

Yağ Dokusunda Katalaz Aktivitesi Ölçümü için Farklı İzolasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Comparison of Different Isolation Methods for Measuring Catalase Activity in Adipose Tissue

Sinem Usta¹, Ahmet Alver^{2*}, Elif Şahin³

¹Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 53100 Rize, Türkiye.

²Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 61080 Trabzon, Türkiye.

³Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 61080 Trabzon, Türkiye.

*Sorumlu yazar e-posta: alver61@yahoo.com

¹<https://orcid.org/0000-0003-3585-4738>

²<https://orcid.org/0000-0002-9617-6689>

³<https://orcid.org/0000-0001-5864-9548>

ÖZET

Son zamanlarda yapılan çalışmalar yağ dokusunun yalnızca enerji deposu olmadığını, bunun yanında endokrin bir organ olduğunu da gösterdi. Vücutta artan yağ kitlesi sonucu oluşan obezite artmış oksidatif stres ve düşük dereceli kronik inflamasyonla birlikte gözlenmektedir. Yağ dokusunda gözlenen inflamasyona bağlı olarak dokuda oksidatif stres de artmaktadır. Antioksidan enzimler, daha az aktif radikal oluşmasına yol açarak veya serbest radikal zincir reaksiyonunun proteinler, lipidler, karbohidratlar ve DNA üzerine hasarını azaltarak oksidatif stresin şiddetini bastırmaya yardımcı olan proteinlerdir. Önemli bir antioksidan enzim olan katalaz (CAT), H₂O₂'yi su ve oksijene parçalayarak oksidatif stresin oluşumunu engeller. Yağ dokusunun yüksek lipid ve düşük protein içeriğine sahip olması, lipid interferansının yüksek olması bu dokuda protein izolasyonunu ve aktivite ölçümlerini zorlaştırmaktadır. Çalışmamızda, yağ dokusunda farklı protein izolasyon yöntemlerinin kullanılmasının CAT aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi ve ölçüm için gerekli şartların ortaya konulması amaçlandı. CAT aktivitesi ölçümleri Aebi yöntemi kullanılarak yapıldı. Sıçanlardan retroperitoneal yağ dokusu çıkarılıp üç farklı homojenizasyon yöntemi kullanılarak aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Homojenizasyon 1 (H1)'de organik çözücü olarak kloroform/metanol, homojenizasyon 2 (H2)'de ve homojenizasyon 3 (H3)'te sadece kloroform kullanıldı. Yapılan değerlendirmeler sonucunda H1 yönteminin ortalama spesifik aktivite değerleri diğer iki yönteme göre daha yüksek bulundu. Sonuç olarak, retroperitoneal yağ dokusunda H1 yönteminin CAT enzim aktivitesi ölçümünde daha uygun olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Adipoz Doku, Enzim Aktivitesi, Katalaz

ABSTRACT

Recent studies have shown that adipose tissue is not only an energy store, but also an endocrine organ. Obesity, which occurs as a result of increased fat mass in the body, is observed together with increased oxidative stress and low-grade chronic inflammation. It is an increase in tissue oxidative stress due to the inflammation observed in adipose tissue. Antioxidant enzymes are proteins that help suppress the severity of oxidative stress by leading to the formation of fewer active radicals or reducing the damage of a free radical chain reaction on proteins, lipids, carbohydrates, and DNA. Catalase (CAT), an important antioxidant enzyme, prevents the formation of oxidative stress by breaking down H₂O₂ into water and oxygen. The fact that adipose tissue has a high lipid and low protein content, high lipid interference, makes protein isolation and activity measurements in this tissue difficult. In our study, it was aimed to investigate the effect of using different protein isolation methods on CAT activity in adipose tissue and to identify the necessary conditions for measurement. CAT activity measurements were performed using the Aebi method. Retroperitoneal adipose tissue was removed from the rats and activity measurements were performed using three different homogenization methods. Chloroform/methanol was used as the organic solvent in homogenization 1 (H1), only chloroform was used in homogenization 2 (H2) and homogenization 3 (H3). As a result of the evaluations, the average specific activity values of the H1 method were found to be higher than those of the other two methods. As a result, it was concluded that the H1 method may be more suitable for measuring CAT enzyme activity in retroperitoneal adipose tissue.

Keywords: Adipose Tissue, Catalase, Enzyme Activity

Geliş Tarihi/Received Date: 22.02.2023

Kabul Tarihi/Accepted Date: 02.03.2023

GİRİŞ

Obezite, dünyada ve ülkemizde gün geçtikçe artan önemli bir toplum sağlığı sorunudur ve kısaca fazla enerji alınımına bağlı yağ dokusu artışı olarak tanımlanır. Yağ dokusu vücutta enerjinin depolandığı ana doku olmasının yanı sıra, endokrin bir organ olarak birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol alan adipokinleri de salgılamaktadır.^{1,2} Salgılanan adipokinler obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, hipertansiyon ve kanser gibi birçok hastalığın patolojisinde önemli rol oynamaktadır.³ Bahsedilen hastalıkların moleküler ve biyokimyasal mekanizmalarının ortaya çıkarılmasında yağ dokusunda bulunan protein karakterli moleküllerin izolasyonu ve ölçümleri oldukça önemli ve bilgi vericidir.

Vücutta veya bir dokuda oksidan-antioksidan dengesinin oksidanlar lehine kayması ile oksidatif stres oluşur. Oldukça farklı karakterde oksidan bileşik bulunmasına rağmen, organizmada oksidatif stresten genellikle reaktif oksijen türler sorumludur. Reaktif oksijen türleri aerobik hücresel metabolik süreçlerde sürekli olarak üretilir. Süperoksit ve hidrojen peroksit gibi serbest radikaller lipitler, proteinler ve DNA gibi çeşitli hücre içi moleküllerle reaksiyona girerek hücrenin yapı ve fonksiyonlarına zarar verir. Obezite, tip 2 diyabet, kalp-damar hastalıkları ve kanser gibi hastalıklarda artmış oksidatif stres patolojide önemli rol oynar. Obezitede hipertrofi ve hiperplazi nedeniyle büyüyen yağ dokusu, adiposit disfonksiyonuna bağlı olarak, normal adipokin profilinin dışına çıkarak inflamatuvar süreci tetikleyen bir adipokin salgı profili kazanır (yüksek leptin, TNF- α , IL-6 ve düşük adiponektin salgısı gibi). Özellikle bu dokudan salgılanan inflamatuvar sitokinlerin artışı bölgede bulunan makrofaj ve monositlerden reaktif oksijen ve azot türlerinin sentezinin artmasına yol açar. Ayrıca, artan mitokondriyal oksidasyon ve mekanik yükte yağ dokusunda oksidatif stresi daha da derinleştirir. Yukarıda bahsedilen etkiler sonucu obezite düşük seviyeli kronik inflamatuvar bir süreç olarak tanımlanır.^{3,4}

Oksidatif stres aynı zamanda yetersiz antioksidan savunma mekanizmaları ile de ilgilidir. ROT hücre içi konsantrasyonu, bu bileşiklerin üretimi ve bunların antioksidanlarca ortamdan uzaklaştırılma hızlarına bağlıdır. Hücreler oksidanların neden olacağı hasarı engellemek ya da tamir etmek için birçok antioksidan mekanizmaya sahiptir. Özellikle

antioksidan enzimlerden, Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX) oksijen kullanan tüm hücrelerin canlılığı için gereklidir. Bu enzimlerin sıralı reaksiyonları sonucu süperoksit radikali suya indirgenmektedir.⁵

Katalaz (E.C. 1.11.1.6) (CAT) dört alt birimden meydana gelen antioksidan enzimdir. Her bir alt birim, NADPH molekülü ve hem grubu ihtiva eder. CAT enzimi hidrojen peroksitin, O₂ ve H₂O'ya dönüşümünü katalizler. Hidrojen peroksit bir radikal kaynağı olduğu halde, biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile reaksiyona girmez. Cu²⁺ ve Fe²⁺ iyonlarının katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu ile en reaktif oksijen türü olan hidroksil radikali oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır.⁶

Obeziteye bağlı oksidatif stresin değerlendirilmesinde de yağ dokusunda bu enzimlerin ölçümü yapılmaktadır.⁷ Ayrıca obezite fizyopatolojisi ile ilgili moleküler çalışmalarda ve tedaviye yönelik uygulamaların değerlendirilmesi kullanılan, proteomik, ELISA, western blot ve enzim ölçümleri gibi yöntemler için yağ dokusundan protein izolasyonu gerekmektedir. Beyaz yağ dokusu, yüksek yağ içeriğine sahip olması ve protein miktarının toplam doku kütlesinin %2'sinden daha az olması sebebiyle proteinlerinin izolasyonu ve analizi yönünden oldukça problemlidir. Ayrıca lipit interferansının yüksek olması analitik yöntemlerin uygulanmasını güçleştirmektedir. Bu çalışmada, retroperitoneal yağ dokusunda CAT aktivite tayininde kullanılabilecek literatürlerde geçen üç farklı homojenizasyon yöntemi karşılaştırılıp, CAT aktivitesi için en iyi spesifik aktiviteyi gösteren homojenizasyon yönteminin belirlenmesi ve ölçüm için gerekli şartların ortaya konulması amaçlandı.

METOD

Beyaz yağ dokusu örnekleri Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde farklı çalışmalar için sakrifiye edilmiş erkek *Sprague Dawley* ırkı ratların retroperitoneal yağ dokuları alınarak temin edildi. Alınan yağ dokusu örneklerine üç farklı lipit homojenizasyon yöntemi uygulandı.

Homojenizasyon Yöntemi 1

İzolasyon Tamponu Hazırlanması (pH 7.4)

0.606 g Tris, 0.87 g NaCl ve 0.08 g EDTA tartıldı. pH 7.4'e ayarlandı ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı. Yaklaşık 100 mg yağ dokusu cam tüplere alındı. 200 μ L izolasyon tamponu ve 750 μ L kloroform/metanol karışımı (2:1) ilave edilerek homojenize edildi.

Homojenatlar ependorflara aktararak 20 dk buzda bekletildikten sonra 250 µL kloroform ve 250 µL saf su eklendi ve ependorflar vortekslendi. +4°C 15000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında iki faz gözlemlendi. Üstteki süpernatant temiz ependorfa aktararak CAT ölçümü için hazır hale getirildi.⁷

Homojenizasyon Yöntemi 2

HEPES Tamponunun Hazırlanması (25 mM, pH 8.80)

1.63 g HEPES tartıldı. pH 8.80'e ayarlandı ve son hacmi 250 mL'ye tamamlandı. Bir önceki homojenizasyon yöntemi modifiye edilerek işlem gerçekleştirildi. Yaklaşık 100 mg yağ dokusu cam tüplere alındı. 200 µL 25 mM HEPES tamponu çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenatlar ependorflara aktarıldı ve 200 µL kloroform ilave edilerek +4°C'de 15000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj ardından iki faz gözlemlendi. Üstteki süpernatant fazı temiz ependorfa aktararak CAT ölçümü için hazır hale getirildi.⁸

Homojenizasyon Yöntemi 3

Homojenizasyon Tamponu (pH 7.4)

Bir balon jenin içine sıvı triton X-100 50 µL ilave edildi ve üzerine 100 mL saf su ilave edilerek çözelti hazırlandı. 0.05 M 100 mL Tris-HCl hazırlamak için bu maddeden 0.788 gr tartıldı ve bir miktar saf suda çözünmesi sağlandıktan sonra 100 mL' ye tamamlandı. Hazırlanan iki çözelti birbirine karıştırıldıktan sonra pH 7.4' e ayarlanarak homojenizasyon tamponu hazırlandı. 150 mg yağ dokusu tartılarak buz içine alındı. Buz üzerinde bekleyen dokunun üstüne 2 mL soğuk homojenizasyon tamponu ilave edildi. Dokular soğuk ortamda 10 saniye boyunca homojenizatörle homojenize edildi. Homojenize doku +4 °C'de, 3000 rpm' de, 10 dakika santrifüj edildi. En üstteki yağ tabakası bir pastör pipet yardımıyla uzaklaştırılarak süpernatant alındı. 1 mL süpernatant üzerine 300 µL kloroform konuldu. Karışım vortekslenerek +4°C' de, 10.000xg'de 15 dk santrifüj yapıldı. Elde edilen süpernatant CAT ölçümü için hazır hale getirildi.⁹

CAT aktivitesi Aebi yöntemi ile ölçüldü.¹⁰ Tablo 1'de sunulan şekilde pipetlemeler yapılarak 240 nm'de H₂O₂'nin bozulması sonucu absorbanstaki düşüş takip edildi. Katalaz aktivitesinde birim olarak birinci derece reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı.¹⁰ Dört farklı dilüsyon seviyesinde ikili tekrarlar halinde ölçümler yapıldı. Retroperitoneal yağ dokularından elde edilen homojenatlar da protein tayini için bisinkoninik asit (BCA) protein ölçüm kiti (Thermo Scientific, Pierce™ BCA Protein Assay Kit) kullanıldı.

Tablo 1. Katalaz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0)	0.25	-
Numune	0.50	0.50
H ₂ O ₂ (% 30)	-	0.25

İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar ortalama olarak ifade edildi. Karşılaştırmalar Kruskal Wallis testi ile yapıldı ve post hoc olarak ta Mann Whitney U testi kullanıldı. p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

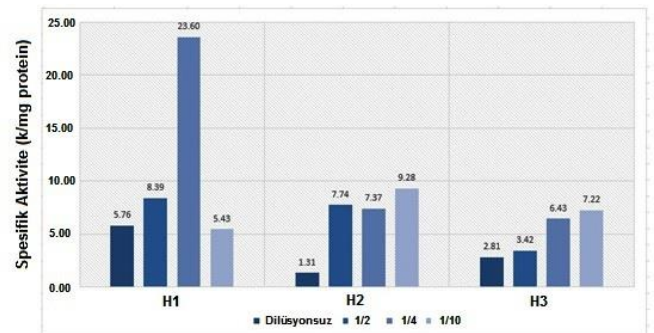
Homojenizasyon yöntemlerinde ölçülen CAT aktivitelerini spesifik aktiviteye çevirmek için kullanılan protein miktarları farklı dilüsyonlar için Tablo 2'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda H1 ile H2 yönteminden elde edilen ortalama total protein miktarları arasında fark gözlenmemiştir (p=0.059). H3 yönteminde diğer iki yöntemle göre anlamlı seviyede daha fazla protein miktarı elde edilmiştir (p<0.05).

Her üç homojenizasyon yönteminin de farklı dilüsyonlardaki spesifik aktiviteleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda üç yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p=0.886).

Tablo 2. Kullanılan 3 yöntemde elde edilen protein miktarı sonuçları (mg/mL)

Seyreltme oranı	H1	H2	H3
Dilüsyonsuz	0.274	0.646	0.994*
1/2	0.176	0.242	0.522*
1/4	0.122	0.117	0.354*
1/10	0.083	0.044	0.177*

*H1 ve H2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı farklı (p<0.05).



Şekil 1. Üç homojenizasyon yönteminin spesifik aktiviteleri

TARTIŞMA

Bu çalışmada, yağ dokusu örneklerinde CAT enzim aktivitesi ölçümünde kullanılacak organik solventle doku homojenizasyonunun delipidasyonu (lipidlerin uzaklaştırılması) esasına dayanan üç farklı yöntem karşılaştırılmıştır. Yağ hücreleri yapısal olarak sitoplazmalarında triaçilgliserol ve az miktarda kolesterol ve fosfolipit içeren lipit damlacıklarını içerir. Sitoplazmadaki lipit damlacıkları perlipin denilen bir proteince sarılmıştır. Bu hidrofobik proteinlerin klasik deterjan kullanan yöntemlerle izolasyonu zordur. Proteinler oluşan misel yapılarının içinde kalmakta ve izole edilen protein miktarı azalmaktadır. Ayrıca, deterjanların birçok ölçüm için interferans yapmaktadır.⁷

Kullanılan homojenizasyon yöntemlerinin etkinliği ortaya koymak için spesifik aktivite değerleri hesaplanmış ve değerlendirilmiştir. Kullanılan ilk homojenizasyon yönteminde (H1) yağ dokusu Sajic ve ark.⁷ tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek homojenize edilmiştir. İzolasyon tamponu ile yapılan homojenizasyonu takiben kloroform/metanol (1:2) karışımı ile delipidasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İkinci homojenizasyon yönteminde (H2) HEPES tamponu ile yapılan homojenizasyonu takiben kloroform ile delipidasyon işlemi yapılmıştır. Üçüncü homojenizasyon yönteminde (H3) yağ dokusu homojenizasyonu yine homojenizasyon ve deterjan (triton X-100) ile yapılmış, delipidasyon işlemi sadece kloroform kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar (Tablo 1) incelendiğinde en yüksek protein değerlerinin H3'te olduğu gözükmektedir. H3'te en yüksek protein içeriğinin olmasında polar organik çözücü kullanılmamasının bir sonucu olabilir. Proteinler organik çözücülerle muamele edildiklerinde çökerler. Bununla beraber, bazı hidrofobik proteinler, özellikle hücre zarlarında yerleşenler organik çözücüler etkisi ile çöktürülemezler. Hücre zarlarında kullanılan organik çözücüler proteinin hidrofobik parçaları etrafındaki su moleküllerinin yerini alırlar. Buda, protein çözünürlüğünün artması ile sonuçlanır. Ayrıca bu homojenizasyon yönteminde kullanılan deterjanda protein çözünürlüğünü arttırmış olabilir. Proteinlerin molekül büyüklüğüne bağlı olarak da çökme davranışını değiştirmektedir. Büyük molekül ağırlıklı proteinler diğer özellikleri aynı olan daha küçük molekül ağırlıklı proteinlere göre daha düşük organik çözücü konsantrasyonların da çökerler.¹¹ Homojenizasyon yöntemleri içersinde tampon/klorofom oranı en yüksek

homojenizasyon yöntemi H3'tür. Bu sebebe bağlı olarak H3'te ölçülen protein miktarı daha yüksek olabilir.

CAT hücrelerde SOD tarafından üretilen hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştüren enzimdir. CAT'ın çoğunluğu peroksidomlarda lokalize olmuştur. İnflamatuvar bir süreç olan obezitede, NADPH oksidazlar oksidatif stresi indükleyebilir. Bu enzim bol miktarda süperoksit anyonu oluşturmaktadır. Süperoksidin zararlı etkilerinin bertaraf edilmesinde ilk savunma hattı SOD aktivitesidir. Bu aktiviteye bağlı oluşan H₂O₂ de CAT ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri ile bertaraf edilir.⁵

Farklı seyreltme oranlarında üç homojenizasyon yöntemi ile elde edilen spesifik aktivite değerleri Şekil 1'de verilmiştir. En yüksek spesifik aktivite değeri H1'de elde edilmiştir, ancak istatistiksel olarak bu fark anlamlı bulunmamıştır (p=0.886). H1 yöntemi en düşük ortalama protein değerlerine sahip olmasına rağmen en yüksek CAT aktivitesine sahiptir. Her üç homojenizasyon yönteminde de yukarıda anlatıldığı gibi apolar bir organik çözücü (kloroform) ve H1 de polar organik çözücü (metanol) kullanılmıştır. Genel olarak kullanılan organik çözücüler izole edilecek proteinlerin üç boyutlu yapılarını değiştirerek çözünürlüklerinin kaybetmelerine ve çökmelerine sebep olur. Bahsedilen etki 0°C üzerindeki şartlarda daha belirgindir. Bu yüzden denatürasyon çalışmalarında, proteinleri çöktürmek için organik çözücüler sıklıkla kullanılır. Organik çözücüler biyolojik örneklerde tüm proteinlerin çökmesini sağlayabileceği gibi, uygun deneysel şartlarda bazı protein fraksiyonlarının çökmeden fonksiyonel olarak ortamda kalmasını sağlayabilir. Bu yöntem (polar organik çözücü kullanımı) enzim izolasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.¹² Enzim katalizi ile ilgili çalışmalarında, substrat (lar) organik çözücülerde daha fazla çözünürlüğe sahip olduğu, arzulanan yönlerde reaksiyon dengelerinin değiştirilmesi, kontaminasyon riskinin azaltılması, termostabilitenin artırılması, enzimin geri kazanımı ve tekrar kullanılabilirliği, uçucu çözücüler kullanıldığında enerji verimliliğinin artırılması, asit anhidritler gibi "neme duyarlı" substratlar/reaktifler kullanması gerektiğinde, substratın özgüllüğü, özgünlüğüne ve enantioselektiflik gibi durumlarda organik çözücü kullanımı tercih edilir.¹³ Kullanılan organik çözücü, enzimlerin tersiyer ve kuaterner yapılarını etkileyerek ölçümler sırasında

domainlerin esnekliğini, substratların aktif bölgeye ulaşması ve bağlanması gibi özellikleri değiştirerek enzim aktivitesi üzerine olan etkisi gerçekleştirebilir.¹⁴ Polar organik çözücülerden metanol ve etanol gibi alkollerin, gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz, fruktoz 1,6-bisfosfataz ve alkalin fosfataz gibi enzimlerin aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir¹⁴. Bu olayın kesin nedeni bilinmemekle birlikte, alkollerin peptitlerde ve proteinlerde yapısal değişiklikler meydana getirdiği uzun zamandır bilinmektedir. Alkoller enzimlerin konformasyonel esnekliğini artırarak katalitik aktivite için moleküler bir kayganlaştırıcı gibi davranmaktadır.¹⁴

H1’de yağ dokusu homojenize edildikten sonra kullanılan kloroform/metanol karışımı H2’de kullanılan kloroforma göre CAT aktivitesini daha iyi korumuştur. Bunda mevcut aktivitenin korunması kadar metanolün CAT aktivitesini yukarıda bahsedilen şekilde artırmış olmasının bir sonucu olabilir. H1 ve H2’de hemen hemen aynı miktarda protein içeriği bulunmasına rağmen CAT aktivitesinin H2’de daha düşük olmasının nedeni, proteinin denatürasyonla aktivitesini kaybetmesi ve /veya kullanılan kloroform miktarının CAT fraksiyonunu çözünür halde tutamamasının sonucu olabilir. Ayrıca, organik çözücüler su ile karıştırıldığında ısı üretimine sebep olmaktadır ve bu denatürasyonu daha da artırmaktadır.¹² H1’de buz üzerinde numuneler bekletilirken H2’de bu uygulama yapılmamıştır. H2 için soğuk ortamın sağlanmamış olması denatürasyonu artırmış olabilir. Yukarıda bahsedildiği gibi organik çözücüler substratların çözünürlüğü üzerinde de etkilidir. Metanolün kloroforma göre daha polar olması deneylerde kullanılan H₂O₂’nin çözünürlüğü üzerinden de enzim aktivitesinin H1’ de daha yüksek olmasına sebep olmuş olabilir. Elde ettiğimiz sonuçlar Aebi yöntemi ile CAT aktivitesi ölçümü ile ilgilidir. CAT aktivitesi ölçümünde kullanılacak farklı yöntemlerde (Goth yöntemi gibi) substrat değişikliği gibi faktörler farklı sonuçların elde edilmesine sebep olabilir. H3’de en yüksek protein miktarına rağmen en düşük CAT aktivitesi ölçülmesinde deterjan kullanılması etkili olabilir. Triton X-100’ün deterjan etkisi lipid-protein ayrımını tam anlamıyla yerine getirirken, yüksek miktarda ürün elde edilmesine imkan sağlarken, apolar karakterinden dolayı proteinlerde ciddi denatürasyona yol açmış olabilir. Yine yüksek apolariteden dolayı substrat çözünürlüğünün azalması, elektron transferinin zorlaşması gibi olaylar CAT’ın aktivite kaybına

uğramasına sebep olmuş olabilir. Ayrıca H2 yöntemindeki kullanılan pH’ nın 8.8 değerine sahip olması da katalaz aktivitesini değiştirmiş ve daha düşük spesifik aktiviteye sebep olmuş olabilir.

SONUÇ

Sonuç olarak, retroperitoneal yağ dokusunda Aebi yöntemi ile CAT aktivite tayininde kullanılacak üç farklı homojenizasyon yöntemi karşılaştırıldığı çalışmamızda, H1 yönteminin (kloroform /metanol karışımı) CAT aktivitesi tayininde daha yüksek spesifik aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi ve bu etkide daha polar özelliğe sahip metanol varlığının ve soğuk ortam uygulamasının önemli olabileceği kanaatine varıldı.

Yazarlık katkı beyanı

Konsept ve dizayn: AA, SU

Verilerin eldesinde: AA, SU

Verilerin analizinde ve yorumlanmasında: AA, SU

Makale yazımında: AA, EŞ

Makale revizyonu ve entelektüel katkı: AA, EŞ

Gözetiminde: AA

Yazar çıkar çatışması

Yazarların arasında potansiyel çıkar çatışması yoktur.

Destek

Bu çalışma için hiç bir maddi destek alınmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(4): 6184-6223. DOI: 10.3390/ijms15046184.
2. Demirci Ş, Gün C. Adipoz Doku ve Adipoz Dokudan Salınan Bazı Proteinler. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.* 2017; 5(2): 155-179.
3. Darroudi S, Fereydouni N, Tayefi M, et al. Oxidative stress and inflammation, two features associated with a high percentage body fat, and that may lead to diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Biofactors.* 2019; 45(1): 35-42. DOI: 10.1002/biof.1459.
4. İpar N. Ekzojen obezitesi olan hastalarda total oksidatif stres ve total antioksidan kapasite düzeyleri; probiyotiklerin bu düzeylere etkisi [Tıpta uzmanlık Tezi]. Eskişehir, Türkiye. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı; 2012.
5. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.* 2010; 5(1): 51-66. DOI: 10.1038/nprot.2009.197.
6. Karabulut H, Gülay MŞ. Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University.* 2016; 1(1): 65-76 . DOI: 10.24880/maeuvsd.260790.

7. Sajic T, Hopfgartner G, Szanto I, Varesio E. Comparison of three detergent-free protein extraction protocols for white adipose tissue. *Anal Biochem.* 2011; 415(2): 215-7. DOI: 10.1016/j.ab.2011.04.023.
8. Selvi Y. Denervasyona bağlı retroperitoneal yağ dokusundaki total karbonik anhidraz aktivite değişikliklerinin incelenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Trabzon, Türkiye. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı; 2018.
9. Kahraman C. Diyetle İndüklenmiş Obezitede Yağ Dokusundaki Oksidan Antioksidan Dengenin İncelenmesi [Doktora Tezi]. Trabzon, Türkiye. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı; 2013.
10. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-6. DOI: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
11. Asakura T, Adachi K, Schwartz E. Stabilizing effect of various organic solvents on protein. *J Biol Chem.* 1978; 253(18): 6423-6425.
12. Englard S, Seifter S. *Methods in enzymology. Precipitation Techniques* (Ed : Abelsan JN, Simon MI) 1990; 285-306.
13. Gupta MN. Enzyme function in organic solvents. *Eur J Biochem.* 1992; 203(1-2): 25-32. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb19823.x.
14. Wiggers HJ, Cheleski J, Zottis A, Oliva G, Andricopulo AD, Montanari CA. Effects of organic solvents on the enzyme activity of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in calorimetric assays. *Anal Biochem.* 2007; 370(1): 107-14. DOI: 10.1016/j.ab.2007.06.042.

To Cite: Usta S, Alver A, Sahin E. Comparison of different isolation methods for measuring catalase activity in adipose tissue. *Farabi Med J.* 2023; 2(2): 8-13. DOI: 10.59518/farabimedj.1254863.