda, L. M. O.(1999). Characterization of İnvertase entrapped into calcium alginate beads, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 81, 23-33.

Wang, Q., Zhou, L., Jiang, Y., Gao, J.(2011). İmproved 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, PhD dissertation, *University of Budapest, Institute of Organic Chemistry and Technology*, Budapest, 3-4.

Yellampalli, S.(2011). Carbon Nanotubes-Polymer Nanocomposites, *InTech*, Croatia, 1-410.

Zniszczoł, A., Herman, A.P., Szymanska, K., Mrowiec-Białon, J., and Krzysztof, Z. Walczak, Andrzej J., Sławomir B.(2016). Covalently immobilized lipase on aminoalkyl-, carboxy- andhydroxy-multi-wall carbon nanotubes in the enantioselectivesynthesis of Solketal, *Enzyme and Microbial Technology*, 87-88, 61–69.

BÖLÜM 9

BÜTÜNCÜL YAKLAŞIM İLE HİPEREMEZİS GRAVİDARUM

Dr. Öğr. Üyesi Sidar GÜL

Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül KILIÇLI

[1]Siirt Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik ABD/Siirt. Türkiye. email:sidar.gul@siirt.edu.tr, ORCID 1: 0000-0002-5766-4129

[2]Muş Alparslan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Kadın Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği ABD/Muş. Türkiye.
email:aysegul_ay_9@hotmail.com, ORCID 2: 0000-0003-1105-9991

1.BÜTÜNCÜL YAKLAŞIM İLE HİPEREMEZİS GRAVİDARUM

Bulantı ve kusma tüm gebeliklerin yaklaşık %75'inde görülen yaygın bir semptomdur. Hiperemezis Gravidarum (HG) ise gebeliklerin %0.3-3'ünü etkileyen, 3 günden daha uzun süren aşırı bulantı kusma ile seyreden klinik bir tablodur. Sıklıkla hastaneye yatış gerektiren belirtileri bulunmaktadır. Bu belirtiler; dehidratasyon (deri turgorunda azalma, ağızda kuruluk), idrarda keton cisimciği, sıvı elektrolit dengesizliği, kilo kaybı (vücut ağırlığının %5'inden fazla) ve beslenme yetersizliği olarak sıralanabilir. İlerleyen evrelerde ise renal veya hepatik yetmezlik görülebilmektedir. HG maternal ve fetal açıdan olumsuz etkiler bırakmasının yanında; gebenin aile, iş ve sosyal yaşamını da etkilemektedir (Tahta ve Yılmaz, 2023). Psikolojik ve sosyal problemlere, iş gücü kaybına neden olup hastaneye tekrarlayan yatışlar ile sonuçlanmaktadır. Sağlık bakım maliyetlerine ek yük getiren bir durumdur (Öz ve ark., 2017). Bu bilgiler doğrultusunda; sağlık kurumlarının kadın doğum servislerinde sıklıkla karşılaşılan HG hastaları açısından risk faktörlerinin ve etiyolojide rol oynayan faktörlerin aydınlatılması, ayırıcı tanının yapılarak hastaneye yatışın değerlendirilmesi ve etkin tedavi ile bütüncül yaklaşım esastır. HG tedavisinde ilk basamak yaşam şeklinde ve diyette yapılan değişiklikler olmalıdır (Kanmaz ve Budak, 2018). Günümüzde tıbbi tedavinin yanında alternatif ve tamamlayıcı tıp yöntemlerinin (biyoenerji, hipnoz, akupresör, akupunktur vb.) kullanıldığı görülmektedir. Gebeyi uzun süre etkileyebilen bu klinik tabloda kişiyi en kısa sürede aile, iş ve sosyal yaşamına geri kazandırmak önemlidir (Havnen ve ark., 2019). Bu bölümde bulantı kusma ve HG'nin tanımı, etiyolojisi, belirtileri, tanı ve tedavi protokolleri ele alınmış ve bütüncül hemşirelik yaklaşımları güncel literatür verileri ışığında sunulmuştur.

1.1. HG Tanımı

HG, gebelikte bulantı ve kusmanın en şiddetli belirtisi olarak kabul edilmektedir. HG'nin semptomlarının yarattığı ciddiyete rağmen, durumun tanımı konusunda evrensel bir fikir birliği yoktur. Bu nedenle HG, tek tip kriterler olmaksızın klinik bir tanı olarak görülmektedir. HG'nin görülme sıklığı toplumdan topluma değişmekle birlikte, literatürde %0.3 ile 3 arasında değişmekte olduğu görülmektedir (Niemeijer ve ark., 2014). Görünüşte

nispeten düşük bir insidansı bulunmasına rağmen, HG gebeliğin erken dönemlerinde sağlık kurumlarına başvurularının en yaygın nedenidir. Semptomlar ilk trimestırda (4. ve 10. Haftalar arasında) görülmeye başlayıp 16. Haftaya kadar görülebilmektedir. Tipik olarak belirtiler son menstrual periyottan 5-6 hafta sonra başlayıp, 8. ve 12. Haftalar arasında zirveye ulaşır. Genellikle 16. Haftada semptomların şiddeti azalıp, nadiren gebeliğin ikinci trimestrına kadar sürebilmektedir (London ve ark., 2017). Uzun yıllar gebelik ve bulantı kusmanın ilişkisinin fonksiyonel olduğu düşünülmüşse de yapılan araştırmalar gebelikte bulantı kusma ve HG'in gebeliğe özgü fonksiyonel bir hastalık veya konversiyon bozukluğu olmadığını göstermiştir. Ayrıca psikolojik faktörlerin semptomları şiddetlendirdiği de yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Bustos ve ark., 2017).

1.2. HG Etiyolojisi Ve Risk Faktörleri

HG'nin etiyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır, ancak çok faktörlü ve karmaşık olduğu düşünülmektedir (Bustos ve ark., 2017). HG'nin nedeninin Human Chorionic Gonadotropin Hormon (hCG) veya estrojen düzeyindeki artmaya karşı vücudun aşırı reaksiyon vermesi olarak düşünülmektedir (Mamesah ve ark, 2020). İlk gebeliklerde ve hCG'nin normalden fazla salgılandığı durumlardan biri olan ikiz gebelik veya mole hydatidiform vakalarında ise HG durumlarına daha sık karşılaşılmaktadır. Sık gebeliklerde nüks oranı yüksek olup bu oran %15 ile %80 arasında değişmektedir (Kalamak ve ark., 2015; Simanjuntak ve Andrian, 2019). Ayrıca progesterone, estradiol, hipertiroidizm, üst gastrointestinal sistem dismotilitesi, immun sistem disfonksiyonu, beslenme problemleri veya psikolojik faktörler HG'nin etiyolojisinde yer alan faktörlerdir (Çelik ve ark., 2020).Son yıllarda yapılan çalışmalarda tiroid stimulasyonunun ve hCG'nin ortaya koyduğu tirotropik aktivitesinin HG ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Farshbaf-Khalili ve ark., 2023). Ayrıca literatür incelemesinde Helicobacter pylori'nin de HG etiyolojisinde etkili olabileceği görülmektedir. Nitekim gebelikte erken dönemde meydana gelen hormonal değişikliğin ekstravasküler ve intravasküler aralıktaki sıvıların yer değiştirmesine yol açtığı ve sonuçta oluşan mide pH değişikliğinin Helicobacter pylori enfeksiyonuna zemin hazırladığı görüşü bu durumu desteklemektedir (Li ve ark., 2015). Gastrointestinal sistemde özellikle de midede Helicobacter pylori varlığı gebelerde dispeptik şikâyetleri ortaya

çıkmasına neden olmaktadır. Gebelikte görülen bulantı kusma şikayetleri de subklinik bir Helicobacter pylori enfeksiyonunun belirgin hale gelmesine neden olabilmektedir (Cardaropoli ve ark., 2014).Etiyolojisinde enflamatuar süreçler önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda sağlıklı gebelere göre HG'si olan gebelerin enflamatuar belirteçlerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Enflamatuar belirteçleri beyaz küre sayısı (BK), nötrofil/lenfosit oranı (NLR), kırmızı küre dağılım genişliği (RDW), platelet/lenfosit oranı (PLR) ve C-reaktif protein (CRP) gibi parametreler oluşturmaktadır (Soyer ve ark., 2020). HG ile ilişkili birçok risk faktörü bildirilmiştir. Risk faktörleri arasında nulliparite, anne yaşının düşük olması, çoğul gebelik, fetal anomaliler, HG ile komplike olmuş önceki gebelik varlığı ve hem yüksek hem de düşük maternal kilo yer almaktadır. Önceki gebelikte kayıp öyküsü, HG ile komplike olmuş sonraki bir gebelik için risk faktörü teşkil edebilir (Bülbül ve ark., 2017). Ayrıca fetüsün cinsiyetinin kız olması da HG ile ilişkilendirilmiştir. HG ile komplike olan gebeliklerde fetüsün cinsiyetinin kız lehine değiştiği ve kız cinsiyet ile ilişkili maternal hormonal seviyelerin HG oluşumunda rol oynadığı iyi tespit edilmiştir (Gunay ve ark, 2020). HG etiyolojisinde yeme alışkanlıkları/bozukluklarının da yer alabildiği düşünülmektedir. Bu nedenle yeme bozukluğu tanısı almış kadınların gebeliklerinde HG için risk teşkil etmektedir (Erginbaş ve ark., 2015).HG literatürde değiştirilebilir birçok risk faktörü ile ilişkilendirilmektedir. Bunlar plansız gebelikler veya gebeliği istememe, aile ilişkilerinin olumsuz etkisi, anne olmaya ilişkin tereddütlü ve çelişkili düşüncelerin varlığı, bebeğin cinsiyetinin yarattığı memnuniyetsizlik, yaşam tarzı değişiklikleri ve sosyal destek yetersizliği HG'nin ortaya çıkmasında rol oynayabilir (Cakaloz Damla ve Ayden, 2020; Gadun ve ark., 2022). Gebelikte var olan anksiyete veya depresyon HG'yi daha belirgin hale getirebilmektedir. Ayrıca anksiyete veya depresyon şiddetinin artması, HG'yi hem neden hem de sonuç açısından olumsuz etkilemektedir (Bulanık ve Şimşek, 2016).

1.3. HG Belirtileri

Hamilelik sırasında zaman zaman görülen bulantı ve kusma "sabah bulantısı" olarak adlandırılır. Halk arasında 'sabah bulantısı' olarak bilinmesine rağmen, kadınların ortalama %2'sinden daha azı sadece sabahları bulantı yaşamakta ve ortalama %80'inin gün boyunca bulantısı olmaktadır. Ancak bulantı ve kusmanın en şiddetli derecesi gebelik sırasında sıklıkla HG'ye yol

açar (Bustos ve ark, 2017). Şiddetli bulantı ve kusmanın yanında annede kilo kaybı (%5'ten fazla), dehidratasyon, asit baz dengesinde bozulma, elektrolit dengesizlikleri, ketonüri, hemokonsatrasyon, malnutrisyon ve kaslarda güçsüzlük ortaya çıkabilmektedir. Serum sodyum ve klor düzeyinde azalma sonrası hiokloremik metabolik alkaloz gelişebilir. Gebelerin %50'sinde karaciğer fonksiyon testlerinde yükselme görülür. HG tanılı gebelerde gıda alımı tam olarak tolere edilemediği için beslenme bozukluğu görülebilir (Fiaschi ve ark., 2018; Kanmaz ve Budak, 2018).HG ile başvuran kadınlar sadece fiziksel olarak değil psikolojik olarak da zorluk yaşamaktadır ve bu durum birçok çalışmada ortaya konulmuştur. HG'li gebelerin çoğunluğunda tekrarlayan hastane yatışları nedeniyle iş gücü kaybı ve sosyoekonomik olumsuzlar (örneğin iş kaybı veya geçim zorluğu) ortaya çıkabilmektedir. Gelecekteki gebeliklere ilişkin kaygı dâhil olmak üzere davranış bozuklukları ve depresyon gibi psikiyatrik sekellerden oluşan olumsuz psikososyal değişiklikler görülebilmektedir. Erken gebelik döneminde yaşanan aşırı bulantı ve kusma gebelerde ambivalan duyguların yaşanmasına neden olmaktadır. Bu durum anne-bebek bağlanmasını olumsuz etkilemektedir (Cakaloz Damla ve Ayden, 2020; Gadun ve ark., 2022). HG'nin tedavi edilmemesi veya tedavisinin yetersiz kalması maternal ve fetal ciddi etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Ketonüriye bağlı fetüste intrauterin gelişme geriliği, düşük doğum ağırlığı, fetal anomali ve prematürite oranı artmaktadır. Özellikle uzamış HG tablosunda gebede B1 vitamini (tiamin) eksikliğine bağlı konfüzyon, ataksi ve oküler bozukluk tablosu olan Wernicke ensefelopatisi görülebilmektedir (Kanmaz ve Budak, 2018).

1.4. HG'DE Tanı

Bulantı kusma ile sağlık kuruluşuna başvuran gebelerin gebelik yaşı, şimdiki ve önceki obstetrik öyküsü (ikiz gebelik, mol hidatiform, fetüste kromozomal anomali), hipertiroidi, helikobakter pilori, psikiyatrik ve genetik faktörlerin ayrıntılı araştırılması gereklidir (Büyükkurt ve ark., 2008). Gebelikte kusma gastroenterit, apandisit, bağırsak tıkanıklığı, akut kolesistit, pankreatit, pnömoni, akut piyelonefrit, idrar yolu enfeksiyonu ve tirotoksikoz gibi nedenlerden dolayı ortaya çıkabilir. Bu nedenle herhangi bir tedavi uygulamadan önce ayırıcı tanı için diğer bulantı ve kusma nedenlerinin dışlanması önemlidir (Kamalak ve ark., 2015). Ayırıcı tanı için tiroid fonksiyon

testleri, elektrolitler, hematokrit, hepatik viral belirteçler, transaminazlar, bilirubin ve idrar testleri gibi laboratuvar incelemeleri yapılmalıdır. Keton kontrolü ile hastalık şiddetinin değerlendirilmesi esastır, çünkü hastalığın şiddeti tedavi yönetimini değiştirebilecektir. Ayrıca çoğul gebelik, abortus, trofoblastik bozukluklar ve diğer neoplazileri dışlamak için ultrasonografi yapılmalıdır (Bülbül ve ark., 2017; Simanjuntak ve Andrian, 2019).Hastalığın şiddetini belirlemek ve belli bir standart oluşturmak için PUQE (Pregnancy-Unique Quantification of Emesis and Nausea = bulantı ve kusmanın gebeliğe özgü ölçümü) skorlama sistemi geliştirilmiştir. PUQE skoruna göre bulantının ve kusmanın olduğu saatler, bulantının ve kusmanın sayısı ve istem dışı öğürme sayısı değerlendirilmekte ve gebeye puan verilmektedir. Buna göre gebenin aldığı toplam puan ≤ 6 ise Hafif HG; 7-12 arasında ise orta HG; ve ≥ 13 ise ağır HG olarak değerlendirilir. Yüksek puanlar dehidratasyon ve elektrolit bozukluğu açısından ileri değerlendirmeyi gerektirdiğine işaret etmektedir (Bülbül ve ark., 2017, Yılmaz ve ark., 2022).HG'in tanı ve yönetiminde laboratuvar bulguları önemlidir. Serumda kan üre nitrojeni (BUN), kreatinin ve hematokrit değerlerinde yükselme, idrarda ketonüri, serumda sıvı-elektrolit dengesizliği (hiponatremi ve hipokalemi), dehidratasyona bağlı hipokloremik metabolik alkaloz ve metabolik asidoz, bulantı kusma nedeniyle proteinden fakir beslenenlerde besin alımında azalma sonucu hipoalbüminemi görülebilir. Vitamin ve mineral eksikliğine bağlı B1 (tiamin), demir, kalsiyum ve folat eksikliği meydana gelebilir (Kinomoto-Kondo ve ark., 2017; Austin ve ark., 2019).HG nedeniyle hastaneye yatırılanların %50'sinde karaciğer fonksiyon testleri (AST-ALT) değerlerinde yükselme, HG tanılı gebelerin %10-15'inde amilaz ve lipaz seviyesinde yükselme, hiperbilirubinemi, izole ya da alkalen fosfataz yüksekliği, TSH seviyesinde düşme görülebilir. Hipovolemi, malnutrisyon ve laktik asidoz gibi faktörler de karaciğer enzimlerinde artışa neden olmaktadır, bu durum HEG'i şiddetlendirmektedir (Kinomoto-Kondo ve ark., 2017; Malek ve ark., 2017).Literatürde HG tanı kriterleri ile ilgili tam bir fikir birliği bulunmamakla birlikte bulantı kusma ile hastaneye başvuran gebelerde %5 kilo kaybı, ketonüri ve gestasyonel haftanın HEG ile uyumlu olması tanıyı doğrulamaktadır. Ayrıca farklı uluslararası klavuzlara göre HEG tanı kriterleri farklı semptom ve parametreleri kapsamaktadır (Koot ve ark., 2018).

1.4.1. Klavuzlara göre HG tanı kriterleri;

- RCOG (Royal Collage of Obstetricians and Gynaecologists) Green Top Klavuzuna göre uzun süren bulantı ve/veya kusma, 1. Tremesterde görülen ve başka bir nedene bağlanamayan bulantı kusma, %5 kilo kaybı, elektrolit imbalansı, dehidratasyon (RCOG, 2016).
- ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists) Practice Klavuzuna göre gebelikte persistan kusma, ketonüri, %5 kilo kaybı, elektrolit imbalansı, tiroid ve karaciğer anormallikleri (ACOG, 2015, 2018)
- SOGC (Society of Obstetricians and Gynecologists of Canada) Clinical Practice Klavuzuna göre gebelikte persistan kusma, %5 kilo kaybı, elektrolit imbalansı ve ketonüri (SOGC, 2016)

Windsor tanımlamasına göre ise kilo kaybı olsun ya da olmasın 16. gebelik haftasından önce ortaya çıkan, ilerleyici bulantı kusma, besin alımının azalması ve bu durumun rutin günlük işleyişi bozması HEG tanısı için yeterlidir (Jansen ve ark., 2021).

HG tanısı koymak kadar gebelikte bulantı kusmaya neden olabilecek diğer patolojilerle ayırıcı tanısını yapmak da oldukça önemlidir. Bu patolojiler gastrointestinal sistem patolojileri (gastroenterit, aklazya, gastroparezi, hepatit, intestinal obstrüksiyon, peptik ülser, helicobakter pilori, pankreatit, apandisit), metabolik ya da endokrin durumlar (diyabetik ketoasidoz, porfiria, addison hastalığı, hipertiroidizm, hipotiroidizm), genitoüriner patolojiler (piyelonefrit, üremi, ovaryen torsiyon, böbrek taşları), nörolojik patolojiler (pseudotümör serebri, vestibüler lezyonlar, miğren, tümörler), gebelikle ilgili durumlar (akut yağlı karaciğer, preeklampsi), ilaca bağlı bulantı kusma, psikiyatrik nedenler, enfeksiyonlar ve molar gebelik gibi durumları kapsar (ACOG, 2018; Koot ve ark., 2018).

1.5. HG Tedavisi

HG'in tedavisinde semptomları azaltmak veya ortadan kaldırmak, anne ve fetüs üzerindeki olumsuz etkileri azaltmak amacıyla farmakolojik ve nonfarmakolojik tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (ACOG, 2018).

1.5.1. HG Tedavisinde Kullanılan Farmakolojik Yöntemler

HG semptomlarının azaltılmasında farmakolojik olarak NICE (National Institute for Health and Care Excellence) tarafından antihistaminik kullanımı önerilmektedir (NICE, 2019). ACOG tarafından ise rejim değişikliğine rağmen devam eden bulantı ve kusmalarda ilk olarak antiemetik tedavi daha sonra antihistaminik ve steroidlerin kullanıması; oral sıvı replasmanının sürdürülemediği ve eşlik eden dehidratasyon durumlarında gebenin hastaneye yatışı yapılarak intravenöz hidrasyon tedavisinin başlanılması önerilmektedir (ACOG, 2018).HG tedavisinde antiemetik ve antihistaminikler gebeliğin ilk trimesterinde sıklıkla kullanılan ilaçlardır (Maltepe ve Koren, 2013). ACOG tarafından steroidlerin kusma merkezini baskılaması sonucu HEG'li gebelerde kullanılabileceği önerilmektedir (ACOG, 2018; Boeling ve ark., 2018). HG dehidratasyon, ketozis ve sıvı-elektrolit dengesizliğine neden olduğundan oral beslenme problemi olanlarda intravenöz hidrasyon sağlanmakta, asit-baz dengesi hiponatremi-hipokalemi gibi elektrolit seviyelerinin yakından izlenmesi önerilmektedir (RCOG, 2016; ACOG, 2018). Farmakolojik tedaviye rağmen bulantı ve kusmanın devam ettiği durumlarda enteral veya parenteral tedavi tercih edilmeli, gebenin beslenme durumu, günlük alması gereken kalori miktarı, günlük kilo takibi, aldığı çıkardığı sıvı miktarı, bulantı kusma durumu, fetal büyüme ve gelişme düzeyi değerlendirilerek tedavi planlaması yapılması, ayrıca ayrıntılı anamnez, fizik muayene, kan basıncı, laboratuvar bulguları ve bilinç durumu değerlendirilmelidir (Stokke ve ark., 2015; ACOG, 2018). Farmakolojik tedaviler içerisinde piridoksin (B6 vitamini), piridoksin ve doksilamin bileşeni, antihistaminikler (difenhidramin, meklizi, dimenhidrinat), dopamin antagonistleri (prometazin, prokloperazin, metoklopramid), seratonin antagonistleri (ondansetron, granisetron), kortikosteroidler (metilprednizolon), nütrisyon ve replasman tedavileri (kalsiyumi demir, folat, vitamin D, thiamin, Niacin, riboflavin) yer alır (London ve ark., 2017; ACOG, 2018; Potts ve ark., 2020).

1.5.2. HG Tedavisinde Kullanılan Nonfarmakolojik Yöntemler

Gebelikte kullanılan bazı tıbbi tedavi yöntemlerinin anne ve fetüs üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle nonfarmakolojik yöntemlere sıklıkla başvurulmaktadır (WHO, 2013; Matthews ve ark., 2015; ACOG, 2018). Nonfarmakolojik yöntemlerin çoğunluğunu Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp

(TAT) yöntemleri oluşturmaktadır. Alternatif tedaviler hastalığa özgü geleneksel tedavinin yerine kullanılan, bilimselliği henüz kanıtlanmamış uygulamalardan oluşurken, tamamlayıcı tedaviler mevcut tıbbi tedavinin etkisini azaltmayan, tıbbi tedaviye ek kullanılan yöntemlerdir (NCCIH, 2021). Dünyada ve ülkemizde kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (WHO, 2013; Getat Yönetmeliği, 2014). ACOG tarafından döllenme sonrası multivitamin-folikasit kullanımı, diyet değişikliği, zencefil, akupunktur bilekliği kullanımı gibi uygulamaların bulantı kusmayı önlemek amacıyla kullanılabileceği önerilmektedir (ACOG 2018). Ayrıca National Institutes for Health (NIH) tarafından National Center for Complementary and Alternative Medicine (NCCAM)'nin kurulmasıyla farklı tamamlayıcı ve alternatif sağlık uygulamaları beş başlık altında gruplandırılmış ve bu uygulamaların gebelikte bulantı kusmayı önlemede kullanılabileceğine ilişkin kanıt temelli uygulama örneklerine yer verilmiştir. Bunlar biyolojik temelli, beden ve zihin temelli, vücut temelli, enerji temelli, alternatif tıp ve medikal sistem tedavilerinden oluşmaktadır (WHO, 2013; NCCIH, 2021).

Biyolojik Temelli Tedaviler

Tıbbi bitki çayları, vitamin, mineral ve probiyotikler "Biyolojik Temelli Tedaviler" olarak sınıflandırılmaktadır. Gebeliğin birinci trimesterinde HG belirtilerinin azaltılmasında beslenme şekli değişikliği ve diyet uygulamaları sık kullanılan yöntemlerdir (NCCIH, 2021). HG'in tedavisinde multivitamin kullanımı, yemeklerde küçük ve sık porsiyonların tercih edilmesi, asitli, yağlı veya baharatlı gıdalardan uzak durulması, hafif ve sindirimi kolay olan lifli besinler tüketilmesi, bol sıvı takviyesi, rahatsız edici koku ve ortamlardan uzaklaşılması, proteinden zengin gıdalar tüketilmesi, aşırı sıcak veya soğuk, asitli gıdalardan uzak durulması önerilmektedir (Bülbül ve ark., 2017; ACOG, 2018). ACOG ve NICE, zencefil veya zencefilden yapılmış şeker, çay gibi gıdaların tüketilmesini önermektedir (ACOG, 2018; NICE, 2019). Ayrıca gebeliğin erken haftalarında HEG semptomlarının azaltılması amacıyla pridoksin (B6) vitamini ile tiamin (B1) vitamini kullanımı önerilmektedir (Matthews ve ark., 2015; ACOG, 2018).

Zihin ve Beden Tedavileri

Vücut fonksiyonlarını etkileyen ve zihinsel kapasiteyi artırmak için kullanılan bu yöntemler müzik terapi, yoga, meditasyon, biyofeedback,

kiropraktik ve osteopatik manipülasyon, spiritual bakım ve hipnoterapi gibi uygulamalardır. Stres ve endişeyi azaltmaya temellendirilen bu uygulamalar bireyde fiziksel duruş ve solunum teknikleri ile mental rahatlama sağlamaktadır (NCCIH, 2021).

Vücut Temelli Tedaviler

En sık bilinen uygulamalar akupunktur, akupresör, refleksoloji, masaj, hidroterapi, gevşeme egzersizleri (progresif kas gevşeme egzersizi, nefes egzersizi vb.), tai-chi, pilatestir (NCCIH, 2021). Yapılan bir çalışmada HG'li gebelerde akupunktur ve akupressörün günlük bulantı ve kusma sayısını azalttığı bildirilmiştir (Matthews ve ark., 2015).

Enerji Tedavileri

Uygulayıcının uygulamayı yaptığı kişiye elleriyle şifa enerjisi vermesidir. Bu uygulamalar arasında reiki, refleksoloji, dokunma ve imgelem gibi uygulamalar yer alır (McCullough ve Huges, 2014; NCCIH, 2021).

Alternatif Tıp ve Medikal Sistem Tedavileri

Geleneksel çin tıbbı, ayurveda, natüropati, homeopati, aromaterapi gibi uygulamaları kapsar. Bu uygulamalar içerisinde en sıklıkla kullanılan yöntem aromaterapidir (NCCIH, 2021). Aromaterapi tedavisinde bazı bitkisel kökenli yağlar (ör nane veya limon yağı) kompres, soluma veya masaj yoluyla vücuda uygulanır (Bilgiç, 2017; NCCIH, 2021). Aromaterapinin strese bağlı yan etkileri azalttığı, kan basıncını düşürdüğü, dolayısıyla sakinleştirici etkisinin olduğu; uyku kalitesi, enfeksiyon ve ağrıyı azaltma, bulantıyı önlemede olumlu etkileri olduğu bildirilmektedir (Matthews ve ark., 2015; Frawley ve ark., 2016).

1.6. HG'DE Hemşirelik Bakımı

HG'in önlenmesinde öncelikli olarak bulantı kusmanın şekli, günlük süre, şiddet ve sıklığının belirlenmesi, semptomların azaltılması sağlanarak sorunlarla baş etme yollarının öğretilmesi hususunda destek ve danışmanlık verilmesi önemlidir. Tedavide öncelikli olarak nonfarmakolojik yöntemlerin kullanımı, diyet ve yaşam tarzında değişiklik, bulantı kusmayı tetikleyen faktörlerden uzak durmak yer alır. Ayrıca antenatal dönemdeki izlemlerde gebelere verilen eğitim içeriklerinde HG'nin belirtileri, etkileyen faktörler,

HG'nin tedavisi, anne ve fetüs üzerindeki komplikasyonlarına ilişkin gebeyi ve yakınlarını bilinçlendirici eğitimler, gebelerle yakın iletişim kurmasını kolaylaştırarak yakınmaların saptanması ve hafifletilmesinde önemli bir rol oynar (Wieland Ladewig ve ark., 2010; Mutlugüneş ve Mete, 2013). HG'nin hemşirelik bakımı hafif ve şiddetli HG'li vakalara göre farklılık gösterir. Hafif HG'li gebelerde hemşirelik bakımı daha sıklıkla dikkat edilmesi gereken noktalarda gebeyi ve yakınlarını bilgilendirmeyi içerirken şiddetli vakalarda hastanede yatarak tedavi altına alınmayı gerektirmektedir (Wieland Ladewig ve ark., 2010).Hafif HG'si olan gebelerin bilgilendirilmesi gereken konular şunlardır; az miktarda ve sık aralıklarla yemek yenmesi, öğün sayılarının artırılması ve yeme işleminin yavaş gerçekleştirilmesi, bulantı kusmanın olmadığı zamanlarda gereken besinleri almaya özen gösterilmesi, proteinden zengin besinlerin tercih edilmesi, varsa bulantı ilaçlarının yemek öncesi alınması, tatlı veya kızartma türü gıdalar ile kafeinli veya gazlı içeceklerden uzak durulması, ağız hijyenine önem verilme ve dişlerin düzenli fırçalanması, rahat kıyafetlerin giyilmesi, yemek yedikten sonra dinlenilmesi ve yaklaşık iki saat süresince sırt üstü uzanılmamasına dikkat edilmesi, bulantı oluşumuna neden olabilecek veya bulantı kusmayı şiddetlendirebilecek koku, görüntü veya seslerden kaçınılması, yemek veya gıda kokularının olduğu alanlardan uzak durulması veya ortamın havalandırılması gereklidir (Bülbül ve ark., 2017; Taşkın, 2021).Şiddetli HG'li gebeler hastane koşullarında yatarak tedavi ve hemşirelik bakımını gerektirmektedir. Aşırı bulantı-kusma nedeniyle sıvı-elektrolit dengesizliği, cilt ve mukoza bütünlüğünde bozulma, gebeliğe ilişkin psikolojik problemlerle baş etmede yetersizlik ve gebenin beslenmesindeki yetersizlik nedeniyle fetüste meydana gelen olumsuz etkiler değerlendirilmelidir (Taşkın, 2021). Ayrıca gebenin oral gıda alımı bulantı kusma kesilinceye kadar kısıtlanması, gebenin loş ışıklı, sessiz ve bulantı kusmayı uyarabilecek kokunun bulunmadığı bir odada yatışlı takip edilmesi, vital bulgularının sık takibi, IV hidrasyon sağlanması, IV solüsyonların dengeli sıvı elektrolit içeriğine sahip olması, istemlenen vitamin B6-B12 ile antiemetiklerin hastaya zamanında uygulanması, gebenin günlük bulantı kusma sayısı, şekli ve şiddeti, günlük kalori miktarı, kilo izlemi, laboratuvar tetkikleri izlemi, günlük aldığı-çıkardığı sıvı takibi, oral gıda alımına başlanıldığında küçük porsiyonlar şeklinde besin miktarının gebenin toleransına göre artırılması, yemek öncesi ve sonrası gebenin dinlendirilmesi, sıvıların yemek

aralarında alınması, gereğinde diyetisyen konsültasyonu sağlanması, ayrıca gebe ve yakınlarına gerekli bilgilendirmelerin yapılması gerekmektedir (Wieland Ladewig ve ark., 2010; Bülbül ve ark., 2017; Taşkın, 2021).

2.SONUÇ

HG gebeliğin ilk trimesterinde en sık ve tekrarlı hastane yatışlarına neden olup tedavi maliyetlerinin yanında maternal ve fetal açıdan morbidite veya mortalite ile sonuçlanabilmektedir. HG'de gebelik sonuçlarını tanımlamak ve ayrıca hastalık şiddetinin metabolik, biyokimyasal, hematolojik ve klinik göstergelerinin sonuç üzerindeki etkisini belirlemek önemlidir.

3.KAYNAKLAR

American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). (2018). ACOG practice bulletin no. 189: Nausea and vomiting of pregnancy, committee on obstetric practice. *Obstetrics and Gynecology*, 131(1), e15-e30.

American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). (2015). Practice bulletin no. 153: Nausea and vomiting of pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*, 126(3), e12-24.

Austin, K., Wilson, K., Saha, S. (2019). Hyperemesis Gravidarum. Nutrition in Clinical Practice: *Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 34(2), 226-241.

Bilgiç, Ş. (2017). Hemşirelikte holistik bir uygulama; aromaterapi. *Namık Kemal Tıp Dergisi*, 5(3), 134-141.

Boelig, R.C., Barton, S.J., Saccone, G., Kelly, A.J., Edwards, S.J., & Berghella, V. (2018). Interventions for treating hyperemesis gravidarum: a cochrane systematic review and meta-analysis. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 31(18), 2492-2505.

Bulanik, M., Şimşek, Y. (2016). Hiperemezis gravidarum etyolojisinde psikolojik komponent: Kritik bir derleme. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, *18*(3), 151-156.

Bustos, M., Venkataramanan, R., & Caritis, S. (2017). Nausea and vomiting of pregnancy-What's new?. *Autonomic Neuroscience*, *202*, 62-72.

Bülbül, M., Kaplanoğlu, M., Yıldırım, A.E., & Dilbaz, B. (2017). Hiperemezis gravidarum. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi,* 26(3), 269-296.

Büyükkurt, S., Demir, S.C., Özgünen, F.T., Evrüke, İ.C., Kadayıfcı, O., & Güzel, A.B. (2008). Gebelikte Bulantı - Kusma Yakınması Olan Hastanın Değerlendirilmesi ve Tedavi Seçenekleri. *Turkiye Klinikleri Gynecology Obstetrics*, 18, 106-116.

Cakaloz Damla, K., Ayden, C. (2020). Effect of hyperemesis gravidarum on pregnancy adaptation: A case-control study. *Int J Caring Sci*, *13(3)*, 1735.

Cardaropoli, S., Rolfo, A., Todros, T. (2014). Helicobacter pylori and pregnancy-related disorders. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *20(3)*, 654.

Çelik, S., Soyer, C., Güvey, H., Yaşar, B., Yazicioğlu, B., Türe, E., & Ulubaşoğlu, H. (2020). Hiperemezis gravidarumda önemli bir nokta: D vitamini ve tiroid fonksiyonlari. *Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*, *17(2)*, 331-334.

Erginbas Kender, E., Yuksel, G., Ger, C., & Ozer, U. (2015). Eating attitudes, depression and anxiety levels of patients with hyperemesis gravidarum hospitalized in an obstetrics and gynecology clinic. *The Journal of Psychiatry and Neurological Sciences*, *28(2)*, 119.

Farshbaf-Khalili, A., Salehi-Pourmehr, H., Najafipour, F., Alamdari, N. M., Pourzeinali, S., & Ainehchi, N. (2023). Is hyperemesis gravidarum associated with transient hyperthyroidism? A systematic review and meta-analysis. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, *62(2),* 205-225.

Fiaschi, L., Nelson-Piercy, C., Gibson, J., Szatkowski, L., & Tata, L.J. (2018). Adverse maternal and birth outcomes in women admitted to hospital for hyperemesis gravidarum: a population-based cohort study. *Paediatric and perinatal epidemiology*, *32(1),* 40-51.

Frawley, J., Sibbritt, D., Broom, A., Gallois, C., Steel, A., & Adams, J. (2016). Women's attitudes towards the use of complementary and alternative medicine products during pregnancy. *Journal Obstetrics Gynaecology,* 36(4), 462-467.

Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği, T.C. Resmi Gazete, sayı: 29158, 27 Ekim 2014. https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2014/10/20141027-3.htm Erişim Tarihi: 6 Temmuz 2023.

Gadung, L.B.R.B.L., Kendu, A.I., Jafaru, Y. (2022). Parity and psychology analysis with hyperemesis gravidarum incidence in first trimester pregnant women. *Open Access Health Scientific Journal*, *3(2),* 58-64.

Gunay, T., Turgut, A., Bilir, R.A., Hocaoglu, M., & Bor, E.D. (2020). Comparative analysis of maternal and fetal outcomes of pregnancies complicated and not complicated with hyperemesis gravidarum necessitating hospitalization. *Medeniyet Medical Journal*, *35(1),* 8.

Havnen, G.C., Truong, M.B.T., Do, M.L.H., Heitmann, K., Holst, L., & Nordeng, H. (2019). Women's perspectives on the management and consequences of hyperemesis gravidarum–a descriptive interview study. *Scandinavian journal of primary health care*, *37(1),* 30-40.

Jansen, L.A.W., Koot, M.H., van't Hooft, J., Dean, C.R., Bossuyt, P.M.M., Ganzevoort, W., Gauw, N., Van der Goes, B.Y., Rodenburg, J., Roseboom, T.J., Painter, R.C., Grooten, I.J. (2021). The windsor definition for hyperemesis gravidarum: A multistakeholder international consensus definition. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology,* 266, 15-22.

Kamalak, Z., & Gözükara, İ., Kucur, S.K. (2015). Is it a disease or a symptom? Hyperemesis gravidarum. *European Journal of General Medicine*, *12(3),* 273-276.

Kanmaz, A.G., & Budak, A. (2018). Hiperemesis gravidarumun doğum ve neonatal sonuçlar üzerine etkisi. *Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi*, *28(3),* 151-154.

Kinomoto-Kondo, S., Umehara, N., Sato, S., Ogawa, K., Fujiwara, T., Arata, N., Sago, H. (2017). The effects of gestational transient thyrotoxicosis on the perinatal

outcomes: a case-control study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 295(1), 87-93.

Koot, M.H., Boelig, R.C., van‘t Hooft, J., Limpens, J., Roseboom, T.J, Painter, R.C., & Grooten, I.J. (2018). Variation in hyperemesis gravidarum definition and outcome reporting in randomised clinical trials: A systematic review. BJOG: *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology, 1*25(12),1514-1521.

Li, L., Li, L., Zhou, X., Xiao, S., Gu, H., Zhang, G. (2015). Helicobacter pylori infection is associated with an increased risk of hyperemesis gravidarum: A meta-analysis. *Gastroenterology research and practice*, 1-13.

London, V., Grube, S., Sherer, D.M., Abulafia, O. (2017). Hyperemesis Gravidarum: A Review of Recent Literature. *Pharmacology*, 100(3-4), 161-171.

Malek, N.Z.H., Kalok, A., Hanafiah, Z.A., Shah, S.A., & Ismail, N.A.M. (2017). Association of transient hyperthyroidism and severity of hyperemesis gravidarum. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation,* 30(3).

Mamesah, I., Loho, M., & Suparman, E. (2020). Relationship between BMI and β-hCG levels with hyperemesis gravidarum in Manado, Indonesia. *Maj Obs Ginekol*, *27(3),* 108.

McCullough, J.E.M., Hughes, M.C. (2014). Reflexology use during pregnancy. *Journal of Yoga & Physical Therapy*, 5(2), 1-3.

Maltepe, C., & Koren, G. (2013). Preemptive treatment of nausea and vomiting of pregnancy: results of a randomized controlled trial. *Obstetrics and Gynecology International*, 809787.

Matthews, A., Haas, D.M., O’mathuna, D.P., Dowswell, T. (2015). Interventions for nausea and vomiting in early pregnancy. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 9, CD007575.

Mutlugüneş, E., Mete, S. (2013). Gebelikte bulantı kusma ile annelik rolü ve gebeliğin kabulü arasındaki ilişki. *Cumhuriyet Hemşirelik Dergisi,* 2(1), 8-14.

National Center For Complementary And Integrative Health (NCCIH). (2021). Complementary, Alternative, or Integrative Health: What’s In a Name? https://www.nccih.nih.gov/health/complementary-alternative-or-integrative-health-whats-in-a-name Erişim Tarihi: 6 Temmuz 2023.

National Institute for Health and Care Excellence (NICE). (2019). Antenatal care for uncomplicated pregnancies. https://www.nice.org.uk/guidance/cg62/chapter/1-guidance#screening-for-clinical-conditions Erişim Tarihi: 6 Temmuz 2023.

Niemeijer, M. N., Grooten, I. J., Vos, N., Bais, J. M., Van Der Post, J. A., Mol, B. W., Painter, R. C. (2014). Diagnostic markers for hyperemesis gravidarum: A systematic review and metaanalysis. *American journal of obstetrics and gynecology*, *211(2),* 150-e1.

Öz, İ.Ş., Boran, A.B., Ateşer, G., Bacanakgil, B.H., & Yıldırım, S.G. (2017). Hiperemezis Gravidarumlu Gebelerde Psikolojik Belirti Taraması. *Batı Karadeniz Tıp Dergisi, 1(3),* 76-83.

Potts, J., Genov, G., Segec, A., Raine, J., Straus, S., & Arlett, P. (2020). Improving the safety of medicines in the European Union: From signals to action. *Clinical Pharmacology and Therapeutics,* 107(3), 521-529.

Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG). (2016). The management of nausea and vomiting of pregnancy and hyperemesis gravidarum, Green-Top Guidelines No.69. https://www.rcog.org.uk/media/y3fen1x1/gtg69-hyperemesis.pdf Erişim Tarihi: 6 Temmuz 2023.

Simanjuntak, T.P., & Andrian, S.A. (2019). Hyperemesis gravidarum: A holistic review and approach to etiopathogenesis, clinical diagnostic and management therapy. *The Journal of perinatal & neonatal nursing, 11(4),* 266-272.

Society of Obstetricians and Gynecologists of Canada (SOGC). (2016). SOGC clinical practice guideline no: 339, the management of nausea and vomiting of pregnancy. https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/j.jogc.2016.08.009 Erişim Tarihi: 6 Temmuz 2023.

Soyer, C., Güvey, H., Çelik, S., Yaşar, B., Yazicioğlu, B., Türe, E., Ulubaşoğlu, H. (2020). Hiperemezis gravidarum inflamatuar bir süreç mi?. *Acta Medica Nicomedia, 3(2),* 60-65.

Stokke, G., Gjelsvik, B.L., Flaatten, K.T., Birkeland, E., Flaatten, H., & Trovik, J. (2015). Hyperemesis gravidarum, nutritional treatment by nasogastric tube feeding: A 10-year retrospective cohort study. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica,* 94(4), 359-367.

Tahta, T., Yilmaz, F.A. (2023). The effect of hyperemesis gravidarum on acceptance of pregnancy and quality of life: A comparative study. *Current Women's Health Reviews, 19(4),* 14-21.

Taşkın, L. (2021). Doğum ve kadın sağlığı hemşireliği. Ankara: Sistem Ofset Matbaacılık.

Wieland Ladewig, P.W., London, M.l., Davidson, M.R. (2010). Contemporary maternal-newborn nursing care. Pearson. 7nd Edition, p.345-346

World Health Organization (WHO). (2013). World Health Organization Traditional Medicine Strategy 2014–2023. https://www.who.int/publications/i/item/9789241506096 Erişim Tarihi: 6 Temmuz 2023

Yilmaz, T., Dinç Kaya, H., Günaydin, S., Güdücü, N., & Dişsiz, M. (2022). Psychometric properties of the Pregnancy-Unique Quantification of Emesis (PUQE-24) Scale. *Journal of Obstetrics and Gynaecology, 42(6),* 1739-1745.

BÖLÜM 10
HÜCRE KÜLTÜRLERİ VE PARAZİTOLOJİDEKİ KULLANIMI

İlhan SABANCILAR
Alican BİLDEN

[1]Bitlis Eren Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programcılığı, Bitlis, Türkiye ilhansabancilar@hotmail.com, ORCID: 0000-0002-0773-2752
[2]Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji A.D, Kırşehir, Türkiye alican.bilden@ahievran.edu.tr, orcid.org/0000-0003-1119-3859

1.GİRİŞ

Hücre kültürü, çeşitli hücre hatlarının optimum şartlarda gerekli besiyerleri ile laboratuvar ortamında yetiştirilmesidir. Hücre kültürü yöntemleri, son zamanlarda deney hayvanlarına alternatif olarak sıkça tercih edilmektedir. Hücrelerin düzgün şeklide çoğalmasını sağlamak amacıyla yapılan pasajlama yönteminin hassas olmasına ve kontaminasyon oluşmamasına azami ölçüde dikkat edilmelidir. Çoğaltılması sağlanan hücre hatlarında farklı alanlarda araştırma çalışmalarının yapmasına olanak sağlamaktadır. Çalışma sonrasında farklı çalışmalarda kullanmak amacıyla uygun şartlarda dondurma işlemiyle hücreler saklanabilmektedir (Helmrich, 1998). 19. yüzyıldan itibariyle hücre kültürü yöntemleri gelişerek günümüze kadar ulaşmıştır. İlk uygulama alanı kurbağa sinir hücresi olup, farklı hücre hatlarında hücre kültürü yöntemleri geliştirilmiştir (Jedrzejczak-Silicka, 2017).

2.Kaynaklarına Göre Hücre Kültürleri

2.1. Primer Hücre Kültürü

Herhangi bir doku veya organdan elde edilen hücre kültürüdür. Flasklara ekim yapıldıktan sonra hücreler besiyeri ortamında çoğalmaları sağlanır. Konfluent oranı %80 ve üzeri olduğunda çoğalma durabilir. Hücrelerde biyolojik aktivite yavaşlar. Bu türde hücreler genellikle kaynak hücrede diploid kromozoma sahiptirler. Primer hücre kültürü taze dokudan alındığından kontaminasyon riski yüksektir (Helmrich, 1998).

2.2. Diploid Hücre Kültürü

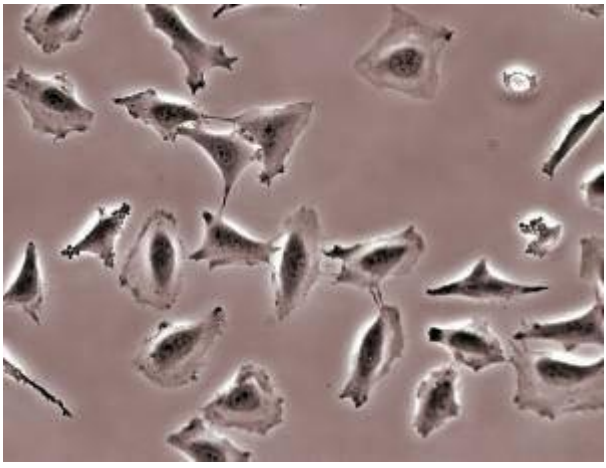
Primer hücre kültürü elde edildikten sonra tek bir yapıda hücrede üreme gösteren hücre kültürüdür. Pasaj hücre sayısı 100 civarındadır. Diploid hücrelerin kültürleri fibroblastoid hücre türünden oluşmaktadır. Bu tür hücreler sıvı nitrojende uzun süre saklanabilmektedir (Etc A-NMBAM, 2005).

2.3. Devamlı Türde Hücre Kültürleri

Sonsuz bölünebilme yeteneğinde olup bölünme yeteneğini kaybetmeyen hücre kültürleridir. Kimyasal olarak transformasyona uğramış hücreler ile in vitro ortamda alınmış tümör hücreleri ve bu hücre kültürlerinin kaynağını oluşturmaktadır. Bu türde hücreler genelde mutasyona uğradıkları için normal bir hücrenin fenotip ve genotip özelliklerini göstermeyebilirler (Helmrich, 1998).

3. Tercih Edilen Besiyerleri

Hücre kültürü invitro çalışmalarda kullanılan besiyerler hücrelerin normal bir döngüde metabolik aktivitesini sürdürebilmesi açısından gerekli olan besleyici solüsyonlardır. Besleyici solüsyonlarda proteinler, esansiyel aminoasitler, vitaminler, hormonlar (insulin, hidrokortizon), glikoz ve antibiyotikler yer almaktadır. İnvitro çalışmalarda kullanılan besiyerler gerekli iyon dengesi ve pH'ı da sağlarlar. 1950'li yıllarda kabul edilmiş olan Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ve bu çözeltilerin zenginleştirilmiş türleri olan EMEM'e Dulbecco modifikasyonu (DMEM), DMEM,F12'nin 1:1 karışımı olan DMEM/F12, RPM1 1640 sıklıkla tercih edildiği kabul görmektedir (Helmrich, 1998).



Şekil 1. Rahim ağzı kanseri hücreleri doku kültürü mikroskopik görüntüsü (Helmrich, 1998).

4. Hücre Kültürü Kullanım Alanları ve Ortamı

Hücre kültürü başlıca kanser araştırmaları, sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyoloji, aşı üretimi, kök hücreler, mikrobiyoloji, tüp bebek ve kısırlık tedavilerinde kullanılmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında sıcaklık, pH değeri, oksijen ve karbondioksit seviyeleri ile glikoz, antibiyotik, besin konsantrasyonunun büyük etkisi bulunmaktadır (Price, 2017). Hücrelerin çoğalması için besiyerleri içerisinde hormon ve vitaminler de yer alması gerekmektedir (Schwartz ve Ronnekleiv-Kelly, 2019).

5. Hücre Kültüründe Kullanılan Kolorimetrik Yöntemler

5.1. Kolorimetrik Yöntemler

Sitotoksisite yöntemleri; renk değişimine bağlı olarak biyolojik aktiviteye dayalı hücre ölümü/proliferasyonu testleri olarak tanımlanır. Bu testler; 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) testi, MTS testi, XTT testi, suda çözünen formazan 1 (WST-1) testi, suda çözünen formazan 8 (WST-8) testi, sulforhodamin B (SRB) testi ve Laktat dehidrogenaz (LDH) testi spektrofotometrik olarak sık olarak tercih edilmektedir (Erkekoğlu ve Baydar, 2021).

5.1.1. MTT Yöntemi

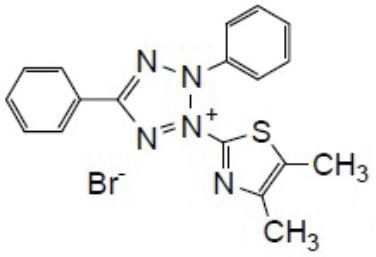
MTT yöntemi, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) enzim aktivitesini renk ölçüm esasına dayanan mevcut olan canlı hücre miktarının belirlenmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Meydana gelen renk değişikliği sarı renkli formazon kristallerinin canlı yapıdaki hücre mitokondrilerinde tetrazolyum yapısının miktarının azalmasına bağlı olarak oluşmaktadır. Bu yöntemle canlı özellikteki hücre üzerindeki antikanserle ile ilgili çalışmalar yapılabilmektedir.

Hücre kültür yöntemlerinde uygulanacak prosedür;

- Hücre kültür ortamının steril edilmesi
- Besiyerinin önceden hazırlanması ve uygun sıcaklığa getirilmesi
- Hücre pasajlama
- Hücre sayımı (Sadece canlı hücreler sayılır)
- Çalışma sonrasında hücrelerin dondurulması

Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanışı (Pezzuto, 1997).

- 500 ml hazır amniyon hücre kültürü medyumu (DMEM ya da RPMI)
- 50 ml Penisilin+Streptomisin+Amfoterisin B
- 5 ml L-glutamin



Şekil 2. MTT'nin kimyasal yapısı (Mosmann T, 1983).

5.1.2. XTT Yöntemi

Mitokondriyal enzimlerin aktivitesi, hücre ölümünden kısa bir süre sonra inaktif olan bu biyokimyasal prosedürün temelini doğrulamaktadır. Tetrazolyum tuzu XTT'ye (sodyum 3,3'-{1-[(fenilamino) karbonil]-3,4-tetrazolyum}-bis (4-metoksi-6-nitro) benzen sülfonik asite hidrat) dayalı bir kolorimetrik yöntem olup ilk olarak 1988'de Scudiero, P.A tarafından kullanılmıştır. MTT uygulama işleminde belli bir formazon bileşiğinin çözünmesi ve bu çözünme ile birlikte renk değişimi gerçekleşmektedir. Oysa ki XTT uygulamasında geniş bir konsantrasyon aralığında, proliferasyon ölçme prosedörünü çözünür boya üreterek basitleştirir. Bu nedenle sitotoksik etkide yaklaşık miktarı belirlemede oldukça etkili bir yöntemdir. Bununla birlikte radyoaktif izotopların kullanımına gerek duyulmadan hücrelerin ve canlılıklarının tayin edilmesine de imkan sağlar (Kang, 1998).

5.1.3. MTS Yöntemi

Tetrazolyum yapısında bir tetrazolyum özelliğine sahip bir tuzdur (MTS). MTS ve MTT yöntemleri birbiriyle benzerlik gösterir. Bu yöntemlerde, prolifere olan hücreler ile birlikte mitokondriyel dehidrojenaz enzim aktivitesi artmasıyla MTS'yi koyu pembe-kırmızı kristallere dönüşmesini sağlar ve oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sonrasında absorbans 492 nm'de ölçülür (Creative Proteomics, website).

5.1.4. WST Yöntemi

Günümüzde sık olarak tercih edilen (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)- 2H tetrazolyum yapısında yer alan Wst-1 yöntemidir. Yine sıklıkla tercih edilen diğer bir yöntem de 2-(2-metoksi-4- nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H tetrazolyum, monosodyum tuzu yapısındaki Wst-8 yöntemidir. Bu testlerde canlı olan hücreler %100 kabul edilerek in vitro

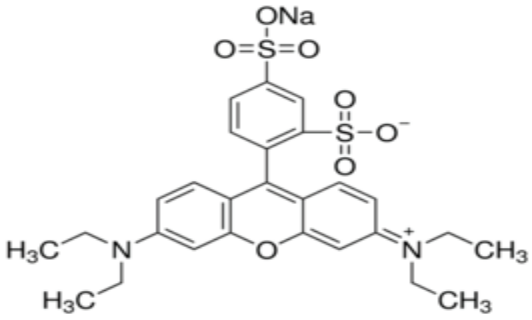
çalışma yapılan hücrelerin canlılığı canlı hücrelerin sayısına göre yapılan hesaplama sonrasında yüzde (%) hesaplama yapılır (Wang P, 2010).

5.1.5. LDH Yöntemi

Hücreler toksik olan bir kimyasala maruz kaldıklarında membran yapısı bozulur ve laktat dehidrojenaz (LDH) enzimi mevcut hücrelerden hücre besiyerine geçer ve sonrasında spektrofotometrik olarak ölçümü yapılır. Birçok sitotoksisite etkinliğinin belirlenmesinde de LDH yöntemi kullanılmaktadır. Ortamdaki hücre dışı LDH, laktat dehidrojenaz enzimi varlığında NAD^+ nın NADH' ye indirgenmesi ile laktatın pirüvata dönüşümünü katalize ederek 490 nm'de ölçümü yapılır (Han X, 2011).

5.1.6. SRB Yöntemi

Sülforhodamin B (SRB) renk olarak pembe-kırmızı olup suda çözünebilme özelliğinde olan bir boyadır (Skehan P, 1990). Testin çalışma prensibi, trikloroasetik asit veya asetik asit ile fikse edilen hücrelerde bulunan amino asit parçacıklarına iyon farkı ve pH değerlerine bağımlı olması esasına dayanır. Düşük asidik ortamda çözücü ve boyanın verdiği renk şiddeti kolorimetrik olarak 540 nm'de ölçülebilmektedir. SRB yönteminin MTT'ye göre aynı günde sonuçlanması, daha ucuz olması ve doğrusal sonuçlar vermesi nedeniyle son zamanlarda bilimsel çalışmalarda daha çok tercih edilmektedir (Orellana EA, 2016).



Şekil 3. Sulforhodamin B'nin kimyasal yapısı (Vichai V, 2016).

6.Parazitolojide Hücre Kültürü

Özellikle, hücre içinde çoğalan ve büyümek için canlı doku ve hücrelere ihtiyaç duyan parazitlerin yeniden üretilmesi için hücre kültürü gereklidir. Bu

amaçla, sonsuz çoğalma kapasitesine sahip hücre hatları özellikle tercih edilir. Sıklıkla tercih edilen hücre hatları aşağıda listelenmiştir.

He la: İnsan servikal karsinomu 1952 yılında servikal kanserli bir hastadan izole edilmiştir. En yaygın kullanılan hücre hatlarından biridir. Epitel benzeri bir hücredir ve süspansiyon halinde büyüyebilir. **Vero:** 1962 yılında normal yetişkin Afrika yeşil maymun böbreklerinden elde edilmiştir. Hücre kültüründe sürekli büyüyebilen yapışık hücrelerdir.

Mc Coy: Bu hücrelerin kökeni hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu hücreler fare fibroblastları olarak bilinir ve koleksiyonlar halinde yapışıp büyürler.

Hep-2: İnsan larinks karsinomu,

U-937: İnsan lösemik monositik lenfoma hücre serisi,

THP-1: İnsan akut monositik lösemi hücre serisi,

J-774: Fare makrofaj hücre serisi.

Serolojik testler için antijen üretmek üzere hücre kültüründe hücre içi çoğalan parazitlerin üretilmesi ile canlı hayvan tüketiminin azaltılması ve maliyetlerin düşürülmesi büyük önem arz etmektedir (Ashburn et al., 2000; Schuster & Sullivan, 2002). Fare peritoneal makrofajları ve insan PBMC hücreleri, parazitolojide tercih edilen primer hücre kültürü örnekleridir.

6.1.Primer makrofajlar: Biyolojinin birçok alanında tercih edilir. Kemik iliğinde üretilen mononükleer fagositler kan yoluyla dokulara dağılarak doku iltihabı bölgelerinde makrofajlara dönüşür. Fagositoz ve kemotaksis özellikleri geliştirilmiştir. Makrofajlar saf halde kolayca elde edilebilir ve analitik biyokimyasal ölçümleri kantitatif olarak yapılabilir. Ancak makrofajlar çoğalamaz ve ömürleri kısadır. Makrofajlar kandan, akciğerlerden, dalaktan, karaciğerden ve periton boşluğundan elde edilebilir. Ancak, bunların periferik kandan veya periton boşluğundan elde edilmesi genellikle tercih edilir. 500 ml kandan 10 monosit elde edilebilir (Freshney, 1992).Farelerin peritonunda çoğunlukla 2-3x10^6 makrofaj bulunur. Peritoneal makrofajları uyarmak için çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ajanların avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemin dezavantajları, elde edilen makrofajların normal peritoneal makrofajlardan belirgin şekilde farklı olması ve kullanılan ilaçların çoğunun sindirilmemesi ve kültür sırasında hücrelerde kalmasıdır (Coriel LL, 1979).Toxoplasma ilk olarak 1929 yılında civciv embriyoları ve tavuk

embriyolarının hücre kültüründe üretilmiştir. Daha sonra araştırmacılar, insan, tavuk, fare, domuz, maymun, sıçan, köpek, tavşan, kobay ve sığır böbreği, makrofaj, kemik iliği, dalak, kalp, fibroblast, deri ve rahim dahil olmak üzere çok çeşitli hücrelerde üreyebileceğini göstermiştir. *T. gondii'*de takizoit üretimi için bir dizi farklı ortam kullanılmıştır, ancak ideal ortam konusunda bir fikir birliğine varılamamıştır. Bununla birlikte, son çalışmalar HeLa ve Vero hücrelerinin daha sık tercih edildiğini göstermektedir (Değirmenci et al., 2011).*T.gondii'*nin çoğaltılmasında HeLa hücreleri kullanılmakta ve bunlardan canlı takizoitler elde edilmektedir. Bu hücreler hızla çoğalabilir, ancak takizoitlerin sayısı tahmin edilemez. En uygun zamanın enfeksiyondan sonraki 72 ila 216 saatler arası olduğu bilinmektedir. Bu esneklik, laboratuvar testleri ve çalışmaları planlanırken sorun yaratır. Hücreler 25°C gibi düşük sıcaklıklarda daha uzun süreler boyunca saklanabilir. Hücreler enfekte edildikten sonra 25°C'ye alınarak 168 saate kadar istenildiği kadar takizoit elde edilebileceği bildirilmiştir. Ayrıca bu kültürden elde edilen takizoitlerin 7 güne kadar dye testleri için kullanılabileceği bildirilmiştir. Böylece standart kalitede takizoit stoku tutmanın mümkün olduğu bildirilmiştir (Chatterton et al., 2002).1983 yılında *Cyptosporodium* spp.in vitro olarak ilk kez aseksüel döngüsü gerçekleştirmiştir. 1984 yılında, insan fetal akciğer hücreleri (HFL), primer tavuk böbrek (PCK) hücreleri ve domuz böbrek (PK-10) hücreleri ile tam döngüler gerçekleştirilmiş ve HFL'nin en başarılı hücre hattı olduğu rapor edilmiştir. Daha sonra MDBK (Madin-Darby sığır böbrek hücreleri), MDCK (Madin-Darby köpek böbrek hücreleri) HCT-8 (insan kolon tümörü) ve Mause L929 fibroblast hücreleri dahil olmak üzere farklı hücre hatlarında test edilmiştir (Arrowood, 2002).*Plasmodium falciparum* hücre kültürü ortamında sürekli olarak muhafaza edilebilir. Kısaca, Rh+ insan eritrositleri RPMI 1640 (%2 bikarbonat, 25 mM HEPES, 50 µg/ml gentamisin, %10 inaktif insan serumu) içinde %5 hematokrit değerine kadar sulandırılır. Besiyeri günlük olarak yenilenir. Hücreler 38°C'de %7 CO_2 ve düşük oksijenli (%1-5) ortamda idame ettirilir. Orijinal paraziti elde etmek için infekte maymundan alınan kan örneği 3-4 gün aralarla insan eritrositleri ile 100 milyon kez sulandırılarak elde edilmektedir. Parazit aseksüel döngüsünü 48 saate tamamlamaktadır. Daha Sonra %5 D-sorbital ile kırmızı kan hücreleri parçalanarak olgun parazitler elde edildiği bildirilmektedir (Taoufiq et al., 2011; Trager, 1995).*Acanthamoeba castellani'*nin insan kornea epitel

hücrelerindeki parazit-hücre iletişimini ve patojenitesini araştırmak için, göz bankasından insan kornea hücreleri standart protokollere göre toplanmış, uygun besiyeri (%2 Bacto Casitone besiyeri) kullanılarak hücre kültürü plakalarına eklenmiş ve farklı parazit sayılarında karşılaştırılarak elde edilen sonuçlar ışık ve taramalı elektron mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Böylece laboratuvar hayvanlarının kullanılmamasının daha etik olduğu düşünülmektedir ve insan kökenli hücrelerin kullanıldığı çalışmaların gerçekçi sonuçlar verme olasılığı daha yüksektir. Bu çalışmada, parazitin hücreye girdiğinde yaşadığı morfolojik değişiklikler ve birkaç saat içinde meydana gelen penetrasyon araştırılmıştır (Omaña-Molina et al., 2010).Helmintlerde, hücre kültürü yöntemleri kullanılarak bazı helmint hücreleri elde edilmeye çalışılmıştır. Örneğin, 1972 yılında Capron ve Dupas, Schistosoma'nın arka ucundan kesilen parçaların tripsinle muamele edilmesiyle elde edilen hücreleri memeli hücre kültüründe muhafaza etmeye çalışmıştır. Daha sonra çeşitli araştırmacılar parazitin farklı hücrelerini izole etmeye ve analiz etmeye çalışmıştır. Elde edilen veriler, memeli hücrelerine kıyasla çok farklı ihtiyaçları olduğunu göstermiştir. Örneğin, şistozomların in vitro gelişiminin penisilin streptomisin varlığında zayıfladığı ve %10'luk bir serum konsantrasyonunun inhibe edici bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Quack et al., 2010).

7. KAYNAKÇA

Arrowood, M. J.(2002). In vitro cultivation of Cryptosporidium species. *Clinical Microbiology Reviews, 15*(3), 390–400.

Ashburn, D., Evans, R., Chatterton, J. M. W., Joss, A. W. L., Ho-Yen, D. O. (2000). Toxoplasma dye test using cell culture derived tachyzoites. *Journal of Clinical Pathology, 53*(8), 630–633.

Chatterton, J. M. W., Evans, R., Ashburn, D., Joss, A. W. L., Ho-Yen, D. O. (2002). Toxoplasma gondii in vitro culture for experimentation. *Journal of Microbiological Methods, 51*(3), 331–335.

Coriel, L.L.(1979). Methods Laboratory regquirments and media. *Cell Culture Methods in Enzymology.Academic Press Limited*, 3–116.

Creative Proteomics. MTS Cell Proliferation Assay. Available from: https://www.creative-proteomics.com/services/mtscell-proliferation-assay.htm [Website].

Etc A-NMBAM.(2005). Human Skin Cell Culture and its Impact on Dermatology. *Egypt Dermatology Online J.* 1(2).

Değirmenci, A., Döşkaya, M., Caner, A., Çiçek, C., Korkmaz, M., Gürüz, Y., Üner, A. (2011). Toxoplasma gondii RH Ankara: production of evolving tachyzoites using a novel cell culture method. *Experimental Parasitology, 128*(1), 1–8.

Freshney, R. I. (1992). *Animal cell culture: a practical approach* (Issue 576.5 ANI). IRL pres Limited.

Han, X., Gelein ,R., Corson, N., Wade-Mercer, P., Jiang, J., Biswas, P., Finkelstein, J.N., Elder, A., Oberdörster, G.(2011).Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology*, 287(1-3),99-104.

Helmrich, A., Barne,s D.(1998). Animal cell culture equipment and techniques. *Methods Cell Biol*,57,3–17.

Jedrzejczak-Silicka, M.(2017). History of cell culture. *New Insights into Cell Culture Technology*, 1–42.

Kang, S.Y., Sung, S.H., Park, J.H., Kim, Y.C.(1998). Hepathoprotective activity of scopoletin a constituent of Solanum lyratum. *Arch. Pharmacol. Res,*21, 718–722.

Mosmann, T.(1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*,

65,55–63.

Pezzuto, J.M.(1997). Plant-derived anticancer agents. Biochemichal Pharmacology,53,121-133.

Price, P.(2017). Best practices for media selection for mammalian cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*,53(8), 673–681.

Schwartz, P.B., Ronnekleiv-Kelly, S.M.(2019). Effective cell culture ,157–169.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R.(1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82(13),1107–1112.

Orellana, E.A., Kasinski, A.L.(2016). Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio Protoc*, 6(21), e1984.

Omaña-Molina, M., González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L. I., Cristóbal-Ramos, A. R., González-Lázaro, M., Salinas-Moreno, E., Méndez-Cruz, R., Sánchez-Cornejo, M., De la Torre-González, E., Martínez-Palomo, A.(2010). Acanthamoeba castellanii: Morphological analysis of the interaction with human cornea. *Experimental Parasitology*, *126*(1), 73–78.

Quack, T., Wippersteg, V., Grevelding, C. G(2010). Cell cultures for schistosomes–Chances of success or wishful thinking? *International Journal for Parasitology*, *40*(9), 991–1002.

Schuster, F. L., Sullivan, J.J(2002). Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clinical Microbiology Reviews*, *15*(3), 374–389.

Taoufiq, Z., Pino, P., N'dilimabaka, N., Arrouss, I., Assi, S., Soubrier, F., Rebollo, A., Mazier, D(2011). Atorvastatin prevents Plasmodium falciparum cytoadherence and endothelial damage. *Malaria Journal*, *10*(1), 1–9.

Trager, W.(1995). Cultivation of malaria parasites. *Methods in Cell Biology*, *45*, 7–26.

Vichai, V., Kirtikara, K.(2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytoxicity screening. Nature Protocol, 1, (3),1112-1116.

Wang, P., Henning, S.M., Heber, D.(2010). Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One*, 5(4),e10202

BÖLÜM 11

MODERN ÇAĞIN BİYOBELİRTEÇLERİ MikroRNA'lar ve KARACİĞER HASTALIKLARINDAKİ ROLLERİ

Arş.Gör.Dilek CANLAR AKAR

Prof. Dr. Funda KIRAL

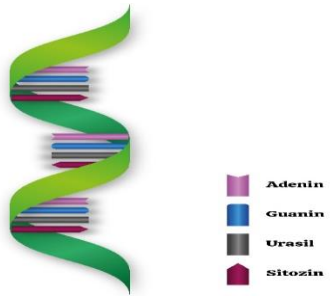
Simgeler kısaltmalar

APP: Amiloid protein öncüsü
Aβ: Ekstrasellülear amiloid plak veya β-amiloid plak
BUN: Kan Üre Nitrojeni
C. elegans: Caenorhabditis elegans
cRNA: Kodlayıcı RNA
FXR1: Kırılgan X Zihinsel Geriliğine Bağlı Protein 1
HCC: Hepato sellüler karsinoma
IgA: İmmunglobülin A
IgAN: IgA nefropatisi
KIM-1: Böbrek Hasarı Molekülü-1
miPEP: Düzenleyici Peptitler
miRNA: mikroRNA
mRNA: Mesajcı RNA
MT-COX1: Kodlanmış Sitokrom C Oksidaz Altünitesi 1
ncRNA: Kodlanmayan RNA
piRNA: PIWI etkileşimli RNA
pri-miRNA: Uzun Zincirli RNA Prekürsörleri
RISC: RNA Kaynaklı Susturma Kompleksi
rRNA: Ribozomal RNA
sCr: Serum Kreatinini
siRNA: Kısa Etkileşen RNA
snoRNA: Kısa Nükleolar RNA
snRNA: Kısa Nüklear RNA
TBFβ: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
tRNA: Taşıyıcı RNA

1.GİRİŞ

Rinonükleik asit (RNA) hücre protein sentezinde görevleri olan ve bazı virüslerde genetik kod taşıyıcısı olarak DNA'nın yerini alan kompleks bir bileşiktir. RNA, siklik riboz bir şekere eklenmiş azotlu bazlar içeren, fosfodiester bağları ile bağlı çeşitli uzunluklarda zincirlerden oluşur. RNA'nın siklik riboz şekeri beş adet karbon ve bir adet oksijen molekülü içerir. RNA'daki riboz şekerin ikinci karbonunda bulunan hidroksil grubu RNA'yı hidrolize yatkın hale getirir. Deoksiribonükleik asit (DNA)'in ikinci karbonunda hidroksil grubu içermemesinin çoğu organizmada genetik taşıyıcı olarak tercih edilmesinin nedeni olabileceğini düşündürmektedir. RNA azotlu bazlar olarak adenin, guanin, sitozin ve DNA'daki timinin yerini almış urasil

içerir. RNA'nın yapısı 1965 yılında R.W. Holley tarafından tanımlanmıştır.RNA tipik olarak tek zincirli polimerik yapıya sahiptir. Bununla birlikte RNA sarmalında kendi kendini tamamlayan dizilerin varlığı ribonükleotid zincirinin çıkıntılar ve sarmallardan oluşan kompleks yapılar şeklinde katlanmasına neden olur. RNA'nın üç boyutlu yapısı fonksiyonları ve stabilitesi için kritik öneme sahiptir. Bu üç boyutlu yapı RNA'nın, riboz şekere ve azotlu bazlara kimyasal gruplar ekleyen hücresel enzimler tarafından, çeşitli yollarla modifiye edilmesine olanak sağlar.RNA'nın birçok tipi arasında, tüm organizmalarda bulunan, en çok bilinen ve en yaygın olarak çalışılanlar; mesajcı RNA (mRNA), taşıyıcı RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA)'dır.Protein sentezinde mRNA nükleusta DNA'dan kodlanan genetik kodları ribozoma taşır. Ribozomlar protein ve rRNA'dan oluşur ve ribozom protein alt üniteleri rRNA tarafından kodlanır ve nükleusta sentezlenir. tRNA molekülleri amino asitleri proteinleri oluşturmak için bağlandıkları ribozomlara taşır.mRNA, tRNA ve rRNA dışındaki RNA'lar kodlayıcı RNA (cRNA) ve kodlayıcı olmayan RNA (ncRNA) olarak ikiye ayrılabilir. ncRNA'lar; housekeeping ncRNA'lar (tRNA ve rRNA) ve düzenleyici ncRNA'lar olarak uzunluklarına göre sınıflandırılır. Uzun zincirli ncRNA'lar en az 200 nükleotitten oluşurken kısa ncRNA'lar 200'den daha az nükleotite sahiptirler. Kısa zincirli ncRNA'lar kendi içerisinde; mikroRNA (miRNA), kısa nükleolar RNA (snoRNA), kısa nüklear RNA (snRNA), kısa etkileşen RNA (siRNA) ve PIWI etkileşimli RNA (piRNA) olarak alt gruplara ayrılabilir.Kodlayıcı olmayan özellikteki RNA'lar arasında 22 nükleotit uzunluğundaki miRNA'lar kanser ve diğer hastalıklardaki rolleri nedeniyle önemli bir yere sahiptir ve biyobelirteç olarak oldukça umut vaadeden moleküller olarak görünmektedir (Chatterjee ve Wan, 2018).



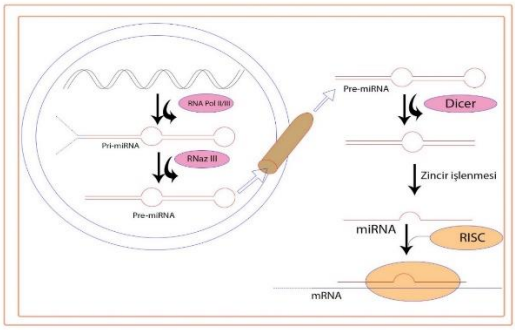
Şekil 1. RNA'nın genel yapısı

2.MikroRNA Nedir?

MikroRNA'lar gen ifadesinin transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenlenmesinde görev alan küçük ve protein kodlamayan 22-24 nükleotit uzunluğundaki RNA molekülleridir (Chen ve ark., 2014). MikroRNA'lar yaklaşık 1 mm uzunluğunda, mikroskobik ve patojen olmayan bir nematod olan Caenorhabditis elegans (C. elegans) üzerinde birbirinden bağımsız iki araştırma grubu tarafından yapılan çalışmalarda, gen ifadesinin post-transkripsiyonel düzenleyicisi olarak keşfedilmiş ve Lin-4 olarak ifade edilmiştir (Lee ve ark., 1993; Wightman ve ark., 1993). Bu keşiften yaklaşık 7 yıl sonra Reinhart ve diğerleri (2000) C. elegans üzerinde yaptıkları çalışmada 22 nükleotit uzunluğundaki let-7 olarak isimlendirdikleri ikinci miRNA'yı keşfetmişlerdir. Bu keşiflerin ardından protozoonlardan insanlara kadar birçok organizmada miRNA'ların varlığı 2002'den beri miRNABase'e bildirilmektir ve 2023 verilerine göre bildirilmiş olan 38 bin 589 miRNA vardır (www.mirbase.org). MikroRNA tanımını ise ilk olarak Ruvkun G. (2001) birçok araştırmacının keşfettiği bu çok küçük RNA'lara vurgu yaparak kullanmıştır.

3.MikroRNA Biyogenezi

MikroRNA'nın hayvanlardaki biyogenezini açığa çıkarmak için C. elegans, Drosophila melanogaster ve memeli hücre kültürlerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. miRNA biyogenezi miRNA genlerinin RNA polimeraz II veya RNA polimeraz III enzimleri tarafından uzun zincirli RNA prekürsörlerine (pri-miRNA'lara) çevrilmesiyle başlar (Lee ve ark., 2004; Cai ve ark., 2004; Davis-Dusenbery ve Hata 2010). RNA prekürsörleri, RNaz III enzimleri olan Drosha ve DGCR8/Pasha tarafından çekirdekte yaklaşık 70 baz uzunluğunda olan pre-miRNA formuna çevrilir. Pre-miRNA'lar Exportin-5 tarafından çekirdekten çıkarılır ardından RNaz III enzimi olan DICER tarafından işlenir ve argonuate proteini içeren RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) dahil edilir. RISC kompleksinin oluşumu, miRNA'ların mRNA'lara bağlanmasına imkan sağlar (Şekil 1) (Lee ve ark., 2003; Denli ve ark., 2004; Gregory ve ark., 2004; Han ve ark., 2004; Landhaler ve ark., 2004; Wojciechowska ve ark., 2017).



Şekil 2. miRNA Biyogenezi

4.MikroRNA'ların Fonksiyonları

MikroRNA'ların keşfinden bu yana miRNA'lara odaklanan ve açıklamaya çalışan 80 binden fazla çalışma PubMed'e girilmiştir ve farklı fonksiyonları gösterilmiştir (Dragomir Knutsen ve Calin, 2018). Pri-miRNA'lar miRNA kodlanmış peptitler olarak adlarılan düzenleyici peptitleri (miPEP) kodlayabilirler. *Arabidopsis thaliana'*da sentezlenen pri-miR-165a ve *Medicago truncatula'*dan sentezlenen pri-miR-171b'yi de içeren bazı pri-miRNA'ların kısa peptitler ürettiği keşfedilmiştir. Bu kısa peptitler pri-miRNA içindeki ATG başlangıç kodunundan başlamaktadır. miPEP-171b dokuz amino asitten, miPEP-165a ise yaklaşık on sekiz amino asitten oluşur ve kendi pri-miRNA'larının transkripsiyonlarını arttırırlar (Lauressergues ve ark., 2015).MikroRNA'lar işlevlerini argonaute proteini içeren kompleks aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Bununla birlikte RNA bağlayıcı proteinler için moleküler tuzaklar olarak görev yapabilirler ve mRNA metabolizmasını değiştirebilirler. miR328 hnRNP E2 ile RISC'ten bağımsız bir şekilde etkileşime girer. miR-328'in bağlanması hnRNP E2 aracılı translasyonal inhibisyondan CEBPA mRNA'nın salınımına neden olur. Bu durum miRNA'ların hücrenin yaşamında önemli yeteneklere sahip olduğunu göstermektedir (Eiring ve ark., 2010).MikroRNA'ların Toll benzeri reseptörlerin aktivasyonunu içeren görevleri olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Fabbri ve ark., 2012, tümör hücreleri tarafından salgılanan miR-21 ve miR-29a'nın insanlarda TLR8 ve farelerde TLR7 reseptörlerine bağlanarak işlev gösterebileceğini bildirmişlerdir. Bu bağlanmayla TLR aracılı bir pro-metastatik inflamatuar yanıt tetiklenerek tümör büyümesi ve metastaza yol

açabilir. Lehmann ve ark., 2012' tarafından yapılan başka bir çalışmada let-7'nin TLR7'yi aktive ettiği ve nöronal TLR7 aracılığı ile nörodejenarasyonu indüklediği gözlemlenmiştir. MikroRNA'ların protein ekspresyonunda hücre siklusuna bağımlı olarak değişen etkileri vardır. Spesifik miRNA'lar hücre döngüsü durduğunda hedef mRNA'ların translasyonunu indüklerken proferilasyon halindeki hücrelerde baskılayabilirler. Vasudevan, Tong ve Steitz (2007), Let-7 ve sentetik mikroRNA miRcxcr4'ün hücre döngüsü durduğunda mRNA'ların translasyonunu aktive ettiğini ancak proliferatif hücrelerde ise baskıladığını belirlemişlerdir.MikroRNA'lar mitokondriye taşınarak mitokondriyal transkripsiyonu düzenleyebilirler. miR-181c'nin mitokondriye translokalize olduğunu ve mitokondriyal kodlanmış sitokrom c oksidaz altünitesi 1 (MT-COX1) protein ekspresyonunu inhibe ettiğini ancak MT-COX2 mRNA ekspresyonunu arttırdığını gözlemlemişlerdir (Das ve ark., 2012).MikroRNA'lar transkripsiyonu direkt olarak aktive edebilirler. Birçok çalışmada miRNA'ların importin 8 tarafından AGO1 veya AGO2'yle birlikte çekirdeğe taşındığı gösterilmiştir (Weinmann ve ark., 2009; Wei ve ark., 2014).

5.Biyobelirteç Olarak MikroRNA'lar

MikroRNA'lar plazma, kan, idrar, tükürük ve diğer vücut salgılarında tespit edilebilmektedir. Dolaşımdaki miRNA'lar AGO2 ilişkili eksozomlar, makroveziküller veya apoptotik cisimlerin içerisinde veya HDL'ye bağlı olarak taşınabilirler (Arroyo ve ark., 2011; Valadi ve ark., 2007; Vickers, Palmisano, Shoucri, Shamburek ve Remaley, 2011; Zernecke ve ark., 2009). Dolaşımdaki miRNA dokular organlar ve türler arasında biyolojik etki gösterebilir. Eksojen bitki miRNA'sı miR-168a fare gastrointestinal sisteminden dolaşıma girerek düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör adaptör protein 1 ifadesini değiştirerek fizyolojik etki gösterir. Bu durum gıda kaynaklı miRNA'ların memelilerde gen ifadesini düzenleyebileceğini göstermektedir (L. Zhang ve aark., 2012). Dolaşımdaki miRNA'ların düzensiz ekspresyon seviyelerinin prostat, akciğer, servikal, mide, kolorektal kanser türleri ve lösemi, melanoma, hepatosellüler karsinomlarla ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Kanserin yanı sıra dolaşımda bulunan yüksek düzensiz miRNA seviyelerinin diyabet, ektopik gebelik, hepatit C, böbrek hasarı, karaciğer hasarı, akciğer tüberkülozu, sepsis, sistemik lupus, sistemik sklerozis ve miyokardiayal hastalıklarda da ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Lawrie ve ark., 2013). Çeşitli hastalık

modellerinde yapılan miRNA çalışmalarında, miRNA'ların doku spesifik fonksiyonların ve hücrelerin farklılaşmasında önemli rol oynadığı ve miRNA ekspresyonunun dokuya özgü olduğu gösterilmiştir. Sağlıklı doku ve organlardan salgılandığı gibi tümöral dokulardan da salgılanan miRNA ekspresyonunun tümör tipinin gelişimsel kökenini yansıttığını rapor eden çalışmalar vardır (Mishra ve Merlino, 2009; Lu ve ark., 2005). Bu nedenle tümör tipleri ve subtiplerinin hücresel ve dokusal kökeni miRNA ile ilişkili olarak sınıflandırılabilir (Rosenfeld ve ark., 2008). Bunlara ek miRNA biyogenez mekanizmasındaki genetik değişikliklerin farklı tümör ve kanser tiplerindeki hücresel değişim ve karsinogenez sürecine dahil olduğu rapor edilmektedir (Kumar, Lu, Mercer, Golub, ve Jacks, 2007; Esteller, 2011; J.T. Huang, Wang, Srivastava, Sen, ve Liu, 2014). Ayrıca tümöral dokulardan salgılanan ve dolaşımda bulunan miRNA'ların endojen RNAz aktivitesinden etkilenmediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Mitchell ve ark., 2008).Böbrek proksimal tübülleri toksik maddeler ve metabolitlerini ekstrete etme rollerinden dolayı, kimyasal kaynaklı toksisiteden ilk etkilenen organların başında gelir. Nefrotoksisitenin belirlenmesinde geleneksel olarak kullanılan belirteçler; kan üre nitrojeni (BUN) ve serum kreatininidir (sCr), ancak serum kreatini; yaş, cinsiyet, kas kütlesi, beslenme durumu, enfeksiyonlar gibi çok çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Edelstein, 2008). Jeon ve ark., (2020) bu durumun BUN ve sCr'yi düşük duyarlılıkta ve kullanılabilirliğini sınırlı kıldığını bununla birlikte böbrek hasarı molekülü-1 (KIM-1)'in ise nefrotoksite için duyarlı bir biyobelirteç olduğunu belirtmişler ve gentamisin ile indüklenen akut böbrek hasarı çalışmasında let-7g-5p, miR-21-3p / 5p, 26b-3p / 5p, 140-3p / 5p, 192-5p, 378a-3p / 5p ve miR-1839-3p / 5p incelenmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada rat idrarında miR-26b-3p, 192-5p ve 378a-3p seviyelerinin BUN, sCR ve üriner KIM-1 seviyeleri gibi yüksek oranda olduğunu gözlemlemişler ve bu miRNA'ların potansiyel biyobelirteçler olabileceğini belirtmişlerdir. Çeşitli klinik çalışmalarda miRNA'ların intrarenal ekspresyonunun; immunglobülin A (IgA) nefropatisi, diyabetik nefropati, hipertansif nefrosklerozis, lupus nefritis ve transplantasyon yapılan böbrekteki renal fibrozisde histolojik ve klinik parametrelerle ilişkisi olduğu gösterilmiştir (G. Wang ve ark., 2010; Krupa ve ark., 2010; Glowacki ve ark., 2013). Benzer şekilde IgA nefropatisi (IgAN), nefrotik sendrom ve lupus nefritisinde birçok üriner miRNA'nın değiştiği rapor edilmiştir (G. Wang ve ark., 2010, 2011,

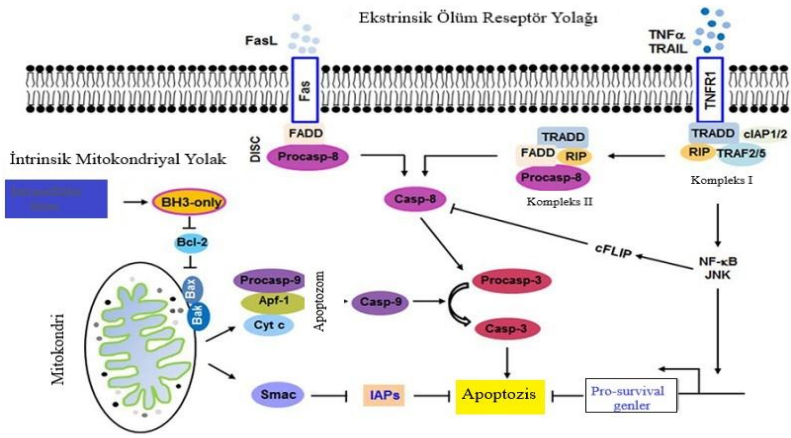
2013; Luo ve ark., 2013). İn vivo ve in vitro olarak yüksek glukoz konsantrasyonlarına maruz bırakılan mezengial hücrelerde indüklenen miRNA'lara odaklanan bir çalışmada, miR-377'nin SOD1, SOD2 ve PAK1 gibi önemli mezengial hücre proteinlerinin translasyonunu bastırdığı tespit edilmiştir. Bu nedenle diyabetik nefropatinin belirlenmesinde miR-377'nin önemli bir role sahip olabileceği öngörülmüştür (Q. Wang ve ark., 2008). Alzheimer Alman doktor Alois Alzheimer'ın adını taşıyan nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalığı vakaların yaklaşık %70'ini oluşturan en yaygın demans tipidir ve ekstrasellüler amiloid plak/β-amiloid (Aβ) ve intrasellüler tau hiperfosforilasyonu ile karakterizedir (Boughey ve Graff-Radford, 2007; Zeliger, 2023). Aβ , amiloid protein öncüsünün (APP) BACE1 tarafından işlenmesiyle üretilir (Scheltens ve ark., 2016). Alzheimer hastalarının serum ve frontal korteklerinde miR-149, miR-34a-5p, miR-125b-5p, miR-15b, miR-16, miR-124, miR-29c ve miR-374b-5p ekspresyonu sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Buna karşılık BACE1 mRNA ifadesi tam tersidir (An ve ark., 2017; Gong ve ark., 2017; Lei, Lei, Zhang, Zhang ve Cheng, 2015; Li, Xu, Wang, Huang ve Li, 2020; Zhong ve ark., 2018). Alzheimer hastalarının hipokampüsünde miR-342–3p ifadesi anlamlı bir şekilde artmıştır. Bu durum Aβ birikimini arttırmıştır. Alzheimer hastalarının serumundaki miRNA ifade profili analizinde ise miR-374b-5p, miR-148a-3p, miR-433 ve miR-193a-3p ifadeleri anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur (Cao, Liu ve Sun, 2020; R. Wang ve Zhang, 2020; H. Zhang, Liu, Ge ve Li, 2021; J. Zhang ve Wang, 2021).Bu nedenlerle dolaşımdaki miRNA'ların hastalıkların prognozunda ve diyagnozunda potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılması önerilmektedir (Huang ve ark., 2017).

6. Apoptoz Ve Nekrozda Mikrornalar

Apoptozis ya da programlanmış hücre ölümü hücresel homeostatazın sürdürülmesinde ve doku gelişiminde önemli role sahip olan, sürekli olarak meydana gelen ve sıkı bir şekilde düzenlenen bir süreçtir. Apoptozis intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere birbirinden bağımsız olmayan iki temel yol üzerinden yürütülür. İntriksik yol (mitokondriyal apoptoz) DNA hasarı, UV ışınlar ve büyüme faktörü eksikliği gibi stres sinyalleri tarafından aktive edilirken, ekstrinsik yol hücre dışından gelen bir ölüm sinyaliyle doğal katil lenfositler ve sitotoksik T lenfositler tarafından başlatılır (Verbrugge, Johnstone ve Smyth,

2010; Yanumula ve Cusick, 2022). İntriksik yolda; mitokondriyal yola Bax/Bak eklenmesi aracılık eder ve prokaspaz-9, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 ve sitokrom c apoptozom üretmek için birleşir. Apoptozom kaspaz 9'u tetikleyen ve apoptoza kadar giden kaspaz 3 sinyal kaskadını aktive eden çoklu bir protein kompleksidir (Şekil 3) (Jin ve El-Deiry, 2005; Los ve ark., 1995; Yuan ve Akey, 2013). İntrinsik apoptoziste birçok miRNA'nın farklı görevleri vardır. MiR-365, adaptör protein Src Homoloji 1 bölgeleri (SHC1) ve Bax'i hedef alır. SHC1 ve Bax'in siRNA tabanlı yıkımı kemoterapötik bir ajan olan gemsitabin direncini arttırarak pankreas kanseri hücrelerinin hayatta kalmasına aracılık eder. Ayrıca miR-365 DNA bağlama inhibitörü 2 ve S100P gibi kanser teşvik edici molekülleri yukarı regüle eder. Tüm bunların ışığında miR-365'in pankreas kanser hücrelerinin hayatta kalmasına aracılık ettiği söylenebilir (Hamada, Masamune, Miura, Satoh ve Shimosegawa, 2014). MiR-125b proapoptotik Bak1'i baskılar. Meme kanseri hücrelerinde miR-125b'nin aşırı ekspresyonu Bak1'i baskılayarak kemoterapötik bir ajan olan paklitaksel kaynaklı apoptozda belirgin bir inhibisyona ve dirence neden olur (M. Zhou ve diğerleri, 2010). İn vivo ve in vitro kolorektal kanserde miR-491'in hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Kolorektal kanserde yoğun olarak eksprese edilen anti-apoptotik Bcl-XL miR-491 tarafından aşağı regüle edilerek apoptozu indüklemektedir (Nakano, Miyazawa, Kinoshita, Yamada ve Yoshida, 2010). MiR-608 ve miR-34a'yı epidermal büyüme faktörü ve hepatosit büyüme faktörü üzerinden etki göstererek Bcl-XL'yi düzenleyerek apoptozu indükler ve kordoma malignitesinde hücre çoğalması ve proliferasyonunu inhibe eder (Y. Zhang, Schiff, Park ve Abounader, 2014).Ekstrinsik apoptopik yolda tümör nekroz faktörü (TNF), Fas ligandı (FasL) ve TNF ilişkişi apoptoz indükleme ligandı gibi hücre dışı ligandların transmembran reseptörlerin hücre dışı bölgesine bağlandığında devreye girer. Ekstrinsik apoptozis yolunda da miRNA farklı görevler üstlenmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan gemsitabin miR-21 ekspresyonunu aşağı regüle ederken FasL ekspresyonunu yukarı regüle eder ve kanser hücresi apoptozunu indükler. Bununla birlikte ektopik miR-21 ekspresyonu kanser hücrelerini indüklenen apoptozisten korumaktadır ve FasL/Fas yolu üzerinden kemodirenç mekanizması oluşturmaktadır (P. Wang ve ark., 2013). Akut miyeloid lösemi hücre hattında en fazla indüklenen miRNA miR-590-5p'dir. MiR-590 bu hücre hattında FasL'yi ekspresyonunu inhibe ederek kanser hücrelerinin hayatta

kalmasını desteklemektedir (Favreau, Shaffiey, Cross ve Sathyanarayana, 2013). Osteosarkom hücrelerinin akciğer metastazı oluşturma yeteneği Fas ekspresyonu ile ters orantılıdır. miRNA-17-92 kümesi tarafından kodlanan miRNA-20a osteosarkom hücreleri akciğere girdikten sonra FasL aracılı apoptozu atlatmasına izin vererek osteosarkom hücrelerinin metastatik potansiyeline katkı sağlar (Huang, Nishimoto, Zhou, Hughes ve Kleinerman, 2012).



Şekil 3. İntrinsik ve Ekstrinsik Apoptozis (J. X. Zhou ve Li, 2015)

Nekrotik hücre ölümü organellerin ve hücrenin şişmesi ve plazma zarının patlaması ile karakterize bir süreçtir. Nekrotik hücre ölümündeki bu değişiklikler apoptopik hücre ölümünden farklıdır. Apoptoziste organeller ve hücre küçülür, çekirdek kromatin yoğunlaşır ve apoptopik cisimler görülür (Chan, 2014). Nekroza TNF reseptör süperailesi, T hücre reseptörü, interferon reseptörleri, Toll benzeri reseptörler, hücresel metabolik ve genotoksik stresler gibi birçok nedenle tetiklenebilir (W. Zhou ve Yuan, 2014). Hasarlı miyokardın rejenerasyonu için kardiyomiyosit progenitör hücreler transplantasyon tedavisi için hücre kaynağı olarak önerilmiştir. Hücre nakli umut verici sonuçlar göstermiş olsada enjeksiyon sonrası hayatta kalma oranlarının düşük olması etkilerini sınırlandırmaktadır. Kardiyomiyosit progenitör hücrelerde oksidatif stres kaynaklı ölüme nekroz aracılık etmektedir ve miR-155 kardiyomiyosit progenitör hücrelerde nekrotik hücre ölümünü baskılamaktadır (Liu ve ark., 2011). İn vivo ve in vitro modellerde miR874'ün kaspaz-8'i hedefleyerek nekrozu düzenlediği gösterilmiştir (K. Wang ve ark., 2013).MikroRNA'ların

apoptozis ve nekrozisteki rollerinin aydınlatılması kanser başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisine ışık tutacaktır.

7. Karaciğer Hastalıklarında MikroRNA' LAR

Karaciğer; metabolik, depolama ve detoksifikasyon gibi birçok önemli işlevi olan ve bu işlevlerin birbiri ile bağlantısını da kuran vücudun en büyük iç organıdır (Noyan, 2010). Hepatik miRNA'lar içerisinde en fazla eksprese edilen miRNA, miR-122'dir. MiR-122 kolesterol ve lipid metabolizmasındaki çeşitli genleri etkiler ve bu etkisi ile karaciğer homeostazında önemli role sahiptir. MiR-122'nin aşağı regülasyonu kolesterol ve hepatik yağ asitlerinin sentezinin azalmasıyla birlikte hepatik yağ asidi oksidasyonunun artması ve plazma kolesterol seviyesinin azalmasıyla sonuçlanır. Bu durumda serum kolesterol, LDL ve serum trigliserid seviyeleri düşürmektedir. Ancak miR-122 eksikliği farelerde steatohepatit ve hepatosellüler karsinoma oluşumuna yol açmıştır (Chang ve ark., 2004; Lagos-Quintana ve ark., 2002; Esau ve ark., 2006; Hsu ve ark., 2012; Tsai ve ark., 2012). Ayrıca miR-122'nin inhibisyonu sistemik demir seviyelerini kontrol eden hepsidin antimikrobiyal peptit, kemik morfogenetik protein reseptör tip 1A, hemojuvelin ve hemokromatosisin yukarı regülasyonuna neden olur (Castoldi ve diğerleri, 2011). Lipid ve kolesterol homeostazının kontrol edilmesinde sterol-düzenleyici element-bağlayıcı protein, miR 33 ve izoformları (özellikle miR-33a ve miR-33b) önemli rollere sahiptir. miR33-a ve miR33-b kolesterolün taşınmasında önemli görevleri olan APOA1'in transkripsiyonunda görev almaktadırlar (Gerin ve ark., 2010; Horie ve ark., 2010; Marquart, Allen, Ory ve Baldán, 2010; Najafi-Shoushtari ve ark., 2010).

7.1. Karaciğer Fibrozisi Ve Sirozunda MikroRNA'LAR

Karaciğer hastalıklarına bağlı 2,14 milyon ölümün %61,7'sinin siroz kaynaklı olduğu bildirilmektedir. Karaciğer sirozu anatomik açıdan fibrozis ve nodül oluşumu ile karakterize yaygın bir süreçtir. Fibrozis karaciğerin kronik karaciğer hasarına karşı verilen iyileşme yanıtıdır. Fibrozis oluşumu karaciğer sirozuna neden olmakla beraber bu iki kavram aynı anlamda değildir. Karaciğer sirozu yoğun fibrozise neden olan aşırı alkol kullanımı, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı ve otoimmun hastalıklar gibi pek çok sebeple oluşmaktadır (McCormick ve Jalan, 2018; Paik,

Golabi, Y. Younossi, Mishra, ve Z.M. Younossi, 2020). Kronik hepatit C ile enfekte 84 fibrotik hastadan karaciğer ve serum örnekleri toplanarak yapılan bir çalışmada hepatik miR-122 seviyesinin fibrozisin şiddetiyle birlikte önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir (Trebicka ve ark., 2013). Tsai ve ark., 2012) tarafından yapılan miR-122a nakavt (miR-122$^{-/-}$) farelerle yapılan çalışmada miR-122a'nın uzun süre baskılanmasının insan karaciğer hastalıklarından persistent steatohepatitis, fibrozis ve hepatosellüler karsinomanın da dahil olduğu hastalık patolojilerine ile benzer etkilere neden olduğu gösterilmiştir.

7.2. Akut Karaciğer Yetmezliğinde MikroRNA'LAR

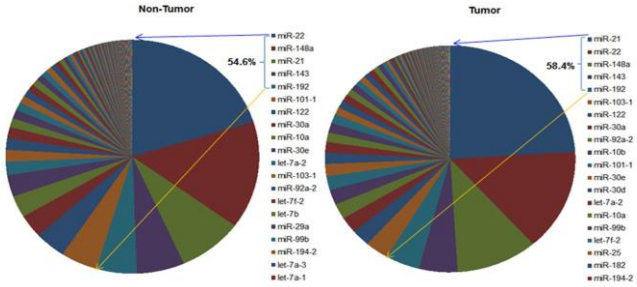
Akut karaciğer yetmezliği, semptomların başlamasıyla beraber altı ay içerisinde koagülopati ve ensefalopatiye neden olan şiddetli hepatosit hasarı olarak tanımlanır (Tujios ve Lee, 2018). Akut karaciğer yetmezliği %69,4'ünün nedeni bilinmeyen, %26,1'nin asetaminofen olmayan ilaçlarla indüklenmiş ve %2,5'inin viral kaynaklı olarak oluşur. 30 günlük süreçte mortalitenin %26,7 olduğu belirlenmiştir (Thanapirom ve ark., 2019).Akut karaciğer yetmezliğine sahip 63 hasta sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında akut karaciğer yetmezliği hastalarının serumlarında miR-122, miR-21, miR-221 ve miR-29a'nın seviyesinin yüksek olduğunu tespit edilmiştir. miR-21 ve miR-122 için ise istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmiştir. Spontan iyileşme gösteren hastalar ile spontan iyileşme göstermeyen hastaların karaciğer dokuları karşılaştırıldığında spontan iyileşme gösteren hastaların karaciğer dokularında miR-122 seviyesinin anlamlı derecede artmış olduğu, miR-21, miR-221 ve miR-29a seviyelerinin anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. Karaciğer dokularında artan miR-122 seviyesi spontan iyileşen hastaların artmış miR-122 serum seviyesiyle, artan serum miR-21, miR-221 ve miR29a seviyelerinin azalan karaciğer ekspresyonu ile ilişkilidir. Çalışmada performans değerlendirilmesi yapılmış ve miR-221'in en iyi duyarlılık/özgüllük oranına sahip olduğunu bildirilmiştir (John ve ark., 2014).Schuller ve ark., 2017), tek doz karbon tetraklorür akut karaciğer hasarı ve tekrarlayan dozlarda karbon tetraklorür kronik karaciğer hasarını indükledikleri farelerde, miR-223'ün serum konsantrasyonlarıyla birlikte hücre ve doku spesifik ekspresyonlarını analiz etmişlerdir. miR-223 ekspresyonunun karaciğer sirozu, akut karaciğer yetmezliğiyle birlikte karaciğer fibrozisi ve akut karaciğer hasarında anlamlı derecede düzensiz olduğunu tespit etmişlerdir. Akut ve kronik modellerde,

hepatik miR-223 yukarı regülasyonunun hepatik hücre ölümü ve karaciğer hasarı derecesiyle ilişkili olduğunu ve hepatositlerle sınırlı olduğunu ancak miR-223 ekspresyonunun, akut karaciğer hasarı süresince yüksek miR-223 serum seviyesini anlamlı derecede yansıttığını bildirmişlerdir.C57BL/6 vahşi tip ve miR-223 nakavt fareleri kullanarak miR-223'ün karaciğer hasarındaki rolü araştırılmıştır. Karaciğer hasarı anti-Fas antikoru Jo-2 uygulanarak indüklenmiştir. Çalışmada miR-223'ün delesyonunun Fas indüklü fare karaciğer apoptozisine ve karaciğer hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Jo-2 uygulamasından sonra, miR-223 nakavt fareler vahşi tip farelerde karşılaştırıldığında hepatosit hücre hasarının ve karaciğer hasarının daha az olması nedeni ile daha uzun süre hayatta kaldıkları gözlemlenmiştir. Fas indüklü fare hepatosit apoptozisinde miR-223'ün rolü vahşi tip fareler ve miR-223 nakavt farelerden izole edilen birincil hepatositlerde belgelenmiştir. Araştırmada miR-223'ün Fas indüklü fare hepatosit apoptozisinin düzenlenmesinde önemli role sahip olduğu tespit edilmiştir (Qadir ve ark., 2015).

7.3. Hepatosellüler KarsinomadA MikroRNA'LAR

Birincil karaciğer kanseri teşhis edilen kanserler arasında altıncı sırada yer alırken, 2020 yılında kansere bağlı ölümlerin nedenleri arasında üçüncü sırada yer alır. Birincil karaciğer kanseri vakalarının %75-85'i hepatosellüler karsinoma, (HCC) %10-15'i kolanjiyokarsinoma ve diğer nadir türlerden oluşur (Sung ve ark., 2021). miR-122 HCC dokularında önemli ölçüde azalmakta ve miR-122'nin restorasyonunun dikkat çekici şekilde HCC hücrelerinin tümör oluşturma yeteneklerini bastırmaktadır (Zeng ve ark., 2010)**.**20 insan HCC örneği aynı bireyden alınan karsinomlu doku ve sağlam dokuyu karşılaştırıldığında; bireylerin %50'sinde karsinomlu dokuda miR-122'nin kayda değer derecede aşağı regüle edildiğini tespit edilmiştir. Bazı HCC örneklerinde ise miR-122 ekspresyonu saptanmazken, bazı örneklerde önemli derecede azaldığını gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada sıçanlarda folat ve metilden fakir diyetle besleyerek HCC modeli oluşturulmuştur. Folat ve metilden fakir diyetle beslemede 36 haftada preneoplastik nodüller oluşurken, 54 hafta sonra HCC'ler oluşmuştur. Oluşturulan sıçan gruplarının her birinden 4'er sıçan 9, 18, 36 veya 54. haftada öldürülmüştür. Yapılan incelemede 36 haftadan sonra normal diyete geçen sıçanlarda miR-122'nin aşağı regülasyonu

gözlenmezken, folat ve metilden fakir diyetle beslenmeye devam eden sıçanlarda 54 hafta sonra HCC gelişmiş ve miR-122 ekspresyonunda aşağı regülasyon olduğu gözlemlenmiştir. miR-122 regülasyonunda olan bu değişiklik HCC oluşumu ile bağdaştırılmıştır (Kutay ve ark., 2006).Bai ve ark.,2009) tarafından yapılan çalışmada 16 hepatosellüler karsinoma örneğinin 14'ünde miR-122 ekspresyonunun önemli derecede azaldığı, diğer iki HCC örneğinde ise komşu sağlam karaciğer dokularıyla karşılaştırıldığında arttığı tespit edilmiştir. Fonksiyonel çalışmalarda miR-122 ekspresyonunun tümoral hücre büyümesini önemli derecede inhibe ettiği ve replikasyon potansiyellerini %48 oranında azaltması ile ilişkilendirilmiştir. Hepatosellüler karsinoma hücre kültürleri ve 104 hastadan toplanan HCC dokusu ve bu dokulara karşılık gelen tümoral olmayan dokular üzerinde yapılan araştırmada miR-199a-5p'nin HCC hücrelerindeki Warburg etkisinin düzenlenmesindeki rolünü incelemişlerdir. miR-199a-5p'nin yeniden ekspresyonuyla glukoz alımı, laktat üretimi ve LDH aktivitesi üzerinde önemli bir düşüş görülmüştür. Bu bulgularla miR-199a-5p'nin HCC hücrelerindeki Warburg etkisini inhibe edebileceğini düşünmüşlerdir (Li ve ark., 2017).Song ve ark., 2014, hepatosellüler karsinoma hücre kültürleri ve 40 hastadan topladıkları HCC örnekleri ve bu dokulara karşılık gelen tümoral olmayan hücreler üzerinde incelemeler yapmışlardır. HCC dokuları bu dokulara karşılık gelen tümoral olmayan dokular ile karşılaştırıldığında HCC dokularındaki miR-199a ekspresyonunda azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada miR-199a'nın ekspresyonunun HCC hastalarının klinik özellikleri veya prognozu arasındaki ilişkide değerlendirilmiştir. HCC örneklerindeki miR-199a ekspresyon seviyeleri hayatta kalım analizi için kullanılmıştır ve miR-199a'nın aşağı regülasyonunun zayıf hasta prognozu ile kayda değer derecede ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir.MiR-199a-3p'nin HCC hücre hatlarındaki etkilerini incelemek amacıyla 39 hastadan HCC ve sirotik doku örnekleri alınmıştır. HCC hücre hatlarına 100 nmol/L pre-miR199a-3p, anti-miR-199a-3p ya da negatif kontrol prekürsörü ve miRNA inhibitörü verilmiştir. Çalışmada miR-199a-3p'nin HCC hücrelerinde mTOR ve c-Met translasyonunu baskıladığını, bununla birlikte miR-199a-3p'nin hücre siklusunun düzenlenmesine, invazivliğe katkı sağladığı ve HCC hücrelerini doksorubisin tedavisine ve hipoksiyle indüklenmiş apoptozise karşı duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Fornari ve ark., 2010).



Şekil 4. HCC ve tümoral olmayan dokulardaki en çok bulunan 20 miRNA'yı gösteren pasta grafiği. Bunlardan en çok bulunan 16 tanesi hem HCC hem de tümoral olmayan dokularda gözlenir. En çok bulunan 5 miRNA saptanabilir olanların %58'ini oluşturmaktadır. miR-122 karaciğer dokusunda en çok bulunan miRNA olmakla birlikte hem HCC hem tümoral olmayan dokularda en çok bulunan 7. miRNA'dır (Shen ve ark., 2015).

7.4. Alkolik Ve Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığında MikroRNA'LAR

Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (alkole bağlı olmayan hepatit) yoğun alkol kullanımı, ilaçlar veya yağlı karaciğer hastalığına neden olabilecek faktörlerin var olmadığı durumlarda görüntüleme yöntemleri ve histopatoloji gibi yöntemlerle tespit edilebilen hepatik steatoz olarak tanımlanır. Hastalık çoğunlukla obezite, tip 2 diabetus mellitus, hiperinsülinemi, hipergliseridemi ve hipertansiyon ile ilişkilidir.(Benhamouche-Trouillet ve Postic, 2016; Budd ve Cusi, 2020). Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığına sahip insanlarda ve hayvan modellerinde miRNA'lar sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede önemli farklılıklar gösterir. Bununla birlikte hastalığın erken teşhisinde ve takibinde ALT gibi rutin biyokimyasal parametrelerden üstün olabileceği ifade edilmektedir (Pirola ve ark., 2015; Yamada ve ark., 2015). Hastalığın prognozu değerlendirildiğinde farklı miRNA'ların ekspresyon seviyeleri değişmekte ve biyobelirteç olarak beraber değerlendirilmelerinin tanıda oldukça faydalı olacağı ifade edilmektedir (Kim ve ark., 2021).Alkol hepatositlerde oksidatif metabolik yol üzerinden nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) NADH'ye indirgenir. Bu durum trigliseritlerin ve yağ asitlerinin oksidasyonunu inhibe ederek lipogenezi arttırır. Aşırı alkol tüketiminde yağlı karaciğer hastalığı (alkolik hepatitis) ilerleyerek siroz ile

sonuçlanabilir. Alkolün neden olduğu karaciğer hasarında endotoksinlerin lipopolisakkarit formunda bağırsaklardan hepatositlere translokasyonu da oldukça etkilidir (Shah, Royer ve John, 2023).Kronik alkol alımında fare karaciğerinde miR-122 ekspresyonundaki anormalliklerle beraber mir-320, miR486, miR705, miR-1224 ekspresyonunda artış görülürken miR-27b, miR214, miR-199a-3p, miR-182, miR-183, miR-200a ekspresyonunda azalma görülür. miR-182, miR-183 ve miR-199-3p ise alkole bağlı olmayan karaciğer hasarında yukarı regüle edilir. MikroRNA'ların alkolik ve alkole bağlı olmayan karaciğer hasarındaki davranışlarındaki bu farklılıklar hastalığın temelinin bulunmasında önemli bilgiler sağlamaktadır (Dolganiuc ve ark., 2009). MikroRNA-212 en çok jejenum, ileum ve kolonda eksprese edilir. Bununla birlikte dalak, karaciğer, akciğer, böbrek, kalp gibi organlarda da eksprese edilmektedir. Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında alkolik karaciğer hasarına sahip hastalarda anlamlı derecede yüksek seviyede eksprese edilir. İnsan kolon dokusunda eksprese edilen miR-145'in alkolik karaciğer hastalığında sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında ekspresyonunda anlamlı farklılık görülmemiştir. Bu durum miR-212'nin alkol kaynaklı bağırsak bariyeri geçirgenliğinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (Cummins ve ark., 2006; Tang ve ark., 2008).

7.5. Viral Hepatitiste MikroRNA'LAR

Enfeksiyöz hastalıklarda miRNA'ların hastalığa hatta hastalığın nedenine göre ekspresyonunda artma veya azalma görülebilmekte ve hastalık sürecine dahil olabilmektedir. Karaciğerde yüksek oranda eksprese edilen miR-122 hepatit C virüsünün (HCV) replikasyon sürecine dahil olmakta ve HCV replikasyonunu arttırmaktadır. Fare ve şempanzelerde yapılan denemelerde miR-122 inhibisyonunun HCV düzeylerini düşürdüğü görülmüştür (Jopling, Yi, Lancaster, Lemon ve Sarnow, 2005; Krützfeldt ve ark., 2005; Lanford ve ark., 2010).HCV enfeksiyonu dünya çapında milyonlarca insanı etkilemekte ve hastalığa sahip bireyler ara sıra veya kronik olarak alkol tüketmektedir. Alkol tüketimi ve HCV karaciğer hasarında sinerjistik etkilere sahip olmakla beraber aralarındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. Alkol kullanımında miR-122 seviyesi artar. miR-122 siklin G1 ekspresyonunu inhibe ederek HCV RNA seviyelerini önemli ölçüde arttırır ve HCV replikasyonunu kolaylaştırır (Hou, Bukong, Kodys ve Szabo, 2013).HCV ile enfekte olmuş hastalarda miR-449a

seviyesi iki kattan fazla aşağı regüle edilmektedir. Alkolik hepatit, alkole bağlı olmayan hepatit ve sağlıklı bireylerde ise miR-449a ekspresyonunda anlamlı bir farklılık görülmemektedir. Bu nedenle miR-449a HCV enfeksiyonunu takiben karaciğerde spesifik olarak aşağı regüle edildiği söylenebilir (Sarma ve ark., 2012).

8. SONUÇ

MikroRNA'lar 20. Yüzyılın başında keşfedildiğinden bu yana birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Ökaryotik canlılarda fizyolojik olarak birçok miRNA eksprese edilmektedir. Fizyolojik koşullarda eksprese edilen MiRNA'ların bazıları patolojik koşullarda artma eğilimi gösterirken bazıları azalma eğilimi göstermekte ve bazı miRNA'lar ise patolojik koşullarda salgılanmaktadır. Tüm bunlar göz önüne alındığında miRNA'lar insan ve hayvanları etkileyen birçok hastalık için değerli biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedir.

9.KAYNAKÇA

An, F., Gong, G., Wang, Y., Bian, M., Yu, L., Wei, C. (2017). MiR-124 acts as a target for Alzheimer's disease by regulating BACE1. *Oncotarget*, 8(69), 114065–114071.

Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F.,Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 5003–5008.

Bai, S., Nasser M.W., Wang, B., Hsu, S.H., Datta, J., Kutay, H., Ghoshal, K. (2009). MicroRNA-122 Inhibits Tumorigenic Properties of Hepatocellular Carcinoma Cells and Sensitizes These Cells to Sorafenib. *The Journal Of Bıologıcal Chemıstry*, 284(46), 32015-32027.

Benhamouche-Trouillet, S., Postic, C. (2016). Emerging role of miR-21 in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, 65(11), 1781–1783.

Boughey, J.G.F.,Graff-Radford, N.R. (2007). Alzheimer's Disease. Neurology and Clinical Neuroscience içinde (First Edit., ss. 846–858). *Philadelphia: Mosby.*

Budd, J., Cusi, K. (2020). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: What Does the Primary Care Physician Need to Know? *American Journal of Medicine*, 133(5), 536–543.

Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R. (2004). Human microRNA's are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12), 1957-1966.

Cao, F., Liu, Z.,Sun, G. (2020). Diagnostic value of miR-193a-3p in Alzheimer's disease and miR-193a-3p attenuates amyloid-β induced neurotoxicity by targeting PTEN. *Experimental Gerontology*, 130.

Castoldi, M., Spasic, M.V., Altamura, S., Elmen, J., Lindow, M., Kiss, J., Muckenthaler, M.U. (2011). The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(4), 1386-1396.

Chan, F. K.-M. (2014). Programmed Necrosis/Necroptosis: An Inflammatory Form of Cell Death. H. Wu (Ed.), Cell Death içinde (ss. 211–228). New York.

Chang, J., Nicolas, E., Marks, D., Sander, C., Lerro, A., Buendia, M.A., Taylor, J.M. (2004). miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biology*, 1(2), 106–113.

Chatterjee, K., Wan, Y. (2018) RNA. *Encyclopedia Britannica*, 13 Jul. https://www.britannica.com/science/RNA. Accessed 10 May 2021.

Chen, Y., Fu, L. L., Wen, X., Liu, B., Huang, J., Wang, J. H. ve Wei, Y. Q. (2014). Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy. *Apoptosis*, 19(8), 1177–1189.

Cummins, J. M., He, Y., Leary, R. J., Pagliarini, R., Diaz, L. A., Sjoblom, T., Velculescu, V. E. (2006). The colorectal microRNAome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(10), 3687–3692.

Das, S., Ferlito, M., Kent, O.A., Fox-Talbot, K., Wang, R., Liu, D., … Steenbergen, C. (2012). Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart. *Circulation Research*, 110(12), 1596–1603.

Davis-Dusenbery, B.N., Hata, A. (2010). Mechanims of control of microRNA biogenesis. *Journal of Biochemistry*, 148(4), 381-392.

Denli, A.M., Tops B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting R.F. ve Hannon G.J. (2004). Processing of Primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231sc-235.

Dolganiuc, A., Petrasek, J., Kodys, K., Catalano, D., Mandrekar, P., Velayudham, A. ve Szabo, G. (2009). MicroRNA expression profile in Lieber-DeCarli diet-induced alcoholic and methionine choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis models in mice. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 33(10), 1704–1710.

Dragomir, M.P., Knutsen, E. ve Calin, G.A.(2018). SnapShot: Unconventional miRNA functions. *Cell.* 174(4), 1038-1038.e1.

Edelstein, C.L. (2008). Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 15(3),222-234.

Eiring, A.M., Harb, J.G., Neviani, P., Garton, C., Oaks, J.J., Spizzo, R., Perrotti, D. (2010). miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*, 140(5), 652–665.

Esau, C., Davis, S., Murray S.F., Yu, X.X., Pandey, S.K., Pear, M., Monia, B.P. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metabolism*, 3(2), 87-98.

Esteller, M. (2011). Noncoding RNAs in human disease. *Nature Genetics*, 12(12), 861–874.

Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Croce, C.M. (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce pro-metastatic inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), E2110–E2116.

Favreau, A. J., Shaffiey, F., Cross, E. ve Sathyanarayana, P. (2013). Mir-590 Is a Novel STAT5 Regulated Oncogenic miRNA and Targets FasL In Acute Myeloid Leukemia. Blood.

Fornari, F., Milazzo, M., Chieco, P., Negrini, M., Calin, G.A., Grazi, G.L., Gramantieri, L. (2010). MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Research*, 70(12), 5184-5193.

Gerin, I., Clerbaux, L. A., Haumont, O., Lanthier, N., Das, A. K., Burant, C. F., Bommer, G. T. (2010). Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(44), 33652–33661.

Glowacki, F., Savary, G., Gnemmi, V., Buob, D., Van der Hauwaert, C., Lo Guidice, J.M., Cauffiez, C. (2013). Increased Circulating miR-21 Levels Are Associated with Kidney Fibrosis. *Plos One*, 8(2), e58014.

Gong, G., An, F., Wang, Y., Bian, M., Yu, L. J.,Wei, C. (2017). miR-15b represses BACE1 expression in sporadic Alzheimer's disease. *Oncotarget*, 8(53), 91551–91557.

Gregory, R.L., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Cooch, N., Shiekhattar R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014), 235-240.

Hamada, S., Masamune, A., Miura, S., Satoh, K.,Shimosegawa, T. (2014). MiR-365 induces gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by targeting the adaptor protein SHC1 and pro-apoptotic regulator BAX ☆. *Cellular Signalling*, 26(2), 179–185.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., Kim, N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes&Development,* 18(24),3016-3027.

Horie, T., Ono, K., Horiguchi, M., Nishi, H., Nakamura, T., Nagao, K., Kita, T. (2010). MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 107(40), 17321–17326.

Hou, W., Bukong, T. N., Kodys, K., Szabo, G. (2013). Alcohol Facilitates HCV RNA Replication Via Up-Regulation of miR-122 Expression and Inhibition of Cyclin G1 in Human Hepatoma Cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research,* 37(4), 599–608.

Hsu, S. H., Wang, B., Kota, J., Yu, J., Costinean, S., Kutay, H., Ghoshal, K. (2012). Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *Journal of Clinical Investigation,* 122(8), 2871–2883.

Huang, G., Nishimoto, K., Zhou, Z., Hughes, D.,Kleinerman, E. S. (2012). miR-20a encoded by the miR-17-92 cluster increases the metastatic potential of osteosarcoma cells by regulating Fas expression. Cancer research, 72(4), 908–916.

Huang, J.T., Wang, J., Srivastava, V., Sen, S., Liu, S.M. (2014). MicroRNA machinery genes as novel biomarkers for cancer. *Frontiers in Oncology*, 4(113), 1-9.

Huang, W. (2017). MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics. Walker, J.M., Borchert, G.M., Dou, D., Huan, J.L., Lan, W., Tan, M., Bin, W. (Eds.), *Bioinformatics in MicroRNA Research* (1. ed., pp. 57-67). New York, NY:Humana Press.

Jeon, B.S., Lee, S.H., Hwang, S.H., Yi, H., Bang, J.H., Tham, N.T.T., Ku, H.O. (2020). Identification of urinary microRNA biomarkers for in vivo gentamicin-induced nephrotoxicity models. *Journal of Veterinary Science*, 21(6), e81.

Jin, Z. ve El-Deiry, W. S. (2005). Overview of Cell Death Signaling Pathways. Cancer biology & therapy, 4(2), 139–163.

John,K., Hadem, J., Krech, T., Wahl, K., Manns, M.P., Dooley, S., Bantel, H. (2014). MicroRNAs Play a Role in Spontaneous Recovery FromAcute Liver Failure. *Hepatology*, 60(4), 1346-1355.

Jopling, C. L., Yi, M. K., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. ve Sarnow, P. (2005). Molecular biology: Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. Science, 309(5740), 1577–1581.

Kim, T. H., Lee, Y., Lee, Y. S., Gim, J. A., Ko, E., Yim, S. Y., Byun, K. S. (2021). Circulating miRNA is a useful diagnostic biomarker for nonalcoholic steatohepatitis.

Kozomara, A., Birgaoanu, M. ve Jones, S.G. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1),155-162.

Krupa, A., Jenkins, R., Luo, D.D., Lewis, A., Philips, A., Fraser, D. (2010). Loss of MicroRNA-192 Promotes Fibrogenesis in Daibetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(3), 438-447.

Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R., Jacks, T. (2007) Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature Genetics*, 39(5),673–677.

Kutay, H., Bai, S., Datta, J., Motiwala, T., Pogribny, I., Frankel, W., Kalpana, G. (2006). Downregulation of miR-122 in the Rodent and Human Hepatocellular Carcinomas. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(3), 671-678.

Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M., Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with "antagomirs". Nature, 438(7068), 685–689.

Lanford, R. E., Hildebrandt-Eriksen, E. S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M. E., Ørum, H, H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. Science, 327(5962), 198–201.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. ve Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology*. 12(9), 735–739.

Landthaler, M., Yalcin, A. ve Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Current Biology*, 14, 2162–2167.

Lauressergues, D., Couzigou, J.M., Clemente, H.S., Martinez, Y., Dunand, C., Becard, G. ve Combier, J.P. (2015) Primary transcriptsof microRNAs encode regulatory peptides. *Nature*, 520, 90-93.

Lawrie, C. H. (Ed.). (2013). MicroRNAs in medicine. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.

Lee, R.C., Feinbaum R.L. ve Ambros, R. (1993). The C. elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to lin-14. *Cell*, *116*(116), 843–854.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Kim, V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 25, 415-419.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., ve Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal*, 23(20), 4051-4060.

Lehmann, S.M., Krüger, C., Park, B., Derkow, K., Rosenberger, K., Baumgart, J., Lehnardt, S. (2012). An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, 15(6), 827–835.

Lei, X., Lei, L., Zhang, Z., Zhang, Z., Cheng, Y. (2015). Downregulated miR-29c correlates with increased BACE1 expression in sporadic Alzheimer's disease. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 8(2), 1565–1574.

Li, B., He, L., Zuo, D., He, W., Wang, Y., Zhang, Y., Yuan, Y. (2017). Mutual Regulation of MiR-199a-5p and HIF-1α Modulates the Warburg Effect in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Cancer*, 8(6), 940-949.

Li, P., Xu, Y., Wang, B., Huang, J. ve Li, Q. (2020). miR-34a-5p and miR-125b-5p attenuate Aβ-induced neurotoxicity through targeting BACE1. Journal of the Neurological Sciences, 413, 116793.

Liu, J., van Mil, A., Vrijsen, K., Zhao, J., Gao, L., Metz, C. H. G., Sluijter, J. P. G. (2011). MicroRNA-155 prevents necrotic cell death in human cardiomyocyte progenitor cells via targeting RIP1. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 15(7), 1474–1482.

Los, M., Van de Craen, M., Penning, L. C., Schenk, H., Westendorp, M., Baeuerle, P. A., Schulze-Osthoff, K. (1995). Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/ AP0-1- mediated apoptosis. Nature, 375(6526), 81–83.

Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., … Golub, T.R. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature Cell Biology,* 435(7043), 834–838.

Luo, Y., Wang, C., Chen, X., Zhong, T., Cai, X., Chen, S., … Zhang, C. (2013). Increased serum and urinary microRNAs in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Clinical Chemistry*, 59(4), 658-666.

Marquart, T. J., Allen, R. M., Ory, D. S. ve Baldán, Á. (2010). miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(27), 12228–12232.

McCormick, P.A. ve Jalan, R. (2018). Hepatic Cirrhosis. J.S. Dooley, A.S.F. Lok, G. Garcia-Tsao, M. Pinzani (eds.). *Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System*, (13. ed., pp. 107-126). John Wiley and Sons Ltd.

Mishra, P.J. ve Merlino G. (2009) MicroRNA reexpression as differentiation therapy in cancer. *The Journal of Clinical Investigation,* 119(8). 2119–2123.

Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., … Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30), 10513–10518.

Najafi-Shoushtari, S. H., Kristo, F., Li, Y., Shioda, T., Cohen, D. E., Gerszten, R. E., Näär, A.M. (2010). MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. Science, 328(5985), 1566–1569.

Nakano, H., Miyazawa, T., Kinoshita, K., Yamada, Y.,Yoshida, T. (2010). Functional screening identifies a microRNA, miR-491 that induces apoptosis by targeting Bcl-X(L) in colorectal cancer cells. International journal of cancer, 127(5), 1072–1080.

Noyan, A. (2010). *Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji* (18. bs.). Ankara : Meteksan Anonim Şirketi.

Paik, J.M., Golabi, P., Younossi, Y., Mishra, A. ve Younossi, Z.M. (2020). Changes in the Global Burden of Chronic Liver Diseases From 2012 to 2017: The Growing Impact of NAFLD. *Hepatology*, 72(5), 1605-1616.

Pirola, C. J., Gianotti, T. F., Castaño, G. O., Mallardi, P., Martino, J. S., Ledesma, M. M. G. L., … Sookoian, S. (2015). Circulating microRNA signaturein non-alcoholic fatty liver disease: From serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut*, 64(5), 800–812.

Qadir, X.V., Chen, W., Han, C., Song, K., Zhang, J. ve Wu, T. (2015). miR-223 Deficiency Protects against Fas-Induced Hepatocyte Apoptosis and Liver Injury through Targeting Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor. *The American Journal of Pathology*, 185(12), 3141-3151.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Ruvkun, G. (2000). The 21- nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. *Nature*, 403,901-906.

Rosenfeld, N., Aharonov, R., Meiri, E., Rosenwald, S., Spector, Y., Zepeniuk, M. ve Barshack, I. (2008). MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nature Biotechnolgy*, 26(4), 462–469.

Ruvkun, G. (2001). Glimpses of a Tiny RNA World. *Science*, 294(5543),797-799.

Sarma, N. J., Tiriveedhi, V., Subramanian, V., Shenoy, S., Crippin, J. S., Chapman, W. C. ve Mohanakumar, T. (2012). Hepatitis C Virus Mediated Changes in miRNA-449a Modulates Inflammatory Biomarker YKL40 through Components of the NOTCH Signaling Pathway. PLoS ONE, 7(11).

Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S. ve Van der Flier, W. M. (2016). Alzheimer's disease. Lancet (London, England), 388(10043), 505–517.

Schuller, F., Roy, S., Loosen, S.R., Alder, J., Koppe, C., Schneider, A.T., Roderburg, C. (2017). miR-223 represents a biomarker in acute and chronic liver injury. *Clinical Science*, 131(15), 1971-1987.

Shah, N., Royer, A. ve John, S. (2023). Alcoholic hepatitis. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.

Shen, J., Siegel, A.B., Remotti, H., Wang, Q. and Santella, R.M. (2015). Identifying microRNA panels specifically associated with hepatocellular carcinoma and its different etiologies. *Hepatoma Research*, 2, 151-162.

Song, J., Gao, L., Yang, G., Tang, S., Xie, H., Wang, Y., … Fan, D. (2014). MiR-199a Regulates Cell Proliferation and Survival by Targeting FZD7. *Plos One*, 9(10), e110074.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. ve Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.

Tang, Y., Banan, A., Forsyth, C. B., Fields, J. Z., Lau, C. K., Zhang, L. J. ve Keshavarzian, A. (2008). Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 32(2), 355–364.

Thanapirom, K., Treeprasertsuk, S., Soonthornworasiri, N., Poovorawan, K., Chaiteerakij, R., Komolmit, P., … Pinzani M. (2019). The incidence, etiologies, outcomes, andpredictors of mortality of acute liver failurein Thailand: a population-base study. *BMC Gastroenterology*, 19(1), 1-7.

Trebicka, J., Anadol, E., Elfimova, N., Roggendorf, M., Viazov, S., Wedemeyer, I., … Odenthal, M. (2013). Hepatic and serum levels of miR-122 after chronicHCV-induced fibrosis. *Journal of Hepatology*, 58(2), 234-239.

Tsai, W.C., Hsu, S.D., Hsu C.S., Lai, T.C., Chen, S.J., Shen, R., … Tsou, A.P. (2012). MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(8), 2884-2897.

Tujios, S.R. ve Lee, W.M. (2018). Hepatic Cirrhosis. J.S. Dooley, A.S.F. Lok, G. Garcia-Tsao, M. Pinzani (eds.). *Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System*, (13. ed., pp. 107-126). John Wiley and Sons Ltd.

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J. ve Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nature Cell Biology, 9(6), 654–659.

Vasudevan, S., Tong, Y., ve Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318(5858), 1931–1934.

Verbrugge, I., Johnstone, R. W. ve Smyth, M. J. (2010). SnapShot Extrinsic Apoptosis. Cell (C. 143).

Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. ve Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. Nature Cell Biology, 13(4), 423–435.

Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. ve Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. Nature Cell Biology, 13(4), 423–435.

Wang, G., Kwan, B.C.H., Lai, F.M.M., Choi, P.C.L., Chow, K.M., Li, P.K.T. ve Szeto, C.C. (2010). Intrarenal expression of microRNAs in patients with IgA nephropaty. *Laboratory Investigation*, 90(1), 98-103.

Wang, G., Kwan, B.C.H., Lai, F.M.M., Chow, K.M., Li, P.K.T., Szeto, C.C. (2010). Expression of microRNAs in the urinary sediment of patients with IgA nephropathy. *Disease Markers*, 28(2), 79-86.

Wang, G., Kwan, B.C.H., Lai, F.M.M., Chow, K.M., Li, P.K.T., Szeto, C.C. (2011). Elevated Levels of miR-146a and miR-155 in Kidney Biopsy and Urine from Patients with IgA Nephropathy. *Disease Markers*, 30(4), 171-179. doi: 10.3233/DMA-2011-0766.

Wang, G., Kwan, B.C.H., Lai, F.M.M., Chow, K.M., Li, P.K.T., Szeto, C.C. (2013). Urinary sediment miRNA levels in adult nephrotic syndrome. *Clinica Chimica Acta*, 418, 5-11.

Wang, K., Liu, F., Zhou, L. Y., Ding, S. L., Long, B., Liu, C. Y., … Li, P. F. (2013). MiR-874 regulates myocardial necrosis by targeting caspase-8. Cell Death and Disease, 4(7).

Wang, P., Zhuang, L., Zhang, J., Fan, J., Luo, J., Chen, H., … Meng, Z. (2013). The serum miR-21 level serves as a predictor for the chemosensitivity of advanced pancreatic cancer, and miR-21 expression confers chemoresistance by targeting FasL. Molecular oncology, 7(3), 334–345.

Wang, P., Zhuang, L., Zhang, J., Fan, J., Luo, J., Chen, H., … Meng, Z. (2013). The serum miR-21 level serves as a predictor for the chemosensitivity of

advanced pancreatic cancer, and miR-21 expression confers chemoresistance by targeting FasL. Molecular oncology, 7(3), 334–345.

Wang, Q., Wang, Y., Minto, A.W., Wang, J., Shi Q., Li, X. ve Quigg, R.J. (2008). MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy. *FASEB Journal*, 22(12), 4126-4135..

Wang, R. ve Zhang, J. (2020). Clinical significance of miR-433 in the diagnosis of Alzheimer's disease and its effect on Aβ-induced neurotoxicity by regulating JAK2. Experimental Gerontology, 141.

Wang, R. ve Zhang, J. (2020). Clinical significance of miR-433 in the diagnosis of Alzheimer's disease and its effect on Aβ-induced neurotoxicity by regulating JAK2. Experimental Gerontology, 141.

Wei, Y., Li, L., Wang, D., Zhang, C.Y. ve Zen, K. (2014). Importin 8 regulates the transport of mature microRNAs into the cell nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 289(15),10270-10275.

Weinmann, L., Höck, J., Ivacevic, T., Ohrt, T., Mütze, J., Schwille, P., … Meister, G. (2009). Importin 8 is a gene silecing factor that targets argonuate proteins to distinct mRNAs. *Cell*, 136(3), 496-507.

Wightman, B., Ha, I. ve Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. *Cell*, *75*(5), 855–862.

Wojciechowska, A., Braniewska, A. ve Kozar-Kominska, K. (2017). MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Advances in Clinical and Experimental Medicine,* 26(5),865-874.

Yamada, H., Ohashi, K., Suzuki, K., Munetsuna, E., Ando, Y., Yamazaki, M., … Hashimoto, S. (2015). Longitudinal study of circulating miR-122 in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease. Clinica Chimica Acta, 446, 267–271.

Yanumula, A. ve Cusick, J. K. (2022). Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Yuan, S. ve Akey, C. W. (2013). Apoptosome Structure , Assembly , and Procaspase Activation. Structure (London, England : 1993), 21(4), 501–515.

Zeliger, H. I. (2023). Alzheimer ' s disease. H. I. Zeliger (Ed.), Oxidative Stress içinde (ss. 291–297). Academic Press.

Zeng, C., Wang, R., Li, D., Lin, X.J., Wei, Q.K., Yuan, Y., … Zhuang, S.M. (2010). A novel GSK-3 beta-C/EBP alpha-miR-122-insulin-like growth factor 1 receptor regulatory circuitry in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 52(5), 1702-1712.

Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., … Weber, C. (2009). Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. Science Signaling, 2(100).

Zhang, H., Liu, W., Ge, H. ve Li, K. (2021). Aberrant expression of miR-148a-3p in Alzheimer's disease and its protective role against amyloid-β induced neurotoxicity. Neuroscience Letters, 756.

Zhang, H., Liu, W., Ge, H. ve Li, K. (2021). Aberrant expression of miR-148a-3p in Alzheimer's disease and its protective role against amyloid-β induced neurotoxicity. Neuroscience Letters, 756.

Zhang, J. ve Wang, R. (2021). Deregulated lncRNA MAGI2-AS3 in Alzheimer's disease attenuates amyloid-β induced neurotoxicity and neuroinflammation by sponging miR-374b-5p. Experimental Gerontology, 144.

Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., … Zhang, C. Y. (2012). Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: Evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. Cell Research, 22(1), 273–274.

Zhang, Y., Schiff, D., Park, D. ve Abounader, R. (2014). MicroRNA-608 and microRNA-34a regulate chordoma malignancy by targeting EGFR, Bcl-xL and MET. PloS one, 9(3).

Zhong, Z., Yuan, K., Tong, X., Hu, J., Song, Z., Zhang, G., … Zhang, W. (2018). MiR-16 attenuates β-amyloid-induced neurotoxicity through targeting β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 in an Alzheimer's disease cell model. NeuroReport, 29(16), 1365–1372.

Zhou, J. X. ve Li, X. (2015). Apoptosis in Polycystic Kidney Disease: From Pathogenesis to Treatment. Xiaogang Li (Ed.), Polycystic Kidney Disease içinde (ss. 197–230). Brisbane.

Zhou, M., Liu, Z., Zhao, Y., Ding, Y., Liu, H., Xi, Y., … Tan, M. (2010). MicroRNA-125b Confers the Resistance of Breast Cancer Cells to Paclitaxel through Suppression of Pro-apoptotic Bcl-2 Antagonist Killer

1 (Bak1) Expression * □. The Journal of Biological Chemistry, 285(28), 21496–21507.

,Zhou, W. ve Yuan, J. (2014). SnapShot: Necroptosis. Cell (C. 158). Elsevier.

BÖLÜM 12

KEDİ ALERJİSİ VE BENGAL KEDİSİ

Dr. Mehmet KARTAL

[1]Dr. Mehmet Kartal İstanbul Gelişim Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Fakültesi, İstanbul, Türkiye, mkartal84@gmail.com, ORCID ID 0000-0001-7364-0875

1. GİRİŞ

Alerji, alerjenler olarak adlandırılan ve vücudun kendine ait olmayan moleküllere karşı bireyin sahip olduğu antikorların aşırı duyarlılık reaksiyonları gerçekleştirmesidir. Başka bir deyişle bireyin bağışıklık sisteminin zararlı tarafıdır. Alerjen olarak nitelendirilen maddeler, tozlar, besinler, polenler, akarlar, hayvan tüyleri ve parazitler olabilir. Alerji her yaş gurubunda görülebilir. Çoğunlukla genetik olduğu düşünülse de çevresel faktörlerin etkisi ile değişik yaşlarda alerji ortaya çıkmaktadır. Alerjenlerin çoğu, moleküler ağırlıkları 5000 ila 100.000 Da arasında değişen proteinler veya glikoproteinlerdir, ancak polisakkaritler ve düşük moleküler ağırlıklı maddeler de alerjik olabilir. Yaygın alerjenler arasında polenler, mantar sporları, ev tozu akarları ve hayvan epitel materyalleri bulunur. Hayvanlar, her türe özgü formlarda alerjenler üretir. Kedi alerjeni, en önemlisi Fel d 1, yüzer ve "yapışkandır", yani havada kolayca kalır ve kaynak kaldırıldıktan sonra bir evde altı ile dokuz aya kadar sürebilir. Kedi alerjeni giysilere yapışır ve okullar gibi halka açık yerlerde bulunabilir. Köpek alerjeni, özellikle Can f 1, kepek, tükürük, idrar ve serumda bulunur. Tüm köpek ırkları alerjenik proteinler üretir (Stewart ve ark., 2014).Alerjenler vücuda soluma, yutma, enjeksiyon veya temas yoluyla girer. Genetik yatkınlık ve çevresel faktörler, bir bireyin bir alerjene karşı duyarlı olup olmayacağını belirler ve daha sonra alerjene yeterli konsantrasyonda maruz kalınması, spesifik IgE bağı ile etkileşerek bir fizyolojik tepkiyi tetikler (Dawn ve ark., 2019) .

2.Kedi Allerjenleri

Modern şehirlerin çoğunda en çok tercih edilen evcil hayvan türleri kediler ve köpeklerdir ve bu evlerde yaşayan çocukların birçoğu kedi ve köpek döküntülerinde bulunan proteinlere karşı alerjik olabilirler. Evcil kedilerin (Felis domesticus), evde bulunan alerjenlerin en yaygın kaynaklarından biri olduğu ve atopik hastaların yaklaşık %20'sinde IgE aracılı alerjik hastalık oluşturduğu kanıtlanmıştır (Erwin ve ark., 2003). Kedi alerjisinin semptomları, rinit ve konjunktivitin hafif belirtilerinden şiddetli astım formlarına kadar değişir. Fel d 1, kedi alerjisi olan hastaların %90'ından fazlası tarafından tanınan ve kedi tüyündeki toplam alerjenik aktivitenin %60-90'ını oluşturan majör kedi alerjenidir (Portnoy ve ark., 2012;Curin ve ark.,2014) . Ayrıca, ana ve en çok çalışılan kedi alerjeni Fel d 1, kalıcıdır ve kapalı yerleşim alanlarında,

kedili veya kedisiz evlerden alınan toz örneklerinde, kamu binalarında ve ulaşımda her yerde bulunur ve bu da alerjenden kaçınmayı zorlaştırır (Dawn ve ark., 2019). Alerjen proteinleri için terminoloji, Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birliği tarafından oluşturulmuştur. Standart terminoloji, cinsin ilk üç harfini, ardından türün ilk harfini ve ardından bir Arap rakamı kullanır; italik değiller. Örneğin, kedi Felis domesticus'tur ve birincil alerjen için alerjen protein terminolojisi Fel d 1.3'tür (Chapman, 2008). İmmunohistokimyasal ve moleküler çalışmalar Fel d 1'den başla kedi alerjenlerinin olduğunu kanıtlamıştır. Dünya Sağlık Örgütü/Uluslararası İmmünolojik Dernekler Birliği (WHO/IUIS) tarafından sekiz Felis domesticus moleküler alerjeni Fel d 1 ile Fel d 8 olarak kabul edilmiştir[.Bunlar: uteroglobin benzeri protein (Fel d 1), serum albümin (Fel d 2), sistatin (Fel d 3), lipokalinler (Fel d 4 ve Fel d 7), immunoglobulin A (Fel d 5) , immunoglobulin M4 (Fel d 6) ve latherin benzeri protein (Fel d 8)'dir (Popescu ve ark., 2021). Serum albümini Fel d 2, tehlikede önemli bir protein olmasına rağmen, minör bir kedi alerjenidir. Bütün kediler bu alerjene sahiptir. İnsan dışı serum albümin duyarlılığının biyolojik belirtecidir. Domuz (rSus d1/nSus s1) ve diğer serum albüminleri sığır (nBod d) 6, köpek (nCan f 3) ve at (nEqu c 3) ile çapraz reaksiyon verir. Sistatin Fel d 3 ise minör bir alerjendir. Lipokalin Fel d 4, majör bir antijendir ve asıl üretim yeri tükürük bezleridir. Aynı şekilde tükürük bezlerinde sentezlenen Fel d 1 ile karşılaştırıldığında tükürükte daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Bu kedi alerjeni, kedilerde kimyasal iletişimi sağlarken farelerde savunma davranışı olarak ortaya çıkararak bir kairomon görevi görür. Diğer hayvanların lipokalinlerine karşı çapraz duyarlılık ,köpek lipokalin rCan f 6, at lipokalin rEqu q 1 ve fare lipokalin nMus m 1'e karşı ise çapraz reaksiyon gösterir. İmmunoglobulin A Fel d 5 ve immunoglobulin M Fel d 6, kedi tükürüğü, serumunda ve ayrıca doğal kedi tüyü döküntülerinde immunoglobulin olarak yüksek konsantrasyonlarda bulunur, ancak moleküler alerjen bileşenleri olarak kullanılmaz. Lipokalin Fel d 7, minör kedi alerjenidir, köpek lipokalinine karşı çapraz duyarlılığın biyolojik belirtecidir, lipokalin köpek rCan f 1 ile çapraz reaksiyon verir. Bahsi geçen kedi alerjenleri, IgE aracılı alerjik duyarlılığın altında yatan moleküler mekanizmalarda yer alır ve farklı çapraz reaksiyonlar. Bu alerjenler için temsili izoformlar açıklanmıştır (Ichikawa ve ark., 2001; Popescu ve ark. 2021). Fel d 1, Can f 1, Rat n 1 ve Mus m 1'in enzimatik aktiviteye sahip olduğu gösterilmemiştir. Bu proteinlerin ortak özellikleri

büyüklükleri, sulu çözeltilerdeki çözünürlükleri ve havada taşınabilen partiküller üzerindeki fiziksel varlıklarıdır (Grönlund ve ark., 2008; Portnoy ve ark., 2012; Satyaraj ve ark., 2019). Kedi majör alerjeni Fel d 1, kristal yapı analizi, iki adet 18-kDa'luk non-kovalent bağlı heterodimerlerin oluşturduğu tetramer yapıda α-helikal bir proteindir. Her bir dimer, iki antiparalel polipeptit zincirden oluşur. Zincir 1 (H1-H4) ve zincir 2 (H5-H-8), sekiz tane anti-paralel sarmal oluşturur. Doğada, bu polipeptitler iki ayrı gen tarafından kodlanır ve daha sonra üç disülfür bağı ile kovalent olarak bağlanır (Curin ve ark., 2014; Tasaniyananda ve ark., 2016). Ayrıca Fel d 1 sıklıkla 38 kDa ağırlığında heterodimerlerin dimerleri halinde tetramerler olarak da tanımlanabilir. Bu alerjenin polimorfizmleri tanımlanmıştır. Fel d 1'in ikisi 1. zincirde ve diğeri 2. Zincirde bulunan üç IgE bağlayıcı epitopu tanınmıştır (Tasaniyananda ve ark., 2016).Bu alerjen, uteroglobin benzeri sekretoglobulin ailesine ait bir proteindir. İnsan Clara hücresi 10-kDa fosfolipid bağlayıcı protein ve progesteron bağlayıcı tavşan uteroglobini (uteroglobin benzeri protein) ile homologdur. Fel d 1'in kedi için biyolojik işlevi net olarak belirlenmemiştir, başlangıçta kedi derisinde koruyucu bir rolü olabileceği tartışılmaktadır (Grönlund ve ark., 2003; Arkestål ve ark., 2011; Curin ve ark., 2014; Bonnet ve ark.,2018; Bienboire-Frosini ve ark., 2020). Fel d 1'in fizyolojik rolü tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, Fel d 1'in anal bezler ve yağ bezleriyle yakın ilişkisi ve Fel d 1 zincirinin steroid bağlayıcı proteinlerle yapısal benzerlikleri, Fel d 1'in feromon bağlayıcı bir protein olduğunu düşündürür. Buna göre, hayvan kepeğindeki bir dizi alerjenik protein, retinoidler ve feromonlar gibi küçük hidrofobik molekül taşıyıcılarına bağlanır. Carayol ve arkadaşlarının çalışması bu hipotezi doğrulamaktadır (Carayol ve ark., 2000).Ayrıca Fel d 1 muhtemelen epitelyal savunma, bağışıklılığın düzenlenmesinde ve türler arası kimyasal iletişimde yer alır, bazı yağ asitlerine ve steroidlere iyi bir afinite ile bağlanır, en iyi ligandı sosyal etkileşimler üzerinde etkili bir kedi feromonu olan laurik asit ve uçucu bir steroid feromon olan androsterondur. Fel d 1, kedilerin çeşitli anatomik bölgelerinde, özellikle yağ bezleri ve anal keseler tarafından, ayrıca tükürük ve lakrimal bezler tarafından üretilen ısıya dayanıklı bir proteindir. Fel d 1 öncelikle kedi derisinde ve kıl köklerinde bulunur. Kediler kendini tımar ederken, Fel d 1 tüylerin üzerine dağıtılır, ardından kepekle birlikte dökülür (Popescu ve ark., 2021; Brackett ve ark., 2022).Yaş, cinsiyet, cins, vücut ağırlığı, tüy uzunluğu veya

barınak (iç ve dış mekân) ne olursa olsun tüm kediler Fel d 1 üretir. Fel d 1, testosteron kontrolü altında üretilir. Erkek kediler kısırlaştırılmamışsa dişilere göre daha fazla ve kısırlaştırmadan sonra 3-5 kat daha az Fel d 1 üretirken, üretimi eksojen testosteron uygulamasıyla kısırlaştırma öncesi seviyelere geri getirilebilir. Evcil kedilerin kürklerinde Fel d 1 seviyeleri Fel d 4'e göre anlamlı derecede yüksek çıkmış ve kediden kediye değişkenlik ortaya çıkmıştır. Kedi tüyü üzerindeki Fel d 1 miktarı 1 µg/g ile 1770 µg/g arasında değişebilir ve boyun bölgesindeki tüylerde yüksek konsantrasyonlar vardır. Saç uzunluğu Fel d 1 üretimini etkilemiyor gibi görünüyor. Fel d 1, kedi tükürüğünde de bulunur, ancak Fel d 4'ten daha düşük konsantrasyonlarda bulunur (Popescu ve ark., 2021). Fel d 1'in boyutu 5 mm'ye kadar ulaşabilir, bu da kedi alerjeninin küçük bronşiollere ulaşmasını ve astım semptomlarına neden olur. Kedi alerjeni giysilere yapışır ve okullar gibi halka açık yerlerde bulunabilir . Yine Fel d1 gibi etki gösteren köpek alerjeni, özellikle Can f 1, kepek, tükürük, idrar ve serumda bulunur. "Hipoalerjenik" olarak nitelendirilen ırklar ve "tüysüz" köpekler dahil tüm ırklar alerjenik proteinler üretir (Poole ve ark., 2020). Kedi alerjeni Fel d 1 ilk olarak Ohman ve meslektaşları tarafından saflaştırıldığından beri, kedi döküntülerinin alerji oluşturma gücünü tahmin etmek ve toz numunelerinde ve havadaki kedi alerjen miktarını ölçmek için kullanılmıştır (Ohman ve ark., 1974). Bir alerjen, maruz kalma indeksi olarak görev yapabilmektedir. Şöyle ki, eğer alerjen bir kaynaktan gelen alerjenin büyük bir bölümünü (en az %40'ını) temsil ediyorsa veya alerjenin ekstrakttaki diğer alerjenlerle tutarlı bir ilişkisi varsa o alerjen maruz kalma indeksi olarak işlev görür. Fel d 1'in, kedi ekstraktındaki alerjenik aktivitenin büyük bir bölümünü (yaklaşık %65 kadarı) oluşturduğu görülür. Bu yüzden kedi alerjenlerine maruz kalmayı ölçmek veya bağışıklık tepkilerini incelemek için Fel d 1'in kullanımı bilimsel çalışmalarda yer almaktadır. Çünkü alerjik etkilere sahip köpek Can f 1, rat Rat n 1, fare Mus m1 proteini için tam bir kanıt yoktur. Köpek, rat ve fare alerjenleriyle karşılaştırıldığında Fel d 1'in konsantrasyonları çok fazla bulunmuştur (Erwin ve ark., 2003) . Kedi bulunan evlerden çıkan tozlar yüksek konsantrasyonda alerjen içerir (1 mg/g'a kadar toz). Kedi alerjeni yaygın olarak dağılır ve okullarda, kamu binalarında ve kedi olmayan evlerde 50 mg/g'a kadar bulunabilir. Kedi alerjeni, bir kedinin bulunduğu evlerde sürekli olarak havada asılı olarak bulunur (Gelber ve ark.,1993; Bollinger ve ark., 1998; Custovic ve ark., 1998). Ayrıca, ana ve en çok çalışılan kedi alerjeni Fel d 1, kalıcıdır ve

kapalı yerleşim alanlarında, kedili veya kedisiz evlerden alınan toz örneklerinde, kamu binalarında ve ulaşımda her yerde bulunur ve bu da alerjenden kaçınmayı zorlaştırır (Grönlund ve ark, 2008; Portnoy ve ark., 2012; Satyaraj ve ark., 2019). Evcil hayvan ekstraktlarındaki alerjenlere maruz kalma ile duyarlılık yada başka bir deyişle IgE antikorunun üretimi arasındaki karmaşık ilişki vardır ve duyarlılaşmış bireylerin astım riskinin arttığına dair tutarlı kanıtlar vardır. Pek çok çalışmada, kedi alerjisi olan hastalarda yaygın astım riskinin arttığı da görülmüştür. Aynı şekilde rat ve diğer kemirgenlere ait alerjenlere maruz kalmanın astım riskini arttırdığı bilinmektedir. Pozitif deri testine veya IgE antikoruna sahip semptomatik bireylerin kedi, köpek, küçük kemirgenler ve deney hayvanlarına daha az maruz kalmaları önerilmektedir. Hayvan alerjenleri kedi bulunan evlerin havasında kolayca ölçülebilir, kaçınma önlemleri havadaki alerjen izlenerek veya toz numunelerinde alerjen (örn. Fel d 1, Can f 1) ölçülerek değerlendirilebilir. Tozdaki alerjenin ölçümü geleneksel olarak tozun gramı başına alerjenin mikrogramı şeklindedir (Erwin ve ark., 2003).Wood ve çalışma arkadaşları tarafından yapılan kapsamlı araştırmalar, hayvan uzaklaştırıldıktan sonra evdeki Fel d 1 konsantrasyonunun giderek azaldığını ortaya koymuştur. Halılar ve mobilyalar evde kalırsa, kedi alerjen seviyelerinin 2 mg/g toz altına düşmesi genellikle 6 ila 12 hafta sürer. Agresif temizleme ile (örneğin, halıların kaldırılması, duvarların yıkanması) süreç hızlandırılabilir (Wood ve ark., 1989). Birden fazla çalışma, farklı kedi ve köpek türlerinin farklı derecelerde duyarlılığa neden olduğunu öne sürse de, erkek kedilerin ve erkek farelerin dişi bireylerinden daha fazla alerjen üretmesi dışında kanıtlar net değildir. Erkek kediler için kısırlaştırma operasyonunun alerjeni azaltabileceği bilinmektedir (Erwin ve ark., 2003). Nicholas ve arkadaşlarının kedilerin özelliklerine ve bunların Fel d 1 seviyeleri ile ilişkisine yönelik araştırmasında, yayınlanan literatürle tutarlı olarak, evde kedi sahibi olmanın artmış Fel d 1 seviyeleri ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu ve evde daha fazla kedi olmasının daha fazla kedi alerjeni ile ilişkili olduğunu bulunmuştur. Diğer yayınlara benzer şekilde, Fel d 1 düzeylerinin sadece erkek kedilerde istatistiksel olarak anlamlı olduğu; ancak bu bulguların, kısırlaştırılmış erkek kedilerin kısırlaştırılmamışlarına göre daha düşük Fel d 1 seviyelerine sahip olduğunu gösteren deneysel çalışmaların tersi olduğu görülmüştür. Mevcut çalışma ve diğer deneysel çalışmalar, Fel d 1 düzeylerinin kısırlaştırılmış ve kısırlaştırılmamış dişi kediler arasında anlamlı bir farklılık

göstermediğini göstermiştir. Bu veriler, kısırlaştırılmamış kedilerin bulunduğu evlerin, kısırlaştırılmış hayvanların bulunduğu evlere göre daha düşük kedi alerjen seviyelerine sahip olduğunu gösterse de, evdeki kedi alerjen seviyelerini en aza indirmek için evcil hayvan sahiplerinin kedilerini kısırlaştırmamalarını onaylamamaktadır (Nicholas ve ark., 2008). Ayrıca hayvanlar tarafından alerjen üretimini azaltmak için çeşitli kimyasallar önerilmiştir, ancak sonuçlar ikna edici olmamıştır. Asepromazin, kedilerde tükürük üretimini azalttığı için önerilmiştir, ancak bilindiği gibi Fel d 1 alerjeninin büyük kısmı deri kaynaklıdır (Klucka ve ark., 1995). Kedi alerjenlerini azaltmak için bir başka yöntem de kedileri yıkamadır. Bu fikir iki gözlemden doğmuştur. Birinci gözlemde, kedilerin tekrar tekrar yıkanmasıyla alerjen miktarının düştüğü bulunmuş; ikinci gözlemde ise birçok hasta alerjiyle ilişkili semptomlarının, kedinin düzenli olarak yıkanmasından sonra kontrol altına alındığını belirtmiştir. Bu fikrin öncül deneylerinde, haftalık yıkamadan sonra alerjen dağılımında çarpıcı bir düşüş olduğu gösterilmiştir. Ancak sonraki deneylerin sonuçları değişkendir; bazı durumlarda, yıkamadan 1 hafta sonra çok az etki bulunmuş ve alerjen dağılımının yalnızca birkaç gün azaldığı belirtilmiştir. Kedileri yıkamak, kediden miligram miktarlarda alerjeni uzaklaştırabilir ve uzun süreli yıkama, evde biriken alerjen miktarını azaltabilir. Bazı durumlarda kedinin düzenli olarak yıkanması alerjik hastaların kedilerini sahiplenmesini sağlayabilir (Erwin ve ark., 2003).Evcil hayvanların gen mutasyonları yoluyla daha düşük alerjenik miktarlarda evcil hayvan tüyü ürettiği iddia edilmektedir. Açıklanan bilimsel mantık ise genlerdeki mutasyon sonucu alerjiye neden olan alerjenlerin (Fel d 1 ve Can f 1) alerji yapmayacak hale getirildiği yönündedir. Ancak PubMed aramalarında "hipoalerjenik evcil hayvanlar" kavramını destekleyen bir kanıt bulunmamaktadır. Aksine Vredegoor ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hipoalerjenikk olarak nitelendirilen hayvanların kıl ve deri örneklerinde önemli derece yüksek miktarda Can fl antijenine rastlanmıştır ki bu oran herhangi hipolarjenik olmayan köpeğinkinden daha az değildir. (Lockey, 2012; Vredegoor ve ark., 2012) Yine Fel d1 gibi etki gösteren köpek alerjeni, özellikle Can f 1, kepek, tükürük, idrar ve serumda bulunduğu ve "hipoalerjenik" olarak nitelendirilen ırklar ve "tüysüz" köpekler dahil tüm ırkların alerjenik proteinler ürettiği kanıtlanmıştır (Poole ve ark., 2020). Fel d 1, kedi alerjisi olan hastaların *%95'inde IgE antikor aracılı cevabın oluşmasına neden olur ve kedi karşıtı

IgE'nin %60-90'ını oluşturur. Fel d 1'e yüksek düzeyde maruz kalma, alerjik ve alerjik olmayan kişilerde IgG4 antikor üretimini ortaya çıkaran değiştirilmiş Th2 bağışıklık tepkilerini harekete geçirir. Birkaç başka kedi alerjeni tanımlanmış olsa da (örn. Fel d 4), bunlar daha az alerjeniktir ve daha az klinik öneme sahiptir (Brackett ve ark., 2022).Ancak kedi ana alerjeni Fel d 1'in bir hipoalerjeni, rekombinant (r) Fel d 1 (DTE III)'in, daha önce T-hücre reaktivitesini koruduğu ve değiştirilmemiş rFel d 1 ile karşılaştırıldığında güçlü bir şekilde azaltılmış IgE bağlama kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Çünkü tek bir alerjen, saf ve iyi tanımlanmış rekombinant proteinler olarak büyük miktarlarda üretilebilir. Rekombinant alerjenler, doğal muadilleri ile aynı IgE bağlayıcı epitopları sergilemelidir, ancak efektör hücrelerin IgE aracılı aktivasyonunun neden olduğu yan etki riskini azaltmak için çeşitli şekillerde modifiye edilebilir. Bu konuda geliştirilen bir strateji, azaltılmış bir IgE bağlama kapasitesine sahip olan ancak tutulan bir T-hücresi reaktivitesi olan hipoalerjenler yapmaktır. Bu amaçla Saarne ve arkadaşları daha önce rekombinant (r) Fel d 1 üzerinde bir dizi genetik modifikasyon yoluyla ana kedi alerjeni Fel d 1'in hipoalerjenlerini üretmiştir. Daha sonra yine Saarne ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada hipoalerjen Fel d1 uygulamasının özellikle insan alerjilerinde faydalı olacağı görüşü kanıtlanmıştır. Bu çalışmaya göre oluşturulan fare modelinin akut alerjik hastalığı yansıttığı ve Fel d 1 hipoalerejinin tekrarlı uygulamasının kronik alerji modellemesinde T-hücre uyarımı üzerinde yaralı olduğu görülmüştür. Burada bildirilen terapötik tedavinin en bariz etkisi, bloke etme kapasiteli rFel d 1'e özgü IgG'nin indüklenmesidir. Bu etki hipoalerjen ve modifiye edilmemiş rFel d 1 ile tedavi edilen farelerde görülmüştür ve daha yüksek dozda rekombinant Fel d 1 ile tedavi edilen farelerde solunum yolu hiperaktivitesindede azalma eğilimi gözlenmiştir. (Saarne ve ark 2011).Alerjene özgü immünoterapi, alerji için hastalığı modifiye eden tek tedavidir ve kesildikten sonra bile uzun süreli etkileri vardır. Alerjene özgü immunoterapinin kedi kaynaklı astım için klinik olarak etkili olduğu birkaç çalışmada gösterilmiştir. Hastaların bu terapinin işe yarar olmasının, majör kedi alerjeni Fel d 1'e özgü IgG antikorlarının uyarılması ve deri ve solunum semptomlarının azalması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu bilgilerin ışığında hipoalerjeniteye ek olarak, alerjene özgü bloke edici IgG antikorlarını yüksek seviyelerde indükleyebilme yeteneği, deri altı immünoterapi için kullanılan bir molekülün uygunluğu için önemli olduğu

görülmüştür. Curin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hem aşılamada hem de bloke edici IgG antikorlarının indüksiyonunda ve tolerans indüksiyonunda faydalı olabilecek rekombinant hipoalerjenik Fel d 1 türevlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın sonunda kedi alerjisi için çeşitli terapötik veya önleyici yaklaşımlar için yararlı olması beklenen hipoalerjenik Fel d 1 türevleri tasarlanmış ve karakterize edilmiştir (Curin ve ark., 2014). Kedi alerjisine karşı geliştirilen yöntemlerden biri de antikor takviyesi yapılmış mamalarla kedilerin beslenmesidir. Anti-Fel d 1 poliklonal yumurta IgY antikoru ile takviye edilmiş kedi maması, kedi tükürüğündeki alerjen seviyelerini düşürerek, kedilerin tüylerinde tükürükten biriken Fel d 1'de %47 azalma sağladı. Anti-Fel d 1 aşısı (HypoCat) ile aşılanan kediler, kedi gözyaşı ekstraktlarında tespit edilen Fel d 1 seviyelerinde %50 azalma sergiledi ve bu da dokuz alerjik hastada semptom şiddetinde *%30 azalma ile sonuçlandı. Anti-Fel d 1 Kedi alerjisi olan hastalara uygulanan monoklonal IgG antikorları, IgE'nin alerjene bağlanmasını rekabetçi bir şekilde bloke etti ve hastaların %50'sinde semptom şiddetini *%60 oranında azalttı (Brackett ve ark., 2022). Yukarıda bahsedilen bilgilerin dışında bilimsel olarak kanıtlanmasa da bazı tür kedilerin veya köpeklerin bazı türlere göre daha az alerjiye sebep olduklarına inanılmaktadır. Köpeklerde bu türler labradoodle, poodle, spanish waterdog ve airedale terrier olarak bilinirken, kedilerde ise sfenks kedisi, bengal kedisi, balinese kedisi, birman kedisi ve cornish rex olarak belirtilmiştir (Lockey, 2012).Bengal kedisi, evcil kısa tüylü kedi (Felis silvestris catus) ile vahşi Asya leopar kedisinin (Prionailurus bengalensis) çaprazlamasıyla oluşan hibrit bir kedi türüdür. Bu çaprazlaşma sonunda ilk hibrit kuşakların erkekleri kısırdır ve sonuç olarak, doğurgan hibrit dişiler, sonraki nesillerden gelen erkek hibritlerle veya erkek evcil kedilerle çaprazlanır. Bengal kedilerinin farklı nesilleri, F (evlat için) artı nesil sayısı ile tanımlanır. Bu nedenle, bir evcil kedi ve bir Asya leopar kedisinden kaynaklanan bir Bengal kedisi F1 olacaktır ve bir F2, bir F1 ve bir evcil kedinin melezlenmesinin sonucu olacaktır (Martinez-Caja ve ark., 2021).

3. Bengal Kedisi

Literatüre bakıldığı zaman leopar kedisi (Prionailurus bengalensis) melezlerinin ilk yazılı kaynağının Harrison Weir tarafından yazılan " Our Cats and All about Them" adlı kitabı olduğu görülür (Harrison, 1892). Bu kitap Bengal kedisinden de bahsedilen ilk kitaptır. Daha sonra 1927 yılında "Cat

Gossips" adlı dergide bu melezlerden bahsedildi. Burada bahsi geçen konu Malay kabilelerinin leopar kedisini ve evcil kedileri nasıl besledikleri ve nasıl melezleştirdikleriydi. Leopar kedisiyle evcil kedinin çiftleştirilmesinin ilk yazılı kaynağı 1934 yılında çıkan "Belgian Science Journal"dı. 1946'da ise Amerikalı kedi yetiştiricisi Jean Mill'in benzersiz bir evcil kedi tutkusu, dişi bir leopar kedisiyle, siyah evcil bir kediyi çiftleştirme fikrini doğurdu. Bu sayede ortaya çıkan yavru F1 melezini oluşturdu. Daha sonra Jean Mill ikinci bir çiftleştirme ile birkaç yavru melez kedi daha elde etti. İlk melez yavru kediler genellikle leopar kedilerine benzer şekilde gergin kediler olarak yetiştiler. Bu melez kedilerin evcil kedilerden doğan yavru melez kedileri, leopar kedilerinden birkaç nesil uzakta olduktan sonra ancak mizaç olarak tatlı ve uysal bir hale gelebilmişti. 1985 yılında yeterli bir nesile ulaşan Bengal kedileri, mizaç olarak tamamen evcil olduklarını ve ve insanlar için tehlike oluşturmadığını kanıtlayarak kabul gördüler. Bugün ise Bengal kedileri dünyanın her yerinde ilgi uyandıran bir evcil hayvandır. Bu ilgi sahip oldukları leopar deseninin egzotik esintileri, yüksek zekâ seviyeleri, sahiplerine karşı olan sevgi ve bağları önemli rol oynamaktadır (Gay-Sarez, 2004). Bengal kedilerinin fiziksel özellikleri ele alındığında gövde uzun ve sağlamdır. Boyutları ortadan iriye doğru değişebilir. Dirençli olarak bilinen bir ırktır. Sahip olduğu bu direnci sağlam kemik yapısına borçludur. Bu ırkın özellikle erkek bireylerinin kas yapısı, erkekleri dişilerinden en ayırt edici en önemli özelliklerden biridir.



Şekil 1. Bengal kedisinin genel görünüşü (Çetintaş, Ç., 2023)

Kafa yapıları vücutlarına oranla daha küçüktür ve şekil olarak yuvarlaktır ancak uzunluğu genişliğinden fazladır. Kafatasının kulaklar arkasında kalan kısmı, sırta doğru yumuşak bir eğri ile iner. Başın genel görünümünün vahşi bir kediden farkı yoktur. Güçlü bir çeneye sahiptirler. Burun ile bir bütün izlenimi verir. Burunları hafif kabarık ve geniş bir haldedir. Ağızları da burunları gibi geniş ve dolgun görünümdedir. Bıyık tüyleri dikkat çekici derecede belirgindir. Çıkıntılı elmacık kemikleri belirleyici özelliklerindendir (Helgren, J.A., 1997).Bacaklarının uzunluğu orta uzunluktadır. Ön bacaklar arka bacaklarla karşılaştırıldığında, Arka bacakların daha uzun olduğu görülür. Ön ve arka ayaklar, büyük ve yuvarlaktır. Belirgin, büyük parmaklara sahiptirler (Helgren, J.A., 1997) .Kulak yapıları incelendiğinde diğer ırklara oranla boyutlarının daha kısa olduğu görülür. Taban kısmı geniş ve kulak uçları yuvarlaktır. Genel görünüm olarak tehditkâr bir sese odaklanmış gibi görünür. Dik kulakları en dip sesleri bile duyabilecek hassaslıktadır (Helgren, J.A., 1997) .Göz yapısına bakıldığında ise boyutlarının büyük olmadığı, şeklinin ise genelde oval ama bazen yuvarlaktır. İris'in renklerinin tüy renklerinden bağımsız olduğu görülür. En çok görülen iris renkleri kahverengi, sarı, turuncu ve yeşildir (Helgren, J.A., 1997).Kuyruk yapıları incelendiğinde taban kısmında kalın olarak başlayıp uçlara doğru hafif incelerek sivri bir uçla sonlandığı görülür. Kuyruğun desen yapısı ise vücut desenlerinden bağımsız olarak çoğunlukla çizgili bir yapıya sahiptir (Helgren, J.A., 1997) .



Şekil 2. Bengal kedisine özgün desenler (Çetintaş, Ç., 2023)

Tüylerinin uzunluğu çok kısa olarak bilinmektedir ve doku olarak yoğun bir dokuya sahiptir. Tüylerin desenleri benekliden mermer desenine kadar değişir. Benekli türlerde yer alan benekler rastgele veya yatay olarak dağılım gösterirler. Renk olarak, kahverengi tekir, sepya tekir, vizon tekir ve siyah gümüş tekir renklerinde bulunurlar. Bahsedilen renkler iki farklı tonda renklere sahiptir. Gövdenin bazal rengi doygun tonda ve belirgin, sahip oldukları desenler ise hafif silik tondadır. Karın bölgesi genellikle yoğun desen rengine sahiptir. Bu ırk neredeyse hiç tüy dökmez (Helgren, J.A., 1997) .Yaşam döngülerine bakıldığında, sağlıklı bir Bengal kedisinin 9 ile 15 yıl arasında yaşadığı görülür. Ancak, tüm kedilerde olduğu gibi Bengal kedilerinde de genotipik veya fenotipik sağlık sorunlarının ortaya çıkabileceği bilinmektedir. Bengal cinsi kedilerde en yaygın görülen hastalıklar düz göğüslü kedi yavrusu sendromu, ilerleyici retinal atrofi, kalça displazisi ve hipertrofik kardiyomiyopatidir (Martinez-Caje ve ark., 2021). Hipertrofik kardiyomiyopati sorunu özellikle yaşlı Bengal kedilerinde görülmektedir. Bir diğer sağlık sorunu ise retinal atrofidir ki Bengal kedilerinin göz retinasının bozulması onların körlüğe varan bir görme problemine neden olabilmektedir. Son olarak, Bengal kedileri anestezik maddelere karşı aşırı derecede hassas oldukları belirtilmelidir. Bu nedenle ovariohisterektomi, ovariektomi veya kastrasyon dâhil olmak üzere herhangi bir ameliyat sürecinde genel sağlık durumlarının dikkatle izlenmesi gerekir. Anestezi gerektiren durumlarda kullanılacak anestezik maddelere karşı alerjik bir reaksiyon oluşabileceği unutulmamalıdır. Atalarının görünüm özelliklerine sahip Bengal kedileri vahşi bir kedi görüntüsüne sahiptirler. Ancak bu vahşi görünümün altında herhangi evcil bir kedi gibi sevimli ve sevgi dolu bir kişilik yatar. Sahiplerine karşı gösterdikleri sonsuz sadakatleri ile bilinirler. Fazlasıyla meraklı ve bir oyun sever bir yapıta sahiptirler. Dikkat çekici zekalarıyla ünlüdürler. Ayrıca sahipleriyle güçlü bir sevgi ve iletişim bağları kurabilecek sosyal zekaya da sahiptirler. Enerjik ve girişken bir yapıları vardır. Yaşadığı ortamı çok çabuk benimseyebilme özelliğine sahiptirler. İhtiyaç duydukları ilgi ve sevgiyi sahiplerinden gördüğü takdirde son derece sadık, sevecen ve oyun oynamayı seven iyi bir arkadaş olurlar.



Şekil 3. Bengal kedisinin tüy yapısı (Çetintaş, Ç., 2023)

Anatomik olarak esnek vücutları sayesinde atletik ve çevik kediler olarak bilinen Bengal kedileri, tırmanmayı çok severler. Evin içindeki herhangi bir yüksek noktaya çıktıkları görülebilir. Ancak nesneleri devirmek gibi zararlı davranışlar göstermezler. Bahsedilen özelliklerinden ve özellikle tüy dökmemesinden dolayı alerjiye yatkın olan kişiler tarafından tercih edilmektedir. Çünkü literatüre bakıldığında kedi alerjenleriyle tüyler arasındaki ilişki birbiriyle bağlantılıdır. Şöyle ki, Ohman ve ark. yaptığı çalışmaya göre Fel d 1 esas olarak tükürükte üretilir ve kedi kendini tımarlamak için yaladığında tüyler üzerinde birikir. Ancak bunun yanı sıra Fel d 1'in esas olarak yağ bezleri tarafından üretildiği başka çalışmalarda belirtilmiştir (Carayol ve ark., 2000). Tüydeki Fel d 1 konsantrasyonları anatomik bölgeye göre değişir. Avner ve arkadaşları kedilerde Fel d 1 konsantrasyonlarının boyunda, göğüs, mide, sırt ve kalça bölgelerine göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Tüylerdeki Fel d 1 içeriğinin anatomik bölgelere göre değiştiğini ve boyun tüylerinin Fel d 1 birikiminin ana bölgesi olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, tüyler üzerindeki bu dağılımın, bölgeler arasında Fel d 1 sentezindeki bir varyasyondan değil, yalamadan kaynaklandığı bulunmuştur (Avner ve ark., 1997). Elde edilen bu sonuçlar, boyun bölgesindeki yüksek konsantrasyonun yine bu bölgedeki yağ bezi sayısının fazlalığıyla uyumlu olduğu yönündedir.

Ancak bu çalışmada sadece Fel d 1'in tüyler üzerindeki miktarı incelendiği için, alerjenin tam kaynak bölgesi belirlenmemiştir. Carayol ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, yüz ve göğüs olmak üzere iki zıt anatomik bölgedeki Fel d 1 deri üretimi seviyeleri ölçülmüş, kedi yüz derisinin göğüs derisinden 10 kat daha fazla Fel d 1üretiği görülmüş ve yine aynı bölgelerin yıkandıktan sonraki Fel d 1 birikimleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada on kısırlaştırılmamış evcil kısa tüylü erkek kedi kullanılmıştır. Bu kedilerin yüz ve göğüs bölgesi incelenmiştir. Deneyin başlangıç gününde 6 cm^2'lik bir vücut yüzeyi genel anestezi altında tıraş edilmiştir. Kedilerin sağ tarafındaki her iki bölgede tüyler deriye en yakın şekliyle kesilmiştir. Kesilen tüyler toplanmış ve tartılmıştır. Her iki bölgenin ortası 1 dakika süreyle 2.5 cm^2'lik plastik bir bir silindir aracılığıyla 5ml borat tamponlu tuz çözeltisiyle (pH 8.2) yıkanmıştır. Tıraşlı alan, bitişik alanlardan kontaminasyonu önlemek için kasıtlı olarak örneklenen alandan daha büyük tutulmuştur. Bu ilk numuneyi, diğer üç 5 ml'lik yıkama dizisi izlemiştir. Her yıkama sıvısı numunesi toplanmış ve Fel d 1 testinden önce -20^0C'de tutulmuştur. Tükürükten kontaminasyonu önlemek amacıyla her kediye bir kısıtlayıcı yakalık takılmıştır. 48 saat sonra yüz ve göğüs bölgeleri tekrar 1 dakika süreyle 2.5 cm^2'lik plastik bir bir silindir aracılığıyla 5ml borat tamponlu tuz çözeltisiyle (pH 8.2) yıkanmıştır. İlk yıkamada kedi derisi üzerinde toplanan Fel d 1 miktarı, temel antijenik seviye olarak kabul edilirken, dördüncü yıkamada toplanan Fel d 1, sonuçlarla karşılaştırma için temel olarak kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tekrarlı yıkamalardan sonra, yıkanan bölgelerdeki Fel d 1 üretimi oranı büyük oranda düşmüştür (Carayol ve ark., 2000).

4.KAYNAKLAR

Arkestål, K., Sibanda, E., Thors, C., Troye-Blomberg, M., Mduluza, T., Valenta, R., Grönlund, H., van Hage, M. (2011). Impaired allergy diagnostics among parasite-infected patients caused by IgE antibodies to the carbohydrate epitope galactose-α 1,3-galactose, *J Allergy Clin Immunol*, 127, 1024-1028.

Avner, D.B., Perzanowski, M.S., Plattsmills, T.A.E., Woodfolk, J.A. (1997). Evaluation of different techniques for washing cats: quantification of allergens removed from the cat and the effect on airborne Fel d 1. *J Allergy Clin Immunol*, 100, 307-312)

Bienboire-Frosini, C., Durairaj, R., Pelosi, P., Pageat, P. (2020). The Major Cat Allergen Fel d 1 Binds Steroid and Fatty Acid Semiochemicals: A Combined In Silico and In Vitro Study, *Int J Mol Sci*; 21(4), 1365.

Bollinger, M.E., Wood. R.A., Chen, P., Eggleston, P.A. (1998). Measurement of cat allergen levels in the home by use of an amplified ELISA, *J Allergy Clin Immunol*, 101,124-125.

Bonnet, B., Messaoudi, K., Jacomet, F., Michaud, E., Fauquert, J.L., Caillaud, D., Evrard, B. (2018). An update on molecular cat allergens: Fel d 1 and what else?, *Allergy Asthma Clin Immunol* ,14, 14.

Brackett, N.F, Davis, B.W., Adli, M., Pomes, A., Chapman, M. D. (2022). Evolutionary Biology and Gene Editing of Cat Allergen, Fel d 1, *Crıspr J*, 5(2), 213-223.

Carayol, N., Birnbaum, J., Magnan, A., Ramadour, A., Lanteaume, A., Vervloet, D., Tessier, Y., Pageat, P. (2000). Fel d 1 production in the cat skin varies according to anatomical sites. *Allergy*, 55(6), 570-573.

Chapman, M.D.(2008). Allergen nomenclature. In: R. F. Lockey & D. K. Ledford (Eds.), *Allergens and allergen immunotherapy* (pp. 47–58). 4th ed. New York: Informa Healthcare USA.

Curin, M., Weber, M., Thalhamer, T., Swoboda, I., Focke-Tejkl, M., Blatt, K., Valent, P., Marth, K., Garmatiuk, T., Grönlund, H., Thalhamer, J., Spitzauer, S., Valenta, R. (2014). Hypoallergenic derivatives of Fel d 1 obtained by rational reassembly for allergy vaccination and tolerance induction, *Clin Exp Allergy*, 44(6), 882–894.

Custovic, A., Fletcher, A., Pickering, C.A., Francis, H.C., Green, R., Smith, A., Chapman, M.,Woodcock, A., Simpson, A. (1998). Domestic allergens in public places III. House dust mite, cat, dog and cockroach allergens in British hospitals, *Clin Exp Allergy,* 28, 53- 59.

Çetintaş, Ç. (2023). Çika, Kırklareli, Türkiye.

Dawn, K., Lei, M.D., Leslie, C. Grammer, M.D. (2019). An overview of allergens. *Allergy Asthma Proc,* 40, 362–365.

Erwin, E. A., Woodfolk, J.A., Custis, N., Platts-Mills, T. A. E. (2003). Animal danders. *Immunol Allergy Clin N Am,* 23, 469 – 481.

Esmond Gay – Sarez, C.E. (2004). A Guide to the Magnificent Bengal Cat.

Gelber, L.E., Seltzer, L.H., Bouzoukis, J.K., Pollart, S.M., Chapman, M.D., Platts-Mills, T,A,E. ((1993). Sensitization and exposure to indoor allergens as risk factors for asthma among patients presenting to hospital, *Am Revs Respir Dis*, 147, 573-578.

Grönlund, H., Adédoyin, J., Reininger, R., Varga, E.M., Zach, M., Fredriksson, M., Kronqvist, M., Szepfalusi, Z., Spitzauer, S., Grönneberg, R., Valenta, R., Hedlin, G., van Hage M. (2008). Higher immunoglobulin E antibody levels to recombinant Fel d 1 in cat-allergic children with asthma compared with rhinoconjunctivitis, *Clin Exp Allergy*, 38, 1275-1281.

Harrison, W. (1982). Our Cats and All About Them, 55.

Helgren, J.A. (1997). Barron's Encyclopedia of Cat Breeds: A Complete Guide to the Domestic Cats of North America, 104-112.

Ichikawa, K., Vailes, L.D., Pomeâs, A., Chapman M. D. (2001). Molecular cloning, expression and modelling of cat allergen, cystatin (Fel d 3), a cysteine protease inhibitör, *Clinical and Experimental Allergy,* 31, 1279-1286.

Klucka, C.V., Ownby, D.R., Green, J., Zoratti, E. (1995). Cat shedding of Fel d 1 is not reduced by washings, Allerpet-C spray, or acepromazine, *J Allergy Clin Immunol,* 95,1164 -1171.

Lockey, R.F. (2012). The myth of hypoallergenic dogs (and cats). J Allergy Clin Immunol, 130(4), 910-911.

Martinez-Caja, A. M., Rosseau, J., Vervaecke, H., Moons, C. P. H. (2021). Behavior and health issues in Bengal cats as perceived by their owners: A descriptive study. *Journal of Veterinary Behavior*, 41, 12-21.

Nicholas, C., Wegienka, G., Havstad, S., Ownby, D., Johnson, C.C. (2008). Influence of cat characteristics on Fel d 1 levels in the home . *Ann Allergy Asthma Immunol*, 101(1), 47-50.

Ohman JL, Lowell RC, Bloch KJ. (1974). Allergens of mammalian origin. III. Properties of a major feline allergen. *J Immunol*,13,1668 – 1676.

Poole , T. B., King , S. P., Suphioglu, C. (2020).Effectiveness of vacuuming and carpet washing in the removal of the major cat allergen, Fel d 1. *Allergy*, 75(10), 2694-2695.

Popescu, F.D.,Ganea, C. S., Panaitescu, C., Vieru, M. (2021). Molecular diagnosis in cat allergy, *World J Methodol*, 11(3), 46-60

Portnoy, J., Kennedy, K., Sublett, J., Phipatanakul, W., Matsui, E., Barnes, C., Grimes, C., Miller, J.D., Seltzer, J.M., Williams, P.B., Bernstein, J.A., Bernstein, D.I., Blessing-Moore, J., Cox, L., Khan, D.A., Lang, D.M., Nicklas, R.A., Oppenheimer, J. (2012). Environmental assessment and exposure control: a practice parameter-- furry animals. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 108, 223-223.

Satyaraj, E., Wedner, H.J., Bousquet, J. (2019). Keep the cat, change the care pathway: A transformational approach to managing Fel d 1, the major cat allergen, *Allergy*, 74(107), 5-17.

Shearer, W. T., Fleisher, T. A.(2003). The immune system: an overview. In: Jr. N. F. Adkinson, J.W. Junginge ,B.S. Bochner, W. W. Busse, S. T. Holgate, & F.E.R. Simsons (Eds.), *Middleton's allergy principles and practice* (p.1). 6th ed. Philadelphia: Mosby.

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.

Tasaniyananda, N., Tungtrongchitr, A., Seesuay, W., Sakolvaree, Y., Indrawattana, N. Chaicumpa, W. Sookrung, N. (2016). A novel IgE-binding epitope of cat major allergen, Fel d 1, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 470, 593-598.

Wood, R.A., Chapman, M.D., Adkinson, Jr. N.F., Eggleston, P.A. (1989). The effect of cat removal on allergen content in household-dust samples, *J Allergy Clin Immunol*, 83, 730 -734.

Vredegoor, D.W., Willemse, T., Chapman, M.D., Heederik, D.J.J., Krop, E.J.M. (2012). Can f 1 levels in hair and homes of different dog breeds: lack of evidence to describe any dog breed as hypoallergenic, *J Allergy Clin Immunol*, 130, 904-909.

BÖLÜM 13

SALDIRGANLIĞIN NÖROANATOMİSİ

Dr. Yasemin ÜSTÜNDAĞ
Dr. Mehmet KARTAL

[1]Dr. Yasemin Üstündağ ,Dokuz Eylül Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İzmir, Türkiye, yasemin.ustundag@deu.edu.tr, ORCID ID 0000-0002-8836-0371
[2]Dr. Mehmet Kartal, İstanbul Gelişim Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Fakültesi, İstanbul, Türkiye, mkartal84@gmail.com, ORCID ID 0000-0001-7364-0875

1.GİRİŞ

Saldırganlık, bireyin hayatta kalması ve yaşam bölgesini veya kaynaklarını koruması için gerekli ancak uygunsuz bir şekilde ifade edildiğinde yıkıcı olabilen karmaşık bir sosyal davranıştır (Aleyasin ve ark., 2018; Zhang, 2021). Çeşitli davranış kalıplarını kapsar ve kökenleri, ifadeleri ve işlevleri açısından çok boyutludur. Tanımına bakılacak olursa genel olarak "zarar veren ve yaralayan veya bunu yapmakla tehdit eden davranış" veya "kaçınmakta olan başka bir canlıya zarar verme veya yaralama amacına yönelik herhangi bir davranış biçimi" olarak tanımlanır. Böcekler, balıklar, kertenkeleler, kurbağalar ve insanlar gibi gruplar halinde yaşayan türlerde barışı korumak ve sosyal etkileşimleri düzenlemek için saldırganlık davranışı gözlemlenir (Takahashi ve Miczek, 2014; Zhang, 2021).Evcil hayvanlar göz önüne alındığında, insana yönelik köpek saldırganlığı en yaygın ve en ciddi davranış sorunudur ve evcil hayvan sahiplerinin eğitmenlerden ve veterinerlerden profesyonel yardım almalarının bir numaralı nedenidir. Bu problemin çözümü açısından korkuya bağlı saldırganlık, cinsiyete bağlı saldırganlık, ırk ve kalıtsal saldırganlık, kaynak koruma (sahiplenme saldırganlığı), çatışmaya bağlı saldırganlık (baskınlık saldırganlığı), anne saldırganlığı gibi bir sınıflandırma oluşturulmuştur. Bölgesel saldırganlık (Luescher ve ark., 2008; Whittle ve ark., 2011; Kaneo ve ark., 2013). Bununla birlikte, tipik saldırgan davranış kalıpları türler arasında farklılık gösterir, kemirgenler, primatlar ve hayvanlar arasındaki saldırganlığın nörobiyolojisi ve nöroanatomisinde bazı benzerlikler vardır. Bu kitap bölümünde, MRI taramaları, immünohistokimyasal boyamalar ve çeşitli beyin bölgelerinin elektriksel uyarımından elde edilen güncel veriler ışığında saldırganlığın oluşum mekanizmasının karşılaştırmalı nöroanatomisi araştırılmıştır.

2.Saldırganlık Ve Limbik Sistem

Saldırganlık; hippocampus, hypothalamus, amygdala, cingulate cortex, mesencephalon ve thalamus'u içeren karmaşık bir limbik sistem tarafından kontrol edilir. Cortex cerebri limbik sistem ile etkileşim halindedir. Bu sistemin etkinliği, hayvanın hayatta kalması için çok önemli olabilecek hem harici hem de dahili çevresel uyarımlara doğrudan bir yanıtın oluşturulması ve mevcut durumun olası veya gerçek tehditler açısından analizi esasına dayanır. Ayrıca limbik sistem, olumlu veya olumsuz duyguların, cinsel dürtülerin ve yiyecek edinme ihtiyacı gibi yaşamsal faaliyetlerin oluşturulduğu bir merkezdir.

Bunun yanı sıra, öğrenme ve ezberleme gibi bilişsel yetenekleri, mevcut duruma uygun eylem taktiklerinin seçimini etkiler. Karar verme sürecinde "Saldırı mı yoksa kaçış mı?" konusunda etkili bir davranışsal tepkiyi tetikler (Horoszewicz ve ark., 2017) .Ayrıca limbik sistem, öğrenme ve hafıza işlevlerinde önemli bir rol oynayan evrimsel olarak eski bir beyin sistemidir. Aynı zamanda duyguların oluşumu, entegrasyonu ve kontrolü ile ilgilenir ve bunları davranışsal tepkilerle ilişkilendirir. Örneğin, bir kişinin yüz ifadesinin yorumlanması ve bu ifadenin altında yatan duygu durumu ya da tehlikeli bir durumun değerlendirilmesi bu duruma karşı uygun davranışsal bir cevabın kararının verildiği yer beynin özellikle amygdala ve prefrontal cortex'i içeren limbik bölgedir. Limbik sistem ayrıca endokrin fonksiyonları düzenleyen hypotalamus aracılığıyla otonom sinir sistemi ile sıkı bir ilişki halindedir. Amygdala, hipoocampus ve medial prefrontal cortex HPA (hypothalamic-pituitary-adrenal) aksisinin cevabını kritik şekilde etkiler (Blair, 2010; Braun, 2011). Amygdala, hippocampus ve prefrontal corteks'in üçü bir arada ele alındığında çevresel uyarımları yorumlamada, karar verme sürecinde, davranışsal seçimlerin rehberliğinde özellikle saldırganlık davranışının oluşumunda önemli role sahiptir (Cupaioli ve ark., 2021). Amygdala, savunma ve saldırganlık gibi bireyin kendini koruma davranışlarını başlatan, belirli hormonların salınımını kontrol eden ve mevcut durumla bağlantılı duyguların hatırlanmasından sorumlu olan bir yapıdır. Korku ve öfke gibi duyguların bir tür bilgi depolama sistemi denilebilir. Amygdala'da oluşturulan hasarlar, saldırganlık davranışnı ve korku deneyimini azaltır, şöyle ki , hasarlı amygdala'ya sahip kişiler daha az korku duygusuna sahipken, amigdala'nın elektrikle uyarılması ise aynı kişilerde tam tersi bir etkiye sahiptir. Ayrıca amygdala, çevsesel uyarımlarla elde edilen duyguların işlendiği önemli bir yer olması bakımından şiddetli saldırganlığın gelişimini anlamak için önemli bir anatomik noktadır (Braun, 2011; Horoszewicz ve ark., 2017). Amygdala'nın fonksiyonel nöroanatomisine bakıldığında; azalan amygdala hacminin, şiddetli ve kalıcı saldırganlıkla beraber psikopatik kişiliğin gelişiminde rol oynadığı görülür. Örneğin daha önce ciddi şiddet uygulayıp uygulamamalarına göre gruplandırılmış erkekler arasında ayrım olmaksızın, düşük amygdala hacmine sahip erkeklerin, çocukluktan erken yetişkinliğe kadar daha yüksek düzeyde saldırgan davranış ve psikopatik özellikler sergilediği gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak düşük amygdala hacmi saldırganlık, şiddet ve psikopatik davranışlarla ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, amygdala hacmi, erken ortaya çıkan ve kalıcı saldırganlık ve psikopatik kişilik özellikleri sergileme riski altındaki bireyleri tanımlamak için yararlı bir biyobelirteç olabilir. Çünkü

psikopatik özellikler, çeşitli duygusal uyaranlara karşı azalmış amygdala reaktivitesi ile ilişkilendirilmiştir ve bu eksiklikler varsayımsal olarak psikopatinin kişilerarası/duygusal özelliklerinin altında yatmaktadır. Bununla birlikte, amygdala hacmini psikopatik özelliklerle ilişkilendiren yapısal çalışmalar karıştırılmıştır ve bazıları amygdala'da gri madde hacminin azaldığını bildirmiştir (Pardini ve ark., 2014). Bununla birlikte Walker ve arkadaşlarının MRI çalışmasına göre amygdala, saldırgan olmayan ratlara oranla saldırgan olan ratlarda düşük değerlerle fraksiyonel anizotropi açısından grup farklılıklarının görüldüğü tek beyin bölgesidir. Önceki çalışmalarda amygdala ilgili herhangi bir verinin olmamasına rağmen, yine aynı çalışmadan elde edilen bilgiler saldırgan ratlardaki azalmış amygdala fraksiyonel aniztropisine ek olarak yapısal düzeyde hippocampus üzerinde zıt etki ettiğini gösterir (Walker ve ark. 2018). Hallera ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre ise amygdala'nın saldırganlıkla ilişkisi, amygdala'nın tahribatından sonra ratların yerleşik-davetsiz misafir testinde, misafire karşı saldırganlığın azaldığını gösteren lezyon çalışmaları ile ortaya konmuştur. Amigdala'nın bir alt çekirdeği olan medial amygdala saldırganlık ve stres faktörlerine karşı davranışsal tepkiler dahil olmak üzere sosyal davranışlarda yer alan kilit bir yapıdır. Medial amygdala saldırma davranışı ve travmatik stres ile aktive olur ve aşırı aktivasyonu ise anormal saldırganlık gösterileriyle ilişkilidir (Nordman ve ark., 2020). Medial amygdala bölgesinin saldırganlığı etkilemesiyle birlikte sosyal zekanın kontrolü ve agresif davranışlara karşı adaptasyonu da etkilediği öngörülmüştür. Bütün amygdala lezyonlarının, serbest dolaşan kertenkelelerde bölgesel saldırganlığı azalttığı ve her iki cinsiyetten kobaylarda ve vervet maymunlarında sosyal statü kaybına neden olduğu belirtilmiştir. Birlikte ele alındığında, lezyon çalışmaları amygdalanın saldırgan davranışı desteklediğini; bu etkinin bazılarıyla (bazolateral ve medial amygdala) bağlantılı olduğu, ancak diğer alt bölgelere (corticomedial amygdala) bağlı olmadığı görülmektedir (Hallera, 2018). İnsanlarda ve diğer memelilerde yapılan araştırmalar, amygdala'nın, saldırganlık davranışını modüle eden ve ayrıca hippocampus, hypothalamus, thalamus, neocortex, orbitofrontal cortex ve periaquaductal gri maddeyi içeren geniş bir nöral devrenin önemli bir bileşeni olduğunu göstermektedir. Amygdala, hypothalamus (esas olarak fornix ve stria terminalis yoluyla) ve periaquaductal gri madde (ventral amigdalofugal yol aracılığıyla) ile karşılıklı bağlantılar sunar ve uncinate fasciculus yoluyla prefrontal cortex'ten büyük projeksiyonlar alır. Hypothalamus, dorsal longitudinal fasciculus yoluyla periaquaductal gri maddeye projekte olur ve medial ön beyin demeti yoluyla prefrontal cortex'ten projeksiyonlar alır. Saldırganlık

davranışının dürtüsel biçimlerinin, prefrontal cortex'ten yetersiz yukarıdan aşağıya kontrolü ile limbik sistemin hiperaktivasyonu sonucunda ortaya çıktığına inanılmaktadır. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar saldırganlık davranışı ile amygdala hiperaktivitesi arasında bir ilişki olduğunu ve amygdala'nın çıkarılmasının saldırganlığı azaltmak için yeterli olabileceğini düşündürmektedir (Matthies ve ark., 2012; Gouveia ve ark., 2019). Bununla birlikte, aynı şekilde Matthies ve arkadaşlarının gözlemlerine dayanarak, amygdala'nın, hypothalamus ve periaquaductal gri madde aracılığıyla agresif davranış programları oluşturduğu ve buna karşılık prefrontal cortex tarafından yönetildiği varsayılabilir. Yine Matthies ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlar, amygdala hacimleri ile yaşam boyu saldırganlık arasında fizyolojik bir ilişki olduğu varsayımını desteklemektedir, çünkü kontrol grubununa göre daha agresif bir alt grupta %16-18 daha küçük amygdala hacimine rastlanmış ve sağlıklı kadınlarda yaşam boyu saldırganlık geçmişi ile amygdala hacimleri arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur (Matthies ve ark., 2012). Ayrıca son zamanlarda yapılan yapısal beyin görüntüleme çalışmaları, kadınlarda ve erkeklerdeki amygdala hacmi ile saldırganlık arasında negatif bir ilişki olduğunu göstermiştir (Mancke ve ark., 2018). Lin ve arkadaşları hypothalamic saldırı alanının saldırganlığın kontol merkezlerinden olan ventromedial hypothalamus ile nöronal bir ağa sahip olduğunu tanımlamışlarıdır (Lin, 2011). Erkek farelerde bu nöronların optogenetik olarak uyarılması, bu farelerde hem erkek hem dişi fareler ile cansız nesnelere karşı ani saldırganlık hareketinin başlamasına sebep olmuştur (Lin ve ark., 2011; Aleyasin ve ark., 2018). Ayrıca, amygdala da hypothalamus'un saldırı bölgesine projeksiyonlar verir ve saldırgan ratların amygdala'sındaki yapısal değişiklikler anormal agresif davranışlara katkıda bulunabilir (Takahashi ve Miczek, 2014).Lateral septum, çeşitli beyin bölgeleriyle bağlantısı olan ve duygulardan sorumlu bir orta hat beyin yapısıdır. Lateral septum'un kaygı ve depresyonu önlediğine dair yaygın bir görüş vardır. Sinirlilik ve depresyonu modüle etmede çift yönlü bir role sahip olduğunu bildirilmiştir (Patel, 2022). Bu bölgede oluşan lezyonlar, çoğu memeli türünde "septal öfke" olarak bilinen ve artan saldırganlık davranışıyla ilişkilendirilmiştir. Wong ve arkadaşları,saldırganlığı modüle eden lateral septum'dan ventromedial hypothalamus'a giden GABAerjik nöron projeksiyonlarının optogenetik uyarımının saldırı davranışını baskıladığını göstermiştir (Wong ve ark, 2016). Beynin diğer bölümleriyle birlikte çalışan hippocampus, belirli bir hedefe ulaşmak için oluşturulacak yanıt için deneyim ve duygusal hafızayı kullanır. Örneğin, tehdit olarak algılanan durumlarda, köpeğin dişlerini göstermesinin ve belirli sesler çıkarmasının insanı veya

hayvanı köpeğin kendisinden veya sahip olduğu nesnelerden uzaklaştıracağını öğrenmesini bu bölge sağlar. Ayrıca hippocampus saldırganlığın motor bileşenlerinin şekillendiği ve saldırının kontrol mekanizması olan yapıdır. Bununla birlikte saldırganlığı harekete geçiren dürtüler esas olarak koku alma ve görme duyularından gelir ve başlatıcı uyaranlar özel hareketler, sesler ve dokunma eylemleridir (Horoszewicz ve ark., 2017). Hippocampus'un saldırganlıkta önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür Hippocampal yapının, duygusal düzenleme ve korkuyu öğrenmedeki kritik rolleri göz önüne alındığında, saldırganlık ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Roberts ve ark., 2021). Saldırganlık ve hippocampus volümü ilişkisinin belirlenmesi için yapılan literatür taramasında bu konuda eksikliklerin olduğu saptanmıştır. Ancak şizofreni ve borderline gibi psikolojik sorunlar yaşayan bireylerin beyin görüntülemelerinde hippocampus bölgesinde azalmış gri madde hacimlerinin olduğu belirlenmiştir (Cupaioli ve ark.,2021). Roberts ve arkadaşları ise salgırganlıkla azalmış hippocampus volümünün ilişkili olduğu hipotezini ön görmüşlerdir (Roberts ve ark., 2021). Whittle ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise bilateral hippocampal hacmi ve anne saldırganlığı davranışının önemli derecede ilişkili olduğu bulunmuştur (Whittle, 2011). Prefrontal cortex, hippocampus, septum ve dorsomedial thalamus'la bağlıdır. Limbik sistem içindeki bu bağlantısı nedeniyle, sevgi ve şefkat, korku, saldırganlık ve ödül dahil olmak üzere duyguların arabuluculuğunda ve kontrolünde önemli bir rol oynar ve bu nedenle sosyal davranış için esastır. (Braun, 2011). Prefrontal cortex ele alındığında ise saldırganlığın önleyici kontrolünde prefrontal cortex'in önemi, insanlar da dahil olmak üzere primatlarda bildirilmiştir. Bununla birlikte ratlarda da prefrontal korteks'in saldırganlık davranışında bazı düzenleyici rolleri olduğu gözlemlenmiştir. Prefrontal cortex, hypothalamus ve amygdala gibi saldırganlıkla bağlantılı çeşitli beyin bölgelerine glutamaterjik projeksiyonlar gönderir. Glutamatın yanı sıra serotonin reseptörlerinin, prefrontal cortex'in aktivitesini modüle etmede ve dolayısıyla agresif davranışı inhibe etmede önemli bir rolü olduğu görülmektedir. Bölgesel olarak ele alındığında prefrontal cortex'in, özellikle medial prefrontal cortex ve orbitofrontal cortex bölümlerinin, saldırganlık üzerinde engelleyici bir etkiye sahip olduğu görülür (Takahashi ve ark., 2014). Özellikle orbitofrontal cortex, karar verme dahil olmak üzere duyusal entegrasyon ve daha yüksek bilişsel işlevlerle ilgili bir merkez olmasından dolayı saldırganlık ve dürtüselliğin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve bu bölgedeki işlev bozukluğu veya hasar; zayıf empati ve bozulmuş sosyal etkileşimlerle beraber saldırganlıkla sonuçlanabilir (Braun, 2011). Bununla birlikte Galucci ve arkadaşlarının

yaptığı çalışmaya göre ise ventrolateral prefrontal cortex'te, saldırgan dürtülerin kontrolü de dahil olmak üzere öz kontrolde ve duyguların düzenleme aşamalarında kritik öneme sahip olduğu bildirilmiştir. Saldırganlığı önlemeye her iki yarım küre de katılır. Özellikle sağ yarımküre üzerine yapılan araştırmalar, sağ ventrolateral prefrontal cortex'in saldırganlığı tetikleyebilecek çok çeşitli olumsuz duyguları azaltmada rol oynayabileceğini göstermektedir (Gallucci ve ark., 2020). Yapılan hayvan çalışmaları ele alındığında ise tehdide karşı oluşan saldırganlığın, medial amigdaloidal alanlardan aşağı doğru, büyük ölçüde stria terminalis yoluyla medial hypothalamus'a ve oradan da periaquaductal gri'nin dorsal yarısına uzanan temel bir tehdit sisteminin aracılık ettiğini görülür ve bu sistem ventromedial prefrontal cortex tarafından düzenlenir. Amygdala'nın uyarılmasıyla ortaya çıkan saldırganlığın medial hypothalamus ve periaquaductal gri'nin işlevsel bütünlüğüne bağlı olduğu, ancak periaquaductal gri'nin uyarıldığı saldırganlığın amygdala'nın işlevsel bütünlüğüne bağlı olmadığı görülmüştür (Blair, 2010).Prefrontal cortex, saldırganlığın yukarıdan aşağıya düzenlenmesi için çok önemlidir, Prefrontal ağ, hayal kırıklıkları da dahil olmak üzere tehdit edici uyaranların işlenmesinde yer alan subkortikal bölgeler üzerinde yukarıdan aşağıya bir kontrol merkezidir.Özellikle ventrolateral prefrontal cortex, saldırgan dürtülerin kontrolü de dahil olmak üzere öz kontrol ve duyguların düzenleme aşamaları için kritik öneme sahiptir. (Galluci ve ark., 2020).Chester ve arkadaşları, ventromedial prefrontal cortex 'de fiziksel saldırganlık ile gri madde yoğunluğu arasında negatif bir ilişki gözlemlemiştir. Çalışmaya göre beynin ön lobundaki yaralanmalar, beyindeki yapısal hasardan fiziksel saldırganlığın ne kadar kolay ortaya çıkabileceğini göstermiştir. Gerçekten de saldırgan davranışın en yaygın biyolojik nedenlerinden biri beynin ön lobunun lezyonlarıdır. Aralıklı patlayıcı bozukluk teşhisi konan bireyler, öfkeli yüzleri görüntülerken azaltılmış ventromedial prefrontal cortex aktivitesi ve ventromedial prefrontal cortex - amigdala bağlantısı sergilemişlerdir. Fiziksel saldırganlığın desteklenmesinde ventromedial prefrontal cortex eksikliklerini içeren önceki araştırmalara dayanarak, normal, genç yetişkinlerin fiziksel saldırganlığının bu bölgede azalmış gri madde ile ilişkili olacağı var sayılmıştır (Chester ve ark., 2017). Yakın zamanda, yapısal ve fonksiyonel nöro-görüntüleme çalışmlarından elde edilen kanıtlar, insan saldırganlığının fronto-limbic beyin bölgeleri tarafından düzenlendiğini belirtir. Dürtüsel saldırganlık ile karakterize edilen klinik grupların yapısal beyin görüntüleme çalışmaları, saldırgan olmayan kontrollerle karşılaştırıldığında, orbital prefrontal, medial prefrontal, anterior cingulate cortex, insula ve uncal cortex'ler dahil olmak üzere çeşitli frontal

alanlarda azalmış gri madde hacmini bildirmektedir. Saldırgan bireylerde azalmış gri madde hacmine sahip subcortikal limbik bölgeler arasında amygdala ve hippocampus da bulunur. Genel olarak, bu bölgeler, önceden planlanmamış saldırganlık ile ilişkili anormal sosyal-duygusal bilgi işlemenin altında yatan bir ön-limbik devreyi oluşturur. Coccaro ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya göre prefrontal cortex'teki gri madde hacimi ile fizyolojik olarak sağlıklı bireylerde görülen saldırganlık arasında bir ilişki bulunmuştur (Coccaro ve ark., 2018). Ayrıca patolojik saldırganlık gözlemlenen genç ve yetişkinlerin cingulate cortex'inde fonksiyon kaybı olduğu bildirilmiştir (Stadler ve ark., 2007; Braun,2011).Prefrontal bozukluklar ve saldırganlık arasındaki ilişki göz önüne alındığında, Choy ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, prefrontal cortex'in direkt transkraniyal elektrik uyarımlarım metodu kullanılarak düzenlenmesinin saldırgan bir eylemde bulunma niyetini azaltacağı hipotezini test etmiş ve alınan sonuçlara göre, prefrontal bölgedeki anodal uyarımlarla saldırgan davranışa niyet etme oranı azalmıştır (Choy ve ark., 2018). Saldırganlık, kortikolimbik bir ağdaki düzensizlik ile ilişkilidir. Spesifik olarak, amygdala'nın prefrontal cortex alanları aracılığıyla yetersiz düzenlenmesi, saldırgan davranış için bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Prefrontal cortex- amygdala sistemi duygusal kontrolü destekler ve saldırgan dürtüleri düzenler. Bu kortikolimbik saldırganlık modelinin kanıtı hem yapısal hem de işlevsel beyin görüntüleme çalışmalarından gelir. Ayrıca antisosyal kişilik bozukluğu ve psikopatisi olan yetişkinlere odaklı saldırganlıkla ilgili mevcut beyin görüntüleme çalışmalarının çoğu, saldırganlık davranışı ile orbitofrontal, medial frontal cortex ve temporal lobdaki düşük gri madde hacimleri arasındaki potansiyel bağlantılar olduğunu gösterir. Böylece prefrontal cortex ve amygdala da dahil alt temporal lobda azalan gri madde, antisosyal özelliklerle ilişkilendirilmiştir (Yang ve ark., 2017; Klasen ve ark. 2019). Yüksek saldırganlık derecesine sahip ergen ikizlerin medial frontal ve orbitofrontal cortex'inde görülen volümetrik değişimlerin saldırganlıkla korele olduğu bulunmuştur. Ek olarak, kortikal kalınlık analizi, medial frontal, superior frontal ve anterior cingulate cortex ve temporal bölgeler dahil olmak üzere birçok örtüşen bölgedeki kalınlık değişikliklerinin ergen ikizlerde saldırganlıkla ilişkili olduğunu göstermiştir (Yang ve ark., 2017). Benzer şekilde, azalmış prefrontal cortex-amygdala bağlantısı, şizofreni hastalarında sürekli saldırganlık için bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Sağlıklı bireylerde, gelişmiş amygdala aktivasyonu, provokasyondan sonra anlık öfkenin nöral bir substratıdır, oysa yanal prefrontal cortex aktivasyonu, bu tür durumlarda saldırgan tepkilere karşı koyar. (Klasen ve

ark.,2019).Saldırganlıkla ilişkili psikopatolojileri olan hastaların prefrontal cortex, hippocampus ve amygdala'sında hacimsel azalmaların görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca peripupertal strese maruz kalan ratların anormal saldırganlık gösterdikleri ve buna paralel olarak amygdala'larının azalmış fraksiyonel anizotropiye, prefrontal cortex ve hippocampus'larının ise azalmış ortalama difüzyon miktarına sahip oldukları görülmüştür. (Walker ve ark., 2018). Davranım bozukluğu olan çocuklardan elde edilen görüntüleme verilene göre ise hippocampus ve amygdala volümlerinin azaldığı; insula ile frontal ve cingulate cortex'lerinde ise hem azalan volüm hem de azalan cortikal kalınlık dikkati çekmektedir (Fahim ve ark., 2011; Fairchild ve ark., 2012; Yang ve ark. 2017).Yang ve ark MRI çalışmasına göre , bütün örnekler için daha yüksek toplam saldırganlığın daha ince frontal cortex ve daha kalın temporal ve parietal loblarla ilişkili olduğu bulundu. Spesifik olarak, daha yüksek toplam saldırganlık, sağ superior temporal gyrus , sağ medial temporal gyrus , bilateral inferior temporal gyrus, bilateral inferior parietal loblar, sağ superior parietal lobdaki daha ince sağ medial frontal cortex ve iki taraflı occipital loblar gibi daha kalın corteksler ile ilişkilidir . Daha yüksek proaktif saldırganlığın, daha ince iki taraflı supeior frontal cortex, iki taraflı medial frontal cortex ile sol ön singulat korteks ve daha kalın sol paracentral gyrus, sol inferior temporal gyrus ve sağ sağ superior temporal gyrus ile ilişkili olduğu bulundu. Öte yandan, daha yüksek reaktif saldırganlık da, daha kalın sol paracentral gyrus, sol precentral gyrus, sağ superior temporal gyrus, sağ medial temporal gyrus, bilateral inferior temporal gyrus, sağ alt ve üst parietal lob ve bilateral occipital lobla gözlemlendi (Yang ve ark., 2017.)

3.SONUÇ :

Saldırganlık bireylerin bölgelerini savunmasına, kaynaklarını güvence altına almasına ve başarılı çiftleşme olasılığının artmasına yardımcı olan doğuştan gelen bir sosyal davranıştır. Bununla birlikte, provokasyona uygun olmayan saldırgan tepkiler, bireyler ve toplum için yıkıcı sonuçlar doğurabilir. Aşırı sinirlilik veya saldırganlık, insanlarda travma sonrası stres bozukluğu, alzheimer hastalığı, depresyon, şizofreni ve madde kullanımı dahil olmak üzere, hastaların ve bakıcılarının yaşam kalitesini olumsuz etkileyen nöropsikiyatrik bozukluklarda yaygın bir semptomdur. Aşırı saldırgan davranışın bireyler ve toplum üzerinde oluşturduğu sağlık riskine rağmen tedavi seçenekleri sınırlı ve büyük ölçüde etkisizdir (Aleyasin ve ark., 2018). Evcil hayvanlar ele alındığında aynı şekilde saldırganlık davranışının çeşitli

nöropsikiyatrik bozuklukların bir belirteci olabileceği düşünülmektedir. Çünkü cins ayrımı olmaksızın şiddete maruz kalan köpeklerin saldırgan davranışlara yatkın olduğu görülmüştür (Gladwell, 2006).

4.KAYNAKÇA

Aleyasin, H., Flanigan, M., Russo, S. J. (2018). Neurocircuitry of aggression and aggression seeking behavior: Nose poking into brain circuitry controlling aggression, *Curr Opin Neurobiol,* 49, 184–191.

Blair, R. J. R. (2010). Psychopathy, frustration, and reactive aggression: The role of ventromedial prefrontal cortex, *British Journal of Psychology,* 101, 383–399.

Braun, K. (2011). The prefrontal-limbic system: development, neuroanatomy, function, and implications for socioemotional development, *Clin Perinatol,* 8(4),685-702.

Chester, D.S., Lynam, D.R., Milich, R., Dewall, C.N. (2017). Physical Aggressiveness and Gray Matter Deficits in Ventromedial Prefrontal Cortex. *Cortex,* 97, 17–22.

Coccaro, E.F., Cremers, H. , Fanning, J., Nosal, E., Lee, R., Keedy, S., Jacobson, K.C. (2018), Reduced frontal grey matter, life history of aggression, and underlying genetic influence, Psychiatry Research: *Neuroimaging,* 271, 126–134.

Cupaioli , F.A., Zucca, F.A., Caporale, C., Lesch, K.L., Passamonti, L., Zecca, L. (2021). The neurobiology of human aggressive behavior: Neuroimaging, genetic, and neurochemical aspects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,* 106, 110059.

Fahim, C., He, Y., Yoon, U., Chen, J., Evans, A., Perusse, D. (2011). Neuroanatomy of childhood disruptive behavior disorders. *Aggressive Behavior,* 37(4), 326–337.

Fairchild, G., Hagan, C. C., Walsh, N. D., Passamonti, L., Calder, A. J., Goodyer, I. M. (2013). Brain structure abnormalities in adolescent girls with conduct disorder. *Journal of Child Psychology and Psychiatry,* 54(1), 86-95.

Gallucci, A., Riva, P., Lauro, L. J. R., Bushman, B. J. (2020). Stimulating the ventrolateral prefrontal cortex (VLPFC) modulates frustration-induced aggression: A tDCS experiment. *Brain Stimulation,* 13, 302-309.

Gouveia, F. V., Hamani, C., Fonoff, E. T., Brentani, H., Alho, E. J. L., Borba de Morais, R. M. C., Luz de Souza, A., Rigonatti, S. P., Martinez, R. C. R.

(2019). Amygdala and Hypothalamus: Historical Overview With Focus on Aggression. *Neurosurgery,* 85(1), 11-30.

Gladwell, M. (2006). Troublemakers: What pit bulls can teach us about profiling. *Annals of Public Policy.* The New Yorker.

Haller, J. (2018). The role of central and medial amygdala in normal and abnormal aggression: A review of classical approaches. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews,* 85, 34-43.

Horoszewicz, E., Galas, J., Smolnik, K., Niedziółka, R., Sweklej, E. (2017). Dogs' Aggressive Behaviors Part I. Neurobiological Mechanisms and Animals' Predispositions. Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., *Agric., Aliment., Pisc., Zootech.,* 332(41)1, 15–22.

Kaneko, F., Arata, S., Takeuchi, Y., Mori, Y. (2013). Analysis of associations between behavioral traits and four types of aggression in Shiba Inu. *Journal of Veterinary Medical Science,* 75(10), 1297-1301.

Klasen, M., Wolf, D., Eisner, P. D., Eggermann, T., Zerres, K., Zepf, F. D., Weber, R., Mathiak, K. (2019). Serotonergic Contributions to Human Brain Aggression Networks. *Frontiers in Neuroscience,* 13, 42.

Kolb, B., Nonneman, A. J. (1974). Frontolimbic lesions and social behavior in the rat. *Physiology & Behavior,* 13, 637–643.

Lin, D., Boyle, M. P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E. S., Perona, P., Anderson, D. J. (2011). Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature,* 470, 221–226.

Luescher, A. U., Reisner, I. R. (2008). Canine Aggression Toward Familiar People: A New Look at an Old Problem. Veterinary Clinics of North America: *Small Animal Practice,* 38(5), 1107-1130.

Mancke, F., Herpertz, S. C., Hirjak, D., Knies, R., Bertsch, K. (2018). Amygdala structure and aggressiveness in borderline personality disorder. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience,* 268, 417–427.

Matthies, S., Rüsch, N., Weber, M., Lieb, K., Philpsen, A., Tuescher, O., Ebert, D., Hennig, J., Tebartz van Elst, L. (2012). Small amygdala-high aggression? The role of the amygdala in modulating aggression in healthy subjects. *World Journal of Biological Psychiatry,* 13(1), 75-81.

Nordman, J., Ma, X., Li, Z. (2020). Traumatic Stress Induces Prolonged Aggression Increase through Synaptic Potentiation in the Medial Amygdala Circuits. eNeuro, 7(4), *Eneuro*.0147-20.2020.

Patel, H. (2022). The role of the lateral septum in neuropsychiatric disease. Journal of Neuroscience Research, 100(7), 1422-1437.

Pardini, D. A., Raine, A., Loeber, R. (2014). Lower Amygdala Volume in Men is Associated with Childhood Aggression, Early Psychopathic Traits and Future Violence. *Biological Psychiatry*, 75(1), 73-80.

Roberts, H., Pozzi, E., Vijayakumar, N., Richmond, S., Bray, K., Deane, C., Whittle, S. (2021). Structural Brain Development and Aggression: A Longitudinal Study in Late Childhood. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, 21(2), 401-411.

Siegel, A., Edinger, H., Koo, A. (1977). Suppression of attack behavior in the cat by the prefrontal cortex: Role of the mediodorsal thalamic nucleus. *Brain Research*, 127, 185–190.

Stadler, C., Sterzer, P., Schmeck, K., Krebs, A., Kleinschmidt, A., Poustka, F. (2007). Reduced anterior cingulate activation in aggressive children and adolescents during affective stimulation: Association with temperament traits. *Journal of Psychiatric Research*, 41(5), 410–417.

Takahashi, A., Miczek, K. A. (2014). Neurogenetics of Aggressive Behavior – Studies in Rodents. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 17, 3–44.

Takahashi, A., Nagayasu, K., Nishitan, N., Kaneko, S., Koide, T. (2014). Control of intermale aggression by medial prefrontal cortex activation in the mouse. *PLoS One*, 9, e94657.

Yang, Y., Joshi, S. H., Jahanshad, N., Thompson, P. M., Baker, L. A. (2017). Neural Correlates of Proactive and Reactive Aggression in Adolescent Twins. *Aggressive Behavior*, 43(3), 230-240.

Walker, S. E., Wood, T. C., Cash, D., Mesquita, M., Williams, S. N. C. R., Sandi, C. (2018). Alterations in brain microstructure in rats that develop abnormal aggression following peripubertal stress. *European Journal of Neuroscience*, 48(2), 1818-1832.

Whittle, S., Yap, M. B. H., Sheeber, L., Dudgeon, P., Cel, M. Y., Pantelis, C., Simmons, J. G., Allen, N. B. (2011). Hippocampal volume and sensitivity

to maternal aggressive behavior: A prospective study of adolescent depressive symptoms. *Development and Psychopathology*, 23, 115–129.

Wong, L. C., Wang, L., D'Amour, J. A., Yumita, T., Chen, G., Yamaguchi, T., Chang, B. C., Bernstein, H., You, X., Feng, J. E., Froemke, R. C., Lin, D. (2016). Effective Modulation of Male Aggression through Lateral Septum to Medial Hypothalamus Projection. *Current Biology*, 26, 593–604.

Zhang, Y. (2021). Aggression Priming by Potentiation of Medial Amygdala Circuits. *The Journal of Neuroscience,* 41(1), 28–30.



ISBN: 978-625-367-190-7