

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MDBK HÜCRELERİNDE METİL CİVA ETKİLİ OKSİDATİF STRESE KARŞI  
KAFEİK ASİT VE GALLİK ASİTİN MUHTEMEL KORUYUCU ETKİSİNİN  
BELİRLENMESİ**

**Çağlar GÜLER**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ÇANKIRI  
2017**

**Her hakkı saklıdır**

## TEZ ONAYI

ÇAĞLAR GÜLER tarafından hazırlanan “MDBK HÜCRELERİNDE METİL CİVA ETKİLİ OKSİDATİF STRESE KARŞI KAFEİK ASİT VE GALLİK ASİTİN MUHTEMEL KORUYUCU ETKİSİNİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması 25.08.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Yrd. Doç. Dr. Şevki ADEM

**Jüri Üyeleri** :

**Başkan:** Yrd. Doç. Dr. Müslüm KUZU

**Üye:** Doç. Dr. Volkan EYÜPOĞLU

**Üye:** Yrd. Doç. Dr. Şevki ADEM

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Doç. Dr. Tamer KEÇELİ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Metal toksisitesi dünya çapında insan sağlığını tehdit eden önemli bir etkidir. Bu metaller var olan birçok hastalığın temel etkeni olarak değerlendirilmekle beraber birçok kronik hastalığında tetikleyicisi olarak bilinmektedir. Bazı metallerin toksisite değerleri diğerlerine göre çok daha fazladır. Bazıları ise ekosisteme dahil olduklarında çok daha fazla tehdit edici bir forma dönüşebilmektedir. Civa toksik değeri oldukça yüksek bir metaldir. Metil civa ise ondan çok daha fazla tehlikeli bir formudur. Metil civa su kaynakları yoluyla insan, hayvan ve bitkilere düşük konsantrasyonlarda ulaşmakta, fakat sucul besin kaynakları yoluyla toksik miktarlara erişebilmektedir. Bu nedenle toksik etkinin azaltılması önemlidir.

Bu tez kapsamında metil civanın MDBK hücreleri üzerinde toksik etkisi incelenmiş ve kafeik asit ile gallik asitin bu toksik etkiyi azaltma potansiyeli araştırılmıştır. Çalışma sonunda MDBK hücreleri üzerinde metilcivanın oluşturduğu toksik etki kafeik asit ve gallik asit tarafından önemli oranda düşürüldüğü belirlenmiştir.

Tez çalışmam boyunca, tüm bilgi ve birikimiyle yanımda olan benden desteğini esirgemeyen tez yazımında büyük yardımlarını gördüğüm değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Şevki ADEM' e,

Hücre kültür çalışmalarında değerli zamanından bana vakit ayırıp yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLOĞLU' na

Kendisinin tüm laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan sayın Doç. Dr. Volkan EYÜPOĞLU' na

Kendi çalışmaları olmasına rağmen, tez çalışmalarım boyunca beni motive eden, deneyimlerinden faydalandığım sevgili hocalarım Arş. Gör. Serkan KOLDAŞ, Uzm. Ali Rıza TÜFEKÇİ ve Uzm. Fatih GÜL' e,

İyi günümde kötü günümde maddi manevi hiçbir desteğini benden esirgemeyen beni hayata en iyi şekilde hazırlayan bana zorluklardan kaçmayı değil onlarla savaşmayı öğreten, geleceğe güvenle bakmamı sağlayan aileme;

Teşekkürü borç bilirim

Bu çalışma Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmalara desteklerinden dolayı bölüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu çalışma Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: FF111115L36)

Ayrıca tez çalışmalarım esnasında meydana gelen 15 Temmuz hain darbe girişiminde şehit olan tüm kardeşlerimize, büyüklerimize Allah'tan rahmet gazilerimize acil şifalar diler minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Çağlar GÜLER  
ÇANKIRI, Ağustos 2017



## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	i
SİMGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÖZET .....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. GENEL BİLGİLER.....	2
1.1.1. Enzim ile ilgili tanımlar .....	2
1.1.2. Enzim aktivitelerinin tayininde kullanılan yöntemler .....	3
1.1.3. Enzimlerin tarihi.....	6
1.1.4. Oksidatif stres.....	7
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	10
2.1. Kafeik Asit .....	13
2.2. Gallik asit.....	14
2.3. Oksidatif stres belirteçleri olan enzimler.....	15
2.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD):.....	15
2.3.2. Katalaz (CAT):.....	15
2.3.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx):.....	15
2.3.4. Glutasyon Redüktaz (GR) .....	16
2.4. Oksidatif stresin önemli belirteçleri olan metabolitler .....	16
2.4.1. Glutasyon:.....	16
2.4.2. Malondialdehid (MDA):.....	17
2.4.3. Protein Karbonil (PCO):.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. Gereç .....	18
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Hücre Kültürü çalışmaları .....	21
3.2.2. Antioksidan enzim aktiviteleri.....	23
3.2.3. Metabolit miktarlarının belirlenmesi.....	28
4. BULGULAR.....	30
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	42
KAYNAKLAR .....	44
ÖZGEÇMİŞ.....	47

## SİMGELER DİZİNİ

MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
$\mu\text{M}$	Mikromolar
SOD	Süperoksit Dismustaz
CAT	Katalaz
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GR	Glutatyon Redüktaz
MDA	Malondialdehid
PCO	Protein Karbonil
KA	Kafeik Asit
GA	Gallik Asit
MC	Metil Civa
GSH	İndirgenmiş Glutatyon
GSSG	Okside Glutatyon
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
EÜ	Enzim Ünitesi
ATP	Adenin tri fosfat
ADP	Adenin di fosfat
ES	Enzim substrat kompleksi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Civanın kaynakları, metil civaya dönüşümü ve insanlara geçmesi (14). ....	10
Şekil 2. Metil civanın hücre üzerinde oksidatif stres ile oluşturacağı etki ve kafeik asit ve gallik asit ile oluşması beklenen muhtemel etki .....	13
Şekil 4. Glutasyonun hücredeki rolü (35) .....	17
Şekil 4.1 de MBDK hücreleri üzerine farklı derişimlerde metil civa eklenerek hücre canlılığı üzerine etkisi incelendi.....	30
Şekil 4.1. Metil civanını MBDK hücreleri üzerindeki toksik etkisi .....	31
Şekil 4.2. MBDK hücrelerinin canlılığı üzerinde kafeik asidin etkisi.....	31
Şekil 4.3. MBDK hücrelerinin canlılığı üzerinde metil civanın oluşturduğu toksik etkiyi kafeik asidin önleme etkisi.....	32
Şekil 4.4. Katalaz enzim aktivitesi ölçümleri .....	33
Şekil 4.5. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ölçümleri .....	33
Şekil 4.6. Glutasyon peroksidaz enzim aktivite ölçümleri.....	34
Şekil 4.7. Glutasyon redüktaz enzim aktivite ölçümleri .....	34
Şekil 4.8. Glutasyon seviyesi sonuçları.....	35
Şekil 4.9. Malonildialdehit seviyesi sonuçları .....	35
Şekil 4.10. Protein miktarı seviyesi sonuçları.....	36
Şekil 4.11. Protein karbonil seviyesi sonuçları.....	36
Şekil 4.12. MBDK hücrelerinin canlılığı üzerinde gallik asidin etkisi.....	37
Şekil 4.13. MBDK hücrelerinin canlılığı üzerinde metil civanın oluşturduğu toksik etkiyi gallik asidin önleme etkisi.....	37
Şekil 4.14. Katalaz enzim aktivitesi ölçümleri .....	38
Şekil 4.15. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ölçümleri .....	38
Şekil 4.16. Glutasyon peroksidaz enzim aktivite ölçümleri.....	39
Şekil 4.17. Glutasyon redüktaz enzim aktivite ölçümleri .....	39
Şekil 4.18. Glutasyon seviyesi sonuçları.....	40
Şekil 4.19. Malonildialdehit seviyesi sonuçları .....	40
Şekil 4.20. Protein miktarı seviyesi sonuçları.....	41
Şekil 4.21. Protein karbonil seviyesi sonuçları.....	41

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### MDBK HÜCRELERİNDE METİL CİVA ETKİLİ OKSİDATİF STRESE KARŞI KAFEİK ASİT VE GALLİK ASİTİN MUHTEMEL KORUYUCU ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Çağlar GÜLER

Çankırı Karatekin Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Şevki ADEM

Metal toksisitesi dünya çapında temel bir halk sağlığı problemidir. Metaller ve metalik bileşikler çeşitli organ sistemleri ile etkileşir. Metil cıva canlı organizmalar için çok zararlı bir zehir olarak sınıflandırılmaktadır. Birçok araştırmacı metil cıvaya maruz kalmanın insanlar ve laboratuvar hayvanlarında birçok biyokimyasal fonksiyon bozukluğuna neden olabileceğini ifade etmiştir. Metil cıva lipid peroksidasyonu, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, protein sentezi gibi metabolik prosesleri etkileyebilir.

Bu çalışmada metil cıvanın MDBK hücreleri üzerinde toksik etkisi test edildi. Metil cıvanın IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> değerleri 2, 25 ve 60 mM olarak tespit edildi. Metil cıva katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimlerini inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, metil cıva malondialdehit ve protein karbonil oluşumunu önemli oranda etkilemiştir. Glutatyon miktarını önemli oranda düşürmüştür. Çalışmada metil cıva ile oluşturulmuş toksik etki üzerinde kafeik asidin etkisi araştırılmış ve oluşan etkiyi azaltmada kafeik asidin etkili olduğu gözlemlenmiştir.

**2017, 46 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** metil cıva; kafeik asit; gallik asit; oksidatif stres; antioksidan savunma sistemi



## ABSTRACT

MSc. Thesis

INVESTIGATION OF THE POSSIBLE PROTECTIVE EFFECT OF CAFFEIC ACID  
AND GALLIC ACID TOWARDS MERCURY-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN  
MDKB CELLS

Caglar GULER

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

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Şevki ADEM

Metal toxicity is a major public health problem worldwide. Metals and metal compounds interfere with functions of various organ systems. Methylmercury (MeHg) is classified as a very harmful toxicant to living organisms. Many investigations have stated that methylmercuric exposure could induce a wide range of biochemical dysfunctions in humans and laboratory animals. This compound affects metabolic processes such as lipid peroxidation, formation of reactive oxygen species, protein synthesis.

In this study, toxic effects of methylmercury on MDBK cells were tested. IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> and IC<sub>75</sub> values of methyl mercury were determined as 2, 25 and 60 µM. The methyl mercury inhibited on the activities of catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. Also, methyl mercury dramatically effected the formation of DPC, malondialdehyde, protein carbonyl. It also considerably reduced the amount of glutathione. In this study, we investigated the effects of caffeic acid on MeHg-induced toxicity in MDBK cells of rats. Caffeic acid decreased significantly toxic effect of methyl mercury.

**2017, 46 pages**

**Keywords:** methylmercury; caffeic acid; gallic acid; oxidative stress; antioxidant defensesystem

## 1. GİRİŞ

Sanayideki hızlı gelişimlerle insanların ve diğer canlıların metal toksisitesine maruz kalma oranı artmakta ve her yıl yüzbinlerce kişinin bu nedenlerden dolayı ölmesine, milyonlarca insanın metal toksisitesi kaynaklı hastalıklara yakalanmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, metaller uzun yıllardan beri akut ya da kronik toksisiteye neden olan ajanlar olarak değerlendirilmektedir.

Metal toksisitesi insanları çeşitli şekillerde maruziyeti altında bırakmaktadır. İnsanların besin kaynaklarına, sularına ve soluduğu havaya çeşitli metaller karışmakta ve hayat kalitelerini tehdit ederek düşürmektedir. Metallerin bazıları bazılarında daha toksik etkiye sahiptir. Toksik etkisi en yüksek olan metaller sıralamasında, arsenik ve kurşundan sonra en toksik üçüncü metal cıvadır (Bridges and Zalups, 2010). Metil cıva, cıvanın sucul canlılarca dönüştürülmüş formu olup cıvadan çok daha toksik bir madde olarak değerlendirilmektedir.

Metaller insanlarda nörolojik ve kardiyovasküler rahatsızlıklara neden oldukları gibi böbrek, karaciğer gibi dokular üzerinde önemli toksik etkilere neden olmaktadır. Bu maddelerin toksik etki göstermesinde oksidatif stresin önemli bir faktör olduğu ifade edilmiştir. Oksidatif strese maruz kalan hücrede serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin miktarında bir artış gözükmektedir. Hem serbest radikaller ve hem de reaktif oksijen türevleri nükleik asitler, serbest amino asitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbohidratlar ve bağ dokusu makromolekülleri de dâhil olmak üzere, canlı organizmaların yapısında bulunan hemen hemen bütün biyomoleküllerle reaksiyona girerek dönüşümlü ve dönüşümsüz hasarlar meydana gelmektedir (Cross et al., 1987).

Metal toksisitesine karşı koruyucu önlemlerin alınması hem küresel çaptaki hastalıkların önlenmesi hem de bireylerin hayat kalitesini artırmak için zorunluluk haline gelmiştir. Birçok araştırmacı bu metallerin toksik etkilerinin azaltılması ile ilgili çalışmalar yapmaktadır. Bu çalışmada toksisite sıralamasında ilk üçte bulunan metil cıvanın toksik etkisini azaltmada kafeik asit ve gallik asitin etkisi araştırılmıştır

## 1.1.GENEL BİLGİLER

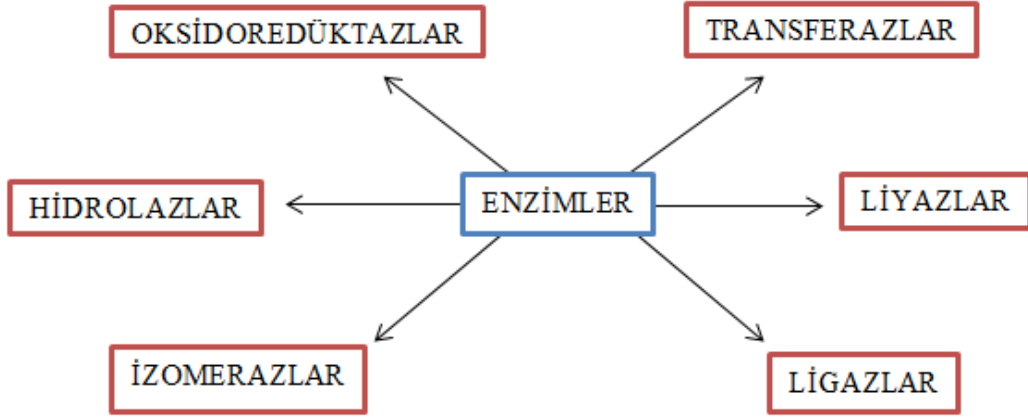
### 1.1.1. Enzim ile ilgili tanımlar

Vücudumuzdaki biyokimyasal reaksiyonların tamamı protein yapısında bulunan (katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç) ve organik moleküller olan enzimler tarafından katalize edilmektedirler. Enzimler canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda sentez edilir fakat *in vitro* olarak da etkinlik gösterirler. Enzim kelime anlamı olarak Latince de fermentum Yunanca da ise zyme yani maya anlamına gelmektedir. İnsanlar çok eski devirlerden beri enzimatik reaksiyonlardan fayda sağlamışlardır. Örnek olarak; şarap, yoğurt, ekme, sirke, boza yapımında canlı ürünü olan enzimlerden, enzimlerin katalitik etkilerini bilmeden de olsa yararlanmışlardır. Enzimler reaksiyon hızını çok fazla arttırabilirler (Keha, 2011).

Enzimler üzerinde durulması gereken çok özel proteinlerdir. Çoğu zaman sentetik ve inorganik katalizörlerden çok daha güçlü katalitik özellikleri mevcuttur. Reaksiyon hızını arttırmakla beraber ph ve sıcaklığın optimum olduğu koşullar altında çözeltilerde fonksiyon gösterirler. Enzimler kimyasal enerjiyi korur, dönüştürür ve basit öncüllerden biyolojik makromoleküller üretirler. Bu enzimlerin besinsel moleküllerin parçalandığı tepkime basamaklarını katalizlemesi sonucu ortaya çıkan bir durumdur(Lehninger, 2008).

Bazı enzimlerin fonksiyon gösterebilmeleri için protein yapısında olmayan maddelere (kofaktör) ihtiyaçları vardır. Bu kofaktörler bir metal iyonu veya koenzim adı verilen organik ya da inorganik olabilen çoğunlukla fosfat içeren ve protein kısmına göre çok daha ufak moleküllü kısımlardır. Enzimlerin üzerine etki ederek ürüne dönüştürdükleri maddeler vardır. Bu maddelere de “substrat” adı verilir. Substratlar genellikle her enzim için spesifiktir. Özellikle *in vivo* koşullarda tek tip bir reaksiyonu katalizlerler. Birçok enzim hücre içinde farklı kısımlarda eksprese olurlar ve bu özellikleri sayesinde bir tepkimenin substratı ve ürünü diğer reaksiyonlardan izole edilebilir (Harvey and Ferrier, 2011).

Enzimler katalizledikleri reaksiyon tipi ve mekanizmalarına göre çeşitli sınıflara ayrılmışlardır.



Enzimler substrat moleküllerini ürüne dönüştüren reaksiyonları katalizlerler. 1913 yılına gelindiğinde Leonor Michaelis ve Maud Menten iki biyokimyacı enzimli reaksiyonların ilk basamağında bir ES oluşmasından ve enzimlerin doygunluk özelliklerinden faydalanarak bir model geliştirmişlerdir (Keha, 2011) . Bu model de enzim sustratıyla geri dönüşümlü olarak bağlanır ve bir ES kompleksi meydana getirir.

Enzimlerin hem in vivo hem de in vitro ortamda aktiviteleri bazı bileşikler tarafından azaltılabilir hatta yok edilebilir. Bu olaya “inhibisyon” adı verilirken aktivitelerinin azaltılmasına neden olan maddelere de “inhibitör” adı verilmektedir. İnhibitör adı verilen bu maddeler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler ve iyonlardır.

### 1.1.2. Enzim aktivitelerinin tayininde kullanılan yöntemler

Enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan çeşitli yöntemler mevcuttur. Enzimlerin aktivite tayinlerinde çoğu zaman kaybolan substrat miktarı tayin edilirken bazı durumlarda da meydana gelen ürün miktarı belirlenerek enzim aktivitesi ölçülür. Çoğunlukla hücredeki enzim proteinini belirlemek etmek çok zor bir olaydır. Bunun yerine kaybolan substrat veya oluşan ürün miktarı belirlenmek kadesiyle enzim hakkında bir fikir sahibi olabiliriz. Enzim aktivite tayininde yöntem seçimi büyük önem

arz etmektedir. Yöntem belirlenirken metodun pratik oluşuna, zaman kaybına yol açmamasına ve ayrıca hassas oluşuna da özen göstermek gerekir.

Bir mikromol substratı bir dakikada ve optimal koşullarda ürüne çeviren enzim miktarı bir ünite olarak kabul edilmektedir. Enzim üniteleri UI şeklinde gösterilmektedir. Bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak kabul edilir. Spesifik aktivite ünite/mg protein olarak ifade edilmektedir (Keha, 2011)

Enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler yedi başlık altında toplanabilir.

- Spektrofotometrik yöntem,
- Monometrik yöntem,
- Thunberg yöntemi,
- Elektrot yöntemi,
- Polimerik yöntem,
- Kromatografik yöntem,
- Kimyasal tayin yöntemi

#### **1.1.2.1.Spektrofotometrik yöntem**

Pek çok enzimin substratı kendine özgüdür ve ürün ya da koenzimi, görülen ya da ultraviyole ışıkta bir tepe değerinde absormans vermektedir. Bu koşullarda ya substratın miktarının azalması veya ürün oluşumu gibi koenzimdeki değişiklik spektrofotometreden faydalanarak tayin edilir. Spektrofotometrik yöntem kolaylığı, basitliği ve hassas oluşu nedeniyle diğer yöntemlere göre daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntemde optik dansite değişimi, belirli miktardaki enzim ünitesini verir. Birçok enzimin aktivite tayini bu yöntem ile yapılmaktadır (<http://www.arsivbelge.com/yaz.php?sc=1935>) (2017).

### **1.1.2.2.Monometrik yöntem**

Bir komponenti yani bileşeni gaz olan enzimlerin aktivitelerinin tayini için kullanılan yöntemdir. Örneğin; oksidazlarla oksijen alınımı ve dekarboksilazlarla karbon dioksit salınımı bu yöntemle ölçülür.

### **1.1.2.3.Thunberg yöntemi**

Genellikle dehidrogenaz enzim aktiviteleri bu yöntem vasıtasıyla belirlenmektedir. Metilen mavisi elektron akseptörüdür. Bu bileşiğin okside olmuş hadeki durumu renkli iken redükte haldeki durumu ise renksizdir. Bu yöntemde enzim aktivite tayin ortamına belirlenen miktarda metilen mavisi ilave edilir ve göz ile renk kaybolmasındaki geçen zaman kronometre yardımıyla dikkatli bir şekilde saptanır. Bu yöntemde dikkat edilmesi gereken en önemli husus deney havanın oksijeninden korunması için özel bir tüpte yapılması gerektiğidir. Bu özel tüpe Thunberg tüpü adı verilir ve bu metod da adını bu tüpten almıştır.

### **1.1.2.4.Polimerik yöntem**

Birçok enzimin substratı optikçe aktiftir. Bu yöntem iki durumda kullanılabilir. İlk olarak eğer üründe optik aktivite değişmesi görülecek olursa bu yöntem kullanılmaktadır. İkincisi ise substratın aktif ve ürünün optikçe aktif olduğu durumlarda yine bu yöntem uygulanmaktadır. Eğer substrat ve ürünün ikisi de optikçe inaktif ise, o zaman bu yöntemin kullanılması uygun değildir.

### **1.1.2.5.Kromatografik yöntem**

Eğer diğer yöntemler kullanılarak bir ölçme yapılamamıyor ise bu yönteme başvurulur. Enzim substrat karışımlarında belli zaman aralıklarında örnekler alınır. Kromatografik yöntemde, substrat ve ürün kromatografi kağıdına veya ince tabaka kromatografisiyle birbirinden ayırt edilir. Bazı hallerde radyoaktif substrat kullanıldığı için ayırmadan

sonra leke, ya ince tabaka kromatografisinde olduğu gibi kazınacak, ya da kağıt kromatografisinde olduğu gibi kesilerek sayım şişelerine koyulacaktır. Radyoaktivite miktarı sayaçta sayılır ve tayini yapılır. Bazı enzim aktivitelinde ürünün meydana getirdiği lekenin büyümesi ile enzim faaliyeti hakkında bilgi edinilir.

#### **1.1.2.6. Kimyasal tayin yöntemi**

Birçok enzim tepkime başladığı andan itibaren belirli zaman dilimlerinde karışımından örnek alınarak, substrat ve ürünün kimyasal yöntem ile miktarı tayin edilir. FISKE ve SUBBAROW kolorimetrik yöntemi olarak inorganik fosfat tayinini gerçekleştirmiştir. Fosforilaz, fosfotaz, nükleotidaz enzimlerinin aktivite tayinleri aynı yolla yapılır. Pirofosfat (Ppi) bağı, bir normal hidroklorik asit ve 100 °C' da on dakika kaynatılmakla kırılmakta ve inorganik fosfat meydana gelmektedir. İnorganik fosfatın miktarı ise, kolorimetrik yöntem ile tayin edilmektedir. ATP ve ADP' nin karıştığı bazı kinaz ve sentetaz reaksiyonlarında enzim aktivitesi bu yöntem ile tayin edilir.

#### **1.1.3. Enzimlerin tarihi**

Enzimatik reaksiyonlar niteliği bilinmemesine karşın yazının keşfinden çok evvel gözlemlenmiş ve kullanılmıştır. Sütün ekşimesi, şekerin fermantasyon ile alkol oluşturması, şarap sirke ve peynirin yapılması ve ekmeğin mayalanması gibi enzimatik reaksiyonlar çok uzun sürelerdir bilinmekte ve kullanılmaktadır. Payen ve Persoz 1883'de malt ekstraktından alkol ile nişastayı dijest eden enzimi çöktürmüşler ve buna diastase adını vermişlerdir. Yaklaşık olarak aynı tarihlerde Beaumont mide suyunun sindirimi kolaylaştıran kimyasa bir maddeye bağı olduğunu bulmuş ve 1836'da Schawn bu maddeyi izole edip pepsin adını vermiştir. Louis Pasteur fermantasyon, pütrefaksiyon gibi kimyasal reaksiyonların canlı organizmalar tarafından meydana getirildiğini kanıtlamıştır. Fakat Pasteur bunun sadece intakt canlı hücreler tarafından meydana getirilebileceğini öne sürmüştü. Buna karşın Büchner fermantasyon yapan maya hücrelerini kumla ezerek hücreleri parçalamış ve bu karışımı yüksek tazyik altında süzmüş ve hücre ihtiva etmeyen bir hale getirmiştir. Bu hücre içermeyen sıvının glukozu fermantasyona uğrattını gözlemlemiş ve Pasteur'un tezini çürütmüştür. Enzim

adı W. Kühne tarafından konulmuş olup maya anlamına gelmektedir. Fakat günümüzde enzim kelimesi her ne kaynaklı olursa olsun bütün biyolojik katalizörler için kullanılmaktadır (ankara üniversitesi eczacılık fakültesi yayınları sayı 8, 1965 <http://kitaplar.ankara.edu.tr/dosyalar/pdf/245.pdf>). (2017)

#### **1.1.4. Oksidatif stres**

##### **1.1.4.1.Serbest radikaller**

Atomlarda ki elektronlar, orbital denilen uzaysal bölgede çift olarak bulunurlar. Moleküllerin ise birçoğu çift elektronlu iken az bir kısmı tek elektronludur. Eksik elektronu olan bu moleküller aşırı derecede reaktif olup kararsızlardır. Buldukları herhangi bir molekül ile etkileşime girip bu molekülden ya bir elektron alır veyahut bir elektron verirler (Knight, 2000).

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron taşıyan, birçok fizyolojik ve patolojik olumsuzluklara neden olabilen oldukça aktif atom veya moleküllerdir. İnsan vücudundaki tüm hücrelere rahat bir şekilde girebilen ve en çok kullanıma özelliği olan O<sub>2</sub> yapısı gereği radikal olmaya çok uygundur ve serbest radikal denince ilk akla gelendir. Serbest oksijen radikalleri ve serbest radikaller organizmada normal şartlar altında sürekli oluşmaktadır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler ve biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar (Young et al., 1997).

Serbest radikaller vücutta 3 yolla meydana gelir. Bunlar;

- Kovalent bağların homolitik kırılması
- Normal bir molekülden bir elektron eksilmesi ya da bir molekülün heterolitik bölünmesi
- Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi



Serbest radikaller ve antioksidan savunma mekanizması arasında bir denge mevcuttur. Bu denge oksidanlar lehine bozulursa serbest radikaller; lipit, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküller ile etkileşerek hücrenin yapısal ve metabolik olarak değişmesine sebep olur (Halliwell et al., 1992; Valko et al., 2007).

- Süperoksit Radikali: Bu radikal zayıf bir reaktiftir ve moleküler oksijenin bir elektron alıp indirgenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Süperoksit radikali bazı flovoenzimler ve ksantin oksidaz vasıtasıyla oluşturulmaktadır.
- Hidrojen Peroksit Radikali: hidrojen peroksit radikali oksijenin iki elektronla indirgenmesi sonucu oluşur. Bu radikallerin temizlendiği temkimeler dismutasyon tepkimeleri adıyla anılmaktadırlar.
- Hidroksil Radikali: biyolojik sistemlere en fazla hasar veren radikal hidroksil radikalleridir ve bu radikaller biyomoleküllerle reaksiyona girebilme özelliği olan güçlü radikallerdir. Hidroksil radikalının oluşumu ortamda geçiş metallere bağlıdır (Okada et al., 1994)
- Singlet Oksijen: enerji absorpsiyonu vasıtasıyla oksijende bulunan paylaşılmamış dış elektronları değiştirerek aynı veya farklı orbitale yerleşebilirler. Uyarılmış haldeki bu oksijene singlet oksijen adı verilir.

#### **1.1.4.2. Antioksidanlar**

Serbest radikal reaksiyonları nötrofil, makrofaj gibi immün sistem hücrelerinin savunma mekanizması için gereklidir fakat serbest radikallerin fazla miktarda üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin (ROT) yarılanma ömürleri kısa olmasına karşın başlattıkları serbest radikal zincir reaksiyonları ile doku hasarına sebep olabilirler. Bundan dolayı serbest radikallerin tetiklediği oksidatif hasara karşı savunma mekanizmaları harekete geçer. Bu savunma mekanizmaları önleyici mekanizmalar, tamir mekanizmaları, fiziksel savunmalar ve antioksidan savunmalardır (Knight, 2000; Valko et al., 2007).

Antioksidan savunma; canlı hücrelerde bulunan protein, karbonhidrat, lipit ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunun önlenmesi veya ertelenmesidir. Bu süreçte rol alan maddelere antioksidanlar adı verilmektedir (Blokina et al., 2003)

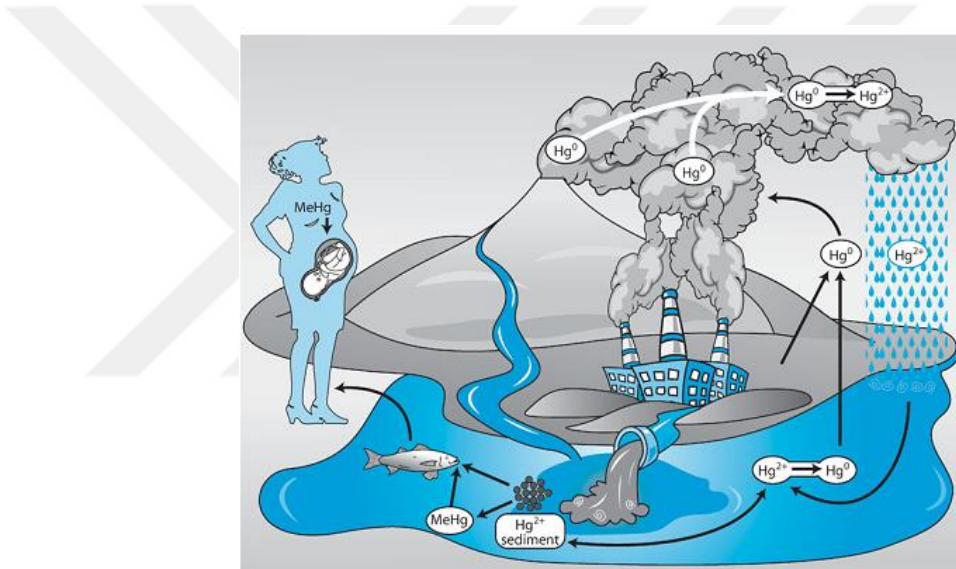
Antioksidanların etki mekanizmaları 3 şekilde gerçekleşir. Bunlar;

- Serbest radikallerin tutulması veya daha zayıf yeni bir moleküle çevrilmesi,
- Serbest radikalle etkileşim aktivitelerinin azaltılması,
- Serbest radikalleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirinin kırılması ya da onarım yapılması (Burton et al., 1985).



## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Cıva çevremizde bulunan hava, su ve toprakta bulunabilen bir metaldir. Atmosfere doğadan ve çalışma alanlarından elementel cıva olarak salınır. Daha sonra okside olarak inorganik cıvaya dönüşür. Suda veya toprakta yaşayan mikroorganizmalar tarafından metil cıvaya dönüştürülerek suya ve su kaynaklı beslenme döngüsüne dahil olur. Sudaki metil cıva konsantrasyonu toplam cıva konsantrasyonunun %15 gibi bir miktara tekabül ederken, bazı balık türlerinde bu oran sudaki derişiminin 1 800 ila 80 000 katına kadar varabilmektedir (Johnson, 2004). Cıvanın çevredeki kaynakları ve metil cıvaya dönüşüp insanlara nasıl geçtiği Şekil 1. de gösterilmiştir.



Şekil 1. Cıvanın kaynakları, metil cıvaya dönüşümü ve insanlara geçmesi (Nordberg et al., 2014).

İnsanlar genellikle balık ve balık ürünlerinin tüketerek metil cıva toksisitesine maruz kalmaktadır (Johnson, 2004). Besin maddeleri ile alınan metil cıva yaklaşık olarak %95'i sindirim sistemi tarafından hızlıca vücuda alınır. 30 saat içinde bütün dokulara dağılır. Metil cıva birçok dokuyu olumsuz etkilemektedir Kan beyin bariyerini aşarak beyin üzerinde toksik etki oluşturmaktadır (Bridges and Zalups, 2010). En çok etkilediği dokular

- Beyin.
- Karaciğerde
- Kan (özellikle eritrositler, kan plazmasındaki metil civanın %90-95'i)
- Böbrek (Bridges and Zalups, 2010).

Metil civa çeşitli şekillerde toksik etki göstermektedir.

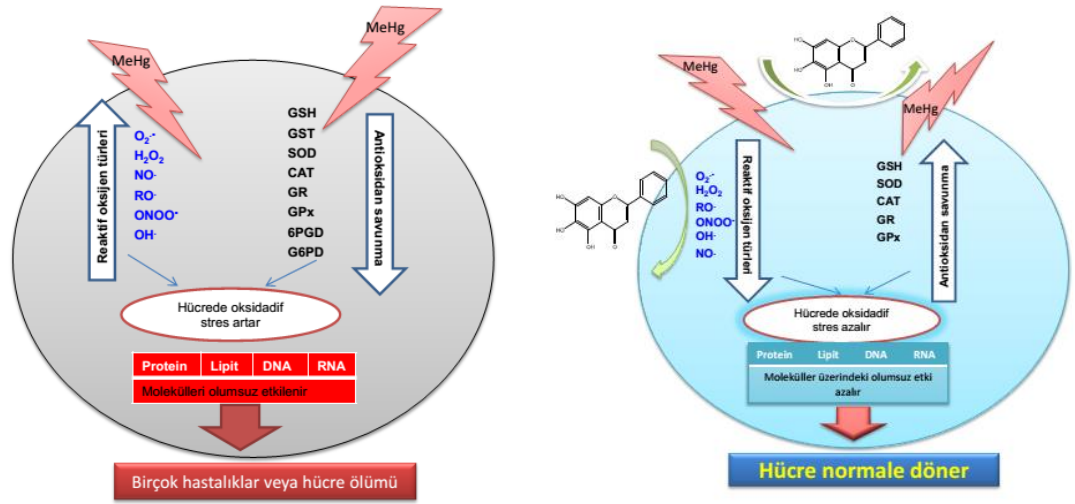
- Metilciva DNA ve RNA ile etkileşip onların sekonder yapısında değişikliğe neden olabilmektedir. DNA ve RNA'ya bağlanarak transkripsiyon ve translasyona engel olmaktadır. Bu nedenle, düşük dozlarda bile genotoksik bir madde olarak değerlendirilmektedir (Li et al., 2006; Schurz et al., 2000). Yapılan bazı çalışmalarda protein sentezini %50 inhibe ettiği ifade edilmiştir.
- Proteinlere bağlanarak onların üç boyutlu yapılarını bozabilmektedir. Özellikle selenyum, sistein ve sülfür grubu proteinlere bağlanmaktadır Metil civa elektrofilik özelliği nedeniyle biyomoleküllerle özellikle tiyol ve selenyum içerenlerle etkileşmektedir (Nordberg et al., 2014).
- Hücrede oksidatif strese neden olarak reaktif oksijen türlerinin artmasına neden olmaktadır. Bu sistemi, oksidatif savunma sistemi enzimlerine bağlanarak onları inhibe ederek, enzimlerin ekspirasyon seviyelerini etkileyerek, glutatyon (GSSG/GSH) ve thioredoxin (TrxSS/Trx(SH)<sub>2</sub>) gibi antioksidan metabolitlere bağlanıp onların hücre içi konsantrasyonlarında önemli değişikliklere neden olarak etkilemektedir. Bunun sonucu olarak da hücre ortamında reaktif oksijen türleri artmaktadır. Bu radikaller protein, lipit, DNA ve RNA gibi primer metabolitlere bağlanarak onların etkinliklerini azaltmakta ya da yapılarını bozmaktadır (Li et al., 2006; Patrick, 2002). Bu moleküllerde oluşan hasarlar hücre ortamında malondialdehid (MDA), protein karbonil (PCO) ve DNA-protein kroslink (DPC) miktarlarının artmasına neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin primer metabolitler üzerindeki etkisi ile hücrenin metabolizmasının normalin dışına çıkmasına neden olmakta ve bunun sonucu olarak da bazı metabolik hastalıklara sebebiyet vermektedir. Reaktif oksijen

türleri hücreyi koruyan hücre zarının yapısını oluşturan lipitlere bağlanarak zarın yapısını bozmak suretiyle hücrenin ölümüne neden olabilmektedir.

Birçok araştırmacı metallerin toksik etkilerinin azaltılması ile ilgili çalışmaktadır. Literatürde fenolik bileşiklerin antioksidan ve metal şelatlama özelliklerinden dolayı toksik etkiyi azaltmada kullanılabileceği belirtilmiş ve bazı çalışmalarla bu desteklenmiştir (Agarwal et al., 2010; Jagadeesan and Bharathi, 2014).

Metil civanın toksik etkisini antioksidan yâda şelatlama özelliği bulunan maddelerin azaltılabileceği literatürde belirtilmiştir. Bu çalışmada metil civanın toksik etkisini kafeik asit ve gallik asitin nasıl etilediği MDBK hücrelerinde *in vitro* olarak araştırılması amaçlanmıştır. Metil civa kan beyin bariyerini aşarak beyne ulaşarak nörotoksik etkiye neden olmasından dolayı rat C6 hücreleri iyi bir model oluşturduğu düşünülmektedir (Rodrigues et al., 2010).

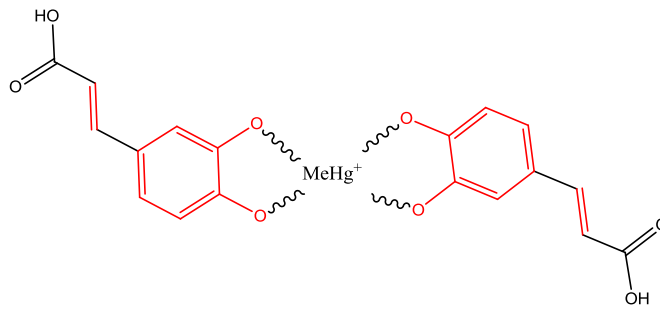
Fenolik bileşikler birçok biyoaktivite gösteren önemli bileşiklerdir. Hem antioksidan hem de güçlü şelat oluşturma özellikleri vardır. Bu bileşikler ortamdaki reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girmek suretiyle onların miktarının azaltılmasına neden oldukları gibi, metallere şelat oluşturarak onların toksik etkisini azaltabilir (Flora and Pachauri, 2010). Bu çalışmada fenolik bileşiklerden önemli bir bileşik olan Kafeik asit ve gallik asitin metil civanın toksik etkisini azaltma potansiyelleri incelenecektir (**Şekil 2**).



**Şekil 2.** Metil civanın hücre üzerinde oksidatif stres ile oluşturacağı etki ve kafeik asit ve gallik asit ile oluşması beklenen muhtemel etki

### 2.1. Kafeik Asit

Kafeik asit meyve, çay ve kahve gibi günlük diyetin önemli bileşenlerinin içinde bulunan doğal bir bileşiktir. Bu bileşik etkili bir antioksidan olmakla beraber aynı zamanda güçlü bir radikal giderici ve iyi bir metal şelatördür(Clifford, 2000; Gülçin, 2006). Bu özellikleri, catechol grubundan ve yan zincir üzerinde bulunan çift bağlardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Kafeik asidin kadmiyum ve nikel gibi metallerin oluşturduğu oksidatif strese karşı koruyucu etkisi çalışmalarda ifade edilmiştir (Ashour, 2014; Pari and Prasath, 2008).



**Şekil 3.** Kafeik asidin yapısı ile şelatlama ve antioksidan aktivitesinde muhtemel aktif kısımları ve yapacakları muhtemel şelat bileşiği

## 2.2. Gallik asit

Galik asit ve türevleri polifenil doğal ürünlerdir ve özellikle kırmızı şarap yeşil çay gibi işlenmiş içeceklerde bol miktarda bulunur (Graham, 1992). Antioksidan, anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal ve anti-kanser aktiviteleride dahil olmak üzere geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahiptir (Bachrach and Wang, 2002).

Sıklıkla taninlerin alkalın veya asit hidroliziyle ya da *Penicillium glaucum* veya *Aspergillus niger*' den elde edilen gallik asit (3,4,5-trihydroxybenzoic acid); gallik asit metil esteri, gallik asit lauril esteri ve propil galat üretiminde yaygın olarak kullanılan gıda antioksidan katkı maddesidir. Gallik asit işlenmiş gıda sektörünün yanı sıra kozmetik ve gıda paketlenme malzemelerinde, lipid peroksidasyonu ve bozulma sonucu oluşan koku riskini önlemek için kullanılır.

Gallik asit, peroksil radikallerini ve DPPH radikallerini süpüren bir fenolik asittir. Ayrıca gallik asidin mide pH'sında antioksidan etkisi vardır (Gunckel et al., 1998).

Metallerin oksidatif stres metabolizması üzerindeki toksik etkisi ile ilgili araştırmalarda bu sistem enzimlerinin aktivitesindeki değişim ve oksidatif stres belirteçlerinin miktarlarında oluşan değişimler ölçülmektedir.

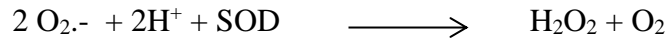
Tüm civa formlarının bazı organlarda özellikle de böbrekte toksik etkileri bulunmaktadır. Böbrek içinde, nefrondaki proksimal tüp toksik etkilere karşı en savunmasız kısımdır (Zalups, 2000). Böbrekteki tek değerlikli civa civa ve civa iyonlarının biyolojik ve toksikolojik aktivitesi, hedef hücrelerde ve çevresinde bulunan kritik nükleofilik bölgelerde oluşan moleküler etkileşimlerle büyük oranda tanımlanabilir.

Antioksidan sistemler hücreleri reaktif oksijen türlerinin (ROS) olumsuz etkilerine karşı korur. Bu savunma sistemi tükendiğinde hücreler oksidatif hasardan yeteri kadar korunamazlar. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonun gerçekleşmesini önleyerek ya da reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu baskırlar (Akkuş, 1995).

### 2.3. Oksidatif stres belirteçleri olan enzimler

#### 2.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD):

SOD, biyolojik sistemlerde üretilen süperoksit radikallerine karşı hücreyi koruyan mükemmel antioksidan bir enzimdir. Süperoksit radikallerinin ( $O_2^{\cdot-}$ ),  $H_2O_2$  ve oksijene hızlıca dönüşüm mutasyonunu katalizler (Khalid et al., 2013).

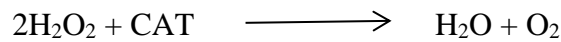


Bu reaksiyon oksidatif stresi önleme de ilk savunma olarak isimlendirilir. Bunun nedeni süperoksit zincirleme sisteminin radikal reaksiyonların güçlü bir başlatıcısı olmasıdır. Bu sayede doku hücrelerinde  $O_2^{\cdot-}$  düzeyleri kontrol altında tutulmuş olur.

Süperoksit dismutaz enzimi memeli canlıların tüm dokularında bulunur ve iki farklı tipi mevcuttur. Bakır – çinko içeren süperoksit dismutaz enzimi stoplazma ve damar endotelinde, manganez içeren tipi ise mitokondriyal matrikste bulunur (Hennekens et al., 1996).

#### 2.3.2. Katalaz (CAT):

Katalaz enzimi kanda, kemik iliğinde, mükoz membranlarda, böbrek, karaciğer ve eritrositlerde bulunan ve dört hem grubuna sahip bir hemoprotein olarak bilinmektedir. CAT, hem elektron verici hem de alıcı substrat olarak  $H_2O_2$  kullanır. Bu enzim  $H_2O_2$ 'in biyomoleküllere zarar vermesini engeller.  $H_2O_2$ , CAT ile parçalanmazsa canlıda kalıcı hasarlara neden olan serbest radikali oluşturur.



#### 2.3.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx):

Glutasyon peroksidaz hidroperoksitlerin indirgenmesinde sorumlu metalloenzimdir. Hücrenin sitozol ve mitokondriyal matriksinde yer alır ve dört Se atomu içerir. Lipid



peroksitlerini daha az toksik yağ asitlerine indirger. Bu enzim en fazla karaciğer, kalp, akciğer ve beyinde etki göstermektedir. Vitamin E ile birlikte lipid peroksidasyonuna karşı vücudun savunma sisteminin bir bölümünü oluşturmaktadır.

Glutasyon peroksidaz  $H_2O_2$  ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinde görev alırken, aşırı hidrojen peroksit varlığında indirgenmiş glutasyonun (GSH) okside glutatona (GSSG) dönüşümünü katalizler. Bu sayede hidrojen peroksitte detoksifiye edilmiş olur. Glutasyon peroksidazın inhibisyonu  $H_2O_2$  miktarının artmasına ve hücrelerin zarar görmesine neden olmaktadır (Akkuş, 1995; Hennekens et al., 1996).

#### **2.3.4. Glutasyon Redüktaz (GR)**

Glutasyon redüktaz (EC 1.8.1.7) enzimi ilk kez 1951 yılında tanımlanmıştır. Bu enzim yükseltgenmiş glutatyonu indirgenmiş hale çevirerek hücre içi glutasyon seviyesinin belirli oranda kalmasını sağlar (Ithayaraja, 2011).



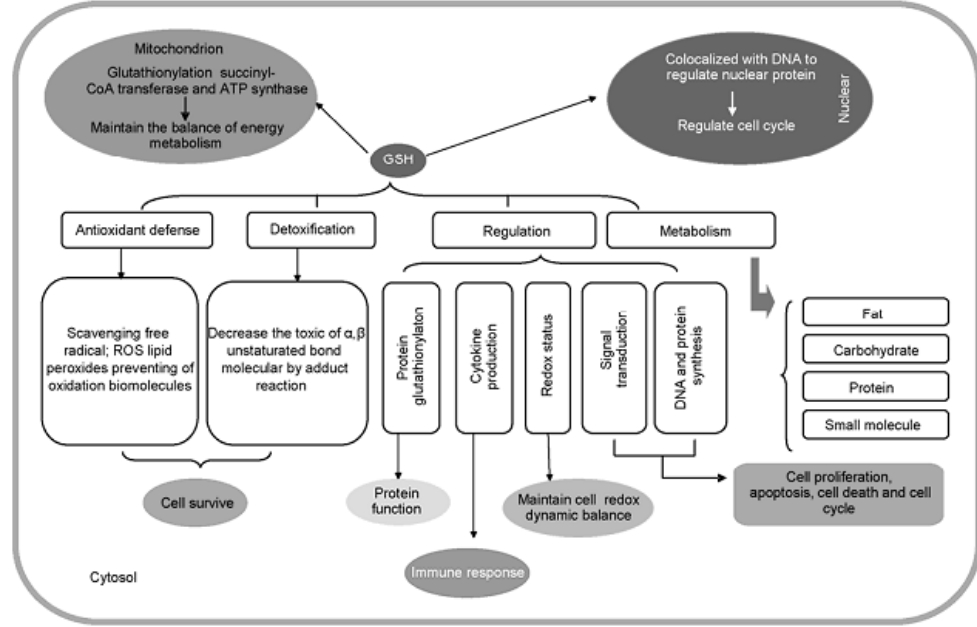
İnsan eritrosit GR enzimi 478 amino asitten oluşur ve birbirine disülfid bağı ile kovalent olarak bağlanmış iki alt birimden meydana gelir (Lehninger, 2008)

### **2.4.Oksidatif stresin önemli belirteçleri olan metabolitler**

#### **2.4.1. Glutasyon:**

Hücre içi en önemli antioksidan molekülü olan redükte glutasyon, antioksidan savunma sisteminde görev almaktan başka ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmesi, aminoasitlerin transportu, proteinlerdeki sülfidril gruplarının redükte halde tutulması, bazı enzimatik reaksiyonlarda koenzim görevi görmesi gibi birçok fizyolojik fonksiyonlara sahiptir (**Şekil 4.**) (Kenow et al., 2008). Metal toksisitesinde glutasyon miktarı önemli oranda düşmektedir. Bunun nedeni, metaller ya glutatona bağlanarak

hücre ortamındaki miktarını azaltmakta ya da glutatyonun oluşumunu katalizleyen glutatyon redüktaz enzimini inhibe etmektedir. Bu nedenle metal toksisitesini belirlemede önemli bir metabolittir.



Şekil 4. Glutatyonun hücredeki rolü (Zhao et al., 2011)

#### 2.4.2. Malondialdehid (MDA):

Oksidatif stresin doymamış yağlar üzerindeki etkisini belirlemek için kullanılan önemli bir belirteçtir (Dmitriev and Titov, 2010).

#### 2.4.3. Protein Karbonil (PCO):

Reaktif oksijen türlerinin proteinler üzerinde oluşturduğu etkiyi belirlemek için kullanılır (Li et al., 2010).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1.Gereç

##### Kullanılan Maddeler

- Potasyum Fosfat Monobazik ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Nitro Blue Tetrazolium
- Phenylmethylsulfonly fluoride
- B-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate disodium salt
- Hidrojen peroksit
- Tris – HCl
- Etilendiamin tetraasetik asit
- t-bütil hidroperoksit
- L-Glutathione reduced
- L-Glutathione okside
- $\beta$  – Nicotinamide adenine dinucleotide 2' – phosphate reduced tetrasodium salt hydrate
- Tiyobarbitürik asit
- Trikloraasetik asit
- 2,4 – dinitrofenil hidrazin
- HCl
- Guanidin hidroklorür
- KCl
- Proteinaz K
- Coomassie Brilliant Blue G-250
- Fosforik asit
- Etanol
- Metil civa
- Kafeik asit

## Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Spektrofotometre

Florometre

pH metre

Otomatik pipet

Kuvars küvetler

Mikroskop

CO<sub>2</sub> İnkübatörü

Hücre Kültür Plate

Elisa okyucu

Manyetik Karıştırıcı

Sonikasyon Cihazı

Vorteks

## Kullanılan çözelti ve kimyasalların hazırlanışı:

### Superoksid Dismustaz

1. 50 mM pH 7,4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu: 0,34 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılıp 40 ml saf suda çözüldü ve NaOH ile pH sı 7.4'e ayarlandı. Daha sonra 50 ml' ye tamamlandı.
2. 300 µM NBT: 1,22 mg NBT tartıldı 5 ml saf su içerisinde çözüldü.
3. 186 µM PMS: 160 ng PMS tartıldı 5 ml saf su içerisinde çözüldü
4. 780 µM NADP<sup>+</sup>: 2,98 mg NADP<sup>+</sup> tartıldı 5 ml saf su içerisinde çözüldü.

### Katalaz

1. 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7: 0,34 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartıldı 40 ml saf su eklendi. NaOH ile pH 7' ye ayarlanarak hacim saf su ile 50 ml' ye tamamlandı.
2. 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pH 7: 0,34 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılıp behere alındı üzerine 51 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 40 ml saf su eklendi. NaOH ile pH 7' ye ayarlanarak hacim saf su ile 50 ml' ye tamamlandı.

### **Glutasyon Peroksidaz**

1. 0,2 M pH 8 tris tamponu: 1,21 g tris tartılıp 40 ml saf su eklendi. 0,1 M HCl ile pH 8' e ayarlandı ve hacim saf su ile 50 ml' ye tamamlandı.
2. 7 mM t-bütil hidroperoksit: Stok çözeltiden 12,72 µL t-bütil hidroperoksit alındı ve hacim saf su ile 10 ml' ye tamamlandı.
3. 100 mM GSH: 153,66 mg GSH tartıldı hacim saf su ile 5 ml' ye tamamlandı.
4. 1,5 Mm NADPH: 6,25 mg NADPH tartıldı hacim saf su ile 5 ml' ye tamamlandı.

### **Glutasyon Redüktaz**

1. 100 mM tris tamponu: 0,6057 g tris tartılıp 40 ml saf su eklendi. 0,1 M HCL ile pH 8' e ayarlandı ve hacim saf su ile 50 ml' ye tamamlandı.
2. 20 mm GSSG: 61,21 mg GSSG tartıldı hacim saf su ile 5 ml' ye tamamlandı.
3. 2 mm NADPH: 8,33 mg NADPH tartıldı hacim saf su ile 5 ml' ye tamamlanır.

### **Glutasyon Düzeyi**

1. %2.5 perklorik asit: % 2.5 ml perklorik asit alınıp hacim saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.
2. % 1lik O-ftalaldehid: 1 mg O-ftalaldehid tartıldı hacim saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.

### **Malondialdehid**

1. % 0,75 lik TBA: 75 mg TBA tartıldı hacim saf su ile 10 ml' ye tamamlandı.
2. % 30 luk TCA: 3 gr TCA tartıldı hacim saf su ile 10 ml' ye tamamlandı.

### **Protein Karbonil Tayini**

1. 10 Mm DNPH, 2 M HCl: 9,9 mg DNPH tartılıp üzerine 2 M 5 ml HCl eklendi.
2. % 20 luk TCA: 2 gr TCA tartıldı hacim saf su ile 10 ml' ye tamamlandı.
3. 6 M Guanidin Hidroklorür: 0,57 g guanidin hidroklorür tartıldı hacim ve saf su ile 5 ml' ye tamamlandı.

## **Protein Tayini**

1. Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi suyla 1 L'ye tamamlandı.

## **3.2.Yöntem**

### **3.2.1. Hücre Kültürü çalışmaları**

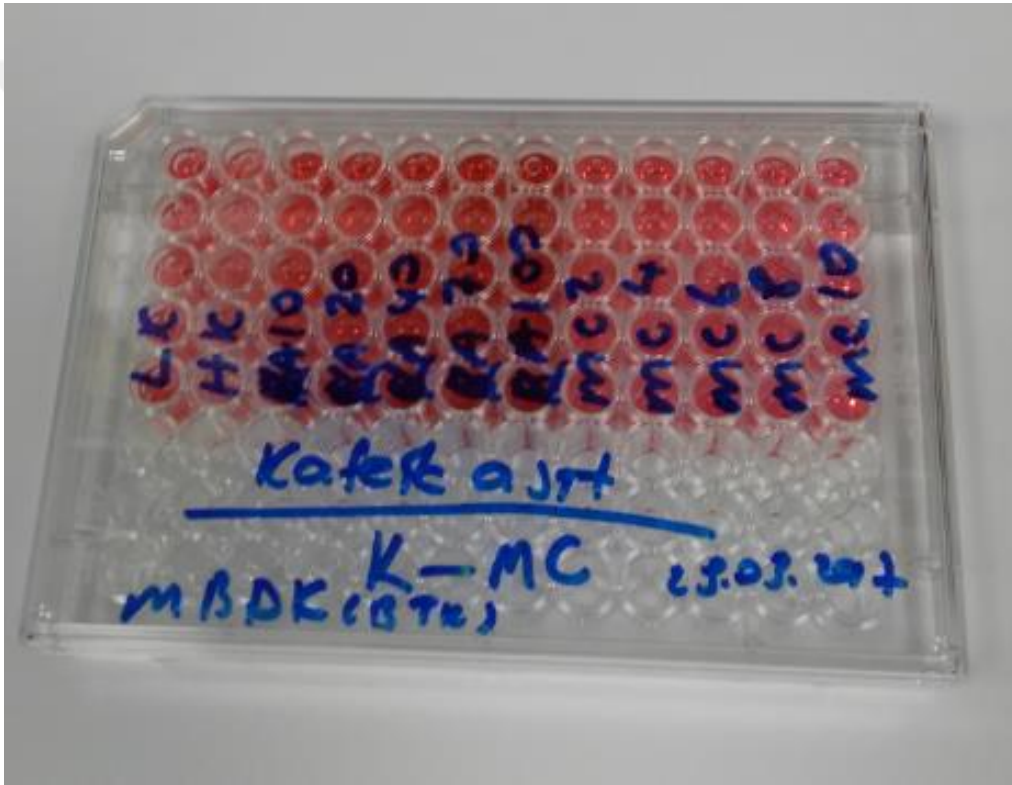
#### **Sitotoksik Aktivite Testleri**

MDBK hücreleri üzerinde metil cıvanın toksik etisini belirlemek için 1-100  $\mu$ M aralığında toksisite testi yapıldı. Bu işlem aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

Test maddelerinin sitotoksik aktivitesi LDH Cell Cytotoxicity Assay (Roche 04 744 926 001, Germany) kullanılarak üretici firmanın prosedürüne göre test edildi. Öncelikle hücre kültür flaskları içinde yer alan MBDK hücrelerinden besi yeri uzaklaştırıldı. Daha sonra flasklara 10 mL Tripsin EDTA çözeltisi eklendi, böylece yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden sökülmesi sağlandı ve 5 dakika CO<sub>2</sub> inkübatörde (37°C) bekletildi ve üzerine DMEM (10 mL) eklendi. Oluşan karışım falcon tüpüne alınıp, santrifüj (600 RPM, 5 dakika) edildi. Süpernatant kısım dökülüp ve hücreler DMEM (2-3 mL) ile çözüldü. Bu karışımdan 20  $\mu$ L alınarak 40  $\mu$ L Trypan blue boyası ile karıştırıldı ve 20  $\mu$ L Thoma Lamına damlatıldı. Üzeri bir lamelle kapatılıp, sayım alanındaki toplam 5 kuyucukta bulunan hücreler (mavi boyanmayan canlı hücreler) mikroskop altında sayıldı. Hücreler sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu mikroplate alınarak her bir kuyucuğa 5000 hücre eklendi. High kontrol kuyucuğuna normal hücreler, low kontrol kuyucuğuna 100  $\mu$ L DMEM ve örnek kuyucuklarına ise farklı konsantrasyonda (bu aralık metil cıva için 1-100  $\mu$ M, kafeik asit ve gallik asit için 10-100  $\mu$ g/ml örneklerden eklendi ve CO<sub>2</sub> inkübatörde (37°C) inkübe edildi. Maddeler ortama eklendikten 24 saat sonrası için LDH Cell Cytotoxicity Assay üretici firmanın protokolüne göre sitotoksik aktivite tespit edilecek. Tüm testler üç tekrarlı olarak yapıldı. Kısaca, inkübasyon sonrasında tüm

kuyucuklardan başka bir 96 kuyucuklu mikroplate süpernatant kısmından 100 µl alındı ve üzerlerine reaksiyon karışımından 100 µl eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında ve ışık almayan bir ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda plakalar uygun bir mikrolaka okuyucu (ChroMate, Microplate Reader P4300 Series, USA) kullanılarak 492 nm dalga boyunda okutuldu ve absorbans değerleri elde edildi. Aşağıdaki formül kullanılarak % sitotoksiteler hesaplandı.

Sitotoksitite (%) = (Deneysel değer - Düşük Kontrol) / (Yüksek Kontrol- Düşük Kontrol) x 100



### Deneysel tasarım

Metil civanın hücre kültürleri üzerinde toksik etkisi verilerinden IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> değerleri ve kafeik asit ile gallik asitin toksik olmayan konsantrasyonları bu maddelerin metil civa toksisitesini nasıl etkilediğinin araştırılmasında kullanıldı. **Tablo 1.** de belirtildiği konsantrasyonlarda, hücreler maddelerle 24 saat muamele edildi. Yöntem sitotoksik çalışmalarda belirtildiği şekilde uygulandı. Kafeik asit ve gallik asitin metil

civanın hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi toksisite testi ile belirlendi. Antioksidan metabolizma üzerindeki beklenen koruyucu etkisinin belirlenmesi enzim aktivite ölçümleri ve oksidatif stres belirteçlerinin miktarlarının belirlenmesi ile tespit edilmeye çalışıldı. Çalışmalar 3 tekrarlı yapılmıştır.

**Tablo 1.** Metilciva ve Kafeik asit hücre kültürüne uygulanması

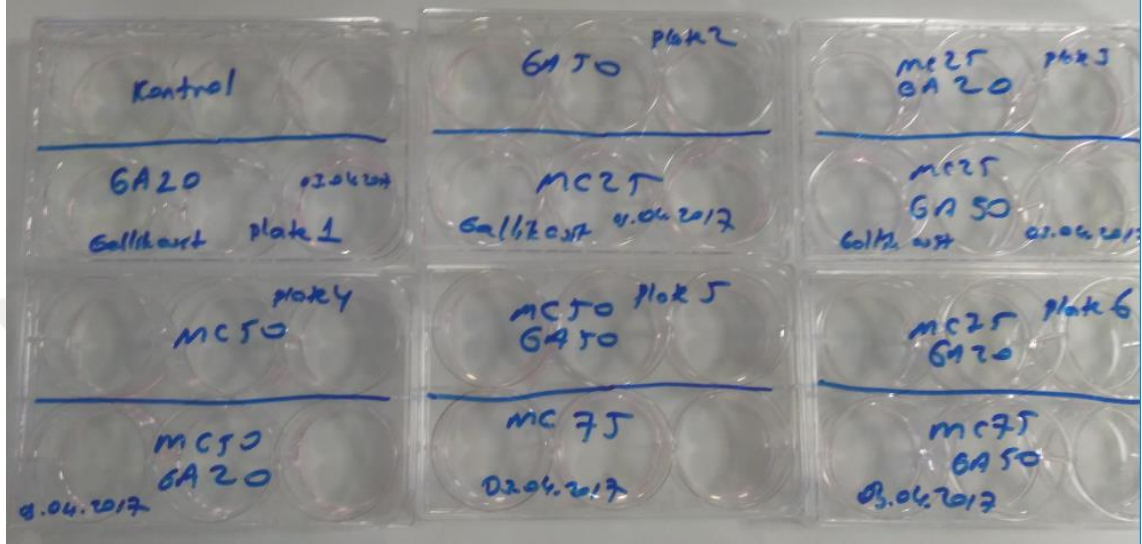
Low	
High Kontrol	
Kaffeik asit (toksik etki göstermediği en yüksek konsantrasyon)	
Kaffeik asit (toksik etki göstermediği en yüksek konsantrasyonun yarısı)	
IC <sub>25</sub> metil civa konsantrasyonu	
IC <sub>25</sub> metil civa konsantrasyonu	Kaffeik asit (toksik etki göstermediği en yüksek konsantrasyon)
IC <sub>25</sub> metil civa konsantrasyonu	Kaffeik asit (Hücre canlılığını %50 artıran konsantrasyon)
IC <sub>50</sub> metil civa konsantrasyonu	
IC <sub>50</sub> metil civa konsantrasyonu	Kaffeik asit (toksik etki göstermediği en yüksek konsantrasyon)
IC <sub>50</sub> metil civa konsantrasyonu	(Hücre canlılığını %50 artıran konsantrasyon)
IC <sub>75</sub> metil civa konsantrasyonu	
IC <sub>75</sub> metil civa konsantrasyonu	Kaffeik asit (toksik etki göstermediği en yüksek konsantrasyon)
IC <sub>75</sub> metil civa konsantrasyonu	Kaffeik asit (Hücre canlılığını %50 artıran konsantrasyon)

### 3.2.2. Antioksidan enzim aktiviteleri

Enzim aktivitesi ölçümleri için 6 lık petlere  $1 \times 10^6$  hücre koyularak 5 saat yukarıda belirtildiği gibi farklı konsantrasyonlarda maddelerle muamele edildi. Enzim aktivitesi



ölçümü için hücreler fosfat tamponu ile 3 kez yıkandı ve tripsin/EDTA çözeltisi ile alınıp 2500 rpm de çöktürüldü ve üst kısım atıldı. Fosfat tamponu ile tekrar yıkandıktan sonra %25 sukroz, 100 mM fosfat (pH:7.0) ve 2 mM EDTA içeren soğuk tampon ile hücreler buz üzerinde sonikasyonla parçalandı. 10 000 rpm de 15 dakika santrüfüjlemeden sonra süpernatant enzim aktivitesi için kullandı.



**Süperoksit dismutaz (SOD):** SOD enzim aktivitesi Kakkar tarafından belirlenen yöntemle yapıldı (Kakkar et al., 1984). Süperoksit radikalleri NADP<sup>+</sup> varlığında ortamda bulunan nitroblue tetrazolium (NBT) ile reaksiyona girerek formazan mavisini oluşturur. SOD ise süperoksit radikallerini ortamdaki uzaklaştırdığı için nitroblue tetrazolium (NBT) indirgememesini engellemesi aktivite ölçümünün temelini oluşturur.

Superoxide dismutase (SOD) enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği		
Stok çözeltiler	Numune küveti	Kontrol küveti
	Hacim (µl)	Hacim (µl)
0.025 mM sodyum pirofosfat (pH=8.3)	400	400
186 µM PMS	40	40
300 µM NBT	100	100
Enzim	70	70
Su	220	290
780 µM NADP <sup>+</sup>	70	-
30 °C de 90 saniye beklenir		
Glasiyel asetik asit	350	350
Reaksiyon karışımı 1.5 ml n-bütanol ile iyice çalkalanır, 10 dakika bekletildikten sonra 5000 rpm de santrüfjü edildi. Bütanol tabakasındaki renk yoğunluğu 560 nm de ölçüldü.		

Enzim ünitesi, normal şartlar altında bir dakikada NBT azalmasını %50 inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlandı.

Yüzde inhibisyonu = ((Kontrol küvetin absorbanansı – Numune küvetin absorbanansı)/ Kontrol küvetin absorbanansı)) X 100

Enzim ünitesi (EU/ml)=(yüzde inhibisyon x seyreltme katsayısı)/%50xV(enzim miktarı ml)

**Katalaz (CAT):** Katalaz enzim aktivitesi 240 nm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maksimum absorbanans vermesi esasına dayanır (Sinha, 1972). Küvet içerikleri aşağıda verilmiştir. Ortamdaki Hidrojen peroksit miktarı azaldıkça absorbanansda düşme olur.

Katalaz enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği		
Stok çözeltiler	Kontrol küveti	Numune küveti
	Hacim ( $\mu$ l)	Hacim ( $\mu$ l)
0,05 M Fosfat, (pH= 7,0) 10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1000	970
Enzim örneği	-	30

**Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Ölçümü:** Redükte glutasyon (GSH)'un okside glutatyona (GSSG)'a oksidasyonu GSH-Px ile t-bütil hidroperoksit varlığında gerçekleşir. Yöntem, bu oksidasyon sonucu oluşan GSSG'nin GSH-Rd enzimi ile tekrar GSH'ye indirgenmesi tepkimesinde NADP<sup>+</sup> 'ye oksitlenen NADPH'nin 340 nm dalga boyundaki absorbans değeri farkının zamana karşı okunması prensibine dayanır (Ursini et al., 1985)

GPx enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği		
Stok çözeltiler	Kontrol küveti	Numune küveti
	Hacim ( $\mu$ l)	Hacim ( $\mu$ l)
0,2 M Tris, (pH= 8)	100	100
7 mM t-bütil hidroperoksit	20	20
Saf su	550	650
100 mM GSH	50	20
1.5 mM NADPH	-	100
GSH-Rd (10 UN/ml)	100	100
Enzim örneği	10	10

**Glutasyon redüktaz enziminin aktivite ölçümü:** Glutasyon redüktaz enziminin aktivite ölçümünde Carlberg and Mannervik'in tanımladığı spektrofotometrik metod kullanılacaktır (Carlberg and Mannervik, 1975). Bu metod GSSG varlığında NADPH'ın yükseltgenmesinden dolayı azalan NADPH'ın 340 nm'de absorbans vermesi esasına dayanır.

GR enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği		
Stok çözeltiler	Kontrol küveti	Numune küveti
	Hacim (µl)	Hacim (µl)
100 mM Tris-HCl (pH=8), 5 mM EDTA	200	200
20 mM GSSG	100	100
2mM NADPH	100	100
Su	600	570
Enzim numunesi	-	30

Katalaz enzimi için enzim ünitesi hesaplamalarında  $E\ddot{U} = (\Delta OD / 43,6) \times (V_T / V_E) \times S_F$  formül kullanılacaktır

GPx, GR enzimlerinin enzim üniteleri hesaplamalarında  $E\ddot{U} = (\Delta OD / 6,22) \times (V_T / V_E) \times S_F$  formül kullanılacaktır

Formüllerde yer alan simgeler aşağıda açıklanmıştır.

$E\ddot{U}/ml$  : 1 ml'deki enzim ünitesi

$\Delta OD$  : Bir dakikadaki absorbans değişimi

43,6: Ekstinksiyon katsayısı ( $H_2O_2$ )

9,6 : Ekstinksiyon katsayısı (DNB-SG)

6,22 : Ekstinksiyon katsayısı (NADPH)

$V_T$  : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

$V_E$  : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

$S_F$  : Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

### 3.2.3. Metabolit miktarlarının belirlenmesi

**Glutasyon Düzeyi Ölçümü:** Enzim aktivitesi için hazırlanan lizatan 0.3 ml alınıp %2.5 perklorik asit ile proteinler çöktürülecek. Örnekler 10 dakika +4 C'de santrüfuj edilecek. Süpernatanttan 0.1 ml alınıp içinde 1.8 ml fosfat-EDTA tamponunun ve %1'lik 0.1 ml O-ftalaldehid bulunan cam tüplere ilave edilecek. Örnekler 15 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletilecek. Numuneler florometrede (spektrofotometri ( $\lambda_{ex}= 350$  nm,  $\lambda_{em}= 450$  nm) ölçülecek. GSH miktarını hazırlanacak standart grafik eğrisi üzerinden hesaplanacak (Hissin and Hilf, 1976).

**Malondialdehid (MDA) Düzeyi Ölçümü:** 0.1 ml hücre 0.750 ml % 75 TBA, 0.5 ml %30 TCA ve 0.05 ml 5 M HCl karıştırılarak kaynayan su banyosunda 15 dakika bekletilir ve renk değişimi gözlenir. 5 000 rpm de 5 dakika santrüfuj yapılır. Soğutmayı takiben en geç 45 dak içerisinde spektrofotometrede, 532 nm dalga boyunda distile suya karşı absorbans değeri okunarak, elde edilen değerler seyreltme katsayısı ile çarpılacak ve MDA miktarı ekstinksiyon katsayısı ( $156.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) kullanılarak nanomol/ml olarak belirlenecek (Ohkawa et al., 1979).

**Protein Karbonil Tayini:** Protein karbonilasyonu Levin'in 2,4-dinitrofenil hidrazin (DNPH) metodu ile tayin edilecektir (Floor and Wetzel, 1998). 0.1 ml hücre, 0.5 ml DNPH (10 mM, 2M HCl) içine alınır ve bir saat oda sıcaklığında bekletilir. 15 dakikada bir vortekslenir. İnkübasyon sonrası proteinler 0,5 ml TCA (%20) çözeltisi ile çöktürülür. 15 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra, 11 000 xg de 4 dakika santrüfuj edilir. Çökelti 3 kez etanol/etilasetat (v/v) çözeltisi ile yıkanır. 1 mL 6 M guanidin hidroklorürde çözülüp ve 37 °C de 10 dakika bekletilir. 2 M HCl blank olarak kullanılarak 360 nm de spetrofotometrik olarak ölçüm yapılır.  $22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  lik molar ekstinksiyon katsayısı protein karbonil miktarını tespit etmek için kullanılır.

**Protein miktarının belirlenmesi:** Hücrelerdeki protein miktarı Bradford yöntemine göre belirlenecektir(Bradford, 1976). Bovin serum albümininden standart grafik hazırlanacak ve örneklerdeki protein miktarı grafik üzerindeki eğriden hesaplanacaktır.

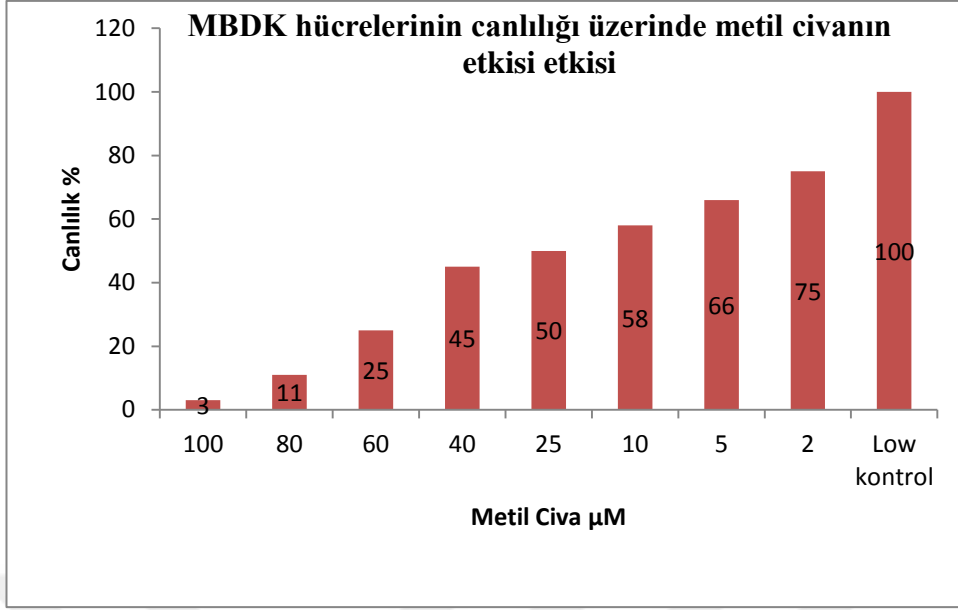
**İstatistiki Analiz:** Grafikler Microsoft Excell 2010 programı kullanılarak çizildi. Yapılacak çalışmaların sonucunda elde edilen veriler SPSS 13.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen verilerin normallik testleri yapıldı ve gruplar arasındaki istatistiksel farkları saptamak için varyans analizi (Anova testi) yapıldı. İstatistiksel anlamlılık için  $P < 0,05$  değeri seçildi.



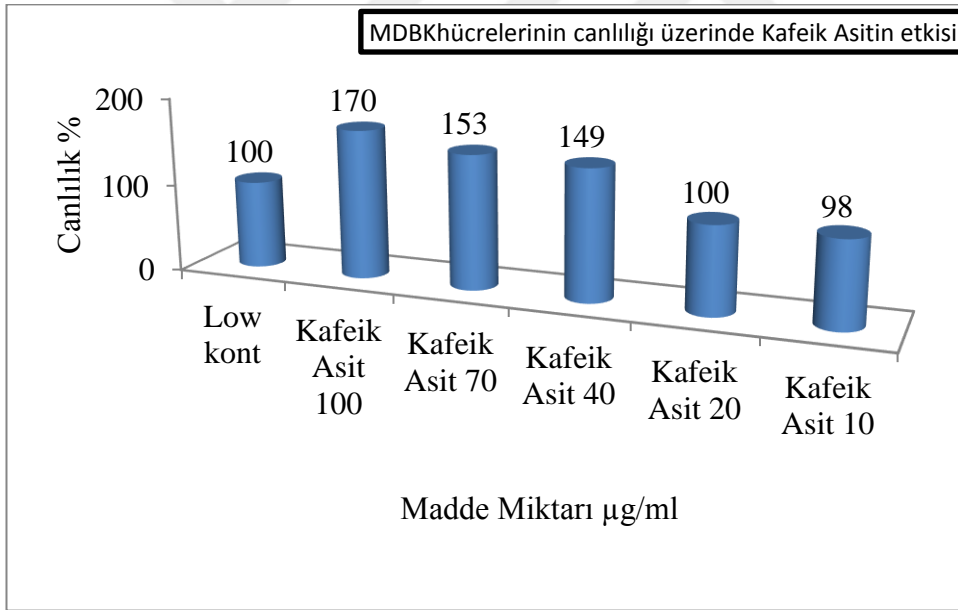
#### 4. BULGULAR

Metil civanın toksik etkisini belirlemek için 1-100  $\mu\text{M}$  aralığında toksisite testi yapıldı. LDH hücre sitotoksosite ölçümü ile yapılan teste metil civanın hücre canlılığını etkileyen  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$  ve  $\text{IC}_{25}$  konsantrasyonları, sırasıyla 2, 25 ve 60  $\mu\text{M}$  olarak bulundu (Şekil 4.1.). Aynı şekilde kafeik asit ve gallik asite 10-100  $\mu\text{g/ml}$  aralığında toksisite testi yapıldı (Şekil 4.2-Şekil 4.13) ve bu maddelerin hücre canlılığı üzerindeki etkisi belirlendi. Kafeik asit için 20  $\mu\text{g/ml}$  hücre canlılığını hiç etkilemeyen en yüksek konsantrasyon olarak bulundu ve 40  $\mu\text{g/ml}$  hücre canlılığını %50 artıran değer olarak tespit edildi. Gallik asit için ise bu değerler sırasıya 20 ve 50  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlendi. Bu tez çalışmasında toksik etki göstermeyen konsantrasyon ve onun yarı konsantrasyonu ile çalışılması planlanmıştır. Fakat yapılan toksisite testi sonucunda gallik asit ve kafeik asitin hücre çoğalması üzerinde pozitif etki göstermeleri nedeniyle metil civanın toksik etkisini azaltmada daha etkili olmasını beklediğimizi için hücre canlılığını %50 artıran gallik asit ve kafeik asit konsantrasyonla çalışmaların yapılmasının karar verildi.

Şekil 4.1 de MBDK hücreleri üzerine farklı derişimlerde metil civa eklenerek hücre canlılığı üzerine etksi incelendi. Low kontrol olarak belirtilen içerisinde yalnızca hücre ve besiyerinin bulunduğu ortamdır. Metil civa derişimi artırıldıkça doğru orantılı olarak hücre canlılığı azalmıştır. 100  $\mu\text{M}$  metil civa derişimi hücre canlılığının neredeyse tamamen yok olması ile sonuçlanmıştır.



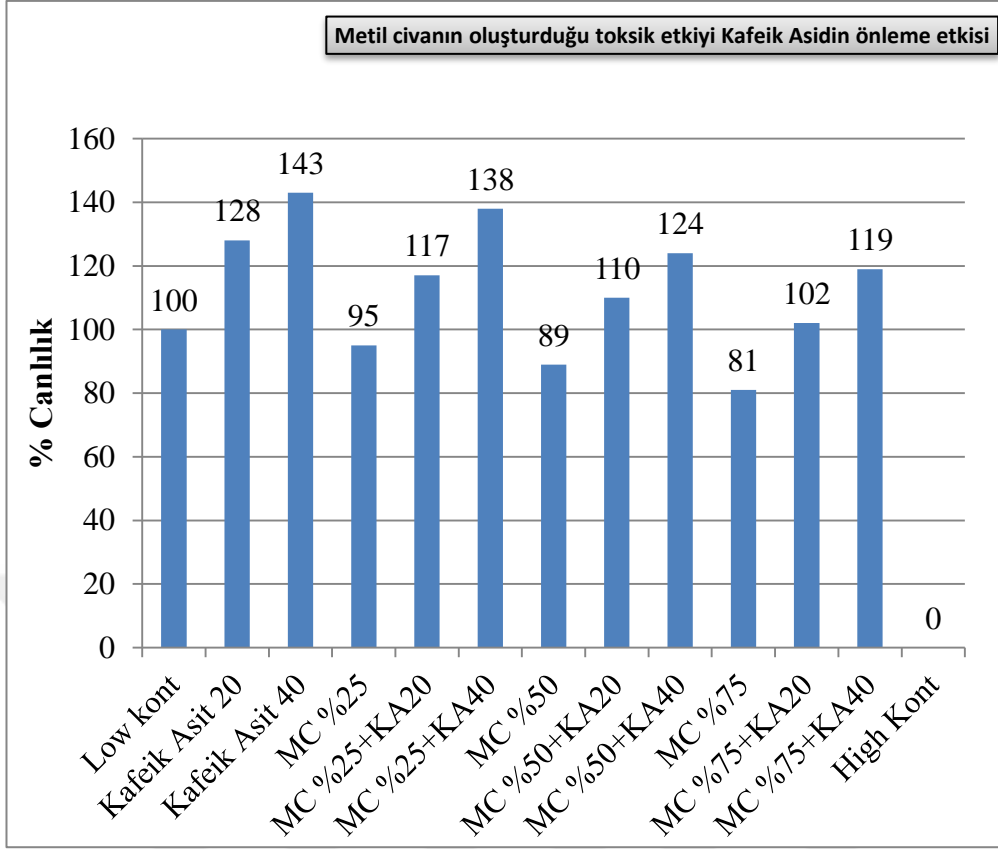
**Şekil 4.1.** Metil civanını MDBK hücreleri üzerindeki toksik etkisi



**Şekil 4.2.** MDBK hücrelerinin canlılığı üzerinde kafeik asidin etkisi

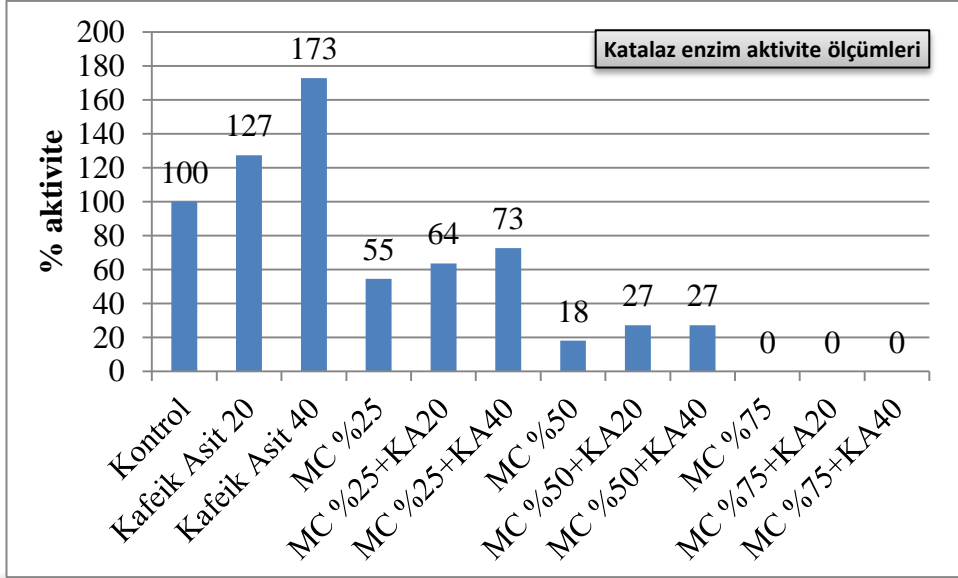
Şekil 4.3. de kafeik asidin metil civanın oluşturduğu toksik etkiyi düşürdüğü görülmektedir. %25 ve %50 oranındaki toksiste %95'in üstünde bir oranla etkisiz hale getirilirken, yüksek toksisite değeri önemli oranda düşürüldüğü görülmektedir.



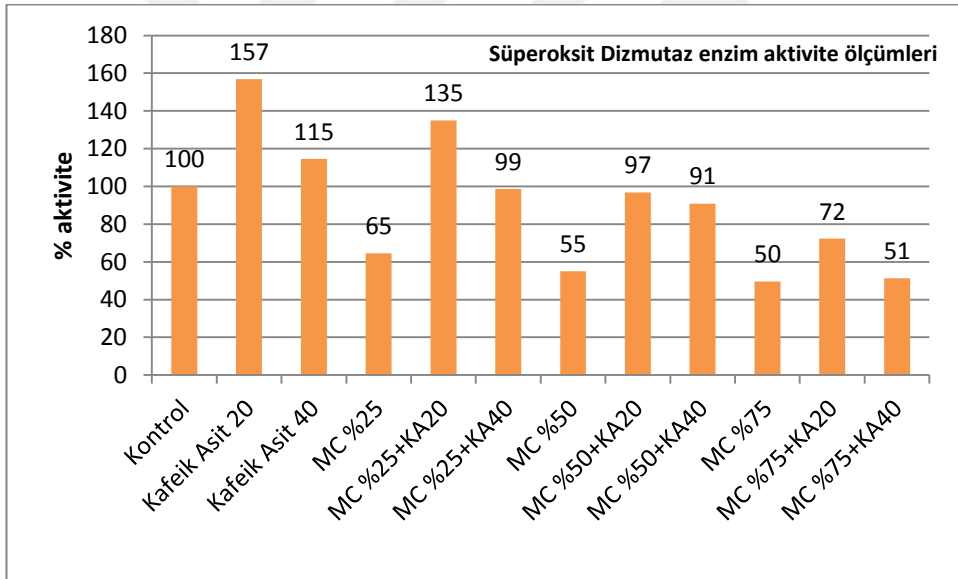


**Şekil 4.3.** MDBK hücrelerinin canlılığı üzerinde metil civanın oluşturduğu toksik etkiyi kafeik asidin önleme etkisi

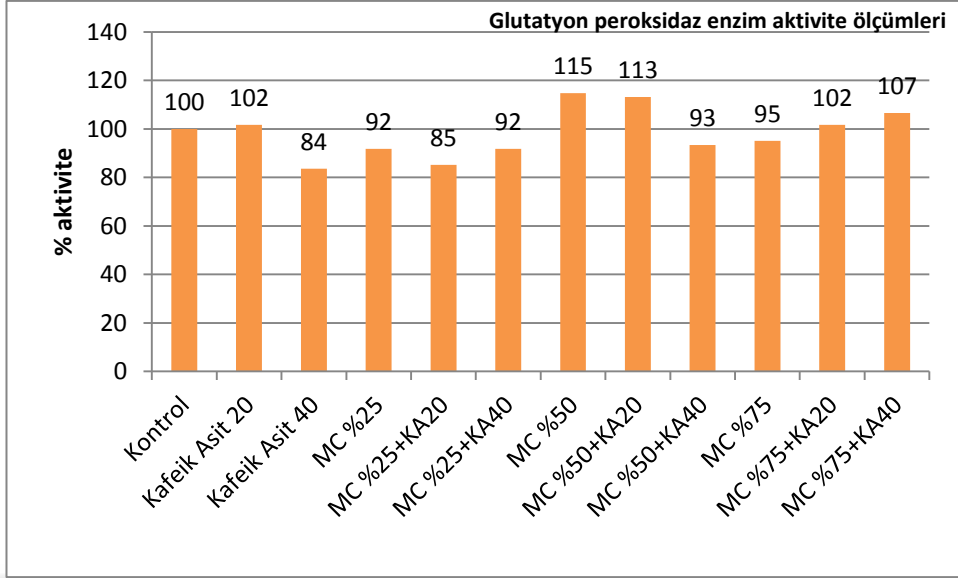
Metil civanın toksik etki oluşturma mekanizması oksidatif stress parametreleri olan enzim aktivitelerinin analizi ile yapılmıştır. Şekil 4.4-4.7 incelendiğinde metil civanın katalaz, süperoksit dimütaz, glutayon peroksidaz, glutatyon redüktaz enzim aktivitelerini inhibe ettiği görülmüştür. İlk üç enzimi önemli oranda inhibe ettiği gözlemlenirken, diğer iki enzimi onlara göre daha az inhibe ettiği tespit edilmiştir.



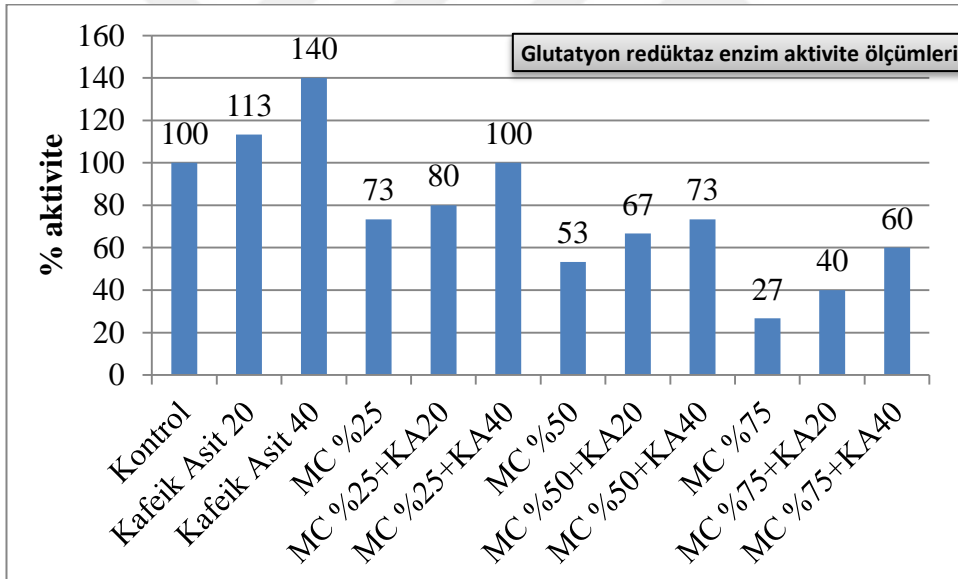
Şekil 4.4. Katalaz enzim aktivitesi ölçümleri



Şekil 4.5. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ölçümleri



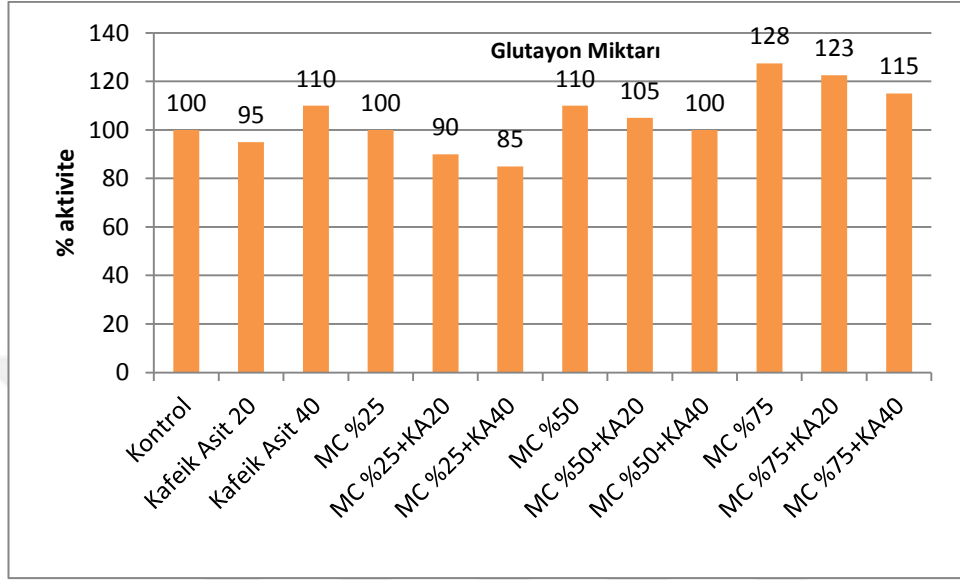
Şekil 4.6. Glutasyon peroksidaz enzim aktivite ölçümleri



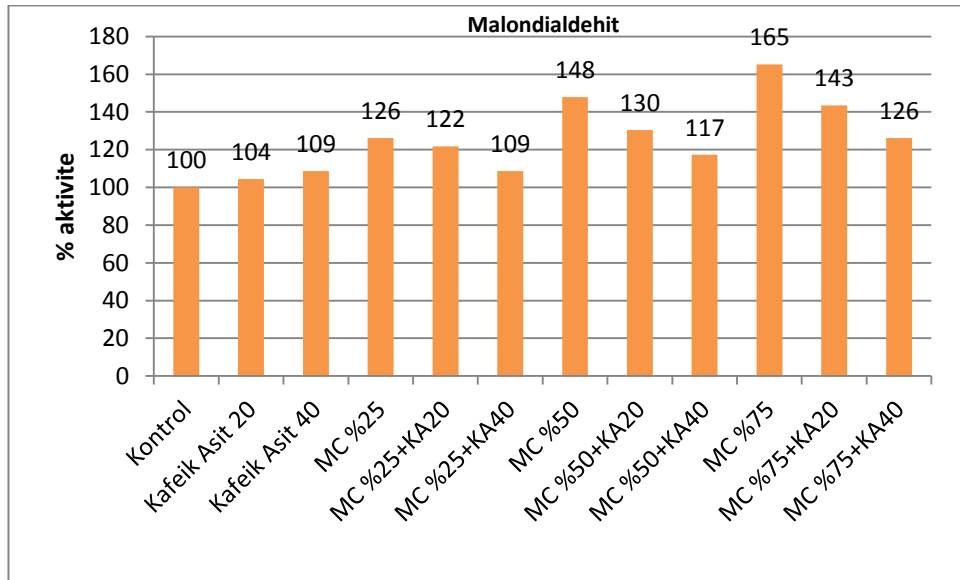
Şekil 4.7. Glutasyon redüktaz enzim aktivite ölçümleri

Metil civanın oksidatif stress parametrelerinden metabolit miktarlarının nasıl etkilediği Şekil 4.8-4.11 lerede verilmiştir. Glutasyon ve protein miktarlarında önemli oranda bir düşüş görülmektedir. Malonildialdehit, protein karbonil miktarlarında toksisite değerlerine bağlı olarak kontrole göre iki üç kat artışlar gözlemlenmektedir. Kafeik asit

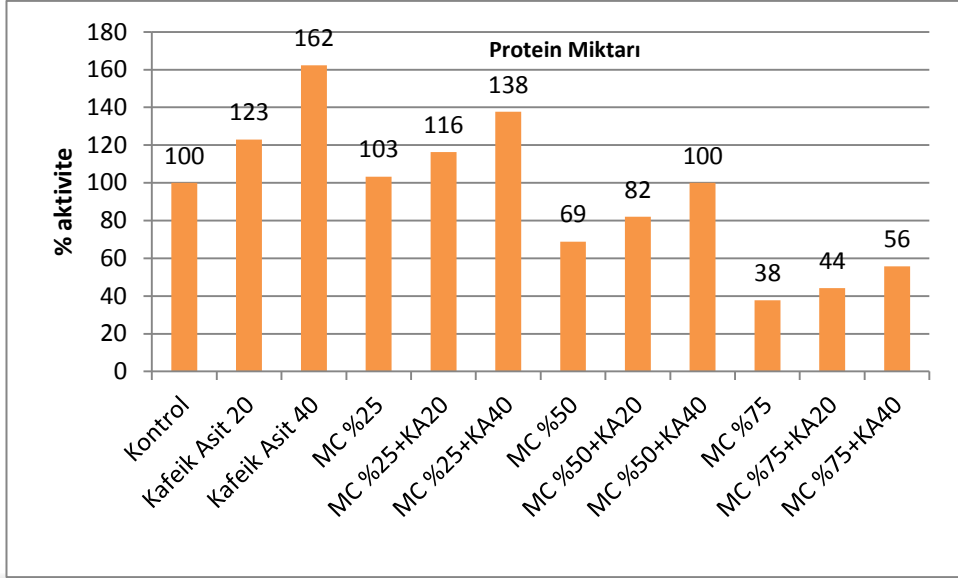
antioksidan parametrelerini yüksek konsantrasyonda %5-10 oranında etkilediği, fakat oluşan toksik durumu düşürmekte etkili olduğu görülmektedir.



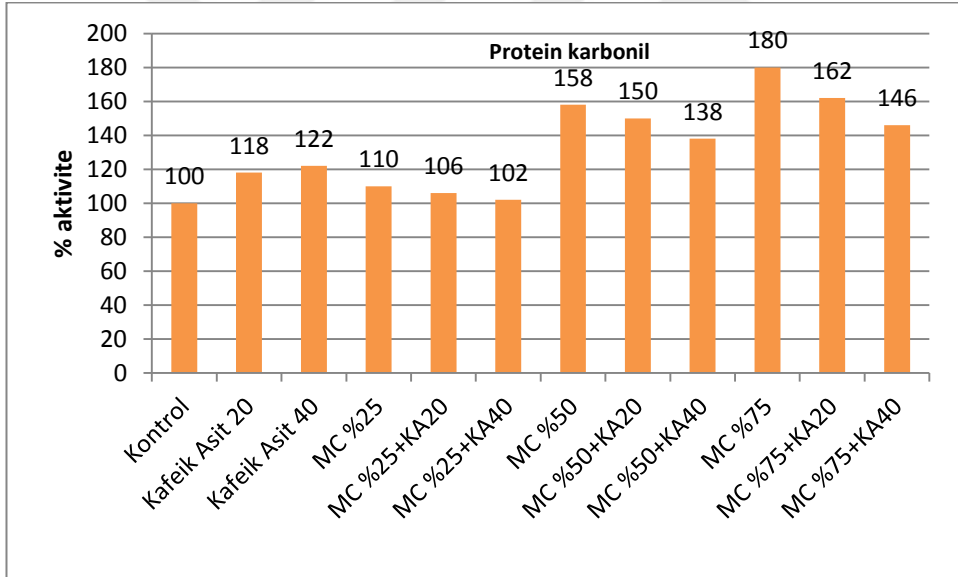
Şekil 4.8. Glutasyon seviyesi sonuçları



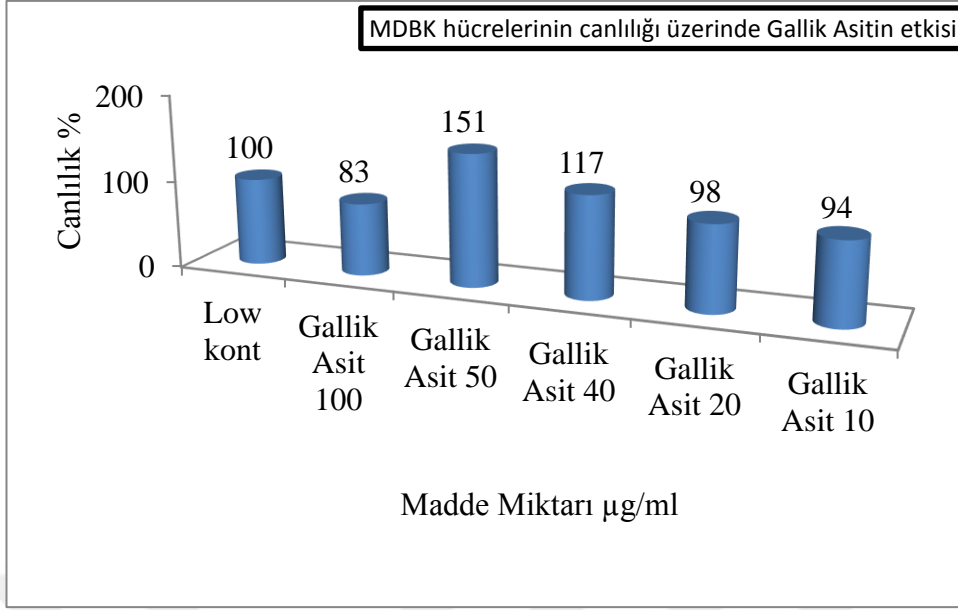
Şekil 4.9. Malondialdehit seviyesi sonuçları



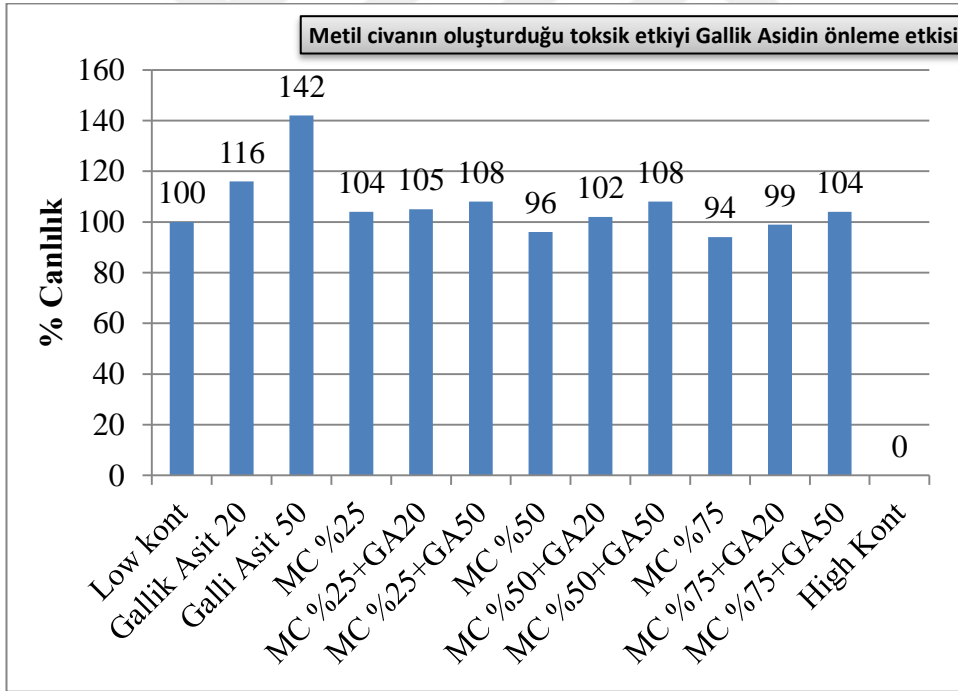
Şekil 4.10. Protein miktarı seviyesi sonuçları



Şekil 4.11. Protein karbonil seviyesi sonuçları

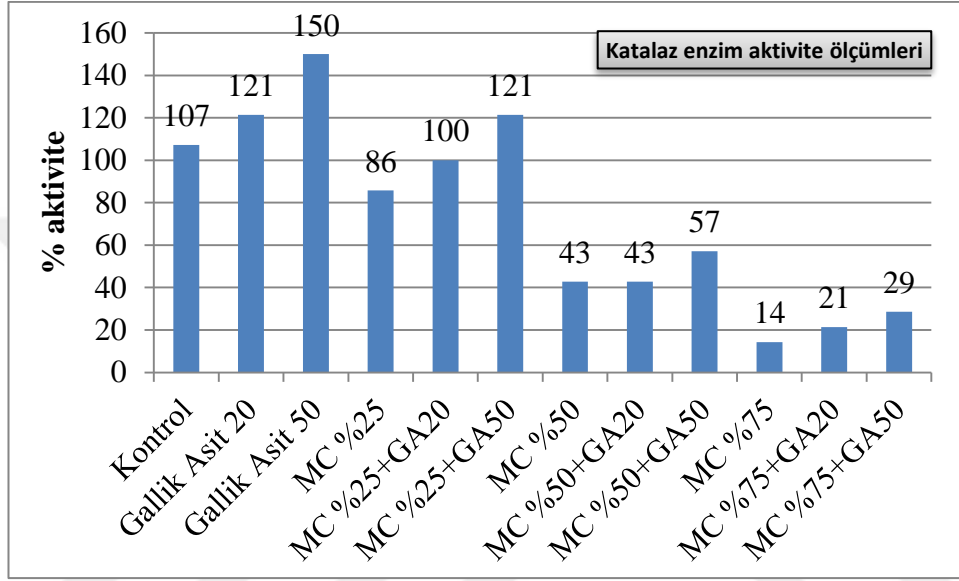


**Şekil 4.12.** MDBK hücrelerinin canlılığı üzerinde gallik asidin etkisi

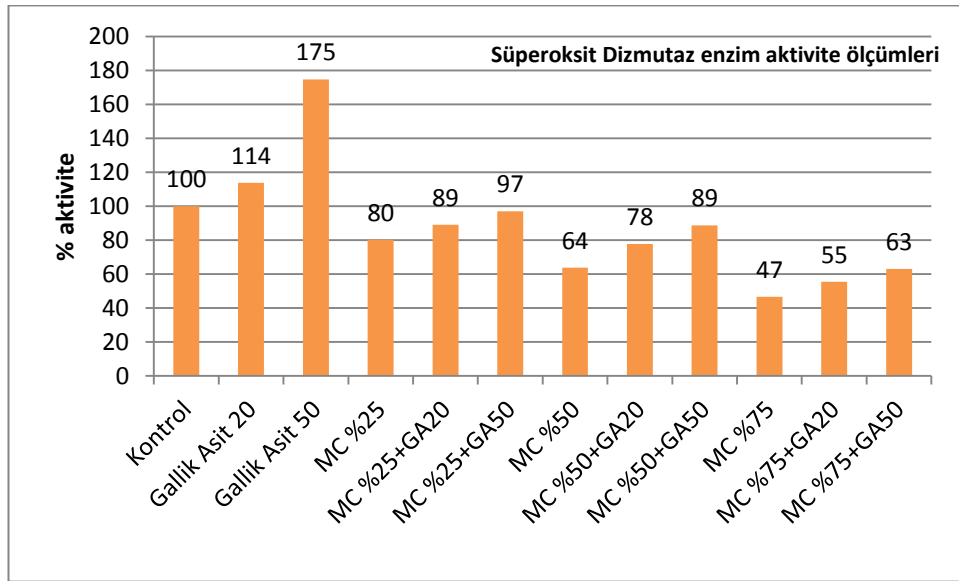


**Şekil 4.13.** MDBK hücrelerinin canlılığı üzerinde metil civanın oluşturduğu toksik etkiyi gallik asidin önleme etkisi

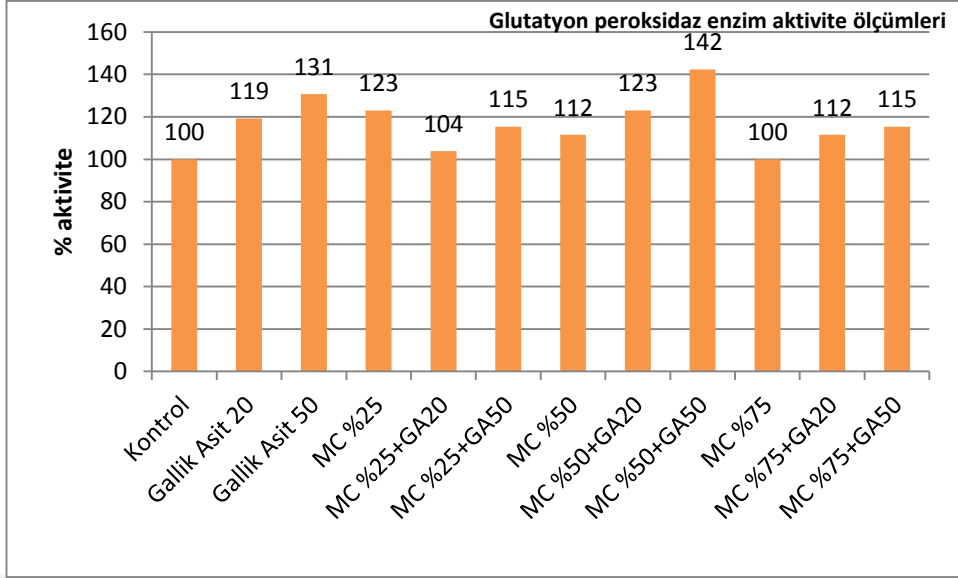
Şekil 4.14-4.17 aralığında farklı derişimlerdeki metil civanın MBDK hücreleri üzerinde gösterdiği toksik etki ve gallik asitin bu etkiyi nasıl etkilediği antioksidan enzim aktiviteleri vasıtasıyla belirlendi. Bu etkiden en fazla etkilenen enzim katalaz enzimi olurken glutatyon peroksidaz enzimi neredeyse hiç etkilenmedi. Gallik asit metil civanın toksik etkisine karşı enzim aktivitelerini neredeyse 2-3 kat kadar artırdı ve koruma etkisini gösterdi.



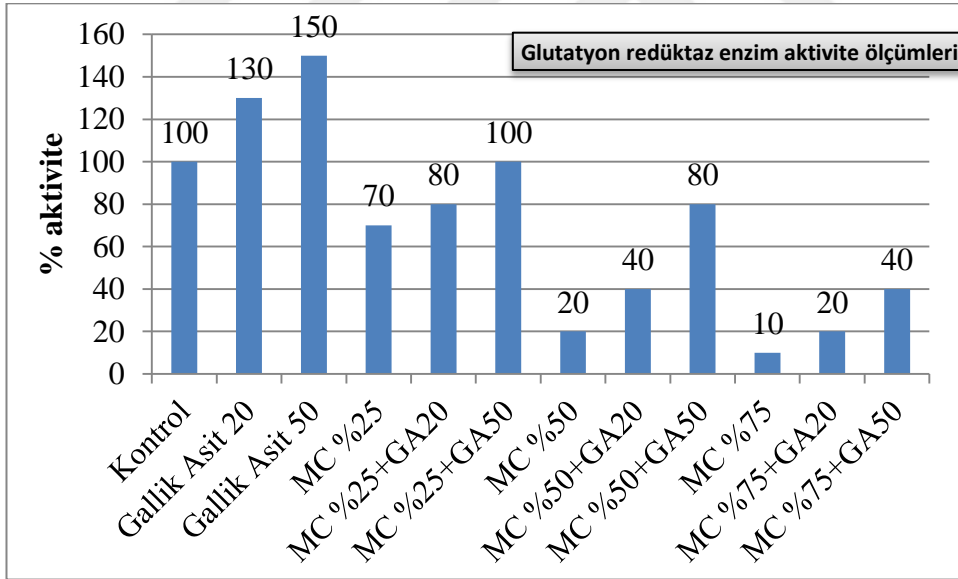
Şekil 4.14. Katalaz enzim aktivitesi ölçümleri



Şekil 4.15. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ölçümleri

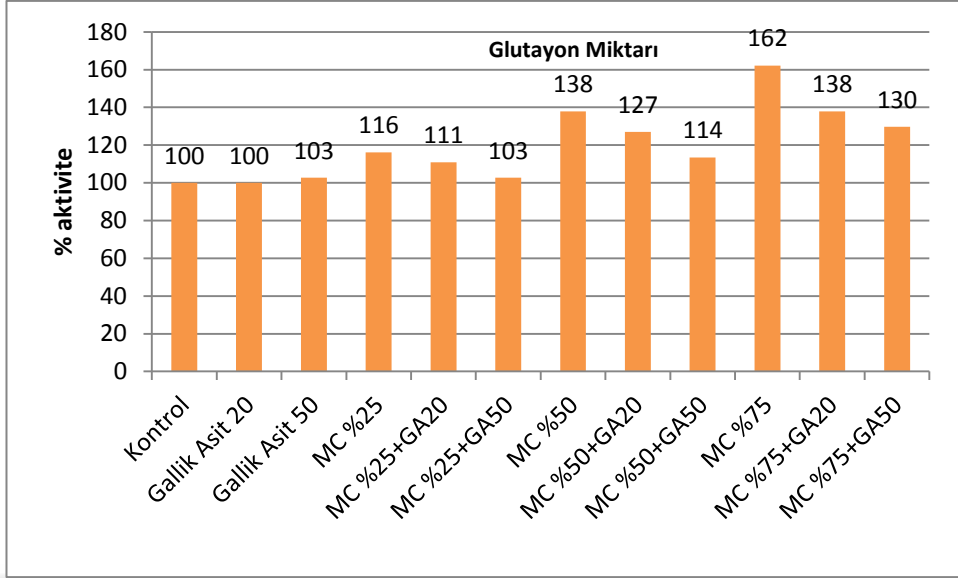


Şekil 4.16. Glutasyon peroksidaz enzim aktivite ölçümleri

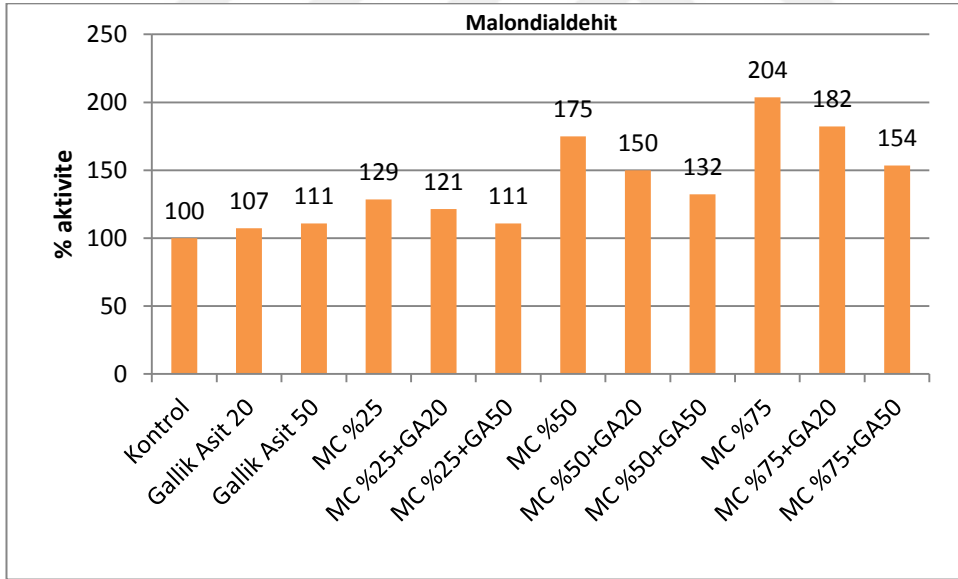


Şekil 4.17. Glutasyon redüktaz enzim aktivite ölçümleri

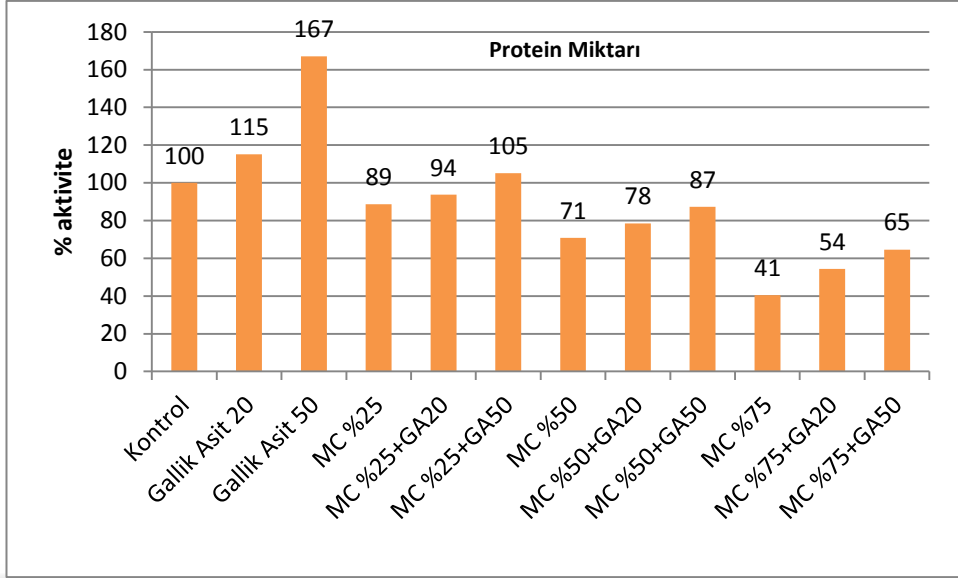




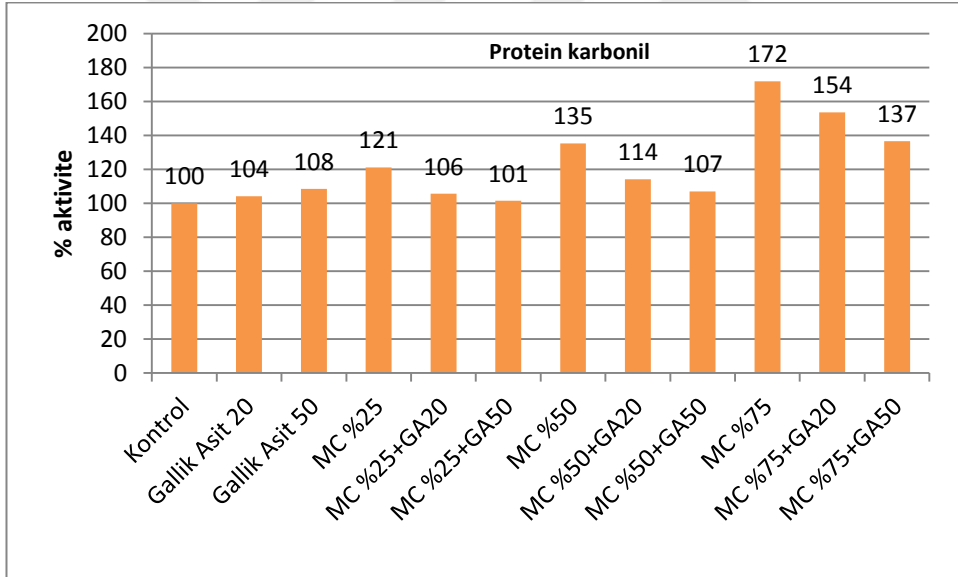
Şekil 4.18. Glutayon seviyesi sonuçları



Şekil 4.19. Malondialdehit seviyesi sonuçları



Şekil 4.20. Protein miktarı seviyesi sonuçları



Şekil 4.21. Protein karbonil seviyesi sonuçları

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sanayideki gelişmelerle artan metal kullanımını ve bunların doğaya salınımı ciddi çevre kirliliğine ve sağlık problemlerine yol açmaktadır. Metal toksisitesi önemli bir halk sağlığı sorunu olarak güncelliğini korumaktadır. Birçok hastalığa sebep olmakla beraber, toksik olmayan düzeylerinin bile bazı yaygın hastalıkların tetikleyicisi olabileceği literatürde ifade edilmiştir. Bu nedenle birçok araştırmacı metallerin toksik etkilerini ve mekanizmalarını araştırırken bir kısmında bu toksisitenin nasıl azaltılacağını araştırmaktadır.

Civa toksisite değeri yüksek bir metaldir. Cıvayı diğer metal türlerinden ayıran önemli bir konuda farklı organik formlara dönüştürülmesidir. Doğaya karışan civa sudaki bakteriler tarafından metil cıvaya dönüşmekte, bu canlılarla beslenen balıklara geçmekte beslenme zinciri yolu ile daha büyük balıklara transfer edilmektedir. Bu yolla sudaki konsantrasyonunun milyon katına varan bir derişimde bizim soframıza besin yoluyla gelmektedir. Bu nedenle önemli ve genel bir toksik ajan olarak değerlendirilmektedir.

Metil civa normal cıvaya göre çok daha toksiktir. Normal civanın sindirim sistemindeki emilimi yok denecek kadar azken metil civa % 100 yakını emilmekte ve kan beyin bariyerini geçerek beyne, sinir sistemine zarar vermektedir. Yarılanma ömrü çok uzun olup dokularda birikme özelliğine sahiptir.

Yapmış olduğumuz çalışmada kültüre edilmiş MDBK hücreleri üzerinde metil civanın toksik düzeyini belirlenmesine, toksik etkisinin oksidatif stres mekanizması üzerindeki etkisine ve bu toksik etkinin kafeik asit ve gallik asit ile azaltılıp azaltılmadığının belirlenmesine çalıştık. Bu hücrelerin seçilmesinin nedeni böbreğin metil civa toksisitesinde hedef dokulardan biri olması ve bu hücre türünde böbrek üzerinde olabilecek etkileri anlamada iyi bir model olmasınıdır.

Metil civanın toksisite çalışması 1-100  $\mu\text{M}$  aralığında yapılmıştır.  $\text{IC}_{25}$ ,  $\text{IC}_{50}$  ve  $\text{IC}_{75}$  değerleri sırasıyla 2, 25 ve 60  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. 100  $\mu\text{M}$ 'ın üzerinde %100 toksik

etkisi gözlenmiştir. Metil civanın toksik etki mekamasında oksidatif stresin önemli olduğu ifade edilmiştir (do Nascimento et al., 2008; Nabi et al., 2011). Yaptığımız çalışmada oksidatif stresin önemli parametrelerinden olan katalaz, süperoksit dismutaz, glutayon peroksidaz, glutayon redüktaz gibi enzim aktivitelerini önemli oranda inhibe ettiği belirlenmiştir. Oksidatif stresin önemli belirteçlerinden olan malonildialdehit, protein karbonil gibi metabolitlerin hücre içinde oluşumunu önemli oranda artırdığı tesbit edilmiştir. Enzim aktivitelerini etkilemede büyükten küçüğe doğru sırayla katalaz, glutayon redüktaz süperoksit dismutaz ve glutayon peroksidaz olarak belirlenmiştir. Metabolitlerden etkilenenler sırayla malonildialdehit ve protein karbonil olarak belirlenmiştir. Metil civanın sülfür grupları ile etkileşerek glutayon oluşumunu ve glutayonun sentezini sağlayan sitemleri inhibe ettiği bilinmektedir. Yapılan çalışmada glutayon miktarında önemli bir azalma tesbit edilmiştir.

Kafeik asidin metil civanın toksik etkisini azaltıp azaltmadığını test etmeden önce bu fenolik asidin toksik etkisi 1-100 µg/ml aralığında test edildi. Hücre canlılığını etkilemeyen 20 µg/ml ile hücre canlılığını %50 etkileyen 40 µg/ml ile metil civanın toksik etkisini azaltıp azaltmadığı test edildi. Kafeik asidin metil civa toksistesini azaltmada etkin olduğu yapılan çalışmalarda belirlendi. Özellikle %50 ve %25 oranındaki toksisite değerlerini normale dödürmede etkili olduğu gözlemlenmiştir. Kafeik asidin yapılan çalışmada oksidatif stres parametrelerini çok etkilemediği fakat toksisite durumunda bu etkiyi azalttığı gözlemlenmiştir. Bu durum literatürle uyumluluk göstermektedir (Kumaran and Prince, 2010; Lotfi-Ghahramanloo and Baghshani, 2016; Pari and Prasath, 2008).

Gallik asit içinde metil civanın toksik etkisini azaltıp azaltmadığını belirlemeden önce 1-100 µg/ml aralığındaki toksik etkisi incelendi. Hücre canlılığını etkilemeyen 20 µg/ml ile hücre canlılığını %50 oranında artıran 50 µg/ml gallik asitin metil civanın toksik etkisini azaltıp azaltmadığı tespit edildi.

Sonuç olarak metil civanın MBDK hücreleri üzerinde düşük konsantrasyonda yüksek toksik etki gösterdiği tesbit edilmiştir. Bu etki kafeik asit tarafından önemli oranda azaltıldığı tesbit edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Agarwal, R., Goel, S.K., Behari, J.R., 2010. Detoxification and antioxidant effects of curcumin in rats experimentally exposed to mercury. *Journal of Applied Toxicology*, 30, 457-468.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 1.
- Ashour, T.H., 2014. Preventative Effects of Caffeic Acid Phenyl Ester on Cadmium Intoxication Induced Hematological and Blood Coagulation Disturbances and Hepatorenal Damage in Rats. *ISRN Hematology*, 2014.
- Bachrach, U., Wang, Y.-C., 2002. Cancer therapy and prevention by green tea: role of ornithine decarboxylase. *Amino acids*, 22, 1-13.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91, 179-194.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K., 2010. Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 13, 385-410.
- Burton, G., Foster, D., Perly, B., Slater, T., Smith, I., Ingold, K., Willson, R., Scott, G., 1985. Biological antioxidants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 565-578.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 5475-5480.
- Clifford, M.N., 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates - Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1033-1043.
- Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., Harman, D., 1987. Oxygen Radicals and Human Disease. *Annals of Internal Medicine*, 107, 526-545.
- Dmitriev, L.F., Titov, V.N., 2010. Lipid peroxidation in relation to ageing and the role of endogenous aldehydes in diabetes and other age-related diseases. *Ageing Research Reviews*, 9, 200-210.
- do Nascimento, J.L.M., Oliveira, K.R.M., Crespo-Lopez, M.E., Macchi, B.M., Maués, L.A.L., Pinheiro, M.d.C.N., Silveira, L.C.L., Herculano, A.M., 2008. Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses. *Indian Journal of Medical Research*, 128, 373-382.
- Floor, E., Wetzel, M.G., 1998. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *Journal of Neurochemistry*, 70, 268-275.
- Flora, S.J.S., Pachauri, V., 2010. Chelation in metal intoxication. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 2745-2788.
- Graham, H.N., 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive medicine*, 21, 334-350.

- Gunckel, S., Santander, P., Cordano, G., Ferreira, J., Munoz, S., Nunez-Vergara, L., Squella, J., 1998. Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media. *Chem-Biol Interact*, 114, 45-59.
- Gülçin, I., 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217, 213-220.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E., 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 119, 598-620.
- Harvey, R.A., Ferrier, D.R., 2011. *Biochemistry*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Hennekens, C.H., Buring, J.E., Manson, J.E., Stampfer, M., Rosner, B., Cook, N.R., Belanger, C., LaMotte, F., Gaziano, J.M., Ridker, P.M., 1996. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, 334, 1145-1149.
- Hissin, P.J., Hilf, R., 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74, 214-226.
- Ithayaraja, C.M., 2011. Mini-review: Metabolic functions and molecular structure of glutathione reductase. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 9, 104-115.
- Jagadeesan, G., Bharathi, E., 2014. In vivo restoration of hepatic and nephro protective potential of hesperidin and ellagic acid against mercuric chloride intoxicated rats. *Biomedicine and Aging Pathology*.
- Johnson, C.L., 2004. Mercury in the environment: Sources, toxicities, and prevention of exposure. *Pediatric Annals*, 33, 437-442.
- Kakkar, P., Das, B., Viswanathan, P.N., 1984. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 21, 130-132.
- Keha, E.K., Ö.İ., 2011. *Biyokimya. Aktif yayın Evi*, Erzurum.
- Kenow, K.P., Hoffman, D.J., Hines, R.K., Meyer, M.W., Bickham, J.W., Matson, C.W., Stebbins, K.R., Montagna, P., Elfessi, A., 2008. Effects of methylmercury exposure on glutathione metabolism, oxidative stress, and chromosomal damage in captive-reared common loon (*Gavia immer*) chicks. *Environmental Pollution*, 156, 732-738.
- Khalid, H., Hanif, M., Hashmi, M.A., Mahmood, T., Ayub, K., Monim-ul-Mehboob, M., 2013. Copper complexes of bioactive ligands with superoxide dismutase activity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 13, 1944-1956.
- Knight, J.A., 2000. Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 30, 145-158.
- Kumaran, K.S., Prince, P.S.M., 2010. Protective effect of caffeic acid on cardiac markers and lipid peroxide metabolism in cardiotoxic rats: an in vivo and in vitro study. *Metabolism*, 59, 1172-1180.
- Lehninger, A., 2008. *Lehninger Principles Of Biochemistry & EBook Author: Albert Lehninger, David L. Nelson, Michael M. Cox, Publisher: W. H.*
- Li, H., Han, M., Hou, L., Li, G., Sang, N., 2010. Landfill leachate ingestion induces protein oxidation and DNA-protein crosslinks in mouse viscera. *Journal of Hazardous Materials*, 174, 54-58.
- Li, Z., Wu, J., DeLeo, C.J., 2006. RNA damage and surveillance under oxidative stress. *IUBMB Life*, 58, 581-588.

- Lotfi-Ghahramanloo, M., Baghshani, H., 2016. Ameliorative Effects of Caffeic Acid on Lead Accumulation and Oxidative Stress in Lead-Exposed Mice. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*.
- Nabi, S., Ara, A., Rizvi, S.J., 2011. Methylmercury chloride coaxed oxidative stress in rats. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 10, 52-60.
- Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., 2014. *Handbook on the Toxicology of Metals: Fourth Edition*.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358.
- Okada, Y., Copeland, B.R., Fitridge, R., Koziol, J.A., Del Zoppo, G.J., 1994. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*, 25, 1847-1853.
- Pari, L., Prasath, A., 2008. Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. *Chemico-Biological Interactions*, 173, 77-83.
- Patrick, L., 2002. Mercury toxicity and antioxidants: Part I: Role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. *Alternative Medicine Review*, 7, 456-471.
- Rodrigues, J.L., Serpeloni, J.M., Batista, B.L., Souza, S.S., Barbosa Jr, F., 2010. Identification and distribution of mercury species in rat tissues following administration of thimerosal or methylmercury. *Archives of Toxicology*, 84, 891-896.
- Schurz, F., Sabater-Vilar, M., Fink-Gremmels, J., 2000. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: The role of metal-binding proteins. *Mutagenesis*, 15, 525-530.
- Sinha, A.K., 1972. Colorimetric assay of catalase. *Analytical biochemistry*, 47, 389-394.
- Ursini, F., Maiorino, M., Gregolin, C., 1985. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 839, 62-70.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39, 44-84.
- Young, Y., Menon, D., Tisavipat, N., Matta, B., Jones, J., 1997. Propofol neuroprotection in a rat model of ischaemia reperfusion injury. *European journal of anaesthesiology*, 14, 320-326.
- Zalups, R.K., 2000. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacological reviews*, 52, 113-144.
- Zhao, H., Ruan, H., Li, H., 2011. Progress in the research of GSH in cells. *Chinese Science Bulletin*, 56, 3057-3063.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Çağlar GÜLER

Doğum Yeri : Bakırköy

Doğum Tarihi : 08.06.1991

Medeni Hali :Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Adres : Kirazlı Mah. Hürriyet Cad. No:37/4 Bağcılar/İSTANBUL

Tel : +90539 214 61 90

E-posta : caglarguler34@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : İstanbul Bağcılar Orhan Gazi Lisesi 2005 - 2010

Lisans : Çankırı Karatekin Üniversitesi, Kimya 2010 - 2014

Yüksek Lisans : Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya A.B.D. 2014-2017

Yayınları (SCI ve Diğer)

1. Aslan E., Guler, C., Adem, S., 2015. In vitro effects of some flavonoids and phenolic acids on human pyruvate kinase isoenzyme M2. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 31(2), 314-317.
2. Adem, S., Aslan, A., Ahmed, I., Krohn, K., Guler, C., Comaklı, V., Demirdağ, M., Kuzu, M., 2015. Inhibitory and Activating Effects of Some Flavonoid Derivatives on Human Pyruvate Kinase Isoenzyme M2. Archiv der Pharmazie, 349(2), 132-136.



3. Koter, S., Guler, C., Koter, I., 2016. Architecture Civil Engineering Environment.
4. Kurşun Aktar, B.S., Oruç Emre, E.E., Demirtaş, I., Sahin Yaglioglu, A., Guler, C., Adem, S., Karaküçük Iyidoğan, A., 2017. Synthesis of novel fluorinated chalcones derived from 4'-morpholinoacetophenone and their antiproliferative effects. Journal of Molecular Structure, 1149, 632-639.

#### Katıldığı Kongre ve Sunumlar

1. Investigate of Effects of Some Phenolic Compounds on Pyruvate Kinase Isoenzyme M2 Activity Bahçeşehir üniversitesi -İstanbul 2014
2. Sıçan Böbrek Dokusu 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının İn Vitro Olarak Etkilerinin İncelenmesi. 27. Ulusal kimya kongresi- Çanakkale 2015
3. İn vitro ortamda bazı flavonoidlerin piruvat kinaz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması 27. Ulusal kimya kongresi- Çanakkale 2015
4. Farklı enzimler üzerine metil civanın inhibisyon etkisinin incelenmesi 3. İlaç ve Eczacılık Kongresi – İstanbul 2017
5. Aromatik etan sülfonil hidrazon bileşiklerinden elde edilen Ni(II) komplekslerinin sentezi ve karbonik anhidraz izoenzimler üzerindeki inhibisyon etkileri 3. İlaç ve Eczacılık Kongresi – İstanbul 2017
6. Aromatik ve heteroaromatik bütan sülfonil hidrazon bileşiklerinin karbonik anhidraz II ve IX üzerindeki inhibisyon etkilerinin incelenmesi 3. İlaç ve Eczacılık Kongresi – İstanbul 2017
7. Bazı centaurea bitki ekstratlarının insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi 3. İlaç ve Eczacılık Kongresi – İstanbul 2017

8. Purification of aldose reductase enzyme from the chicken liver and inhibition effects on enzyme activity of some pesticides 2nd international conference on advances in natural and applied sciences – Antalya 2017
9. Investigation of enzyme activity of Gardenin B and Cynarinin A Uluslararası tıbbi ve aromatik bitkiler kongresi – Konya 2017
10. Activator effect of 2 $\beta$ -hidroksi-ent-13-epi-manoil oksit, isolated from sideritis perfoliata, on carbonic anhydrase isoenzymes, CA-I and CA-II. Uluslararası tıbbi ve aromatik bitkiler kongresi – Konya 2017

