



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**OKSİDATİF PROTEİN HASARI ve ANTİOKSİDANLARIN
ÖNLEYİCİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ için BİR SENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

Govigerel BAYARSAIKHAN

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

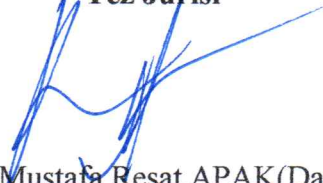
**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa Reşat APAK**

Temmuz, 2018

İSTANBUL

Bu çalışma, 2.07.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı
, Analitik Kimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Mustafa Reşat APAK(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Esra ÇAPANOĞLU GÜVEN
İstanbul Teknik Üniversitesi
Kimya Metalurji Fakültesi



Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 25812 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Türkiye’de Doktora çalışmalarına başladığım ilk günden itibaren, beni sıcakkanlılıkla araştırma ekibine dahil edip, engin bilgi ve tecrübeleriyle öğrenimim ve tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerini benimle paylaşıp, yönlendirmeleriyle destek veren sayın hocam Prof. Dr. Mustafa Reşat APAK’a yaptığı her şey için en içten şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora öğrenimim boyunca, bana laboratuvarını açıp güler yüzünü ve samimiyetini benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ’e tez çalışmalarımın değerli bilgi ve tecrübeleriyle sabır ve anlayış göstererek her türlü konuda yardımcı olduğu için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora öğrenimim süresince her türlü olanağı kullanmamı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen Analitik Kimya Anabilim Dalındaki bütün hocalarıma,

Hayatım boyunca yanımda olduklarını bana her daim hissettiren, koşulsuz sevgileri ve bana olan inançları ile güç kazandığım değerli babam Ts. Bayarsaikhan, annem D.Tseveendulam ile sevgili kardeşlerim B. Enkhjargal, B. Delger ve B.Myanganbazar’a

Doktora öğrenimim boyunca yanımda olan, öğrendiği her şeyi benimle paylaşıp akademik hayatımın zenginleşmesine katkı veren, kıymetli manevi desteklerinden dolayı Türkiye’deki hayatımı ailemden uzak geçirmemiş gibi mutlu anılarla dolu geçirmemi sağlayan sevgili arkadaşlarım Aslı Neslihan AVAN, Seda UZUNBOY, Asiye Aslıhan AVAN, Merve UZUN, Sevda AYDAR, Yasemin MÜMİN, Özge KARAKAŞ ve diğer tüm arkadaşlarıma en içten şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Türkiye’deki eğitim ve akademik çalışmalarımın sağlamlasına her türlü desteği gösteren T.C. Başbakanlık Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı’na verdiği Türkiye Bursu için ve çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne en içten teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2018

Govigerel BAYARSAIKHAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ.....	xiv
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xv
ÖZET	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. REAKTİF OKSİJEN VE AZOT TÜRLERİ (OKSİDANLAR)	4
2.2. ANTİOKSİDANLAR	6
2.2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	6
2.2.1.1. <i>Sentetik Antioksidanlar</i>	6
2.2.1.2. <i>Doğal Antioksidanlar</i>	6
2.2.2. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini için Kullanılan Yöntemler	7
2.2.2.1. <i>Hidrojen Atomu Transferine (HAT) Dayalı Yöntemler</i>	9
2.2.2.2. <i>Elektron Transferine (ET) Dayanan Yöntemler</i>	9
2.2.2.3. <i>HAT ve ET Esaslı Yöntemler Arasındaki Farklılıklar</i>	12
2.3. SERBEST RADİKALLERİN HEDEFİ OLAN BİYOMOLEKÜLLER.....	13
2.3.1. Karbonhidratlar.....	13
2.3.2. Lipitler	13
2.3.3. DNA	14
2.3.4. Proteinler	14
2.3.4.1. <i>Proteinlerin Karbonillenmesi</i>	16
2.3.4.1. <i>Protein Tiyollerinin Oksitlenmesi</i>	19
2.4. PROTEİNLERİN OKSİDATİF HASARININ BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	20
2.4.1. Amino Asit Kalıntısının Değişikliği.....	20
2.4.1.1. <i>HPLC Yöntemleriyle Amino Asit Analizi</i>	20
2.4.1.2. <i>Sistein Köklerinin Ölçümü</i>	21
2.4.1.3. <i>Sistin Kalıntılarının Ölçümü</i>	21
2.4.2. Ara Ürünlerin Belirlenmesi	21
2.4.2.1. <i>Radikallerin Spektrofotometrik Yöntemler ile Belirlenmesi</i>	21

2.4.2.2. Radikal Olmayan Ara Ürünlerin Belirlenmesi	22
2.4.3. Son Ürünlerin Oluşumu.....	23
2.4.3.1. Spesifik Oksidasyon Ürünlerinin Belirlenmesi ve Ölçümü.....	23
2.4.3.2. Protein Oksidasyonunun Genel Belirteci	24
2.5. TEZ AŞAMASINDA KULLANILAN PROTEİNLER	25
2.5.1. Bovin (Sığır) Serum Albümin (BSA).....	25
2.5.2. Kazein.....	26
2.5.3. Yumurta Akı Proteini	26
2.6. SENSÖRLER	27
2.6.1. Sensörlerin Sınıflandırılması	28
2.6.1.1. Doğrudan Okuma Yapılabilen Seçimli Sensörler.....	28
2.6.1.2. Numune Ayırıcı Sensörler.....	29
2.6.2. Proteinlerin Algılanması için Geliştirilen Yöntemler.....	30
2.6.2.1. Proteinlerin Yapısının Tanınması.....	30
2.6.2.2. Protein Yüzeyinin Tanınması	31
2.6.2.3. Protein – Ligand Etkileşimleriyle Protein Algılanması.....	32
2.6.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Sensör Destek Materyali – Nafyon	33
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	34
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR VE KİMYASALLAR	34
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	34
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	34
3.2. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI.....	35
3.2.1. Protein Oksidasyonu için Uygulanan Fenton Çözeltilerinin Hazırlanması.....	35
3.2.2. Antioksidan Standartlarının Hazırlanması.....	35
3.2.3. CUPRAC Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	36
3.2.4. Protein Karbonil Tayini için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	36
3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	36
3.3.1. Karbonil Tayini Yöntemi ve Optimizasyonu	36
3.3.1.1. Protein Türevli Dinitrofenilhidrazon Bileşiğinin Elde Edilmesi	37
3.3.1.2. KOH Çözeltisinin Hacminin Belirlenmesi.....	37
3.3.1.3. Organik Fazın Kurutulması.....	37
3.3.1.4. Fenton Sistemi ile Proteinlerin Okside Edilmesi.....	38
3.3.1.5. Proteinlerin Oksidatif Hasarı Sonucu Oluşan Karbonil Grubunun Tayini	38
3.3.2. CUPRAC Yöntemi	39

3.3.2.1. Protein Oksidasyonu.....	39
3.3.2.2. Proteinlerin Oksidatif Hasarının Belirlenmesinde Uygulanan Modifiye Edilmiş CUPRAC Yöntemi.....	39
3.4. CUPRAC SENSÖRÜ.....	40
3.4.1. CUPRAC Yöntemine Dayalı Optik Sensör Hazırlanması	40
3.4.2. Optik Sensör Kullanılarak Proteinlerin Oksidatif Hasarının Tayin Edilmesi	40
3.4.3. CUPRAC Sensörünün Tekrar Kullanımının Araştırılması	41
3.4.3.1. Optimal Sıcaklık Belirlenmesi	41
3.4.3.2. Temizleme için Kullanılan Asit Konsantrasyonunun Belirlenmesi	41
3.4.3.3. Süre Denemesi	41
3.5. ANTİOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ İÇİN GERÇEK ÖRNEK UYGULAMASI	41
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. KARBONİL TAYİNİ YÖNTEMİNİN OPTİMİZASYONU	43
4.1.1. Protein Türevli Dinitrofenilhidrazon Bileşiğinin Elde Edilmesi	43
4.1.2. KOH Çözeltisinin Hacminin Belirlenmesi	43
4.1.3. Organik Fazın Kurutulması	44
4.2. PROTEİN KARBONİL TAYİNİ YÖNTEMİNİN UYGULANMASI	45
4.2.1. BSA'nın Oksidatif Hasarı Sonucu Karbonillenmesi	45
4.2.1.1. BSA'nın Karbonillenmesine Antioksidanların Koruyucu Etkisinin Belirlenmesi	46
4.2.2. Kazeinin Oksidatif Hasar Sonucu Karbonillenmesi	49
4.2.2.1. Kazeinin Karbonillenmesine Antioksidanların Koruyucu Etkisinin Belirlenmesi	49
4.2.3. Protein Karbonil Tayini Yönteminin Gerçek Örneğe Uygulanması	52
4.2.3.1. Yumurta Akı Proteinin Karbonillemesine Antioksidanların Koruyucu Etkisinin İncelenmesi	52
4.3. KARBONİL TAYİNİ YÖNTEMİNİN MAKSİMUM ABSORBANS VERDİĞİ DALGABOYUNA PROTEİN VE ANTİOKSİDANLARIN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ	55
4.4. PROTEİNLERİN OKSİDATİF HASARININ BELİRLENMESİ İÇİN CUPRAC YÖNTEMİNİN UYGULANMASI.....	56
4.4.1. Proteinlerin Oksidatif Hasarının CUPRAC Yöntemiyle Belirlenmesi	57
4.5. OKSİDATİF PROTEİN HASARI VE ANTİOKSİDANLARIN ÖNLEYİCİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ İÇİN OPTİK SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ.....	58
4.5.1. Optimal Koşullarının Belirlenmesi.....	58

4.5.2. Optik Sensör Yüzeyinde Proteinlerin Oksidatif Hasarının Belirlenmesi	59
4.5.2.1. <i>Antioksidanların Proteinlerin Oksidatif Hasarı Üzerine Koruyucu Etkilerinin Optik Sensör Yüzeyinde Belirlenmesi</i>	60
4.5.3. Proteinlerin Oksidatif Hasarının CUPRAC Yöntemiyle Çözeltide ve Optik Sensör Yüzeyinde Elde Edilen Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	60
4.5.3.1. <i>BSA'nin Oksidatif Hasarının CUPRAC Yöntemiyle Belirlenmesi</i>	61
4.5.3.2. <i>BSA'nın Oksidatif Hasarı Üzerine GSH'nin Engelleyici Etkisi</i>	61
4.5.3.3. <i>BSA'nın Oksidatif Hasarı Üzerine NAC'nin Engelleyici Etkisi</i>	62
4.5.3.4. <i>BSA'nın Oksidatif Hasarı Üzerine CYS'nin Engelleyici Etkisi</i>	62
4.5.3.5. <i>BSA'nın oksidatif hasarı üzerine AA'in engelleyici etkisi</i>	63
4.5.3.6. <i>BSA'nın Oksidatif Hasarı Üzerine GA'nin Engelleyici Etkisi</i>	63
4.5.3.7. <i>Kazein'in Oksidatif Hasarının CUPRAC Yöntemiyle Belirlenmesi</i>	64
4.5.3.8. <i>Kazein'in Oksidatif Hasarı Üzerine CYS'nin Engelleyici Etkisi</i>	64
4.5.3.9. <i>Kazein'in Oksidatif Hasarı Üzerine AA'in Engelleyici Etkisi</i>	65
4.5.3.10. <i>Kazein'in Oksidatif Hasarı Üzerine GSH'in Engelleyici Etkisi</i>	65
4.5.3.11. <i>Kazein'in Oksidatif Hasarı Üzerine NAC'in Engelleyici Etkisi</i>	66
4.5.3.12. <i>Kazein'in Oksidatif Hasarı Üzerine GA'in Engelleyici Etkisi</i>	66
4.5.3.13. <i>Yumurta Akı Proteinin Oksidatif Hasarının CUPRAC Yöntemiyle Belirlenmesi</i>	67
4.5.3.14. <i>Yumurta Akı Proteininin Oksidatif Hasarı Üzerine AA'in Engelleyici Etkisi</i>	67
4.5.3.15. <i>Yumurta Akı Proteininin Oksidatif Hasarı Üzerine GSH'in Engelleyici Etkisi</i>	68
4.5.3.16. <i>Yumurta Akı Proteinin Oksidatif Hasarı Üzerine CYS'nin Engelleyici Etkisi</i>	68
4.5.3.17. <i>Yumurta Akı Proteininin Oksidatif Hasarı Üzerine NAC'in Engelleyici Etkisi</i>	69
4.5.3.18. <i>Yumurta Akı Proteininin Oksidatif Hasarı Üzerine GA'in Engelleyici Etkisi</i>	69
4.6. CUPRAC SENSÖRÜNÜN TEKRAR KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI	70
4.6.1. Optimal Sıcaklık Belirlenmesi	70
4.6.2. Temizleme için Kullanılan Asit Konsantrasyonunun Belirlenmesi	70
4.6.3. Süre Denemesi.....	71
4.7. ANTIOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ İÇİN GERÇEK ÖRNEK UYGULAMASI	72
4.8. İSTATİKSEL ANALİZ	73

4.8.1. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA).....	73
4.8.2. Antioksidan Etkinliği Sıralaması İçin Spearman Analizi.....	73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	74
KAYNAKLAR.....	84
ÖZGEÇMİŞ	91



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Serbest radikal kaynakları, insan sağlığına faydaları ve zararları.	5
Şekil 2.2: Antioksidanların sınıflandırılması.	7
Şekil 2.3: CUPRAC reaksiyonu ve kromoforu: Bis(neokuproin) bakır (I) kelat katyonu.	11
Şekil 2.4: Serbest radikal ile polipeptit omurganın yarılması. (a) çapraz bağlanma veya bağ parçalanması ile karbonil oluşumu; (b) yan zincirlerdeki amino asidin oksidasyonu ile karbonil oluşumu; (c) prolil kalıntısında polipeptid omurgasının kırılması ile karbonil oluşumu.	17
Şekil 2.5: Amino asit yan zincirinin oksitlenmesi (a) Lizin, (b) arjinin ve (c) prolin oksidasyonu gösterilmektedir.	18
Şekil 2.6: Protein glikasyon şeması.	19
Şekil 2.7: Protein tiyol gruplarının oksidasyonu için genel şema.	20
Şekil 2.8: Doğrudan okuma yapabilen seçimli sensörler.	28
Şekil 2.9: Proteinin yan zincirlerinin tanınması.	31
Şekil 2.10: Protein yüzeyinin tanınması.	32
Şekil 2.11: Protein – Ligand Etkileşimleriyle Protein Algılanması.	33
Şekil 2.12: Nafyon membranının yapısı.	33
Şekil 3.1: Protein karbonil tayini için genel şema.	39
Şekil 3.2: Oksidatif protein hasarının CUPRAC yöntemi ile tayini için genel şema.	40
Şekil 4.1: Karbonil anyonu içeren organik fazın bazik olması için yapılan denemeler (6,0 M KOH'den 100(a); 150(b) ve 50 µL(c) alındığında elde edilen spektrumlar).	45
Şekil 4.2: BSA'nın karbonil tayini yöntemine ait kalibrasyon eğrisi.	46
Şekil 4.3: BSA'nın karbonillenmesine antioksidanların engelleyici etkilerinin incelenmesi amacıyla antioksidanların artan konsantrasyonları ile oksidasyon ürünlerinin absorbanlarında oluşan azalma (ΔA) arasında çizilen kalibrasyon eğrileri.	48
Şekil 4.4: Kazein konsantrasyonu (mg mL^{-1}) ve karbonil yöntemi ile elde edilen absorbanlar arasında çizilen kalibrasyon eğrisi.	49

Şekil 4.5: Kazeinin karbonillenmesine antioksidanların engelleyici etkilerinin incelenmesi amacıyla antioksidanların artan konsantrasyonları ile oksidasyon ürünlerinin absorbandsında oluşan azalma (ΔA) arasında çizilen kalibrasyon eğrileri.....	51
Şekil 4.6: Yumurta akı miktarı (mg mL^{-1}) ve karbonil yöntemi ile elde edilen absorbsanlar arasında çizilen kalibrasyon eğrisi.	52
Şekil 4.7: Yumurta akı proteinlerinin karbonillenmesine antioksidanların engelleyici etkilerinin incelenmesi amacıyla antioksidanların artan konsantrasyonları ile oksidasyon ürünlerinin absorbandsında oluşan azalma (ΔA) arasında çizilen kalibrasyon eğrileri.....	54
Şekil 4.8: Protein oksidasyonuna karşı antioksidanların hidroksil radikal süpürücü aktivelerinin belirlenmesi denemelerinde elde edilen spektrumlar. Şekil 4.8 (A) $5.0 \times 10^{-4} \text{M}$ CYS'den alınan 0; 0,5; 1,1; 1,3; 1,7 ve 2,0 mL'lik örnekler varlığında, BSA için (B) $2.0 \times 10^{-4} \text{M}$ GA'ten alınan 0; 0,3; 0,9; 1,2; 1,6 ve 2,0 mL'lik örnekler varlığında, yumurta akı için, (C) $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ GSH çözeltisinden 0; 0,2; 0,4; 0,8 ve 1,2 mL'lik örnekler varlığında, kazein için oksidatif hasar sonucu oluşan protein karbonillerinden kaynaklanan absorbsan azalması.....	56
Şekil 4.9: CUPRAC reaktifinin nafyon membran yüzeyine tutturulma süresi ve elde edilen CUPRAC sensörü ile proteinin oksidatif hasarının belirlenmesi için sıcaklık denemesi.....	59
Şekil 4.10: CUPRAC sensörü ile proteinin oksidatif hasarının tayini için kullanılan üre tamponu miktarının belirlenmesi (Üre tampon hacminin 0 mL olarak gösterilen denemede üre tamponu yerine 2,0 mL NH_4Ac tamponu kullanılmıştır).....	59
Şekil 4.11: BSA'nın oksidatif hasarının CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nafyon yüzeyinde belirlenmesi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.	61
Şekil 4.12: BSA'nın oksidatif hasarı üzerine GSH'nin engelleyici etkisinin CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nafyon yüzeyinde belirlenmesi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.....	61
Şekil 4.13: BSA'nın oksidatif hasarı üzerine NAC'nin engelleyici etkisinin CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nafyon yüzeyinde belirlenmesi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.....	62
Şekil 4.14: BSA'nın oksidatif hasarı üzerine CYS'nin engelleyici etkisinin CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nafyon yüzeyinde belirlenmesi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.....	62
Şekil 4.15: BSA'nın oksidatif hasarı üzerine AA'in engelleyici etkisinin CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nafyon yüzeyinde belirlenmesi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.....	63

Şekil 4.16: BSA'nın oksidatif hasarı üzerine GA'nin engelleyici etkisinin CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nasyon yüzeyinde belirlenmesi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.17: Kazein'in oksidatif hasarının CUPRAC yöntemiyle belirlenmesinde çözültide ve nasyon yüzeyinde elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.....	64
Şekil 4.18: Kazein'in oksidatif hasarı üzerine CYS'nin engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nasyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.....	64
Şekil 4.19: Kazein'in oksidatif hasarı üzerine AA'in engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nasyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.....	65
Şekil 4.20: Kazein'in oksidatif hasarı üzerine GSH'ın engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nasyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.....	65
Şekil 4.21: Kazein'in oksidatif hasarı üzerine NAC'in engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nasyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.....	66
Şekil 4.22: Kazein'in oksidatif hasarı üzerine GA'in engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nasyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.....	66
Şekil 4.23: Yumurta akı proteininin oksidatif hasarının belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nasyon yüzeyinde elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.....	67
Şekil 4.24: Yumurta akı proteininin oksidatif hasarı üzerine AA'in engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nasyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.....	67
Şekil 4.25: Yumurta akı proteininin oksidatif hasarı üzerine GSH'ın engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nasyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.....	68
Şekil 4.26: Yumurta akı proteini oksidatif hasarı üzerine CYS'nin engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nasyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.....	68
Şekil 4.27: Yumurta akı proteininin oksidatif hasarı üzerine NAC'in engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nasyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.....	69
Şekil 4.28: Yumurta akı proteininin oksidatif hasarı üzerine GA'in engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nasyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.....	69

Şekil 4.29: Kullanılmış nasyon membranının temizlenmesine sıcaklığın etkisi.....70

Şekil 4.30: Kullanılmış nasyon membranının temizlenmesine asit konsantrasyonunun etkisi.71

Şekil 4.31: Kullanılmış nasyon membranının temizlenmesine sürenin etkisi.....71



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: Protein çözeltilerin hazırlanması.....	35
Tablo 4.1: BSA'nın oksidatif hasarı üzerine antioksidanların (AO) koruyucu etkilerinin karbonil tayin yöntemiyle belirlenmesi.....	47
Tablo 4.2: Kazeinin oksidatif hasarı üzerine antioksidanların (AO) koruyucu etkilerinin karbonil tayini yöntemiyle belirlenmesi.	50
Tablo 4.3: Yumurta akı proteininin oksidatif hasarı üzerine antioksidanların (AO) koruyucu etkilerinin karbonil tayin yöntemiyle belirlenmesi.....	53
Tablo 4.4: Protein karbonil tayini yönteminin λ_{max} değeri protein ve ilave edilen AO maddeye göre değişimi.....	55
Tablo 4.5: Proteinlerin oksidatif hasarının CUPRAC yöntemiyle belirlenmesi.....	57
Tablo 4.6: Proteinlerin oksidatif hasarı üzerine antioksidanların (AO) koruyucu etkilerinin CUPRAC yöntemiyle belirlenmesi.....	58
Tablo 4.7: Oksidatif protein hasarının CUPRAC sensör ile belirlenmesiyle elde edilen sonuçlar.....	60
Tablo 4.8: CUPRAC sensörü ile oksidatif protein hasarına antioksidanların (AO) önleyici etkisinin belirlenmesi.....	60
Tablo 4.9: Oksidatif protein hasarına portakal suyunun engelleyici etkisinin GA varlığında ve yokluğunda karbonil, CUPRAC çözelti ve CUPRAC sensör yöntemleri ile belirlenmesi.....	72
Tablo 4.10: Oksidatif protein hasarına antioksidanların engelleyici etkisinin karbonil tayini ve CUPRAC (çözelti) yöntemiyle elde edilen sonuçların kıyaslanmasında Spearman korelasyon katsayısının belirlenmesi.....	73

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
A	: Absorbans
ΔA	: Absorbans farkı
λ_{\max}	: Maksimum absorbans verdiği dalga boyu

Kısaltmalar	Açıklama
AA	: Askorbik asit
ABTS	: 2,2'-azinobis – 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit
ANOVA	: Tek yönlü varyans analizi
AO	: Antioksidan
AOPP	: İleri oksidasyon protein ürünleri
BAE	: Bağ ayrışma enerjisi
BHA	: Bütil hidroksi anisol
BHT	: Bütil hidroksi toluen
BSA	: Bovin serum albümin
CAT	: Katalaz
CD	: Siklodekstrin
CTAB	: Setil Trimetil Amonyum Bromür
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
CYS	:Sistein
DMPO	: 5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNPH	: 2,4-Dinitrofenilhidrazin
DOPA	: L-3,4-dihidroksifenil alanin
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5'-Ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit
ET	: Elektron transferi
EPR	: Elektron paramanyetik rezonans
FOX	: Fe(II)–ksilenoloranj
FRAP	: Demir(III) indirgeme antioksidan gücü
GA	: Gallik asit
GPX	: Glutatyon peroksidazlar

GSH	: Glutasyon
HAT	: Hidrojen Atomu Transferi
HNE	: Hidroksinonenal
IP	: İyonlaşma potansiyeli
MS	: Kütle spektroskopisi
NAC	: N-Asetil sistein
Nc	: Neokuproin
OHG	: 8-hidroksiguanin
ORAC	: Oksijen radikali absorblama kapasitesi
PBN	: N-tert-bütil- α -fenilnitron
PG	: Propil gallat
PRX	: Peroksiredoksin
RNA	: Ribonükleik asit
RNS	: Reaktif azot türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAC	: Toplam antioksidan kapasite
TBHQ	: Ter-bütil hidrokinon
TCA	: Trikloroasetik asit
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
TFE	: Tetrafloroetilen
TRAP	: Toplam radikal absorblama potansiyeli
TRX	: Tiyoredoksin

ÖZET

DOKTORA TEZİ

Govigerel BAYARSAIKHAN

İstanbul Üniversitesi

OKSİDATİF PROTEİN HASARI ve ANTIOKSİDANLARIN ÖNLEYİCİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ İÇİN BİR SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Mustafa Reşat APAK

Günümüzde oksidatif stres kavramı, tüm dünyada kimyasal, biyolojik, tıbbi vb. çeşitli alanlarda yapılan araştırmalar arasında önemli bir yer tutmaktadır. Serbest radikaller canlı organizmalarda sürekli üretilmekle birlikte çeşitli antioksidan savunma sistemleriyle düzenlenmektedir. Serbest radikallerin aşırı üretimi sonucu, miktarlarının antioksidanlarca dengelenememesi oksidatif stres olarak tanımlanır ve protein, DNA, RNA, lipid, karbonhidratlar dahil olmak üzere biyolojik olarak önemli moleküller üzerine hasar oluşumuna ve bundan kaynaklanan çok sayıda hastalığa neden olabilir. Son yıllarda sensörler, düşük maliyetleri, kolay kullanımları, analitin hızlı tayin edilebilmesi ve yüksek hassasiyet gibi avantajları nedeniyle çeşitli hastalıkların takibi ve tedavisi için taşınabilir aletler geliştirilmesinde, gıda ve ilaçların kontrollerinde, adli kimyada veya biyomedikal araştırmalar gibi çeşitli alanlarda başarıyla uygulanmaktadır. Bu nedenle, tez çalışmasının amacı oksidatif protein hasarı ve antioksidanların önleyici etkisinin belirlenmesi için bir sensör geliştirilmesidir.

Bu çalışmada CUPRAC reaktifi (Cu(II)-Nc) nasyon membran yüzeyine tutturularak oksidatif protein hasarı ve antioksidanların önleyici etkisinin belirlenmesi için kullanılan optik sensör elde edildi. Protein örnekleri olarak bovin serum albümin (BSA), kazein ve yumurta akı kullanıldı. Fenton Yöntemiyle oluşturulan hidroksil radikali ile oksidatif hasara uğratılan protein örneklerinde meydana gelen bu hasarın belirlenmesi için CUPRAC sensörü uygulandı. İşlem askorbik asit, gallik asit, glutatyon, sistein, N-asetil sistein bileşikler varlığında tekrarlanarak antioksidanların oksidatif protein hasarı üzerine engelleyici etkisi incelendi. CUPRAC tayin yöntemi ayrıca çözelti ortamında da gerçekleştirildi ve CUPRAC yöntemiyle sensör üzerinde ve çözelti ortamında yapılan ölçümlerle elde edilen sonuçlar arasında yüksek bir korelasyon görüldü (çoğu denemelerde, $R^2 > 95$).

Dünya literatüründe karbonil grubu oksidatif protein hasarının genel belirteci olarak tanımlanmış olup bu çalışmada karbonil tayini yöntemi standart referans yöntem olarak uygulanmıştır. Tezin kapsamında kullanılan karbonil tayini yöntemi, oksidatif hasara uğratılan proteinlerin karbonil türevleri üzerine 2,4-Dinitrofenilhidrazin (DNPH) eklenmesiyle meydana gelen 2,4-dinitrofenilhidrazon bileşiğinin bazik ortamda şarap – kırmızı renkli anyon şekline dönüştürülmesiyle elde edilen absorbansın 450 nm'de

okunmasına dayanmaktadır. Çalışmada protein örnekleri Fenton sisteminde antioksidanların varlığında ve yokluğunda oksidatif hasara uğrattıldı, meydana gelen karbonil türevlerinden kaynaklanan absorbanstaki azalma değerlendirilerek antioksidanlar oksidatif protein hasarından koruyucu etkilerine göre sıralandı. Spearman sıra-korelasyon katsayısı istatistiklerine göre ($p = 0,05$), CUPRAC tarafından belirlenen antioksidan sıralaması ile protein oksidasyonuna karşı verdikleri yanıtta dolayı önerilen protein karbonil metodu sıralaması arasında monotonik olarak “çok güçlü” bir ilişki ($r_s = +0,9$ 'den $+1,0$) olduğu belirlendi. Araştırılan bileşikler arasında antioksidan kapasitesi en yüksek olan Gallik asit olarak belirlendi. Proteinlerin oksidatif hasarının önlenmesi için antioksidan aktivite belirlenmesinde kullanılan modifiye CUPRAC yönteminin geliştirilmesi ve aynı amaca dönük tasarlanan bazik karbonil yönteminde yüzey aktif varlığında çözücü özütlemenin kullanılması, çalışmanın iki özgün katkısını oluşturmaktadır.

Temmuz 2018, 111 sayfa.

Anahtar kelimeler: Protein, Oksidatif hasar, Sensör, Antioksidan, CUPRAC

SUMMARY

Ph.D. THESIS

Govigerel BAYARSAIKHAN

İstanbul University

DEVELOPMENT of a SENSOR for MEASURING OXIDATIVE PROTEIN DAMAGE and ANTIOXIDANT PROTECTION

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering
Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Mustafa Reşat APAK

In last few decades, the term oxidative stress has attracted sharp attention in the field of chemical, biological and medical researches around the world. Free radicals are continuously formed in living organisms and regulated with antioxidant systems in living organisms. The production of excessive amounts of free radicals that could overwhelm the antioxidant capacity of the system causes oxidative stress and as a result, various diseases are formed due to damages on biologically important molecules, including protein, DNA, RNA, lipid and carbohydrates. On the other hand, the sensor technology is rapidly introduced for wide range of areas such as monitoring of treatment and disease, food and drug control and forensic and biomedical researches, due to its advantages, including low cost operation, ease of use, rapid determination and high sensitivity. Therefore, the purpose of the thesis is to develop a sensor for determination of oxidative protein damage and of the protective effect of antioxidants on this damage.

Within the frame of thesis, an optical sensor was developed to evaluate oxidative protein damage and antioxidant protection through immobilizing CUPRAC reagents (Cu(II)-Nc) on nafion membrane. In this study, BSA, casein and egg white proteins were used as protein probes and their hydroxyl radical induced oxidative damage in Fenton system was carried out with the CUPRAC sensor. Determination of oxidative damage of proteins by CUPRAC sensor was followed with a number of antioxidants to identify protective effect of antioxidant compounds (ascorbic acid, gallic acid, glutathione, cysteine and N-acetyl cysteine) on oxidative protein damage. Furthermore, CUPRAC assay was also applied in solution medium to measure oxidative protein damage and antioxidant protective effect and there was high correlation found between results obtained with CUPRAC sensor and CUPRAC solution methods (in most cases, $R^2 > 95$).

As it is well known that carbonyl groups are generic markers for the oxidative protein damage, protein carbonyl assay was conducted as the standard reference method in the present study. The principle of carbonyl assay used in this study is based on read absorbance of wine colored anion of 2,4-dinitrophenylhydrazone. This anion is produced in basic media from the 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives, which are formed in the reaction between carbonylized derivatives of damaged protein and 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) reagent.

Protein samples were oxidized in the Fenton system with and without the presence of AOs, and based on decreases in absorbance of produced carbonyl derivatives, studied AOs were ranked with respect to their protective effect on oxidative protein damage. The Spearman rank order correlation analysis resulted that there was a monotonically increasing “very strong” association ($r_s = +0.9$ to $+1.0$; $p=0.05$) found between two ranks of AOs obtained through CUPRAC solution method and carbonyl assay in this study. Among the studied AOs, the strongest antioxidant activity was found for Gallic acid. The two novelty statements of this thesis work may be declared as: (i) development of a modified CUPRAC method for measuring the antioxidant activity of protein damage protective compounds, and (ii) design of an alkaline carbonyl method in conjunction with surfactant-assisted solvent extraction used for the same purpose.

July 2018, 111 pages.

Keywords: Protein, Oxidative damage, Sensor, Antioxidant, CUPRAC

1. GİRİŞ

Biyolojik sistemlerde protein, lipit, DNA ve karbonhidrat gibi hücrenel yapılar hem iç hem de dış kaynaklı reaktif oksijen türlerine (ROS) sürekli maruz kalmaktadır (Stadman ve Levine, 2000). Hücre ve organizmalarda normal şartlarda bu oksidanların oluşumunun kontrol altında tutulması için bir savunma sistemi bulunur. Bu savunma sisteminde düşük molekül ağırlıklı süpürücüler (örneğin, askorbik asit, tokoferoller, ürat ve tiyoller), doğrudan oksidanları ya da öncülerini uzaklaştıran enzimler (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, peroksietoksin ve glutasyon peroksidaz) ve hasarı onaran (metiyonin sülfoksit redüktaz (Msrs), disülfid redüktaz / izomeraz ve sülforedoksin) ya da hasarlı ürünü uzaklaştıran (proteazomlar, lizozomlar ve DNA onarım enzimleri) etkili enzim sistemleri bulunmaktadır (Davies, 2016). Oksidan ve savunma sistemi arasındaki denge bozulduğu takdirde, serbest radikallerin zarar verdiği DNA, RNA, protein, lipit ve karbonhidratlar gibi biyomoleküllerin başında proteinler yer almaktadır (Lobo ve diğ. 2010). Oksidatif protein hasarının Parkinson hastalığı, kistik fibrozis, Alzheimer hastalığı ve romatoid artrit gibi bazı hastalıklar ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Perry ve diğ. 2002; Hwang, 2013; Mateen ve diğ. 2016).

Serbest radikalleri uzaklaştırma ve giderme yeteneğine sahip olan antioksidan bileşiklerin oluşturduğu toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar son yıllarda dünya literatüründe önemli bir yer bulmuş olup bu amaçla çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Antioksidan bileşiklerin özellikleri, reaksiyon karakteristikleri ve mekanizmaları çok farklı olduğundan tek bir analiz yöntemi ile kompleks bir sistemdeki tüm radikal kaynaklarının veya antioksidanların miktarlarının doğru bir şekilde belirlenmesi olası değildir ve bu nedenle antioksidan kapasite tayini için uygun analiz yönteminin seçimi kritik öneme sahiptir (Huang ve diğ. 2005). Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılan yöntemler antioksidanların oksidanlarla olan reaksiyonlarına bağlı olarak elektron transferine ve hidrojen atomu transferine dayalı olmak üzere iki grup altında incelenebilir (Prior ve diğ. 2005).

Radikal aracılığıyla gerçekleşen protein oksidasyonu bu yüzyılın ortalarından beri araştırılmış olmakla birlikte reaksiyon ürünlerinin *in vivo* oksidatif hasarın spesifik ya da genel belirteçleri olarak kullanılması ancak son yıllarda gerçekleşmiştir. Bunun nedeni oluşan ürünlerin yapısının bilinmemesi ve bu ürünleri biyolojik materyaller içerisinde saptayacak duyarlı metodların mevcut olmamasıdır. Proteinlerin hücrede üretilen hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) gibi reaktif türlerin %50-75'ini süpürebileceği tahmin edilmektedir (Davies ve diğ. 1999).

ROS'un proteinlerle etkileşimiyle histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit kalıntısında ve/veya peptit omurgasında meydana gelen hasar sonucunda protein karbonil ürünleri meydana gelir. Protein oksidasyonu sonucu oluşan ürünler arasında ölçülmesi en yaygın olan protein karbonilleridir (Evans ve diğ. 1999). Protein oksidasyonunun protein karbonil gibi belirteçlerinin *in vivo* protein oksidasyonunun derecesini gösteren bir araç olarak kullanılması ise nispeten daha uzun bir geçmişe dayanmaktadır. Son zamanlarda protein oksidasyonunun yeni bir belirteci olan ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) çeşitli araştırmacıların dikkatini çekmeye başlamıştır. AOPP, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Diğer taraftan AOPP'nin yapısal olarak ileri glikasyon son ürünlerine benzediği bildirilmektedir. AOPP protein oksidasyonunun derecesini belirlemede duyarlı bir belirteçtir. Witko-Sarsat ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, AOPP düzeylerinin, protein oksidasyonunun göstergesi olan plazma ditirozin ve ileri glikasyonun son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile korelasyon gösterdiği, fakat lipit peroksidasyon belirteci olan tiyobarbütirik asit ile reaksiyon veren maddelerle korelasyon göstermediği bildirilmiştir (Witko ve diğ. 1996).

Oksidatif protein hasarı sonucu meydana gelen ürünlerin belirlenmesi ve algılanması için geliştirilen uygulamalardan biri de biyosensörlerin kullanımınıdır. Biyosensörler biyolojik sistemdeki bir analitin konsantrasyonuyla orantılı sinyaller üreterek kimyasal veya biyolojik reaksiyonları ölçen cihazlar olarak tanımlanabilir. İlk olarak 1950'lerde Leland C. Clark tarafından kandaki oksijen miktarının elektrot ile belirlenmesi amacıyla geliştirilen biyosensörler bugüne kadar çeşitli hastalıkların takibi ve tedavisi için taşınabilir alet tasarımı, gıda ve ilaç kontrolleri, adli veya biyomedikal araştırmalar gibi geniş bir alanda başarıyla kullanılmaktadır. "Web of Science" veritabanında, 2005'ten 2015'e kadar "biyosensörler" konusuyla ilgili 84000'den fazla çalışmanın yayınlandığı belirtilmiştir (Bhalla ve diğ. 2016).

Tez kapsamında proteinlerin oksidatif hasarı ve antioksidanların önleyici etkisinin belirlenmesi amacıyla İstanbul Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda toplam antioksidan kapasite tayini için geliştirilmiş olan CUPRAC (bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi kullanılmıştır (Apak ve diğ. 2004; Özyürek ve diğ.2011).

Tez çalışmasının ilk aşamasında, Fenton sistemi ile antioksidanlar varlığında ve antioksidansız olarak oksidatif hasara uğratılan protein örneklerinden meydana gelen hasar

ürünleri CUPRAC yöntemiyle tayin edilmiştir. Yöntem, oksidatif protein (BSA, kazein, yumurta akı proteini) hasarı sonucu meydana gelen ürünlerin CUPRAC (Cu(II)-Nc) reaktifini indirgemesiyle meydana gelen sarı renkli Cu(I)-Nc kromoforunun absorpsiyonunun 450 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır.

Çalışmanın ikinci aşamasında oksidatif protein hasarı ve antioksidanların önleyici etkisinin belirlenmesi amacıyla CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifini katyon değiştirici polimerik bir membran olan nafyon film üzerine tutturularak optik bir sensör elde edilmiştir. Çözelti ortamında uygulanan CUPRAC yöntemi kapsamında gerçekleştirilen denemeler sensör kullanılarak tekrarlanmıştır. Sensör üzerinde gerçekleştirilen reaksiyon sonucu oluşan Cu(I)-Nc kromoforunun absorpsiyonu 450 nm'de ölçülmüştür. Ayrıca CUPRAC sensöründe kullanılan nafyon membranının birden fazla kez kullanılıp kullanılamayacağını belirlemek için denemeler yapılmıştır.

Oksidatif protein hasarı ve antioksidanların engelleyici etkileri, CUPRAC yönteminin hem çözelti ortamında hem de nafyon membran üzerinde uygulanmasıyla tayin edilmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak aralarındaki korelasyon belirlenmiştir. Ayrıca oksidatif protein hasarı ve antioksidanların engelleyici etkilerinin belirlenmesi amacıyla standart referans metod olarak karbonil yöntemi kullanılmıştır. Çözelti ortamında CUPRAC ve karbonil tayin yöntemi sonuçları karşılaştırılmış ve Spearman korelasyon katsayısı belirlenmiştir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında, Lappin ve Clark (1951) tarafından karbonil grubu içeren küçük moleküllü bileşiklerin tayini amacıyla geliştirilen yöntem, protein karbonillerinin tayini için modifiye edilmiş ve standart yöntem olarak kullanılmıştır. Optimum şartlar belirlendikten sonra CUPRAC yönteminde kullanılan proteinler Fenton sistemiyle antioksidanlar varlığında ve antioksidansız olarak oksidatif hasara uğrattırılıp bu hasar sonucu meydana gelen karbonil türevleri bazik ortamda şarap kırmızısı renkli anyon şekline dönüştürülerek absorpsiyonu 450 nm'de okunmuştur.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. REAKTİF OKSİJEN VE AZOT TÜRLERİ (OKSİDANLAR)

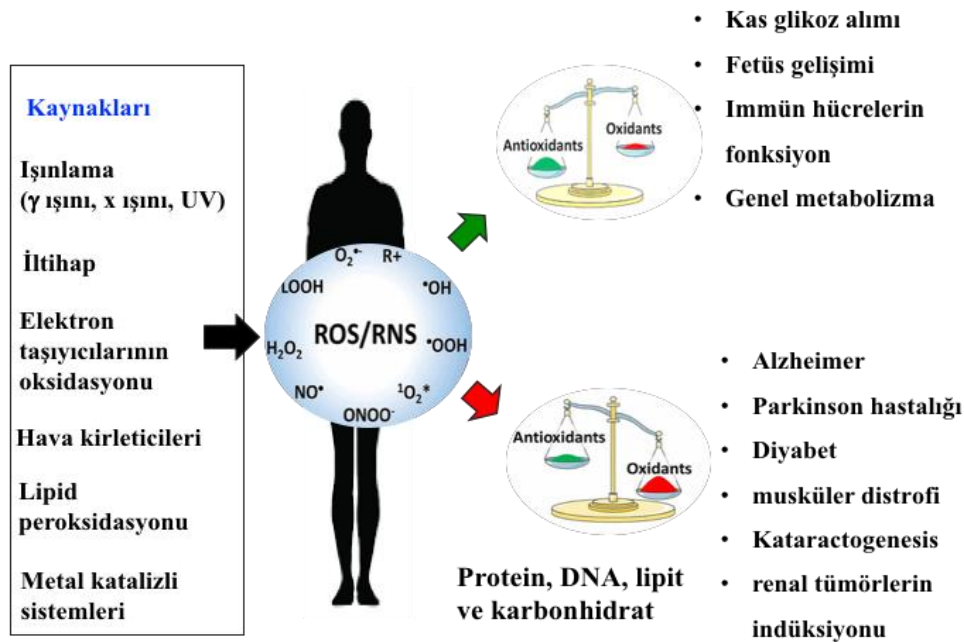
Canlı organizmalar yaşamları boyunca serbest radikaller üreten bir veya birden fazla sisteme sürekli maruz kalırlar ve bu reaktif türler protein, nükleik asit ve lipid gibi hücrel yapılar üzerinde hasara neden olurlar (Stadman ve Levine, 2000). Serbest radikaller dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan, yüksek enerjili atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller eşleşmemiş elektrona sahip olduğundan diğer bileşiklerle kolaylıkla reaksiyona girebilirler. Oksijen kaynaklı türler reaktif oksijen türleri (ROS), azot kaynaklı türler ise reaktif azot türleri (RNS) olarak adlandırılırlar. Reaktif oksijen türleri arasında hidroksil ($\bullet\text{OH}$), süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroksil ($\text{ROO}\bullet$), lipid peroksil ($\text{LOO}\bullet$) ve alkoksil ($\text{RO}\bullet$) radikalleri bulunur. Azot oksit ($\text{NO}\bullet$) ve azot dioksit ($\text{NO}_2\bullet$) serbest radikalleri reaktif azot türleri arasında sayılabilir. Ayrıca hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), hipokloröz asit (HOCl), nitrik asit (HNO_2), peroksinitrit (ONOO^-), diazot trioksit (N_2O_3) ve lipid peroksit (LOOH) gibi oksidanlar ise radikal olmadıkları halde canlı organizmada serbest radikallerin oluşmasına neden olabilirler (Genestra, 2007).

Lipit, DNA, protein ve karbonhidrat gibi biyomakromoleküllerin modifikasyonuna etkisi olduğu belirtilen serbest radikaller hem iç hem de dış kaynaklı olabilirler. İçsel kaynaklı serbest radikaller bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu, iltihaplanma reaksiyonu, indirgenmiş elektron taşıyıcılarının otooksidasyonu, azot oksit sentezi, lipid peroksidasyonu, metal katalizörü varlığında gerçekleşen reaksiyonlar gibi normal metabolizma sırasında meydana gelir. Aynı zamanda yemek pişirme (füme et, kullanılmış yağ vb.), bazı ilaçlar, atmosferdeki radyasyon ve kirleticiler gibi çevresel faktörler (O_3 , N_2O_2 , NO_2 , sigara dumanı) serbest radikallerin oluşmasına neden olan dış kaynaklar arasında sayılabilir.

Serbest radikaller ayrıca enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarla da oluşabilir. Serbest radikal üreten enzimatik reaksiyonlara solunum dizisi, prostaglandin sentezi ve sitokrom P450 sistemleri örnek olarak verilebilir. Örneğin $\text{O}_2^{\bullet-}$; NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, peroksidaz vb. birçok hücrel oksidaz sistemlerinden meydana gelir. Peroksit de aminoasit oksidaz ve ksantin oksidaz gibi çeşitli oksidaz enzimleri tarafından üretilir. En aktif radikallerden birisi olan $\bullet\text{OH}$ demir (II) veya bakır (I) katalizörleri varlığında süperoksit radikali ile peroksitin reaksiyona girmesi ile meydana gelir. Azot oksit radikali ($\text{NO}\bullet$) ise

biyolojik dokuda azot oksit sintaz ile L-Arjininin sitriline oksitlenmesinden oluşur. Bununla birlikte iyonize ışınlar ile etkileştiğinde başlayan veya oksijen ve organik maddeler arasında gerçekleşen reaksiyonlar serbest radikal üreten enzimatik olmayan reaksiyonlar arasında yer almaktadır (Pham – Huy ve diğ. 2008).

Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin meydana getirdiği hasara karşı reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getirmek amacıyla antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Serbest radikal seviyesinin vücuttaki antioksidanlar tarafından dengelenmesi şartıyla bu türler hücresel yanıtların iletilmesinde ve immün fonksiyonunda önemli roller oynamaktadır. Normal şartlarda hücrelerde oksidanlar ve antioksidanlar denge halindedir. Bununla birlikte reaktif oksijen türlerinin üretimi arttığında veya antioksidan seviyesi düştüğünde bu denge oksidanlar lehine kayabilir ve bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır (Vinson ve diğ. 1998). Oksidatif stress durumunda serbest radikal seviyesi vücuttaki antioksidan seviyesinden yüksek olduğundan hücrenin dengesini bozarak damar içinde endotel hasara, ateroskleroza, vasküler blokaja, çeşitli kardiyovasküler hastalıklara, Alzheimer hastalığına, nörodejeneratif hastalıklara, böbrek borusu disfonksiyonuna, bağ dokusu hastalıklarına vb. neden olabilir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Serbest radikal kaynakları, insan sağlığına faydaları ve zararları.

2.2. ANTIOKSİDANLAR

İnsan vücudu oksidatif strese karşı, biyolojik sistemlerde üretilen ya da gıda ve/veya besin takviyeleri ile dışarıdan alınan antioksidanlardan oluşan bir savunma sistemine sahiptir. Serbest radikallerin hedefi olan yükseltgenebilen maddeye göre nispeten daha az miktarda bulunup bu maddelerin oksidasyonunu ciddi derecede engelleyen veya yavaşlatan maddelere “antioksidan” denir. Antioksidan maddeler serbest radikallerin yayılmasını engelleyen çeşitli mekanizmalara sahiptir. Bunlar: 1) peroksidasyonu başlatan türlerin süpürülmesi, (2) serbest radikallerin oluşum reaksiyonlarına katılan metalleri bağlaması, (3) peroksit üretilmesinin önüne geçmek için $O_2\bullet^-$ radikallerinin söndürülmesi (4) kendi kendine oksitlenen zincir reaksiyonunun kırılması ve (5) lokalize oksijen konsantrasyonunu azaltması olarak özetlenebilir (Brewer, 2011).

2.2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Normal fizyolojik koşullarda oluşan radikalik ya da radikalik olmayan oksidanları etkisiz hale getiren antioksidanlar doğal ve sentetik olarak iki gruba ayrılır.

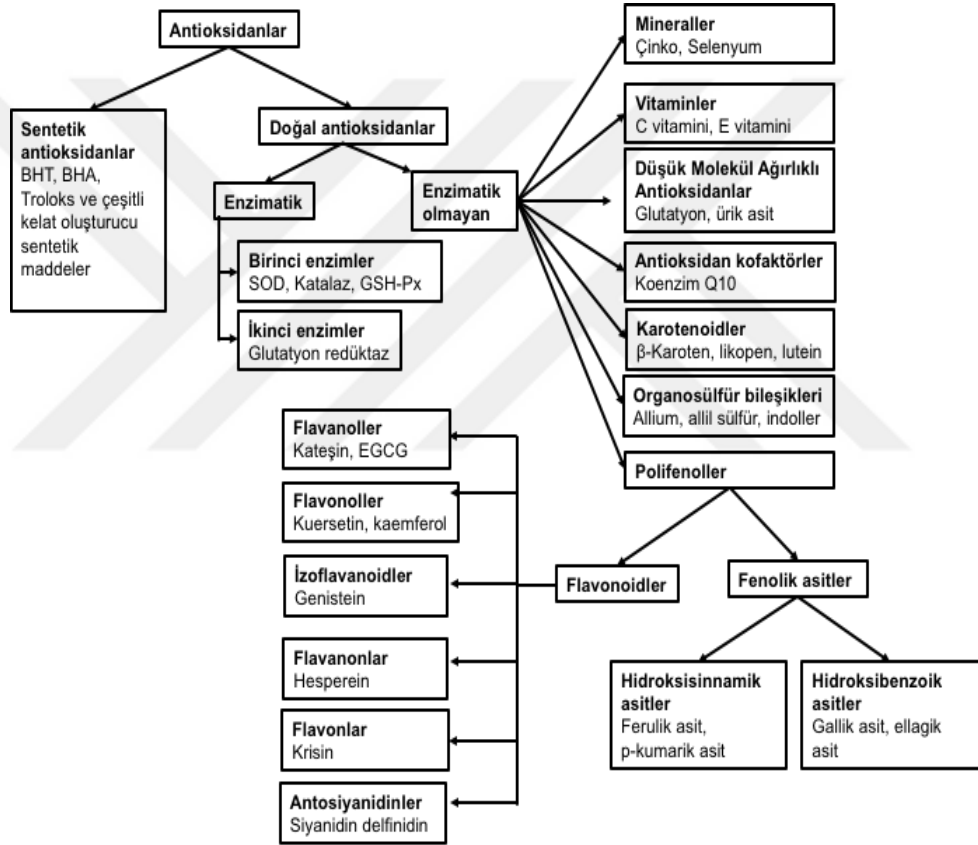
2.2.1.1. Sentetik Antioksidanlar

Birçok araştırmacı antioksidan aktivitesi yüksek ve organizmaya zararı olmayan sentetik bileşikler üzerinde araştırmalar yapmış olup 1940’lı yıllardan beri yüzlerce yapay antioksidan madde sentezlemiştir. Bunların ancak sınırlı bir kısmı günümüzde kullanılmaktadır (Eken, 2007). Sentetik antioksidan sınıfına giren bütil hidroksi anisol (BHA); bütil hidroksi toluen (BHT); propil gallat (PG); ve ter-bütil hidrokinon (TBHQ) vb. antioksidanlar en yaygın kullanılanlardır. Fakat BHA ve BHT’nin oksidatif özellikleri ve/veya metabolitleri kanser ve tümör oluşumuna katkıda bulunabilir. Araştırma sonuçları incelendiğinde, bu maddelerin yüksek dozda alınmasının akciğer, karaciğer ve böbreklere zarar verebileceği ortaya koyulmuştur. Bu tehlikelere rağmen, BHA ve BHT maddeleri gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yağ ve yağ içeriği yüksek olan yiyeceklerin stabilizasyonu için BHT, BHA, propil gallat ve sitrik asit gibi diğer antioksidanlarla birlikte kullanılırlar. (Shalaby ve Shanab, 2013).

2.2.1.2. Doğal Antioksidanlar

Son yıllarda doğal antioksidanların güvenilirlikleri ve yan etkilerinin olmaması gibi nedenlerle sentetik antioksidanlara kıyasla daha avantajlı olduğu belirtilmiştir (Pellegrini ve

diğ. 2009). Doğal antioksidanlar özelliklerine göre enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar olarak sınıflandırılır. Enzimatik olanlara süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidazlar (GPX), tiyoredoksinler (TRX) ve peroksiredoksinler (PRX) örnek olarak verilebilir. Enzimatik olmayanlar arasında ise glutatyon, alfa-lipoik asit, koenzim Q, ferritin, ürik asit, bilirubin, l-karnitin ve melatonin sayılabilir. Bununla birlikte diğer antioksidanlar, örneğin askorbik asit (Vitamin C), tokoferol, β -karoten, lipoik asit, ürik asit, glutatyon ve polifenol metabolitleri diyet kaynaklı olarak alınabilir (Shalaby ve Shanab, 2013).



Şekil 2.2: Antioksidanların sınıflandırılması.

2.2.2. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini için Kullanılan Yöntemler

Biyolojik sistemlerde farklı antioksidan kaynakları bulunmaktadır: (1) enzimler, örneğin süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz; (2) büyük moleküller (albümin, serüloplazın, proteinler, ferritin vb.); (3) küçük moleküller; askorbik asit, glutatyon, ürik asit, tokoferol, karotenoidler, (poli) fenoller vb. (4) bazı hormonlar – östrojen, anjiyotensin, melatonin. Bu çeşitlilik nedeniyle laboratuvar ortamında gerçekleştirilen toplam antioksidan

kapasite ölçümünün sonuçlarının tam olarak gerçeği yansıtmayı yansıtmayacağı zaman zaman tartışılmaktadır.

Ayrıca serbest radikal veya radikalik olmayan birçok oksidan kaynağı bulunmaktadır. Bu oksidanların ve bunlarla reaksiyona giren antioksidanların fiziksel ve kimyasal özellikleri çok farklıdır. Bazı durumlarda ise antioksidanlar reaksiyonun gerçekleştiği sisteme göre farklı mekanizmalar gösterebilmektedir. Bu faktörlere bağlı olarak antioksidanların farklı radikal ve oksidan kaynaklara karşı cevapları değişebilir. Örneğin karotenoidler, fenolik bileşikler ve diğer antioksidanlara kıyasla peroksil radikallerini süpürmede çok etkin değilken, singlet oksijeni yakalamada daha etkilidirler.

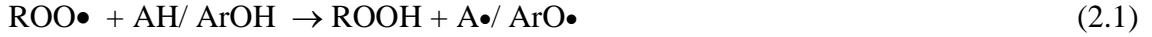
Toplam antioksidan kapasite tayini için kullanılan yöntemlerin aşağıdaki ideal koşulları karşılaması gerekir: (1) belli bir kimyasal reaksiyona dayanması; (2) biyolojik açıdan uygun bir radikal kaynağı kullanılması; (3) basit olması; (4) son noktası ve kimyasal mekanizması belirli bir yöntem olması; (5) ölçüm yapılacak cihazın kolayca bulunması; (6) gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğinin yüksek olması; (7) hidrofilik ve lipofilik antioksidanların tayinine ve hedef alınan serbest radikallere göre adapte edilebilmesi ve (8) rutin kalite kontrol analizleri için "yüksek verim" ile uygulanabilmesi. Bir yöntemin validasyonunda dikkate alınması gereken özellikler ise aşağıdaki gibi sıralanabilir: (a) analitik cevap aralığının genişliği, (b) geri kazanım, (c) tekrarlanabilirlik, (d) yeniden üretilebilirlik ve (e) girişim yapan maddelerin tanımlanması.

Serbest radikalleri uzaklaştırma ve giderme yeteneğinden dolayı antioksidan bileşiklerinin toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi konusu son yıllarda dünya literatüründe önemli bir yer tutmaktadır ve bu amaçla çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Antioksidan bileşiklerin özellikleri, reaksiyon karakteristikleri ve mekanizmalarının farklı oluşu nedeniyle tek bir analizin, karmaşık bir sistemdeki tüm radikal kaynakları veya tüm antioksidanları doğru bir şekilde yansıtması çok zordur bu nedenle antioksidan kapasite tayini için uygun analiz yönteminin seçimi kritik bir öneme sahiptir (Huang ve diğ. 2005).

Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılan yöntemler antioksidanların oksidanlarla olan reaksiyonlarına bağlı olarak elektron transferine ve hidrojen atomu transferine dayalı olmak üzere iki grup altında incelenebilir (Prior ve diğ. 2005).

2.2.2.1. Hidrojen Atomu Transferine (HAT) Dayalı Yöntemler

Bu yöntemler, antioksidanın serbest radikallere hidrojen vermesini temel alarak antioksidanın radikali söndürme potansiyelini ölçer. Örneğin, fenolün (Ar-OH) hidrojen atomunu (H) serbest radikale (ROO•) verme mekanizması aşağıdaki reaksiyonla gösterilebilir:



Yukarıda gösterilen antioksidan (fenol) ve peroksil radikalleri arasında gerçekleşen reaksiyonda oluşan ariloksi radikali (ArO•) rezonans ile dengelenir. AH ve ArOH türleri sırasıyla korunmuş biyomolekülleri ve fenolik antioksidanları temsil etmektedir. Güçlü antioksidan olan fenollerin biyomoleküllerden daha yüksek hızla serbest radikallerle reaksiyona girmesi beklenmektedir. HAT esaslı yöntemlerde hem floresans prob hem de antioksidanlar ROO• radikaliyle reaksiyona girebilir ve antioksidanın koruyucu etkisinin hesaplanması, antioksidanların varlığında ve yokluğunda kullanılan probun floresans bozunma eğrisinin altındaki integre edilmiş net alandan kinetik farklılıklarının belirlenmesiyle yapılır. HAT esaslı yöntemler arasında oksijen radikali absorblama kapasitesi (ORAC), floresans prob olarak R-fikoeitini kullanan toplam radikal absorpsiyon potansiyeli (TRAP) yöntemi, 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorür radikal üretici olarak kullanılan krosin ağartma ve β – karoten yöntemleri sayılabilir.

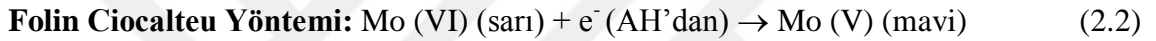
2.2.2.2. Elektron Transferine (ET) Dayanan Yöntemler

ET esaslı analiz yöntemlerinde antioksidanlar reaktif türleri süpürürken aynı zamanda indirgen özellik gösterirler. Bu yöntemlerde prob olarak kullanılan reaktif türler antioksidanlar tarafından indirgendiklerinde renk ya da fluoresans özelliklerinde değişiklik oluşur. ET esaslı yöntemlerin tümünde reaktif türler kullanılmamaktadır. Örneğin bakır(II) ya da demir(III) iyonlarının indirgenme yeteneğinden de toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesinde yararlanılmaktadır (Apak ve diğ. 2016) ET esaslı spektrofotometrik analiz yöntemleri, antioksidan maddenin indirgendiğinde farklı renk gösteren bir oksidan maddeyi indirgeme kapasitesinin ölçülmesine dayanır. Probunun renk değişim derecesi örnekteki antioksidan konsantrasyonu ile bağlantılıdır.

Elektron transferine dayanan toplam antioksidan kapasite tayini için kullanılan yöntemler probunun rengini gidermesi veya arttırmasına göre iki grupta sınıflandırılabilir: (a) 2,2' – azinobis – (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümü ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ölçüm yöntemlerini de kapsayan

başlangıç renginin açıldığı yöntemler; (b) toplam fenolik madde analizi için yapılan Folin yöntemi, Demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü, ferrisiyanür yöntemi ve bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi gibi reaksiyon sonucunda renk yoğunluğunun arttığı yöntemler. İlk grupta genellikle radikalik bir prob kullanılır ve reaksiyon ortamında bulunan antioksidanlar tarafından radikalın süpürülmesiyle başlangıçta mevcut olan renkte azalma meydana gelir. Bu azalmanın ölçüsü antioksidanın konsantrasyonu ile orantılıdır. İkinci grupta ise reaktifin antioksidan ile belirli koşullarda reaksiyona girmesi sonucunda oluşan ürünün renk şiddetindeki artma antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır.

ET esaslı TAC ölçümlerine aşağıdaki yöntem ve bu yöntemlere ait reaksiyonlar örnek verilebilir:

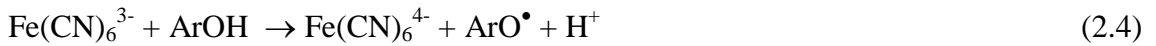


Denklem 2.2'de gösterilen $3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 13\text{W}\text{O}_3 - 5\text{Mo}\text{O}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$ (heteropoli anyonu: $\text{P}_2\text{Mo}_5\text{W}_{13}\text{O}_{62}^{6-}$) formüllü molibdo fosfotungstik heteropoliasit yükseltgen belirteçidir ve Mo(V) aktif merkezili olan son ürünün maksimum dalgaboyu 765 nm'dir.

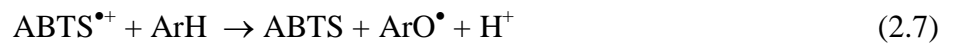
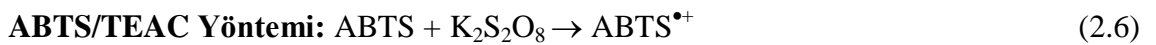


Denklem 2.3'de 2,4,6 – tripiridil – s – triazin ligandı TPTZ olarak gösterilmiştir ve oluşan ürün için $\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$ olmaktadır.

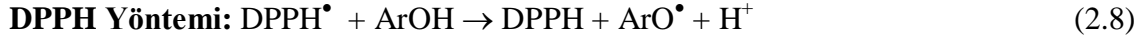
Ferrisiyanür/Prusya Mavisı Yöntemi:



Reaksiyon denklemi 2.5'te üretilen $\text{KFe[Fe(CN)}_6]$ bileşik prusya mavisidir ve bunun için $\lambda_{\text{max}} = 700 \text{ nm}$ 'dir.



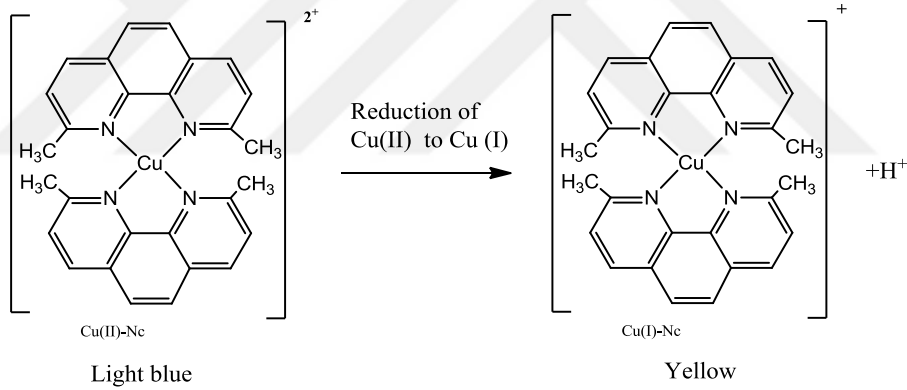
Denklem 2.6 ve 2.7’de ABTS /TEAC yöntemlerinde kullanılan kimyasal bileşik ABTS olarak kısaltılan 2,2’ – azinobis – 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asidi olup, $ABTS^{\bullet+}$ için $\lambda_{max} = 734$ nm’dir.



Denklem 2.8’deki $DPPH^{\bullet}$ (2,2 – di(4-tert-oktilfenil)-1-pikrilhidrazil) kararlı bir radikaldir ve $\lambda_{max} = 515$ nm’dir (Apak ve diğ. 2013).

CUPRAC YÖNTEMİ

CUPRAC yöntemi ilk olarak Apak ve arkadaşları tarafından İstanbul Üniversitesi Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarı’nda geliştirilmiştir. Bu yöntem temel olarak antioksidan vb indirgen maddelerin CUPRAC reaktifi olan bis (neokuproin) – bakır (II) klorürü indirgemesi ile oluşan sarı renkli CUPRAC kromoforunun (Cu(I) – neokuproin kelatı) absorpsiyonunun 450 nm’de okunmasına dayanır.



Şekil 2.3:CUPRAC reaksiyonu ve kromoforu: Bis(neokuproin) bakır (I) kelat katyonu.

Toplam antioksidan kapasite tayini için kullanılan diğer yöntemlere göre, CUPRAC yönteminin avantajları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- CUPRAC reaktifi tiyol grubu içeren antioksidanları yükseltgemedi yeteri kadar hızlı iken, FRAP yöntemi tiyol grubu taşıyan bitki ve hayvan hücresinde bulunan düşük molekül ağırlıklı tiyol bileşiği olan glutatyon gibi önemli bir antioksidanı ölçememektedir.
- CUPRAC reaktifi fenantrolin veya tripiridiltriazin ligandları varlığında Fe(II)-Fe(III) çiftinin redoks potansiyelinden daha düşük potansiyele sahip olduğu için seçicidir. Cu (II,I) – Nc redoks çiftinin standart potansiyeli 0.60 V olup hem $ABTS^{\bullet+}/ABTS$ ($E^{\circ} =$

0.68 V) hem de FRAP ($E^{\circ} = 0.70$ V) redoks çiftinin standart potansiyeline yakındır. O yüzden indirgen maddeler, örneğin sitrik asit ve şekerler CUPRAC reaktifiyle yükseltgenmez.

- Bahsedilen yöntemin reaktifi ABTS, DPPH vb. diğer kromojenik radikal reaktiflere göre daha kararlı ve kolay ulaşılabilir.
- Bu yöntem kolay, toplamsal, hızlı, maliyeti düşük olduğu için standart kolorimetre kullanan tüm laboratuarlarda kolaylıkla uygulanabilir. CUPRAC yöntemi hem hidrofilik hem de lipofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesinin tayini için kullanılabilir.
- CUPRAC reaksiyonu sonucunda oluşan renkli Cu(I) – Nc kelatı DPPH benzeri radikalik reaktifleri etkileyen hava, güneş ışığı, nem ve pH gibi çeşitli parametrelere duyarlıdır.
- CUPRAC reaksiyonu fizyolojik pH'a yakın ortamlarda gerçekleşebilmekte iken, FRAP yöntemi asidik (pH = 3,6) ve Folin yöntemi bazik (pH = 10) ortamlarda gerçekleşmektedir. Ortam fizyolojik pH'dan asidikse antioksidanlar protonlanacağından toplam antioksidan kapasite eksik, ortam bazik oldukça fenollerin protonlarını vermiş olmasına bağlı olarak toplam antioksidan kapasite olduğundan fazla bulunabilir.
- CUPRAC reaktifinin, katyon – değiştirici membran yüzeylerine tutturulmasıyla ucuz ve lineer –cevaplı antioksidan sensörler geliştirilebilir (Özyürek ve diğ. 2011).

2.2.2.3. HAT ve ET Esaslı Yöntemler Arasındaki Farklılıklar

Antioksidanlar serbest radikalleri HAT ve ET olmak üzere iki mekanizma ile etkisizleştirmektedir. Bu mekanizmaların son noktası mekanizmaya bağlı olmayıp, yan reaksiyonlar, kinetik ve potansiyeye göre değişebilmektedir. Antioksidanların etkisi ve bunların serbest radikali etkisiz hale getirme mekanizmaları bağ ayrışma enerjisi (BAE) ve iyonlaşma potansiyeline (IP) bağlıdır.

HAT esaslı yöntemlerin reaktivitesi genellikle, $\Delta BAE \sim -10$ kkal/mol ve $\Delta IP < -36$ kkal/mol özellik gösteren antioksidanların hidrojen atom veren grubuna ait BAE ile belirlenir. Tipik olarak, HAT ile ilgili reaksiyonlar birkaç saniye veya dakika içinde gerçekleşip nispeten daha hızlıdır. Ayrıca çözücü ve pH'dan bağımsızdır. Metal vb. indirgeyici maddelerin varlığı

antioksidan aktiviteyi hatalı olarak yüksek gösterdiğinden HAT bazlı analizlere engel olmaktadır. ET bazlı analizler antioksidanların bir elektronunun transferiyle metal, karbonil, radikal vb. maddeleri indirgeyebilme potansiyelini ölçmektedir.

ET ve HAT mekanizması antioksidanın yapısı ve ortamın pH'sına bağlı olarak belirlenen dengeyle çoğu örneklerde genellikle aynı anda meydana gelir. ET esaslı antioksidan kapasite tayin yöntemleri reaktif fonksiyonel grubun IP ve proton vermesine dayanmakta olup ET yöntemleri ortamın pH'sından etkilenir. Genel olarak ortamın pH'sı arttıkça IP değeri azalır proton kaybetme ve elektron verme kapasitesi de yükselmektedir. Bu yüzden, ET'ye dayalı mekanizma, ΔIP değeri -45 kkal/mol'dan fazla antioksidanlar için gerçekleşir.

ET ile gerçekleşen oksidasyon reaksiyonları genellikle yavaş olup tamamlanması uzun zaman gerektirebilir, bu nedenle antioksidan kapasitesi kinetiğe bağlı olmaksızın, ürün yüzdesindeki azalmayla ilişkilidir. Bununla birlikte, ET'ye dayalı analizlere eser bileşikler ve kirletici maddeler (özellikle metaller) karıştığında analiz sonucu değişkenlik gösterebilir, bu da tutarlılıkta ve tekrarlanabilirlikte azalmaya yol açabilir (Prior ve diğ. 2005).

2.3. SERBEST RADİKALLERİN HEDEFİ OLAN BİYOMOLEKÜLLER

2.3.1. Karbonhidratlar

Serbest radikaller karbonhidratlar ile etkileştiğinde karbon atomlarının birinden bir hidrojen atomu çıkararak protein, hiyalüronik asit gibi önemli moleküllerde zincir kırılmalarına yol açabilen karbon merkezli radikal üretirler.

2.3.2. Lipitler

Lipitler serbest radikal hasarına karşı son derece hassas olup, serbest radikaller ile etkileştiklerinde oldukça zararlı olan lipit peroksidasyonuna yol açarlar. Peroksidasyon sonrası hücre membranının akışkanlığı ve geçirgenliği bozularak hücre membranı hasar görür. Lipit peroksidasyonu metilen grubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla birlikte karbon atomu üzerinde eşlenmemiş bir elektron oluşur karbon radikali üretilir ki moleküllerin yeniden düzenlenmesiyle konjuge diene dönüşerek kararlı hale gelir. Karbon radikali, konjuge dien ile kararlı hale geldikten sonra oksijen molekülü ile reaksiyona girip lipit peroksil radikalini ($LOO\bullet$) oluşturur. Meydana gelen peroksil radikalleri diğer lipit moleküllerinden

hidrojen atomlarını ayırarak reaksiyona girer. Bu şekilde lipit hidroperoksitler (LOOH) yeniden üretilip lipit peroksitlerde artış görülür (Karabulut ve Gülay, 2016).

2.3.3. DNA

Vücutta genetik değişikliklere neden olan eylemler olarak tanımlanabilen mutajenik etkiler; DNA'nın yapısal değişimi, sitoplazma ve çekirdekte gerçekleşen sinyal iletimi, hücrelerin çoğalması, ölümü gibi olaylardan sorumlu gen ve proteinlerin aktivitelerinde değişiklikler olarak özetlenebilir. DNA hasarına yol açan kimyasal olayların başında oksidasyon, deprimasyon, metilasyon ve deaminasyon gelir. DNA hasarında çeşitli ROS'nin etkisi laboratuvar koşullarında oldukça iyi karakterize edilmiş olmasına rağmen henüz karakterize edilmemiş pek çok ROS ve RNS bulunmaktadır. ROS saldırısının en sık rastlanan etkisi guaninin, 8-hidroksiguanine (8-OHG) dönüşümüdür. RO(N)S aynı zamanda pek çok hastalık ve yaşlanma üzerine etkin olan mitokondrial DNA hasarına da yol açmaktadır. Tam olarak kanıtlanmamış olmakla birlikte mitokondri hücrelerarası ROS'nin en önemli kaynağı olarak bilinir. Mitokondriyal elektron transfer zinciri vücutta ROS oluşumuna neden olmaktadır ve mitokondriyal DNA hasarının da bundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Mitokondride oluşan DNA hasarı Alzheimer başta olmak üzere çeşitli nörodejanetarif hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. İnsan vücudunda DNA hasarı bir seri enzim tarafından onarılmaya çalışılmaktadır ancak yapılan çalışmalar bu enzimlerin modifiye bazıları tamamen uzaklaştırmada başarılı olamadıklarına işaret etmektedir. Bununla bağlantılı olarak hepatit, romatoid artrit gibi bir dizi kronik iltihaplı hastalık ile mitokondriyal DNA hasarı arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir. Ayrıca akciğer, kolon, böbrek, göğüs, mesane kanserleri ve çift taraflı prostatik hiperplazi vakalarında tümörlerden biyopsi ile alınıp izole edilen DNA larda baz hasarına rastlanmıştır (Wiseman ve Halliwell, 1996). Vücutta DNA hasarına yol açan RO(N)S bileşikleri yalnızca doğal yollarla oluşmaz. Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda Fenton tipi reaktifler, X-ışınları, sigara dumanı, asbest başta olmak üzere değişik kaynaklardan türeyen oksijen radikalleri, singlet oksijen, peroksinitrit ve süperoksit gibi pek çok bileşiğin çeşitli mekanizmalar üzerinden DNA'dan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHG) oluşumuna neden olduğu saptanmıştır (Hiroshi, 1997).

2.3.4. Proteinler

Proteinlerin oksidatif hasarının aşağıda bahsedilen faktörlere bağlı olduğu görülmüştür (Davies, 2012):

1. Hedef moleküllerin konsantrasyonu

2. Hedef moleküllerin oksidan ile reaksiyon hızı
3. Oksidana karşı hedef moleküllerin bulunduğu yer
4. Zarar verici ikincil olayların meydana gelmesi
5. Transfer reaksiyonlarının mevcut olması
6. Süpürme ve onarım reaksiyonlarının olasılığı.

Proteinler çoğu biyolojik sistemin temel bileşenlerindedir. Örneğin, plazmada proteinler $\sim 70 \text{ g dm}^{-3}$ konsantrasyonunda bulunurken diğer tüm bileşenler $<5 \text{ g dm}^{-3}$ konsantrasyonunda bulunur. Karaciğer dokusunda protein yağ ağırlığı $\sim 140 \text{ g kg}^{-1}$, lipit miktarı $\sim 50 \text{ g kg}^{-1}$ ve diğer tüm bileşenlerin miktarı 5 g dm^{-3} 'den az olarak görülmüştür. Dolayısıyla çoğu biyolojik sistemde oksidanların hedefleri arasında proteinlerin başta geldiği görülmüştür. Proteinlerin yapısı genel olarak %50–55 karbon, %6–7,3 hidrojen, %19–24 azot ve %0–4 kükürtden oluşmaktadır. Bununla birlikte proteinler fosfor, demir, bakır, iyot, magnezyum ve çinko gibi mikroelementleri de içermektedir (Davies, 2005).

Proteinlerin ROS aracılığıyla oksidasyonu sonucunda histidin kalıntısı 2-oksohistidine; triptofan kalıntısı kinürene veya N-formilkinürene, tirozin kalıntısı dihidroksi türevlerine, triptofan kalıntısı 2-,4-,5-,6- ve 7-Hidroksitriptofan nitrotriptofan, kinüren, formil ve hidroksi kinürene; tirozin kalıntısı dihidroksi kalıntılara ve 3,4-Dihidroksifenilalanin, 3-klorotirozin, L-3,4-dihidroksifenil alanin (DOPA) ya; lösin ve valin kalıntıları metiyonin sülfoksit veya metiyonin sülfon türevlere dönüştürülmüş olur. Bunlar arasında DOPA, 3-Klorotirozin, 3,5-Diklorotirozin, 3-Nitrotirozin, 3,5-Dinitrotirozin, di-tirozin, o- ve m- Tirozin, 2,4,5,6 veya 7-hidroksitriptofanlar, 5-hidroksilösin, 3-Hidroksivalin, 3-hidroksilizin, 5-hidroksi-2-aminovaleik asit ve metiyonin sülfoksit gibi bileşikler protein oksidasyonunun derecesini belirlemede duyarlı belirteçlerdir (Davies ve diğ. 1999).

Ayrıca karbonil grupları çeşitli oksidatif işlemlerden kaynaklandığından karbonil türevlerinin ölçümü proteinlerin oksidatif hasarının genelleştirilmiş veya bütünlük bir değerlendirilmesini sağlamaktadır. Bu nedenle, karbonil türevlerinin mutlak değeri, genellikle herhangi bir tek ürünün ölçülmesinden çok daha fazla bulunur. Sağlıklı ve genç canlı organlarda karbonil değeri ortalama olarak 2 nmol mg^{-1} protein ($\sim 0.10 \text{ mol karbonil mol}^{-1}$ protein) olup, her on protein molekülünden biri karbonil grubu taşır. Aksine oksidasyonun diğer ürünlerinin ise çok düşük seviyelerde olduğu görülmüştür. Yüksek karbonil türevi düzeyleri yaşla ilişkili hastalıklar ve çoğu hastalığın ilerlemesi ile bağlantılıdır. Alzheimer,

Parkinson, diyabet, romatoid artrit, musküler distrofi, kataraktogenez, renal tümörlerin indüksiyonu, bronkopulmoner displazi, amiloidoz, kronik etanol alınması, akut karbon tetraklorür toksisitesi vb. çeşitli oksidatif hasardan kaynaklı hastalıkların protein karbonil içeriği düzeylerindeki artış ile karakterize edildiği belirlenmiştir. Bu hastalıkların bazıları birden fazla oksidatif modifikasyonla meydana gelir. Örneğin Alzheimer hastalığının protein karbonil türevleri, ileri glikasyon son ürünleri, hidroksinonenal (HNE) katkısı, nitratlanmış tirozin türevleri ve redoks aktif demir içeriği düzeylerinde artış ile bağlı olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, kataraktogenez hastalığı, protein karbonil gruplarıyla metionin sülfoksitlerin konsantrasyonunun artışı ile, Parkinson hastalığı ise hem protein karbonil türevlerinin hem de hidroksinonenal katkısının artışıyla ilişkilidir (Stadman ve Levine, 2000).

2.3.4.1. Proteinlerin Karbonillenmesi

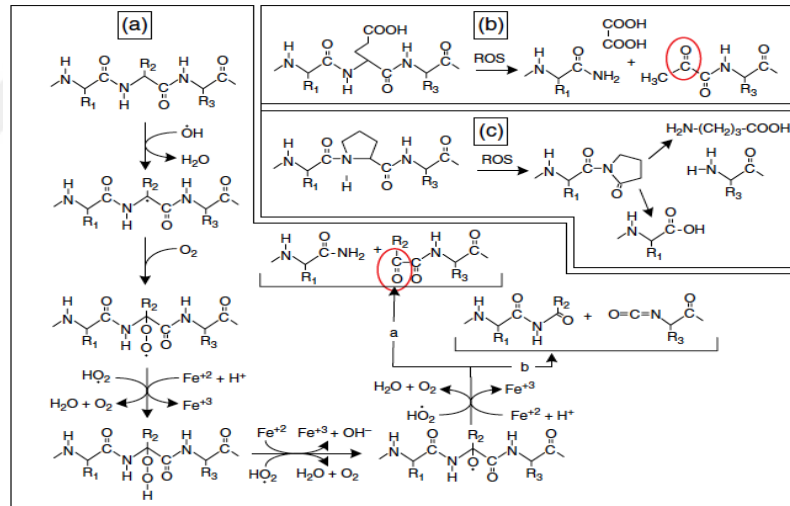
Peroksit, azot oksit vb. oksitleyici maddeler ve serbest radikaller oluşur oluşmaz proteinlere zarar vererek oksidatif hasara neden olurlar. Bununla birlikte aerobik metabolizma, örneğin lipit peroksidasyonu, metal katalizli oksidasyon sistemleri, enzimler, radyasyon, iltihap oluşumu, glikolizasyon reaksiyonları da proteinin oksidatif hasarına sebep olur. Canlı organizmalarda proteinlerin oksidasyonu sonucu polipeptit omurganın yarılması, amino asit yan zincirlerinin oksitlenmesi, lipit oksidasyonundan meydana gelen karbonil içeren metabolitlerin proteine nükleofilik olarak eklenmesi ve glikasyon oksidasyonu ile proteinlerin karbonil türevlerine dönüşmesi olayları gerçekleşir.

Polipeptit omurganın yarılması: Proteinlerin polipeptit omurgası serbest radikallere maruz kaldığında amino asidin α - karbonu ROS ile reaksiyona girer ve alkoksil radikali oluşur. Meydana gelen alkoksil radikali (a) çapraz bağlanma veya (b) bağ parçalanması ile yarılr (Şekil 2.4). Alkoksil radikali çapraz bağlanma yoluyla yarıldığı takdirde proteinler radikallerin reaksiyonu başlattığı bölgedeki N-terminal uç tarafında karbonil türevlerine dönüştürülür. Proteinin N-terminal kısmından gelen polipeptit fragmanları C – terminal amidi taşıırken, proteinin C-terminal kısmı, fragmanın N – ucunda N- α -ketoasil grubu taşır (a). Proteinlerin polipeptid omurgası oluşturacak şekilde α -karbonu içeren C-terminalindeki bağ parçalanır (b). Sonuç olarak, proteinin N-terminal kısmında ortaya çıkan polipeptit fragmanının C-ucunda bir diamid oluşturulurken, proteinin C-terminalin N-ucunda bir izosiyanat grubu oluşur. Yapılan araştırmalarda, bahsedilen birinci mekanizmanın (a) aksine,

ikinci mekanizmanın enerji bilançosuna göre gerçekleşme olasılığının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

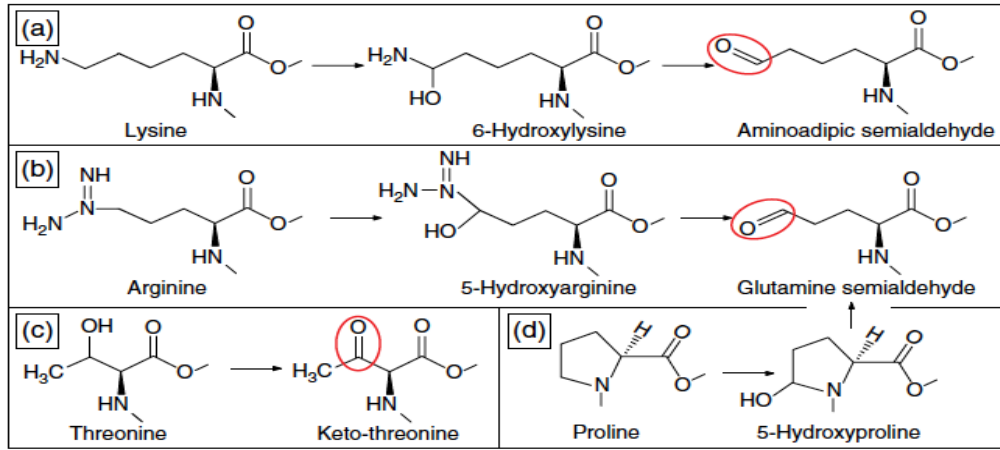
Şekil 2.4'ün (b) kısmında proteindeki glutamil amino asit kalıntıları serbest radikaller ile okside edildiğinde karboksil grubuna komşu yan zincirde kırılma gerçekleştiğinden proteinin primer yapısının bozulduğu gösterilmiştir. Bu durumda α -karbonu üzerinden protein parçalanma eğilimi göstermemektedir. Reaksiyon sonucunda oksalik asit, proteindeki N-terminalinin C ucunda oluşan amid bileşiği ve $\text{CH}_2=\text{CO}-$ grubundan düzenlenen $\text{CH}_3-(\text{C}=\text{O})-(\text{C}=\text{O})-$ bileşikleri ortaya çıkar (Şekil 2.4.B). Bahsedilen bu mekanizma proteindeki aspartil amino asit kalıntılarında da gerçekleşir.

Polipeptid omurgası prolil tarafından kırıldığı zaman protein başka bir şekilde bölünür. Bu halde, prolil kalıntısında bulunan α -karbonunun C-terminal kısmındaki serbest radikal saldırısı ve kırılma ötesinde, proteinin N-terminalindeki son grup olan 2-pirolidonun hidrolizinden üretilen γ -aminobutirik asitler meydana gelir (Şekil 2.4.C).



Şekil 2.4: Serbest radikal ile polipeptid omurganın yarılması. (a) çapraz bağlanma veya bağ parçalanması ile karbonil oluşumu; (b) yan zincirlerdeki amino asidin oksidasyonu ile karbonil oluşumu; (c) prolil kalıntısında polipeptid omurgasının kırılması ile karbonil oluşumu.

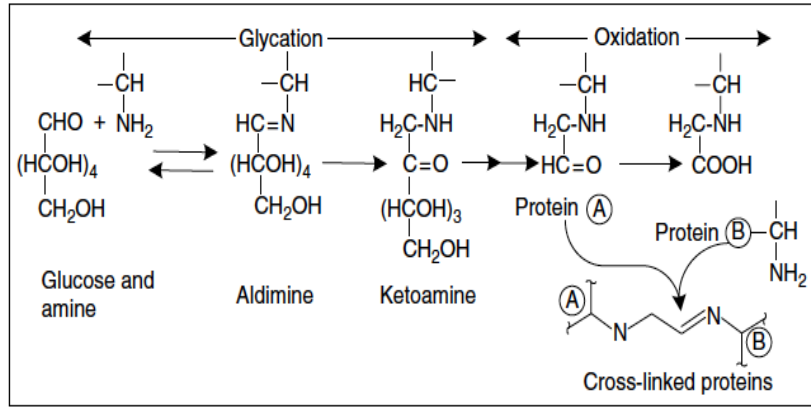
Amino asit yan zincirinin oksitlenmesi: Amino asitlerin yan zinciri çeşitli reaksiyonlar üzerinden oksitlenir. Prolin, arginin ve lizin oksidasyonu yan zincirde azota komşu karbon atomunda gerçekleştiğinde C-N bağı parçalanması aldehit oluşumuyla başlatılır. Treonin oksidasyonu ise yan zincirde, C-C bağının bölünmesiyle gerçekleşen mekanizma ile meydana gelir.



Şekil 2.5: Amino asit yan zincirinin oksitlenmesi (a) Lizin, (b) arjinin ve (c) prolin oksidasyonu gösterilmektedir.

Karbonil içeren grubun Michael katılması: Protein oksidasyonunun belirteci olan karbonil bileşikleri proteinin doğrudan oksidasyona ek olarak *in vivo* türevlendirme ile de meydana gelebilir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) lipid peroksidasyonundan oluşan akrolein, maloandialdehid, 4-hidroksi-2-nonenal, 4-okso-2-nonenal vb. aldehit içeren türevlerinin üretimiyle zincir kırılmasına neden olur. PUFA'dan en yaygın araştırılan aldehit bileşikler ise 4-hidroksi-2-nonenal ve 4-okso-2-nonenal'dır. 4-HNE bileşiği proteinlere Michael katılması veya Schiff bazı oluşumuyla eklenir. Genellikle lizin, sistein, histidin üzerinde oluşan Michael katılımına kıyasla Schiff bazı katılımı kolayca tersinir (çift yönlü) çalışır. HNE apomiyoglobine baskın olarak lizin kalıntılarına eklenirken insan serum albümini ile sistein, histidin ve lizin kalıntılarına HNE bileşiğin eklenmesi incelenmiştir.

Glikat proteinlerinin oksidasyonu: Hiperglisemi süresince glikoz izlenmesi günlük insülin tedavisini düzenlemek için yaygın olarak kullanılsa da günümüzde uzun vadeli ortalama kan şekeri seviyesi hemoglobin A1c'nin ölçülmesiyle elde edilmektedir. Şeker hastalığına ait kullanılan bu hemoglobin A1c'nin takip edilmesi açık zincir aldehit içeren glikoz proteinlerinin primer amin grubuyla yavaşça reaksiyona girmesine dayanmaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6:Protein glikasyon şeması.

Yukarıda bahsedildiği gibi karbonhidrat birimlerinin proteine enzimatik olmayan eklenmesi, protein sentezi süresince enzimler tarafından yönlendirilerek meydana gelen “glikolizlenme” işleminden farklılaştırmak amacıyla “glikasyon” olarak adlandırılır. Glikasyon reaksiyonundan meydana gelen Schiff bazı veya aldimin bileşikleri “amadori yeniden düzenleme reaksiyonları” ile ketoamin bileşiğini oluşturur. Bu işlemde aldiminin ketoamine dönüşüm hızı aldiminin glikoza geri dönüşüm hızı ile karşılaştırıldığında yaklaşık 60 kat yavaş olduğu izlenmiştir. Bu nedenle önemli miktarda bulunan glikoz uzun yarı-ömürlü olarak proteinlerde görünür ve bu glikat proteinleri karbonil içeren ileri glikasyon son ürünleri oluşturmak için daha da oksitlenir. Karbonil içeren ileri glikasyon son ürünlerin en önemli özelliklerin biri çapraz bağlı proteinlerin oluşumuna neden olmamasıdır. Çapraz bağlı proteinlerin oluşumu çeşitli yollarla meydana gelebilmektedir:

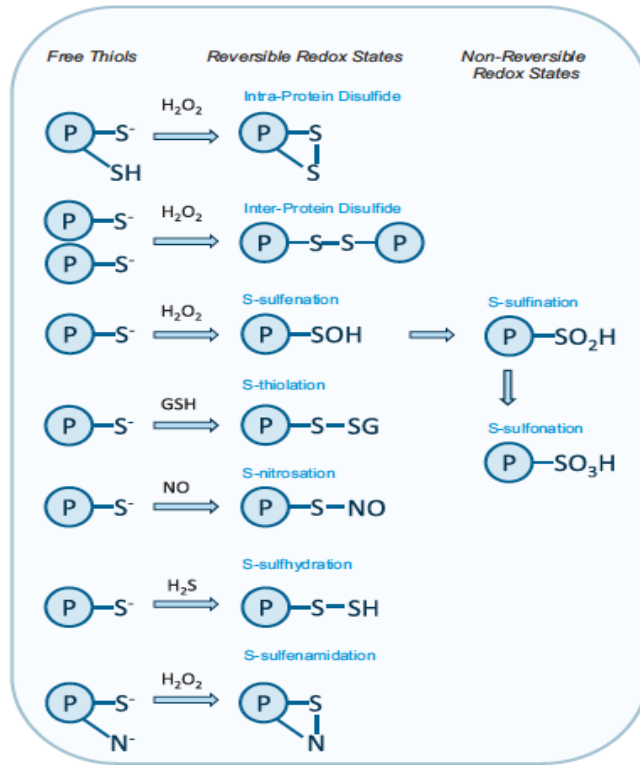
- Proteinlerin tirozin kökü ile bağlanması;
- Proteinlerin sistein kalıntılarının oksidasyonundan meydana gelen disülfür bağı ile çapraz bağlanması
- Bir proteindeki 4-HNE'nin karbonil grubunun diğer proteindeki amin kalıntısıyla reaksiyona girerek Schiff bazı oluşturması (Joaquim, 2017).

2.3.4.1. Protein Tiyollerinin Oksitlenmesi

İnsan proteomunun yaklaşık olarak %2,3'ü sistein kalıntılarında oluşur. Sisteinin yan zincirinde yer alan tiyol (-SH) grubu ROS ve RNS türevleriyle reaksiyona kolayca girerek Şekil 2.7'de gösterildiği gibi çeşitli ürünler meydana getirebilir. Protein tiyolleri seçici olarak ROS ile oksitlenip modifikasyona uğramaktadır. Bunun nedeni H₂O₂ gibi ROS'un (oksidanların) tercihen düşük bir disosiyasyon sabiti (pKa) ile deprotonlanmış (-S-), nükleofilik tiyolatlarla reaksiyona girerek oksitlendikleri tiyollere karşı seçici olmasıdır. Çoğu

sistein tiyollerinin pKa'sı 8-9'dur, ve bu yüzden fizyolojik pH'ta neredeyse tamamen protonlanmıştır. Bu da onları oksitleyicilere karşı daha az reaktif hale getirir ve bu şekilde oksidatif modifikasyona ve regülasyona karşı duyarlı değildir.

Proteinlerdeki tiyol (-SH) grupları oksidasyona yatkındır ve Şekil 2.7' de gösterildiği gibi –SH gruplarından değişik mekanizmalarla oluşan çeşitli ürünler meydana gelmektedir (Rudyk ve Eaton, 2014).



Şekil 2.7: Protein tiyol gruplarının oksidasyonu için genel şema.

2.4. PROTEİNLERİN OKSİDATİF HASARININ BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

2.4.1. Amino Asit Kalıntısının Değişikliği

2.4.1.1. HPLC Yöntemleriyle Amino Asit Analizi

Proteinlerin oksidasyonu sonucunda bazı amino asitlerin kaybolduğu belirlenmiştir. Bu değişiklikler, modifikasyona uğrayan proteinlerin kendisini oluşturan amino asitlere hidroliz edilmesiyle meydana gelen serbest amino gruplarının o-ftaldialdehit veya benzer maddelerin yardımıyla flüoresan türevlerine dönüştürülüp HPLC analizi ile araştırılmasıyla izlenebilir. O-ftaldialdehit-amino asit türevlerinin miktarı, amino asit standardına göre flüoresansı ölçülerek

belirlenir. Bu yöntem izole edilmiş veya saflaştırılmış proteinler için uygun olmakta sistein ve sistin hariç aside dayanıklı bütün amino asitlerin kantatif analizinde kullanılmaktadır. Sistein ve sistin amino asitleri bu yöntem şartlarında tamamen bozunmaları nedeniyle farklı yöntemler ile tayin edilmektedir (Heinecke ve diğ. 1999).

2.4.1.2. Sistein Köklerinin Ölçümü

Proteine bağlı sisteinin tiyol gruplarının oksidasyonu modifiye edilmiş proteinlerin spesifik olmayan ölçümlerinde yaygın olarak kullanılır. Bu oksidasyonda sistin (disülfür), karışık disülfürler (örneğin, protein glutasyon türleri), nitroso eklentileri (RS-NO) ve oksit asit (sülfenik, RSOH; sülfirik, RSO₂H ve sülfonik, RSO₃H) gibi çeşitli türler meydana gelir (Biswas ve diğ. 2006). Proteine bağlı tiyoller spektrofotometrik (DTNB; 5,5'-Ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)), florimetrik (Tiyoglo1) ve kütle spektroskopisi (MS) gibi çeşitli yöntemler ile ölçülebilir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılan DTNB (Ellman reaktifi) olup yöntemde tiyoller DTNB ile reaksiyona girdiğinde 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) meydana gelir, ve bu bileşiğin absorpsiyon değeri UV-görünür bölge spektrofotometresinde 412 nm'de okunur. Bu yöntemin belirtme sınırı 0,3 µM'dir (Hu, 1994).

2.4.1.3. Sistin Kalıntılarının Ölçümü

Proteinlerin sistin kalıntılarının belirlenmesi için proteinler kimyasal ve enzimatik yöntemler ile (örneğin siyanojen bromür veya tripsin) parçalandıktan sonra meydana gelen peptitler HPLC uygulamalarıyla ayrılıp MS veya hızlı atom bombardımanı (FAB) teknikleriyle ölçülmektedir (Zhou ve Smith, 1990).

2.4.2. Ara Ürünlerin Belirlenmesi

2.4.2.1. Radikallerin Spektrofotometrik Yöntemler ile Belirlenmesi

Radikaller doğrudan UV-görünür bölge spektrofotometrisi, rezonans Raman, elektron paramanyetik rezonans (EPR) vb. çeşitli spektroskopik yöntemler ile tayin edilebilmektedir. Günümüzde izole edilen veya kompleks sistemlerde bulunan protein radikallerinin tanımı ve bu türlerin konsantrasyonunun belirlenmesinde EPR spektroskopisi en yaygın kullanılan yöntemdir. EPR spektroskopisi kalitatif analizler için güçlü bir teknik olmasına rağmen, radikallerin yüksek reaktivitesi ve kısa ömürleri nedeniyle konsantrasyonlarının doğrudan belirlenmesi zordur (Irwin, J. A ve diğ. 1999; DeGray ve diğ. 1992).

EPR spin tuzaklama yöntemi ile radikallerin dolaylı olarak saptanmasında, araştırılan sistemdeki radikaller spin tuzağı (nitron veya nitrozo bileşikleri vb.) ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek dayanıklı ve kolayca tayin edilebilecek ürünlere dönüşürler. Nitrozo spin tuzakları yalnızca karbon merkezli radikallerin analizi için uygundur ve bu türlü tuzakların çoğu ısıl ve fotokimyasal olarak kararsızdır. Fakat nitrozo spin tuzaklarına karşın, 5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksit (DMPO) ve N-tert-bütül- α -fenilnitron (PBN) vb. nitron spin tuzakları çeşitli radikallerle (örneğin, karbon, azot, kükürt ve oksijen merkezli) reaksiyona girerek uzun ömürlü ürünler verir. Ancak nitron spin tuzağına dayalı EPR analizinde araştırılan radikallerin yapısı hakkında elde edilen bilgiler sınırlıdır. Bu yöntem genellikle peroksinitrit ve peroksitlerin oksitleyici etkisinden dolayı hem proteinlerinden oluşan radikallerin saptanmasında kullanılmıştır (Mason, 2004).

2.4.2.2. Radikal Olmayan Ara Ürünlerin Belirlenmesi

Hidroperoksitler: Oksijen kaynaklı proteinlerin oksidatif hasarından oluşan ara ürünlerden birisi de protein hidroperoksitlerdir. Protein hidroperoksitler uzun ömürlü olup reaktif olmamalarına rağmen sistem içinde metal iyonları yer aldığında bozularak, çeşitli biyomoleküllere zararlı olan başka radikallerin (alkoksil, peroksil ve karbon merkezli) oluşumuna neden olur (Davies ve diğ. 1995). Amino asit, peptit ve protein üzerinde oluşan hidroperoksitlerin tayin edilmesi Fe(II)-ksilenoloranjda (FOX) bulunan Fe(II)'nin hidroperoksitlerle oksitlenerek Fe(III)'e dönüşümüne dayanmaktadır. Burada oluşan Fe(III)-ksilenol oranj kompleks bileşiğinin absorbanı 560 nm'de okunur (Wolff, 1994).

Hidroperoksitler ayrıca iyodometrik yöntem ile de ölçülebilir. Bu yöntemde asidik ortamda hidroperoksitin iyodür iyonu ile 1:1 stokiyometrik oranda reaksiyona girmesiyle spektrofotometride 358 nm'de maksimum absorbanı veren triiyodür (I_3^-) anyonu meydana gelir. Yöntemin avantajı çeşitli biyomoleküller üzerinde oluşan hidroperoksitlerin kantitatif olarak belirlenmesidir. Fakat asitlenmiş iyodür çözeltisinin oksijene karşı gösterdiği hassasiyet nedeniyle iyodometrik analizin anaerobik ortamda gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Aksine, FOX yönteminde kullanılan demir-ksilenol kompleksi oksijene minimal hassasiyet gösterdiğinden yöntemin uygulanması daha kolaydır (Jessup, 1994).

Kloramin ve bromaminler: Amin ve amid gibi bazı azot içeren fonksiyonel grupların HOCl ve HOBr ile reaksiyonu, sırasıyla N-klorlu ve N-bromlu türlerine dönüşmeleriyle sonuçlanır.

İzole edilmiş sistem içinde bu türlerin mutlak tayini onların UV absorpsiyon bantlarına göre belirlenir. Örneğin, monokloraminler (RNHCl) ve monobromaminler (RNHBr)'ın maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyu sırasıyla 250–255 ve 288–290 nm aralığında, dikloraminler (RNCl₂) ve dibromaminler (RNBr₂) ise sırasıyla 205/300 nm ve 241/346 nm dalga boylarında genellikle iki absorpsiyon bandı göstermektedirler (Thomas ve diğ. 1995).

Sülfenik asitler: Sülfenik asitler (RSOH), sistein veya tiyol kalıntısının yükseltgenme tepkimelerinden oluşan reaktif ara ürünlerdir. Sülfenik asitler tiyoller ile kolayca reaksiyona girerek disülfürleri, sülfenik asitlerle reaksiyona girerek tiyosülfinatların, tiyosülfınattan da sülfenik (RSO₂H) veya sülfonik (RSO₃H) asitlerin oluşumuna kadar oksitlenebilir. Sülfenik asitlerin kantitatif analizi kimyasal türevlendirme ve tuzaklama yöntemleriyle yapılır. Örneğin, sülfenik asitlerin 5,5-Dimetil-1,3-sikloheksanedion (dimedon) ile verdiği reaksiyon kararlı bir bileşik olan tiyoeterin oluşması ile sonuçlanır. Analizin sonraki aşamasında, oluşan tiyoeterler peptid haritalama MS yöntemleriyle veya floresans ya da biyotinlenmiş ürünleri oluşturabilen modifiye edilmiş dimedonun katıldığı proteomik yöntemlerle kantitatif olarak tayin edilir (Allison, 1976). 7-kloro-4-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol (NBD-Cl) adlı elektrofilik reaktif hem proteine bağlı sülfenik asitler hem de tiyollerle reaksiyona girer ve oluşturulan ürünler sırasıyla UV-görünür bölgede 347 ve 720 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir. Bu yöntem hem peroksiredoksin, alkil hidroperoksit redüktaz, tirozin fosfotaz ve insan serum albümini gibi çeşitli proteinler üzerine oluşturulan sülfenik asitlerin hem de proteinlerin tiyol grubunun kaybının kantitatif analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Carballal ve diğ. 2003).

2.4.3. Son Ürünlerin Oluşumu

2.4.3.1. Spesifik Oksidasyon Ürünlerinin Belirlenmesi ve Ölçümü

Proteinlerin yan zincirinde bulunan aromatik kalıntılar kolayca yükseltgenerek ölçülebilen dayanıklı ürünler verdiği için bu türevlerin modifikasyonu proteinlerin oksidatif hasarının belirteci olarak kullanılabilir. Hidroksillenmiş ürünler çeşitli mekanizmalar ile örneğin hidroksil ve peroksil radikallerinin reaksiyonlarına bağlı olarak veya peroksidaz aracılı işlemler ile, HOCl ya da HOBr aracı ile gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda oluşabilir. Elde edilen bu ürünlerin çoğu dayanıklı olmasına rağmen, kateşol yapısına sahip olan DOPA kolaylıkla kinon formuna oksitlenip farklı radikaller oluşturularak diğer biyomoleküllere zarar

verebilmektedir (Davies, 1999). Proteinlerin oksidatif hasarının belirteci olan bu ürünlerin tayin edilmesi için GC/MS, çeşitli detektör ile kombine edilmiş HPLC ve immünolojik (Western blot/ELISA) olmak üzere üç farklı yöntem geliştirilmiştir.

GC/MS, HPLC ve LC/MS yöntemleri: Belirlenen örneklerin ölçülmesinde hem GC/MS hem de HPLC yöntemleri için izolasyon ve hidroliz işlemlerinin yapılması gerekmektedir. Çoğu protokollerde, proteine karşılık gelen amino asitlerin ve oksitlenmiş ürünlerin yüksek derecede geri kazanılması için asit hidroliz yöntemleri kullanılmıştır; bu açıdan, enzimatik yöntemler daha az nicel olarak belirlenmiştir. Bu amaçla, genel olarak triptik sindirimler kullanılmaktaysa da bazı faktörlere dikkat edilmesi gerekmektedir. GC/MS yöntemleriyle proteinlerin yapısı hakkında bilgi de elde edilebilir. Bu tür yöntemler oldukça hassas olup, HPLC yöntemine göre çoklu analizler daha hızlı yapılabilmektedir. Buna rağmen GC/MS yöntemlerinde analiz edilen bileşiklerin stabilizasyonu ve uçucu hale getirilmesi amacıyla çoklu türevlendirmeye ve izotopik olarak etiketlenmiş iç standartlara ihtiyaç duyulması nedeniyle GC/MS yöntemleri için örnek hazırlama işlemi HPLC yönteminde yapılan örnek hazırlama aşamasından daha kompleksdir. Tek amino asitler veya küçük peptitlerin oksidasyonunun belirlenmesi için hidroliz ve enzimatik parçalanma gereği olmaksızın çeşitli dedektörler ile GC/MS veya HPLC yöntemleri uygulanabilir.

İmmünolojik yöntemler: Protein oksidasyon ürünlerinin ölçümü için çeşitli duyarlılık derecesinde bazı antikorlar geliştirilmiştir; teorik olarak bu antikorlar ELISA ile oksidan kaynaklı hasarın ölçülmesine olanak sağlar. Oksitlenmiş proteinler kullanılan antikor ile karşılaştırılan standarttan daha az veya fazla derecede reaksiyona girebildiğinden immünolojik yöntemler yarı – kantitatif olup, net değerler ile sonuçlanmamaktadır. Fakat ELISA yöntemi proteinlerin oksidatif hasarının görece düzeyinin belirlenmesinde kullanılan değerli bir yöntemdir. Bu yöntem süresince birinci, ikinci ve üçüncü antikorların analiz edilen sistemdeki diğer bileşenlerle çarpışma reaksiyonuna girmemesi ve engelleyici çözeltinin tespit sistemiyle uyumsuz olmadığına kanıtlanması için her zaman kontrol deneyleri yapılmalıdır.

2.4.3.2. Protein Oksidasyonunun Genel Belirteci

Protein karbonil grubu protein oksidasyonunun en yaygın olarak kullanılan belirteçidir. Proteinlerin karbonil türevlerinin konsantrasyonu, 2,4-Dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile karbonil türevlerinin reaksiyonundan meydana gelen hidrazon bileşiğinin ölçümü ile elde edilir. Bu reaksiyondan oluşan sarı renkli hidrazon ürünlerinin absorbansı spektrofotometrede

370 nm'de okunur. Absorbans değerlerinden belirlenen molar absarplama kullanılarak karbonil gruplarının mutlak değerleri elde edilir.

DNPH ile türetilmiş protein karbonil grubunun tayini için DNPH'e karşı antikorlar kullanılarak ELISA, Western blotting vb. immünolojik yöntemler uygulanabilmektedir. Karbonil grubunun tayini için trityumlu borhidrürün radyoaktif yöntem de kullanılabilir. Fakat diyabetli hastalardan alınan örnek, proteoglikan içeren materyaller, karbonilli lipidler veya şekerler gibi bazı örneklerde yukarıda bahsedilen yöntemler ile protein karbonillerinin miktarı mutlak olarak ifade edilmez. Bununla birlikte, protein oksidasyonundan meydana gelen karbonil grubu hem proteine bağlı hem de düşük molekül ağırlıklı bileşenler şeklinde olduğundan sadece proteine bağlı karbonil türevlerini tayin eden yöntemlerin kullanılması sonucu düşük olarak ölçülebilmektedir (Hawkins ve diğ. 2009).

2.5. Tez Aşamasında Kullanılan Proteinler

2.5.1. Bovin (Sığır) Serum Albümin (BSA)

Albümin proteini 585 amino asitten oluşur ve molekül ağırlığı 66 kDa'dır. Ayrıca plazma proteinlerinin ayrımsal çözünürlük karakteristiklerine dayalı saflaştırma yönteminde albümin beşinci fraksiyonda bulunduğundan dolayı Fraksiyon V olarak da adlandırılır. Albümin yüksek çözünürlüğe sahip olup, insan plazmasında genel olarak 35–50 g L⁻¹ konsantrasyonda bulunur. Albümin insan vücudunda metal, yağ asitleri, kolesterol, safra pigmenti ve ilaçların taşınması vb. önemli fizyolojik ve farmakolojik rollere sahiptir. Ayrıca osmotik basıncın düzenlenmesini ve vücutta sıvı dağılımını sağlar. Normal koşullarda, albüminin yarı ömrü yaklaşık 20 gündür ve plazma konsantrasyonu sadece karaciğerdeki sentezi ile katabolizması arasındaki dengeye değil, aynı zamanda transkapiler sızmaya da bağlıdır. Albümin genel olarak plazmanın ana ve baskın antioksidanlarını temsil etmekte olup vücudun oksidatif stres seviyesini göstermektedir. Ayrıca serum toplam antioksidan kapasitesinin büyük bir kısmı albümine bağlıdır. Serbest radikal ile indüklenen hemoliz analizinde yapılan araştırmalarda, serumun serbest radikal yakalama aktivitesinin %70'inden fazlasının insan serum albümine bağlı olduğu görülmüştür (Bourdon ve Blache, 2001). Çoğunlukla serebrospinal, göz sıvısı ile sinoviyal ve akciğer bronkialveolar sıvısındaki albümin konsantrasyonu plazmadaki konsantrasyonuyla karşılaştırıldığında çok düşük bulunur (Cross ve diğ. 1994). Antioksidan özelliklerine sahip olduğundan, inflamasyona maruz kalan bölgelerde albümin konsantrasyonu daha yüksek bulunur (Halliwell, 1988).

2.5.2. Kazein

Süt proteinleri %80 kazeinden %20 serum proteinlerinden oluşur. Bu nedenle, kazein sütün esas proteindir. Kazeinler fosforlu bileşikler olmakla birlikte α -s1, α -s2, β ve κ -kazein olmak üzere 4 formda bulunur ve 20°C sıcaklıkta ve zayıf asidik ortamda (pH~4,6) çökerler.

Bunlar arasında, α -kazein süt proteinlerinin %44'ünü oluşturur ve diğer fraksiyonlara göre daha az prolin içermekte olup α -heliks veya β -tabakalı yapılara sahiptir ve kalsiyum gibi çift değerlikli metal iyonlarının önemli miktarını bağlamaktadır. Hidrofobik özellikli β -kazein ise amfifilik yapısından dolayı yüzey aktif madde gibi hareket etmektedir. Disülfür bağları aracılığı ile polimerize olma yeteneğine sahip tek fraksiyon olan κ -kazeinin amfifilik yapısı, protein yüzey aktivitesinin artmasına neden olmaktadır (Yılmaz ve diğ. 2007).

2.5.3. Yumurta Akı Proteini

Yumurta, din ve etnik gruptan bağımsız olarak bütün dünyada kullanılan gıdalardan biridir. Yapısal olarak yumurta, yumurta kabuğu (% 9-12), yumurta akı (%60) ve yumurta sarısı (% 30 - 33) olarak üç ana bileşenden oluşur ve %75'i su, %12'si protein, %12'si lipit ve kalan %1'i de minerallerden oluşur. Yumurtada bulunan proteinler yumurta akı ve sarısında dağılırken, lipidler esas olarak yumurtanın sarısında yoğunlaşmıştır. Yumurta akının %88'i su ve %11'si proteinlerinden ve kalan kısmı ise karbonhidrat ve eser miktarda bulunan lipitlerden oluşmaktadır. Yumurta akında bulunan ana proteinler başta ovalbümin (%54), ovotransferrin (%12), ovomukoid (%11), lizozim (%3,5) ve ovomisin (%3,5) olup avidin (% 0,05), sistatin (% 0,05), ovomakroglobulin (% 0,5), ovoflavoprotein (% 0,8), ovoglikoprotein (% 1,0) ve ovoinhibitör (% 1,5) az miktarda bulunan diğer proteinlerdir (Kovacs-Nolan ve diğ. 2005).

Ovalbümin proteini 386 amino asitten oluşur ve N-terminal ucunda asetillenmiş glisin ve C-terminal ucunda prolin içermektedir. Aynı zamanda bu protein glikoprotein olarak da adlandırılır ve N-terminaline bağlı bir karbonhidrat grubuna sahiptir. Molekül ağırlığı 45 kDa'dır.

Monomerik bir glikoprotein olan **ovotransferrin** 686 amino asitten oluşmakta olup insan serum transferrini ile aynı amino asit dizisine sahiptir ve 15 disülfür bağı içerir. Moleküler ağırlığı 76 kDa'dır. Bir ovotransferrin molekülüne iki demir molekülü bağlanır ve vücutta

demirin taşınmasında önemli bir rol oynar. Bazik ortamda ($\text{pH} > 7,0$) demir(III), ovotransferrin proteinine kolayca bağlanabilmekte iken asidik ortamda ($\text{pH} < 4,5$) oluşan bağ bozularak demir(III) serbest kalır (Ky ve Du, 2008).

Lizozim, yumurta akı proteininde bulunan diğer önemli bir bileşendir. Doğal olarak birçok lizozim türü bulunmakta olup en yüksek çözünürlüğe ve kararlılığa sahip lizozim yumurtada bulunur. Lizozimin moleküller ağırlığı 14.400 Da'dır ve 129 amino asitten oluşan bir polipeptit zincirine sahiptir. Yumurta akında bulunan kuvvetli bazik proteinlerden biridir. İçerdiği 4 disülfür bağından dolayı yüksek termal kararlılığa sahiptir ve izoelektrik noktası 10,7'dir (Huopalahti ve diğ. 2007).

Ovomusin, çözünür ve çözünmez bileşenlerden oluşup, çözünebilir bileşenlerin moleküler ağırlığı 8.300 Da ve çözünmeyen bileşenlerin ise 220 – 270 kDa dır. Karbonhidrat içeren büyük moleküler ağırlıklı proteinlerden biridir ve yumurta akının jele benzer yapısından sorumludur. Ovomusin esas olarak 2 tip alt birimden oluşur ve bunlar α ve β olarak adlandırılır; α -ovomusin homojen iken β -ovomusin heterojendir. β -ovomusin esas olarak serin ve treonin amino asitlerinden oluşurken α -ovomusin aspartik asit, glutamik asit vb. amino asitlerden oluşmaktadır (Robinson ve Monsey, 1975).

Ovomükod proteini yumurta akında bulunan en yüksek glikosile proteinlerden biridir. Ovomükoidin moleküller ağırlığı 28 kDa'dır. Bu proteinler Tripsin ile 1:1 olarak bağlandığından Tripsin inhibitörü olarak adlandırılmıştır ve yumurta akına bağlı besin alerjisinin ana kaynağıdır (Kovacs-Nolan ve diğ, 2005).

2.6. SENSÖRLER

Sensör teknolojisi, mühendislik alanının işleyişleri, güvenilirliği, işletilebilirliği ve kullanımının iyileştirilmesinde önemli rol oynayan ve hızla gelişen bir kavramdır. Kimyasal sensörler bir örnek bileşenin konsantrasyonundan toplam bileşen analizine uzanan, analitin kimyasal reaksiyonundan veya araştırılan sistemin fiziksel özelliklerinden elde edilen bilgileri analitik sinyale dönüştürebilen herhangi bir cihazdır. Kimyasal sensörlerin duyarlılığı ve seçiciliği tayin edilen sistemin faz, boyut ve zamansal özelliklerinden etkilenir. Belirlenen analitler gaz, sıvı ve katı fazda pikolitreden litreye kadar geniş aralıkta bulunabilir (Hulanicki ve diğ.1991).

Kimyasal sensörler alıcı ve dönüştürücü olmak üzere iki fonksiyonel birimden oluşmaktadır. Sensörün alıcı kısmında kimyasal bilgiler enerji şeklinde değiştirilirken dönüştürücü kısmında ölçülmektedir. Kimyasal sensörlerin alıcı kısmı fiziksel, kimyasal, biyokimyasal vb. çeşitli prensiplere dayanmaktadır:

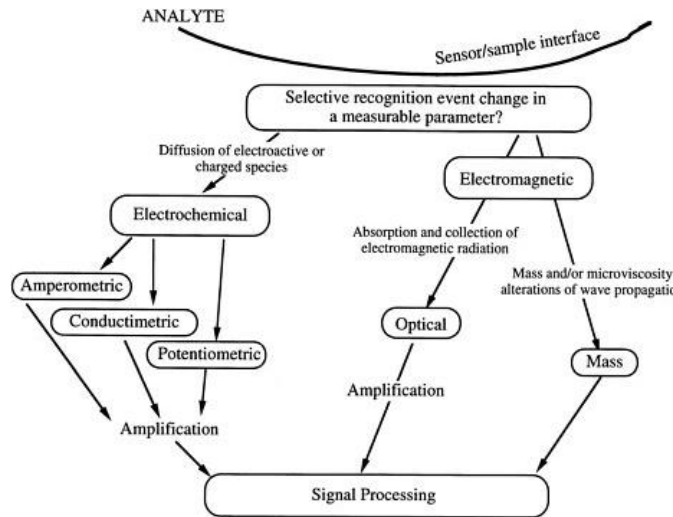
- **Fiziksel** sensörler analitin absorpsiyon, kırılma indisi, iletkenlik, sıcaklık, kütle değişimi gibi fiziksel özelliklerine dayanarak ölçüm yapmaktadır.
- **Kimyasal** sensörler analitin katıldığı kimyasal reaksiyon sonucu vermiş olduğu analitik sinyalin artışına dayanmaktadır.
- **Biyokimyasal** sensörler ise mikrobiyal potansiyometrik ya da immüno-sensörler gibi biyokimyasal işlemlerden gelen analitik sinyallere dayanmaktadır (Hulanicki ve diğ.1991).

2.6.1. Sensörlerin Sınıflandırılması

Kimyasal sensörler doğrudan okumaya olanak veren seçimli sensörler (örneğin, elektrokimyasal sensörler, optik fiberler) ve kromatografik veya elektroforetik vb. numune hazırlama ön basamağına ihtiyaç duyulan sensörler olmak üzere iki gruba ayrılabilir.

2.6.1.1. Doğrudan Okuma Yapılabilen Seçimli Sensörler

Doğrudan okuma yapılabilen seçimli sensörlerin çalışma prensibi, ölçülebilecek parametrenin değişimlerinden kaynaklanan seçici tanıma işlemlerine dayanmaktadır. Bu tür sensörlere ait dönüştürücü parametreler ve ilgili cihaz tipleri Şekil 2.8’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.8: Doğrudan okuma yapabilen seçimli sensörler.

Çoğunlukla, örnekteki analitin varlığında gerçekleşen sensör–numune ara bağlantı yanıtı analitin kimyasal reaktivitesine bağlıdır. Kimyasal reaktivite aşağıda listelenen olaylar dahil olmak üzere çeşitli kimyasal olayları içerebilir:

- Moleküler analitlerin boyut/şekil/dipolar özellikleri moleküler film, faz veya bölgeler tarafından ifade edilmektedir. Bunlar biyoreseptör merkezleri, moleküler tanıma veya konak-konuk etkileşimlerine olanak sağlayan yapılar ya da şablonlanmış boşluklu seramik veya benzer materyaller olabilir. Moleküller tanıma, analitlerin sensör materyali üzerine seçici ve güçlü olarak bağlanmasına veya absorblanmasına yol açar.
- İnce film sensöründe analitin seçici geçirgenliği: Analitin sensör üzerinde bağlanması veya geçirgenliği tersinir olduğu takdirde sensör filmi belirli ölçülerde tekrar kullanılabilir. Aksi halde, tersinmez bağlanma veya yan tepkimeler sensör materyaline zarar vererek ömrünü kısaltabilir.

2.6.1.2. Numune Ayırıcı Sensörler

Kimyasal analizde kromatografik, elektroforetik vb. ayırma sistemleri klasik olarak “kimyasal sensör” kapsamında değerlendirilmemektedir. Doğrudan okuma yapılamayan sensörler analiti kromatografik veya kapiler elektroforetik formatlar kullanarak ayırabilir. Bu takdirde, basınç altında veya elektriksel değişim altında analit karışım içerisinde ayrılıp dedektör (sensör) kısmında da algılanır.

Numune ayırıcı sensör sistemlerinin (dedektör, destekleyici eklentileri, kontrol ve ölçüm elektroniği) minyatürleşebilirliği önemli bir avantajdır. Bu tip sensörlerin minyatürleştirilmesini ve etkin kullanılmasını sağlayan dedektör sistemleri:

- Termal iletkenlik
- Elektrot, amperometrik
- Floresans (lazer kaynaklı)
- Yüze akustik dalga cihazı
- Kütle spektrometrisi
- İyonik iletkenliğe dayalı sistemleri içermektedir.

Yukarıda bahsedilen dedektörler (kütle spektrometrisi hariç) nispeten düşük maliyetleri ve iyi numune ayırma özellikleri nedeniyle günümüzde geniş kullanım alanı bulmaktadır (National Research Council, 1995).

2.6.2. Proteinlerin Algılanması için Geliştirilen Yöntemler

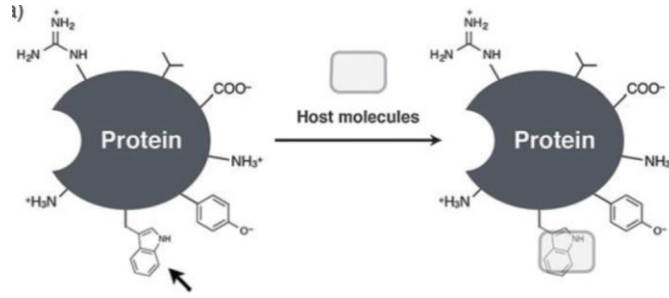
Kimyasal algılama/görüntüleme teknikleri, ilgilenilen moleküllerin miktarını ve bulunduğu yeri değerlendirme yeteneğine sahiptir. Kimyasal sensörlerin modüler yapısı genellikle iki bölümden oluşur: algılama modülü ve bağlanma/tanım modülü. Sensör sistemleri antikor ve aptamer vb. biyolojik büyük bağlayıcılar ile karşılaştırıldığında, küçük sentetik bağlayıcılar/sensörler moleküler boyutu küçük, doğal olmayan fonksiyonel gruplarla modifiye edilerek, düşük maliyetli ve biyolojik koşullara dayanıklı şekilde üretilerler. Fakat peptit ve proteinlere seçici analitik sensörlerin geliştirilmesi henüz ilk aşamalarda. Proteinlerin seçici olarak tanınması için aşağıda bahsedilen stratejiler geliştirilmiştir:

- Proteinlerin altyapısının (yan zincir, peptit dizisi, fosforile peptid vb.) tanınması
- Proteinlerin yüzeyinin tanınması
- Protein – ligand etkileşimleri ile proteinlerin algılanması

Proteinlerin tanınma ve algılanma stratejileri protein altyapısı (yan zincir, di/tripeptit ve fosforile peptidler vb.) için bağlayıcı geliştirilmesi, protein yüzeyi (protein yüzeyindeki “hot spot” u hedefleyen veya protein-protein etkileşimlerine benzetme uygulanarak yapılan) için bağlayıcı geliştirilmesi ve proteine özgü ligandların kullanımı ile proteinlerin algılanması ve görüntülenmesi olmak üzere üç bölümde toplanmaktadır.

2.6.2.1. Proteinlerin Yapısının Tanınması

Yan zincirlerin tanınması: Herhangi bir proteinin tanınması ilk olarak yan zincirlerinin tanınması ile başlar (Şekil 2.9). Proteinin yan zincirinin tanınması yapısal ve dizisel karmaşıklığından dolayı henüz yüksek özgüllük ile elde edilememiştir. Fakat yan zincirlerin bağlanması proteinlerin çözünürlük, kristallik vb. yüzey özellikleri değiştirebilmektedir. Supramoleküler kimya alanında siklodekstrin (CD), kalikseren ve kukurbituril vb. moleküllerin iç kısmındaki boşluğu dolduran ve hidrofobik olan çeşitli konakçı moleküller bildirilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak araştırılan siklodekstrinler, sulu ortamda içlerindeki boşluğa hidrofobik küçük molekülleri (Trp, Tyr ve Phe gibi amino asitleri) almaktadır. Örneğin, Breslow ve arkadaşları, β – CD'nin Phe içeren dipeptidleri seçici olarak bağladığını bildirmişlerdir.



Şekil 2.9: Proteinin yan zincirlerinin tanınması.

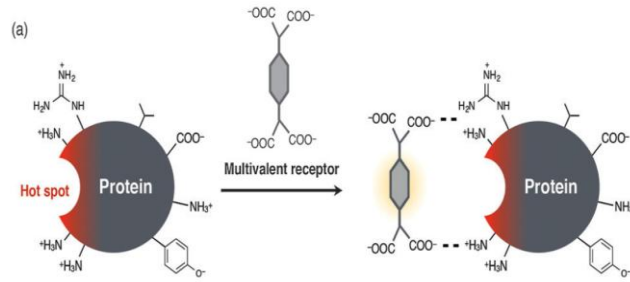
Bu bağlayıcıların peptitlerle bağlanabilmesini sağlayan üç özellik vardır: (i) konformasyonun kısıtlanması, ii) konkav eğilmiş bağlama merkezi ve iii) hidrojen bağı alıcısı ve vericisinin serbest olması.

Protein yüzeyi ve fosforile peptidlerin tanınması ve algılaması: Birçok proteinin enzimler tarafından modifiye edilmesine “proteinlerin çevrim sonrası değişimi (Post translational modification)” denir. Glikosilasyon, asilasyon, fosforilasyon vb. translasyon sonrası protein modifikasyonu proteinlerin stabilitelelerini, lokalizasyonlarını ve aktivitelerini değiştirerek birçok hücreyel olayda önemli rol oynar. Bunlar arasında Tyr, Ser ve Thr'nin fosforilasyon/defosforilasyonu, enzim aktiviteleri, sinyal değişim yolları ve protein–protein etkileşimlerinin düzenlenmesi vb. çeşitli biyolojik fonksiyonlar yer almaktadır. Yapılan araştırmalarda fosforile peptidler ve protein yüzeyinin tanınmasında koordinasyon bağına dayalı yöntemlerinin yaygın olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, Phos-tag diye adlandırılan elektro emdirim (electroblotting) yöntemiyle membran üzerinde fosforile proteinlerinin kemilüminensans tayini de yapılmıştır.

2.6.2.2. Protein Yüzeyinin Tanınması

Protein yüzeyinin tanınması işlemlerinde protein yüzeyindeki “hot spot” hedeflenmektedir (şekil 2.10). Proteinlerin yapısı üç boyutlu olduğu için proteinlerin yüzeyi her proteinin özelliğini (parmak izi) belirten çeşitli fonksiyonel gruplar içerir. Bu nedenle karmaşık ve büyük molekülü protein yüzeylerine bağlanabilecek sentetik sensörün tasarımı için peptit dizilim tayininden farklı bir yöntem gerekmektedir. Proteinlerin yüzeyine bağlamak amacıyla çeşitli bağlayıcılar sentezlene bile yüksek seçiciliğe ve eğilime sahip olan sentetik bağlayıcıların tasarlanması işlemleri henüz tam olarak yaygınlaşmamıştır. Proteinlerin seçici tanınmasında kullanılan bileşikler üç kategoriye ayrılabilir: (i) küçük hedeflerin tanınmasında uygulanan siklodekstrin vb. nano aralıklı kafes ve makrosiklikler, (ii) protein yüzeyinin tanınması için düzeltilmiş multi- işlevselliklere sahip olan çok değerli moleküller (metal

kompleksleri, porfirinler ve kaliksarenler), ve (iii) protein – protein etkileşimleri ile benzetilen basit ve kolay fonksiyonelleştirilebilen bileşikler (siklik peptitler).



Şekil 2.10: Protein yüzeyinin tanınması.

Protein yüzeyindeki “hot spot” u hedef almayı amaçlayarak yapılan bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin mitokondriyel solunum zinciri sırasında doğal olarak ifade edilen hemprotein veya sitokrom c (cyt c) hem merkezinin yanında pozitif yüzeyi içermektedir. Bu “hot spot”-ların bağlanmasında hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler, koordinasyon bağları vb. etkileşimler aracılığıyla yüzey alanı kaplanması için uygun çoklu fonksiyonel gruplara sahip olan organik veya inorganik bileşikler kullanılmıştır.

Hot spotların bağlanmasında yaygın olarak kullanılan yapılardan birisi oktahedral koordinasyon geometrisine sahip metal kompleksi oluşumlarıdır. Bu tür metal kompleksleri ligand üzerinde birçok fonksiyonel grup içerebilmektedir. Metal kompleksleri fluoresans, manyetik ve redoks özelliklerinden dolayı protein algılanması için uygun materyaller arasında bulunmaktadır.

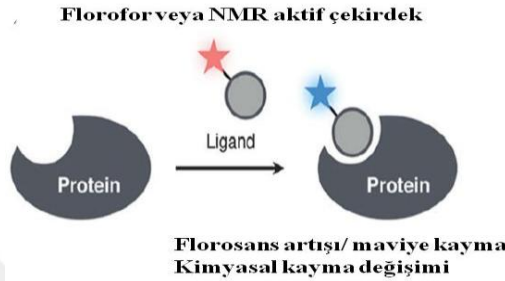
2.6.2.3. Protein – Ligand Etkileşimleriyle Protein Algılanması

Proteinlerin kompleks yüzeyleriyle kıyaslandığında, canlı sistemlerde protein ve enzimlerin aktif kısımlarına (veya substrat bağlanma boşluğuna) bağlanmak üzere seçici küçük moleküllerin (ligand) tasarlanması daha olasıdır. Bu tür protein-ligand etkileşimleri, proteinlerin seçici algılama ve görüntüleme sistemlerinin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ligand/protein tanınmasını sağlayacak tespit sinyallerinin elde edilmesi için genel olarak aşağıda gösterilen konseptlere odaklanılmaktadır:

- (i) Hedef proteinlerin serbest ve karmaşık durumlarında farklı sinyaller üreten çevreye – maddeye duyarlı probalar kullanılması: Bu tür fluoroforlar genellikle polar ve protik bir ortamda çok zayıf fluoresans sergiler, fakat hidrofobik ortamda bulunduğu güçlü, maviye doğru artan fluoresan gösterirler. Örneğin, benzensülfonamid ve 4-sülfamonil-7-aminobezoksadiazol (SBD) adlı madde

protein belirlenmesi için yüksek derecede çevreye duyarlı, küçük bir fluorofor olarak kullanılmıştır.

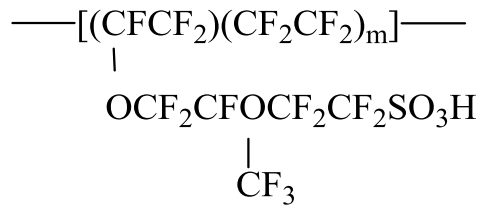
- (ii) Hedef proteinlerin varlığında ya da yokluğunda sinyallerin görünmesi veya kaybolmasının belirteç olarak kullanıldığı kendiliğinden oluşan problemler: Protein varlığında meydana gelen ve kendiliğinden oluşan veya kaybolan sinyallerle proteinlerin seçici olarak floresans veya ^{19}F NMR/MRI yöntemleriyle algılanabileceği bildirilmiştir (Ryou ve Hamachi, 2015).



Şekil 2.11: Protein – Ligand Etkileşimleriyle Protein Algılanması.

2.6.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Sensör Destek Materyali – Nafyon

Nafyon membranlar, perfloro vinil eter komonomerinin tetrafloroetilen (TFE) ile kopolimerizasyonu ile elde edilir. Nafyon membranın yapısı Şekil 2.12’de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.12: Nafyon membran yapısı.

Nafyon membran, ısıya dayanıklı, mekanik olarak stabil, UV-görünür bölge ve yakın IR'yi kapsayan geniş bir dalgaboyu aralığında ışın geçirgenliğine sahiptir. Bu özellikleri sayesinde farklı spektroskopik sensörlerde destek malzemesi olarak kullanılmaktadır (Mauritz ve Moore, 2004).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR VE KİMYASALLAR

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada, kimyasal maddelerin tartımı için Radwag AS 220/C/2 model analitik terazi, kimyasal maddelerin çözünmesini sağlamak için Ellma Sonic marka ultrasonik banyo, hazırlanan çözeltilerin karıştırılması için VELP Scientifica ZX3 karıştırıcı, çözeltilerin pH'larının belirlenmesi amacıyla HANNA HI 221 pH metre, inkübasyon işlemi için Memmert Waterbath WNB 7-45 su banyosu, çöktürülen proteinleri ayırma işlemi için M 4812 P Elektro mag model santrifüj, absorbans ölçümlerinde Varian CARY 100 UV-görünür alan spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için Helma marka 10 mm ve 1 mm ışın yollu birer çift kuartz küvet, destile su üretim için GFL 2008 destile su sistemi, sensörlerin hazırlanmasında kullanılmak üzere programlanabilir BIOSAN RS-24 rotator kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Tez kapsamında kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve amonyum demir (II) sülfat heksahidrat ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) Aldrich (Steinheim, Almanya); hidrojen peroksit (H_2O_2), bakır (II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sodyum sitrat, setil trimetil amonyum bromür (CTAB), potasyum hidroksit (KOH), ve sodyum dodesil sülfat tuzu (SDS) Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından temin edildi. Bovin (sığır) serum albümini (BSA), kazein (CAS), etilendiamintetraasetik asit disodyum dihidrat tuzu ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), trikloroasetik asit (TCA), neokuproin (Nc), etanol (EtOH), 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (tris bazı), glisin, üre Sigma (ABD) firmasından temin edildi. Gallik asit (GA), N-asetil sistein (NAC), L-glutatyon (GSH), 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), metanol (MeOH), askorbik asit (AA) ve L-sistein (CYS) Sigma-Aldrich (ABD) firmasından satın alındı. Sodyum karbonat (Na_2CO_3), kloroform, sodyum klorür (NaCl) Riedel-de Haën'den (Steinheim, Almanya) temin edildi.

3.2. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.2.1. Protein Oksidasyonu için Uygulanan Fenton Çözeltilerinin Hazırlanması

Fosfat tamponu 0,2 M (pH=7,0) olacak şekilde 2,6125 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 5,9325 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Demir (II) çözeltisi, 20 mM olacak şekilde $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'dan 0,1960 g tartım alınıp 1 mL 1,0 M HCl çözeltisi ile çözüldükten sonra hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Na_2EDTA çözeltisi, 20 mM olacak şekilde 0,7444 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. H_2O_2 çözeltisi, %30(w/v)'luk stok çözeltisinden 1:1000 oranında su ile seyreltilerek günlük olarak hazırlandı. Standart protein örnekleri için BSA ve kazein proteinleri, gerçek örnek için yumurta akı proteini kullanıldı, protein çözeltilerinin hazırlanmasına ilişkin işlemler Tablo 3.1'de verilmiştir. Fenton sisteminde okside edilen protein örneklerine CUPRAC yöntemi uygulanmadan önce oksidasyon işlemi trikloro asetik asit (TCA, $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) çözeltisi ile durduruldu. Fenton oksidasyonunu durdurmak için kullanılan TCA çözeltisi, 0,6 M olacak şekilde 9,8034 g tartılıp su ile çözüldükten sonra hacim 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Tablo 3.1: Protein çözeltilerin hazırlanması.

Protein	Yöntem	Kons.	Hazırlanma
BSA	Karbonil tayini ve CUPRAC	10 mg mL ⁻¹	BSA'dan 0,1 g tartım alınıp destile su ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
Kazein	Karbonil tayini	2,5 mg mL ⁻¹	Kazeinden 0,0625 g tartım alınıp 100 µL 6,0 M KOH çözeltisi ve destile su ile ilave edildikten sonra 80°C'de çözününceye kadar ısıtıldı. Sonrasında hacim destile su ile 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
	CUPRAC	4,0 mg mL ⁻¹	Kazeinden 0,1 g tartılıp, yukarıda bahsedildiği şekilde hazırlandı.
Y. akı	Karbonil tayini ve CUPRAC	0,15 g mL ⁻¹	Yaklaşık 37,5 g yumurta akı yumurta sarısından ayrılıp, destile su ile çözüldükten sonra Whatman mavi bant süzgeç kağıdıyla süzülüp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.2.2. Antioksidan Standartlarının Hazırlanması

Tez kapsamında suda çözünen antioksidanlar olan askorbik asit (AA), gallik asit (GA), indirgenmiş L-glutasyon (GSH) ve N-Asetil sistein (NAC) bileşiklerinin stok çözeltilerinin konsantrasyonları $1,0 \times 10^{-2}$ M olacak şekilde uygun miktarda tartılan katılar doğrudan destile su ile çözülerek hazırlandı. Sistein çözeltisi ise konsantrasyonu $1,0 \times 10^{-2}$ M olacak şekilde

0,0121 g'lık tartım 0,5 mL 1,0 M HCl çözeltisi ile çözülüp hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. CUPRAC ve karbonil tayini yöntemlerinde antioksidanların çalışma çözeltileri stok çözeltilerin uygun miktarda destile su ile seyreltilmesiyle günlük olarak hazırlandı.

3.2.3. CUPRAC Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

CuCl₂ çözeltisi, konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde CuCl₂·2H₂O'dan 0,1704 g tartım alınıp hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Neokuproin çözeltisi, 7,5×10⁻³ M olacak şekilde 0,1832 g tartım alınıp hacim 100 mL olacak şekilde etil alkol ile hazırlandı. Üre tamponu (pH = 7,0) hazırlamak için; tris bazından 2,6045 g, glisinden 1,6891 g, sodium sitrattan 0,3572 g ve üreden 120 g tartım alındı destile su ile çözüldü pH, 1,0 M HCl çözeltisi ile 7,0'ye ayarlandıktan sonra hacim destile su ile 250 mL'ye tamamlandı. Sodyum karbonat çözeltisi, konsantrasyonu ağırlıkça %1,0 olacak şekilde Na₂CO₃ tuzundan 1,0 g tartım alınıp hacmi destile su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çöktürülen proteinlerin tekrar çözeltilmeye alınmasında kullanılan protein çözücü tamponun hazırlanması için, 54,05 g üre, 1,0 g sodyum dodesil sülfat (SDS; CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na) ve 0,30 g Tris tartıldı, destile suda çözüldü ve pH'ı 6,8 olacak şekilde 1,0 M HCl çözeltisiyle ayarlandı son olarak hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.2.4. Protein Karbonil Tayini için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Tris (C₄H₁₁NO₃) çözeltisi, konsantrasyonu 1,0 M olacak şekilde 12,114 g tartım alınıp, hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. 2,4-Dinitrofenil hidrazin (DNPH; C₆H₆N₄O₄) çözeltisi konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde DNPH'den alınan 0,2 g'lık tartım mutlak metanol ile çözülüp hacim yine metanol ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. CTAB; C₁₉H₄₂BrN çözeltisi, ağırlıkça %1,0'lik olacak şekilde, CTAB'dan 1,0 g tartım alınıp su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. KOH çözeltisi 6,0 M olacak şekilde 33,66 g tartım alınıp hacim su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Sodyum klorürün doymuş çözeltisinin (5M) hazırlanması için 29,22 g NaCl tartılıp hacmi destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.3.1. Karbonil Tayini Yöntemi ve Optimizasyonu

Protein karbonil tayini için tez kapsamında kullanılan yöntem, Lappin and Clark (1951) tarafından ilk olarak aldehit, keton vb. küçük molekülü karbonil bileşiklerinin analizi için

geliştirilmiştir. Büyük molekül yapısına sahip olan proteinleri içeren sistemler için orijinal yöntem doğrudan uygulandığında meydana gelen ürünlerin kararsız ve absorbans değerlerinin düşük oluşu nedeniyle, aşağıda anlatılan şekilde modifiye edildi.

3.3.1.1. Protein Türevli Dinitrofenilhidrazon Bileşiğinin Elde Edilmesi

Proteinlere Fenton Reaksiyonu uygulandığında oluşan oksidatif hasar sonucu açığa çıkan karbonil grubu, eklenen DNPH reaktifi ile dinitro karbazon bileşiğini oluşturmaktadır. Bu reaksiyon zayıf asidik ortamda gerçekleştiği için orijinal yöntemdeki 1 damla konsantre HCl yerine 1,0 M HCl çözeltisinden 0,25 mL alındı ve öncelikle uygun pH belirlendi. Bu amaçla (proteinlerin çökmesini de engelleyecek şekilde) uygun miktarlarda tris çözeltisi eklenmesiyle pH aralığı 4 – 7 olacak şekilde ayarlandı. Bu çalışmada, orijinal yöntemdeki DNPH'in doymuş çözeltisi yerine 10 mM DNPH çözeltisi kullanıldı. DNPH çözeltisinin en uygun miktarının belirlenmesi için Fenton sistemiyle oksitlenmiş protein çözeltisinden 0,25 mL alınıp üzerine 10 mM DNPH çözeltisinden sırasıyla 0,25 mL, 0,50 mL ve 0,75 mL eklenerek denemeler yapıldı. Protein karbonil türevlerinin DNPH ile reaksiyonu için optimal pH ve DNPH miktarı belirlendikten sonra, dinitrofenil hidrazon türevlerinin oluşumu için gerekli inkübasyon süresi araştırıldı. Bu amaçla orijinal yöntemde belirlenmiş olan 50°C'lik su banyosunda örnekler sırasıyla 15, 30 ve 60 dakika bekletildi.

3.3.1.2. KOH Çözeltisinin Hacminin Belirlenmesi

3.3.1.1 kısmında elde edilen dinitrofenil hidrazon türevlerinin bazik ortamda şarap renkli anyon şekline dönüştürülmesi için gereken baz miktarının belirlenmesi için 6,0 M KOH çözeltisinden 150, 250, 300 ve 500 µL'lik hacimler alındı. DNPH ve protein karbonil örneği arasındaki reaksiyon sonucu oluşan 2,4-dinitrofenil hidrazon bileşiğinin üzerine eklendi. Ardından oluşan şarap renkli anyon ile iyon çifti oluşturularak kloroform fazına transfer olmasını sağlamak amacıyla katyonik-yüzey aktif madde olarak CTAB eklendi. En uygun hacmin belirlenmesi için CTAB çözeltisinden 100, 250 ve 500 µL'lik hacimler alınarak denemeler yapıldı.

3.3.1.3. Organik Fazın Kurutulması

3.3.1.2 kısmında anlatılan şekilde protein karbonil bileşiği organik faza alındıktan sonra organik ve sulu fazın ayırımını arttırmak için (kurutma) 5,0 M NaCl çözeltisinden 50, 100 ve 150 µL'lik hacimler ayrı ayrı eklendi. Karbonil anyonu içeren organik fazın bazlığını

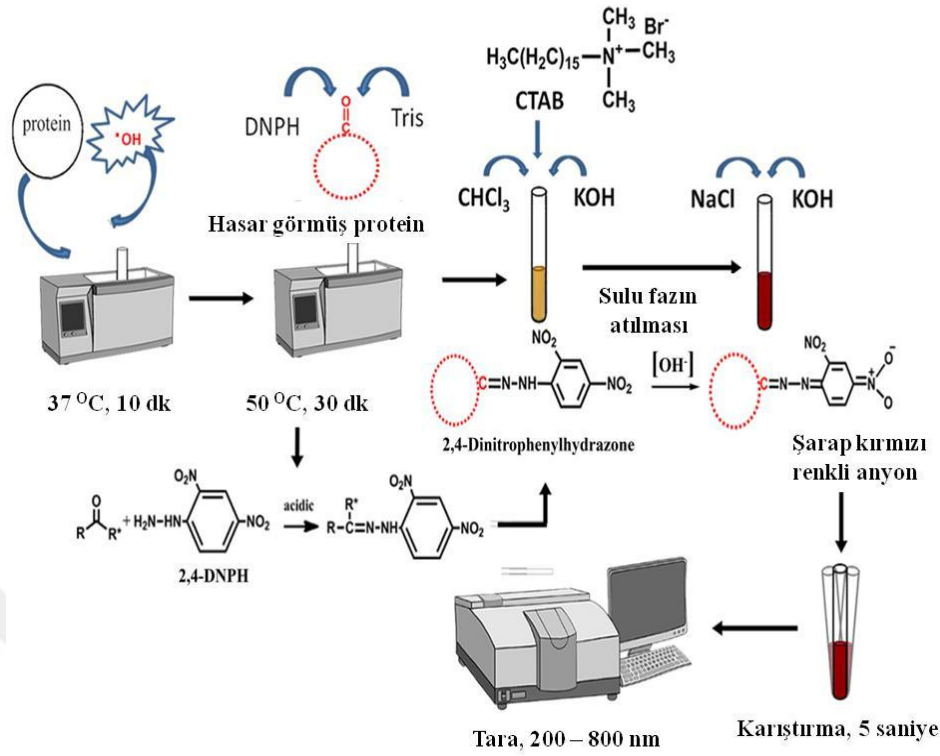
sağlamak amacıyla organik fazın üzerine 6,0 M KOH'den 50, 100 ve 150 µL olacak şekilde farklı hacimler ilave edilerek en uygun miktar belirlendi.

3.3.1.4. Fenton Sistemi ile Proteinlerin Okside Edilmesi

Protein örneklerinin oksidasyonu için tüp içine 1,5 mL 0,2 M (pH=7,0) sodyum fosfat tamponu, 0,5 mL protein örneği, 0,25 mL 20 mM Na₂EDTA çözeltisi, 0,25 mL 20 mM (NH₄)₂Fe(SO₄)·6H₂O çözeltisi, x mL antioksidan çözeltisi, 2-x mL destile su ve 0.5 mL 10 mM H₂O₂ çözeltisi belirtilen sıra ile eklenip 37°C sıcaklığındaki su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.

3.3.1.5. Proteinlerin Oksidatif Hasarı Sonucu Oluşan Karbonil Grubunun Tayini

Protein karbonillerinin tayini için 0,25 mL 1,0 M Tris çözeltisi, 0,25 mL 1,0 M HCl çözeltisi ve 0,25 mL Fenton sistemiyle oksitlenmiş protein çözeltisinden alınıp 0,5 mL 10 mM DNPH ilave edildi, reaktif karışımı su banyosunda 50°C de 30 dakika bekletildi. Ardından, musluk suyu altında oda sıcaklığına kadar soğutulup üzerine CHCl₃ çözeltisinden 1,5 mL ve %1,0 CTAB çözeltisinden 0,25 mL, 6,0 M KOH çözeltisinden 0,25 mL eklenip oluşan karışım vorteks yardımıyla iyice karıştırıldı. Ardından sulu faz ile organik faz ayrılıp, organik fazın üzerine sodyum klorürün doygun çözeltisinden 50 µL ve 6,0 M KOH çözeltisinden 100 µL eklenip vorteks yardımı ile karıştırılarak organik faz bazik hale getirildi. Ardından elde edilen şarap renkli çözeltinin 200-800 nm arasında spektrumu alındı. Protein karbonil tayini için uygulanan yöntemin genel şeması Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1: Protein karbonil tayini için genel şema.

3.3.2. CUPRAC Yöntemi

3.3.2.1. Protein Oksidasyonu

Protein örneklerin oksidasyonu için tüp içine 1,5 mL 0,2 M (pH=7,0) sodyum fosfat tamponu, 0,5 mL protein örneği, 0,25 mL 20 mM Na₂EDTA çözeltisi, 0,25 mL 20 mM (NH₄)₂Fe(SO₄)₆H₂O çözeltisi, x mL antioksidan çözeltisi, 2-x mL destile su ve 0,5 mL 10 mM H₂O₂ çözeltisinden sırasıyla eklenip 37°C de 10 dakika inkübe edildi. Fenton sistemindeki protein oksidasyon tepkimesini durdurmak için 0,6 M TCA çözeltisinden 0,5 mL ilave edildi. Oluşan çökeltiliyi ayırmak için 5000 rpm hız ile 1 dakika santrifüj işlemi uygulandı. CUPRAC yöntemi için üstte kalan berrak kısım kullanıldı. CUPRAC yöntemiyle yapılan çalışma için genel şema şekil 3.2’de verilmiştir.

3.3.2.2. Proteinlerin Oksidatif Hasarının Belirlenmesinde Uygulanan Modifiye Edilmiş CUPRAC Yöntemi

Bir tüp içerisinde 0,5 mL 1,0×10⁻²M CuCl₂·2H₂O çözeltisi, 0,5 mL 7,5×10⁻³ M Nc çözeltisi 0,5 mL üre tamponu (pH=7,0), 0,25 mL %1,0 Na₂CO₃ çözeltisi ve Bölüm 3.3.2.1 anlatılan şekilde elde edilen berrak çözeltilerden 0,5 mL karıştırılıp su banyosunda 37°C de 30 dakika bekletildi ve meydana gelen sarı renkli çözeltinin absorbansı 450 nm’de reaktif körüne karşı okundu. Reaktif körünün hazırlanması için Fenton oksidasyon sisteminden protein örneği

çıkartılarak yerine eşit hacimde destile su eklendi ve Fenton oksidasyon yöntemi aynı şekilde uygulandı. Daha sonra buradan alınan 0,5 mL'lik kısım CUPRAC reaktiflerinin üzerine eklendi (Uzunboy ve diğ. 2017; Demirci Cekic ve diğ. 2012).

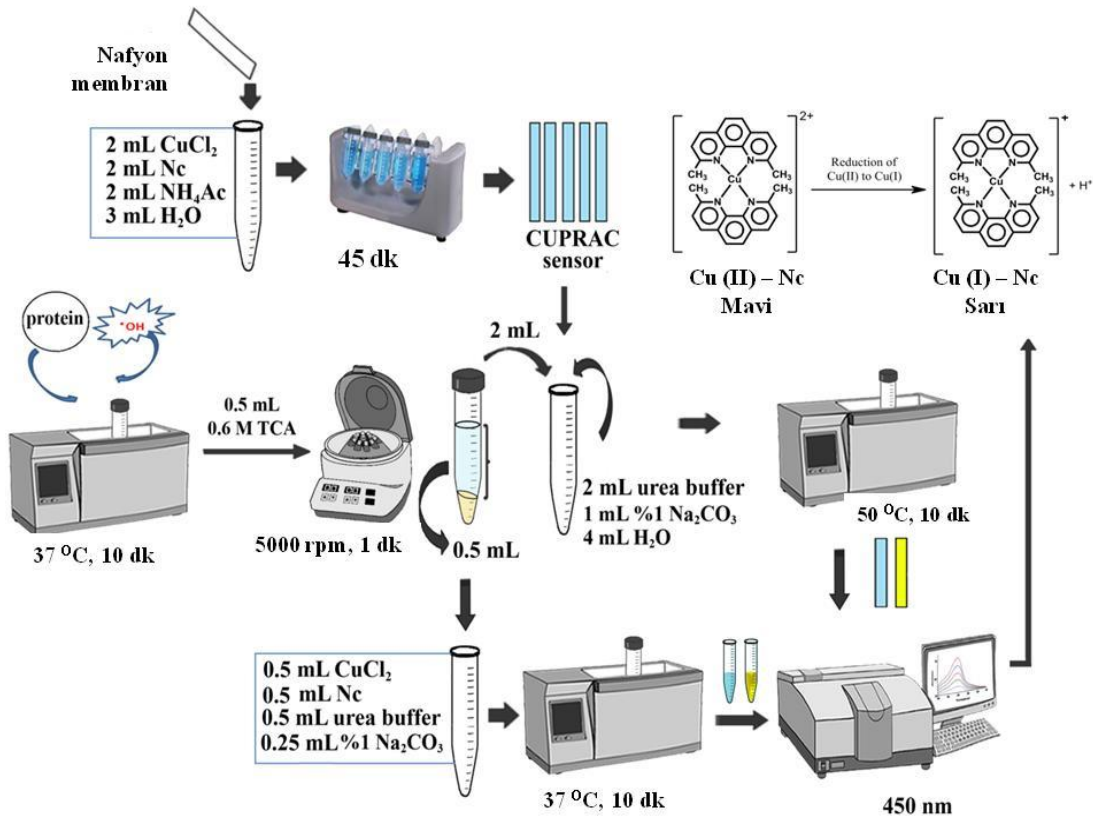
3.4. CUPRAC SENSÖRÜ

3.4.1. CUPRAC Yöntemine Dayalı Optik Sensör Hazırlanması

Santrifüj tüplerinin içerisine 2,0 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi, 2,0 mL $7,5 \times 10^{-3}$ M Nc çözeltisi, 2,0 mL 1,0 M amonyum asetat tamponu (pH=7,0) ve 3 mL destile su ilave edildi ($V_S=9,0$ mL). Elde edilen karışıma 4,0x0,5 cm boyutlarında kesilerek hazırlanmış nafyon membranlardan birer tane daldırılıp karıştırıcı yardımıyla 45 dakika boyunca çalkalandı.

3.4.2. Optik Sensör Kullanılarak Proteinlerin Oksidatif Hasarının Tayin Edilmesi

Deney tüpü içerisine 4 mL destile su, 2 mL üre tamponu (pH= 7,0), 1 mL %1,0 Na_2CO_3 çözeltisi ve 2 mL Fenton sistemiyle oksitlenmiş protein çözeltisi (3.3.2.1) ilave edilip karıştırıldı ve içine Bölüm 3.4 de anlatılan şekilde elde edilen CUPRAC optik sensörleri ilave edildi ve reaktif karışımı su banyosunda 50°C de 30 dakika bekletildi.



Şekil 3.2: Oksidatif protein hasarının CUPRAC yöntemi ile tayini için genel şema.

3.4.3. CUPRAC Sensörünün Tekrar Kullanımının Araştırılması

Kullanılan atık membranların tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi için sarı renkli nafyon membranlar HCl içerisinde ısıtılarak bekletildi ve ardından 1 saat boyunca destile su içerisinde bırakılarak asit uzaklaştırıldı. Atık membranların temizlenmesinde optimum koşulların belirlenmesi için farklı sıcaklık, asit konsantrasyonu ve süre denendi. Ardından Rengi giderilen nafyon membranlar ve daha önce kullanılmamış membranlar (kontrol) ile Bölüm 3.4 ve Bölüm 3.5’de anlatıldığı şekilde CUPRAC reaktifi membran üzerine tutturulup BSA’nın fenton sistemi ile oksidatif hasarı belirlenerek elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı (N=5).

3.4.3.1. Optimal Sıcaklık Belirlenmesi

Kullanılmış CUPRAC sensör yüzeyindeki sarı rengin giderilmesi için atık nafyonun herbir şeridi için 1,0 M HCl’den 1,0 mL olacak şekilde 10 şerit üzerine 10 mL 1,0 M HCl eklenip yüzeyindeki sarı renk kayboluncaya kadar 50°C, 37°C ve oda sıcaklığında olmak üzere farklı sıcaklıklarda bekletilerek optimal sıcaklık belirlendi.

3.4.3.2. Temizleme için Kullanılan Asit Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Kullanılan atık nafyon yüzeyindeki sarı rengin giderilmesi için 1,0 M, 2,0 M, 3,0 M ve 4,0 M HCl çözeltisi nafyonun her bir şeridi için 1,0 mL olacak şekilde ilave edilip 1 saat boyunca 50°C’de bekletildi ve temizleme için gerekli uygun asit konsantrasyonu belirlendi.

3.4.3.3. Süre Denemesi

Oksidatif protein hasarı CUPRAC sensörü ile belirlendikten sonra atık (kullanılmış) nafyon membranlar 1,0 M HCl içerisinde 50°C’de 30, 60, 90 ve 120 dakika bekletilerek uygun temizleme süresi belirlendi.

3.5. ANTİOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ İÇİN GERÇEK ÖRNEK UYGULAMASI

Oksidatif protein hasarına antioksidanların koruyucu etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçek örnek olarak portakal suyu kullanıldı. Bu amaçla hazır portakal suyu marketten temin edildi. Portakal suyu örneği protein içeren Fenton sistemi içerisine ilave edilmeden önce 0,45 µm’lik membran filtreden şırınga yardımıyla geçirildi. Elde edilen berrak portakal suyu örneği Karbonil tayini ve CUPRAC çözelti yöntemleri için seyreltilmeden direkt kullanılırken CUPRAC sensör yöntemi için portakal suyu destile su ile 1:30 oranında seyreltildi.

Proteinlere oksidatif hasar verilmesi amacıyla gerçekleştirilen Fenton yöntemi sırasında önce portakal suyu ve GA'nin uygun miktarları daha sonra belirlenen hacimdeki portakal suyu ve GA birlikte eklenerek CUPRAC çözelti, CUPRAC sensör ve karbonil yöntemlerinde % hata değerleri hesaplandı.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tez kapsamında elde edilen sonuçların istatistiksel analizi için Microsoft Excel versiyon 2016 kullanıldı. Tez kapsamında protein karbonil tayini için geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için gün içinde 5 tekrar olacak şekilde üç gün boyunca (N=15) elde edilen sonuçlara tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Her durumda F değeri F_{kritik} (3,88) değerinden düşük, P değerleri ise 0,05'ten yüksek olduğundan sonuç ANOVA analizine göre istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi. Spearman korelasyon katsayısı, denklem 3.1'e göre hesaplandı. CUPRAC ve protein karbonil tayini yöntemleriyle antioksidanların koruyucu etkisi için belirlenen sıralar arasındaki ilişkinin kuvveti belirlendi (Millers, 2010).

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2-1)} \quad (3.1)$$

Denlem 3.1'de:

r_s – Spearman sıralama analiz korelasyonu

d_i – iki sıra arasındaki fark

n – çift sayısı

4. BULGULAR

4.1. KARBONİL TAYİNİ YÖNTEMİNİN OPTİMİZASYONU

4.1.1. Protein Türevli Dinitrofenilhidrazon Bileşiğinin Elde Edilmesi

Proteinlere Fenton Reaksiyonu uygulandığında oluşan oksidatif hasar sonucu açığa çıkan karbonil türevleri DNPH reaktifi ilave edilerek dinitro karbazon türevlerinin oluşturması için uygun pH'ın belirlenmesinde oksidatif hasara uğratılan 0,25 mL protein örneği üzerine 0,25 mL 1,0 M tris ve 0,25 mL 1,0 M HCl çözeltisi alınarak çözelti karışımının pH'ı 6,0 olarak ayarlanmış, denemelerde referansın sarı ve örnek içeren çözeltinin de şarap rengi olduğu görülmüştür. Çözeltinin pH değeri ($\text{pH} < 6,0$) düşük olduğunda referans çözeltisinin mor renkli olduğu ve pH değeri 6,0'dan büyük olduğunda ise karbonil türevlerinin absorbensinin azaldığı görülmüş bu nedenle en uygun pH değeri 6 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada, orijinal yöntemdeki DNPH'in doymuş çözeltisinin yerine 10 mM DNPH çözeltisi kullanıldı. DNPH çözeltisinin uygun miktarının belirlenmesi için Fenton sistemiyle oksitlenmiş protein çözeltisinden 0,25 mL alınıp üzerine 10 mM DNPH çözeltisinden 0,25 mL eklendiğinde $A=0,43$; 0,50 mL eklendiğinde $A=0,84$ ve 0,75 mL eklendiğinde $A= 0,19$ olarak bulunmuştur. DNPH çözeltisinin hacmi arttıkça, referans çözeltisinde koyu yeşil rengi gözlemlendi. Dinitrofenil hidrazon türevlerinin elde edilmesi için 10 mM DNPH'in en uygun hacminin 0,5 mL olduğu belirlendi.

Su banyosunda 50°C sıcaklıkta gerçekleştirilen inkübasyon süresinin belirlenmesi için yapılan denemelerde 30 dakikada karbonil bileşiğin absorbensinin en yüksek değere ulaştığı bulunmuştur ($A_{10\text{min}} = 0,65$; $A_{30\text{min}} = 1,07$ ve $A_{60\text{min}} = 0,66$).

4.1.2. KOH Çözeltisinin Hacminin Belirlenmesi

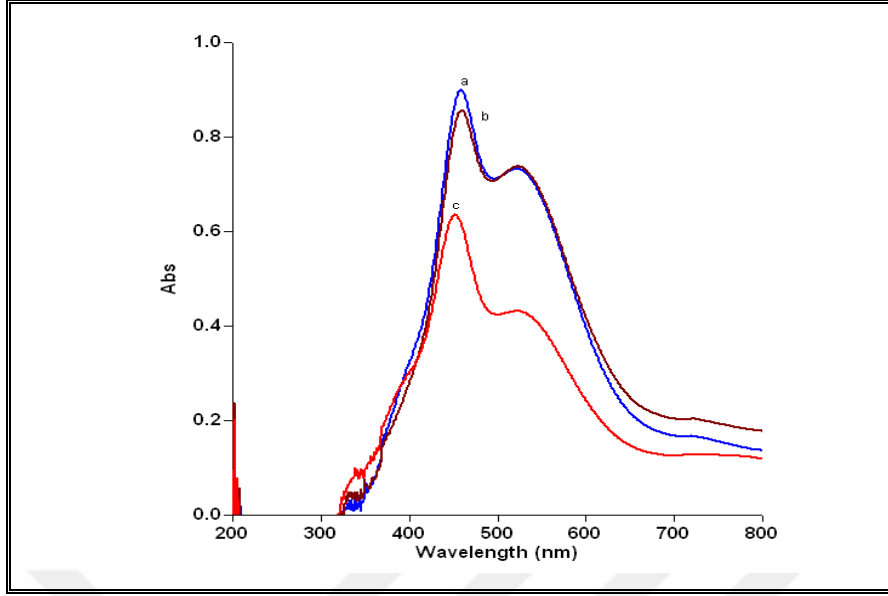
Karbonil tayini için Lappin ve Clark (1951) tarafından geliştirilen yöntemde KOH çözeltisinin konsantrasyonunu 1,7 M olacak şekilde 1:4 su ve metanol karışımı ile çözülerek hazırlanmıştır. Karbonilin şarap renkli anyonunun elde edilmesi için DNPH metanol ile hazırlanmaktadır. 1,0 mL karbonil örneği 1,0 mL DNPH ve 0,2 mL derişik HCl ilave edilip su banyosunda 50°C'de 30 dakika bekletildi. Çözelti soğutulduktan sonra 1,7 M KOH'tan 5 mL eklenerek meydana gelen şarap renkli karbonil anyonunun absorbens değeri 450 nm'de okundu. Bu çalışmada protein karbonilinin tayini için orijinal yöntemdeki gibi hazırlanmış

KOH kullanıldığı takdirde hem kloroform fazında çökme (metanolün hacmi arttıkça çökme artmakta) hem de meydana gelen ürünün absorpsiyonunun çok düşük olduğu görüldü. Bu nedenle, KOH'in konsantrasyonu 6,0 M'a kadar artırılarak sulu çözeltisinden 150, 250, 300 ve 500 μL olacak şekilde farklı hacimler alındı, DNPH ve protein karbonil örneğinden oluşan 2,4-dinitrofenil hidrazon bileşiğinin üzerine eklendiğinde en yüksek absorpsiyon değeri 6,0 M KOH'dan 250 μL ($A=0,70$) alındığında elde edildi ($A_{300 \mu\text{L}} = 0,55$; $A_{150 \mu\text{L}} = 0,44$; ve 6,0 M KOH'dan 500 μL alındığında çökme gözlemlendi). Karbonil tayini yöntemiyle elde edilen dinitrofenil hidrazon türevlerinin şarap renkli anyonunun organik faza transfer edilebilmesi için eklenen katyonik-yüzey aktif madde olan %1,0 CTAB'ın uygun miktarı 0,25 mL olarak belirlendi ($A=0,81$). %1,0 CTAB çözeltisinden 0,5 mL alındığında organik fazda çökme gözlemlendi ve 0,1 mL alındığında oluşan renk şiddetinin çok düşük olduğu görüldü.

4.1.3. Organik Fazın Kurutulması

4.1.2'de anlatılan şekilde protein karbonil anyonu organik faza alındıktan sonra organik ve sulu fazın ayrımını arttırmak için (kurutma) 5,0 M NaCl çözeltisinden sırasıyla 50, 100 ve 150 μL 'lik hacimler eklenerek yapılan denemelerden en uygun hacim 50 μL olarak belirlendi. Denemelerde NaCl çözeltisinin hacmi arttıkça organik fazda bulanıklık oluştuğu gözlemlendi.

Karbonil anyonu içeren organik fazın berraklığını sağlamak amacıyla organik fazın üzerine 6,0 M KOH'dan 50, 100 ve 150 μL olacak şekilde farklı hacimlerde ilave edilerek uygun miktar belirlendi. Şekil 4.2'de gösterildiği gibi 6,0 M KOH'dan 100 μL eklendiğinde karbonil anyonun en yüksek absorpsiyon değerine ulaştığı belirlendi. Bu koşullarda, referansın rengi sarı, proteinlerin anyonik karbonil türevleri ise şarap renklidir.



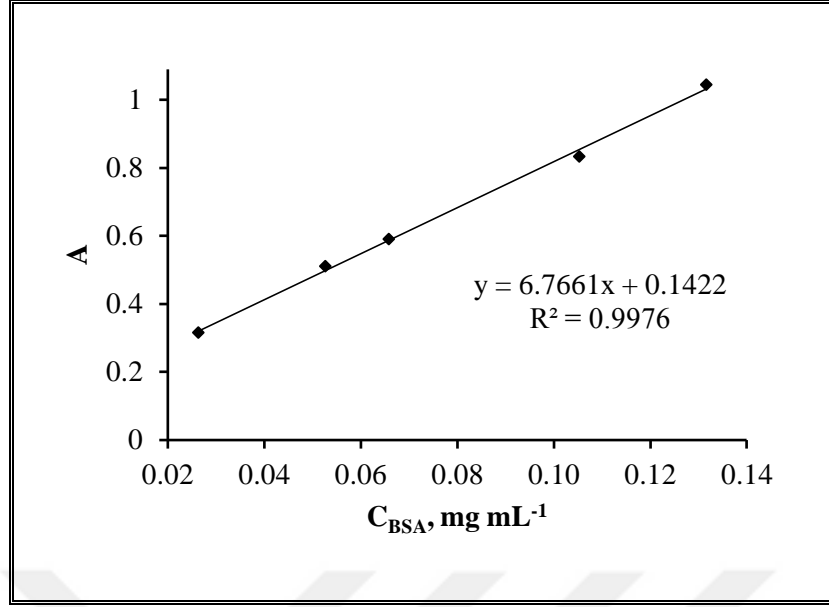
Şekil 4.1: Karbonil anyonu içeren organik fazın bazik olması için yapılan denemeler (6,0 M KOH'den 100(a); 150(b) ve 50 μ L(c) alındığında elde edilen spektrumlar).

4.2. PROTEİN KARBONİL TAYİNİ YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

Tez kapsamında protein karbonil tayininin modifiye edilmesiyle geliştirilen yöntem (4.1.3) sırasıyla standart protein probu olarak BSA, CAS ve gerçek protein örneği olarak yumurta akı proteinleri üzerine uygulandı. Protein örneklerinin Fenton oksidasyonuna maruz bırakılmadan önce geliştirilen bu yönteme cevap vermediği görülmüştür. Ayrıca proteinlerin oksidatif hasarına AA, CYS, GA, GSH ve NAC gibi antioksidanların önleyici etkisi, antioksidanların varlığında ve yokluğunda oksidatif hasara uğratılmış proteinlerden oluşan karbonil gruplarının miktarının ölçülmesiyle belirlendi.

4.2.1. BSA'nın Oksidatif Hasarı Sonucu Karbonillenmesi

BSA proteininin oksidatif hasarı sonucu meydana gelen karbonil grubunun tayini için BSA'nın 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan çözeltisinden 0,1 – 0,5 mL aralığında hacimler alınarak denemeler yapıldı ve elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.2'de verildi.

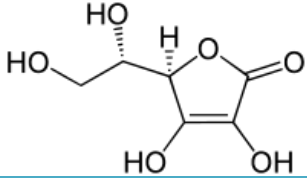
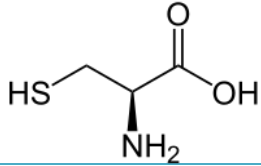
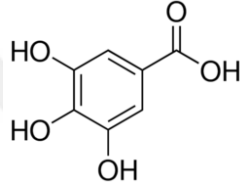
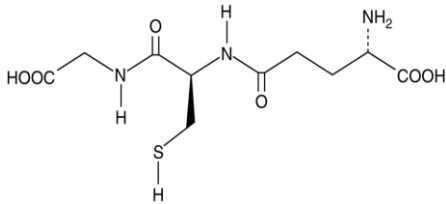
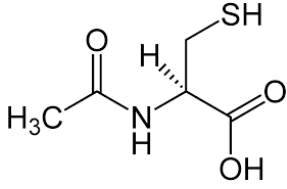


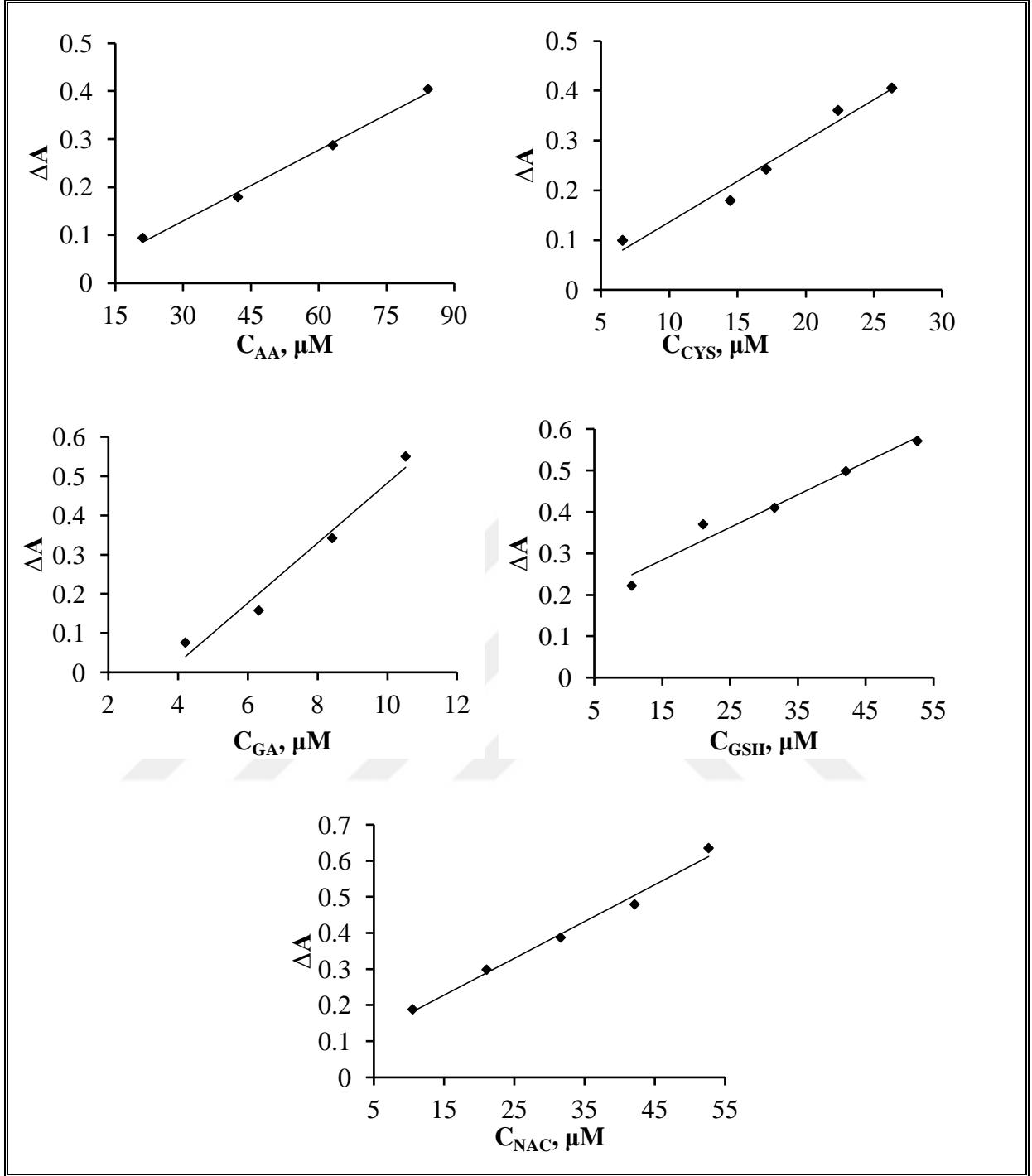
Şekil 4.2: BSA'nın karbonil tayini yöntemine ait kalibrasyon eğrisi.

4.2.1.1. BSA'nın Karbonillenmesine Antioksidanların Koruyucu Etkisinin Belirlenmesi

BSA'nın oksidatif hasarına antioksidanların engelleyici etkisi, BSA proteininin farklı miktarda antioksidan içeren Fenton sisteminde oksitlenmesiyle oluşan karbonil ürünlerinde meydana gelen azalma ölçülerek belirlendi. Bu amaçla kullanılan antioksidanların molekül yapısı, çalışma aralığı ve antioksidanların konsantrasyonuna karşı karbonil türevlerinin absorbansında meydana gelen azalma (ΔA) arasında çizilen grafiklerden elde edilen doğru denklemleri Tablo 4.1'de ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.1: BSA'nın oksidatif hasarı üzerine antioksidanların (AO) koruyucu etkilerinin karbonil tayin yöntemiyle belirlenmesi.

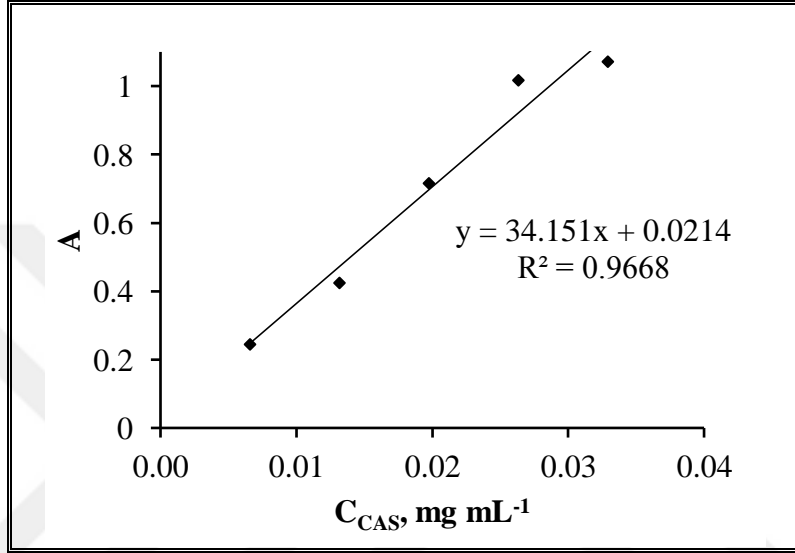
AO	Molekül yapısı	Çalışma Konsantrasyonu	Doğru denklemi
AA		$2,11 \times 10^{-5} \text{M} - 8,42 \times 10^{-5} \text{M}$	$\Delta A = 0,49 \times 10^4 C - 0,018;$ $R^2 = 0,99$
CYS		$6,58 \times 10^{-6} \text{M} - 2,63 \times 10^{-5} \text{M}$	$\Delta A = 1,64 \times 10^4 C - 0,028;$ $R^2 = 0,97$
GA		$4,21 \times 10^{-6} \text{M} - 1,05 \times 10^{-5} \text{M}$	$\Delta A = 7,63 \times 10^4 C - 0,280;$ $R^2 = 0,96$
GSH		$1,05 \times 10^{-5} \text{M} - 5,26 \times 10^{-5} \text{M}$	$\Delta A = 0,78 \times 10^4 C + 0,166;$ $R^2 = 0,97$
NAC		$1,05 \times 10^{-5} \text{M} - 5,26 \times 10^{-5} \text{M}$	$\Delta A = 1,02 \times 10^4 C + 0,074;$ $R^2 = 0,98$



Şekil 4.3: BSA'nın karbonillenmesine antioksidanların engelleyici etkilerinin incelenmesi amacıyla antioksidanların artan konsantrasyonları ile oksidasyon ürünlerinin absorbansında oluşan azalma (ΔA) arasında çizilen kalibrasyon eğrileri.

4.2.2. Kazeinin Oksidatif Hasar Sonucu Karbonillenmesi

Kazeinin oksidatif hasarı sonucu oluşan karbonil grubunun tayini için kazein çözeltisi 2,5 mg mL⁻¹ olacak şekilde hazırlanıp bu çözeltiden 0,1 – 0,5 mL arasında değişen hacimler alındı ve denemeler yukarıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi; mg mL⁻¹ cinsinden kazein konsantrasyonu ve karbonil yöntemi uygulanarak elde edilen absorbanlar arasında çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.4'te verildi.

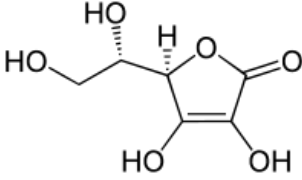
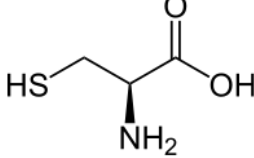
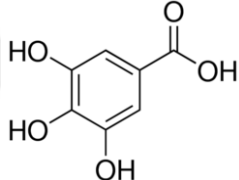
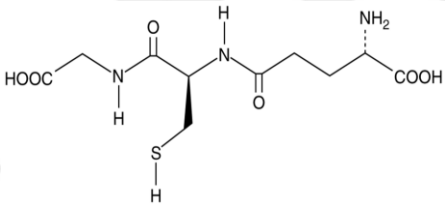
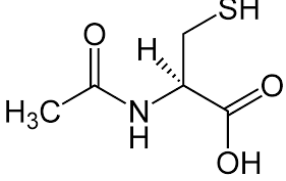


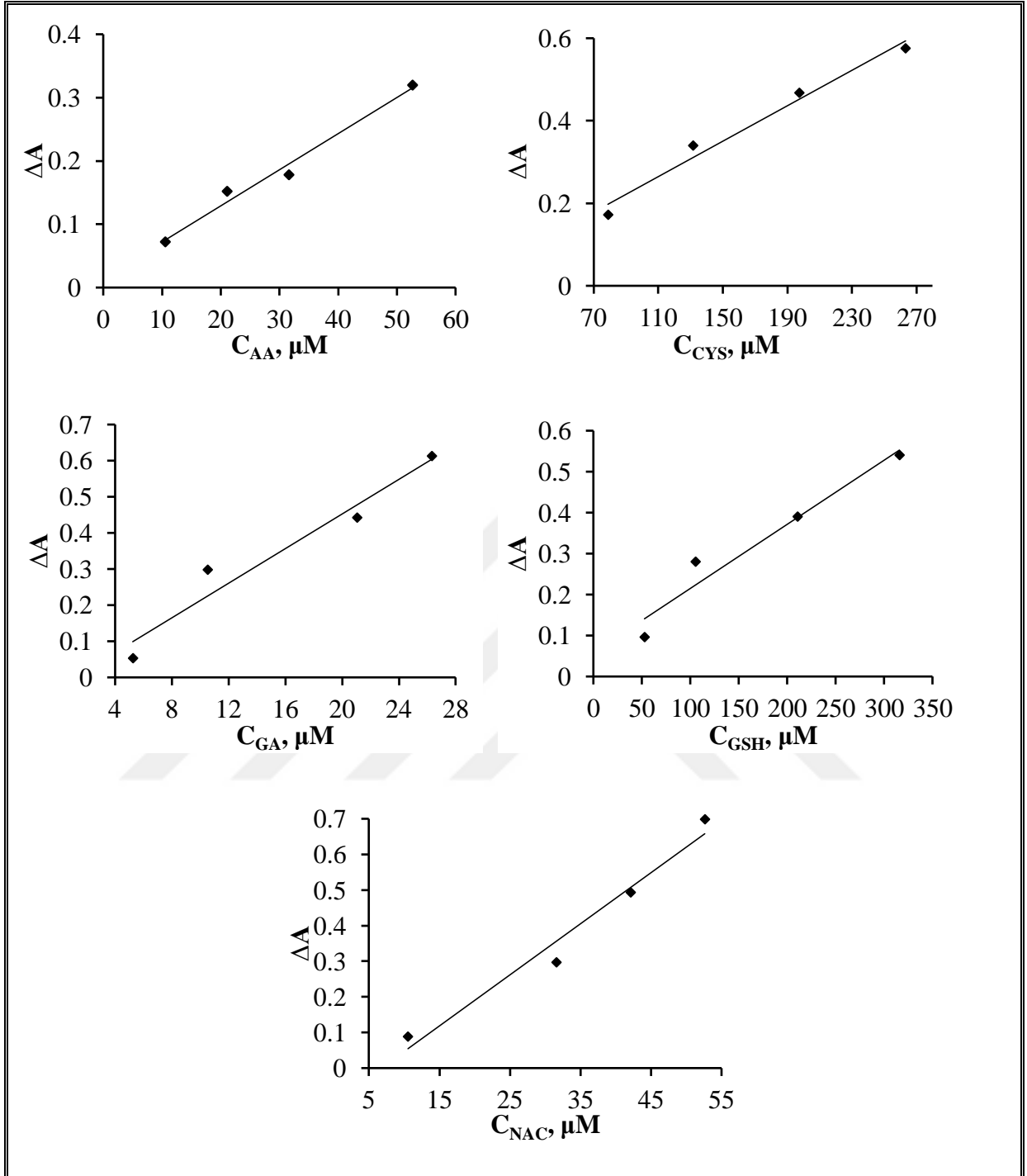
Şekil 4.4: Kazein konsantrasyonu (mg mL⁻¹) ve karbonil yöntemi ile elde edilen absorbanlar arasında çizilen kalibrasyon eğrisi.

4.2.2.1. Kazeinin Karbonillenmesine Antioksidanların Koruyucu Etkisinin Belirlenmesi

Kazeinin oksidatif hasarına antioksidanların koruyucu etkisini incelemek için kazein ve farklı konsantrasyonlarda antioksidan içeren karışımlar Fenton sisteminde oksitlenerek meydana gelen karbonil ürünlerinin azalması ölçüldü. Bu kapsamda kullanılan antioksidanların molekül yapısı, çalışma konsantrasyon aralığı ve antioksidanların doğru denklemleri Tablo 4.2'de ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Kazeinin oksidatif hasarı üzerine antioksidanların (AO) koruyucu etkilerinin karbonil tayini yöntemiyle belirlenmesi.

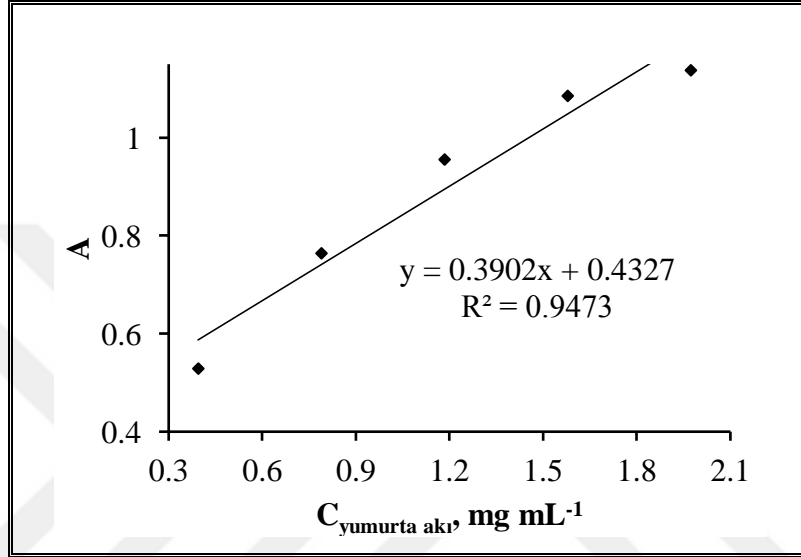
AO	Molekül yapısı	Çalışma Konsantrasyonu	Doğru denklemi
AA		$1,05 \times 10^{-5} \text{M} - 5,26 \times 10^{-5} \text{M}$	$\Delta A = 0,57 \times 10^4 C + 0,015;$ $R^2 = 0,98$
CYS		$7,89 \times 10^{-5} \text{M} - 2,63 \times 10^{-4} \text{M}$	$\Delta A = 0,21 \times 10^4 C + 0,028;$ $R^2 = 0,98$
GA		$5,26 \times 10^{-6} \text{M} - 2,63 \times 10^{-5} \text{M}$	$\Delta A = 2,4 \times 10^4 C - 0,028;$ $R^2 = 0,95$
GSH		$5,26 \times 10^{-5} \text{M} - 3,16 \times 10^{-4} \text{M}$	$\Delta A = 0,16 \times 10^4 C + 0,059;$ $R^2 = 0,95$
NAC		$1,05 \times 10^{-5} \text{M} - 5,26 \times 10^{-5} \text{M}$	$\Delta A = 1,43 \times 10^4 C - 0,096;$ $R^2 = 0,97$



Şekil 4.5: Kazeinin karbonillenmesine antioksidanların engelleyici etkilerinin incelenmesi amacıyla antioksidanların artan konsantrasyonları ile oksidasyon ürünlerinin absorbanısında oluşan azalma (ΔA) arasında çizilen kalibrasyon eğrileri.

4.2.3. Protein Karbonil Tayini Yönteminin Gerçek Örneğe Uygulanması

Tez kapsamında protein karbonil tayini için geliştirilen yöntem standart protein örneklerine uygulandıktan sonra yumurta akı proteini gerçek örnek olarak kullanıldı. Konsantrasyonu 0,15 g/mL olacak şekilde hazırlanmış yumurta akı proteini örneğinden 0,1 – 0,5 mL arasında değişen hacimler alınarak denemeler yapıldı. Yumurta akı proteinin oksidatif hasarı sonucu oluşan protein karbonillerin için elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.6’da gösterilmiştir.

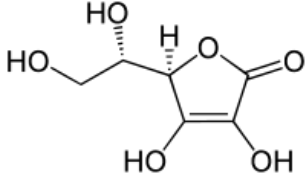
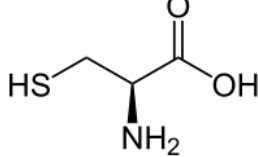
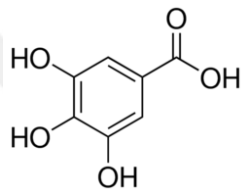
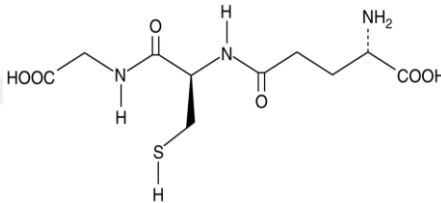
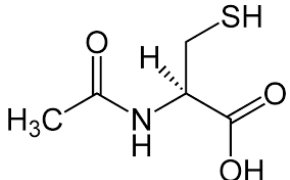


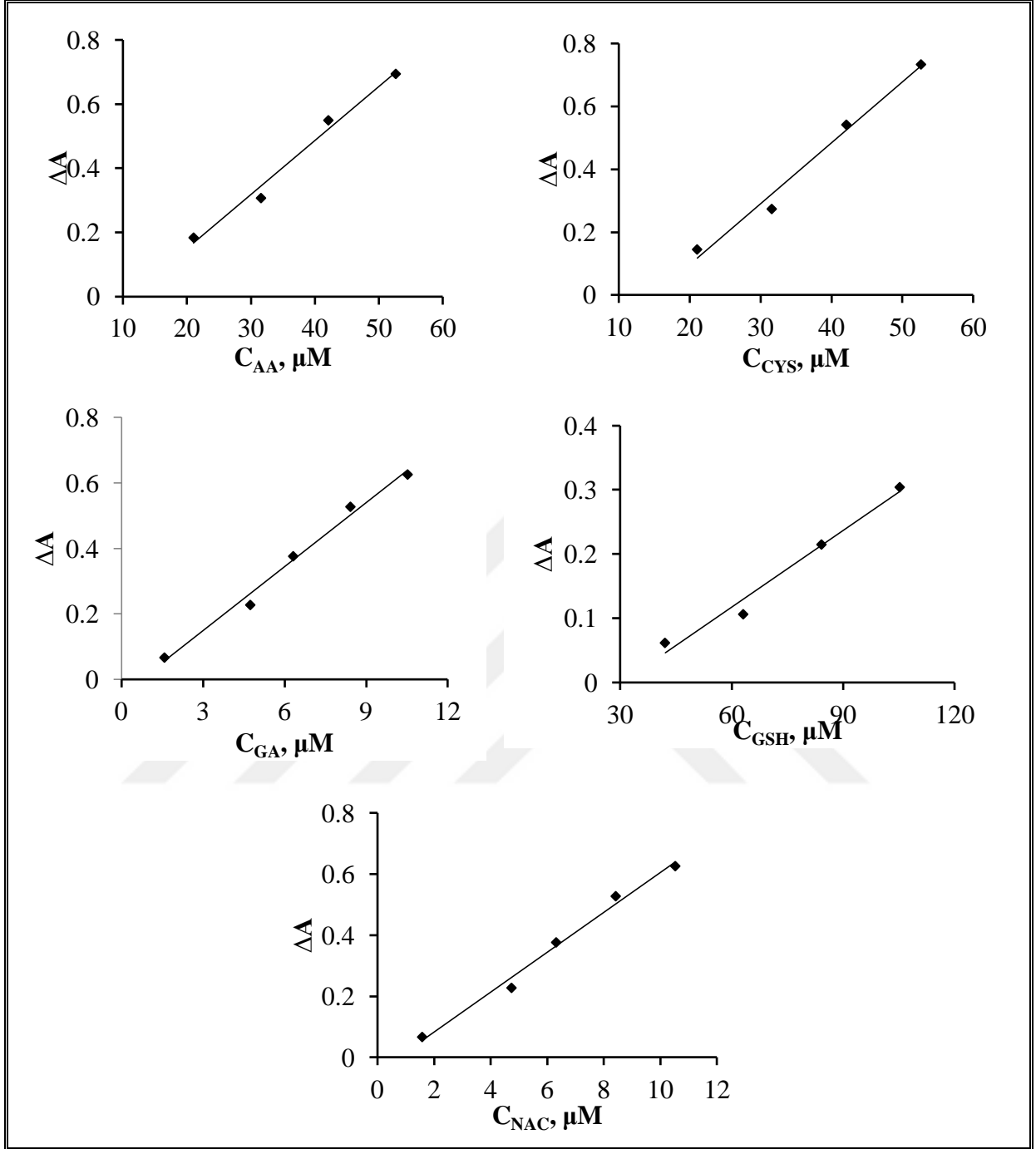
Şekil 4.6: Yumurta akı miktarı (mg mL⁻¹) ve karbonil yöntemi ile elde edilen absorpsiyonlar arasında çizilen kalibrasyon eğrisi.

4.2.3.1. Yumurta Akı Proteinin Karbonillemesine Antioksidanların Koruyucu Etkisinin İncelenmesi

Yumurta akı proteinin oksidatif hasarına antioksidanların koruyucu etkisini belirlemek için yumurta akı ve farklı konsantrasyonlarda antioksidan içeren karışımlar Fenton sisteminde oksitlenerek meydana gelen karbonil ürünlerindeki azalma ölçüldü. Bu kapsamda kullanılan antioksidanların molekül yapısı, çalışma aralığı ve antioksidanların doğru denklemleri Tablo 4.3’de ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Yumurta akı proteininin oksidatif hasarı üzerine antioksidanların (AO) koruyucu etkilerinin karbonil tayin yöntemiyle belirlenmesi.

AO	Molekül yapısı	Çalışma konsantrasyonu	Doğru denklemi
AA		$2,11 \times 10^{-5} \text{M} - 5,26 \times 10^{-5} \text{M}$	$\Delta A = 1,69 \times 10^4 C - 0,188;$ $R^2 = 0,98$
CYS		$2,11 \times 10^{-5} \text{M} - 5,26 \times 10^{-5} \text{M}$	$\Delta A = 1,93 \times 10^4 C - 0,2885;$ $R^2 = 0,98$
GA		$1,58 \times 10^{-6} \text{M} - 1,05 \times 10^{-5} \text{M}$	$\Delta A = 6,51 \times 10^4 C - 0,046;$ $R^2 = 0,99$
GSH		$4,21 \times 10^{-5} \text{M} - 1,05 \times 10^{-4} \text{M}$	$\Delta A = 0,4 \times 10^4 C - 0,121;$ $R^2 = 0,98$
NAC		$1,05 \times 10^{-5} \text{M} - 5,26 \times 10^{-5} \text{M}$	$\Delta A = 1,15 \times 10^4 C - 0,087;$ $R^2 = 0,97$



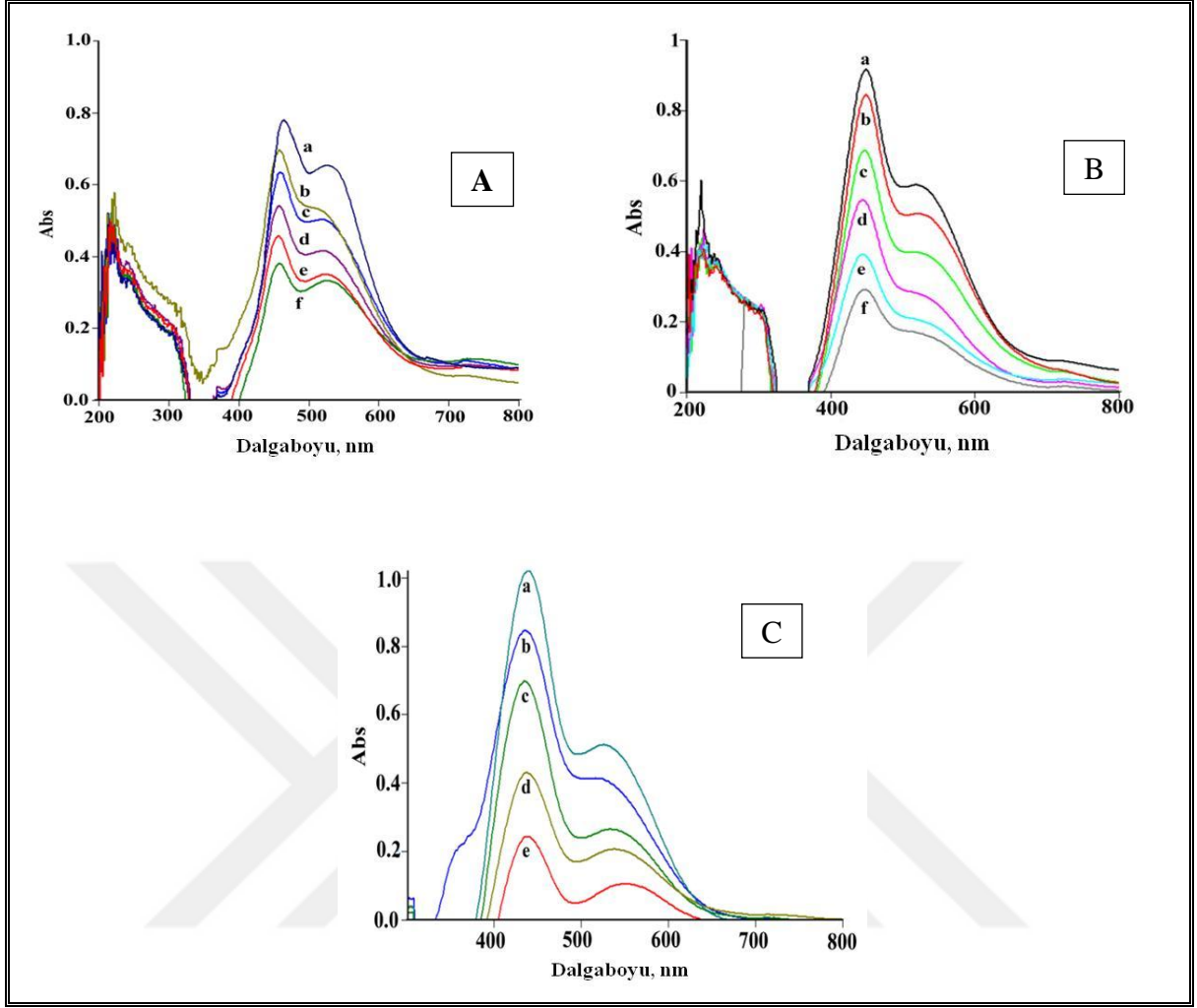
Şekil 4.7: Yumurta akı proteinlerinin karbonillenmesine antioksidanların engelleyici etkilerinin incelenmesi amacıyla antioksidanların artan konsantrasyonları ile oksidasyon ürünlerinin absorbansında oluşan azalma (ΔA) arasında çizilen kalibrasyon eğrileri.

4.3. KARBONİL TAYİNİ YÖNTEMİNİN MAKSİMUM ABSORBANS VERDİĞİ DALGABOYUNA PROTEİN VE ANTİOKSİDANLARIN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Tez kapsamında proteinlerin oksidatif hasarından meydana gelen karbonil grubunun tayini için modifiye edilerek geliştirilen yöntemin maksimum absorbands verdiği dalgaboyu (λ_{\max}) tezin 4.1 kısmında 450 nm olarak bulunmuştur. Fakat yöntem, çeşitli protein ve antioksidan içeren sistemlere uygulandığında (bölüm 4.2) protein ve antioksidanların herhangi bir bozucu etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla bütün deneysel çözeltiler UV-görünür alan spektrofotometrede 200 – 800 nm dalgaboyu aralığında tarandı ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.4 ve Şekil 4.8’de verildi.

Tablo 4.4: Protein karbonil tayini yönteminin λ_{\max} değeri protein ve ilave edilen AO maddeye göre değişimi.

	λ_{\max} (ortalama)
Proteinler	
BSA	453 nm
CAS	441 nm
Yumurta akı proteini	450 nm
Antioksidanlar	
AA	447 nm
CYS	454 nm
GA	446 nm
GSH	451 nm
NAC	449 nm



Şekil 4.8: Protein oksidasyonuna karşı antioksidanların hidroksil radikal süpürücü aktivelerinin belirlenmesi denemelerinde elde edilen spektrumlar. Şekil 4.8 (A) 5.0×10^{-4} M CYS'den alınan 0; 0,5; 1,1; 1,3; 1,7 ve 2,0 mL'lik örnekler varlığında, BSA için (B) 2.0×10^{-4} M GA'ten alınan 0; 0,3; 0,9; 1,2; 1,6 ve 2,0 mL'lik örnekler varlığında, yumurta akı için, (C) 1.0×10^{-2} M GSH çözeltisinden 0; 0,2; 0,4; 0,8 ve 1,2 mL'lik örnekler varlığında, kazein için oksidatif hasar sonucu oluşan protein karbonillerinden kaynaklanan absorbans azalması.

4.4. PROTEİNLERİN OKSİDATİF HASARININ BELİRLENMESİ İÇİN CUPRAC YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

Çalışmada kullanılan modifiye CUPRAC yöntemi daha önce hidroksil radikali tayininde ve DNA'nın oksidatif hasarının belirlenmesi için kullanılmıştır (Uzunboy et al. 2017). Proteinin oksidatif hasarının belirlenmesinde modifiye CUPRAC yönteminin uygulanması için birkaç değişiklik yapıldı. Bunlar, DNA probunun yerine protein probunun kullanılması ve amonyum asetat tamponu yerine üre tamponu kullanılmasıdır (Cekic et al., 2012). Protein örnekleri Fenton sistemiyle oksitlendikten sonra reaksiyon TCA ile duruldu ve protein hasarından meydana gelen CUPRAC yöntemine cevap veren ürünlerin protein çözeltisinin üstte kalan

berrak kısmında bulunduğu deneysel olarak belirlendi. TCA eklendikten sonra oluşan proteinin çökeltisi çözücü tampon (pH=6,8) ile çözüldükten sonra modifiye CUPRAC yöntemi uygulandığında reaksiyonun gerçekleşmediği görüldü. Oksitlenmemiş ya da sağlam protein örnekleri kontrol örneği olarak modifiye CUPRAC yöntemine maruz bırakıldı ve proteinlerin kendisinin kullanılan konsantrasyonlarda CUPRAC reaktif olmadığı ve absorban değerlerinin 0,05'den az olduğu görüldü.

4.4.1. Proteinlerin Oksidatif Hasarınının CUPRAC Yöntemiyle Belirlenmesi

Tez kapsamında kullanılan standart proteinler olan BSA ve kazeine modifiye CUPRAC yöntemi uygulanarak, proteinlerin oksidatif hasarı sonucu oluşan ürünler saptandı. Bundan sonra, modifiye CUPRAC yöntemi gerçek örnek olarak yumurta akı proteinine de uygulandı. Tablo 4.5'te Fenton reaksiyonuyla meydana gelen hidroksil radikallerinin neden olduğu proteinlerin oksidatif hasarı modifiye CUPRAC yöntemiyle belirlenerek elde edilen sonuçlar özetlendi.

Tablo 4.5: Proteinlerin oksidatif hasarınının CUPRAC yöntemiyle belirlenmesi.

Protein	Çalışma Konsantrasyonu, mg mL ⁻¹	Doğru denklemi
BSA	0,040 – 0,202	A = 4,61 C - 0,118; R ² = 0,97
Kazein	0,032 – 0,081	A = 15,28 C - 0,255; R ² = 0,95
Yumurta akı proteini	1,212 – 3,030	A = 0,26 C - 0,073; R ² = 0,96

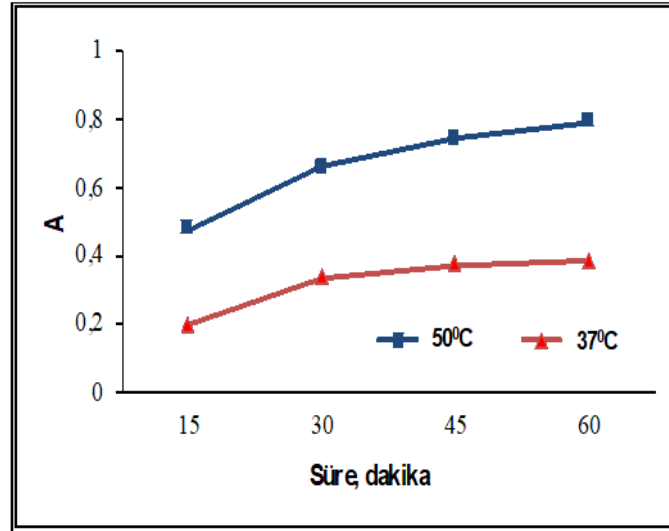
Tablo 4.6: Proteinlerin oksidatif hasarı üzerine antioksidanların (AO) koruyucu etkilerinin CUPRAC yöntemiyle belirlenmesi.

Protein	AO	Çalışma konsantrasyonu	Doğru denklemi
BSA (C= 0,202 mg mL ⁻¹)	AA	$8,08 \times 10^{-6}M - 3,23 \times 10^{-5}M$	$\Delta A = 1,2 \times 10^4 C + 0,124; R^2 = 0,96$
	CYS	$8,08 \times 10^{-6}M - 2,63 \times 10^{-5}M$	$\Delta A = 2,9 \times 10^4 C + 0,144; R^2 = 0,95$
	GA	$5,66 \times 10^{-6}M - 1,62 \times 10^{-5}M$	$\Delta A = 3,1 \times 10^4 C + 0,179; R^2 = 0,95$
	GSH	$1,62 \times 10^{-5}M - 8,08 \times 10^{-5}M$	$\Delta A = 0,8 \times 10^4 C + 0,013; R^2 = 0,97$
	NAC	$8,08 \times 10^{-6}M - 3,23 \times 10^{-5}M$	$\Delta A = 2,8 \times 10^4 C + 0,005; R^2 = 0,96$
Kazein (C= 0,081 mg mL ⁻¹)	AA	$4,04 \times 10^{-6}M - 4,04 \times 10^{-5}M$	$\Delta A = 1,6 \times 10^4 C + 0,005; R^2 = 0,95$
	CYS	$8,08 \times 10^{-6}M - 4,04 \times 10^{-5}M$	$\Delta A = 1,7 \times 10^4 C + 0,286; R^2 = 0,95$
	GA	$1,62 \times 10^{-6}M - 8,08 \times 10^{-6}M$	$\Delta A = 6,7 \times 10^4 C + 0,057; R^2 = 0,97$
	GSH	$3,23 \times 10^{-5}M - 1,29 \times 10^{-4}M$	$\Delta A = 0,7 \times 10^4 C + 0,013; R^2 = 0,95$
	NAC	$8,08 \times 10^{-6}M - 3,03 \times 10^{-5}M$	$\Delta A = 1,8 \times 10^4 C + 0,068; R^2 = 0,97$
Yumurta akı protein (C= 3,030 mg mL ⁻¹)	AA	$8,08 \times 10^{-6}M - 3,23 \times 10^{-5}M$	$\Delta A = 1,8 \times 10^4 C + 0,137; R^2 = 0,96$
	CYS	$8,08 \times 10^{-6}M - 3,23 \times 10^{-5}M$	$\Delta A = 2,0 \times 10^4 C - 0,130; R^2 = 0,98$
	GA	$3,23 \times 10^{-6}M - 1,62 \times 10^{-5}M$	$\Delta A = 4,7 \times 10^4 C + 0,011; R^2 = 0,99$
	GSH	$2,83 \times 10^{-5}M - 8,08 \times 10^{-5}M$	$\Delta A = 0,9 \times 10^4 C - 0,189; R^2 = 0,97$
	NAC	$4,04 \times 10^{-6}M - 1,62 \times 10^{-5}M$	$\Delta A = 1,4 \times 10^4 C + 0,1272; R^2 = 0,97$

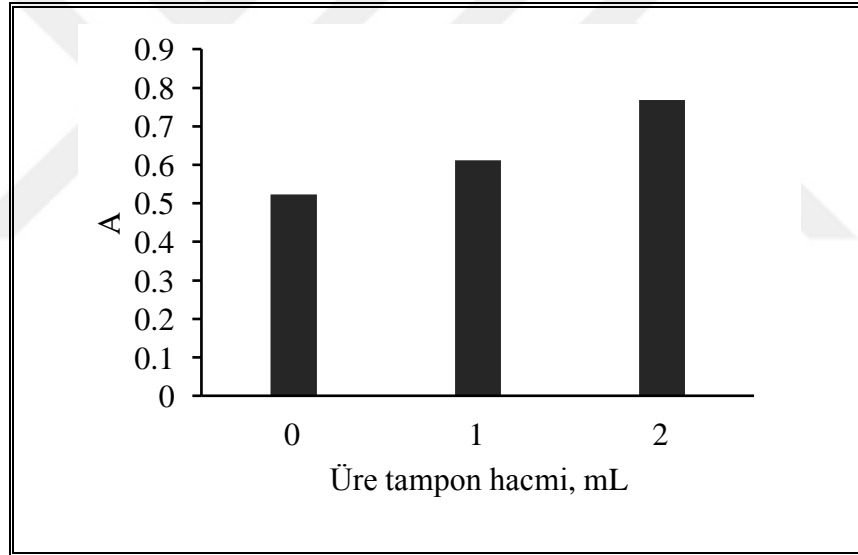
4.5. OKSİDATİF PROTEİN HASARI VE ANTIOKSİDANLARIN ÖNLEYİCİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ İÇİN OPTİK SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

4.5.1. Optimal Koşullarının Belirlenmesi

Tez kapsamında CUPRAC yöntemi esaslı olarak gıdalarda ve serumda toplam antioksidan kapasite ölçümü için geliştirilmiş moleküler spektroskopik sensör, birtakım değişiklikler yapılarak kullanılmıştır (Bener ve diğ. 2013). Cu(II)-Nc veya CUPRAC reaktifinin nasyon membran üzerine tutturulma süresi olan 30 dakika 45 dakika olarak (Şekil 4.10) değiştirildi ve CUPRAC reaktifi (Cu(II)-Nc) tutturulmuş olan nasyon membran, oksitlenmiş protein belirteci olarak kullanıldı ve böylece proteinlerin oksidatif hasarının belirlenmesinde CUPRAC sensörü elde edilmiş oldu. Ayrıca bu çalışmada kullanılan modifiye CUPRAC reaksiyonu çözeltide 37°C sıcaklığında yapılırken CUPRAC sensörü yüzeyindeki tayini için bu sıcaklık 50°C olarak değiştirildi (Şekil 4.9). CUPRAC sensörünün hazırlanması için amonyum asetat tamponu ve elde edilen sensörün protein probunda kullanılması için üre tamponu olmak üzere iki çeşit tampon kullanıldı (Şekil 4.10).



Şekil 4.9: CUPRAC reaktifinin nafyon membran yüzeyine tutturulma süresi ve elde edilen CUPRAC sensörü ile proteinin oksidatif hasarının belirlenmesi için sıcaklık denemesi.



Şekil 4.10: CUPRAC sensörü ile proteinin oksidatif hasarının tayini için kullanılan üre tamponu miktarının belirlenmesi (Üre tampon hacminin 0 mL olarak gösterilen denemede üre tamponu yerine 2,0 mL NH_4Ac tamponu kullanılmıştır).

4.5.2. Optik Sensör Yüzeyinde Proteinlerin Oksidatif Hasarının Belirlenmesi

Standart (BSA ve kazein) ve gerçek (yumurta akı proteini) protein örneklerinden Tablo 4.7’de özetlenen çalışma konsantrasyon aralığında bulunacak şekilde alınıp Fenton sistemiyle hasara uğratıldığında meydana gelen ürünlerin tayini için bu çalışmanın 4.5.1 kısmında belirtilen optimum koşullarda CUPRAC sensörü uygulanarak elde edilen sonuçlar aşağıda verildi.

Tablo 4.7: Oksidatif protein hasarının CUPRAC sensör ile belirlenmesiyle elde edilen sonuçlar.

Protein	Çalışma konsantrasyonu, mg mL ⁻¹	Doğru denklemi
BSA	0,040 – 0,202	A = 4,89 C - 0,1917; R ² = 0,981
Kazein	0,032 – 0,081	A = 13,35 C - 0,221; R ² = 0,987
Yumurta akı proteini	0,606 – 3,030	A = 0,27 C - 0,068; R ² = 0,953

4.5.2.1. Antioksidanların Proteinlerin Oksidatif Hasarı Üzerine Koruyucu Etkilerinin Optik Sensör Yüzeyinde Belirlenmesi

Antioksidanların oksidatif protein hasarını engelleyici etkisinin CUPRAC sensörü ile tayini sonuçları Tablo 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.8: CUPRAC sensörü ile oksidatif protein hasarına antioksidanların (AO) önleyici etkisinin belirlenmesi.

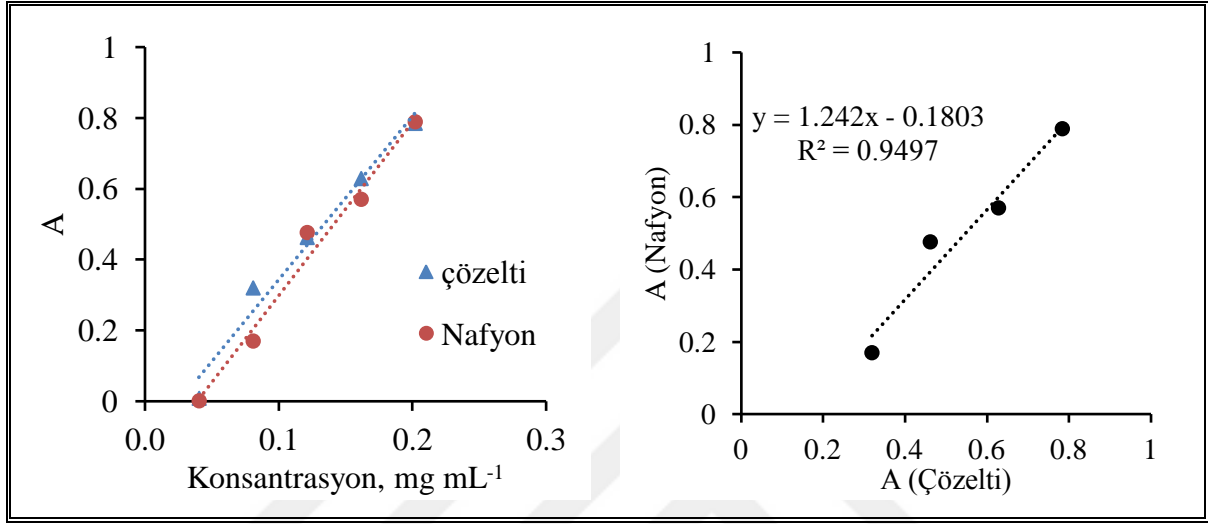
Protein	AO	Çalışma Aralığı	Doğru denklemi
BSA (C= 0,202 mg mL ⁻¹)	AA	8,08×10 ⁻⁶ M – 4,04×10 ⁻⁵ M	ΔA = 2,1×10 ⁴ C + 0,017; R ² = 0,95
	CYS	8,08×10 ⁻⁶ M – 4,04×10 ⁻⁵ M	ΔA = 2,7×10 ⁴ C + 0,181; R ² = 0,99
	GA	3,23×10 ⁻⁶ M – 1,62×10 ⁻⁵ M	ΔA = 4,1×10 ⁴ C + 0,337; R ² = 0,95
	GSH	1,62×10 ⁻⁵ M – 6,46×10 ⁻⁵ M	ΔA = 0,9×10 ⁴ C + 0,245; R ² = 0,98
	NAC	8,08×10 ⁻⁶ M – 4,04×10 ⁻⁵ M	ΔA = 1,7×10 ⁴ C + 0,363; R ² = 0,97
Kazein (C= 0,081 mg mL ⁻¹)	AA	8,08×10 ⁻⁶ M – 3,23×10 ⁻⁵ M	ΔA = 1,9×10 ⁴ C + 0,141; R ² = 0,96
	CYS	8,08×10 ⁻⁶ M – 3,03×10 ⁻⁵ M	ΔA = 2,1×10 ⁴ C + 0,115; R ² = 0,98
	GA	1,62×10 ⁻⁶ M – 8,08×10 ⁻⁶ M	ΔA = 5,9×10 ⁴ C + 0,123; R ² = 0,99
	GSH	3,23×10 ⁻⁵ M – 1,05×10 ⁻⁴ M	ΔA = 0,5×10 ⁴ C + 0,201; R ² = 0,96
	NAC	8,08×10 ⁻⁶ M – 2,63×10 ⁻⁵ M	ΔA = 2,0 ×10 ⁴ C + 0,086; R ² = 0,94
Yumurta akı protein (C= 3,030 mg mL ⁻¹)	AA	8,08×10 ⁻⁶ M – 2,63×10 ⁻⁵ M	ΔA = 2,7×10 ⁴ C – 0,013; R ² = 0,98
	CYS	8,08×10 ⁻⁶ M – 3,23×10 ⁻⁵ M	ΔA = 2,1×10 ⁴ C + 0,158; R ² = 0,97
	GA	5,66×10 ⁻⁶ M – 1,29×10 ⁻⁵ M	ΔA = 3,8×10 ⁴ C – 0,082; R ² = 0,98
	GSH	1,62×10 ⁻⁵ M – 6,46×10 ⁻⁵ M	ΔA = 0,7×10 ⁴ C – 0,035; R ² = 0,95
	NAC	4,04×10 ⁻⁶ M – 1,62×10 ⁻⁵ M	ΔA = 3,6×10 ⁴ C + 0,101; R ² = 0,99

4.5.3. Proteinlerin Oksidatif Hasarının CUPRAC Yöntemiyle Çözeltide ve Optik Sensör Yüzeyinde Elde Edilen Sonuçlarının Karşılaştırılması

Oksidatif protein hasarı ve antioksidanların önleyici etkisinin çözeltide modifiye CUPRAC yöntemiyle tayini ve CUPRAC sensör yüzeyinde belirlenmesiyle elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak Şekil 4.11 – Şekil 4.28’de gösterildi. Çift halinde verilen şekillerin sol tarafında proteinlerin oksidatif hasarını ve antioksidanların oksidatif protein hasarını engelleyici etkileri CUPRAC yöntemiyle çözeltide ve nasyon yüzeyinde belirlenerek aynı eksen üzerinde iki ayrı grafik şeklinde gösterildi. Şekillerin sağ tarafında ise, CUPRAC yöntemiyle çözeltide ve nasyon membran yüzeyinde elde edilen sonuçlar arasındaki

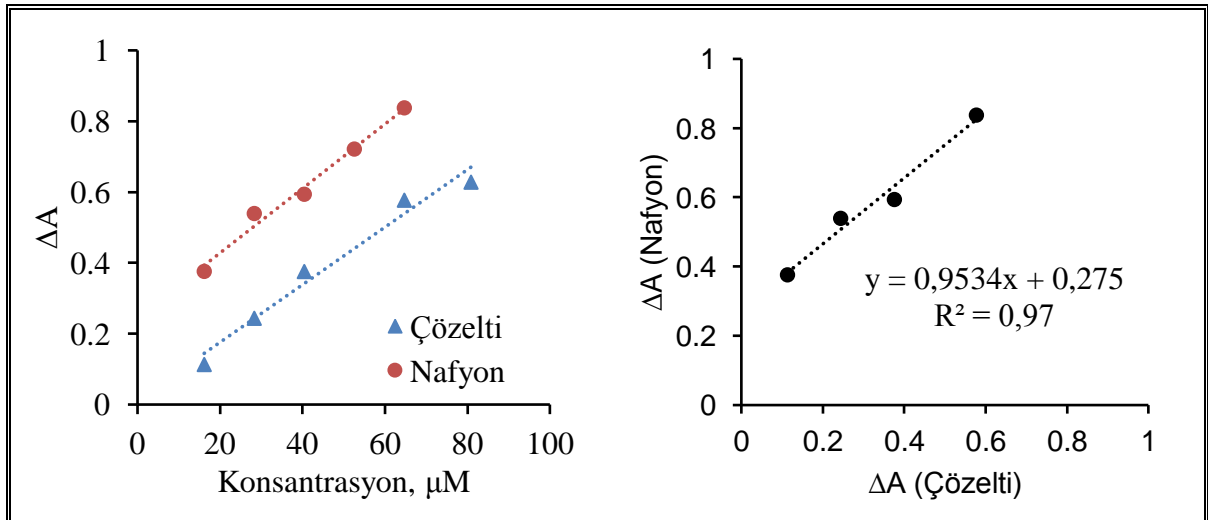
korelasyon gösterilmiştir. Bu amaçla aynı konsantrasyonda alınan örnekler için CUPRAC yöntemi çözelti fazında ve nafyon membran üzerinde uygulandı ve çözelti fazında elde edilen absorbanlar yatay eksene, membran üzerinde okunan absorbanlar düşey eksene konularak aralarındaki korelasyon incelendi.

4.5.3.1. BSA'nın Oksidatif Hasarının CUPRAC Yöntemiyle Belirlenmesi



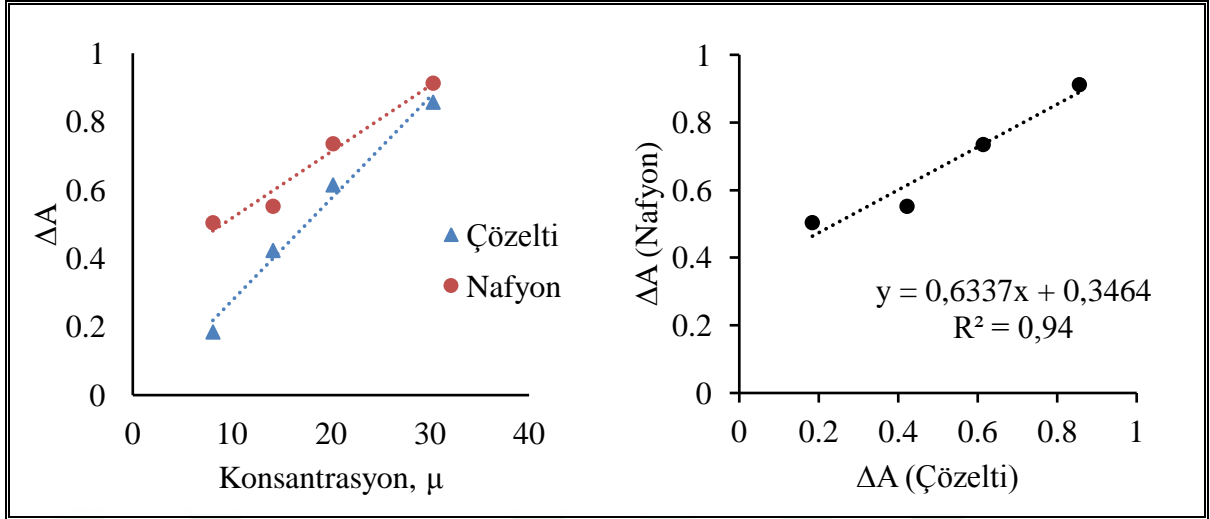
Şekil 4.11: BSA'nın oksidatif hasarının CUPRAC yöntemiyle çözeltide ve nafyon yüzeyinde belirlenmesi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.

4.5.3.2. BSA'nın Oksidatif Hasarı Üzerine GSH'nın Engelleyici Etkisi



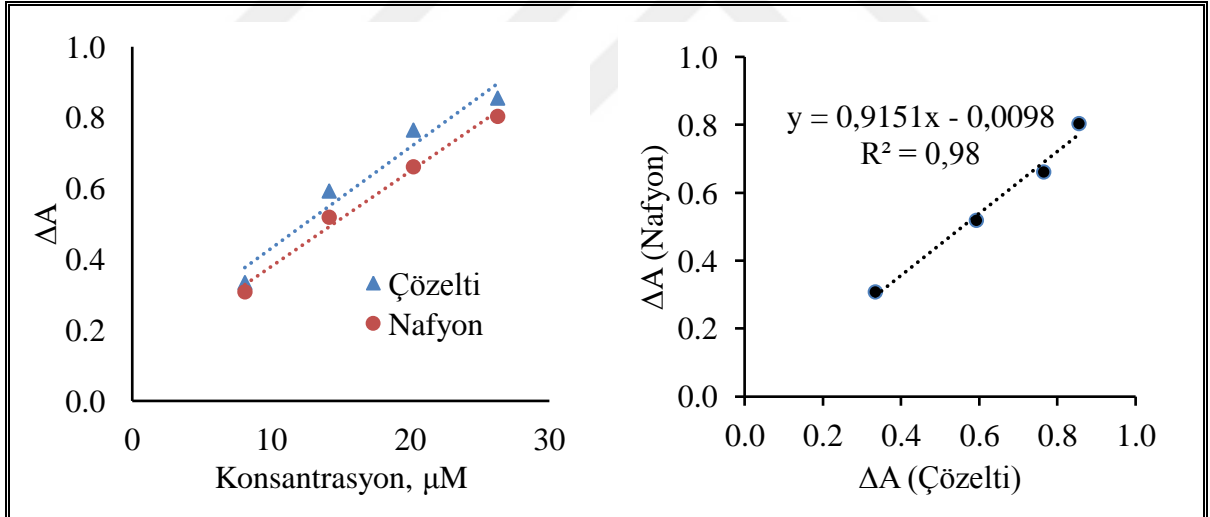
Şekil 4.12: BSA'nın oksidatif hasarı üzerine GSH'nın engelleyici etkisinin CUPRAC yöntemiyle çözeltide ve nafyon yüzeyinde belirlenmesi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.

4.5.3.3. BSA'nın Oksidatif Hasarı Üzerine NAC'nin Engelleyici Etkisi



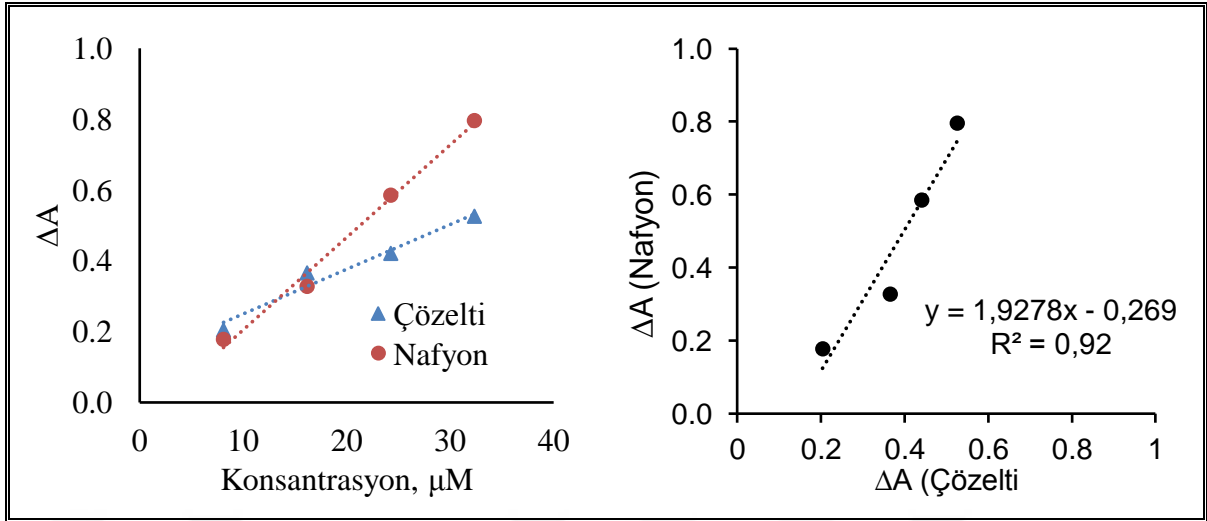
Şekil 4.13: BSA'nın oksidatif hasarı üzerine NAC'nin engelleyici etkisinin CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nafyon yüzeyinde belirlenmesi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.

4.5.3.4. BSA'nın Oksidatif Hasarı Üzerine CYS'nin Engelleyici Etkisi



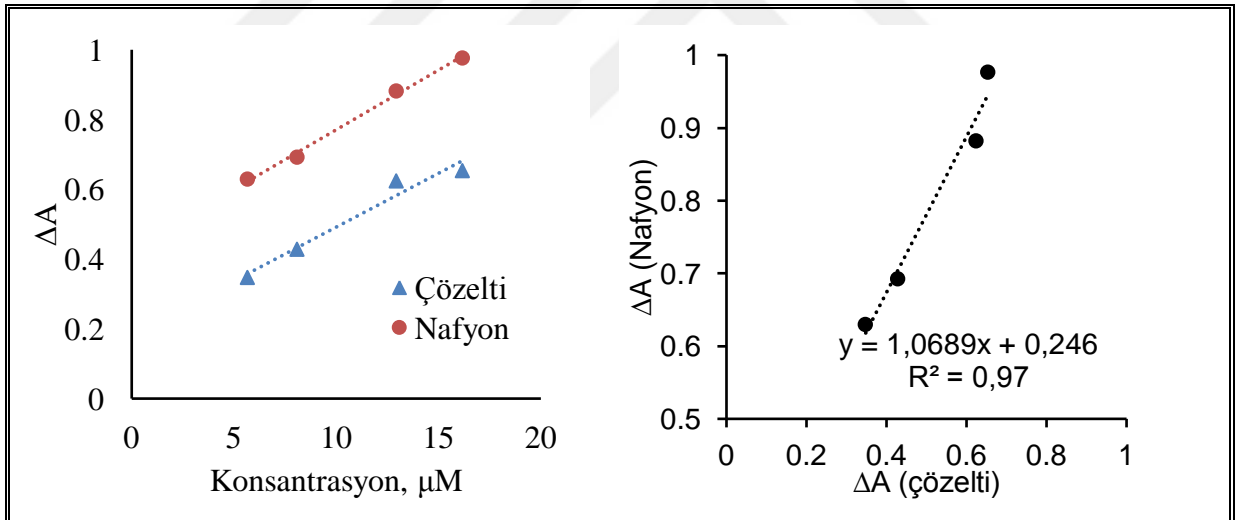
Şekil 4.14: BSA'nın oksidatif hasarı üzerine CYS'nin engelleyici etkisinin CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nafyon yüzeyinde belirlenmesi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.

4.5.3.5. BSA'nın oksidatif hasarı üzerine AA'in engelleyici etkisi



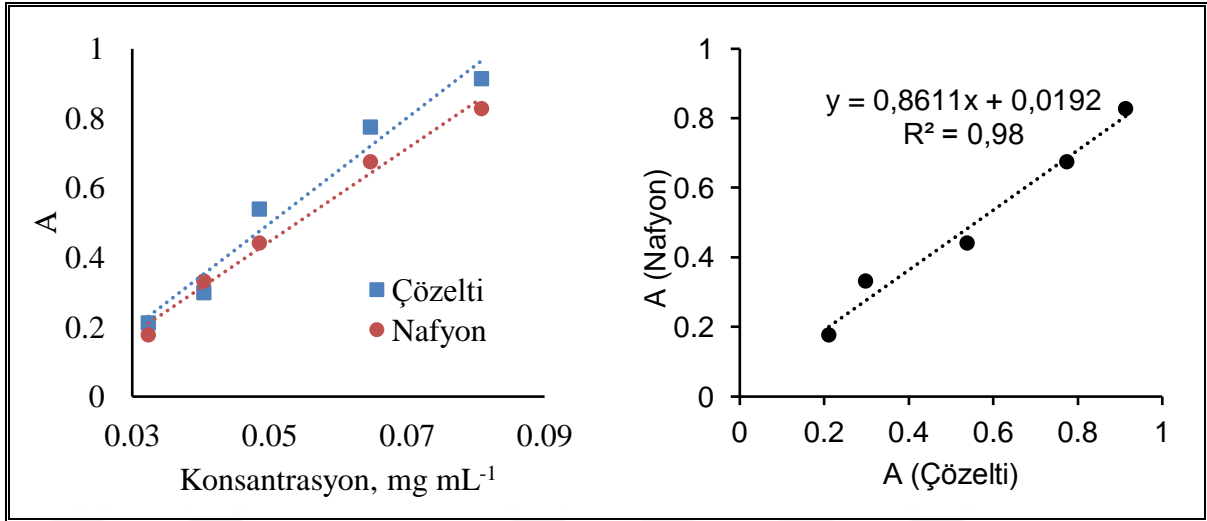
Şekil 4.15: BSA'nın oksidatif hasarı üzerine AA'in engelleyici etkisinin CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nafyon yüzeyinde belirlenmesi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.

4.5.3.6. BSA'nın Oksidatif Hasarı Üzerine GA'nin Engelleyici Etkisi



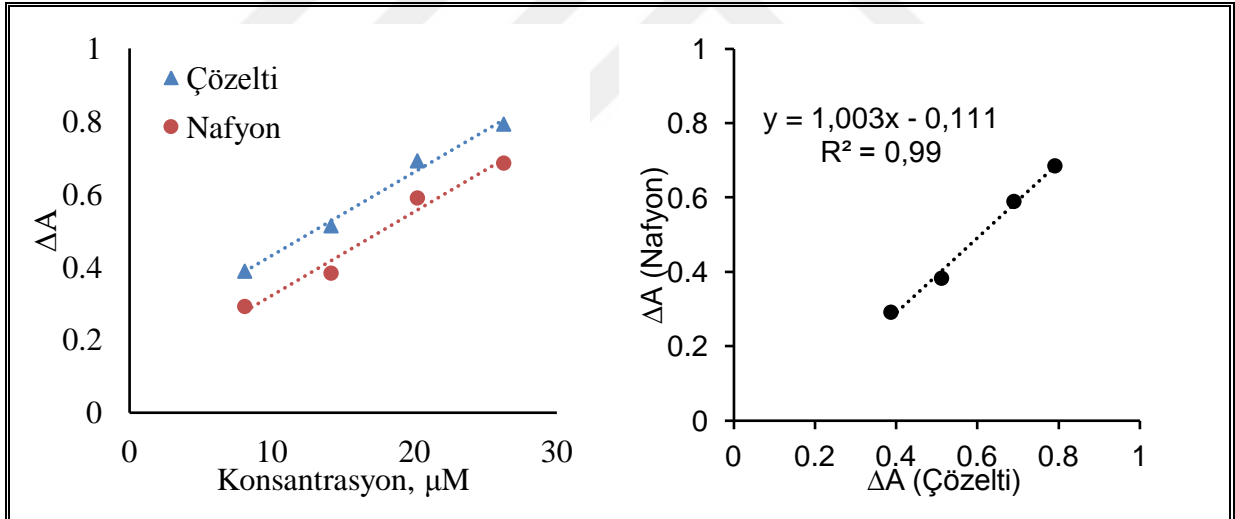
Şekil 4.16: BSA'nın oksidatif hasarı üzerine GA'nin engelleyici etkisinin CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nafyon yüzeyinde belirlenmesi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.

4.5.3.7. Kazein'in Oksidatif Hasarının CUPRAC Yöntemiyle Belirlenmesi



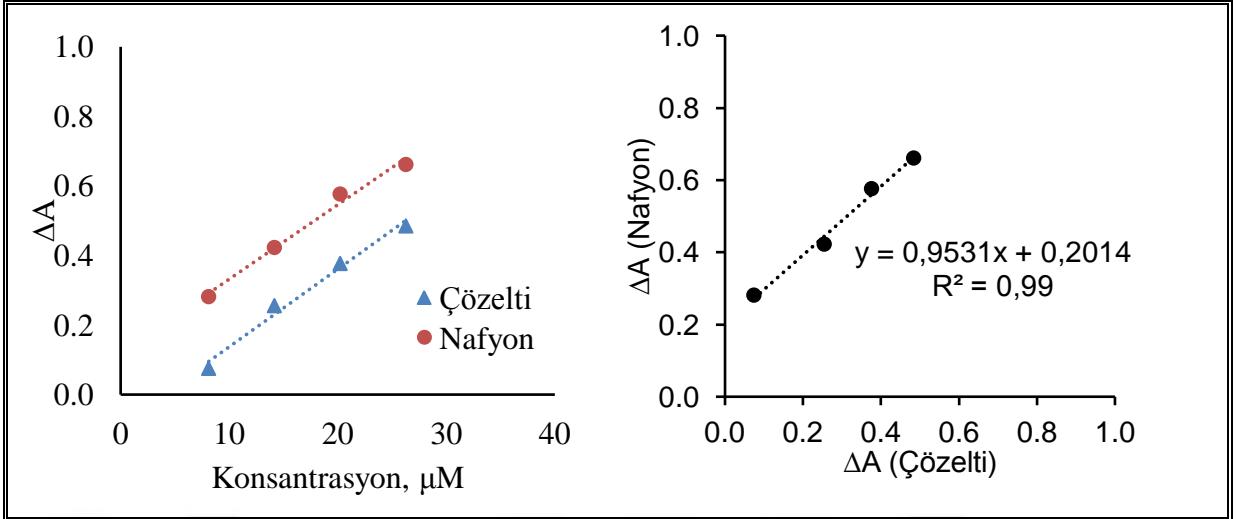
Şekil 4.17: Kazein'in oksidatif hasarının CUPRAC yöntemiyle belirlenmesinde çözeltide ve nafyon yüzeyinde elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.

4.5.3.8. Kazein'in Oksidatif Hasarı Üzerine CYS'nin Engelleyici Etkisi



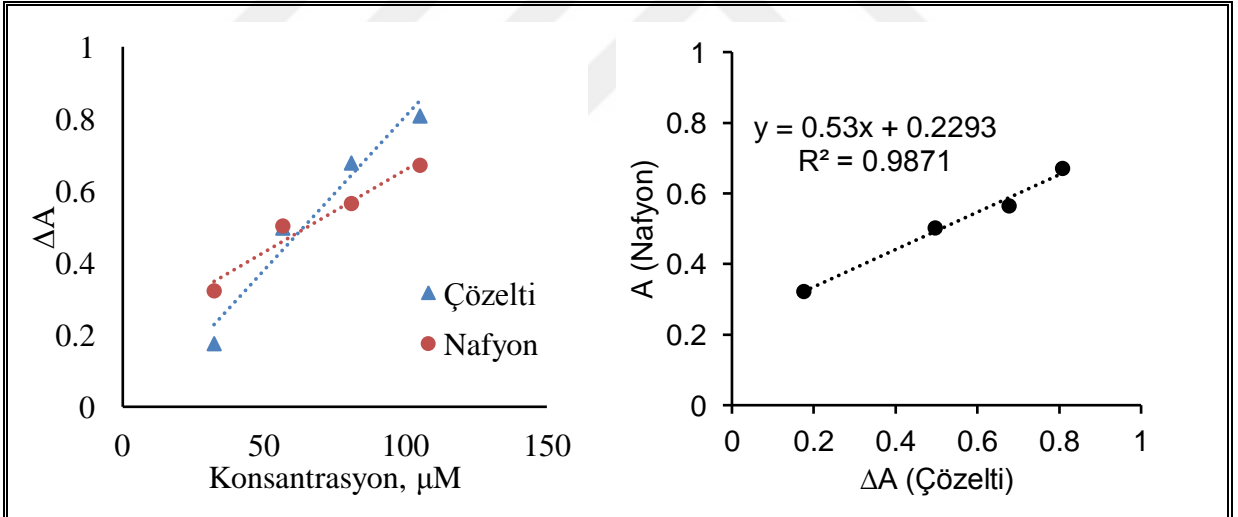
Şekil 4.18: Kazein'in oksidatif hasarı üzerine CYS'nin engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözeltide ve nafyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

4.5.3.9. Kazein'in Oksidatif Hasarı Üzerine AA'in Engelleyici Etkisi



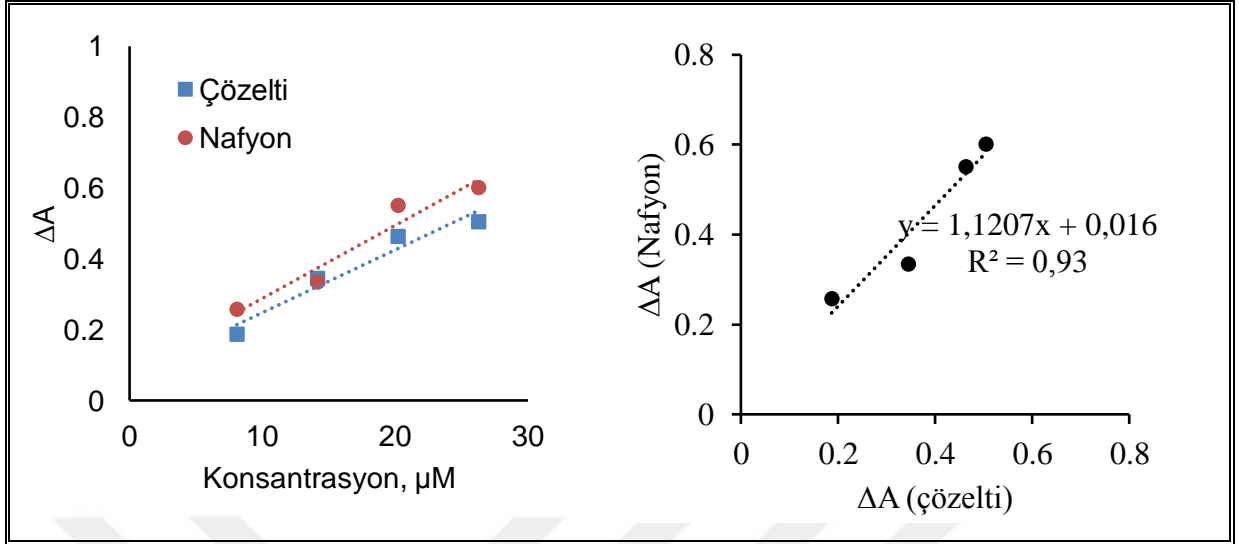
Şekil 4.19: Kazein'in oksidatif hasarı üzerine AA'in engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözeltide ve nafyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

4.5.3.10. Kazein'in Oksidatif Hasarı Üzerine GSH'ın Engelleyici Etkisi



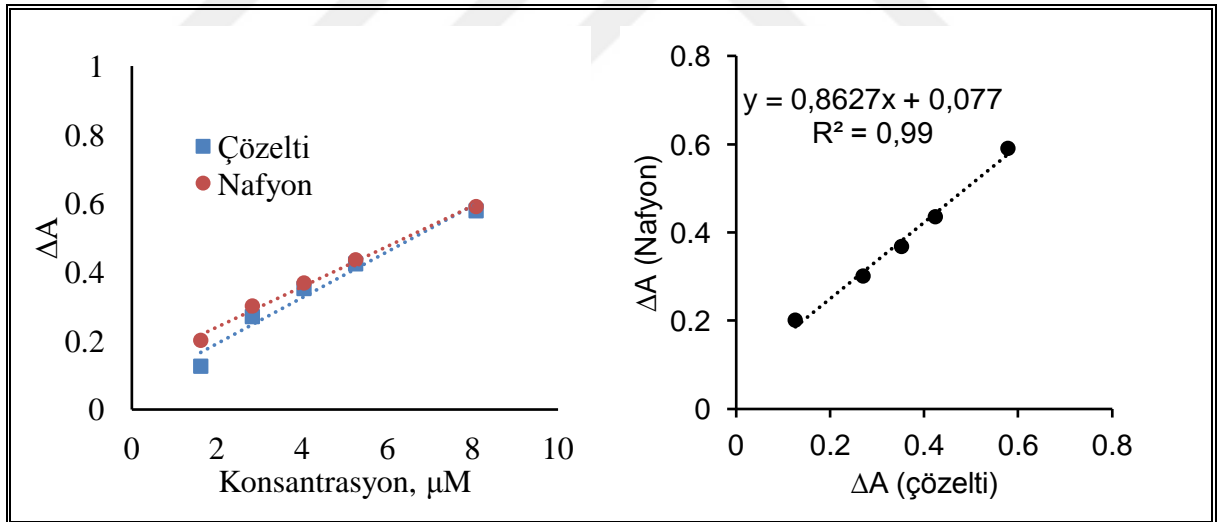
Şekil 4.20: Kazein'in oksidatif hasarı üzerine GSH'ın engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözeltide ve nafyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

4.5.3.11. Kazein'in Oksidatif Hasarı Üzerine NAC'in Engelleyici Etkisi



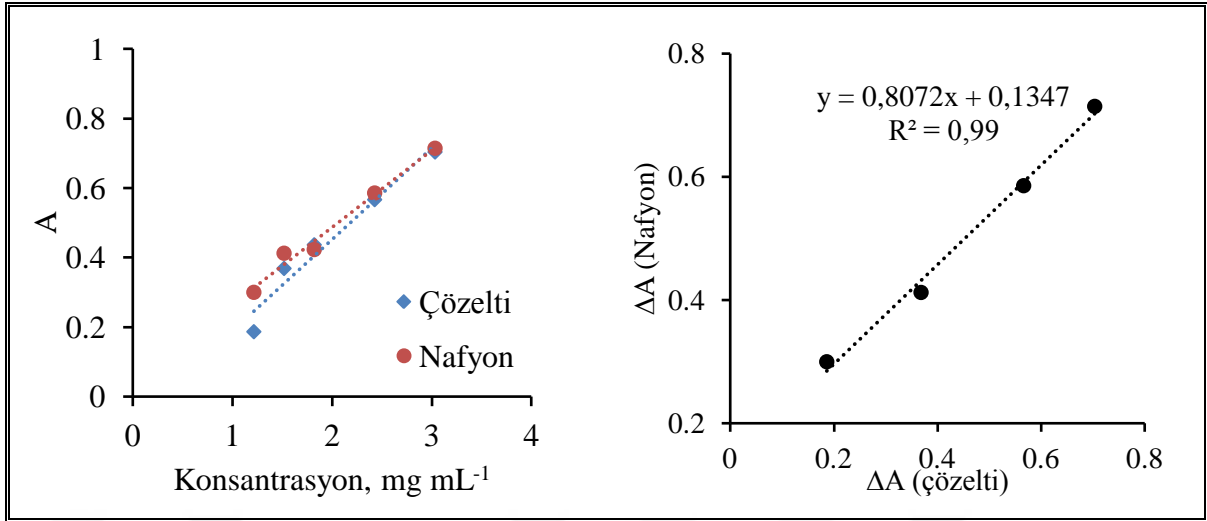
Şekil 4.21: Kazein'in oksidatif hasarı üzerine NAC'in engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözeltilde ve nafyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

4.5.3.12. Kazein'in Oksidatif Hasarı Üzerine GA'in Engelleyici Etkisi



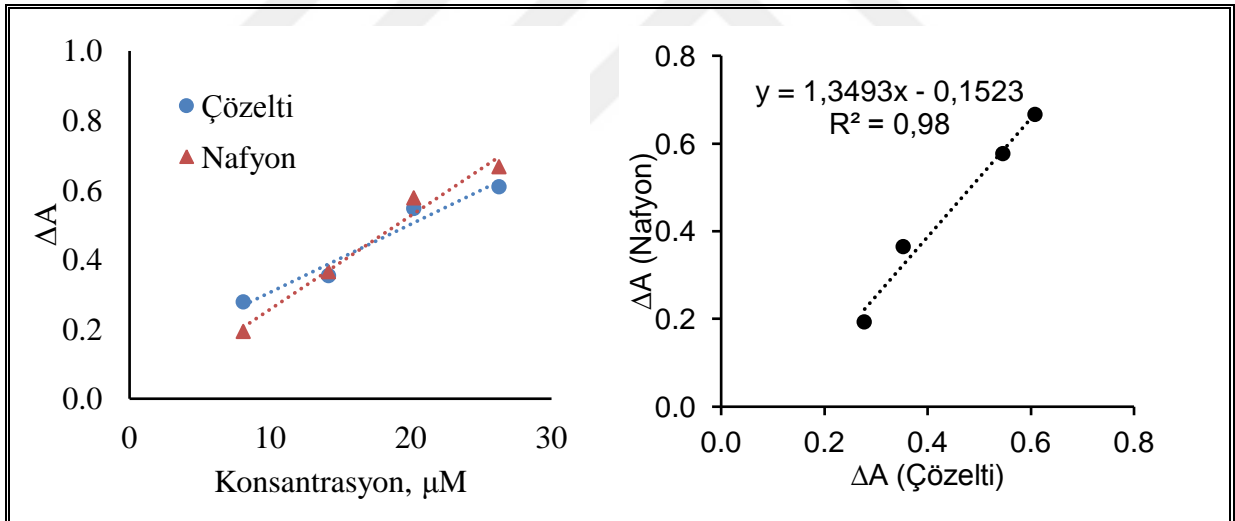
Şekil 4.22: Kazein'in oksidatif hasarı üzerine GA'in engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözeltilde ve nafyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

4.5.3.13. Yumurta Akı Proteininin Oksidatif Hasarının CUPRAC Yöntemiyle Belirlenmesi



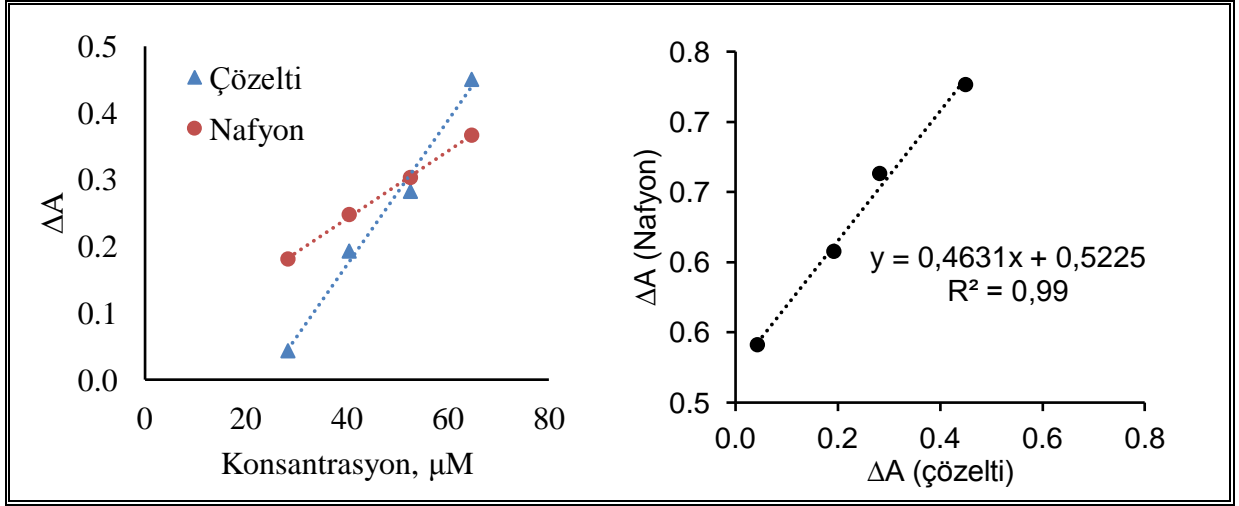
Şekil 4.23: Yumurta akı proteininin oksidatif hasarının belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözeltilde ve nafyon yüzeyinde elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.

4.5.3.14. Yumurta Akı Proteininin Oksidatif Hasarı Üzerine AA'in Engelleyici Etkisi



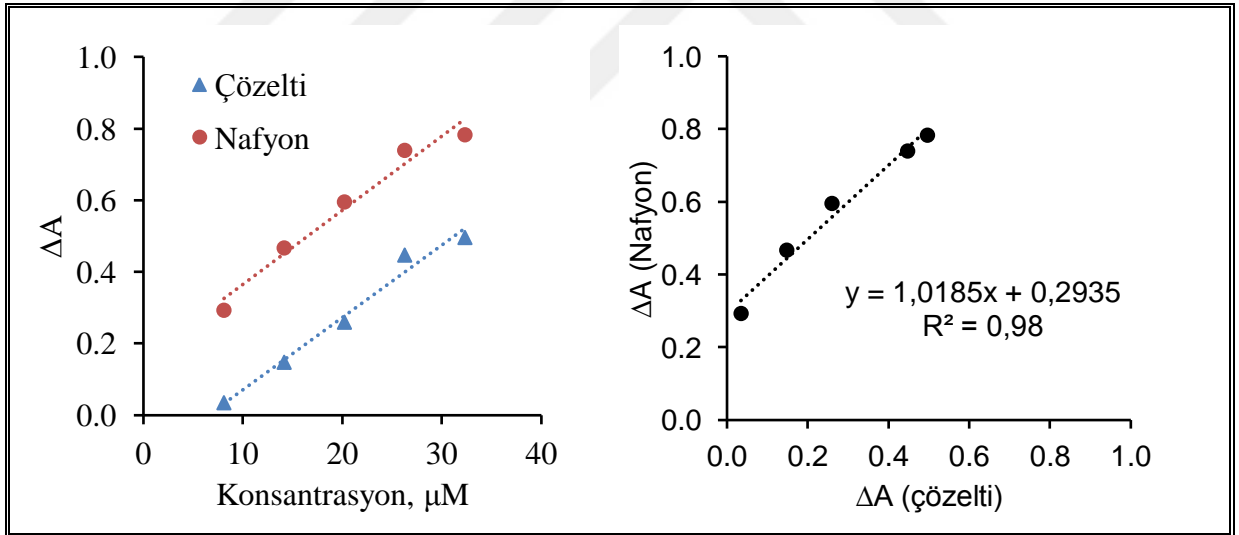
Şekil 4.24: Yumurta akı proteininin oksidatif hasarı üzerine AA'in engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözeltilde ve nafyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

4.5.3.15. Yumurta Akı Proteininin Oksidatif Hasarı Üzerine GSH'ın Engelleyici Etkisi



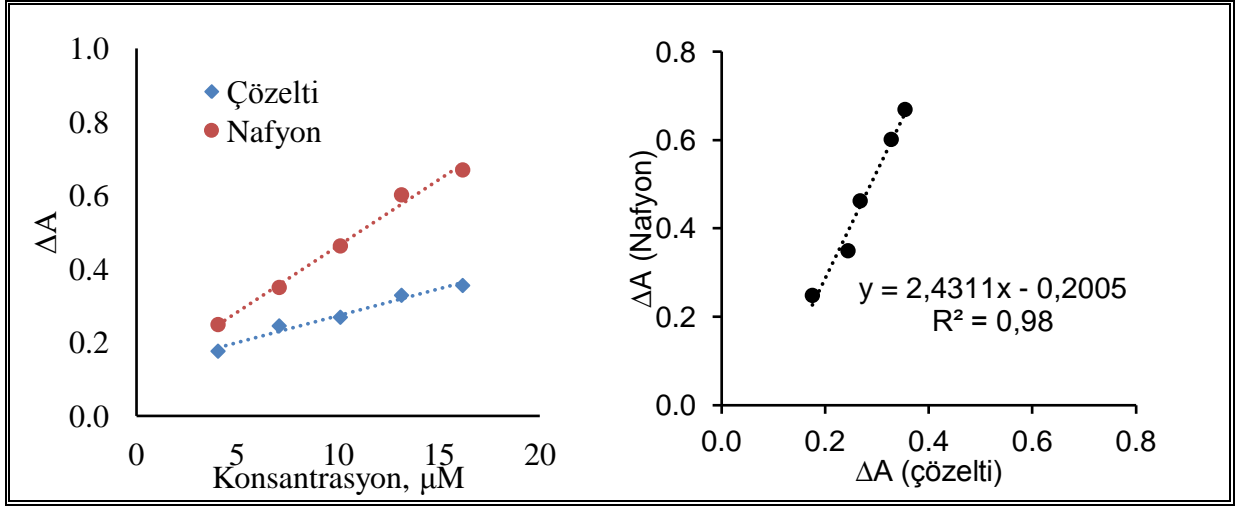
Şekil 4.25: Yumurta akı proteininin oksidatif hasarı üzerine GSH'ın engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözeltilde ve nafyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

4.5.3.16. Yumurta Akı Proteinini Oksidatif Hasarı Üzerine CYS'nin Engelleyici Etkisi



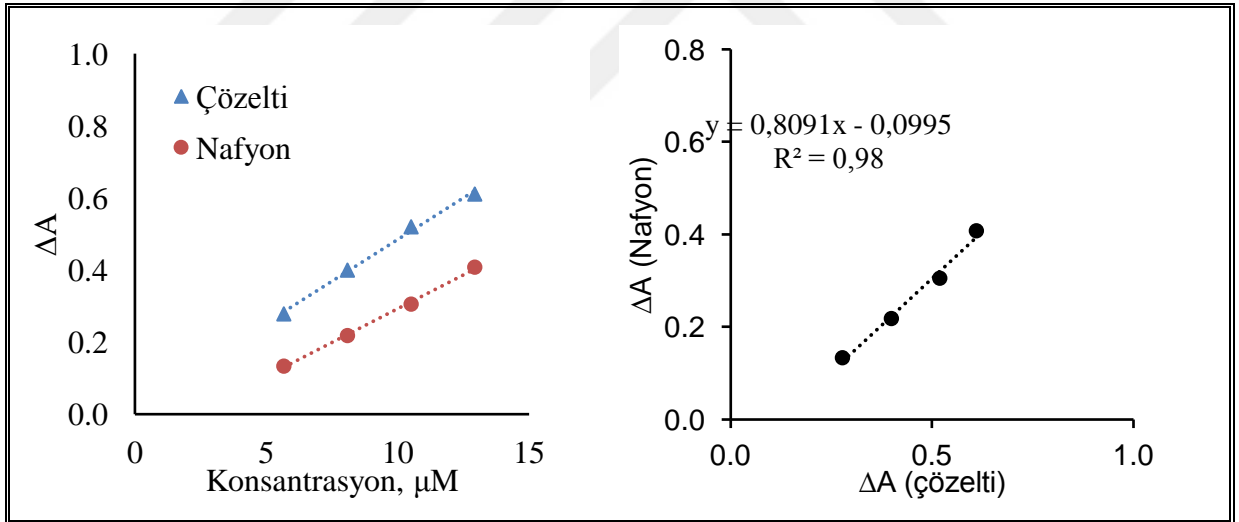
Şekil 4.26: Yumurta akı proteini oksidatif hasarı üzerine CYS'nin engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözeltilde ve nafyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

4.5.3.17. Yumurta Akı Proteininin Oksidatif Hasarı Üzerine NAC'in Engelleyici Etkisi



Şekil 4.27: Yumurta akı proteininin oksidatif hasarı üzerine NAC'in engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nafyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

4.5.3.18. Yumurta Akı Proteininin Oksidatif Hasarı Üzerine GA'in Engelleyici Etkisi

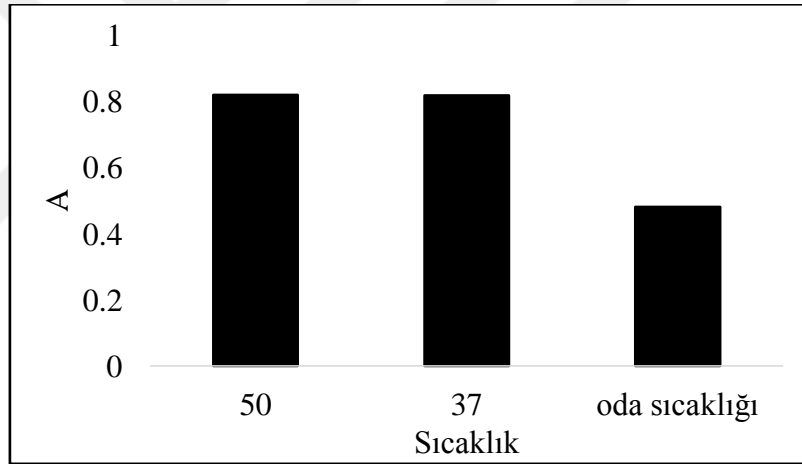


Şekil 4.28: Yumurta akı proteininin oksidatif hasarı üzerine GA'in engelleyici etkisinin belirlenmesinde CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nafyon yüzeyinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

4.6. CUPRAC SENSÖRÜNÜN TEKRAR KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

4.6.1. Optimal Sıcaklık Belirlenmesi

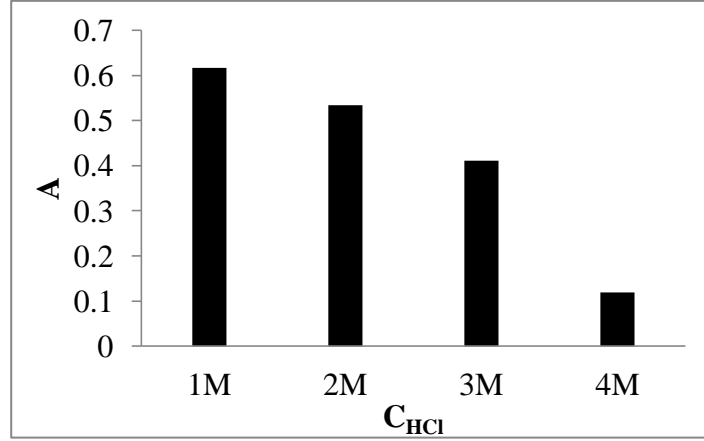
Bölüm 3.4.3’de anlatılan şekilde, kullanılmış nasyon membran (yani Cu(I)-Neokuproin tutturulmuş) yüzeyindeki sarı rengin giderilmesi için 1,0 M HCl içerisinde sarı renk kayboluncaya kadar 50°C, 37°C ve oda sıcaklığında olmak üzere farklı sıcaklıklarda 1 saat bekletildi. Şekil 4.29’da gösterildiği gibi 50°C ve 37°C’te yapılan denemeler yüksek absorban değerlerinin ölçülmesiyle sonuçlandı. Beşer tekrar şeklinde yapılan denemeler için standart sapma değerleri sırasıyla 0,09; 0,18 ve 0,11 olarak belirlenmiştir (N=5). Kontrol amaçlı yapılan kullanılmamış nasyon membranda elde edilen sonuca yakın (A= 0,8283) ve daha düşük %RSD’si olduğundan nasyon membranların temizlenmesi için uygun sıcaklık 50°C olarak seçildi.



Şekil 4.29: Kullanılmış nasyon membranın temizlenmesine sıcaklığın etkisi.

4.6.2. Temizleme için Kullanılan Asit Konsantrasyonunun Belirlenmesi

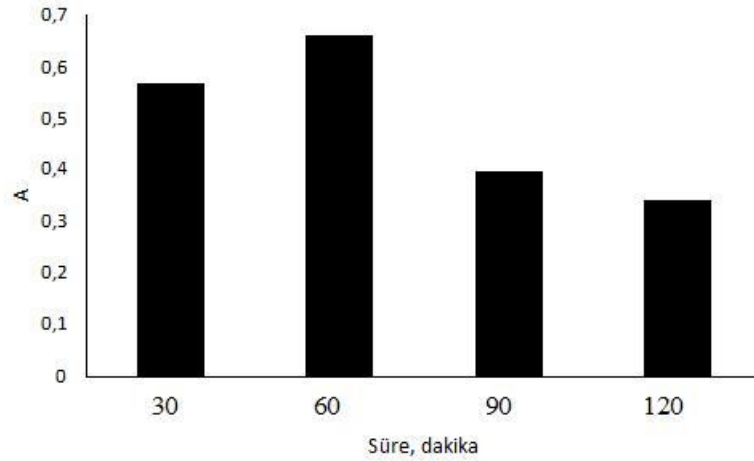
Kullanılan atık nasyon membran yüzeyindeki sarı rengin giderilmesi için kullanılan HCl çözeltinin konsantrasyonu 1,0 M, 2,0 M, 3,0 M ve 4,0 M olacak şekilde 1 saat süre boyunca bekletildi ve kontrol amaçlı yapılan kullanılmamış nasyon membranda elde edilen sonuca (A= 0,6124) en yakın değerler 1,0 M HCl ile yapılan çalışmayla elde edildi (Şekil 4.30). Her deneysel çalışma 5 kez tekrarlandı ve elde edilen ölçümlerin standart sapma değerleri sırasıyla 0,07; 0,08; 0,18 ve 0,04 olarak bulundu. Bu nedenle atık nasyon membranın sarı renginin 50°C’lik sıcaklıkta giderilmesi için uygun asit konsantrasyonu 1,0 M olarak bulunmuştur.



Şekil 4.30: Kullanılmış nafyon membranın temizlenmesine asit konsantrasyonunun etkisi.

4.6.3. Süre Denemesi

Atık nafyon membranın sarı renginin giderilmesi için uygun sıcaklık ve HCl konsantrasyonu belirlendikten sonra bu optimum şartlarda temizleme süresini belirlemek için membranlar 30, 60, 90 ve 120 dakika bekletildi ve kontrol amaçlı yapılan kullanılmamış nafyon membranla elde edilen sonuca en yakın absorbans ($A=0,6251$) 60 dakika bekleme süresi için elde edildi (Şekil 4.31). Denenen farklı süreler için standart sapma değerleri sırasıyla 0,09; 0,03; 0,13 ve 0,11 olarak bulunmuştur ($N=5$).



Şekil 4.31: Kullanılmış nafyon membranın temizlenmesine sürenin etkisi.

Bu denemelerle belirlenen optimal koşullarda temizlenen nafyon membranların iki defa ardarda kullanılabileceği bulunmuştur. İki kez kullanılan nafyon membranlar yeniden temizlenerek üçüncü kez kullanılıp kullanılmayacakları araştırılmış, ancak bu durumda CUPRAC yöntemi uygulandığında referansın da örnekler gibi sarı renk verdiği görülmüştür. Bu durumda nafyon membranların iki defadan fazla kullanılmasının uygun olmayacağı anlaşılmıştır.

4.7. ANTİOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ İÇİN GERÇEK ÖRNEK UYGULAMASI

Oksidatif protein hasarına antioksidanların önleyici etkisinin belirlenmesinde gerçek örnek olarak portakal suyu ve standart katkı olarak GA çözeltisi kullanıldı ve işlem Bölüm 3.5’de anlatıldığı şekilde uygulandı. Elde edilen ΔA ve % hata değerleri Tablo 4.9’da gösterildi. Her bir deneme 5 kez tekrarlandı ve RSD değerleri hesaplandı. Bu değerler genel olarak %5’in altında bulundu.

Tablo 4.9: Oksidatif protein hasarına portakal suyunun engelleyici etkisinin GA varlığında ve yokluğunda karbonil, CUPRAC çözelti ve CUPRAC sensör yöntemleri ile belirlenmesi.

Yöntem	Deneme	GA kons.	ΔA	Hata, %
Karbonil	BSA + 0,8 mL GA	$1,18 \times 10^{-5} M$	0,076	
	BSA + 0,1 mL Por. suyu	-	0,188	
	BSA + 0,1 mL Por. suyu + 0,8 mL GA	$1,18 \times 10^{-5} M$	0,268	-1,5
	CAS + 0,4 mL GA	$5,26 \times 10^{-6} M$	0,052	
	CAS + 0,25 mL Por. suyu	-	0,143	
	CAS+ 0,25 mL Por. suyu + 0,4 mL GA	$5,26 \times 10^{-6} M$	0,202	-3,5
	Y. akı proteini + 0,3 mL GA	$1,58 \times 10^{-6} M$	0,067	
	Y. akı proteini + 0,25 mL Por. suyu	-	0,241	
	Y. akı proteini + 0,25 mL Por. suyu + 0,3 mL GA	$1,58 \times 10^{-6} M$	0,319	-3,6
CUPRAC çözelti	BSA + 1,0 mL GA	$8,08 \times 10^{-6} M$	0,428	
	BSA + 0,1 mL Por. suyu	-	0,263	
	BSA + 0,1 mL Por. suyu + 1,0 mL GA	$8,08 \times 10^{-6} M$	0,748	-8,24
	CAS + 1,0 mL GA	$4,04 \times 10^{-6} M$	0,352	
	CAS + 0,25 mL Por. suyu	-	0,169	
	CAS+ 0,25 mL Por. suyu + 1,0 mL GA	$4,04 \times 10^{-6} M$	0,550	-5,5
	Y. akı proteini + 1,0 mL GA	$8,08 \times 10^{-6} M$	0,399	
	Y. akı proteini + 0,25 mL Por. suyu	-	0,229	
	Y. akı proteini + 0,25 mL Por. suyu + 1,0 mL GA	$8,08 \times 10^{-6} M$	0,588	6,36
CUPRAC sensörü	BSA + 1,0 mL GA	$8,08 \times 10^{-6} M$	0,692	
	BSA + 0,1 mL Por. suyu	-	0,298	
	BSA + 0,1 mL Por. suyu + 1,0 mL GA	$8,08 \times 10^{-6} M$	0,922	10,0
	CAS + 1,0 mL GA	$4,04 \times 10^{-6} M$	0,368	
	CAS + 0,1 mL Por. suyu	-	0,140	
	CAS+ 0,1 mL Por. suyu + 1,0 mL GA	$4,04 \times 10^{-6} M$	0,619	-21,8
	Y. akı proteini + 1,0 mL GA	$8,08 \times 10^{-6} M$	0,218	
	Y. akı proteini + 0,1 mL Por. suyu	-	0,132	
	Y. akı proteini + 0,1 mL Por. suyu + 1,0 mL GA	$8,08 \times 10^{-6} M$	0,352	-0,6

4.8. İSTATİKSEL ANALİZ

4.8.1. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)

Varyans analizi, yöntemin günler arasında tekrarlanabilirliğinin, BSA ($F(2,12) = 2,85$; $p = 0,09$) ve CAS ($F(2,12) = 0,39$; $p = 0,68$) için anlamlı olduğunu göstermiştir; yumurta akı proteini için anlamlı farklılık ($F(2,12) = 7,24$; $p < 0,05$) olduğunu göstermiştir. Student t-testi analizi, bir ve üç günlük yumurta akı çözeltilerinde yapılan ölçümlerin aynı olmadığını göstermiştir ($p < 0,05$). Bu değişiklik, çalışmada kullanılan yumurtaların farklılığı ile açıklanabilir. CUPRAC çözelti yöntemi, gün içinde 5 kez tekrarlanarak % RSD değeri hesaplanmış ve bu değerlerin kabul edilebilir aralıkta olduğu belirlenmiştir (BSA için, % RSD = 4,84; CAS için, % RSD = 4,97 ve yumurta akı proteini için, % RSD = 4,86). CUPRAC sensör ölçümleri de gün içinde 5 kez tekrarlanmasıyla elde edilen %RSD değerinin kabul edilebilir aralıkta olduğu belirlenmiştir (BSA için % RSD=6,7; CAS için %RSD=6,5 ve yumurta akı proteini için %RSD = 14,1).

4.8.2. Antioksidan Etkinliği Sıralaması İçin Spearman Analizi

Spearman sıra-korelasyon katsayısı istatistiklerine göre ($p = 0,05$), CUPRAC tarafından belirlenen antioksidan etkinliği sıralaması ile bu antioksidanların ve protein oksidasyonuna karşı verdikleri yanıtına göre önerilen protein karbonil metoduyla bulunan sıra arasında monotonik olarak “çok güçlü” bir ilişki olduğu doğrulanmıştır (Tablo 4.10).

Tablo 4.10: Oksidatif protein hasarına antioksidanların engelleyici etkisinin karbonil tayini ve CUPRAC (çözelti) yöntemiyle elde edilen sonuçların kıyaslanmasında Spearman korelasyon katsayısının belirlenmesi.

Yöntem	Antioksidanların etkinlik sırası					r_s katsayısı P = 0,05	Açıklama
	I	II	III	IV	V		
BSA							
Karbonil	GA	CYS	NAC	GSH	AA	+0,9	Çok güçlü
CUPRAC	GA	CYS	NAC	AA	GSH		
Kazein							
Karbonil	GA	NAC	AA	CYS	GSH	+0,9	Çok güçlü
CUPRAC	GA	NAC	CYS	AA	GSH		
Yumurta akı proteini							
Karbonil	GA	CYS	AA	NAC	GSH	+1,0	Çok güçlü
CUPRAC	GA	CYS	AA	NAC	GSH		

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Basit bir tanımlama ile, sensörler sistemdeki analit konsantrasyonu ile orantılı sinyaller üreterek biyokimyasal reaksiyonları izleyen aletler olarak ifade edilebilir. Son yıllarda sensör uygulamaları, hastalığın izlenmesi ve tedavisi için taşınabilir aletlerde, gıda ve ilaçların kontrollerinde ve adli veya biyomedikal araştırma gibi çeşitli alanlarda başarıyla uygulanmaktadır (Bhalla ve diğ. 2016). Ancak, bu uygulamalarda sensör kullanımının esas zorlukları ve sınırlamaları, karmaşık sistemlerde hızlı analiz için tekrar kullanılabilir, ekonomik ve uzun ömürlü sensör geliştirme ihtiyacından kaynaklanmaktadır (Vigneshvar ve diğ. 2016).

Tez kapsamında oksidatif protein hasarının ölçülmesi için kullanılan CUPRAC (bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi ilk olarak İstanbul Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda gıdalarda ve biyolojik sıvılarda toplam antioksidan kapasite tayini için geliştirilmiş olup, Cu(II)-Nc reaktifinin indirgenmesiyle meydana gelen sarı renkli Cu(I)-Nc kromoforun absorbansının 450 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır (Apak ve diğ. 2004; Ozyurek ve diğ. 2011). Antioksidan kapasite ölçülmesinde kullanılan diğer yöntemlere kıyasla CUPRAC yönteminin avantajları gıda, biyolojik vb. karmaşık sistemlere uygulanarak çeşitli bileşiklerin antioksidan kapasitesini ölçebilme yeteneği; CUPRAC reaktiflerinin kolay erişilebilirliği ve nafyon gibi katyon – değiştirici membranların üzerine tutturulabilmesi; hava oksijeni, güneş, ışığı, nem vb. çevresel faktörlerden etkilenmemesi; CUPRAC reaksiyonunun fizyolojik pH'da gerçekleşmesi; basit enstrümantasyonu ve doğruluğunun iyi olması şeklinde özetlenebilmektedir (Apak ve diğ. 2013).

Hidroksil radikallerinin tayini ve DNA'nın oksidatif hasarının belirlenmesi için CUPRAC yöntemi daha önce modifiye edilerek uygulanmıştır (Uzunboy ve diğ. 2017). Tez kapsamında ilk olarak BSA, kazein ve yumurta akı proteinleri oksidatif hasara uğratılmadan önce ve sonra CUPRAC yöntemi uygulanmış olup, proteinlerin oksidatif hasarından meydana gelen ürünlerin CUPRAC yöntemiyle tayini gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında kullanılan proteinlerin Fenton sistemiyle elde edilen hidroksil radikali saldırılarına duyarlılığını belirlemek için oksidatif hasara uğratılan proteinlerin miktarı optimize edildikten sonra oksidatif hasar sonucu oluşan ürünlerin CUPRAC yöntemine cevabı ölçülerek elde edilen absorbans değerleri arasında korelasyon grafikleri çizilmiştir (Tablo 4.5). Bu grafikler, proteinin başlangıç konsantrasyonuna karşı hasar görmüş proteinin CUPRAC absorbansını

göstermektedir. Bu grafikler ile elde edilen doğru denklemlerinin eğimine göre bu çalışmada kullanılan proteinler arasında kazeinin hidroksil radikali saldırısına en duyarlı protein olduğu ve yumurta akı proteininin ise duyarlılığı en az olan olduğu belirlenmiştir. Bu duyarlılığın proteinlerin moleküler ağırlığı ile (mutlaka sebep-sonuç ilişkisi içinde olmasa da) ilişkili olduğu düşünülmektedir. Örneğin, tez kapsamında kullanılan proteinlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesi için daha önce yapılan çalışmalarda kazein ve BSA'nın moleküler ağırlıkları sırasıyla $98.000 \text{ g mol}^{-1}$ (Carpenter, 1931) ve $66.431 \text{ g mol}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Feng ve diğ. 1991). Buna ek olarak, yumurta akının %88'i sudan oluşmakta iken diğer kalan %12'sinin %54'ü yumurta akının ana proteinin olan $45.000 \text{ g mol}^{-1}$ molekül ağırlığına sahip olan ovalbumin proteininden (Abeyrathne ve diğ. 2013) oluşmaktadır. Bu sonuçlardan, oksidatif hasara maruz kalan proteinlerin molekül ağırlığı arttıkça ilgili CUPRAC absorbans değerinin de arttığı görülmüştür (Tablo 4.5). Ayrıca Fenton sisteminde bozulan proteinin molekül ağırlığı ne kadar yüksekse, CUPRAC çözelti yönteminde oksidatif protein hasarının belirlenme sınırının da o kadar yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 4.5). Doğal olarak proteinin molekül ağırlığı, ana değişkeni (örneğin CUPRAC reaktif amino asit artıklarının çeşitliliği, vb.) gizleyen ikincil bir değişken de olabilir.

Antioksidan terimi dünya literatüründe farklı şekillerde tanımlanmıştır. Tez çalışması kapsamında, antioksidanlar oksidatif hasara uğratılan substrat (burada protein) ile karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlarda bulunsa da protein oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya önleyen maddeler olarak tanımlanabilir (Young ve Woodside, 2001; Bendary ve diğ. 2013). Burada, CUPRAC yöntemi ile oksidatif protein hasarı yüksek doğrulukla belirlenmiş olup, AA, CYS, GA, GSH ve NAC antioksidanları Fenton sistemine ilave edilerek, oksidatif protein hasarı sonucu meydana gelen türlerin CUPRAC cevabındaki azalma incelenmiştir. Antioksidan varlığında ve yokluğunda yapılan çalışmalarda oksidatif protein hasarından kaynaklı absorbans değerleri okunmuştur. Elde edilen bulgulara göre antioksidan varlığında protein hasarı azaldığından oksidatif protein hasarından kaynaklanan absorbans değerleri de düşmüştür. Yapılan denemelerde antioksidan konsantrasyonu ile absorbanstaki azalma (ΔA) arasında belirli bir derişim aralığında lineer bir ilişki olduğu saptanmış ve konsantrasyon ile ΔA arasında bir grafik çizilmiştir (Tablo 4.6). Bu şekilde elde edilen doğru denklemlerinin eğim katsayısı ile antioksidanların oksidatif protein hasarını engelleyici etkisi belirlenmiştir. BSA ile yapılan denemelerde bu sıra GA>CYS>NAC>AA>GSH şeklinde iken kazein ile yapılan denemelerde bahsedilen sıra

GA>NAC>CYS>AA>GSH olarak belirlenmiştir. Yumurta akı proteinleri ile yapılan denemelerde antioksidanların oksidatif protein hasarını engelleyici aktivitesi GA>CYS>AA>NAC>GSH olarak sıralanmıştır. Elde edilen sonuçların (Tablo 4.6), daha önce yapılan DNA'nın oksidatif hasarına adı geçen antioksidanların koruyucu etkisinin modifiye CUPRAC yöntemi ile belirlenmesinde elde edilen sonuçlar ile tutarlı olduğu görülmüştür. Yani DNA ve protein problemleri benzer yanıtlar vermektedir. Karşılaştırılan bu çalışmada da GA'nın hidroksil radikal süpürücü aktivitesinin adı geçen diğer antioksidanlardan daha yüksek olduğu ve CYS, AA ve NAC bileşiklerinin antioksidan aktivitelerinin GSH'dan yüksek olduğu bulunmuştur (Uzunboy ve diğ. 2017). Çalışılan antioksidanlardan AA bir vitamin, GSH ise düşük molekül ağırlıklı antioksidanlardan biridir. GA fenolik antioksidan grubunda yer almakta iken CYS ve NAC bileşikleri ise tiyol grubu içeren antioksidanlar olarak sınıflandırılmaktadır (Shalaby ve Shanab, 2013). Sonuç olarak çalışılan bu bileşikler enzimatik olmayan antioksidanların farklı gruplarını temsil etmektedir. Fenton sistemlerinde esas olarak hidroksil radikalleri açığa çıktığından komşu -OH gruplarına sahip olan GA gibi antioksidanların hidroksil radikal yakalama etkinliğinin yüksek oluşu literatür bilgileri ile uyumludur.

Tezin ikinci aşamasında, oksidatif protein hasarı ve antioksidanların önleyici etkisinin belirlenmesi için geliştirilen spektroskopik sensör olarak, ilk defa gıda ve serumda toplam antioksidan kapasite ölçümü için geliştirilen Nafyon membran sensör (Bener ve diğ. 2013) modifiye edilerek kullanılmıştır. Tez çalışmasında, CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan CUPRAC reaktifi (Cu(II)-Nc), 4,0x0,5 cm boyutlarında kesilerek hazırlanmış katyon değiştirici polimerik membran olan Nafon film üzerine 45 dakika çalkalanarak tutturulmuş, oksidatif protein hasarı ve antioksidanların koruyucu etkisinin belirlenmesi için kullanılacak CUPRAC yöntemine dayalı optik sensör elde edilmiştir. Bundan sonra, deney tüplerine 4,0 mL destile su, 2,0 mL üre tamponu (pH= 7,0), 1,0 mL %1,0 Na₂CO₃ çözeltisi, 2,0 mL Fenton sistemiyle hasara uğratılmış protein çözeltisi alınıp içinde CUPRAC sensörü yerleştirilerek su banyosunda 50°C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Bu tayinde membranın tam olarak çözelti içine girebilmesi için reaktif karışımının hacmi arttırılmıştır. Alınan bütün örnekler ve CUPRAC reaktiflerinin hacmi eşit olarak 4 kat arttırıldığı için modifiye CUPRAC yönteminde kullanılan konsantrasyonlarda herhangi bir fark olmamıştır. Fakat CUPRAC sensörü üzerinde oksidatif protein hasarının ölçülmesi ile elde edilen absorbans değerlerinin arttırılması için CUPRAC yönteminin uygulandığı sıcaklık,

CUPRAC çözelti (37°C) ve CUPRAC sensör (50°C) yöntemlerinde farklı olarak kullanılmıştır (Apak ve diğ. 2008). Oksidatif protein hasarının CUPRAC sensörü kullanılarak belirlenmesiyle elde edilen sonuçlar CUPRAC çözelti yöntemiyle belirlenen sonuçlarla karşılaştırılarak doğru denklemlerindeki eğim katsayılarının benzerliği incelenmiştir (Tablo 4.7). Böylece, CUPRAC yönteminin hem çözeltilerde hem sensör üzerinde başarı ile gerçekleştirilebildiği görülmüştür. Ayrıca oksidatif hasara uğratılan proteinlerden meydana gelen ürünlerin, Fenton reaksiyonu TCA ile durdurulduktan sonra protein çözeltilisinin üstünde kalan berrak kısmında bulunduğu görülmüştür. Bu nedenle, CUPRAC sensörünün kullanılmasının bir avantajı protein çökelti ve katı parçacıkları içeren bir emülsiyon sisteminde oksidatif protein hasarının spektrofotometrik yöntem ile tayin edilebilmesidir.

Çalışmada kullanılan AA, CYS, GA, GSH ve NAC antioksidan bileşiklerinin oksidatif protein hasarını engelleyici etkisi CUPRAC sensörü kullanılarak incelenmiş, antioksidanlar için konsantrasyon ile ΔA arasında kalibrasyon grafiği çizilerek doğru denklemleri belirlenmiştir (Tablo 4.8). Adı geçen antioksidanların oksidatif protein hasarını engelleyici aktivitesi doğru denklemlerinin eğim katsayısı ile belirlenerek BSA proteini varlığında bu sıranın GA>CYS> AA>NAC>GSH, kazein varlığında ise GA>CYS>NAC>AA>GSH olduğu görülmüştür. Gerçek örnek olarak kullanılan yumurta akı proteininin oksidatif hasarına adı geçen antioksidanların önleyici etkisi GA>NAC>AA>CYS>GSH olarak belirlenmiştir. CUPRAC sensörü ile antioksidanların oksidatif protein hasarını engelleyici etkisi en yüksek ölçülen GA iken en düşük etkili antioksidan ise GSH olarak gözlenmiştir. Ayrıca antioksidanların oksidatif protein hasarını engelleyici etkisinin CUPRAC sensörü ile belirlenmesinde doğrusal bir yanıt için antioksidan bileşiklerinin konsantrasyonunun 1-10 mikromolar seviyelerinde olması gerektiği bulunmuştur (Tablo 4.8).

Günümüzde oksidatif protein hasarınının tayin edilmesinde kimyasal ve immünolojik çeşitli yöntemler uygulanmaktadır ve ilgili çalışmalarda, oksidatif protein hasarının karbonil türevlerinin artması ile doğrudan ilişkisi ortaya konmuştur (Hawkins ve diğ. 2009). Bununla birlikte, aşağıda bahsedilen nedenlerle karbonil grubu oksidatif protein hasarının belirteci olarak kullanılmaktadır: (a) çeşitli radikallerden kaynaklı oksidatif protein hasarından üretilebilmesi, (b) oksidatif protein hasarının belirteci olarak çeşitli biyolojik materyallerde kantitatif olarak tayin edilebilmesi ve (c) karbonil türevlerinin kimyasal olarak kararlılığı ve herhangi bir değişikliğe uğramadan -80°C sıcaklıkta 3 ay boyunca saklanabilmesi (Jacob ve

diğ. 2013; Griffiths, 2000). Protein karbonil türevlerinin tayininde kullanılan problemlerin başında trityum sodium borhidrür ($[^3\text{H}] \text{NaBH}_4$), floresan reaktifleri, biyotin içeren problemler ve 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) reaktifleri gelmektedir (Yan ve Forster, 2012). Bu problemlerden DNPH reaktifini baz alan yöntem en yaygın olarak kullanılmaktadır. DNPH ile türevlendirilerek elde edilen karbonil bileşikler spektrofotometrik ($\lambda_{\text{max}}= 370 \text{ nm}$) olarak ölçülebildiği gibi Western blotting, ELISA vb. immünojenik tekniklerle de ölçülmektedir (Hawkins ve diğ. 2009).

Proteinlerin karbonil türevlerinin tayin edilmesinde kullanılan geleneksel DNPH yöntemi basit ve güvenilir bir yöntem olmakta birlikte bazı dezavantajları vardır. Bunlar: (i) yöntemin maksimum absorptans verdiği dalgaboyu aralığında hem-proteini de maksimum absorptans gösterir (360–380 nm); (ii) düşük algılama sınırı ve (iii) yıkama sırasında proteinlerin kaybolabilmesi olarak özetlenebilir (Fagan ve diğ. 1999). Bu nedenle tez kapsamında oksidatif protein hasarından kaynaklı meydana gelen karbonil türevlerinin tayini için küçük moleküllü karbonil bileşiklerine DNPH ilave edilerek oluşturulan 2,4-dinitrofenil hidrazon bileşiklerinin bazik ortamda şarap – kırmızı renkli anyona dönüşmesini temel alan yöntem modifiye edilmiştir (Lappin ve Clark, 1951). Bu yöntemin avantajları: (i) çoğu proteinler 200–280 nm dalga boyunda, hem proteinleri ise 360–380 nm’de maksimum absorptans vermekte iken bu yöntemde meydana gelen hidrazon anyonu için λ_{max} değerinin 450 nm’de bulunması; (ii) yöntem sıvı-sıvı ekstraksiyonunu temel aldığı için proteinin yıkanması ile ilişkili hata bulunmaması ve mevcut yöntemin son ürünü anyon şeklinde bulunduğundan, anyon değiştirici kağıt, anyon değiştirici reçine vb. materyallere tutturulup yüksek hassasiyetli bir yöntem geliştirilmesine yol göstermesidir. Yöntemin doğrudan protein karbonil tayini için uygulanmasında düşük absorptans vermesi, protein çökmesi gibi bazı dezavantajlar görülmüştür. Bu nedenle tez çalışmasında oluşan şarap–kırmızı renkli anyon katyonik yüzey aktif madde olan CTAB ile yüksüz hale getirilerek organik faza aktarılmıştır. Ardından organik fazdan su kalıntılarının giderilmesi için sodyum klorürün doygun çözeltisi eklenip, organik fazın bazik yapılması için KOH çözeltisi tekrar eklenmiştir. Elde edilen organik fazdaki şarap renkli anyonunun absorptansı 450 nm’de okunmuştur (Şekil 4.1).

Optimum şartlar belirlendikten sonra standart protein olarak Bovin Serum Albümin (BSA; 10 mg mL⁻¹) ve kazein (2,5 mg mL⁻¹), gerçek örnek olarak da yumurta akı (0,15 g mL⁻¹) kullanılarak oksidasyon sonucu karbonil türevlerinin tayini yapıldı. Fenton sistemiyle

oksidatif hasara uğratılan protein miktarı ve ilişkili karbonil türevlerinin absorbanası arasındaki korelasyon analizi ile elde edilen doğru denklemlerinin eğim katsayılarına göre proteinlerin hidroksil radikal atakları ile hasar görebilirliği incelendi (Şekil 4.2, 4.4, ve 4.6). Belirlenen eğim katsayısına göre, Fenton sistemiyle üretilen hidroksil radikalleri en fazla kazeini etkilemekte iken en az hasarı yumurta akına verdiği görülmüştür. Bu sonuç, oksidatif protein hasarının CUPRAC yöntemiyle çözültide ve nafyon membran üzerinde tayiniyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve benzer bir sıralama (CAS>BSA>Yumurta akı proteini) elde edilmiştir.

In vivo protein karbonilasyonu, polipeptit omurga yarılması, lipit oksidasyonundan karbonil içeren metabolitlerin nükleofilik eklenmesi, glikasyonun oksidasyon üretimi ve amino asitlerin oksitlenmesi sonucu oluşur (Joaquim, 2017). Amino asitlerden arjinin, prolin, lizin ve treonin kalıntılarının yan zincirlerinin oksidasyonundan DNPH ile belirlenen karbonil türevleri meydana gelmekle birlikte adı geçen amino asitlerin karbonil yöntemine cevap verme eğiliminin diğer amino asitlerden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Wong ve diğ. 2012; Suzuki ve diğ. 2010; Weber ve diğ. 2015). Bu çalışmada belirlenen proteinlere hidroksil radikal hasarının duyarlılığının sorumlusu olarak ilgili proteinin prolin içeriği ve karbonillenme derecesi arasındaki ilişki gösterilmektedir. Örneğin, daha önce yapılan çalışmalarda proteinlerin prolin amino asit içeriği belirlenip BSA'nın %4,75 (Stein ve Moore,1949); kazeinin %8,29 (Lauer ve baker,1977) ve yumurta akı proteininin %3,80 (Lewis ve diğ. 1950) oranında prolin amino asidini içermekte olduğu saptanmıştır. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar bu çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırılarak proteindeki prolin amino asidinin içeriğinin artışı ile proteinin karbonillenmesinin de arttığı incelendi. Ayrıca adı geçen 4 amino asit içeriği tez çalışmasıyla elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında, aynı korelasyon BSA ve yumurta akı proteinleriyle de bulunmuştur. Örneğin prolin, arjinin, lizin ve treoninin toplam miktarı BSA'nın %29,3'ünü, (Stein ve Moore,1949) ve yumurta akı proteinin %20,1'ini (Lewis ve diğ. 1950) oluşturmakta olup, tez çalışmasında BSA'nın yumurta akı proteininden daha yüksek seviyede karbonillendiği görüldü.

Modifiye edilen karbonil tayini yönteminde AA, CYS, GA, GSH ve NAC antioksidanlarının önleyici etkisinin incelenmesi amacıyla adı geçen antioksidanlar Fenton sistemine ilave edilmiş, oksidatif protein hasarından meydana gelen karbonil türevlerindeki azalma

incelenmiştir (Tablo 4.1 – 4.3). Antioksidan varlığında ve yokluğunda yapılan çalışmada protein karbonillerinden kaynaklanan absorbans değerleri okunmuştur. Buna göre antioksidanlar varlığında protein hasarı azaldığından karbonil gruplarından kaynaklanan absorbans değerleri de düşmüştür. Antioksidanlar varlığında absorbanstaki azalma (ΔA) hesaplanmıştır. Yapılan denemelerde antioksidan konsantrasyonu ile ΔA arasında lineer bir ilişki olduğu saptanmış ve konsantrasyon ile ΔA arasında bir grafik çizilmiştir. Bu grafiğin eğim katsayısı ile antioksidanların oksidatif protein hasarını engelleyici etkisi sıralanmış ve BSA için GA>CYS >NAC>GSH>AA; kazein için GA>NAC>AA>CYS>GSH ve yumurta akı proteini için GA> CYS>AA>NAC>GSH olarak belirlenmiştir.

Antioksidan bileşiklerin serbest radikal süpürücü aktivitesi esas olarak moleküler yapılarına bağlıdır ve mekanizma olarak reaktif oksijen türlerinin doğrudan söndürülmesi, enzimlerin inhibisyonu ve metal iyonlarının kelatlanması yoluyla oksitleyici zincir reaksiyonlarının inhibe edilmesi şeklinde belirlenmiştir (Bendary ve diğ. 2013).

Tez çalışmasında hem çözelti hem de sensör üzerine uygulanmış CUPRAC yöntemleri ve karbonil tayini yöntemleri yardımıyla oksidatif protein hasarını antioksidanların engelleyici etkisini belirlemede en etkin antioksidan GA olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar GA'nın Fenton sisteminde Fe(II) oksitlenmesiyle üretilen hidroksil radikallerinin oluşumu için bir katalizatör olan Fe (III) iyonu ile bağlanma kapasitesi ile açıklanabilmektedir (Lee ve Sedlak, 2009; Hermanek ve diğ. 2007). Önceki araştırmalar komşu -OH grupları içeren GA'nın demir (III) ile reaksiyona girip kararlı bir kompleks oluşturduğunu göstermiştir ve oluşan bu kelat kompleksi oldukça kararlı olup, Fenton reaksiyonunun yayılımını durdurduğunu düşünülmektedir (Powel ve Taylor, 1982).

Yapısından görüldüğü gibi GA, AA'e göre bir tane daha fazla -OH grubuna sahiptir. Bu da metal iyonlarına kolaylıkla bağlanmasını sağlar. Fe(III)'ün AA'ya bağlanması üzerine çoğu literatür pH'ın 5'in üzerine çıkması durumunda AA tarafından Fe(III)'ün Fe(II)' ye indirgenme oranının oldukça yavaşladığı yönündedir (Peggy Hsieh ve Ping Hsieh, 2000; Dorey ve diğ. 1993).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar tiyol grubu içeren bileşiklerin serbest radikal süpürme aktivitesinin 5-üyelî halkada iki hidroksil grubu içeren bileşiklerden daha etkili olduğunu

savunmaktadır. Diğer taraftan metot duyarlılığına, kullanılan reaktiflerin ve problemlerin özelliklerine bağlı olarak antioksidan sırası değişebilmektedir. Örneğin daha önceki bir çalışmada (Demirci Cekic ve diğ. 2015), çalışılan antioksidan etkinlik sırası GA>AA>CYS>GSH> NAC olarak belirlenirken, farklı bir çalışmada (Bayarsaikhan ve diğ. 2018) GA'in CYS'den daha güçlü olduğu ve NAC'nin de AA'dan güçlü olduğu görülmüştür. Bu çalışmalarda antioksidanların farklı reaksiyon mekanizmaları etken olabilmektedir. Bu üç bileşiğin birbirine yakın yapılar gösterdiği, mesela NAC'ın CYS kalıntısı içerdiği ve GSH'ın tiyol grupları içerdiği görülmektedir. Son çalışmalarda GSH'ın protein oksidasyonunda en az koruyucu etkiye sahip bileşik olduğu görülmüştür. Bununla birlikte GSH bir amino grup, iki karboksilik grup, iki amit ve bir sülfhidril olacak şekilde 8 aktif Fe(III) bağlama merkezi içermekte olup, daha önceki çalışmalarda indirgenmiş GSH'ın Fe(III) ile 1:1 oranında reaksiyona girdiği bildirilmiştir (El-Ayaan ve Linert, 2002).

Tez kapsamında protein karbonil tayini için modifiye edilen yöntemin maksimum absorbans verdiği dalgaboyu (450 nm) antioksidanlar varlığında yeniden incelenmiş ve reaksiyon ortamına antioksidanların eklenmesi durumunda maksimum dalgaboyu üzerinde herhangi bir etkinin olmadığı görülmüştür (Lappin and Clark, 1951).

Çalışmada CUPRAC sensörünün birden fazla kez kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmış ve kullanılan nafyon membran 1,0 M HCl çözeltisinde 50°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Bu işlemin sonucunda membran renksizleşmiş ardından destile su ile yıkanarak bir kez daha kullanılmıştır. İkinci kez kullanılan membranın ilk kullanımında elde edilen sonuçlara çok yakın değerler verdiği görülmüştür. Bu nedenle membranın iki kez kullanılabileceği saptanmıştır. Membranın üçüncü kez kullanılması amacıyla yapılan denemelerde referans ve örnekler arasında fark olmadığı görülerek nafyon membranının yalnızca iki kez kullanılabileceği belirlenmiştir.

Nafyon membranının iyon değiştirme kapasitesinin aktivasyonuna yönelik birçok çalışma yapılmıştır ve son bulgular nafyon membranı 1 saat peroksit ve 80°C'de 1,0 M sülfürik asit ile 3 saat muamele etmenin membranın yapısal ve morfolojik özelliklerini etkilemediği yönündedir (Pujiastuti ve Onggo, 2015).

Bu bulgulardan görüldüğü üzere CUPRAC sensöre dayalı nafyon membranın rejenerasyonu için kullanılan deneysel koşullar oldukça yumuşak bir ortam olup, nafyon membranın yapısal ve morfolojik özelliklerine hiçbir hasar vermediği düşünülmektedir. Fenton reaktifiyle muamele edilmiş BSA kullanılarak rejenere edilen nafyon membran ile yapılan tekrarlı denemelerde (N=5) RSD sonuçları %4,8 olarak bulunmuş ve muamele görmemiş yeni nafyon membran ile yapılan deneme sonrası elde edilen absorpsiyon ile tutarlı değerler verdiği görülmüştür.

Tez kapsamında oksidatif protein hasarı ve antioksidanların önleyici etkisinin belirlenmesi için CUPRAC yöntemi temel alınarak nafyon membran sensör geliştirilmiştir. CUPRAC yöntemi hem çözeltide hem de nafyon membran üzerinde uygulanarak elde edilen sonuçlar kıyaslanmıştır. Hem proteinler için hem de antioksidanlara ait olan denemelerde elde edilen CUPRAC çözelti ve CUPRAC sensör yöntemleri sonuçları arasında yüksek korelasyonlar ($R^2 > 95$) görülmüştür. CUPRAC çözelti yöntemi, gün içinde 5 kez tekrarlanarak % RSD değeri hesaplanmış ve bu değerlerin kabul edilebilir aralıkta olduğu belirlenmiştir (BSA için, % RSD = 4,84; CAS için, % RSD = 4,97 ve yumurta akı proteini için, % RSD = 4,86). CUPRAC sensör ölçümleri de gün içinde 5 kez tekrarlanmasıyla elde edilen %RSD değerinin kabul edilebilir aralıkta olduğu belirlenmiştir (BSA için % RSD=6,7; CAS için %RSD=6,5 ve yumurta akı proteini için %RSD = 14,1).

Oksidatif protein hasarı ve antioksidanların önleyici etkisinin belirlenmesinde standart yöntem olarak protein karbonil tayini yöntemi kullanıldı. Varyans analizi, yöntemin günler arasında tekrarlanabilirliğinin BSA için ($F(2,12) = 2,85$; $p = 0,09$) ve CAS için ($F(2,12) = 0,39$; $p = 0,68$) anlamlı olduğunu, yumurta akı proteini için anlamlı farklılık ($F(2,12) = 7,24$; $p < 0,05$) olduğunu göstermiştir. Bu değişiklik çalışmada kullanılan yumurta örneklerinin farklılığı ile açıklanabilir. Karbonil tayini yöntemiyle ve CUPRAC çözelti yöntemiyle elde edilen sonuçlar yardımıyla antioksidanların oksidatif protein hasarını engelleyici etkileri belirlenmiştir. Spearman sıra-korelasyon katsayısı istatistiklerine göre ($p = 0,05$), antioksidanların verdikleri yanıtı göre CUPRAC yöntemi ve önerilen protein karbonil yöntemiyle elde edilen sonuçlar arasında monotonik olarak “çok güçlü” bir ilişki olduğunu doğrulamıştır. Bu çalışmanın iki yenilik beyanı: (i) proteinlerin oksidatif hasarının önlenmesi için antioksidan aktivite belirlenmesinde kullanılan modifiye CUPRAC yönteminin

geliştirilmesi ve (ii) aynı amaca dönük tasarlanan bazik karbonil yönteminde yüzey aktif varlığında çözücü özütlemenin kullanılmasıdır.



KAYNAKLAR

- Abeyrathne, E.D., Lee, H.E., Ahn, D.U., 2013, Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents—A review, *Poultry Science*, 92 (12), 3292–3299.
- Allison, W. S., 1976, Formation and reactions of sulfenic acids in proteins, *Accounts of Chemical research*, 9 (8), 293–299.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K.M., Özyürek, M., Güçlü, K., 2013, Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity, (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, 85 (5), 957–998.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 52(26), 7970-81.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. Esin Çelik, S., 2008, Mecahism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (Cupric ion reducing antioxidant capacity) assays, *Microchimica Acta*, 160 (4), 413-419.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., and Çapanoğlu, E., 2016, Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays, *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 64, 997–1027.
- Bayarsaikhan, G., Dondurmacioğlu, F., Avan, A.N., Demirci Çekiç, S., Apak, R., 2018, Novel Colorimetric Assay of 2,3-Dihydroxybenzoate among Other Isomers as a Selective Indicator of Hydroxyl Radical Damage and Related Antioxidant Activity, *Analytical Letters*, 51 (1-2), 2018.
- Bendary, E., Francis, R.R., Ali, H.M.G., Sarwat, M.I., Hady, S.E., 2013, Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds, *Annals of Agricultural Science*, 58(2), 173–181.
- Bener, M., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2013, Novel Optical Fiber Reflectometric CUPRAC Sensor for Total Antioxidant Capacity Measurement of Food Extracts and Biological Samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (35), 8381–8388.
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., Estrela, P., 2016, Introduction to biosensors, *Essays in Biochemistry*, 60 (1), 1–8.
- Biswas, S., Chida, A. S., Rahman, I., 2006, Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling, *Biochemical Pharmacology*, 71 (5), 551–564.

- Bourdon, E., Blache, D., 2001, The importance of proteins in defense against oxidation, *Antioxidants and Redox Signalling*, 3 (2), 293–311.
- Brewer, M.S., 2011, Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food safety*, 10 (4), 221-247.
- Carballal, S., Radi, R., Kirk, M. C., Barnes, S., Freeman, B. A., Alvarez, B., 2003, Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite, *Biochemistry*, 42 (33), 9906–9914.
- Carpenter, D. C., 1931, The molecular weight of casein. III, *Journal of the American Chemical Society*, 53 (5), 1812-1826.
- Cross, C.E., Van der Vliet, A., O'Neill, C.A., Louie, S., Halliwell, B., 1994, Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids, *Environmental Health Perspectives*, 102 (10), 185–191.
- Davies M J. 2005, The oxidative environment and protein damage, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1703 (2), 93–109.
- Davies M J., 2012, *Oxidative damage to proteins*, Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials, In: Chatgililoglu, C., Studer, A. (ed), New York, Wiley, 1425-1458.
- Davies, M. J., Fu, S., Dean, R. T., 1995, Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals, *Biochemical journal*, 305(2), 643–649.
- Davies, M. J., Fu, S., Wang, H., Dean, R.T., 1999, Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease, *Free Radical Biology and Medicine*, 27 (11-12), 1151-1163.
- Davies, M.J., 2016, Protein oxidation and peroxidation, *Biochemical Journal*, 473(7), 805–825.
- DeGray, J. A., Lassmann, G., Curtis, J. F., Kennedy, T. A., Marnett, L. J., Eling, T. E., Mason, R. P., 1992, Spectral analysis of the protein-derived tyrosyl radicals from prostaglandin H synthase, *Journal of Biological Chemistry*, 267 (33), 23583–23588.
- Demirci Çekiç, S., Kara, N., Tütem, E., Sözgen Başkan, K., Apak, R., 2012, Protein-Incorporated Serum Total Antioxidant Capacity Measurement by a Modified CUPRAC (CUPRIC Reducing Antioxidant Capacity) Method, *Analytical Letters*, 45 (7), 754-763.
- Demirci Çekiç, S., Avan, A. N., Uzunboy, S., Apak, R., 2015, A colourimetric sensor for the simultaneous determination of oxidative status and antioxidant activity on the same membrane: N, N-dimethyl-p-phenylene diamine (DMPD) on Nafion, *Analytica Chimica Acta*, 865, 60–70.

- Dorey, C., Cooper, C., Dickson, D. P. E., Gibson, J. F., Simpson, R. J., Peter, T. J., 1993, Iron speciation at physiological pH in media containing ascorbic acid and oxygen, *Brazilian Journal of Nutrition*, 70 (1), 157-169.
- Eken, S., 2007, *Bazı Materyallerde Antioksidan Tayinleri*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- EL-AYAAN, U., LINERT, W., 2002, A kinetic study of the reaction between glutathione and Iron(III) in the pH range from 1 to 3, *Journal of Coordination Chemistry*, 55 (11), 1309-1314.
- Evans, P., Lyras, L., Halliwell, B., 1999, Measurement of protein carbonyls in human brain tissue, *Methods in Enzymology*, 300, 145-56.
- Fagan, J. M., Slecicka, B. G., Sohar, I., 1999, Quantitation of oxidative damage to tissue proteins, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31 (7), 751-757.
- Feng, R., Konishi, Y., Bell, A.W., 1991, High accuracy molecular weight determination and variation characterization of proteins up to 80 ku by ionspray mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2 (5), 387-401.
- Genestra, M., 2007, Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants, Review. *Cellular Signalling*, 19 (9), 1807-1819.
- Griffiths, H.R., 2000, Antioxidants and protein oxidation, *Free Radical Research*, 33, S47-S58.
- Halliwell, B., 1988, Albumin – an important extracellular antioxidant ?, *Biochemical Pharmacology*, 37 (4), 569-571.
- Hawkins C.L, Morgan, P.E., Davies, M.J., 2009, Quantification of protein modification by oxidants, *Free Radical Biology & Medicine*, 46, 965-988.
- Heinecke, J. W., Hsu, F. F., Crowley, J. R., Hazen, S. L., Leeuwenburgh, C., Mueller, D. M., Rasmussen, J. E., Turk, J., 1999, Detecting oxidative modification of biomolecules with isotope dilution mass spectrometry: sensitive and quantitative assays for oxidized amino acids in proteins and tissues, *Methods in Enzymology*, 300, 124-144.
- Hermanek, M., Zboril, R., Medrik, I., Pechousek, J., Gregor, C., 2007, Catalytic Efficiency of Iron(III) Oxides in Decomposition of Hydrogen Peroxide: Competition between the Surface Area and Crystallinity of Nanoparticles, *Journal of American Chemical Society*, 129 (35), 10929-10936.
- Hiroshi K., 1997, Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a maker of cellular oxidative stress during carcinogenesis, *Mutation Research*, 387 (3), 147-163.

- Hu, M. L., 1994, Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma, *Methods in Enzymology*, 233, 380–385.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L, 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F., 1991, Chemical Sensors Definitions and Classification, *Pure and Applied Chemistry*, 63 (9), 1247-1250.
- Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M., 2007, *Lysozyme*, Bioactive Egg Compounds, In: Schade, R. (ed), Chapter 6, Springer, New York, 33-38.
- Hwang, O., 2013, Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease, *Experimental Neurobiology*, 22(1), 11–17.
- Irwin, J. A., Ostdal, H., Davies, M. J., Myoglobin-induced oxidative damage: evidence for radical transfer from oxidized myoglobin to other proteins and antioxidants, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 362 (1), 94–104.
- Jacob, K. D., Hooten, N. N., Trzeciak, A. R., Evans, M. K., 2013, Markers of Oxidant Stress that are Clinically Relevant in Aging and Age-related Disease, *Mechanisms of Ageing and Development*, 134(0), 139–157.
- Jessup, W., Dean, R. T., Gebicki, J. M., Iodometric determination of hydroperoxides in lipids and proteins, *Methods in Enzymology*, 233, 289–303.
- Joaquim, R.O., 2017, *Analysis of protein carbonylation*, Protein Carbonylation: Principles, Analysis, And Biological Implications, WILEY SERIES ON MASS SPECTROMETRY, In: Desiderio, D.M., Loo, J.A., Nibbering, N.M.M. (ed), Chapter 2, John Wiley and Sons, Inc, USA, ISBN 9781119074915, 27-33.
- Karabulut, H., Gülay, M.Ş., 2016, Serbest radikaller, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 50-59.
- Kovacs-Nolan, J., Phillips, M, Mine, Y., 2005. Advances in the value of eggs and egg components for human health, *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 53(22), 8421–8431.
- Kubota, R., Hamachi, I., 2015, Protein recognition using synthetic small-molecular binders toward optical protein sensing in vitro and in live cells, *Chemical Society reviews*, 44 (13), 4454-4471.
- KY, K., Du, A., 2008, An economic and simple purification procedure for the large scale production of ovotransferrin from egg white, *Poultry Science*, 87 (7), 1441–1450.

- Lappin, G., Clark, L., 1951, Colorometric method for determination of traces of carbonyl compounds, *Analytical chemistry*, 23 (3), 541–542.
- Lauer, B.H., Baker, B.E., 1977, Amino acid composition of casein isolated from the milks of different species, *Canadian journal of Zoology*, 55, 231-236.
- Lee, C., Sedlak, D. L., 2009, A Novel Homogeneous Fenton-like System with Fe(III)-Phosphotungstate for Oxidation of Organic Compounds at Neutral pH Values, *Journal of Molecular Catalysis. A: Chemical*, 311(1-2), 1–6.
- Lewis, J. C., Snell, N. S., Hirschmann, D. J., Fraenkel-Conrat, H., 1950, Amino acid composition of egg proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 186, 23-35.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, *Pharmacognosy Reviews*, 4(8):118-126.
- Mason, R. P., 2004, Using anti-5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (anti-DMPO) to detect protein radicals in time and space with immuno-spin trapping, *Free Radical Biology and Medicine*, 36 (10), 1214–1223.
- Mateen, S., Moin, S., Khan, A. Q., Zafar, A., Fatima, N., 2016, Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis, *PLoS ONE*, 11(4), e0152925.
- Mauritz, K.A., Moore, R. B., 2004, State of Understanding of Nafion, *Chemical reviews*, 104 (10), 4535- 4585.
- Miller, J.N., Miller, J.C., 2010, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, sixth edition, Ashford Colour Press Ltd., Gosport, UK. ISBN: 978-0-273-73042-2, 171-172.
- National Research Council, 1995, *Chemical Sensors*, Expanding the Vision of Sensor Materials, Chapter 6, National Academy press, Washington, DC, 73-77.
- Ozyurek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2011, The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement, *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (4), 652-664.
- Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K.S., Ercağ, E., Esin Çelik, S., Baki, S., Yıldız, L., Karaman, S., Apak, R., 2011, A comprehensive review of CUPRAC methodology, *Analytical methods*, 3, 2439 -2453.
- Peggy Hsieh, Y.H., Ping Hsieh, Y., 2000, Kinetics of Fe(III) Reduction by Ascorbic Acid in Aqueous Solutions, *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 48 (5), 1569-1573.

- Pellegrini, N., Miglio, C., Del Rio, D., Salvatore, S., Serafini, M., Brighenti, F., 2009, Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60 (2): 12–22.
- Perry, G., Cash, A. D., Smith, M. A., 2002, Alzheimer Disease and Oxidative Stress, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2(3), 120–123.
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., 2008, Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health, *International Journal of Biomedical Science*, 4 (2): 89-96.
- Powell, H.K.I., Taylor, M. C., 1982, Interactions of Iron(II) and Iron(III) with Gallic Acid and its Homologues: a Potentiometric and Spectrophotometric Study, *Australian Journal of Chemistry*, 35 (4), 739-56.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005, Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (10), 4290-4302.
- Robinson, D. S., Monsey, J.B., 1975, The composition and proposed subunit structure of egg-white β -ovomucin, *Biochemical Journal*, 147 (1), 55–62.
- Rudyk, O., Eaton, P., 2014, Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. *Redox Biology*, 2, 803–813.
- Sadowska-Bartosz, I., Galiniak, S., Bartosz, G., Rachel, M., 2014, Oxidative Modification of Proteins in Pediatric Cystic Fibrosis with Bacterial Infections, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1-10.
- Shalaby, E.A., Shanab, S.M.M., Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(10), 528-539.
- Stadman, E.R., Levine, R.L., 2000, Protein Oxidation, *Annals of the New York academy of science*, 899:191-208.
- Stein, W.H., MOORE, S., 1949, Amino acid composition of β -lactoglobulin and bovine serum albumin, *Journal of Biological Chemistry*, 178, 79-91.
- Suzuki, Y. J., Carini, M., Butterfield, D. A., 2010, Protein Carbonylation, *Antioxidants and Redox Signaling*, 12(3), 323–325.
- Thomas, E. L., Bozeman, P. M., Jefferson, M. M., King, C. C., 1995, Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. Formation of bromamines, *Journal of Biological Chemistry*, 270 (7), 2906–2913.

- Thomas, E. L., Grisham, M. B., Jefferson, M. M., 1986, Preparation and characterization of chloramines, *Methods in Enzymology*, 132, 569–585.
- Uzunboy, S., Demirci Çekiç, S., Eksin, E., Erdem, A., Apak, R., 2017, CUPRAC colorimetric and electroanalytical methods determining antioxidant activity based on prevention of oxidative DNA damage, *Analytical Biochemistry*, 518, 69-77.
- Vigneshvar, S., Sudhakumari, C. C., Senthilkumaran, B., Prakash, H., 2016, Recent Advances in Biosensor Technology for Potential Applications – An Overview, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4 (11).
- Vinson, J.A., Hao, Y., Su, X., Zubik, L., 1998, Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (9), 3630-3634.
- Weber, D., Davies, M. J., & Grune, T., 2015, Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox Biology*, 5, 367–380.
- Wiseman H., Halliwell B., 1996, Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer, *Biochemical Journal*, 313 (1), 17-29.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillere-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff. J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B., 1996, Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney International*, 49(5), 1304-13.
- Wolff, S. P., 1994, Ferrous ion oxidation in the presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides, *Methods in Enzymology*, 233, 182–189.
- Wong, C.M., Bansal, G., Marcocci, L., Suzuki, Y. J., 2012, Proposed role of primary protein carbonylation in cell signaling, *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 17(2), 90–94.
- Yan, L.J., Forster, M. J., 2011, Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: a review, *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 879(17-18), 1308-1315.
- Yılmaz, D., Akpınar Bayızit, A., Özcan Yılsay, T., 2007, Süt proteinlerinin yenilebilir film ve kaplamalarda kullanılması, *Gıda teknolojileri elektronik Dergisi*, 1, 59-64.
- Young, I.S., Woodside, J.V., 2001, Antioxidants in health and disease, *Journal of Clinical Pathology*, 54 (3), 176–186.
- Zhou, Z. R., Smith, D. L., 1990, Assignment of disulfide bonds in proteins by partial acidhydrolysis and mass-spectrometry, *Journal of Protein Chemistry*, 9 (5), 523–532.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı Govigerel BAYARSAIKHAN
 Doğum Yeri MOĞOLİSTAN
 Doğum Tarihi 06.01.1989
 Uyuşu T.C. Diğer: Moğolistan
 Telefon +90-553-005-11-43
 E-Posta Adresi govio888@yahoo.com
 Web Adresi



Eğitim Bilgileri

Lisans

Üniversite Moğolistan Halk Üniversitesi
 Fakülte Kimya ve Kimya Mühendisliği Fakültesi
 Bölümü Analitik ve Çevre kimyası
 Mezuniyet Yılı 15.06.2010

Yüksek Lisans

Üniversite Moğolistan Halk Üniversitesi
 Enstitü Adı Kimya ve Kimya Mühendisliği Fakültesi
 Anabilim Dalı Analitik ve Çevre kimyası Dalı
 Programı Analitik ve Çevre kimyası

Doktora

Üniversite İstanbul Üniversitesi
 Enstitü Adı Fen Bilimleri Enstitüsü
 Anabilim Dalı Kimya Anabilim Dalı
 Programı Analitik Kimya Programı

Makale ve Bildiriler

Bildiriler

Bayarsaikhan, G., Dondurmacıoğlu, F., Avan, A.N., Demirci çekic, S., Apak, R., 2016, Spectrophotometric Determination of 2,3-DHBA and catechol, *Aegean Analytical Chemistry Days 2016*, 203.

Bayarsaikhan, G., Uzunboy, S., Demirci Çekiç, S., Apak, R., 2016, Determination of Oxidative Protein Damage Using Modified CUPRAC Method, *Aegean Analytical Chemistry Days 2016*, 284.

Makale:

Bayarsaikhan, G., Dondurmacıoğlu, F., Avan, A.N., Demirci Çekiç, S., Apak, R., 2018, Novel colorimetric assay of 2,3-dihydroxybenzoate among other isomers as a selective indicator of hydroxyl radical damage and related antioxidant activity, *Analytical Letters*, 51 (1-2), 236 – 253.