

DENEY NO: 8
POTANSİYEL ANTİOKSİDAN MADDE TAYİNİ (DPPH, Glutasyon)

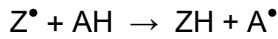
A) Antioksidan Aktivite Tayini

Serbest radikaller ile oluşabilecek hasarların engellenmesinde antioksidan bileşikler önemli rol almaktadırlar. Bu amaçla doğal ve sentetik kaynaklı antioksidan bileşikler kullanılmaktadır. Antioksidan etkiye sahip doğal kaynaklı ve sentetik kaynaklı bileşiklerin keşfi için, in vitro olarak yapılan çeşitli test sistemleri kullanılmaktadır. Bu test sistemlerinden birisi de *DPPH radikalini süpürücü etki tayini yöntemidir*.

DPPH Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Sentetik ya da doğal bileşiklerin DPPH radikalini süpürücü etkileri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil stabil radikalinin menekşe/mor rengini giderme yetenekleri ile ölçülecektir. Bu maddelerin DPPH ile oluşturdukları rengin 517 nm'de ölçümüne ve standart madde ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır.

DPPH çözeltisi, bir hidrojen atomu verebilecek bir madde ile karıştırıldığında, mor-menekşe rengin kaybolması ile birlikte indirgenmiş forma dönüşmektedir. DPPH radikali Z^{\bullet} ile ve donör molekül AH ile gösterilirse, primer reaksiyon şu şekilde gerçekleşir:



ZH, indirgenmiş formu ve A^{\bullet} , ilk basamakta oluşan serbest radikali göstermektedir. Bu radikal, daha sonra tüm stokiometriyi kontrol eden yani, indirgeyici bir molekül tarafından indirgenen (rengi giderilen) DPPH moleküllerinin sayısı kadar reaksiyona girecektir. Üstteki reaksiyon bu nedenle bir lipidin veya doymamış bir maddenin otooksidasyonu gibi okside edici bir sistem içinde gerçekleşen reaksiyonlar için bir temel oluşturmaktadır. DPPH molekülü Z^{\bullet} , sistem içindeki aktiviteleri AH tarafından baskılanan serbest radikalleri temsil etmektedir.

Reaksiyon ortamı: 100 μ M DPPH (metanolde) ve değişik konsantrasyonlarda madde içerir.

Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyonun ardından 517 nm'de absorbans ölçülür ve süpürücü etki, radikal redüksiyonunun yüzdesi olarak hesaplanır. Her deney 2-4 ölçümün ortalaması olarak verilir.

Deneyin Yapılışı:

- 1) Reaksiyon ortamındaki konsantrasyonu 0.001M olacak şekilde hazırlanan örnek çözeltilerinden 0.5 ml alınır.
- 2) 100 µM konsantrasyonda %70'lik metanol içinde hazırlanmış olan DPPH çözeltilisinin 3ml'si üzerine ilave edilir; vortekste 30 saniye karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletilir.
- 3) Süre sonunda UV Spektrofotometresi'nde 517 nm de absorpsansı okunur. Kullanılan bileşiklerin radikal süpürücü etkileri kontrol olarak kullanılan DPPH çözeltilisine oranla okunan absorpsans değerlerine göre aşağıdaki eşitlikten hesaplanır.

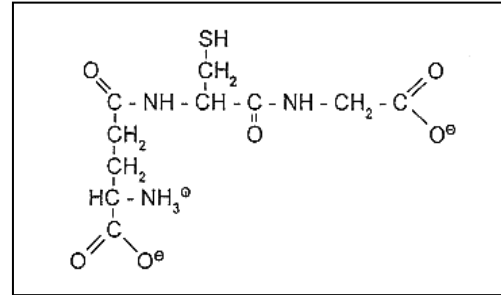
Kontrol Çözelti: Herhangi bir kimyasal ilave edilmeden ve sadece kimyasal bileşiklerin çözücüsünün ilave edildiği 100 µM DPPH çözeltilisi kontrol çözelti olarak alınmaktadır

$$\% \text{ Radikal süpürücü etki} = (\text{Kontrol absorpsans} - \text{Bileşiklerin absorpsans değerleri}) \times \text{Kontrol absorpsans} \times 100$$

Deneyde standart olarak antioksidan etkinliği bilinen butilhidroksi toluen(BHT) çözeltilisinin değişik konsantrasyonları kullanılacaktır.

B) Glutasyon

Glutasyon, L-glutamik asit, L-sistein ve glisinden, γ-glutamilsistein sentetaz ve GSH sentetazın katalizlediği iki basamaklı bir reaksiyonla meydana gelen, hayvan hücrelerinde oldukça yüksek konsantrasyonlarda (0,1-10 mM) bulunan bir tripeptittir.

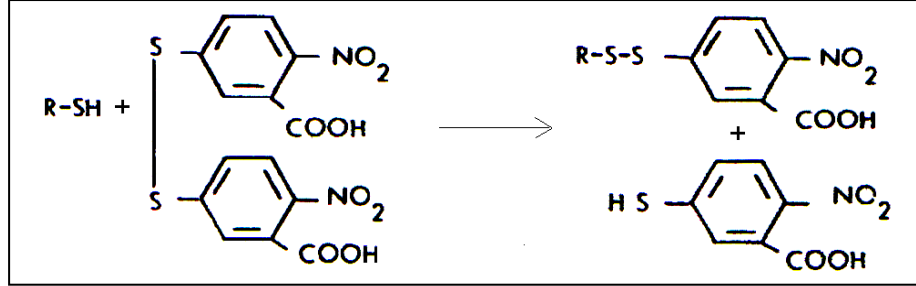


Şekil 1. İndirgenmiş glutasyon

Hücredeki nonprotein tiyollerin büyük bir kısmı (%90'dan fazlası), indirgenmiş glutasyon (GSH) formundadır. Glutasyon düzeylerinin, önemli ölçüde azalmasının, reaktif oksijen bileşiklerinin toksik etkilerine karşı hücrenin savunmasını azalttığı; hücre hasarı ve hücre ölümüne yol açabileceği bildirilmektedir. Oksidatif strese, GSH'ın tükendiği ve okside glutasyonun (GSSG) arttığı bilinmektedir. GSH, hücre içinde, en fazla, biyosentezinin gerçekleştiği bölge olan sitozolde bulunur. GSH ve GSSG, ekstraselüler olarak da bulunurlar: Ekstraselüler glutasyonun, detoksifikasyon proseslerinde fonksiyonu olduğu ve oksidan hasara karşı koruma sağladığı düşünülmektedir.

Glutasyon (GSH) Düzeylerinin Ölçülmesi

GSH ölçümü, Sedlak ve Lindsay (1968)'in spektrofotometrik yöntemine göre gerçekleştirilecektir. Bu yöntemin prensibi, reaksiyon ortamına ilave edilen 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) in sülfidril grupları tarafından indirgenmesi sonucu, 1 mol sülfidril karşılık 1 mol 2-nitro-5-merkaptobenzoik asit oluşumuna dayanmaktadır (Şekil 2). Oluşan nitro-merkaptobenzoik asit, **parlak sarı** renktedir ve sülfidril gruplarının spektrofotometrik yöntemle ölçümünde kullanılabilir.



Şekil 2. Sülfidril gruplarının DTNB ile reaksiyonu

Çözeltilerin Hazırlanması:

%10 trikloroasetik asit (TCA): TCA'nın iritan ve korozif olduğu unutulmamalı, çalışırken dikkatli olunmalıdır. 5g TCA tartılır, distile suda çözülür, toplam hacim 50 mL olacak şekilde tamamlanır. Protein çöktürme amacıyla kullanılacaktır.

0.4M Tris tamponu (pH 8.9): 48.4g Tris(baz) ve 7.4g EDTA (Titriplex) tartılır, yaklaşık 800mL distile suda, manyetik karıştırıcı kullanılarak çözülür. 6M HCl ile pH 8.9'a ayarlanır, toplam hacim 1L'ye tamamlanır.

10 mM DTNB çözeltisi: 99 mg DTNB tartılır, 25 mL metanolde çözülür.

GSH standart çözeltileri: 1 mM stok GSH çözeltisinden hareketle 25, 50, 100 µM konsantrasyonda çözeltileri hazırlanır.

Deneyin Yapılışı:

- 1) Örnekler üzerine, doku homojenatı ile aynı hacimde (örn. 0.5 mL) %10'luk trikloroasetik asit konularak deney tüpünde karıştırılır ve tüpler, 10-15 dakika süreyle, buz içinde, ara ara çalkalandıktan sonra 3000g'de 15 dakika santrifüjlenir.
- 2) Elde edilen süpernatanttan 0.4 mL alınarak, her bir tüp üzerine;
 - a. 0.8 mL 0.4M Tris tamponu (pH8.9)
 - b. 0.02 mL (= 20µL) 10mM DTNB çözeltisi otomatik pipetle eklenir. Tüpler, vorteksle karıştırılır, renk hafifçe sarıya döner.
- 3) DTNB'nin eklenmesinden 5 dakika sonra, sarı renk şiddeti maksimum olduğunda, absorban 412 nm'de, reaktif körüne karşı okunur.
- 4) Kalibrasyon grafiğinin hazırlanmasında, standart olarak, indirgenmiş glutasyon (GSH) kullanılır. 1 mM'lık GSH stok çözeltisinden hareketle, dilüsyonla hazırlanan standart çözeltileri reaksiyon ortamına ilave edilir; 412 nm'de absorbanları ölçülerek kalibrasyon grafiğine işlenir. Absorbansı ölçülmüş olan örneklerin konsantrasyonları, kalibrasyon denklemi yardımıyla hesaplanır.
- 5) Hesaplama, $[(A_{412} / m) \times \text{dilüsyon faktörü}]$ formülünden yararlanılır.