ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEKZOKİNAZ 2 ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNDE BAZI FLAVONOİDLERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Reyhan EYÜPOĞLU

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2017

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Reyhan EYÜPOĞLU tarafından hazırlanan **"**HEKZOKİNAZ 2 ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNDE BAZI FLAVONOİDLERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**"** adlı tez çalışması 25/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Şevki ADEM

Jüri Üyeleri

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Müslüm KUZU

Üye : Doç. Dr.Salihe ALYAR

Üye : Yrd. Doç. Dr. Şevki ADEM

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doç. Dr. Tamer Keçeli
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine göre hazırlamış olduğum“HEKZOKİNAZ 2 ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNDE BAZI FLAVONOİDLERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (25/08/2017).

Öğrencinin Adı Soyadı
(imza)

Reyhan EYÜPOĞLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HEKZOKİNAZ 2 ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNDE BAZI FLAVONOİDLERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Reyhan EYÜPOĞLU

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Şevki ADEM

Kanser tüm dünyadaki sağlık sorunları arasında ilk sıralarda yer almakta ve farklı birçok araştırmaya konu olmaktadır. Yapılan bu araştırmalarda, kanser hücrelerinde gerçekleşen glikoliz metabolizmasındaki biyokimyasal değişiklikler kanser tanı ve tedavisinde yol gösterici olduğunu göstermiştir. Yapılan araştırmalar neticesinde kanser hücrelerinin hızla büyüyüp çoğalmak için gerekli olan enerjiyi, sağlıklı hücrelere kıyasla 10-15 kat daha fazla glikoz yakarak sağladığı bilinmektedir. Bu enerjinin kaynağı glikoliz yolundan geçmekte olduğu bilinmektedir. Glikoliz yolunun inhibisyonu ile hem kanser hücrelerinin metabolik dengesini bozmak hem de kanser hücrelerinin enerji kaynaklarını kısıtlamak mümkündür. Bu amaçla, yapılan tez çalışmasında glikoliz metabolik yolunun ilk hız kısıtlayıcı basamağı enzimi olan HK-II enziminin, bazı fenolik bileşikler ile inbisyonu çalışılmıştır.

2017, 71 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Glukoz Metabolizması, Kanser, HK-II Enzimi, Fenolik bileşikler, Aktivasyon, İnhibisyon

ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SOME FLAVONOIDS ON HEKZOKINASE 2 ENZYME ACTIVITY

Reyhan EYÜPOĞLU

Cankiri Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisors: Assistant Prof. Dr. Şevki ADEM

Cancer is located in the first location among the World health problems, and it became the topic for lots of different researches. In performed studies, the biochemical changes in the glycolysis metabolism occurred inside the cancer cell can be guidance to the cancer diagnosis and therapy. In the present studies show that cancer cells consume glucose 10-15 times more than the typical cell to provide their energy demand. The pathway of this energy production is known as glycolysis. With the inhibition of the glycolysis pathway, we can both disrupt the metabolic balance of cancer cell and limits the energy sources of the cancer cell. For these purposes, in the present thesis studies, the inhibition of HK-II enzyme, which is the first-rate restricting step of the metabolic pathway of the glycolysis have been studied by using some phenolic compounds.

2017, 71 pages

KeyWords: Glucose Metabolism, cancer, HK-II Enzyme, Phenolic compounds, activation, inhibition

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde üç yıl boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol gösteren, güler yüzünü ve samimiyetini esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Şevki ADEM' e,

Tez çalışmam boyunca beraber çalıştığım çalışma arkadaşım Naciye Kayhan'a ve Çağlar Güler'e, çalışmalarım boyunca bilimsel ve moral desteğini eksik etmeyen eşim Volkan EYÜPOĞLU' na, çalışmalarımı bir an önce bitirip kendisiyle vakit geçirmemi dileyen ve bekleme sabrını bir büyük edasıyla gösteren oğlum Muhammet Ali EYÜPOĞLU' na, hiçbir zaman desteklerini esirgemeden güvenerek sabırla ve inançla yanımda olan tüm çalışma arkadaşlarıma, 15 Temmuz şehit ve gazilerine sonsuz saygı ve teşekkürleri bir borç bilirim.

2014L06 nolu Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Yüksek Lisans tez projesi ile desteklenmiştir. Katkılarından dolayı Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürü bir borç bilirim.

Hem. Reyhan EYÜPOĞLU
Çankırı, Temmuz 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR iv
SİMGELER DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
TABLOLAR DİZİNİ xi
1.GİRİŞ 12
2. LİTERATÜR ÖZETİ 14
2.1. Enzimler 14
2.2. Enerji Kaynağı Olarak Kullanılan Glikoliz Metabolik Yolu 15
2.2.1. Glikoliz metabolik yolu reaksiyonları ve enzimleri 16
2.3. Kanserin Tanımı ve Özellikleri 18
2.4. Warburg Teorisi ve Kanser Hücrelerinde Glukoz Metabolizması 21
2.5. Kanser Tanı ve Tedavisinde Glikolizin Yeri 23
2.6. Kanserde Aerobik Glikolizi Artıran Çeşitli Mekanizmalar 24
2.6.1. Mitokondriyal hasarlar 24
2.6.2. Bazı metabolik ara ürünlerin artışı 24
2.6.3. Hipoksi 25
2.6.4. Onkojen ve bazı metabolik enzimlerin anormal artışı 26
2.7. Kanserde Dışa Vuran İzoenzimler 26
2.8. Kanser Tedavisinde Stratejiler 28
2.9. Kanser Tedavisi İçin Glikoliz İnhibisyonu 28
2.10. Glikoliz İnhibisyonu İçin Kullanılan Fenolik Bileşikler 30
3. MATERYAL ve METOT 32
3.1. Materyal 32

3.1.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler 32
3.1.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan laboratuvar malzemeleri ve cihazlar 33
3.1.3 Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hazırlanması 33
3.2. Metot 34
4. BULGULAR 36
4.1. Enzim Aktivite Çalışmaları ve Optimum Şartların Belirlenmesi 36
4.2. Enzim İnhibisyon Çalışmaları 37
4.2.1. Enzim inhibitörü olarak kullanılan flavon bileşikleri ve göstermiş oldukları etkiler 38
4.2.2. Enzim inhibitörü olarak kullanılan flavonol bileşikleri ve göstermiş oldukları etkiler 43
4.2.3. Enzim inhibitörü olarak kullanılan flavanon bileşikleri ve göstermiş oldukları etkiler 49
4.2.4. Enzim inhibitörü olarak kullanılan flavanonol bileşikleri ve göstermiş oldukları etkiler 52
4.3. İnhibisyon Etkisi Gösteren Maddeler ve IC50 Değerleri 57
4.3.1. Chrysin 58
4.3.2. Baicalein 58
4.3.3. Baicalin 59
4.3.4. Diosmetin 60
4.3.5. Rutin Hidrat 60
4.3.6. Quercetin 61
4.3.7. Myricetin 62
4.3.8. Fisetin 62
4.3.9. Gallocatechin 63
4.5. K_i Çalışmaları 64
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 67

KAYNAKLAR 69
ÖZGEÇMİŞ 70

SİMGELER DİZİNİ

HK- II	Hekzokinaz 2 enzimi
G6PD	Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
IC50	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
Ki	İnhibisyon katsayısı
Km	Enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu subsrat konsantrasyonu
NADP+	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form)
nm	Nanometre
Tris	Trihidroksimetil amino metan
Vmax	Maksimum hız
mg	Miligram
ml	Mililitre
M	Molar
mM	Milimolar
DMS	Dimetil Sülfat
PMSF	fenilmetilsülfonil florid
SDS	sodyum dodesil sülfat
µl	mikrolitre
ºC	santigrat derece
ATP	Adenin trifostat
NaCl	Sodyum klorür
NADP+	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
MgCl2	Magnezyum klorür
L	Litre
µg	mikrogram
g	gram
min.	Dakika
nm	Nanometre
m	Molalite
M	Molarite
pH	bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimidir.
He-La	kanser arştırmalarında kullanılan kültür hücreleri
FDG	Floro-2-deoksiglukoz
PET	Pozitron emisyon tomografisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Glikoliz metabolik yolu(Pelicano et al. 2006) 16
Şekil 2.2. Kanser Hücresinin Özellikleri 20
Şekil 2.3. Oksidatif fosforilasyon ve aerobik glikoliz (Devic 2016) 22
Şekil 2.4. Glukoz Alımında Artış(Finlay 2012) 23
Şekil 2.5. Kanser hücrelerinin çoğalmasında metabolik ara ürünlerin rolü 25
Şekil 2.6. Kanserde anormal artış gösteren izoenzimler 26
Şekil.2.7. Hekzokinaz ve izoenzimleri(Scatena et al. 2008) 27
Şekil.2.8. Glikoliz inhibisyonu (Ganapathy-Kanniappan and Geschwind 2013) 29
Şekil.4.1. Flavon bileşiklerinin genel molekül yapısı 38
Şekil.4.2. Flavon bileşiklerinden Chrysin'in moleküler yapısı 38
Şekil.4.3. Flavon bileşiklerinden Apigenin'in moleküler yapısı 39
Şekil.4.4. Flavon bileşiklerinden Baicalein'in moleküler yapısı 40
Şekil.4.5. Flavon bileşiklerinden Baicalin'in moleküler yapısı 40
Şekil.4.6. Flavon bileşiklerinden Diosmin'in moleküler yapısı 41
Şekil.4.7. Flavon bileşiklerinden Diosmetin'in moleküler yapısı 42
Şekil.4.8. Flavon bileşiklerinden Luteolin'in moleküler yapısı 42
Şekil.4.9. Flavonol bileşiklerin genel molekül yapısı 43
Şekil.4.10. Flavonol bileşiklerinden Rutin hidrat'ın moleküler yapısı 44
Şekil.4.11. Flavonol bileşiklerinden Kaempferol'ün moleküler yapısı 44
Şekil.4.12. Flavonol bileşiklerinden Quercetin'in moleküler yapısı 45
Şekil.4.13. Flavonol bileşiklerinden Myricetin'in moleküler yapısı 46
Şekil.4.14. Flavonol bileşiklerinden Quercetin 3- β-D glucose'un moleküler yapısı 46
Şekil.4.15. Flavonol bileşiklerinden Fisetin'in moleküler yapısı 47
Şekil.4.16. Flavonol bileşiklerinden Galangin'in moleküler yapısı 48
Şekil.4.17. Flavonol bileşiklerinden Morin hidrat' ın moleküler yapısı 48
Şekil.4.18. Flavanonların genel molekül yapısı 49
Şekil.4.19. Flavanon bileşiklerinden Hesperitin' in moleküler yapısı 50
Şekil.4.20. Flavanon bileşiklerinden Naringenin' in moleküler yapısı 50
Şekil.4.21. Flavanon bileşiklerinden Hesperidin' in moleküler yapısı 51

Şekil.4.22. Flavanon bileşiklerinden Neohesperidin' in moleküler yapısı 52
Şekil.4.23. Flavanonollerin genel molekül yapısı..... 53
Şekil.4.24. Flavanonollerden Gallocatechin' in moleküler yapısı..... 53
Şekil.4.25. Flavanonollerden Catechin gallate' ın moleküler yapısı 54
Şekil.4.27. Flavanonollerden Taxifolin hidrat'ın moleküler yapısı..... 55
Şekil.4.28. HK-II enzimi üzerine Chrysin % aktivite-[I] grafiği..... 58
Şekil.4.29. HK-II enzimi üzerine Baicalein % aktivite-[I] grafiği 59
Şekil.4.30. HK-II enzimi üzerine Baicalin % aktivite-[I] grafiği 59
Şekil.4.31. HK-II enzimi üzerine Diosmetin % aktivite-[I] grafiği..... 60
Şekil.4.32. HK-II enzimi üzerine Rutin Hidrat % aktivite-[I] grafiği 61
Şekil.4.33. HK-II enzimi üzerine Quercetin % aktivite-[I] grafiği..... 61
Şekil.4.34. HK-II enzimi üzerine Mrycetin % aktivite-[I] grafiği..... 62
Şekil.4.35. HK-II enzimi üzerine fisetin % aktivite-[I] grafiği..... 63
Şekil.4.36. HK-II enzimi üzerine gallocatechin % aktivite-[I] grafiği 63
Şekil.4.37. HK-II enzimi üzerinde gallocatechin için 5 farklı glukoz konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği 65
Şekil.4.38. HK-II enzimi üzerinde baicalein için 5 farklı glukoz konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği 65
Şekil.4.39. HK-II enzimi üzerinde baicalin için 5 farklı glukoz konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği 66

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo.2.1. Sağlıklı ve kanser hücreleri arasındaki farklılıklar 19
Tablo.4.1. Hekzokinaz-II enzimi aktivitesi üzerine optimum şartların belirlenmesi 37
Tablo. 4.2. HK-II enzimi üzerine Chrysin' in etkisi 39
Tablo. 4.3. HK-II enzimi üzerine Apigenin' in etkisi 39
Tablo. 4.4. HK-II enzimi üzerine Baicalein' in etkisi 40
Tablo. 4.5. HK-II enzimi üzerine Baicalin' in etkisi 41
Tablo.4.6. HK-II enzimi üzerine Diosmin' in etkisi 41
Tablo. 4.7. HK-II enzimi üzerine Diosmetin' in etkisi 42
Tablo. 4.8. HK-II enzimi üzerine Luteolin' in etkisi 43
Tablo. 4.9. HK-II enzimi üzerine Rutin Hidrat'ın etkisi 44
Tablo. 4.10. HK-II enzimi üzerine Kaempferol' ün etkisi 45
Tablo.4.11. HK-II enzimi üzerine Quercetin' in etkisi 45
Tablo.4.12. HK-II enzimi üzerine Myricetin' in etkisi 46
Tablo. 4.13. HK-II enzimi üzerine Quercetin 3-β-D glucose' un etkisi 47
Tablo. 4.14. HK-II enzimi üzerine Fisetin' in etkisi 47
Tablo. 4.15. HK-II enzimi üzerine Galangin' in etkisi 48
Tablo. 4.16. HK-II enzimi üzerine Morin Hidrat ' ın etkisi 49
Tablo. 4.17. HK-II enzimi üzerine Hesperitin' in etkisi 50
Tablo. 4.18. HK-II enzimi üzerine Naringenin' in etkisi 51
Tablo. 4.19. HK-II enzimi üzerine Hesperidin' in etkisi 51
Tablo. 4.20. HK-II enzimi üzerine Neohesperidin' in etkisi 52
Tablo. 4.21. HK-II enzimi üzerine Gallocatechin ' in etkisi 53
Tablo. 4.22. HK-II enzimi üzerine Catechin gallate' in etkisi 54
Tablo. 4.23. HK-II enzimi üzerine Epicatechin' in etkisi 55
Tablo. 4.24. HK-II enzimi üzerine Taxifolin hidrat' ın etkisi 55
Tablo. 4.25. Fenolik bileşiklerin HK-II enzimi üzerine etkisi 56
Tablo4.26. İnhibisyon Etkisi Gösteren Maddeler ve IC_{50} Değerleri 57
Tablo.4.27. Fenolik maddelerin HK-II enzimleri üzerine K_i çalışma sonuçları 64

1.GİRİŞ

Sağlıklı hücreler büyümek ve fonksiyonlarını yürütmek için gereken enerjiyi; glukoz kullanarak üretirler. Canlılar biyolojik yaşamı sürdürebilmeleri için gerekli olan bu enerjiyi yönlendirebilmek için hücre içi düzenleyicilere ihtiyaç duyarlar. Yeni dokuların inşası, eskilerin ortadan kaldırılması, gıdaların enerjiye ve metabolizma için gerekli metabolitlere dönüştürülmesi, atık maddelerin ortadan kaldırılması ve canlı için tekrar yeni ürünlere dönüştürülmesi veya zararsız hale getirilmesi gibi faaliyetler enzimler aracılığıyla olmaktadır.

Aynı zamanda enzimler bize çok önemli ipuçları da vermektedirler. Örneğin; birçok hastalığın teşhisinde ve tedavi sürecinin takibinde kullanılmaktadır. Enzimlerin sağlık alanında, tanı ve tedavide son derece önemli görevleri ve katkıları bulunmaktadır. Enzimlerin niteliksel ve niceliksel tayinleri yapılarak pek çok kalıtsal bozukluğun ve hastalığın tanısı konulmakta, hastalığın geleceği ile ilgili ipuçları elde edilmektedir(Adem 2011). Enzimler canlı doku ve hücrelerin hatta organların ihtiyacına göre özelleşmiş yapıya sahiptirler(Gill *et al.* 2016). Enzimlerdeki bu farklılaşmalar; her bir enzimi özel kılmaktadır. Dolayısıyla hastalıkların tanısı ve tedavisi için mükemmel bir hedef haline gelmiştir.

Kanser, günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde olmak üzere önemli sağlık sorunları arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Her geçen gün hızla artan kanser vakası milyonlarca insanın hayatını tehdit eden metabolik bir hastalıktır. Bu hastalığın tedavisi için çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Kanser oluşumuna neden olan faktörlerin nitel ve nicel artışının yanı sıra tanı olanaklarının gelişmesi ile paralel bir artış gösteren vaka sayıları, konuyla ilgili kişi ve kuruluşların kanserle daha fazla yakından ilgilenmesine ve araştırmaların artmasına yol açmıştır. (http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir/4-kanser-nedir.html 2017) Günümüzde klinik düzeyde gerek araştırma gerekse uygulama yönünden çalışmaların yoğunluk kazandığı tartışılmaz bir gerçektir. Yapılan bu araştırmalarda, hastalıkla mücadele için yeni ve özel stratejiler belirlenmeye çalışılmaktadır.

Yapılan bu çalışmada da hedeflenen kanser dokularına özgü enzimleri inhibe ederek yeni tedavi stratejileri geliştirmektir. Böylelikle diğer sağlıklı dokular üzerindeki toksik ve olumsuz etkiler en aza indirgenecektir. Bu farklı enzimlerin kanser tedavisinde hedef seçilebileceği literatürde belirtilmiş ve bu enzimlerin inhibitörleri kullanılarak klinik çalışmalar başlatılmıştır.(Gatenby and Gillies 2007, Scatena *et al.* 2008)

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Glikoliz ilk olarak 1930'lu yıllarda Gustov Embden ve Otto Meyerhoff glikoliz yolunun bütün oksidasyon-redüksiyon basamaklarını ortaya koydukları için glikoliz yoluna Embden-Meyerhoff yolu da denilir.

Kanser (cancer) terimi, tıbbın babası olarak bilinen Yunan fizikçi Hipokrat (MÖ 460-370) tarafından oluşturulmuştur. Hipokrat carcinos ve carcinoma terimlerini ülser oluşturan ve ülser oluşturmayan tümörler için kullanmıştır. Kanser kelimesi de burdan gelmektedir.(http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir/4-kanser-nedir.html 2017)

2.1. Enzimler

Sağlıklı hücreler büyümek ve fonksiyonlarını yürütmek için gereken enerjiyi; glukoz kullanarak üretirler. Canlılar biyolojik yaşamı sürdürebilmeleri için gerekli olan bu enerjiyi yönlendirebilmek için hücre içi düzenleyicilere ihtiyaç duyarlar. Yeni dokuların inşası, eskilerin ortadan kaldırılması, gıdaların enerjiye ve metabolizma için gerekli metabolitlere dönüştürülmesi, atık maddelerin ortadan kaldırılması ve canlı için zararsız hale getirilerek tekrar yeni ürünlere dönüştürülmesi enzimler aracılığıyla olmaktadır.

Aynı zamanda enzimler bize çok önemli ipuçları da vermektedirler. Enzimler, hastalıkların teşhisinde ve tedavi sürecinin takibinde çok önemli bir yere sahiptir. Enzimlerin sağlık alanında, tanı ve tedavide son derece önemli görevleri ve katkıları bulunmaktadır. Enzimlerin niteliksel ve niceliksel tayinleri yapılarak pek çok kalıtsal bozukluğun ve hastalığın tanısı konulmakta, hastalığın geleceği ile ilgili ipuçları elde edilmektedir(Küfrevioğlu 1985, Adem 2011). Şöyle ki enzimler genellikle canlı doku ve hücrelerin ve hatta organların ihtiyacına göre özelleşmiş yapıya sahiptirler(Gill *et al.* 2016). Enzimlerdeki bu farklılaşmalar; her bir enzimi özel kılmaktadır. Dolayısıyla hastalıkların tanısı ve tedavisi için mükemmel bir hedef haline gelmiştir.

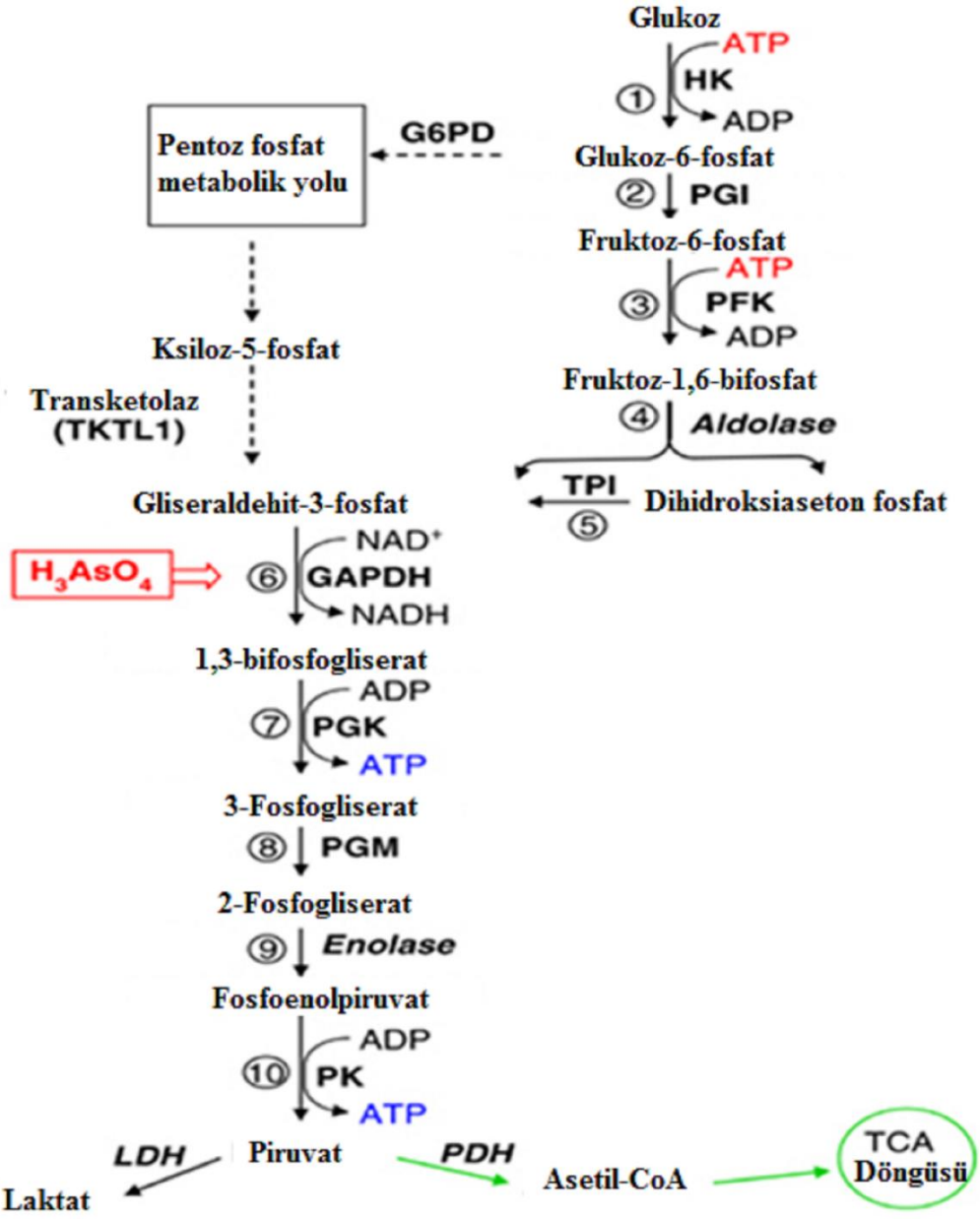
Enzimler hücre içindeki tepkimeleri kendisini değişikliğe uğratmadan gerçekleştirir. Enzimin etki ettiği maddeye subsrat adı verilir. Reaksiyon sonucu oluşan maddeye de ürün denir. Ürün açığa çıktıktan sonra enzim başka bir subsrat molekülünü ürüne dönüştürmek üzere çalışmaya devam eder (Küfrevioğlu 1985, Bhat 2000).

Enzim aktivitelerini in vivo ve in vitro olarak azaltan ya da tamamen yok eden maddelere inhibitör denilmektedir. Bu maddeler genellikle küçük molekül yapısına sahip bileşikler ya da iyonlardır(Küfrevioğlu 1985). Enzimlerin kinetik özellikleri hakkındaki bilgiler, Michaelin-Menten eşitliğinde yer alan enzimin subsrata ilgisini ifade eden K_m sabiti ve enzimin katalitik aktivitesini ifade eden V_{max} değerlerinden anlaşılır. Enzim aktivitesi "Enzim Ünitesi" ile ifade edilir(Küfrevioğlu 1985, Adem 2006).

2.2. Enerji Kaynağı Olarak Kullanılan Glikoliz Metabolik Yolu

Canlı hücre içerisinde bir yaşam döngüsü vardır. Hücreler büyümek ve fonksiyonlarını yürütmek için enerjiye ihtiyaç duyarlar. Bu enerjiyi sadece büyümek ve fonksiyonlarını yerine getirmek için kullanmazlar. Aynı zamanda yeni dokuların inşası, yıpranmış hücrelerin ortadan kaldırılması, dışarıdan alınan gıdaların enerjiye dönüştürülmesi ve yine metabolizma için gerekli olan metabolitlerin temin edilmesi, atık maddelerin ortadan kaldırılması ve canlı için tekrar yeni ürünlere dönüştürülmesi için kullanırlar.
Canlılar biyolojik yaşamı sürdürebilmeleri için gerekli olan bu enerjiyi karbonhidrat olarak en yaygın kullanılan glukozdan elde ederler. Glukoz sadece mükemmel bir yakıt değil, aynı zamanda dikkat çekici derecede kolay yönlendirilebilen biyosentetik tepkimeler için çok sayıda metabolik ara bileşikleri sağlayabilen bir öncüldür.

Glikoliz, glukoz metabolizmasında glukozun yıkım reaksiyonudur. Bir başka deyişle hücre devamlılığını sağlamak için gerekli olan enerjinin kazanıldığı enzimatik reaksiyonlar zinciridir. Bu reaksiyonlar sonunda glukoz pürivik asite (pirüvata) kadar parçalanarak ATP kazanılır.



Şekil 2.1. Glikoliz metabolik yolu(Pelicano *et al.* 2006)

2.2.1. Glikoliz metabolik yolu reaksiyonları ve enzimleri

Glikoliz, glukozun pirüvik aside kadar parçalandığı on basamaklı bir metabolik yoldur. Bu metabolik yolda net olarak 2 ATP elde edildiği bilinmektedir (Pelicano *et al.* 2006). Mevcut metabolik yol şağıda basamaklar halinde verilmiştir;

Hekzokinaz: Bu enzim glikolizin ilk basamağıdır. Glukozun fosforillenerek glukoz-6-fosfat'a dönüşümünü katalizler. Bu reaksiyon dönüşümsüz bir reaksiyondur. Diğer kinazlarda olduğu gibi aktivite gösterebilmesi için Mg^{2+}'ya gereksinim duyarlar (Pelicano *et al.* 2006).

Glukoz-6 fosfat izomeraz: Bu enzim reaksiyonu glukoz-6-fosfat'ın früktoz-6-fosfat'a tersinir olarak izomerleşmesini katalizler. Bu enzim Mg^{2+}'ye gereksinir ve glukoz-6-fosfat ve fruktoz-6-fosfat'a spesfiktir (Pelicano *et al.* 2006).

Fosfofruktokinaz-1: Bu enzim hücresel şartlarda dönüşümsüzdür ve glikolizde temel düzenleyici noktadır. Glukoz-6-fosfat' ın glikolize girip girmeyeceğini belirler. Substrat bağlama yerlerine ek olarak, bu kompleks enzimin allosterik inhibitörleri veya aktivatörleri bağlayacak birkaç düzenleyici bölgesi vardır (Pelicano *et al.* 2006).

Aldolaz: Aldolaz fruktoz-1,6-fosfat' ın gliseraldehit-3 fosfat ve dihidroksiaseton' a dönüşümünü katalizleyen enzimdir. İlginç bir şekilde bu enzimin malign tümör olan hastalarda yükseldiği görülmüştür (Pelicano *et al.* 2006).

Trioz fosfat izomeraz: Trioz fosfatların birbirine dönüşümünü katalizler. Bu aşamada trioz fosfat izomeraz, dihidroksiaseton fosfatın gliseraldehit-3 fosfat' a dönüşümünü katalizler (Pelicano *et al.* 2006).

Gliseraldehit-3 fosfat dehidrojenaz: Bu enzim NAD+' nın NADH' a indirgenmesiyle birlikte gliseraldehit-3-fosfat' ın 1,3-bifosfogliserat' a dönüşümünü katalize eder (Pelicano *et al.* 2006).

Fosfogliserat kinaz: Bu enzim ADP den ATP nin oluşumu ile birlikte 1,3-bifosfogliserat' ın 3-fosfogliserat' a dönüşümünü katalize eder. ATP üretiminin başladığı basamaktır (Pelicano *et al.* 2006).

Fosfogliserat mutaz: Fosfogliseratmutaz gliserat-3-fosfat ve gliserat-2-fosfat'ın birbirine dönüşümünü katalizleyen bir glikolitik enzimdir (Pelicano *et al.* 2006).

Enolaz: Enolaz 2-fosfogliserat'ın fosfoenolpiruvat'a dönüşümünü katalize eder (Pelicano *et al.* 2006).

Piruvat kinaz: Piruvat Kinaz(PK),fosfoenolpiruvat'dan ADP'ye fosforil grubunun geri dönüşümsüz transferini katalizler. Piruvat ve ATP açığa çıkar. Fosfofruktokinazdan sonra ATP üretiminin yapıldığı ikinci reaksiyondur (Pelicano *et al.* 2006).

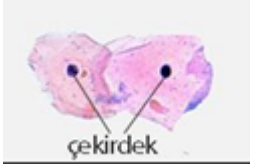
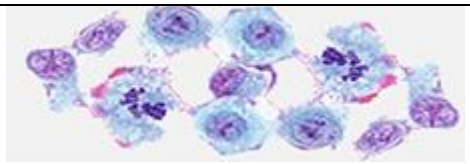
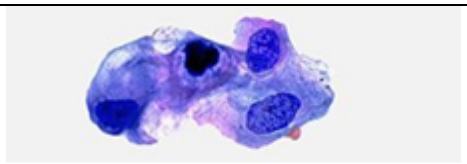
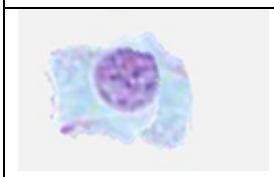
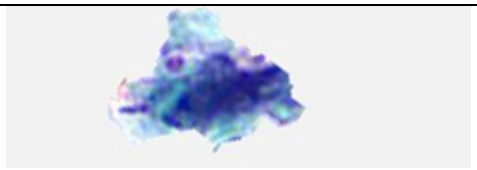
2.3. Kanserin Tanımı ve Özellikleri

Latincede "cancer" Yunancada "carcinos" sözcüklerinden kaynağını alan, kanserin kelime anlamı yengeçtir. Yengeçler, düşmanını uzun dişli kollarıyla tutar ve yavaş yavaş kemirerek yer. Bu benzerlik nedeni ile kanserin kelime anlamı yengeçti(Hüsamettin Erdamar 2015). Kanser terimi ilk olarak Hipokrat tarfından oluşturulmuş olup; yavaş gelişen, iyileşmeyen yaralara carcinos, kötü seyirli olanlara da carsinoma deyimini kullanmıştır(Çakmak 2012).

Kanser bir metabolik hastalık olmanın yanında DNA'da yapı değişikliğiyle başlayan bir genom hastalığıdır. Kanserde normal büyüme ve farklılaşmayı sağlayan mekanizmalar üzerindeki kontrol kaybolmuş ve değişime uğramıştır. Kanser hücrelerindeki bu özellik onların kontrolsüz ve sınırsız çoğalmasına neden olur. Kanser hastalığının birçok türü vardır. Meydana geldiği organ veya uzuva göre ismini alır(https://www.drozdogan.com/kanser-nedir-neden-ve-nasil-olusur-ozetle-tum-surec/ 2017) Kanser hastalığında karbonhidrat metabolizması birçok değişime uğramaktadır ve bu durum, kanser teşhis ve tedavisinde kullanılan yöntemlere ışık tutmaktadır(Hüsamettin Erdamar 2015)

Vücudumuzdaki sağlıklı hücreler ile kanser hücrelerini kıyaslamak kanseri daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır.

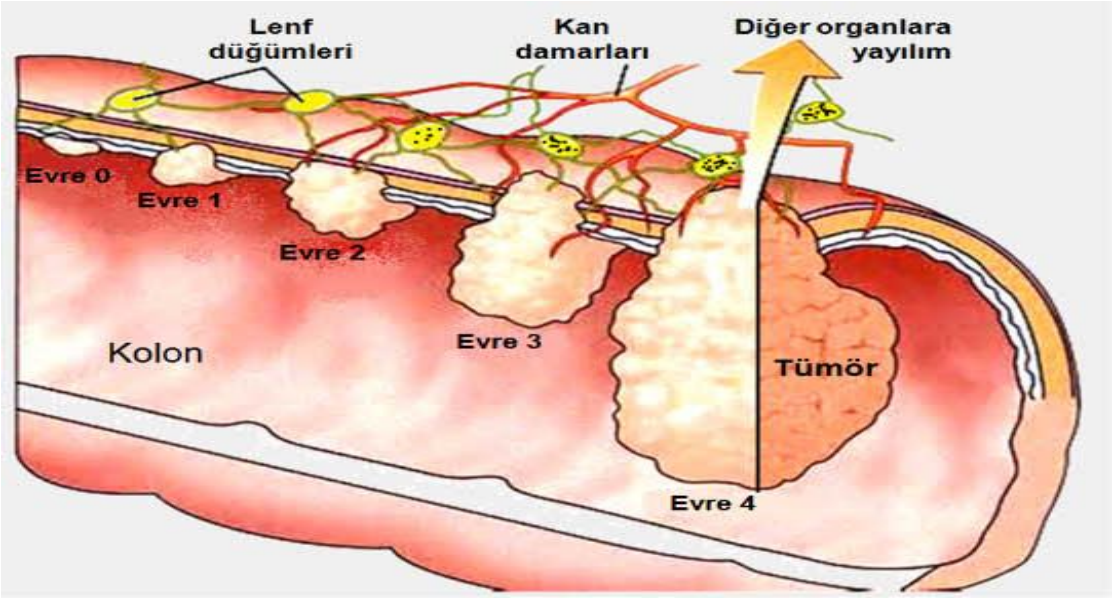
Tablo.2.1. Sağlıklı ve kanser hücreleri arasındaki farklılıklar (https://www.drozdogan.com/kanser-nedir-neden-ve-nasil-olusur-ozetle-tum-surec/ 2017)

Sağlıklı Hücre	Kanser Hücresi	Hücre Farklılıkları
		Çok daha büyük ve farklı şekillerde hücre çekirdeği varlığı.
		Çok sayıda ve kontrolsüz bölünen hücre varlığı.
		Hücre boyutu, şekli ve organel yapılarındaki farklılıkların varlığı.
		Normal hücre özelliklerinin kaybolması.

Vücudumuzdaki sağlıklı hücreler bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Yaralanan dokuların onarılması, ölen hücrelerin de yenilenmesi amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar. Fakat hücrelerin bu yetenekleri sınırlıdır, sonsuz bölünemezler. Normal şartlar altında biyolojik düzen buna izin vermez. Bu doğal düzen anormal bir şekilde bölünen ya da az bile olsa değişime uğramış hücreleri algılar ve onları programlı ölüme iter. Buna hücrenin programlı ölümü yani apoptosis denir. Kanser hücrelerinde hücre çekirdekleri farklılaştığı için hücre faaliyetlerini kontrol eden mekanizmalar da

farklılaşarak devre dışı kalmıştır. Bu sebeble kanserli hücrelerde bölünme kontrolsüz ve çok sayıdadır. Hücrenin boyutları farklılaşmış ve normal özelliklerini kaybetmiştir. Kanser hücrelerinin özellikleri;

1. Büyüme faktörlerinden bağımsız olarak kontrolsüz büyüme
2. "Planlı hücre ölümü" (Apoptoz) sisteminin bozulması sonucu mutasyona uğramış veya genetik olarak hatalı hücrelerin hızla çoğalması
3. Yeni damarlanmalar(Anjiojenez) yapabilme yeteneği ile tümör hücrelerinin hızla büyümesi ve çoğalması
4. İnvazyon(dokunun içine yerleşme) ve metastaz (farklı doku ve organlara yayılım) yapabilme yeteneği kanser hücrelerinin ayırt edici özelliğidir.(Hanahan and Weinberg 2000)



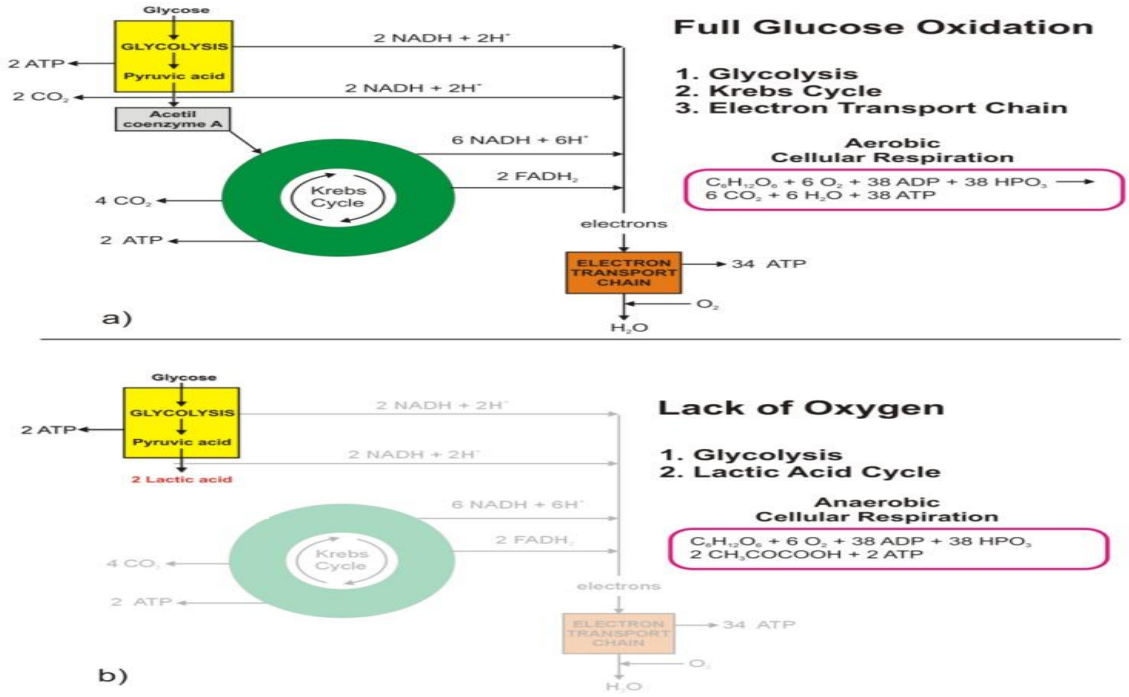
Şekil.2.2. Kanser Hücresinin Özellikleleri (http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser/ 2017)

2.4. Warburg Teorisi ve Kanser Hücrelerinde Glukoz Metabolizması

Bir Alman biyokimyacı olan Dr. Otto Warburg, 1931′de, oksijen yetersizliğinin ve hücre fermantasyonunun, kanser sürecinin parçaları olduğunu keşfetmesiyle Nobel Ödülü almıştı. Dr. Warburg' a göre: "Kanserin tek nedeni oksijensiz yaşamdır. Normal hücreler oksijene gereksinme duyarlar iken kanser hücreleri oksijensiz de yaşayabilir." Dr. Warburg, herhangi bir embriyodan alınan normal hücreleri laboratuvar tüpünde oksijensiz büyümeye zorlandığında kanser hücrelerinin özelliklerini aldıklarını gösterdi. Warburg teorisine göre, hücreler oksijenden mahrum bırakılınca, enerjilerini, oksijenden değil, bunun yerine şekerin fermantasyonundan alarak, glikoz reaksiyonlarına girebiliyordu. (Pelicano *et al.* 2006, Devic 2016)

Normal hücrelerle kanser hücreleri karşılaştırıldığında yeterli oksijen varlığında bile glikolitik aktivitenin önemli ölçüde yükseldiği görülmüştür. 'Kanser hücrelerinin başlangıcı' ya da maling dönüşümde en temel metabolitik değişim olarak aerobik glikoliz olduğu kabul edilmiştir. Çeşitli doku kökenlerinde birçok kanser hücrelerinde sürekli glikoliz artışı gözlenmiştir, bu metabolik değişimin kanserde ortak olduğunu akıllara getirmektedir. Buna rağmen kanserin gelişimi ve aerobik glikoliz artışı arasındaki neden-sonuç ilişkisi tartışmalıdır.(Pelicano *et al.* 2006)

Daha sonra yapılan çalışmalarda Warburg'un kanserli hücrelerin glukozu, aerobik glikoliz yoluyla metabolize ettiği ilk hipotezinin tersine, normal hücrenin glikoz metabolizmasını oksidatif fosforilasyondan aerobik glikolize geçirdiği anda normal hücrenin kanserleştiğine ilişkin yeni bir hipotez sunulmuştur. (Devic 2016)
Tümör hücrelerinin ATP üretirken oksidatif fosforilasyondan daha az etkili olan aerobik glikolizi (Warburg etkisi) tercih etmeleri bize biraz düşündürücü gelebilir ancak kanser hücreleri o kadar hızlı çalışmaktadır ki; bize az gibi görünen bu kazançla hem kısa sürede hem de çok sayıda enerji elde etmektedirler.



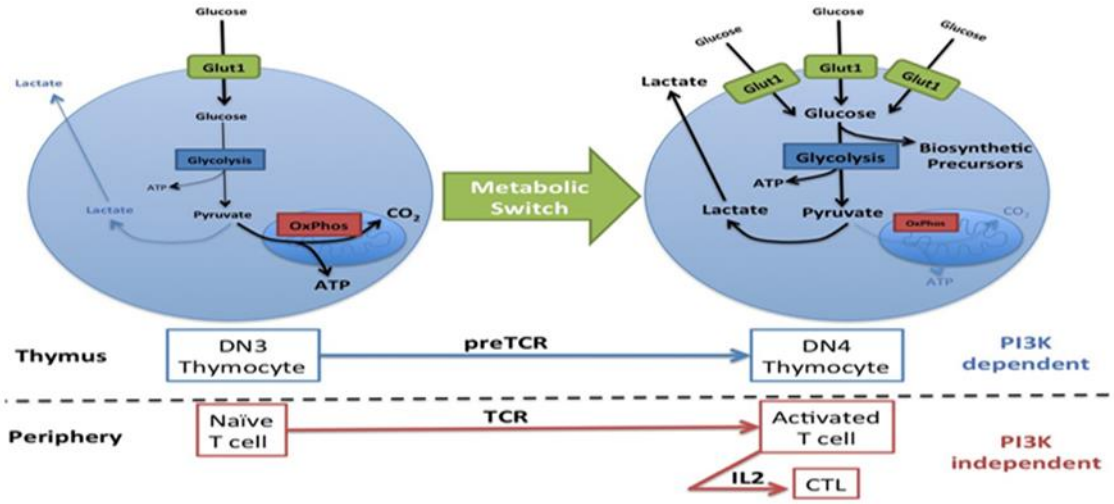
Şekil 2.3. Oksidatif fosforilasyon ve aerobik glikoliz (Devic 2016)

Kanser hücreleri aerobik glikoliz kullanarak agresif mikro çevre koşullarına adaptasyon sağlarlar.(Hanahan and Weinberg 2000, Hüsamettin Erdamar 2015) Ayrıca aerobik glikolizde karbon zincirlerini hücre çoğalması için gerekli olan metabolitlerin (nükleik asitler, proteinler ve lipidlerin) sentezi için kullanırlar. (Devic 2016)

Kontrolsüz bir şekilde çoğalıp, büyüyen kanser hücreleri normal hücrelerden 10-15 kat daha fazla enerjiye ihtiyaç duyarlar.(Hanahan and Weinberg 2000, Hüsamettin Erdamar 2015) İhtiyaç duydukları bu enerjiyi karşılayabilmek için hücrenin enerji santrali olan mitokondriyi devreden çıkartıp anaerobik glikoliz yoluyla istedikleri kadar enerji elde ederler. Bu yol tam da kanser hücrelerinin tabiatına uygun bir yoldur. Daha hızlı büyümek ve çoğalmak için, daha sıkı çalışmak zorunda kalan Kanser hücrelerinde gerçekleşen glukoz metabolizmasındaki biyokimyasal değişiklikler iki büyük olay ile ifade edilebilir. Bu değişimler şunlardır:

1- Glukozun piruvata dönüşüm süreci sonunda laktat üretimi (fermentasyon) ile sonuçlanan anaerobik glikolize yöneliş ve

2- Glukoz alımında artıştır(Hanahan and Weinberg 2000, Ganapathy-Kanniappan and Geschwind 2013, Hüsamettin Erdamar 2015).



Şekil 2.4. Glukoz Alımında Artış(Finlay 2012)

2.5. Kanser Tanı ve Tedavisinde Glikolizin Yeri

Vücudumuz, kanseri beslemeye çalışırken kapasitesinin üstünde çalışır ve bu enerjiyi karşılamak için glikoliz hızı artar(Ganapathy-Kanniappan and Geschwind 2013).

Günümüzde kanserin bu biyokimyasal özelliğinden klinik olarak yararlanılmakta ve tümör tepkilerinin belirlenmesi yoluyla radyoaktif olarak işaretlenen glukoz analoğu Floro-2-deoksiglukoz (FDG), PET (pozitron emisyon tomografi) çekimlerinde kullanılmaktadır(Ganapathy-Kanniappan and Geschwind 2013, Hüsamettin Erdamar 2015). Vücuda verilen radyoaktif olarak işaretlenmiş glukoz analoğu, glukoza ilgisi yüksek olan kanserli hücrelerin tespitinde kullanılır. .

2.6. Kanserde Aerobik Glikolizi Artıran Çeşitli Mekanizmalar

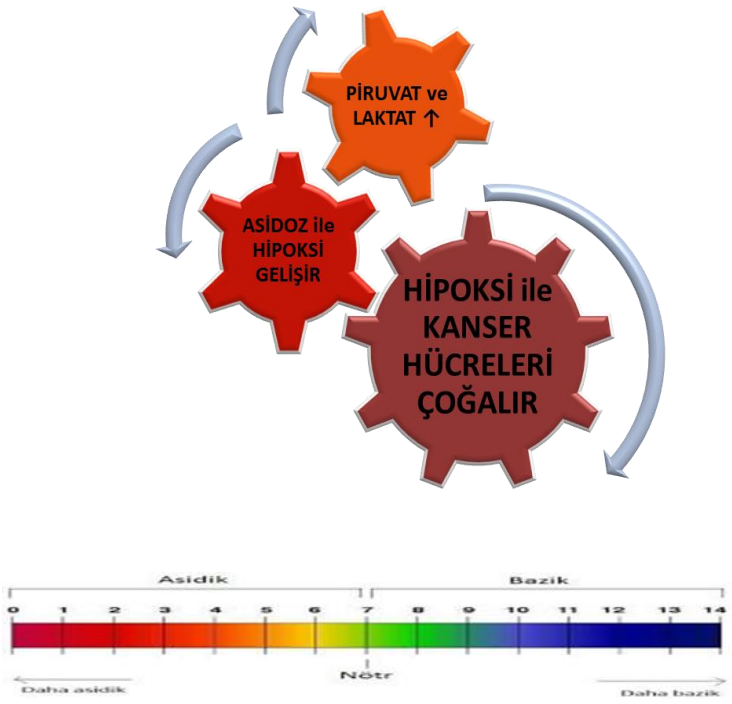
Kanserde aerobik glikolizi artıran birçok mekanizma olduğu bilinir. Aerobik glikolizin artması kanser hücrelerinin hızla büyüyüp çoğalması anlamına gelir ve aynı zamanda aerobik glikoliz sonucu biriken laktat ve piruvat, kanserin oluşumuna ve yayılımına zemin hazırlar, aynı zamanda anti-kanser tedavilere direnç oluşturur. Kanser oluşumunu hızlandıran bu mekanizmalara aşağıda kısaca değinilmiştir.

2.6.1. Mitokondriyal hasarlar

Glikoliz, glukozun bir takım kimyasal reaksiyonlar sonucu piruvata dönüşmesi ve bu arada ATP (enerji) sentezlenmesi olayıdır. Glikoliz olayında oksijen kullanılmaz. Yeterli oksijen varsa, oluşan piruvat mitokondriye girer ve burada tam bir oksidasyona uğrayarak karbondioksit ve suya kadar parçalanır. Mitokondriyal DNA nın mutasyona uğraması mitokondrinin işlev bozukluğuna neden olduğu bilinmektedir. Mitokondrinin devre dışı kalması ise aerobik glikoliz metabolizmasının artışına neden olduğu bilinmektedir (Pelicano *et al.* 2006).

2.6.2. Bazı metabolik ara ürünlerin artışı

Glikoliz hızı artıkça metabolik ara ürün miktarlarında da artış görülür. Reaksiyon sonunda biriken metabolik ara ürünler laktat ve piruvattan ibarettir. Hücrede biriken laktat ve piruvat asidik bir mikro çevre oluşturur. Hücre ortamında oluşan asidoz protein yapısında olan enzimlerin biyolojik aktivitelerini olumsuz yönde etkiler. Ayrıca hastalıkların oluşmasına ve üremesine zemin hazırlar. Hücre asidoza girdiğinde hipoksi gelişir. Gelişen hipoksi ile birlikte aerobik glikolizde belirgin bir artış görülür. Bu döngü aşağıda şekil.2.5. ile gösterilmiştir. (Devic 2016)



Şekil 2.5. Kanser hücrelerinin çoğalmasında metabolik ara ürünlerin rolü

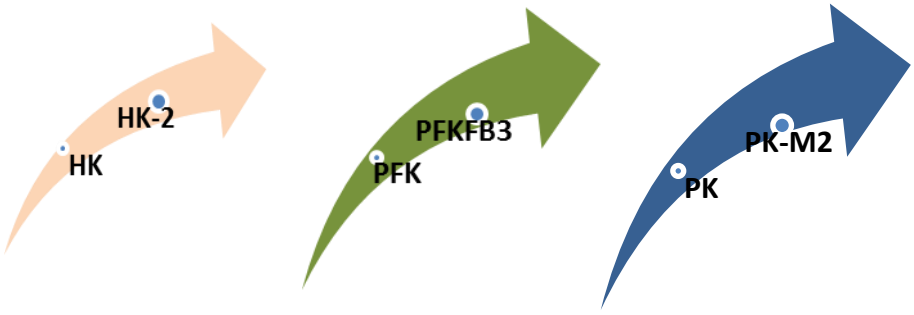
2.6.3. Hipoksi

Otto Warburg'a göre kanserin tek bir sebebi vardır. Bu da vücudun normal hücrelerinin oksijenli solunumunun, oksijensiz (aerobik) hücre solunumuyla yer değiştirmesidir.(Devic 2016). Hücrelerde O2 kaynağının yetersiz oluşu ya da oksijenlenmenin yeteri kadar sağlanmadığı durumlarda aerobik glikoliz artışı görülebilir. Hipoksik koşullarda ortaya çıkan hipoksi uyarı faktörü dediğimiz HIF-1α; hipoksik ve stresli durumlarda hücresel cevabı kontrol eden hücre içi bir proteindir. Hipoksik durumlar HIF-1α'nın kontrolsüz bir şekilde expresyonuna sebeb olarak aerobik glikolizi arttırır. (Pelicano *et al.* 2006, Hüsamettin Erdamar 2015)

2.6.4. Onkojen ve bazı metabolik enzimlerin anormal artışı

İnsan vücudunda kanser oluşumunu engelleyen biyolojik mekanizmalar vardır bunlar; tümör baskılayıcı genler, DNA onarım genleri ve apoptozisi düzenleyen genlerdir. Bunlardan biri veya birkaçının bozulması sonucu kanserli hücre gelişiminin gözlenebildiği bilinmektedir. Buna ek olarak mutasyona uğramış her bir gen karşımıza bir onkojen olarak çıkabilir.

Metabolik enzimlerin anormal dışa vurumu özellikle glikolizde metabolik yolun hız sınırlayıcı kontrol noktası enzimlerinin belirgin artışı glikolizi kontrolden çıkararak hızla artmasına sebeb olur. Glikolizde hız kısıtlayıcı kontrol enzimlerinin izoenzimleri aşağıda şekil.2.6. da gösterilmiştir.

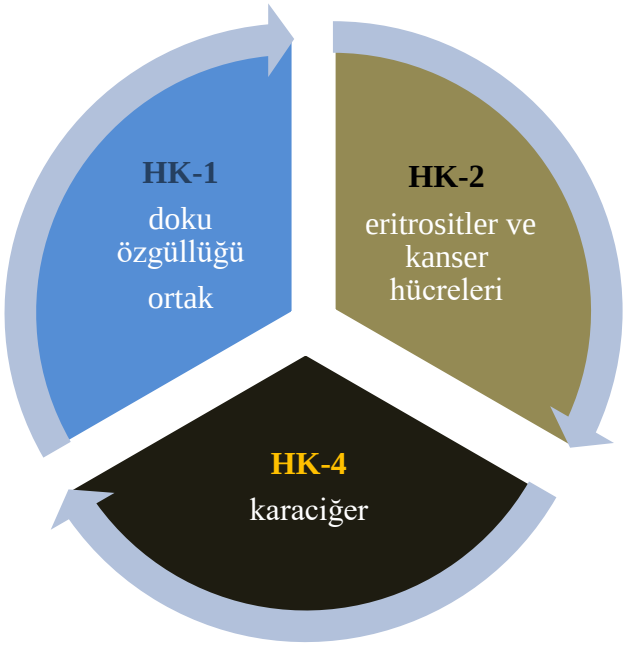


Şekil 2.6. Kanserde anormal artış gösteren izoenzimler

2.7. Kanserde Dışa Vuran İzoenzimler

Kanserli hücrelerde, enerji ihtiyacı arttıkça glikolitik yolu enzimlerinin kapasitesinin artması gerekmekte ve dolayısıyla bu enzimlerin izoenzimleri devreye girmektedir. Örneğin; Hekzokinaz enziminin dört izoformu vardır. Bunlar HK I, II, III ve IV olarak adlandırılırlar. Her biri ayrı ayrı doku ve organlarda hayat bulmaktadır. Örnek vermek

gerekirse; HK-I dokularda ortak bulunurken HK- II eritrositlerde bulunur. HK-III testislerde, HK- IV yani glukokinaz da karaciğerde bulunmaktadır. (Scatena *et al.* 2008).



Şekil.2.7. Hekzokinaz ve izoenzimleri(Scatena *et al.* 2008)

Hemen hemen bütün kanser türlerinde HK-II nin aşırı sentezlendiği bir çok çalışmada belirtilmiş ve literatürde yerini almıştır. (Hu *et al.* 2014, Jiang-Tao Zhong 2017, Tao *et al.* 2017). Kanserde glikolitik yolun ilk hız kısıtlayıcı kilit enzimi olan HK-II nin inhibe edilmesi tedavi stratejilerinden biridir. Yapılan bu çalışmada da hedeflenen kanser dokularına özgü enzimleri inhibe ederek yeni tedavi stratejileri geliştirmektir. Böylelikle diğer sağlıklı dokular üzerindeki toksik ve olumsuz etkiler en aza indirgenecektir. Bu farklı enzimlerin kanser tedavisinde hedef seçilebileceği literatürde belirtilmiş ve bu enzimlerin inhibitörleri kullanılarak klinik çalışmalar başlatılmıştır.(Gatenby and Gillies 2007, Scatena *et al.* 2008)

2.8. Kanser Tedavisinde Stratejiler

Kanser tedavisi için yeni stratejiler geliştirilmekte ve her geçen gün bu stratejilere bir yenisi eklenmektedir. Klinik olarak artan kanser vakaları bu konuda yapılan çalışmaları hızlandırmaktadır(http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir/4-kanser-nedir.html 2017) Metabolik olarak belirlenen bu stratejiler aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

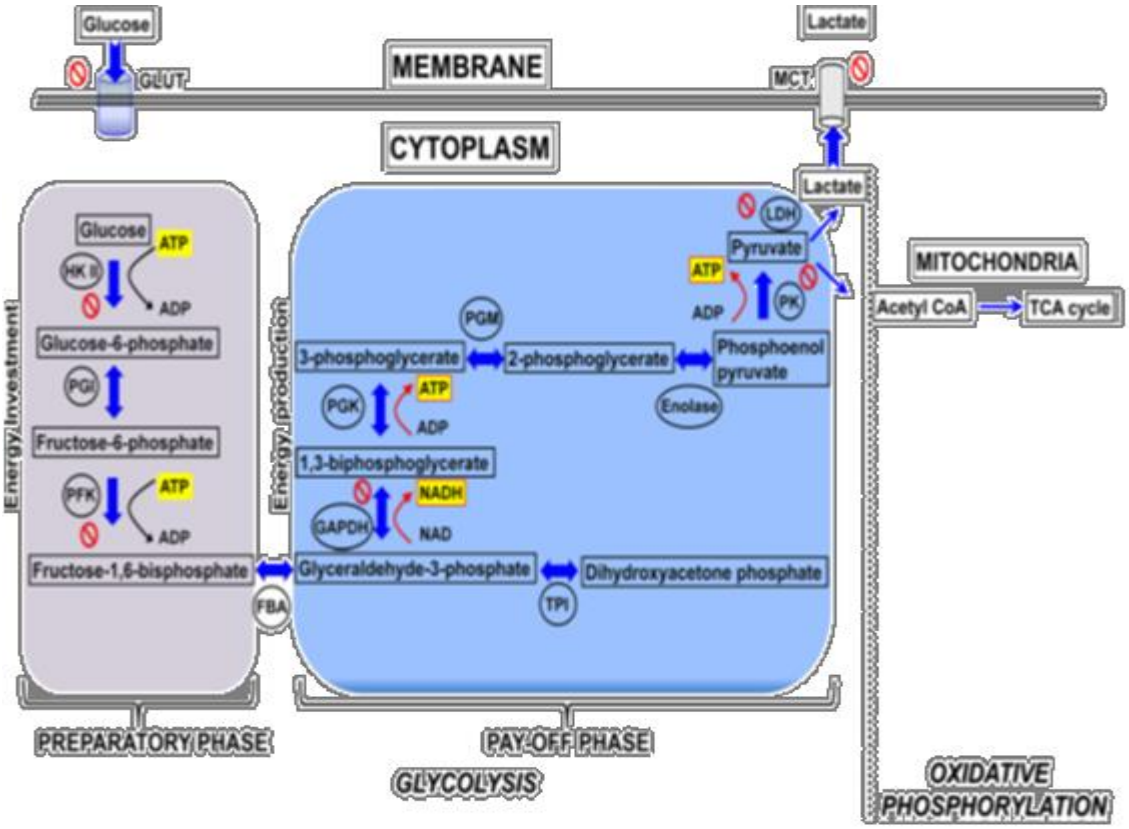
Kanser terapi için belirlenen metabolik stratejiler aşağıda verilmiştir. Bu stratejiler:

1) Enerji kaynağı olarak glukoz yoksunluğunun sağlanması
2) Glikolitik yolun inhibisyonunu hedeflenmesi
3) Glukoz analoglarının kullanılması
4) Glukoz transportunu engellenmesidir.

2.9. Kanser Tedavisi İçin Glikoliz İnhibisyonu

Glikolitik yolun inhibisyonu, kanser terapi için seçilen stratejiler içerisinde en etkili ve sürdürülebilir olduğunu düşündürmüştür. Glikoliz metabolik yolunun hız kısıtlayıcı 3 kontrol noktası vardır. Bunlar; Hekzokinaz, Fosfofruktokinaz ve Piruvatkinaz enzimlerinin katalizlediği basamaklardır. Sözü edilen bu kontrol noktası enzimlerinin inhibisyonuyla kanser hücrelerinin metabolik dengesinin değişebileceği düşünülmekte ve bununla ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır (Pelicano *et al.* 2006, Scatena *et al.* 2008, Hüsamettin Erdamar 2015). Ancak bir süre sonra bu strateji de kanser için bir çözüm olmaktan çıkmıştır. Çünkü kanserli hücreleri etkilemenin yanında diğer sağlıklı hücre ve dokular da etkilenmiş hatta zarar görmüştür. Bir süre sonra sağlıklı dokular üzerinde toksik etkiye neden olacağı için tedavi amaçlı hedef olarak tercih edilmemiştir. Glikolitik enzimler yerine glikolitik enzimlerin izoenzimlerini hedef almak diğer normal dokular üzerindeki toksik ve olumsuz etkileri en aza indirmiş ve seçicilik kazandırmıştır. Bu bağlamda glikoliz yolunun önemli bir basamağı olan Hekzokinaz enziminin izoenzimi

olan HK-II' nin sinyal yolaklarını inhibe etmenin, kanser tedavisi için yeni bir strateji olabileceği yapılan çalışmalar sonunda belirtilmiştir. .(Jiang-Tao Zhong 2017)



Şekil.2.8. Glikoliz inhibisyonu (Ganapathy-Kanniappan and Geschwind 2013)

2.10. Glikoliz İnhibisyonu İçin Kullanılan Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler benzen halkası içeren organik maddelerdir(Arslan 2015). Fenolik bileşikler sekonder metabolitlerin ana sınıfını oluşturan, benzen halkasına hidroksil bağlı kimyasal bileşiklerdir. Fenolik bileşikler, bitkilerde fazla miktarda bulunur, meyve çiçeklere renklerini verir, çevresel stres faktörlerine karşı bitkilere koruma sağlar. Bitkilerdeki Fenolik bileşikler yıllardır geleneksel olarak tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Ayrıca antioksidan, antikanser ve antienflamatuar gibi farklı biyolojik etkilerinden dolayı önemli bileşiklerdir. İnsan sağlığına faydalı olabileceği düşünülen bu bileşiklerin, birçok hastalığın önlenmesinde ve iyileştirilmesinde tedavi amaçlı kullanılabileceği literatürde belirtilmiştir.(Gulcin *et al.* 2004, Dykes and Rooney 2007) Birçok deneysel ve epidemolojik çalışmada çeşitli dejeneratif hastalıklara karşı fenolik asitlerin koruması rapor edilmiştir (Kris-Etherton and Keen 2002, Oktay *et al.* 2003, Baker *et al.* 2007, Dykes and Rooney 2007, Newman 2008).

Bitkiler aleminde çok geniş bir yayılım alanına sahip olan fenolik bileşikler en az bir hidroksil grubu (OH) ve bunun fonksiyonel gruplarını içeren aromatik halkalı bileşiklerdir. En basit fenolik bileşik bir tane hidroksil grubu içeren benzendir ve fenol olarak adlandırılmaktadır. Birden fazla hidroksil grubu içeren fenolik maddeler ise polifenoller olarak bilinirler. Polifenoller çok genel bir sınıflandırma şekli olarak fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere 2 grup altında toplanmaktadırlar (Shi *et al.,* 2003)(Arslan 2015).

Bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Bu bileşikler kendi içinde gruplara ayrılmakla beraber fenolik asitler ve flavonoidler en büyük grubunu oluşturmaktadır. Flavonoidler biyolojik aktivite gösteren bitki fenollerinin en büyük grubunu içermektedir. Bu bileşikler birçok alanda kullanılmaktadır. Sözü edilen bileşikler insan sağlığına faydalı olabileceği gibi birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde de kullanılabileceği literatürde belirtilmiştir(Arslan 2015)(Shi *et al.,* 2003)(Baker *et al.* 2007, Dykes and Rooney 2007, Newman 2008)

Sarı renkli olmaları nedeniyle latince 'sarı ' anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilerek 'flavonoid ' adını almışlardır. Flavonidler suda çözünen bileşiklerdir ve kimyasal olarak iskelet yapılarına göre;

1) Flavonlar
2) Flavonoller
3) Flavanonlar
4) Flavanonoller
5) Flavanoller
6) İzoflavonlar
7) Antosiyanidin
8) Antosiyanidinler
9) Şalkonlar olamak üzere 9 sınıfta incelenirler.(Newman 2008)

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Deneysel çalışmalarda kullanılan materyaller; laboratuvarda kullanılan malzemeler, laboratuvarda kullanılan cihazlar ve kimyasal maddelerden ibarettir.

3.1.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler aşağıda liste halinde verilmiştir;

1) Ph:8 de 200 mM Tris tamponu
1) 0.1M Glikoz
2) 14 mM ATP
3) 2 mM $NADP^+$
4) 140 mM $MgCl_2$
5) Glukoz-6 fosfat Dehidrojenaz(G6PD)
6) He-La kültür hücresi
7) Saf su
8) Hidroklorikasit(HCI)
9) 150 mM NaCl
10) 1 mM EDTA
11) % 0.1 SDS
12) 1 mM PMSF
13) Fenolik Bileşikler

3.1.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan laboratuvar malzemeleri ve cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan laboratuvar malzemeleri ve cihazlar aşağıda liste halinde verilmiştir;

Yararlanılan Alet ve Cihazlar:

1) Spektrofotometre: Rayleigh UV-2601
2) pH metre: Mettler Toledo
3) Kuvars küvetler: Hellma Analytics
4) Vorteks
5) Manyetik Karıştırıcı
6) Piset
7) Otomatik pipet
8) Hassas terazi
9) Saf su cihazı
10) Buzdolabı
11) Ependorf tüpleri
12) Beher
13) Spatul
14) Falkon

3.1.3 Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Deneysel çalışmalarda kullanılan çözelti ve kimyasalların hazırlanışı; aşağıda liste halinde verilmiştir.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1) 0.1 M Glikoz Çözeltisi: 99 mg glukoz tartılır. Saf su ile 5 ml ye tamamlanır.
2) 14 mM ATP Çözeltisi: 38,57 mg ATP tartılır. 5 ml saf su ile tamamlanır.
3) 2 mM $NADP^+$ Çözeltisi: 7.65 mg $NADP^+$ tartılır. 5 ml saf su ile tamamlanır.
4) 140 mM $MgCl_2$ Çözeltisi: 66.65 mg $MgCl_2$ tartılır. 5 ml saf su ile tamamlanır.
5) 200 mM Tris tamponu çözeltisinin hazırlanışı: 1,21gr. Tris tartılır.50 ml saf su ile tamamlanır. pH:1 8 'e ayarlanır.

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere;

He-La hücresini (HK-II) parçalamak için kullanılan çözeltiler:

1) 50 mM Tris-HCL Çözeltisi: 0,6057 gr Tris-HCL tartılır. 5 ml saf su ile tamamlanır. pH 7.4 'e ayarlanır.
2) 150 mM NaCl Çözeltisi: 0,87 gr. NaCl tartılır.
3) 1 mM EDTA Çözeltisi: 0,029 gr. EDTA tartılır.
4) % 0,1 SDS: 0,1 gr.
5) 1mM PMSF: 17,42 mg PMSF tartılır.50 ml ye tamamlanır.

3.2. Metot

Yapılan bu çalışmalar 3 aşamalı olarak yapıldı. İlk olarak parçaladığımız kültür He-La hücresinde mevcut HK-II enziminin aktivitesi spektrometrik olarak ölçülüp aktivasyon etkisinin olup olmadığına bakılmıştır. Sonrasında enzim ve diğer maddelerin optimum şartları belirlenmek üzere enzim aktivite çalışmaları yapıldı. Daha sonra bazı fenolik bileşik ve türevleri kullanılarak her birinin ayrı ayrı enzim üzerinde sergilemiş olduğu etkilere bakıldı. İnhibisyon etkisi gösterenler belirlendi. Daha sonra bu inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin IC_{50} değerleri belirlendi. Sonrasında en etkili olan bileşiklerin K_i değerleri çalışıldı.

Yapılan çalışmalarda öncelikli olarak aktivite deneyleri yapılmıştır. Ölçümler oda sıcaklığında 340 nm' de spektrofotometrik olarak takip edildi. Bütün işlemlerde optimum

şartlar belirlenerek deneysel çalışmaların aynı şartlar altında gerçekleşmesi sağlandı. Ölçümler 1 ml'lik küvetlerde yapıldı. Her bir ölçüm 3 kez tekrarlandı. Üç değerin ortalaması alınarak hesaplama yapıldı. Küvet içerikleri bulgular kısmında tablo.4.1. de verilmiştir. Absorbans değerleri 3 dakika takip edildi ve bir dakikalık ortalama absorbans hesaplamada kullanıldı. Enzim ünitesi, enzim ünitesi/ml olarak hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Enzim Aktivite Çalışmaları ve Optimum Şartların Belirlenmesi

HK-II enzim aktivitesi katalizlediği reaksiyonun ürünlerinin ölçülmesi ile belirlenir. Oluşan glukoz-6 fosfat miktarı glukoz-6 fosfat dehidrogenaz (G6PDH) aktivitesine bağlı olarak Beutler metoduna göre ölçülebilmektedir(Adem 2006, Christofk *et al.* 2008, Adem 2011, Arslan 2015)

Aktivite ölçümleri oda sıcaklığında 340 nm'de spektrofotometrik olarak takip edildi. Aktivite ölçümleri 1 ml'lik küvetlerde yapıldı. Absorbans düşüşü 3 dakika takip edildi ve bir dakikalık ortalama düşüş hesaplamada kullanıldı. Enzim ünitesi, enzim ünitesi/ml olarak hesaplanmıştır.(Küfrevioğlu 1985)

Enzim aktivitesinin daha iyi ölçülmesi için yapılan ön çalışmalarda her bir maddenin ayrı ayrı pipetlenmesi durumunda 20 dakika gibi uzun bekleme süreleri sonunda spektrofotometrede enzim katılmadan absorbans değişimi sabitleniyordu. Bekleme süresini azaltmak için çeşitli kombinasyon çalışmaları sonucunda ATP, $NADP^+$ ve $MgCl_2$ çözeltileri çalışma öncesi birleştirildi. Bu yöntem ile yapılan ön denemelerde olumlu sonuçlar alındığı için bu protokolle inhibisyon çalışmaları yapıldı. Bir çok denemeden sonra HK-II enziminin optimum şartları sağlandı. Optimum şartların sağlandığı küvet hacimleri ve içerikleri tablo.4.1.' de verilmiştir.

Tablo.4.1. Hekzokinaz-II enzimi aktivitesi üzerine optimum şartların belirlenmesi

Stok çözeltiler	Kontrol küveti (µl)	Kontrol küveti (µl)
200 mM Tris tamponu (Ph:8)	125	125
14 mM ATP,2 mM NADP+, 140 mM MgCl2	175	175
Saf su	650	595
3 min. inkübasyon		
Toplam enzim örneği	----	55
Glukoz	50	50
Toplam küvet hacmi	1000	1000

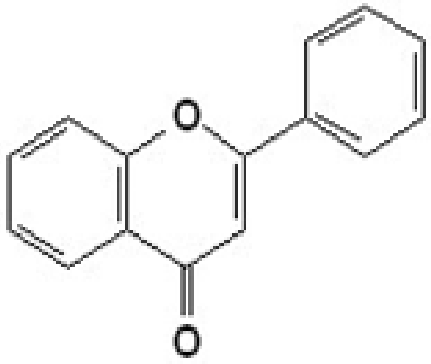
4.2. Enzim İnhibisyon Çalışmaları

Aktivite çalışmaları tamamlandıktan sonra inhibisyon çalışmalarına başlandı. Çalışmalara flavon, flovononol, flavanonol ve flavanon gibi fenolik bileşikler ile birlikte devam ettik. Her bir fenolik madde 1 mg olarak tartıldı. Daha sonra da 1/1 oranda DMSO da çözüldü. Saf su ile belli oranlarda seyreltildi.

Enzim aktivitesinin daha iyi ölçülmesi için yapılan ön çalışmalarda her bir maddenin ayrı ayrı pipetlenmesi durumunda 20 dakika gibi uzun bekleme süreleri sonunda spektrofotometrede enzim katılmadan absorbans sabitlendi. Bekleme süresini azaltmak için çeşitli kombinasyon çalışmaları sonucunda ATP, NADP+, MgCl2 çözeltileri çalışma öncesi birleştirildi. Bu yöntem ile yapılan ön denemelerde olumlu sonuçlar alındığı için bu protokolle inhibisyon çalışmaları yapıldı.

4.2.1. Enzim inhibitörü olarak kullanılan flavon bileşikleri ve göstermiş oldukları etkiler

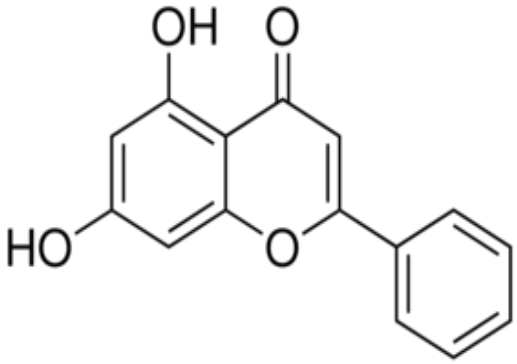
Genel olarak flavon bileşiklerinin kimyasal iskelet yapıları aşağıda gösterildiği gibidir.



Şekil.4.1. Flavon bileşiklerinin genel molekül yapısı

Deneylerde çalıştığımız flavon bileşikleri sırasıyla aşağıda şekilleri ile beraber verilmiştir.

- **Chrysin**



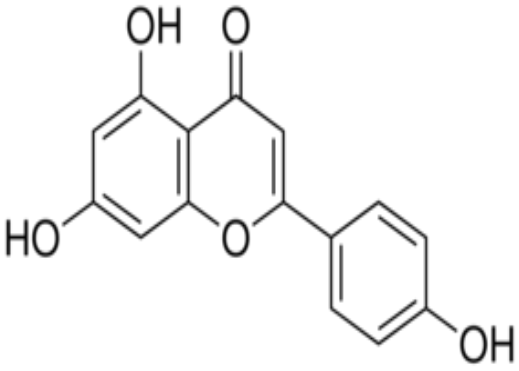
Şekil.4.2. Flavon bileşiklerinden Chrysin'in moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş chrysin HK-II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.2. HK-II enzimi üzerine Chrysin' in etkisi

Kontrol Değeri	**Flavonoid hacmi**	100 µl	200 µl	250 µl	300 µl	400 µl	İnhibisyon
0,077	**Abs. farkı**	0,068	0,049	0,037	0,029	0,018	

- **Apigenin**



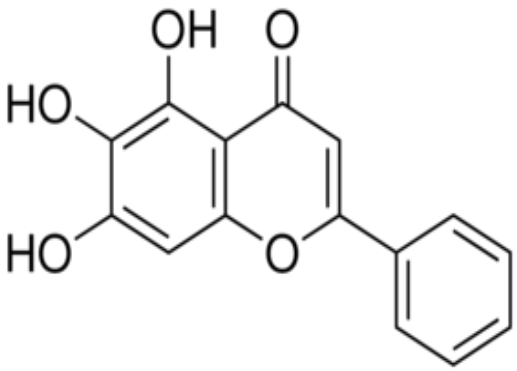
Şekil.4.3. Flavon bileşiklerinden Apigenin'in moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş apigenin'in HK-II enzimi üzerinde etkisi yoktur. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.3. HK-II enzimi üzerine Apigenin' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	100 µl 0	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl	Etkisiz
0,077	**Abs farkı**	0,080	0,075	0,079	0,077	0,068	

- **Baicalein**



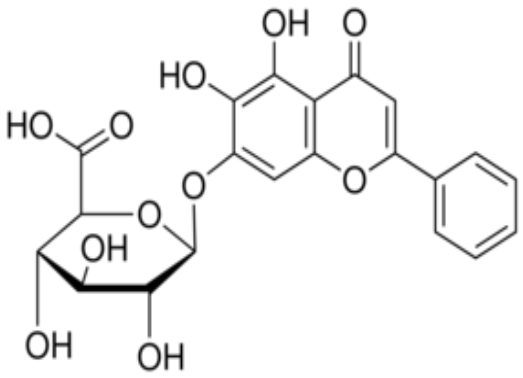
Şekil.4.4. Flavon bileşiklerinden Baicalein'in moleküler yapısı

20 kat seyreltilmiş baicalein HK-II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.4. HK-II enzimi üzerine Baicalein' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl	İnhibisyon
0,080	**Abs farkı**	0,066	0,051	0,038	0,025	0,010	

- **Baicalin**



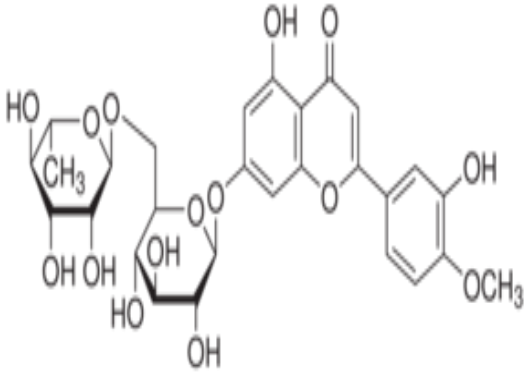
Şekil.4.5. Flavon bileşiklerinden Baicalin'in moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş baicalin HK-II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.5. HK-II enzimi üzerine Baicalin' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	50 µl	75 µl	100 µl	125 µl	150 µl	İnhibisyon
0,073	**Abs farkı**	0,058	0,045	0,037	0,031	0,025	

- **Diosmin**



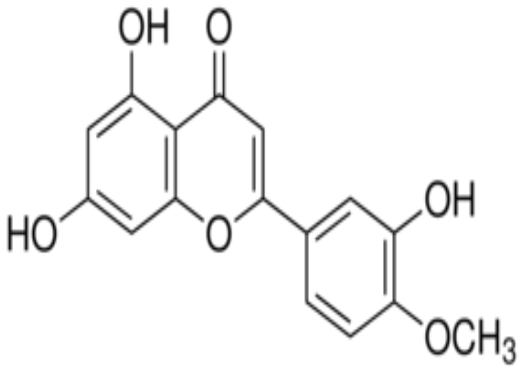
Şekil.4.6. Flavon bileşiklerinden Diosmin'in moleküler yapısı

100 kat seyreltilmiş diosmin'in HK-II enzimi üzerinde etkisi yoktur. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo.4.6. HK-II enzimi üzerine Diosmin' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	250 µl	Etkisiz
0,069	**Abs farkı**	0,073	0,073	0,069	0,082	0,076	

- **Diosmetin**



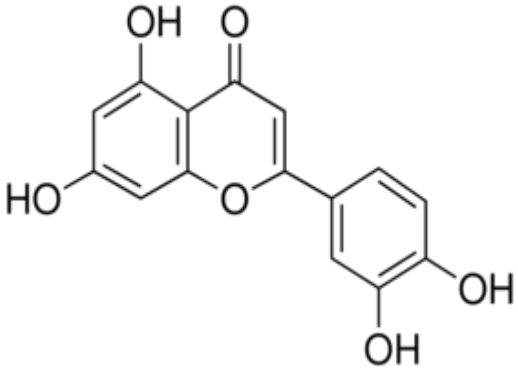
Şekil.4.7. Flavon bileşiklerinden Diosmetin'in moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş diosmetin HK-II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.7. HK-II enzimi üzerine Diosmetin' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	50 µl	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	İnhibisyon
0,073	**Abs farkı**	0,064	0,057	0,040	0,028	0,019	

- **Luteolin**



Şekil.4.8. Flavon bileşiklerinden Luteolin'in moleküler yapısı

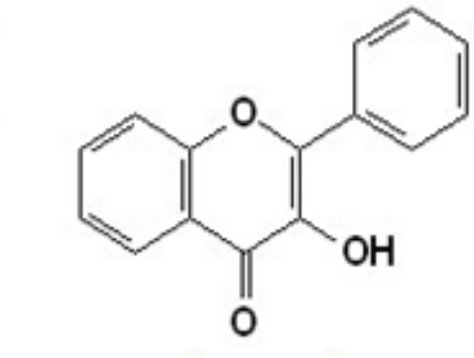
10 kat seyreltilmiş luteolin'in HK-II enzimi üzerinde etkisi yoktur. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.8. HK-II enzimi üzerine Luteolin' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl	Etkisiz
0,073	**Abs farkı**	0,069	0,074	0,068	0,057	0,066	

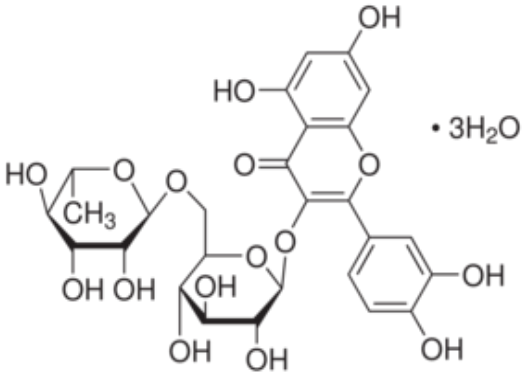
4.2.2. Enzim inhibitörü olarak kullanılan flavonol bileşikleri ve göstermiş oldukları etkiler

Genel olarak flavonol bileşiklerinin kimyasal iskelet yapıları aşağıda gösterildiği gibidir.



Şekil.4.9. Flavonol bileşiklerin genel molekül yapısı

- **Rutin hidrat**



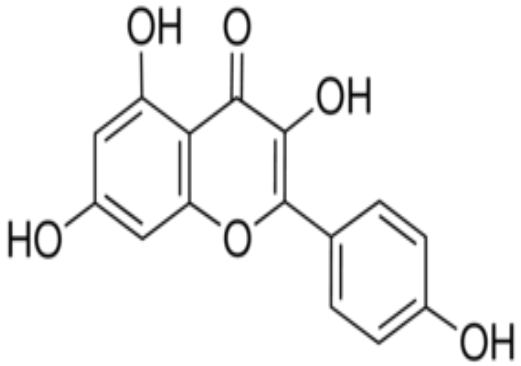
Şekil.4.10. Flavonol bileşiklerinden Rutin hidrat'ın moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş diosmetin HK-II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.9. HK-II enzimi üzerine Rutin Hidrat'ın etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	100 µl	300 µl	500 µl	600 µl	700 µl	İnhibisyon
0,062	**Abs farkı**	0,056	0,047	0,038	0,026	0,023	

- **Kaempferol**



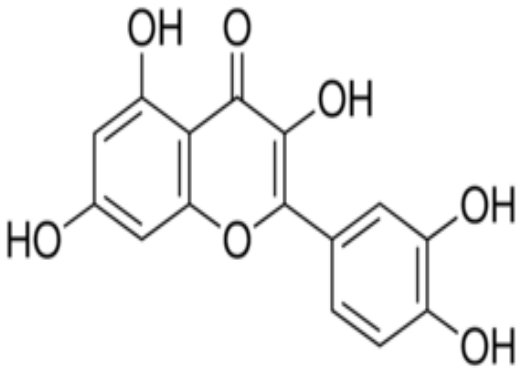
Şekil.4.11. Flavonol bileşiklerinden Kaempferol'ün moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş kaempferol HK-II enzimi üzerinde aktivasyon etkisi göstermiştir. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.10. HK-II enzimi üzerine Kaempferol' ün etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl	Aktivasyon
0,062	**Abs farkı**	0,070	0,073	0,078	0,079	0,081	

- **Quercetin**



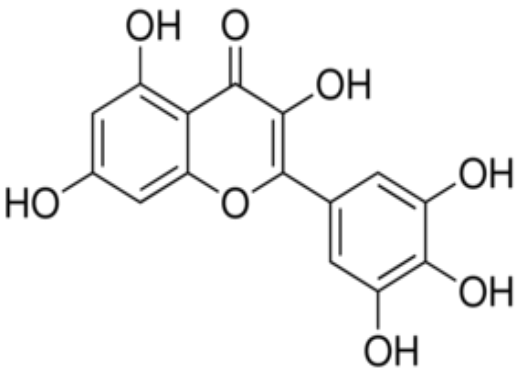
Şekil.4.12. Flavonol bileşiklerinden Quercetin'in moleküler yapısı

20 kat seyreltilmiş quercetin HK-II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo.4.11. HK-II enzimi üzerine Quercetin' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	25 µl	100 µl	200 µl	300 µl	500 µl	İnhibisyon
0,062	**Abs farkı**	0,052	0,039	0,031	0,025	0,006	

- **Myricetin**



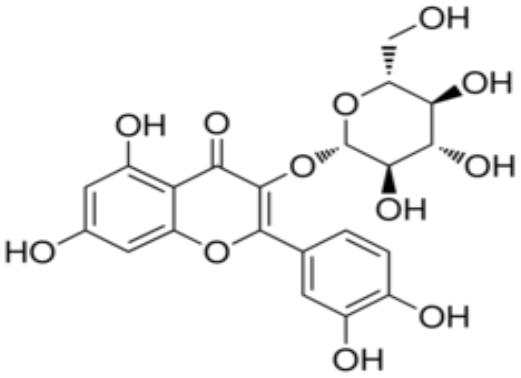
Şekil.4.13. Flavonol bileşiklerinden Myricetin'in moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş myricetin HK-II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo.4.12. HK-II enzimi üzerine Myricetin' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	50 µl	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	İnhibisyon
0,073	**Abs farkı**	0,053	0,044	0,029	0,019	0,007	

- **Quercetin 3-β-D glucose**



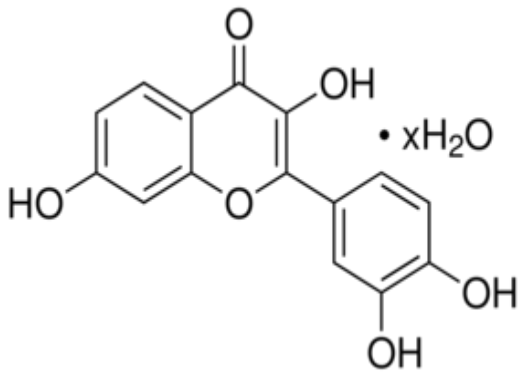
Şekil.4.14. Flavonol bileşiklerinden Quercetin 3- β-D glucose'un moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş Quercetin 3-β-D glucose'un HK-II enzimi üzerinde etkisi yoktur. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.13. HK-II enzimi üzerine Quercetin 3-β-D glucose' un etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl	Etkisiz
0,068	**Abs farkı**	0,062	0,062	0,060	0,075	0,074	

- **Fisetin**



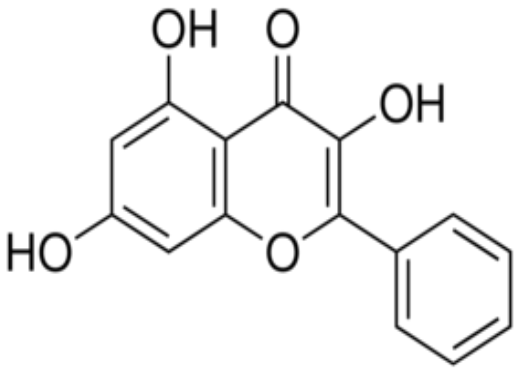
Şekil.4.15. Flavonol bileşiklerinden Fisetin'in moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş fisetin HK-II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.14. HK-II enzimi üzerine Fisetin' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	50 µl	100 µl	200 µl	300 µl	500 µl	İnhibisyon
0,062	**Abs farkı**	0,053	0,047	0,033	0,021	0,007	

- **Galangin**



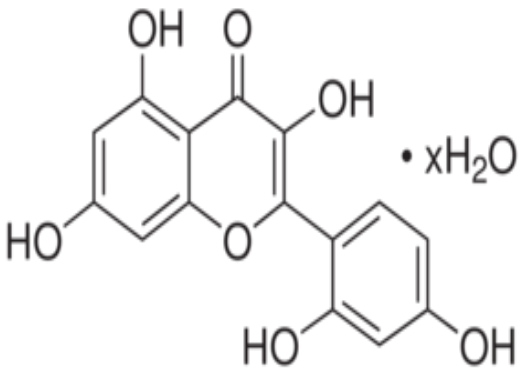
Şekil.4.16. Flavonol bileşiklerinden Galangin'in moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş galangin'in HK-II enzimi üzerinde etkisi yoktur. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.15. HK-II enzimi üzerine Galangin' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	250 µl	Etkisiz
0,069	**Abs farkı**	0,072	0,056	0,061	0,061	0,059	

- **Morin hidrat**



Şekil.4.17. Flavonol bileşiklerinden Morin hidrat' ın moleküler yapısı

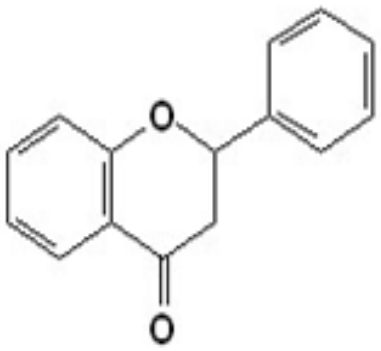
10 kat seyreltilmiş morin hidrat'ın HK-II enzimi üzerinde etkisi yoktur. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.16. HK-II enzimi üzerine Morin Hidrat ' ın etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl	Etkisiz
0,069	**Abs farkı**	0,075	0,073	0,071	0,066	0,066	

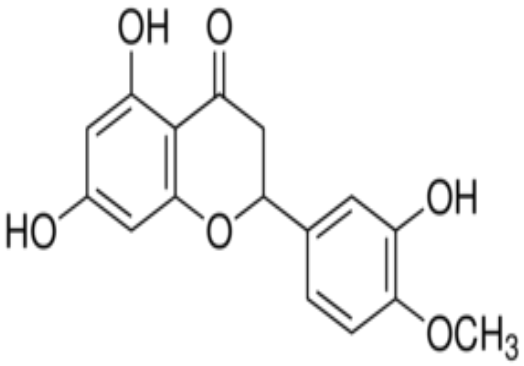
4.2.3. Enzim inhibitörü olarak kullanılan flavanon bileşikleri ve göstermiş oldukları etkiler

Genel olarak flavanon bileşiklerinin kimyasal iskelet yapıları aşağıda gösterildiği gibidir.



Şekil.4.18. Flavanonların genel molekül yapısı

- **Hesperitin**



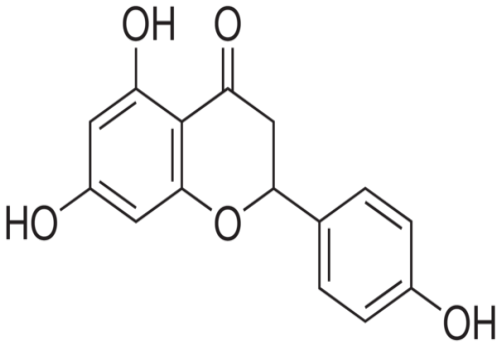
Şekil.4.19. Flavanon bileşiklerinden Hesperitin' in moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş hesperitin'in HK-II enzimi üzerinde etkisi yoktur. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.17. HK-II enzimi üzerine Hesperitin' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl	Etkisiz
0,058	**Abs farkı**	0,064	0,070	0,048	0,052	0,035	

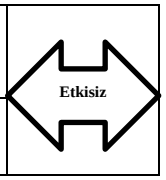
- **Naringenin**



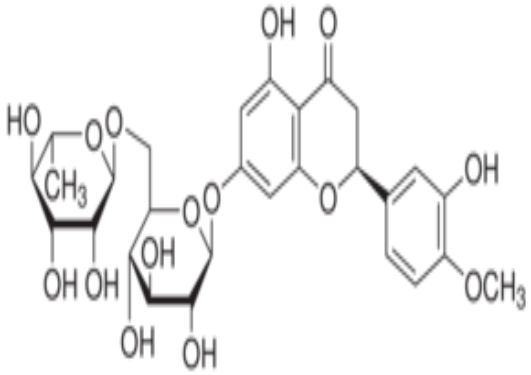
Şekil.4.20. Flavanon bileşiklerinden Naringenin' in moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş naringenin'in HK-II enzimi üzerinde etkisi yoktur. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.18. HK-II enzimi üzerine Naringenin' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	100 µl	150 µl	200 µl	250 µl	300 µl	
0,073	**Abs farkı**	0,064	0,073	0,067	0,058	0,059	

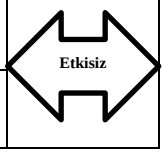
- **Hesperidin**



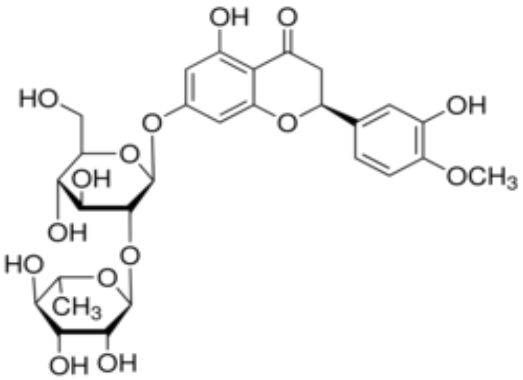
Şekil.4.21. Flavanon bileşiklerinden Hesperidin' in moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş hesperidin'in HK-II enzimi üzerinde etkisi yoktur. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.19. HK-II enzimi üzerine Hesperidin' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl	
0,058	**Abs farkı**	0,065	0,065	0,060	0,062	0,063	

- **Neohesperidin**



Şekil.4.22. Flavanon bileşiklerinden Neohesperidin' in moleküler yapısı

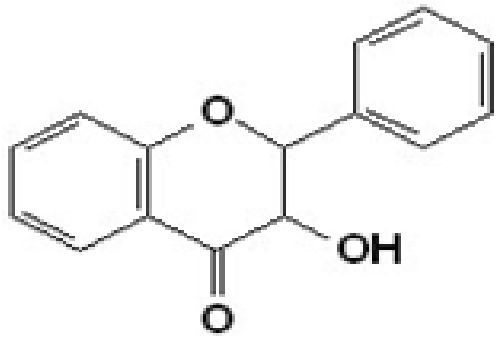
10 kat seyreltilmiş neohesperidin'in HK-II enzimi üzerinde etkisi yoktur. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.20. HK-II enzimi üzerine Neohesperidin' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	250 µl	Etkisiz
0,058	**Abs farkı**	0,073	0,077	0,069	0,072	0,070	

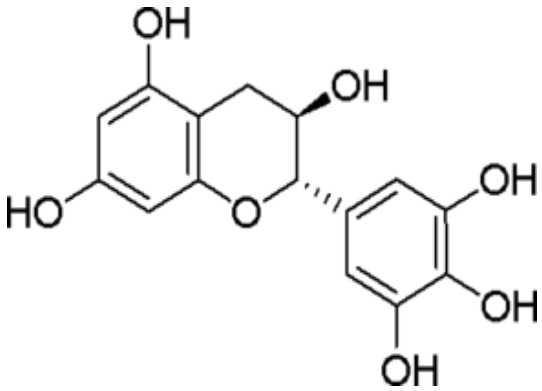
4.2.4. Enzim inhibitörü olarak kullanılan flavanonol bileşikleri ve göstermiş oldukları etkiler

Genel olarak flavanonol bileşiklerinin kimyasal iskelet yapıları aşağıda gösterildiği gibidir.



Şekil.4.23. Flavanonollerin genel molekül yapısı

- **Gallocatechin**



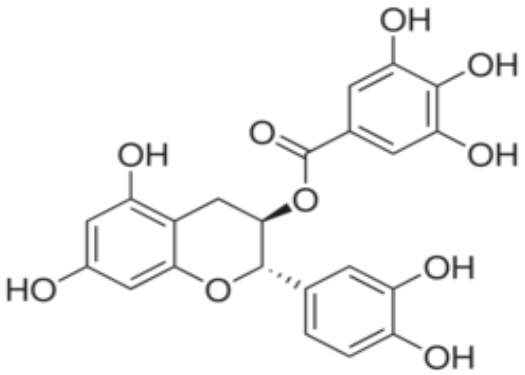
Şekil.4.24. Flavanonollerden Gallocatechin' in moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş gallocatechin HK-II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.21. HK-II enzimi üzerine Gallocatechin ' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	125 µl	İnhibisyon
0,065	**Abs farkı**	0,051	0,039	0,032	0,024	0,015	

- **Catechin gallate**



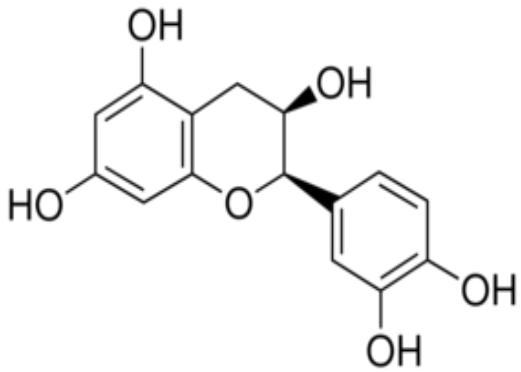
Şekil.4.25. Flavanonollerden Catechin gallate' ın moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş catechin gallate' ın HK-II enzimi üzerinde etkisi yoktur. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.22. HK-II enzimi üzerine Catechin gallate' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	100µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl	Etkisiz
0,054	**Abs farkı**	0,062	0,077	0,060	0,062	0,063	

- **Epicatechin**



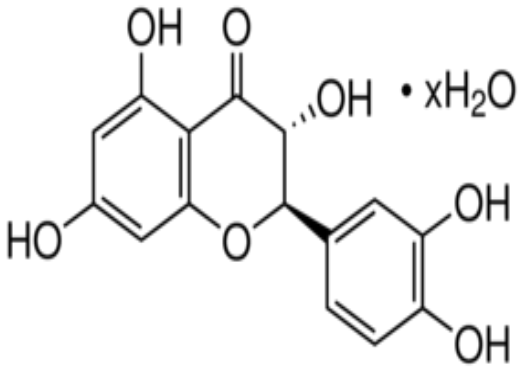
Şekil.4.26. Flavanonollerden Epicatechin' in moleküler yapısı

10 kat seyreltilmiş epicatechin'in HK-II enzimi üzerinde etkisi yoktur. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.23. HK-II enzimi üzerine Epicatechin' in etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl	Etkisiz
0,058	**Abs farkı**	0,043	0,042	0,049	0,045	0,060	

- **Taxifolin hidrat**



Şekil.4.27. Flavanonollerden Taxifolin hidrat'ın moleküler yapısı

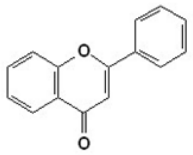
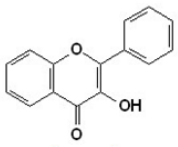
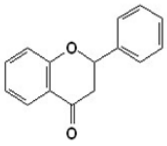
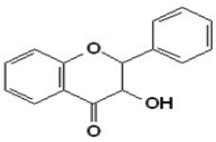
10 kat seyreltilmiş Taxifolin hidrat HK-II enzimi üzerinde aktivasyon etkisi göstermiştir. Deneylerden elde edilen veriler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo. 4.24. HK-II enzimi üzerine Taxifolin hidrat' ın etkisi

Kontrol değeri	**Flavonoid hacmi**	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl	Aktivasyo
0,065	**Abs farkı**	0,082	0,087	0,094	0,105	0,0116	

Bu çalışmalar sırasında HK-II enzimi üzerinde etkileri belirlenen maddeler aşağıda tabloya dönüştürülmüştür.

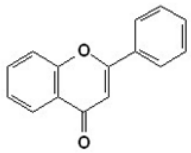
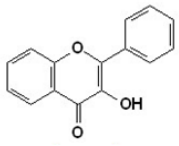
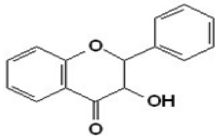
Tablo. 4.25. Fenolik bileşiklerin HK-II enzimi üzerine etkisi

Bileşiğin sınıfı	**Bileşiğin adı**	**Etki**
Flavon 	Chrysin	İnhibisyon
	Apigenin	Etkisiz
	Baicalein	İnhibisyon
	Baicalin	İnhibisyon
	Diosmin	Etkisiz
	Diosmetin	İnhibisyon
	Luteolin	Etkisiz
Flavonol 	Rutin hidrat	İnhibisyon
	Kaempferol	Aktivasyon
	Quercetin	İnhibisyon
	Myricetin	İnhibisyon
	Fisetin	İnhibisyon
	Quercetin3-D Glukoz	Etkisiz
	Galangin	Etkisiz
	Morin hidrat	Etkisiz
Flavanon 	Hesperitin	Etkisiz
	Naringenin	Etkisiz
	Hesperidin	Etkisiz
	Neohesperidin	Etkisiz
Flavanonol 	Gallocatechin	İnhibisyon
	Catechin gallate	Etkisiz
	Epicatechin	Etkisiz
	Taxifolin hidrat	Aktivasyon

4.3. İnhibisyon Etkisi Gösteren Maddeler ve IC50 Değerleri

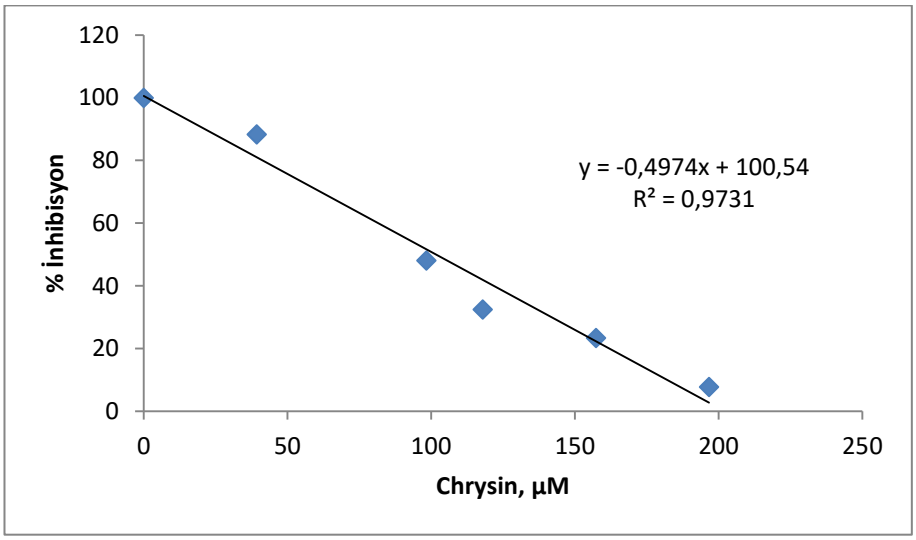
Deneysel çalışmalardan elde ettiğimiz verilere göre flavon bileşiklerinden; chrysin, baicalein, baicalin ve diosmetin, flavonol bileşiklerinden; rutin hidrat, quercetin, myricetin ve fisetin, flavanonol bileşiklerinden ise gallocatechin inhibisyon etkisi göstermiştir. İnhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşikler ve ait oldukları sınıflar aşağıda tablo halinde IC_{50} değerleri ile birlikte verilmiştir.

Tablo4.26. İnhibisyon Etkisi Gösteren Maddeler ve IC_{50} Değerleri

Bileşiğin Sınıfı	**Bileşiğin Adı**	**Etkisi**	**IC_{50} Değeri (µM)**
Flavon 	Chrysin	inhibisyon	81,76
	Baicalein	inhibisyon	2,29
	Baicalin	inhibisyon	23,39
	Diosmetin	inhibisyon	72,45
Flavonol 	Rutin hidrat	inhibisyon	99,29
	Quercetin	inhibisyon	34,60
	Myricetin	inhibisyon	51,75
	Fisetin	inhibisyon	76,97
Flavanonol 	Gallocatechin	inhibisyon	27,71

4.3.1. Chrysin

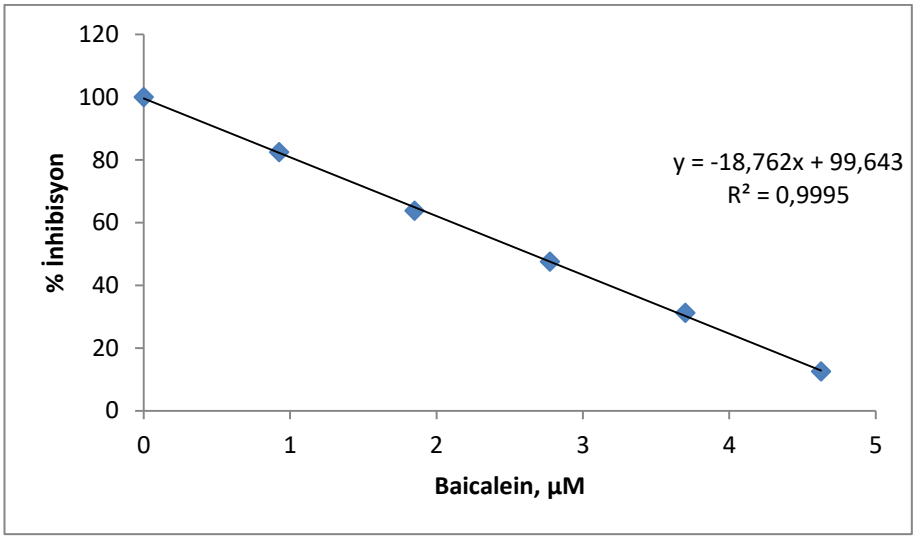
Chrysin'in hekzokinaz II enzimi üzerinde gösterdiği etki incelenmiş ve elde edilen deneysel veriler Şekil.4.28'de grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre Chrysin bileşiğinin hekzokinaz II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil.4.28. HK-II enzimi üzerine Chrysin % aktivite-[I] grafiği

4.3.2. Baicalein

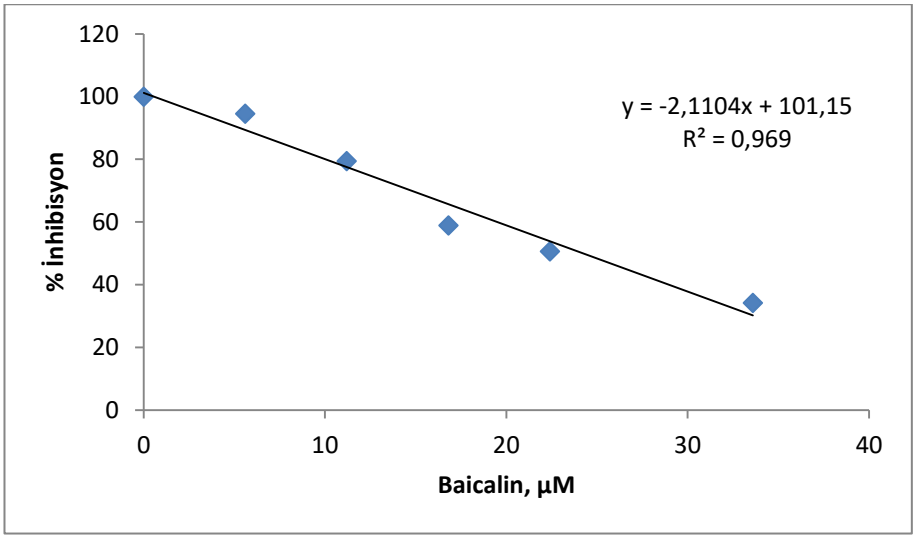
Baicalein'in hekzokinaz II enzimi üzerinde gösterdiği etki incelenmiş ve elde edilen deneysel veriler Şekil.4.29'da grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre baicalein bileşiğinin hekzokinaz II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil.4.29. HK-II enzimi üzerine **Baicalein** % aktivite-[I] grafiği

4.3.3. Baicalin

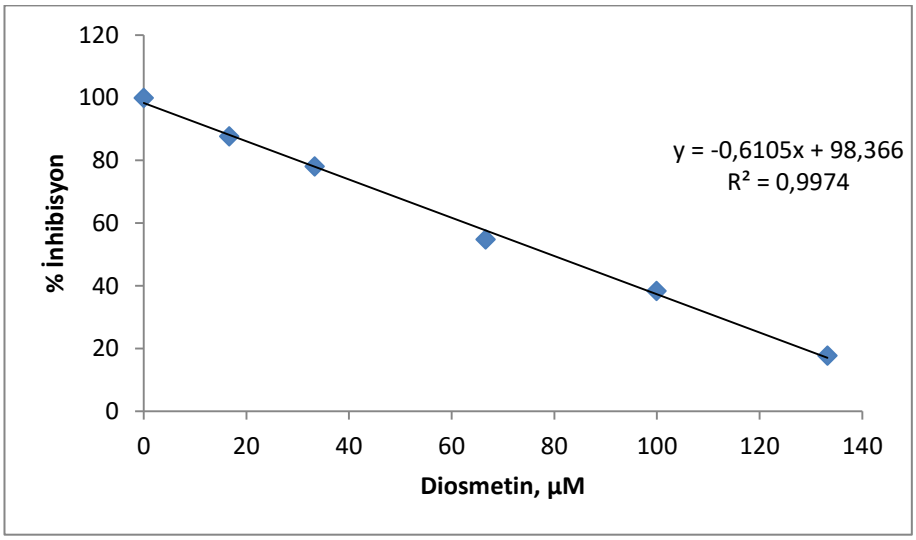
Baicalin'in hekzokinaz II enzimi üzerinde gösterdiği etki incelenmiş ve elde edilen deneysel veriler Şekil.4.30'da grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre Baicalin bileşiğinin hekzokinaz II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil.4.30. HK-II enzimi üzerine **Baicalin** % aktivite-[I] grafiği

4.3.4. Diosmetin

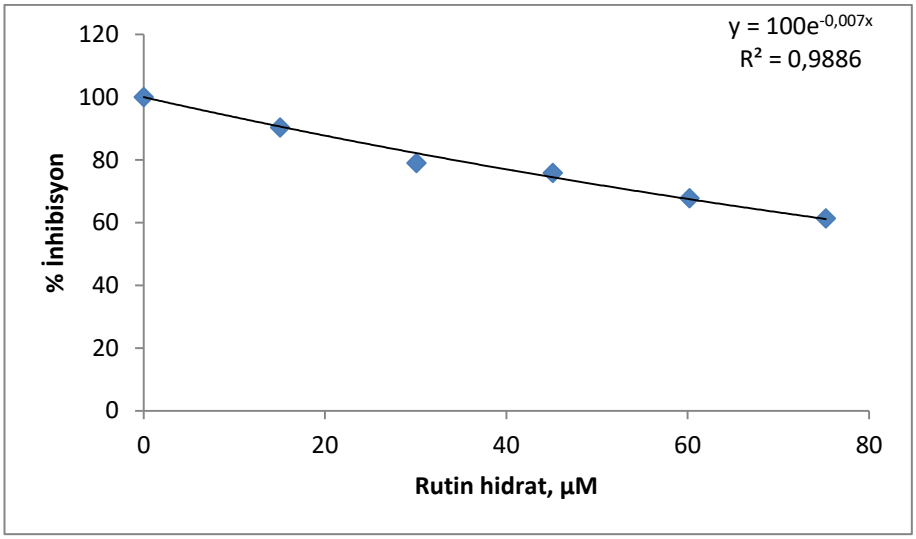
Diosmetin'in hekzokinaz II enzimi üzerinde gösterdiği etki incelenmiş ve elde edilen deneysel veriler Şekil.4.31'de grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre Diosmetin bileşiğinin hekzokinaz II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil.4.31. HK-II enzimi üzerine Diosmetin % aktivite-[I] grafiği

4.3.5. Rutin Hidrat

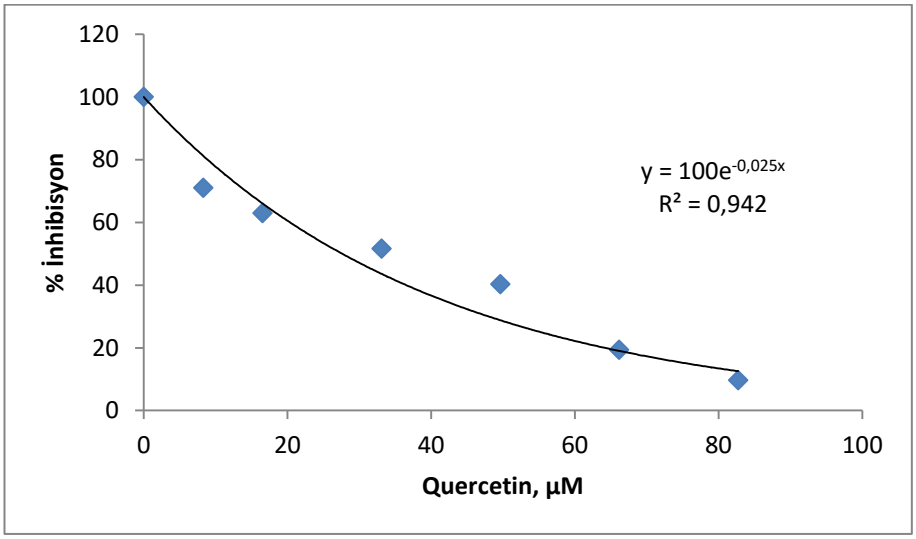
Rutin Hidrat'ın hekzokinaz II enzimi üzerinde gösterdiği etki incelenmiş ve elde edilen deneysel veriler Şekil.4.32'de grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre Rutin Hidrat bileşiğinin hekzokinaz II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil.4.32. HK-II enzimi üzerine Rutin Hidrat % aktivite-[I] grafiği

4.3.6. Quercetin

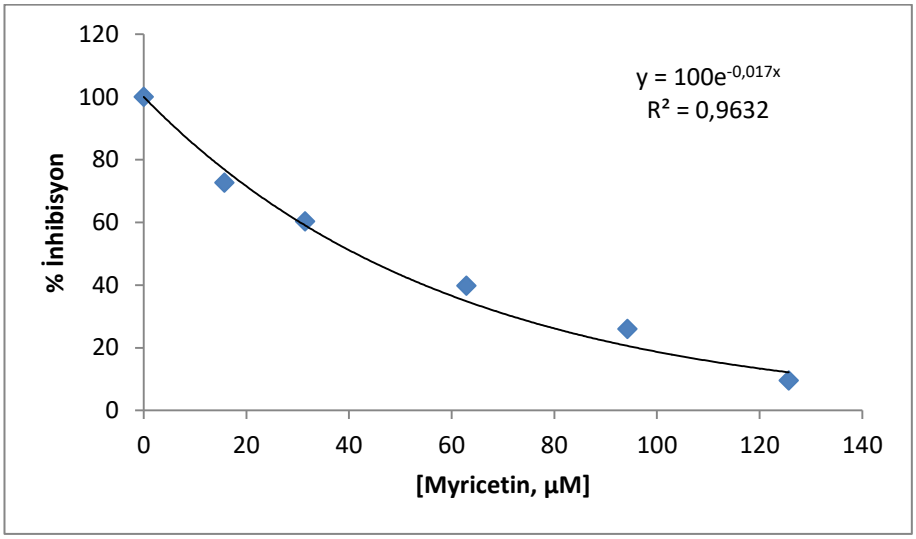
Quercetin'in hekzokinaz II enzimi üzerinde gösterdiği etki incelenmiş ve elde edilen deneysel veriler Şekil.4.33'de grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre Quercetin bileşiğinin hekzokinaz II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil.4.33. HK-II enzimi üzerine Quercetin % aktivite-[I] grafiği

4.3.7. Myricetin

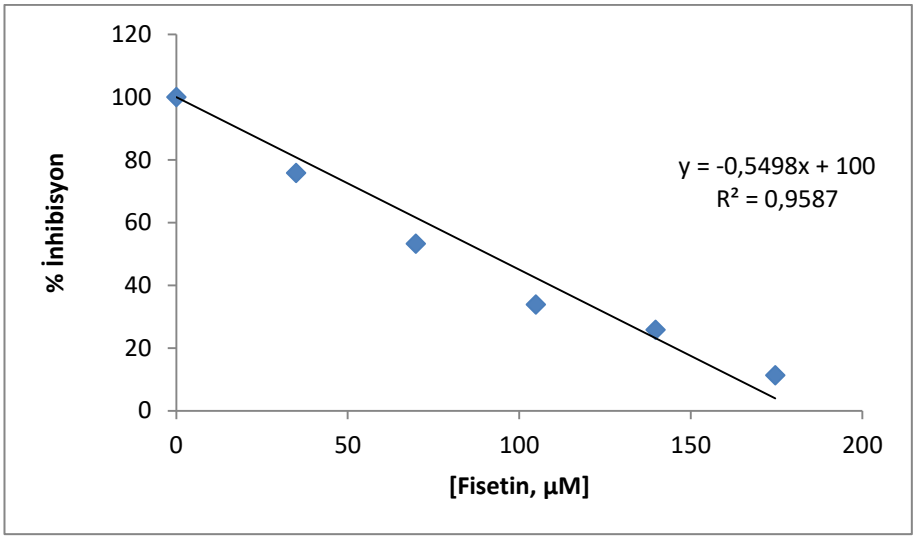
Myricetin'in hekzokinaz II enzimi üzerinde gösterdiği etki incelenmiş ve elde edilen deneysel veriler Şekil.4.34'de grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre Myricetin bileşiğinin hekzokinaz II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil.4.34. HK-II enzimi üzerine Mrycetin % aktivite-[I] grafiği

4.3.8. Fisetin

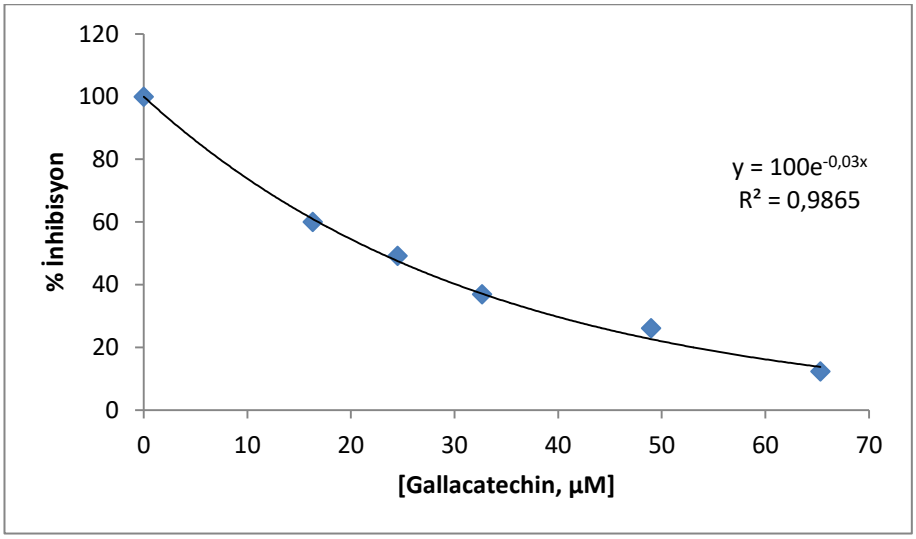
Fisetin'in hekzokinaz II enzimi üzerinde gösterdiği etki incelenmiş ve elde edilen deneysel veriler Şekil.4.35'de grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre Fisetin bileşiğinin hekzokinaz II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil.4.35. HK-II enzimi üzerine fisetin % aktivite-[I] grafiği

4.3.9. Gallocatechin

Gallocatechin'in hekzokinaz II enzimi üzerinde gösterdiği etki incelenmiş ve elde edilen deneysel veriler Şekil.4.36'da grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre gallocatechin bileşiğinin hekzokinaz II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.



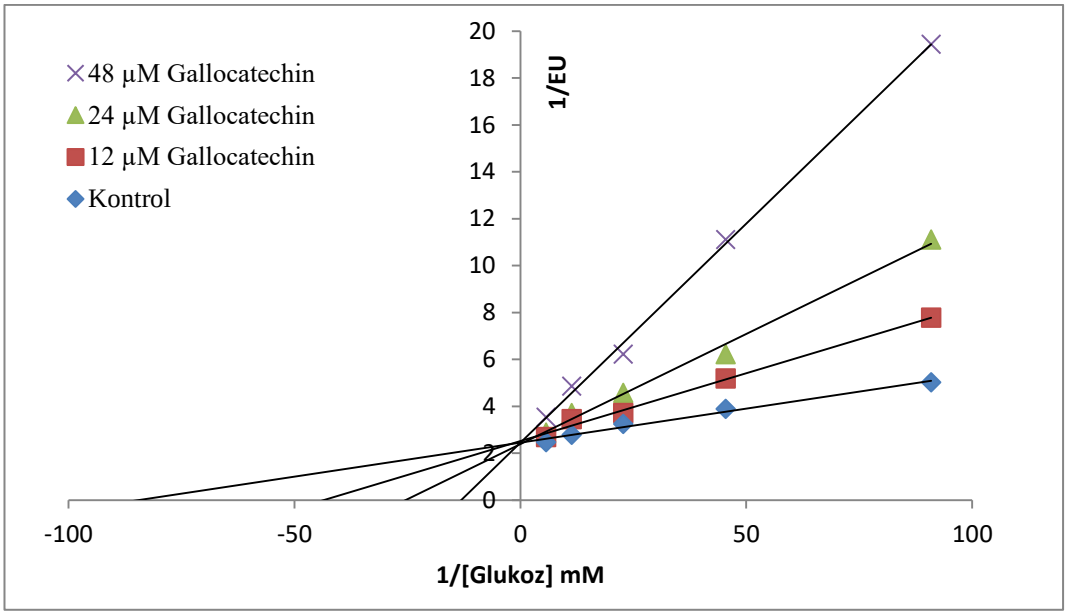
Şekil.4.36. HK-II enzimi üzerine gallocatechin % aktivite-[I] grafiği

4.4. K_i Çalışmaları

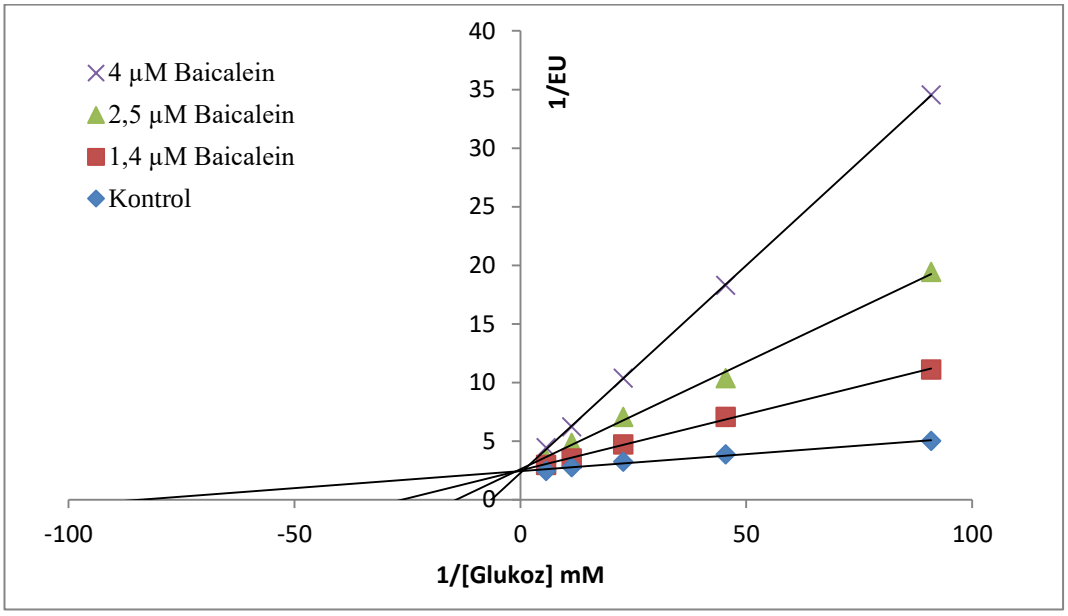
Çalışılan maddelerden yüksek inhibisyon etkisi gösterenlerin gallocatechin, baicalein ve baicalin için K_i değerlerini belirlemek amacıyla enzimlerin aktivitesini yarıya düşüren madde konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstünde iki sabit inhibitör konsantrasyonlarında glukozun beş konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi(Adem 2006,2011, Arslan 2015). Bu grafiklere göre gallocatechin, baicalein enzimin K_M değerini düşürdükleri için enzim aktivitesini yarışmalı olarak inhibe etmiştir. Yani enzimi inhibe ederken glukozun bağlanma bölgesine bağlanarak enzimi inhibe etmiştir. Baicalin ise enzim aktivitesini etkilerken substrat olan glukozun bağlanmasını etkilememiştir, bu nedenle yarışmasız olarak inhibe etmiştir.

Tablo.4.27. Fenolik maddelerin HK-II enzimleri üzerine K_i çalışma sonuçları

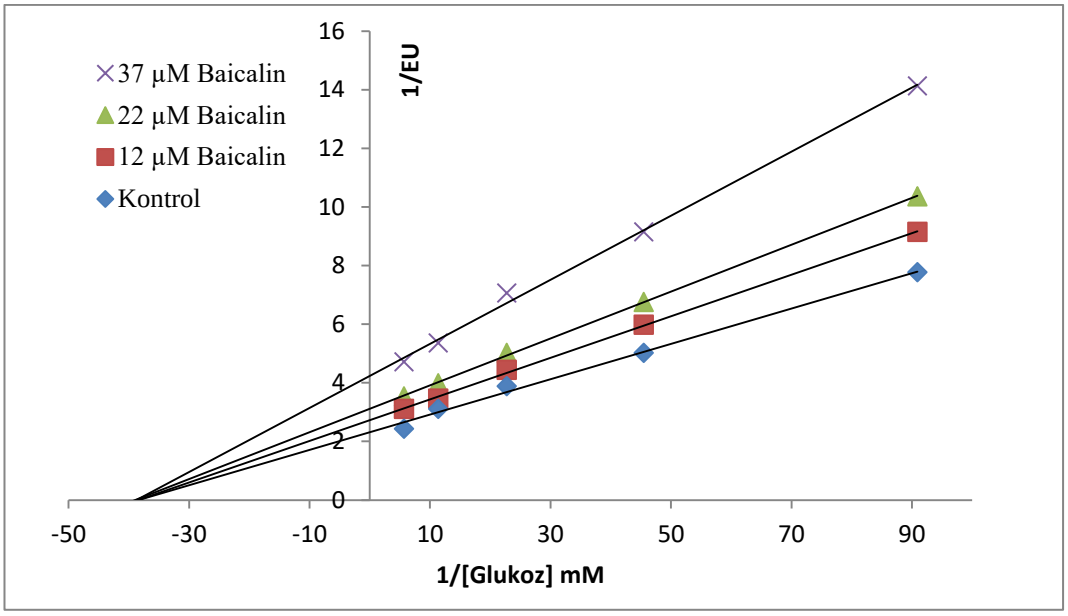
Etkin madde	Ortalam K_i (μM)	İnhibisyon türü
Baicalein	0,48±0,15	Yarışmalı
Gallocatechin	10±1,40	Yarışmalı
Baicalin	82±3,17	Yarışmasız



Şekil.4.37. HK-II enzimi üzerinde gallocatechin için 5 farklı glukoz konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil.4.38. HK-II enzimi üzerinde baicalein için 5 farklı glukoz konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil.4.39. HK-II enzimi üzerinde baicalin için 5 farklı glukoz konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan tez çalışmasında elde edilen sonuçlar Bölüm 4'de verilmiştir. Buna göre HK-II enzimi vasıtasıyla glikoliz mekanizmasının inhibisyonu fenolik bileşikler kullanılarak deneysel olarak incelenmiştir. Bilimsel literatürde yapılan çalışmalara göre, kanserli dokularda glukoz tüketiminin fazla olduğu kanıtlanmıştır (Pelicano *et al.* 2006, Gatenby and Gillies 2007, Gill *et al.* 2016). Yapılan deneysel çalışmalar göstermiştir ki, glukoz tüketimi hücre içindeki metabolik ihtiyaca uygun olarak düzenlenmektedir. Metabolizmada enerji ihtiyacını karşılamak için harekete geçirilen glikoliz yolunun hızı, hücre içi faaliyetlere ve enerji ihtiyacına göre kontrol edilmektedir. Bu kontrol mekanizmasında HK-II izoenziminin kilit rol oynadığı bilinmektedir (Pelicano *et al.* 2006, Jiang-Tao Zhong 2017, Thamrongwaranggoon *et al.* 2017). Bu enzimin aktivasyonundaki pozitif veya negatif değişim ile kanserli dokunun glikolitik metabolik dengesi değişebilmekte ve bu değişimin kanserli dokunun gelişimini önlediğine dair çalışmalar da literatürde mevcuttur (Harris *et al.* 2012). Yukarıda bahsi geçen sebeplerden dolayı, kanser tedavisi amacı ile HK-II enziminin inhibisyonunun oldukça önemli hedef olduğu düşünülebilir. Bu amaçla biyoaktivitesi yüksek olan flavonoid türevi bileşiklerin, kanserli hücrelerin gelişimi önlemek üzerine etkili birçok çalışma yapılmıştır (Gulcin *et al.* 2004, Chahar *et al.* 2011, Finlay 2012, Ganapathy-Kanniappan and Geschwind 2013). Bu bileşikler, kanser hücrelerindeki enzim metabolizmaları üzerinde yüksek inhibisyon veya aktivasyon potansiyeline sahip oldukları bilindiğinden dolayı yapılan deneysel çalışmalarda incelenmek için uygun görülmüştür.

Çalışmada flavonoid türevi bileşiklerin "flavonlar, flavonoller, flavanonlar ve flavanonoller" olmak üzere dört ayrı alt grupta HK-II enzimi üzerine etkileri çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.25'de ayrıntılı olarak liste halinde verilmiştir. Buna göre flavon ve flavanon grubu bileşiklerin diğer bileşiklere oranla glukoz metabolizmasını daha çok inhibe ettiği bunun yanında inhibisyon etkisi en az olan grubun flavanonoller olduğu tespit edilmiştir. Fenolik bileşiklerden flavanonlar ise hiçbir şekilde İnhibisyon etkisi göstermemiştir. Molekül formülleri incelendiğinde; flavon ve flavonol grubu bileşenler ile flavanonlar ve flavanonollerin ortak molekül yapılarına sahip oldukları görülmektedir. Flavon ve flavanol bileşenlerinde –OH

grubunnun bağlı olduğu karbon atomunun α pozisyonunda çift bağ olduğu, flavanonlar ve flavanonoller de ise bu bağın olmadığı görülmektedir. Buna paralel olarak bileşiklerin genel anlamda biyolojik aktivitelerinin de değiştiği gözlenmiştir. Flavanonol gurubu bileşiklerden gallocatechin hariç, incelenen hiçbir bileşiğin inhibisyon etkisi göstermediği saptanmıştır. Bunun aksine incelenen toplamda on beş flavonol ve flavon bileşiğinden ise sekiz tanesinin inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen inhibisyon sonuçlarının bileşiklerin moleküler yapıları ile ilintili olduğu sonucuna varılabileceği düşünülebilir. Aynı zamanda elde edilen sonuçların bilimsel literatürle de uyumlu olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak gerçekleştirilen tez çalışmasında glikoliz metabolizmasını inhibe eden flavonoid türevi bileşikler incelenmiş ve bileşiklerin moleküler yapıları ile inhibisyon aktiviteleri arasında kuvvetli bir bağ olduğu tespit edilmiştir. en iyi İnhibisyon etkisi gösteren 3 bileşiğin HK-II enzimine ilgisi $K_İ$ formülü ile hesaplandı. Bu çalışmanın sonunda Gallocatechin ve Baicalein'in yarışmalı, Baicalin'in ise yarışmasız olduğu tespit edilmiştir. Baicalein hem IC_{50} değerinin düşük olması hem de yarışmalı İnhibisyon sergilemesi nedeniyle fenolik bileşikler arasında önem kazanmıştır. Elde edilen verilere göre baicalein bileşiği kanser terapi amaçlı farmosetik alanda kullanılabileceği aynı zamanda ileri düzey biyokimyasal ve tıbbi araştırmalara dayanak olacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

Adem, Şevki. 2006. İnsan eritrositlerinden 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans. Ataturk Unıversity, Erzurum

Adem, Şevki. 2011. Sıçan kalp ve akciğer dokularından glukoz–6-fosfat dehidrogenaz, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz enzimlerinin saflaştırılması, karakterizasyonu, kotinin ve bazı İlaçların enzimlerin aktiviteleri üzerine etkilerinin İncelenmesi. Doktora. Ataturk Unıversity, Erzurum

Arslan, Erdem. 2015. Pİrüvat kinaz izoenzimm m2 aktİvİtesİ üzerİnde bazi flavon bİleşİklerİn etkİlerİnİn araştirilmasi. Yüksek lisans. Çankırı Karatekin Üniversitesi, 56, Çankırı

Baker, D. D., Chu, M., Oza, U., and Rajgarhia, V. (2007).The value of natural products to future pharmaceutical discovery. Natural product reports, 6(24); 1225-1244.

Bhat, M. K. (2000).Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnol Adv, 5(18); 355-383.

Chahar, M. K., Sharma, N., Dobhal, M. P., and Joshi, Y. C. (2011).Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. Pharmacognosy Reviews, 9(5); 1-12.

Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., Wei, R., Fleming, M. D., Schreiber, S. L., and Cantley, L. C. (2008).The m2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. Nature, 7184(452); 230-U274.

Çakmak, Deniz Ezgi. 2012. Kanser dispne ölçeği'nin türk kanser hastalarında geçerlik ve güvenirliğinin incelenmesi. yüksek lisans. Ege Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir

Devic, S. (2016).Warburg effect - a consequence or the cause of carcinogenesis? J Cancer, 7(7); 817-822.

Dykes, L., and Rooney, L. W. (2007).Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. Cereal Food World, 3(52); 105-111.

Finlay, D. K. (2012).Regulation of glucose metabolism in t cells: New insight into the role of phosphoinositide 3-kinases. Front Immunol, 3);

Ganapathy-Kanniappan, S., and Geschwind, J. F. H. (2013).Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: Progress and prospects. Mol Cancer, 12);

Gatenby, R. A., and Gillies, R. J. (2007).Glycolysis in cancer: A potential target for therapy. Int J Biochem Cell B, 7-8(39); 1358-1366.

Gill, K. S., Fernandes, P., O'Donovan, T. R., McKenna, S. L., Doddakula, K. K., Power, D. G., Soden, D. M., and Forde, P. F. (2016).Glycolysis inhibition as a cancer treatment and its role in an anti-tumour immune response. Bba-Rev Cancer, 1(1866); 87-105.

Gulcin, I., Kufrevioglu, O. I., Oktay, M., and Buyukokuroglu, M. E. (2004).Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (urtica dioica l.). J Ethnopharmacol, 2-3(90); 205-215.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000).The hallmarks of cancer. Cell, 1(100); 57-70.

Harris, I., McCracken, S., and Mak, T. W. (2012).Pkm2: A gatekeeper between growth and survival. Cell research, 3(22); 447-449.

http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir/4-kanser-nedir.html (2017).

http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser/ (2017).

Http://www.Drahmetdobrucali.Com/hastaliklar/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser/.

https://www.drozdogan.com/kanser-nedir-neden-ve-nasil-olusur-ozetle-tum-surec/ (2017).

Https://www.Drozdogan.Com/kanser-nedir-neden-ve-nasil-olusur-ozetle-tum-surec/.

Hu, J. W., Sun, P., Zhang, D. X., Xiong, V. J., and Mi, J. (2014).Hexokinase 2 regulates g1/s checkpoint through cdk2 in cancer-associated fibroblasts. Cell Signal, 10(26); 2210-2216.

Hüsamettin Erdamar, Fatmanur Hacıevliyagil Kazancı, Sümeyye Gök. (2015).Biochemical changes in cancer.

Jiang-Tao Zhong, Shui-Hong Zhou. (2017).Warburg effect, hexokinase-ii, and radioresistance of laryngealcarcinoma. Oncotarget, 8(8); 14133-14146.

Kris-Etherton, P. M., and Keen, C. L. (2002).Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. Curr Opin Lipidol, 1(13); 41-49.

Küfrevioğlu, Ömer İrfan. 1985. Apokarbonik anhidrazın tekrar aktivasyonu ile bazı vücut sıvılarında zn miktarı tayini. Doktora. Atatürk Üniversity, Erzurum

Newman, D. J. (2008).Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drug discovery? Journal of medicinal chemistry, 9(51); 2589-2599.

Oktay, M., Gulcin, I., and Kufrevioglu, O. I. (2003).Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (foeniculum vulgare) seed extracts. Lebensm-Wiss Technol, 2(36); 263-271.

Pelicano, H., Martin, D. S., Xu, R. H., and Huang, P. (2006).Glycolysis inhibition for anticancer treatment. Oncogene, 34(25); 4633-4646.

Scatena, R., Bottoni, P., Pontoglio, A., Mastrototaro, L., and Giardina, B. (2008).Glycolytic enzyme inhibitors in cancer treatment. Expert Opin Inv Drug, 10(17); 1533-1545.

Tao, L., Wei, L., Liu, Y., Ding, Y., Liu, X., Zhang, X., Wang, X., Yao, Y., Lu, J., Wang, Q., *et al.* (2017).Gen-27, a newly synthesized flavonoid, inhibits glycolysis and induces cell apoptosis via suppression of hexokinase ii in human breast cancer cells. Biochem Pharmacol, 125); 12-25.

Thamrongwaranggoon, U., Seubwai, W., Phoomak, C., Sangkhamanon, S., Cha'on, U., Boonmars, T., and Wongkham, S. (2017).Targeting hexokinase ii as a possible therapy for cholangiocarcinoma. Biochem Biophys Res Commun, 2(484); 409-415.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Reyhan EYÜPOĞLU
Doğum Yeri : Aydın / Yenipazar
Doğum Tarihi : 19/04/1985
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
Adres : Kırkevler mah. Ege apt. No:29/1 Çankırı/Merkez
Tel : 544 379 60 72
E-posta : reyupoglu09@gmail

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Yenipazar Lisesi 1999-2002

Lisans : Atatürk Üniversitesi/SYO/Hemşirelik Bölümü 2002-2006

Yüksek Lisans : ÇKÜ/FBE/Kimya Anabilim Dalı 2013-2017

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

15.07.2007 tarihinden itibaren devlet memuru olarak görev yapmaktayım.

SAKARYA EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ 2007-2011

ÇANKIRI DEVLET HASTANESİ 2011-2012

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ 2012-...halen çalışmaktayım.