T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CAULERPA TÜRLERİNDEN TIBBİ ÖNEME SAHİP ENZİM İNHİBİTÖR ÖZÜTLERİNİN HAZIRLANMASI

Sevilay CENGİZ

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

2011

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CAULERPA TÜRLERİNDEN TIBBİ ÖNEME SAHİP ENZİM İNHİBİTÖR ÖZÜTLERİNİN HAZIRLANMASI

Sevilay CENGİZ

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

Dokuz Eylül Üniversitesi, 2008.KB.FEN.019 numaralı BAP projesi tarafından desteklenmiştir.

2011

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CAULERPA TÜRLERİNDEN TIBBİ ÖNEME SAHİP ENZİM İNHİBİTÖR ÖZÜTLERİNİN HAZIRLANMASI

Sevilay CENGİZ

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 02/03/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Sevil AKSU (Danışman)
Prof. Dr. M. Kadir YURDAKOÇ (İkinci Danışman)
Prof. Dr. İlgi KARAPINAR KAPDAN
Doç. Dr. Levent ÇAVAŞ
Doç. Dr. Sibel TUNÇ

ÖNSÖZ

Bilim ve teknoloji alanında son yıllarda gözlenen hızlı gelişmelere paralel olarak tıp sektöründe de önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu gelişmelerle birlikte hem daha önce tedavisi pek mümkün olmayan çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek hem de hâlihazırda kullanılan ancak çeşitli yan etkilere sahip ilaçlara alternatif olabilecek ilaçların üretimi konusunda da artan bir hızla çalışmalar sürdürülmektedir. Bu konuda yapılan bazı çalışmaların sonuçları, konuya ilgi duyan araştırmacıları doğal ürünlerin kullanımına teşvik etmektedir. Pek çok araştırma grubu tarafından özellikle karasal bitkiler kullanılarak pek çok araştırma sonuçlandırılmış olmakla birlikte, sucul canlıların olası potansiyellerinin değerlendirildiği araştırmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Dünyanın büyük bir kısmının su ile kaplı olduğu ve sucul ekosistemde yaşayan canlıların kendilerini predatörlerinden koruyabilmek için daha çok metabolit salgılıyor olabileceği düşünülürse, bu ortamda yaşayan türlerin de potansiyellerinin incelenmesi gerektiği açıkça görülecektir. Bu çalışma da üç tarafı denizlerle çevrili olan ülkemizde, denizlerimizde yüksek oranda yayılım gösteren *Caulerpa* türünün olası farmakolojik potansiyelinin belirlenmesi ve türün medikal endüstriye kazandırılması amaçlanmıştır.

Doktora çalışmalarım süresince bana rehberlik eden ve her türlü desteği veren değerli danışman hocalarım, Sayın Prof. Dr. Kadir YURDAKOÇ ve Yrd. Doç. Dr. Sevil AKSU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her konuda beni destekleyen Sayın Hocam Doç. Dr. Levent ÇAVAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Eğitim ve tez çalışmama, bilgi birikimleri ve görüşleriyle katkıda bulunan Dokuz Eylül Üniversitesi, Kimya Bölümü öğretim üyelerine, arkadaşlarıma ve bölüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Çalışmalarımın bir kısmını yapmış olduğum Akdeniz Üniversitesi, Kimya Bölümü öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora tezimi finansal olarak detekleyen Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fonuna (2008.KB.FEN.019 nolu proje) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) (109T512 nolu proje) teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince beni finansal olarak destekleyen Tübitak-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB), Yurt İçi Doktora Bursu programına teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora eğitimim boyunca sabır ve desteğini benden esirgemeyen, her türlü kararımda daima yanımda olan aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

CAULERPA TÜRLERİNDEN TIBBİ ÖNEME SAHİP ENZİM İNHİBİTÖR ÖZÜTLERİNİN HAZIRLANMASI

Sevilay CENGİZ
Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Sevil AKSU
İkinci Danışman: Prof. Dr. M. Kadir YURDAKOÇ
Mart 2011, 149 sayfa

Pek çok alg türü, bulundukları sucul ortamda yaşamlarını devam ettirebilmek adına savunma amaçlı bazı metabolitler salgılarlar. Predatörlerinden korunmak amacıyla salgılanan bu sekonder metabolitler genellikle farmasötik açıdan da önemli birer bileşendirler. Çeşitli alg türlerinin geleneksel olarak bazı hastalıkların tedavisinde kullanılıyor olması ve özellikle Akdeniz'de yaygın olarak bulunan *Caulerpa* türlerinin salgılarının anti-mikrobiyal, anti-kanserojen, anti-viral ve apoptotik özelliklere sahip olduğunun ortaya çıkarılmış olması bu çalışmanın temel çıkış noktasını oluşturmuştur.

Bu çalışmada Akdeniz kıyılarında yaygın olarak bulunan *C. racemosa* ve *C. prolifera* türlerinin başlıca sekonder metaboliti olan caulerpenyne'in (CYN) tıbbi öneme sahip çeşitli enzimler üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonuçları CYN'nin; α-amilaz, lipoksigenaz ve ksantin oksidaz enzim aktiviteleri üzerinde önemli bir inhibisyon etkisi gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Yapılan kinetik incelemeler CYN varlığında α-amilaz ve lipoksigenaz inhibisyonunun unkompetetif ve ksantin oksidaz inhibisyonunun nonkompetetif inhibisyon modelleri ile uyumlu olduğunu göstermiştir.

Çalışmada elde edilen bu verilerin ışığında *Caulerpa* türlerinin, bu enzimlerle ilişkilendirilebilen çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek doğal bir ürün olduğu söylenebilir. Ayrıca çalışmadan elde edilen sonuçlar *Caulerpa* türlerinin, toplum sağlığına hizmet eden yararlı bir ürüne, bilime özellikle de farmasötik endüstriye kazandırılmasının mümkün olabileceğini göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELER: *Caulerpa* türleri, enzim inhibisyonu, enzimatik tepkimelerin kinetiği, α-amilaz, lipoksigenaz, fosfolipaz A_2, lipaz, ksantin oksidaz, katalaz ve süperoksid dismutaz

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. Sevil AKSU (Danışman)

Prof. Dr. M. Kadir YURDAKOÇ (İkinci Danışman)

Prof. Dr. İlgi KARAPINAR KAPDAN

Doç. Dr. Levent ÇAVAŞ

Doç. Dr. Sibel TUNÇ

ABSTRACT

PREPARATION OF MEDICINALLY IMPORTANT EZYME INHIBITOR EXTRACTS FROM *CAULERPA* SPECIES

Sevilay CENGİZ

Ph.D. Thesis in Chemistry

Superviser: Asst. Prof. Dr. Sevil AKSU

Second Superviser: Prof. Dr. M. Kadir YURDAKOÇ

March 2011, 149 pages

Most algae species secrete some defensive metabolites in order to maintain their life in aquatic media. These secondary metabolites that aim to protect these species from their predators generally have significant potential in terms of pharmaceutical industry. Various algae species has been used traditionally for the treatment of some diseases for ages. Besides, it was presented in previous scientific papers that the secondary metabolites of *Caulerpa* species have anti-microbial, anti-carcinogen, anti-viral and apoptotic properties. These remarkable results above mentioned constitute the main starting point of this study.

In the present study, the inhibitory effects of caulerpenyne (CYN) which is the main secondary metabolite of *C. racemosa* and *C. prolifera* abundant in the Mediterrenean Sea on some medically important enzymes were investigated. According to the results of this study, CYN has significant inhibitory effects on the activities of α-amylase, lipoxygenase and xanthine oxidase enzymes. The enzyme kinetic studies indicated that both α-amylase and lipoxygenase inhibition with CYN represents an un-competitive type of inhibition while it is non- competitive for xanthine oxidase.

In the light of the results obtained from this study, it can be said that *Caulerpa* species can be promising native material for the treatment of some diseases associated with studied enzymes. Also the results of the study pointed out that *Caulerpa* species

can be converted to a beneficial bio-material for public health and science especially for pharmaceutical industry.

KEY WORDS: *Caulerpa* species, enzyme inhibition, enzyme kinetics, α-amylase, lipoxygenase, phospholipase A_2, lipase, xanthine oxidase, catalase and superoxide dismutase

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Sevil AKSU (Superviser)
Prof. Dr. M. Kadir YURDAKOÇ (Second Superviser)
Prof. Dr. İlgi KARAPINAR KAPDAN
Assoc. Prof. Dr. Levent ÇAVAŞ
Assoc. Prof. Dr. Sibel TUNÇ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i
ÖZET iii
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ x
ŞEKİLLER DİZİNİ xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ xvii
1. GİRİŞ 1
1.1. *Caulerpa* Türlerinin Taksonomisi 1
1.2. Türkiye'deki *Caulerpa* Türleri 2
1.2.1. *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh 4
1.2.2. *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (Sonder) Verlaque, Huisman, et Boudouresque (Caulerpales, Chlorophyta) 6
1.2.3. *Caulerpa prolifera* (Forsskål) J.V. Lamouroux 8
1.2.4. *Caulerpa scalpelliformis* (R. Brown ex Turner) C. Ag. var. *denticulata* (Dacaisne) Weber van Bosse (Caulerpaceae, Caulerpales) 9
1.2.5. *Caulerpa ollivieri* Dostál 10
1.2.6. *Caulerpa racemosa* var. [*lamourouxii*] f. *requienii* (Montagne) Weber-van Bosse 11
1.2.7. *Caulerpa sertularioides* (S.G.Gmelin) M.A.Howe 12
1.3. *Caulerpa* Türlerinin Yayılımını Önleme Çalışmaları 12
1.3.1. Elle toplama 13
1.3.2. Fizikokimyasal metotlar 13
1.3.3. Biyolojik savaş 13
1.4. Caulerpenyne (CYN) Üzerine Yapılan Biyokimyasal Araştırmalar 14
1.5. Enzimler 22
1.5.1. Enzimlerin yapısı 22
1.5.2. Enzimlerin sınıflandırılması 23
1.5.3. Enzim aktivitesi 24
1.5.3.1. Enzim aktivitesine etki eden faktörler 24

1.5.4 Enzim kinetiği - Michaelis-Menten mekanizması 25
1.5.5. Enzim inhibisyonu 28
1.5.5.1. Tersinir inhibisyon 28
1.5.5.2. Tersinmez inhibisyon 32
1.5.6. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan enzimler 32
1.5.6.1. Amilaz (EC 3.2.1.1) 32
1.5.6.2. Lipoksigenaz (LOX, EC 1.13.11.34) 35
1.5.6.3. Fosfolipaz A_2 (PLA_2, EC 3.1.1.4) 37
1.5.6.4. Lipaz (triaçilgliserol açilhidrolaz, EC 3.1.1.3) 40
1.5.6.5. Ksantin Oksidaz (XOD, EC 1.17.3.2) 43
1.5.6.6. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) 45
1.5.6.7. Süperoksid Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) 46
1.6. Çalışmanın Amacı 49
2. MATERYAL ve METOT 51
2.1. Kullanılan Kimyasallar 52
2.2. Kullanılan Cihazlar 53
2.3. *Caulerpa* Türlerinin Toplanması 54
2.4. *Caulerpa* Türlerinden Çeşitli Özütlerin Hazırlanması 54
2.5. *Caulerpa* Özütlerinin Çeşitli Enzimler Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi 54
2.5.1. α-amilaz enzimi için inhibisyon etkisinin belirlenmesi 55
2.5.2. Fosfolipaz A_2 (PLA_2) enzimi için inhibisyon etkisinin belirlenmesi 56
2.5.3. Lipoksigenaz (15-LOX) enzimi için inhibisyon etkisinin belirlenmesi 58
2.5.4. Monoaçil Gliserol Lipaz (MGL) enzimi için inhibisyon etkisinin belirlenmesi 60
2.5.5. Katalaz (CAT) enzimi için inhibisyon etkisinin belirlenmesi 61
2.5.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi için inhibisyon etkisinin belirlenmesi 62
2.6. *C. prolifera* Türünden CYN'nin Saflaştırılması 64
2.6.1. CYN'nin H-NMR spektrumu 65
2.6.2. HPLC'de CYN analizi 65
2.6.2.1. CYN için kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması 65
2.6.2.2. Kıyılarımızda yaygın olarak bulunan türlerdeki CYN içeriğinin tespiti 66

2.7. Çeşitli Enzimlerin CYN ile İnhibisyon Kinetiği.....66
2.7.1. α-amilaz enziminin CYN ile inhibisyonunun kinetiği 66
2.7.2. Lipoksigenaz (LOX) enziminin CYN ile inhibisyonunun kinetiği..... 67
2.7.3. Ksantin oksidaz (XOD) enziminin CYN ile inhibisyonunun kinetiği .. 68
2.7.4. Pankreatik lipaz (PL) enziminin CYN ile inhibisyonunun kinetiği..... 70
2.8. İstatiksel Analiz 71
3. BULGULAR 72
3.1. *Caulerpa* Özütlerinin Enzim İnhibitörü Olarak Etkisinin Belirlenmesi 72
3.1.1. *Caulerpa* özütlerinin α-amilaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi..... 73
3.1.2. *Caulerpa* özütlerinin PLA_2 enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi..... 76
3.1.3. *Caulerpa* özütlerinin 15-LOX enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 77
3.1.4. *Caulerpa* özütlerinin MGL enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi..... 81
3.1.5. *Caulerpa* özütlerinin CAT enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi..... 83
3.1.6. *Caulerpa* özütlerinin SOD enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi..... 87
3.2. *C. prolifera* Türünden CYN'nin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu 88
3.2.1. CYN'nin H-NMR spektrumu 90
3.2.2. HPLC'de CYN analizi 92
3.2.2.1. CYN kalibrasyon grafiğinin oluşturulması.....92
3.2.2.2. *C. racemosa* ve *C. prolifera* türlerindeki CYN içeriğinin mevsimsel olarak belirlenmesi 96
3. 3. Çeşitli Enzimlerin CYN ile İnhibisyon Kinetiklerinin Belirlenmesi 100
3.3.1. α-amilaz-CYN inhibisyonunun kinetiği..... 100
3.3.2. LOX-CYN inhibisyonunun kinetiği..... 105
3.3.3. XOD-CYN inhibisyonunun kinetiği 109
3.3.4. PL-CYN inhibisyonunun kinetiği 114
4. TARTIŞMA..... 122
5. SONUÇ 134
6. KAYNAKLAR..... 135
ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Asn	Asparagin
$[E]_0$	Toplam enzim konsantrasyonu
ES	Enzim-substrat kompleksi
His	Histidin
IC_{50}	% 50 inhibisyon oluşturan konsantrasyon
K_I	İnhibitörün dissosiyasyon sabiti
K_M	Michaelis-Menten sabiti
$K_{M.app}$	İnhibitör varlığında gözlenen K_M
$[S]_0$	Başlangıç substrat konsantrasyonu
V_{max}	Maksimum reaksiyon hızı
$V_{max.app}$	İnhibitör varlığında gözlenen V_{max}
α	Alfa
ºC	Santigrad Derece

Kısaltmalar

2-AG	2-araşidonil gliserol
AA	Araşidonik asit
AEA	Araşidoniletanolamid
B. reticulatum	*Bittium reticulatum*
C. mexicana	*Caulerpa mexicana*
C. ollivieri	*Caulerpa ollivieri*
C. prolifera	*Caulerpa prolifera*
C. racemosa	*Caulerpa racemosa* var. *cylindracea*
C. scalpelliformis	*Caulerpa scalpelliformis*
C. sertularioides	*Caulerpa sertularioides*
C. taxifolia	*Caulerpa taxifolia*
C. veravelensis	*Caulerpa veravelensis*
CAT	Katalaz

$CDCl_3$	Dötero kloroform
$cPLA_2$	Hücre içi Ca bağımlı PLA_2
CYN	Caulerpenyne
DAD	Diode Array Detector
DMSO	Dimetilsülfoksit
DTNB	5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)
EA	Ellagik asit
EC	Enzyme Commission
FAAH	Yağ asidi amid hidrolaz
FAD	Flavin adenin dinükleotit
FIV	Feline Immunodeficiency Virus
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High-performance liquid chromatography
IS	İnternal standart
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
$iPLA_2$	Hücre içi Ca bağımsız PLA_2
kDa	Kilo Dalton
kat	Katal
L. lallemandii	*Lophocladia lallemandii*
LOX	Lipoksigenaz
MGL	Monoaçilgliserol lipaz
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
nkat	Nanokatal
NMR	Nuclear magnetic resonance
O. olivacea	*Oxynoe olivacea*
P. oceanica	*Posidonia oceanica*
PL	Pankreatik lipaz
PLA_2	Fosfolipaz A_2
p-NP	p-nitrofenol
p-NPP	p-nitrofenilpalmitat

ROS	Reaktif oksijen türleri
SEM	Standard error of mean
SI	Uluslarası birim sistemi
SOD	Süperoksit dismutaz
$sPLA_2$	Sekretuvar PLA_2
TLC	İnce tabaka kromatografisi
U	Unit
VAD	Valoneik asit dilakton
XDH	Ksantin dehidrogenaz
XOD	Ksantin oksidaz
XOR	Ksantin oksidoredüktaz
α-amilaz	alfa amilaz
β-amilaz	beta amilaz
γ-amilaz	gama amilaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Yeşil bitkilerin filogenetik incelemesi ve *C. taxifolia*'nın taksonomik pozisyonu (Madl ve Yip 2005) 2
Şekil 1.2. *C. taxifolia* (Cavas 2010) 4
Şekil 1.3. *C. taxifolia* türünün morfolojisi (Madl ve Yip 2005) 6
Şekil 1.4. *C. racemosa* var. *cylindracea* (Cavas 2010) 7
Şekil 1.5. *C. racemosa* türünün morfolojisi (Madl ve Yip 2005) 8
Şekil 1.6. *C. prolifera* (Cavas 2010) 9
Şekil 1.7. *C. scalpelliformis* (Madl ve Yip 2005) 10
Şekil 1.8. *C. ollivieri* (Hine ve Humm 1971) 11
Şekil 1.9. *C. racemosa* var. [*lamourouxii*] f. requienii (Montagne) Weber-van Bosse (Guiry 2011). 11
Şekil 1.10. *C. sertularioides* (Sweat 2009) 12
Şekil 1.11. *Lobiger serradifalci* (Cavas 2010) 14
Şekil 1.12. *Oxynoe olivacea* (Cavas 2010) 14
Şekil 1.13. CYN'nin molekül yapısı 15
Şekil 1.14. Esteraz enzimi varlığında CYN (1)'nin deasetilasyon basamakları (4: oksitoksin 1, 9: oksitoksin 2) (Jung vd 2002) 15
Şekil 1.15. Enzim mekanizmasının şematik gösterimi 22
Şekil 1.16. a.) Michaelis-Menten ve b.) Lineweaver-Burk grafikleri 28
Şekil 1.17. Kompetetif inhibisyon için şematize Lineweaver-Burk grafiği 30
Şekil 1.18. Unkompetetif inhibisyon için şematize Lineweaver-Burk grafiği 31
Şekil 1.19. Nonkompetetif inhibisyon için şematize Lineweaver-Burk grafiği 31
Şekil 1.20. Tükrük amilazı (Ramasubbu vd 1996) ve pankreas amilazının (Brayer vd 1995) üç boyutlu yapısı 33
Şekil 1.21. Soya fasülyesi lipoksigenaz enzimi ve aktif merkezinin üç boyutlu yapısı (Lipoxygenase structure 2010) 36
Şekil 1.22. PLA_2 enzim mekanizmasının şematik gösterimi (Andersson 2009) 38
Şekil 1.23. Fosfolipaz A_2 enzimi ve aktif merkezinin üç boyutlu yapısı (Guy vd 2009) 39
Şekil 1.24. İnsan gastrik lipaz enzimi (Roussel vd 1999) ve insan pankreatik lipaz-kolipaz kompleksinin (van Tilbeurgh vd 1992) üç boyutlu yapıları 40

Şekil 1.25. İnsan monoaçilgliserol lipaz enziminin üç boyutlu yapısı (Labar vd 2010) 42
Şekil 1.26. Sığır süt XOD enziminin üç boyutlu yapısı (Enroth vd 2000) 44
Şekil 1.27. İnsan eritrosit katalaz enziminin üç boyutlu yapısı (Safo vd 2001)..... 46
Şekil 1.28. İnsan SOD1 enziminin (Cao vd 2008) ve Cu,Zn-SOD aktif merkezinin üç boyutlu yapısı (Cu/Zn SOD 2010)..... 47
Şekil 1.29. SOD enziminin farklı isoform modelleri (PDB 2010) 47
Şekil 3.1. α-amilaz enzim aktivitesi tespiti için kalibrasyon grafiği 73
Şekil 3.2. *C. racemosa* ve *C. prolifera*'nın etanol, metanol ve DMSO özütlerinin α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi..... 74
Şekil 3.3. Cd^{2+} iyonunun α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi 75
Şekil 3.4. Saf CYN'nin α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi..... 76
Şekil 3.5. *C. racemosa* ve *C. prolifera*'nın DMSO özütlerinin PLA_2 enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlılığı 77
Şekil 3.6. *C. racemosa*'nın etanol ve metanol özütleri ile *C. prolifera*'nın metanol ve DMSO özütlerinin 15-LOX enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi .. 78
Şekil 3.7. *C. prolifera*'nın metanol ve DMSO özütlerinin 15-LOX enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlılığı..... 79
Şekil 3.8. 15-LOX enziminin inhibisyon değerinin (%) *C. prolifera* metanolik özütünün konsantrasyonuna bağlı değişimi 80
Şekil 3.9. *C. racemosa*'nın etanol, metanol ve DMSO özütlerinin MGL enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi 81
Şekil 3.10. *C. prolifera*'nın etanol, metanol ve DMSO özütlerinin MGL enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi 82
Şekil 3.11. Saf CYN'nin MGL enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlılığı 83
Şekil 3.12. *C. racemosa*'nın su özütünün CAT enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlı değişimi 84
Şekil 3.13. *C. racemosa*'nın etanol özütünün CAT enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlı değişimi..... 85
Şekil 3.14. *C. racemosa*'nın metanol özütünün CAT enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlı değişimi..... 85

Şekil 3.15. *C. racemosa*'nın su özütü ve saf suyun CAT enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi 86
Şekil 3.16. *C. racemosa*'nın etanol özütü ve saf etanolün CAT enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi 86
Şekil 3.17. *C. racemosa*'nın metanol özütü ve saf metanolün CAT enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi 87
Şekil 3.18. *C. racemosa*'nın su, etanol ve metanol özütlerinin SOD enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi 88
Şekil 3.19. Farklı yöntemlerle hazırlanmış *Caulerpa* özütleri 89
Şekil 3.20. Farklı yöntemlerle hazırlanmış *Caulerpa* özütleri ve saf CYN için TLC analiz sonuçları 90
Şekil 3.21. Saflaştırılan CYN için H-NMR spektrumu 91
Şekil 3.22. Saf CYN'nin HPLC kromatogramı 92
Şekil 3.23. 5 ppm CYN + 25 ppm IS örneği için HPLC kromatogramı 93
Şekil 3.24. 7,5 ppm CYN + 25 ppm IS örneği için HPLC kromatogramı 93
Şekil 3.25. 10 ppm CYN + 25 ppm IS örneği için HPLC kromatogramı 94
Şekil 3.26. 15 ppm CYN + 25 ppm IS örneği için HPLC kromatogramı 94
Şekil 3.27. 20 ppm CYN + 25 ppm IS örneği için HPLC kromatogramı 95
Şekil 3.28. 25 ppm CYN + 25 ppm IS örneği için HPLC kromatogramı 95
Şekil 3.29. CYN kalibrasyon grafiği 96
Şekil 3.30. Ekim 2009 ve Ocak 2010 örnekleri için CYN kalibrasyon grafiği 97
Şekil 3.31. Nisan 2010 ve Haziran 2010 örnekleri için CYN kalibrasyon grafiği 97
Şekil 3.32. *C. racemosa*'nın Haziran 2010 örnekleri için HPLC kromatogramı 98
Şekil 3.33. *C. racemosa* türünün CYN konsantrasyonunun mevsimsel değişimi 98
Şekil 3.34. *C. prolifera*'nın Nisan 2010 örnekleri için HPLC kromatogramı 99
Şekil 3.35. *C. prolifera* türünün CYN konsantrasyonunun mevsimsel değişimi 100
Şekil 3.36. α-amilaz enzim aktivitesinin tespiti için kalibrasyon grafiği 101
Şekil 3.37. Değişen konsantrasyonlarda CYN varlığında α-amilaz enzim aktivitesi (96 U/mL) için Lineweaver–Burk grafiği 101
Şekil 3.38. İnhibitör konsantrasyonunun $1/V_{max.app}$ ile değişim grafiği 103
Şekil 3.39. İnhibitör konsantrasyonunun $1/ K_{M.app}$ ile değişim grafiği 103

Şekil 3.40. Saf CYN'nin LOX enzim aktivitesi (167 U/mL) üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlılığı 105
Şekil 3.41. Değişen konsantrasyonlarda CYN varlığında soya fasülyesi lipoksigenaz enzim aktivitesi (167 U/mL) için Michaelis-Menten grafiği 106
Şekil 3.42. Değişen konsantrasyonlarda CYN varlığında soya fasülyesi lipoksigenaz enzim aktivitesi (167 U/mL) için Lineweaver–Burk grafiği 106
Şekil 3.43. İnhibitör konsantrasyonunun $1/V_{max.app}$ ile değişim grafiği 108
Şekil 3.44. İnhibitör konsantrasyonunun $1/K_{M.app}$ ile değişim grafiği 108
Şekil 3.45. Saf CYN'nin XOD enzim aktivitesi (10 U/L) üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlılığı 110
Şekil 3.46. XOD enziminin (10 U/L) değişen konsantrasyonlarda CYN varlığında reaksiyonu için Michaelis-Menten grafiği 111
Şekil 3.47. XOD enziminin (10 U/L) değişen konsantrasyonlarda CYN varlığında reaksiyonu için Lineweaver–Burk grafiği 111
Şekil 3.48. İnhibitör konsantrasyonunun $K_M/V_{max.app}$ ile değişim grafiği 113
Şekil 3.49. İnhibitör konsantrasyonunun $1/V_{max.app}$ ile değişim grafiği 113
Şekil 3.50. PL enzim aktivitesi için Lineweaver–Burk grafiği 115
Şekil 3.51. *O. olivacea*'de CYN'nin *in vivo* (LIP-2/LIP-1 yolu) ve *in vitro* (LIP-1/LIP-2 yolu) koşullarda oksitoksinlere dönüşüm mekanizması (Cutignano vd 2004) 116
Şekil 3.52. PL enziminin HPLC kromatogramı (10 mg/mL) 117
Şekil 3.53. 10 ppm CYN örneği için HPLC kromatogramı 118
Şekil 3.54. PL enzimi varlığında CYN'nin transformasyonu (0. dakika) 118
Şekil 3.55. PL enzimi varlığında CYN'nin transformasyonu (15. dakika) 119
Şekil 3.56. PL enzimi varlığında CYN'nin transformasyonu (30. dakika) 119
Şekil 3.57. PL enzimi varlığında CYN'nin transformasyonu (45. dakika) 120

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. *Caulerpa* türlerinin CYN içeriği 20
Çizelge 2.1. α-amilaz enzim aktivitesi ölçüm ortamının bileşimi 56
Çizelge 2.2. PLA_2 enzim aktivitesi ölçüm ortamının bileşimi 58
Çizelge 2.3. LOX enzim aktivitesi ölçüm ortamının bileşimi 59
Çizelge 2.4. MGL enzim aktivitesi ölçüm ortamının bileşimi 61
Çizelge 2.5. CAT enzimi – inhibitör sisteminin bileşimi 62
Çizelge 2.6. SOD enzimi – inhibitör sisteminin bileşimi 63
Çizelge 3.1. α-amilaz enziminin inhibisyonuna ilişkin kinetik veriler 102
Çizelge 3.2. Doğal kaynaklardan elde edilen bazı bileşenlerin α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin karşılaştırılması 104
Çizelge 3.3. LOX enziminin inhibisyonuna ilişkin kinetik veriler 107
Çizelge 3.4. Doğal kaynaklardan elde edilen bazı bileşenlerin LOX enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin karşılaştırılması 109
Çizelge 3.5. XOD enziminin inhibisyonuna ilişkin kinetik veriler 112
Çizelge 3.6. Doğal kaynaklardan elde edilen bazı bileşenlerin XOD enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin karşılaştırılması 114
Çizelge 3.7. PL enzimi varlığında CYN'nin transformasyonuna ilişkin veriler 120

1. GİRİŞ

1.1. *Caulerpa* Türlerinin Taksonomisi

ALEM: Protista (Raven vd 1992) veya bitkiler aleminde değerlendirilir.

ŞUBE: Chlorophyta (yeşil alg). Çeşitli karotenoidlere ek olarak klorofil a ve b'nin varlığı ile karakterize edilen tek ya da çok hücreli fotosentetik organizmaları kapsar.

SINIF: Ulvophycea. Bu, yeşil algler için tanımlanan 3 temel sınıftan biri olup, diğerleri ise Chlorophyceae ve Trebouxiophyceae'dir. Ulvophycea sınıfı, *Ulva* ve *Caulerpa* gibi iyi tanınan ve büyük çoğunluğu sıcak ve tropik deniz çevrelerinde bulunan türleri içerir. Buna karşın Chlorophyceae ve Trebouxiophyceae türleri neredeyse daima denizel olmayan organizmaları ihtiva etmektedir.

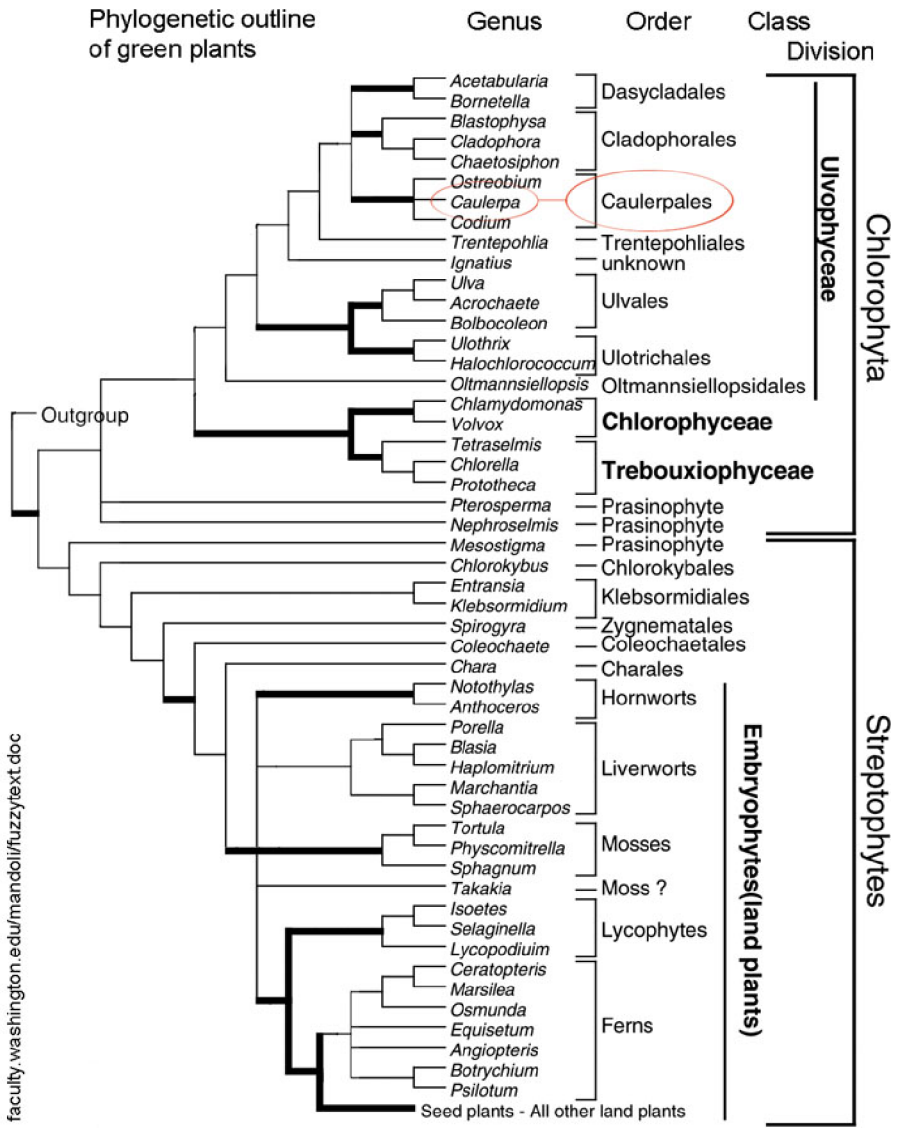
TAKIM: Caulerpales. Çok sayıda plastid ve çekirdek içeren tropikal makrofitleri içerir.

FAMİLYA: Caulerpaceae

CİNS: *Caulerpa*

TÜR: *C. taxifolia* (Madl ve Yip 2005)

Caulerpales ordosu içinde bulunan *Caulerpa* cinsi, tropik denizlerde geniş yayılım gösteren birçok tür içerir. Sifonlu yeşil algler arasında yer alan bu grubun üyeleri, sitoplazmalarında bir zarla çevrilmemiş olan çok sayıda çekirdek ve plastidleri bulundururlar. Görünüşleri ile yüksek bitkileri andıran bu canlıların hücre duvarları genellikle selüloza göre daha fazla ksilan içermekte olup, bu duvarın dayanıklılığı da çoklu aksiyal konstrüksiyonlar ile arttırılmıştır (Strassburger 1998, Madl ve Yip 2005). Şekil 1.1'de *Caulerpa taxifolia* (*C. taxifolia*) türünün yeşil bitkiler içindeki taksonomik pozisyonu gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Yeşil bitkilerin filogenetik incelemesi ve *C. taxifolia*'nın taksonomik pozisyonu (Madl ve Yip 2005)

1.2. Türkiye'deki *Caulerpa* Türleri

Ülkemizin de bir kıyısını çevreleyen Akdeniz, biyolojik çeşitlilik yönünden oldukça zengin bir yapıya sahiptir. Ancak balıkçılık, deniz trafiği vb insan faaliyetlerine ilaveten yayılımcı özellik gösteren çeşitli türlerin Akdeniz'e girmesi, mevcut ekosistemde değişikliklere neden olmakta ve pek çok canlı türünü yok ederek biyolojik çeşitliliği olumsuz yönde etkilemektedir. Akdeniz, sadece % 5'i bilinen türleri temsil etmek üzere yaklaşık 600 civarında yeni giriş yapan türe ev sahipliği yapmaktadır (Boudouresque vd

2005, Zenetos vd 2005, Klein ve Verlaque 2008). Yayılımcı özellikli türlerin yayılımlarının kontrolü ve önlenmesi oldukça ciddi bir problemdir ve ne yazık ki Akdeniz'de bu tür çalışmalar oldukça sınırlıdır.

C. taxifolia, Akdeniz'deki varlığı ile geniş kitlelerin dikkatini çeken ve bu büyük çaplı yayılımı önlemek amacıyla çeşitli uygulamaların hayata geçirildiği ilk makrofit türüdür. Akdeniz'deki istenmeyen bu istilayı önlemek amacıyla türün akvaryum ticareti yasaklanmış, her türlü medya aracı kullanılarak geniş bir bilgilendirme kampanyası başlatılmış, türle ilgili 7 kongre ve workshop düzenlenmiş, çok sayıda araştırma makalesi sonuçlandırılıp-yayınlanmış ve yayılımı önlemeye yönelik çeşitli programlar uygulamaya koyulmuştur. Hatta Avustralya, ABD ve İspanya'da bu konuda kanuni düzenlemeler getirilmiştir. Akdeniz'de yayılımı tespit edilen diğer bir *Caulerpa* türü de *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (*C. racemosa*)'dir. Bu tür de Akdeniz'de oldukça ciddi bir yayılım dinamiği sergilemesine karşın, toplumun hiçbir kesiminde bu tür *C. taxifolia*'nın çektiği dikkati çekememiş ve bu tür için yapılan çalışmalar çok daha sınırlı kalmıştır. *C. racemosa*, sadece *C. taxifolia* için düzenlenen konferanslarda yer bulmuş ve bu türün yayılımını önlemeye yönelik geniş kapsamlı bir çalışma yapılmamıştır (Klein ve Verlaque 2008).

Adını latince "Yatay Gelişen Gövde" anlamına gelen sözcükten alan Ulvophyceae sınıfına ait *Caulerpa* cinsi deniz alglerinin dünyada 85'e yakın türü bulunmaktadır (Guiry ve Guiry 2007, Klein ve Verlaque 2008). Ülkemiz kıyılarında *Caulerpa* genusuna ait 7 taksonun varolduğu belirtilmiştir: *C. ollivieri* Dostál (Akdeniz); *C. prolifera* (Forsskål) J.V. Lamouroux (Akdeniz ve Ege Denizi); *C. racemosa* (Forsskål) J. Agardh var. *racemosa* (Akdeniz ve Ege Denizi); *C. racemosa* var. *lamourouxii f. requienii* (Montagne) Weber-van Bosse (Akdeniz); *C. scalpelliformis* (Brown ex Turner) C. Agardh (Akdeniz); *C. sertularioides* (S.G. Gmelin) M. Howe (Marmara Denizi), *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (Sonder) Verlaque, Huisman, et Boudouresque (Caulerpales, Chlorophyta) (Ege Denizi ve Akdeniz) (Aysel vd 2001, Klein ve Verlaque 2008). Bu taksonlar dışında Akdeniz'de iki tür daha bulunmaktadır: *C. mexicana* Sonder ex Kützing ve *C. taxifolia* (Vahl) C. Agardh (Cirik ve Akçalı 2002, Cevik vd 2007).

1.2.1. *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh

Caulerpa türleri içinde en çok tanınanı *C. taxifolia* olup, bu tür medyada "Katil Yosun" olarak da bilinmektedir (Şekil 1.2). 1980'li yıllarda Stuttgart Deniz Akvaryumu'nda dekoratif amaçla kullanılan bu tür, daha sonra kültürü yapılmak üzere Monako Deniz Akvaryumu'na getirilmiş ve buradan kazara Akdeniz'e giriş yapmıştır (Madl ve Yip 2005). 1984 yılında Nice-Antipolis Üniversitesi'nden Meinesz, akvaryumun deniz altında kalan pencerelerinde türün varlığını tespit etmiştir (Meinesz ve Hesse 1991). Bu ilk gözlemde 1 m^2'lik alanda yayıldığı belirlenen alg; kısa bir sürede, taşıdığı özellikler nedeniyle hızla yayılmış ve Batı Akdeniz havzasında 6 ülkeyi (Monako, Fransa, İspanya, İtalya, Hırvatistan ve Tunus) etkisi altına almıştır (Meinesz vd 2001). Düşük ışık ve sıcaklığa karşı yüksek toleransa sahip olan bu türün, bünyesindeki caulerpenyne isimli terpenoid yapıdaki sitotoksik salgısı sayesinde yerel Akdeniz türlerine karşı çok iyi bir savunma oluşturduğu, böylece kısa bir sürede yayılım gösterdiği düşünülmektedir (McConnell vd 1982, Paul ve Fenical 1986, Boudouresque vd 1996, Pesando vd 1996, Cavas ve Yurdakoc 2005a, Cavas ve Yurdakoc 2005b). Türün global bir tehlike olduğu Amerika ve Avustralya kıtalarında da görülmesiyle açıkça ortaya çıkmıştır.



Şekil 1.2. *C. taxifolia* (Cavas 2010)

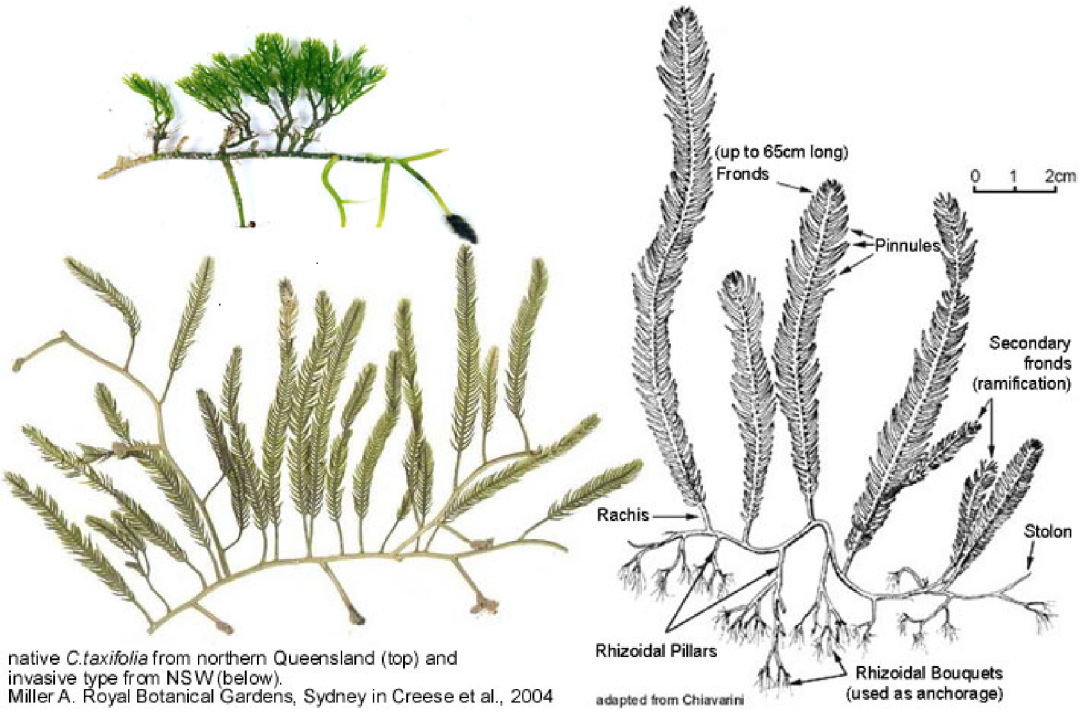
Bu tür; bulunduğu bölgelerde tür çeşitliliğini önemli ölçüde azaltarak, kıyı ekosistemini tehdit etmektedir. Akdeniz'deki *C. taxifolia* türünün sadece tomurcuklanma yolu ile ürediği rapor edilmiştir. Eşeysiz olarak üreyen bu türün

yayılımında, tallus bölgesinde meydana gelen parçalanmalar önemli bir yere sahiptir (Žuljevic ve Anatolic 2000). *C. taxifolia* frondları genellikle denizde oluşan dalga hareketleri ya da gemi çapaları, balıkçılık ve trolle avcılık gibi çeşitli insan faaliyetleri ile parçalanmaktadır (Sant vd 1996). Kopan parçalar, sürüklendikleri bölgelerde tekrar yetişip yeni koloniler oluşturabilmekte veya varolan kolonileri güçlendirebilmektedir (Smith ve Walters 1999).

C. taxifolia'nın Akdeniz'deki orjini üzerine literatürde iki tip hipotez bulunmaktadır. Birinci hipotez; lesepsiyen göçmen olan *Caulerpa mexicana*'nın Kızıldeniz'den göçü sonrasında *C. taxifolia*'ya metamorfozunu savunur (Meinesz 1999). İkinci hipotez ise *C. taxifolia*'nın Akdeniz'deki bir akvaryumdan kazara denize salındığını savunmaktadır (Meinesz ve Hesse 1991). Ulm Üniversitesinden Wiedenmann'ın dünyanın değişik kıyılarından toplanan *C. taxifolia* numuneleri üzerine yaptığı DNA analizleri ikinci hipotezi desteklemektedir. Wiedenmann'ın araştırmalarına göre Manly Limanı-Moreton Körfezi (Avustralya) numuneleriyle Akdeniz'deki akvaryum numunelerinin DNA analizleri büyük bir benzerlik göstermektedir. (Wiedenmann vd 2001).

Tür; ülkemizin İskenderun ve Yumurtalık kıyılarında da tespit edilmiş, ancak yapılan genetik incelemeler türün, Fransa kıyılarında yeralan yayılımcı *C. taxifolia* ile benzerlik taşımadığını ortaya koymuştur (Cevik vd 2007). Buna karşın, ülkemiz kıyılarına giriş yapan bu türün yayılımcı özelliğine yönelik herhangi bir araştırma bulunmamakta olup, bu tür de kıyılarımız için potansiyel bir tehdit unsuru olabilecek niteliktedir.

Morfolojik açıdan bitkinin tümü tallus olarak adlandırılmaktadır. *C. taxifolia*, yatay uzanan silindirik gövde ve filiz veren kısmından dikey olarak çıkan, yaprağa benzer yapılardan (frondlar) oluşmuştur (Şekil 1.3). Bileşik yaprak görünümündeki bu yapılar ışık koşullarına bağlı olarak farklı uzunluklarda (2-80 cm) olabilmektedir. Sığ sularda oldukça küçük olan bu uzunlukların, derin sularda geçerli olan düşük ışık koşulları ile baş edebilmek için arttığı rapor edilmiştir (Madl ve Yip 2005).



Şekil 1.3. *C. taxifolia* türünün morfolojisi (Madl ve Yip 2005)

1.2.2. *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (Sonder) Verlaque, Huisman, et Boudouresque (Caulerpales, Chlorophyta)

Caulerpa racemosa (*C. racemosa*) tropikal kuşaklardan ılık bölgelere dek yayılım gösteren yeşil bir deniz algidir (Verlaque vd 2003). *C. racemosa* Akdeniz'de ilk kez Tunus'un doğusundaki Sousse Limanında, Hamel (1926) tarafından tespit edilmiştir. Akdeniz'de üç farklı türde *C. racemosa*'nın varlığı rapor edilmiştir. Bunlar; kuzey Afrika kıyıları ve doğu Akdeniz'de bulunan *C. racemosa* var. *turbinata-uvifera*; doğu Akdeniz'de varlığı gözlenen *C. racemosa* var. *lamourouxii f. requienii* ve 1990'dan bu yana tüm Akdeniz'de yayılım gösteren *C. racemosa* türüdür (Verlaque vd 2000). 1990'lara kadar yayılımcı özellik göstermeyen bu türün, Lesepsiyen göçmen olduğu düşünülmüştür (Por 1978, Verlaque 1994). Fakat 1990'dan sonra, bilinmeyen bu *C. racemosa* türünün Akdeniz'de 13 ülke (Libya, İtalya, Yunanistan, Arnavutluk, Kıbrıs, Fransa, Türkiye, Malta, İspanya, Tunus, Hırvatistan, Cezayir ve Monako) ve bazı büyük adalara (Balearik adaları, Korsika, Girit, Kıbrıs ve Sicilya) yayılımı tespit edilmiştir (Verlaque vd 2003, Verlaque vd 2004, Ould-Ahmed ve Meinesz 2007, Klein

ve Verlaque, 2008). Atlantik'teki (Kanarya adaları) ilk gözlem de Verlaque ve arkadaşları tarafından rapor edilmiş ve *C. racemosa*'nın önlenemeyen bu yayılımı Akdeniz'de tarihte görülen en ciddi ekolojik sorunlardan biri olarak değerlendirilmiştir (Verlaque vd 2003, Verlaque vd 2004). Başlarda bu tür; *C. racemosa* var. *occidentalis*'e benzer bir tür olarak değerlendirilmiş olsa da, yapılan genetik analizler sonucunda *C. racemosa*'nın yayılımcı olan bu türünün, Avustralya orijinli *C. cylindracea* ile *C. racemosa*'nın oluşturduğu melez bir alt tür olduğu ortaya konmuş ve *C. racemosa* var. *cylindracea* (Sonder) Verlaque, Huisman, et Boudouresque (*Caulerpales, Chlorophyta*) (Şekil 1.4) olarak isimlendirilmiştir (Verlaque vd 2003). Bu türün yayılım hızının *C. taxifolia*'dan bile daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Meinesz vd 2001, Verlaque vd 2003). Gözlenen bu hızlı yayılım; üremenin yalnızca eşeysiz olarak değil, eşeyli olarak da gerçekleştirildiğinin göstergesidir (Panayotidis ve Žuljevic 2001). Bu türün yayılımı, özellikle *Posidonia oceanica* (*P. oceanica*) çayırlarının yaşam alanını yok etmek suretiyle, Akdeniz ekosistemini olumsuz yönde etkilemektedir (Ruitton vd 2005).



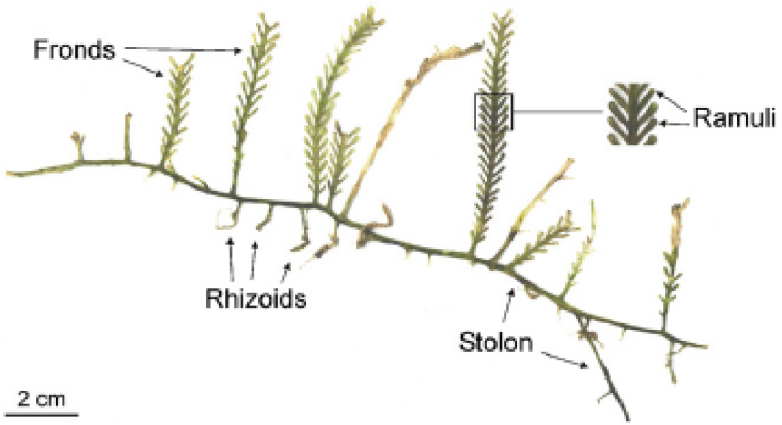
Şekil 1.4. *C. racemosa* var. *cylindracea* (Cavas 2010)

Akdeniz'de *C. racemosa'* nın başlıca dağılma nedenlerinin;

- ✓ Gemi balast suları,
- ✓ Balıkçılık aktiviteleri (trol ağlarının çekilmesi gibi)
- ✓ Dalış aktiviteleri,

- ✓ Küresel ısınma,
- ✓ Savunma mekanizmasının temelini oluşturan sekonder metabolit caulerpenyne'in varlığı olduğu düşünülmektedir.

C. racemosa, uzun stolonlara ve aşağı doğru yönelmiş rizoidlere sahiptir (Şekil 1.5). Rizoidlere zıt doğrultuda yer alan özelleşmiş bölgelerde fotosentez gerçekleşir (Madl ve Yip 2005).



Şekil 1.5. *C. racemosa* türünün morfolojisi (Madl ve Yip 2005)

1.2.3. *Caulerpa prolifera* (Forsskål) J.V. Lamouroux

Caulerpa prolifera (*C. prolifera*) yatay gelişen tallus üzerinde basit yaprak şeklinde gelişmiş kısımlarıyla tanınan bir yosundur (Şekil 1.6). Rizom (stolon), yaprak ve rizoid kısımlarından oluşmaktadır. Yapraklar genelde oval ya da uzun çizgisel görünümdedir (Dawes ve Rhamstine 1967). Rizomlar yatay olarak büyümeyi, rizoidler de geliştikleri alana tutunmayı sağlarlar (Dawes 1998). Bu tür, kopan yapraklardan ve rizomlardan kolayca rejenere olabilmektedir (Levi ve Friedlander 2004). Akdeniz için yerel bir tür olup yayılımcı bir özellik göstermemektedir.



Şekil 1.6. *C. prolifera* (Cavas 2010)

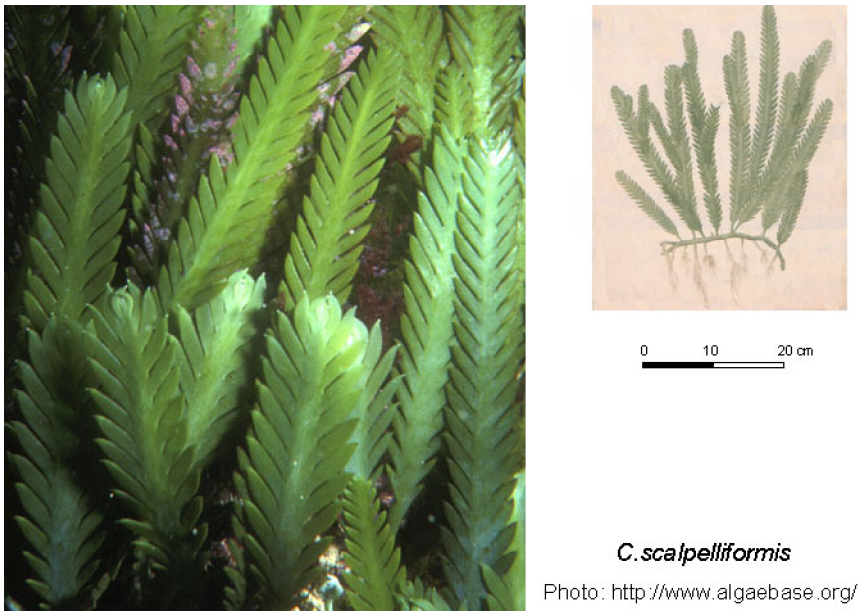
C. prolifera; su içinde dik pozisyonda çıkan, dallanmış uçları olan az sayıda ancak oldukça sağlam yapıda stolonlara sahiptir. Bu uçların en üst kısımları sindirim pigmentlerine ev sahipliği yapmaktadır. Bu tür; 15 cm'e kadar bir uzunluğa ve hatta bazı durumlarda 13 cm'lik genişliklere ulaşabilmektedir (Madl ve Yip 2005).

1.2.4. *Caulerpa scalpelliformis* (R. Brown ex Turner) C. Ag. var. *denticulata* (Dacaisne) Weber van Bosse (Caulerpaceae, Caulerpales)

Bir Indo-Pasifik tür olan *Caulerpa scalpelliformis* (*C. scalpelliformis*)'in Akdeniz'deki varlığı ilk defa 1930 yılında Hamel tarafından rapor edilmiştir (Hamel 1930). 1930 yılı öncesinde bu türe ilişkin Akdeniz'de herhangi bir kaydın olmaması ve türün Akdeniz'deki yayılımının Levanten çukuru ile sınırlı olması, bu türün Süveyş Kanalı yolu ile Akdeniz'e giriş yapmış bir Lesepsiyen göçmen olması olasılığını arttırmaktadır. Türün sıcak bölgeleri yaşam alanı olarak tercih etmesi, onun yayılımını biraz da olsa sınırlamakta, şu anda ülkemizin sadece Antalya kıyılarında var olduğu bilinmektedir (Ertan vd 1998).

C. scalpelliformis, yaklaşık 10-20 cm uzunluğunda düz frondlara sahiptir. Görünüşte *C. taxifolia*'ya oldukça benzer olan bu tür, başlangıçta düz sonlara doğru ise içe doğru kıvrılan frond uçları ile *C. taxifolia*'dan ayırt edilebilmektedir. Bu türü, *C. taxifolia*'dan

ayıran bir diğer önemli özelliği de frondu oluşturan yaprakçıkların oldukça keskin ve sivri uçlara sahip olmasıdır (Şekil 1.7) (Madl ve Yip 2005).

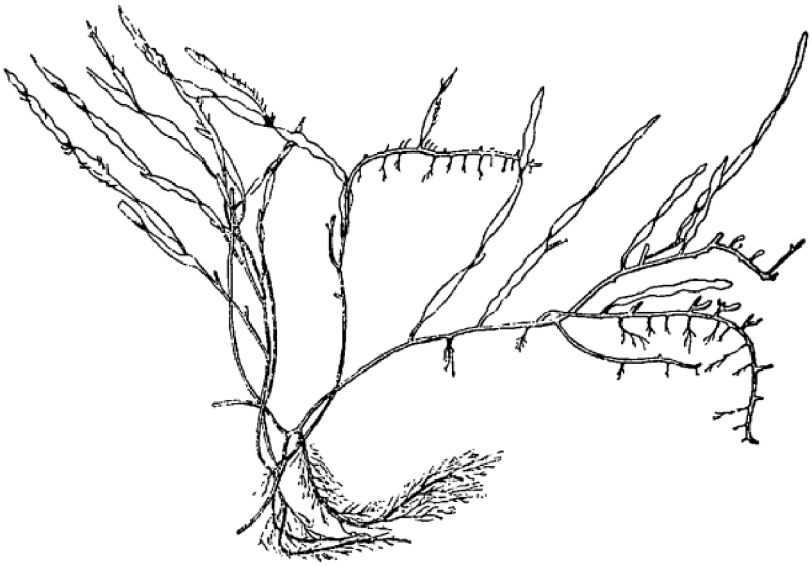


Şekil 1.7. *C. scalpelliformis* (Madl ve Yip 2005)

1.2.5. *Caulerpa ollivieri* Dostál

İlk kez Ollivier (1928) tarafından Fransa'nın güney kıyılarından toplanmıştır. Toplanan bu materyalin yeni bir tür mü, yoksa yaygın olarak bulunan *C. prolifera*'nın bir formu mu olduğunu belirlemek isteyen Dostál (1928), kültür ortamında bu materyali yetiştirmiş ve çeşitli özellikleri üzerine çalışmıştır. Kültür ortamında yetiştirilen bu materyalin morfolojik özellikleri Dostál'ı bu materyalin, yeni bir tür olduğuna ikna etmiş ve yapı *Caulerpa ollivieri* (*C. ollivieri*) olarak isimlendirilmiştir (Şekil 1.8).

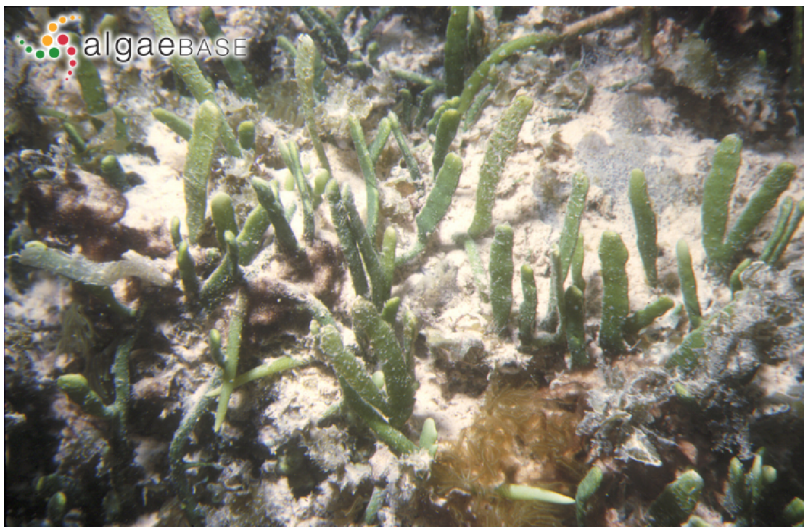
Tür; yüzey üzerinde yatay gelişen stolanlara, yüzeye dik uzanan fotosentetik frondlara ve aşağı doğru uzanan dallanmış, renksiz rizoidlere sahiptir. Küçük ince stolanların ve dik dallanmaların varlığı tür için ayırt edici bir özelliktir. Tür; yaygın bir tür olan *C. prolifera*'ya benzemekle birlikte boyutları, *C. polifera*'dan oldukça farklıdır. Türün stolon çapının 0,17-0,4 mm, frond uzunluğunun 4-10 mm ve frond genişliğinin 0,8-3,0 mm arasında değiştiği rapor edilmiştir (Hine ve Humm 1971).



Şekil 1.8. *C. ollivieri* (Hine ve Humm 1971)

1.2.6. *Caulerpa racemosa* var. [*lamourouxii*] f. *requienii* (Montagne) Weber-van Bosse

Verlaque vd (2000)'e göre Akdeniz'de bir arada yaşamlarını sürdüren üç farklı *Caulerpa racemosa* taksonundan biri *Caulerpa racemosa* var. [*lamourouxii*] f. *requienii* (Montagne) Weber-van Bosse'dir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. *C. racemosa* var. [*lamourouxii*] f. *requienii* (Montagne) Weber-van Bosse (Guiry 2011)

Bu türün Levanten çukurundaki varlığı, 1950'den bu yana bilinmektedir (Durand vd 2002). Tür; zemin üzerinde mavimsi yeşil bir çayır görünümünde yetişir. 3-4 mm kalınlığındaki stolonları yoğun olarak dallanmıştır. Frondları genellikle basit, dallanmamış ve 4-8 cm uzunluğundadır (Shafik ve Manawy 2008).

1.2.7. *Caulerpa sertularioides* (S.G.Gmelin) M.A.Howe

İsmini tüysü yapıdaki frondlarından alan *Caulerpa sertularioides* (*C. sertularioides*) türünde de yatay gelişen stolona dik olarak uzayan frondlar bulunmaktadır (Şekil 1.10). Yatayda gelişen stolon, 2-2,5 mm çapında ve 2 m uzunluğunda olabilir. Frondları 20 cm yüksekliğe ve 2 cm genişliğe kadar gelişebilirler (Littler ve Littler 2000). Uzun stolonların uçlarında yer alan rizoidler ise algin, geliştiği yüzeye tutunmasında görev alırlar (Sweat 2009).



Şekil 1.10. *C. sertularioides* (Sweat 2009)

1.3. *Caulerpa* Türlerinin Yayılımını Önleme Çalışmaları

Caulerpa türleri, toksik özelliklerinin yanı sıra *Posidonia* ve *Zostera* çayırları gibi Akdeniz ekosisteminin doğal bitki örtüsü üzerinde gelişebilme yetenekleri nedeniyle Akdeniz ekosistemi ve biyoçeşitliliği için bir tehdit olarak değerlendirilmektedir (Boudouresque vd 1996, Romero 1997). *Caulerpa* türlerinin tanınmasında büyük pay sahibi olan *C. taxifolia* ve *C. racemosa* var. *cylindracea*, Akdeniz'deki yayılımlarını hala büyük bir hızla sürdürmektedirler. Yayılımcı özellikli bu türlerin yayılımlarının engellenebilmesi için pek çok çalışma yapılmış olup, bunlardan bazıları aşağıda özetlenmiştir:

1.3.1. Elle toplama

Türlerin rejenerasyon özelliğinin yüksek olması nedeni ile elle toplama yöntemi sonuçsuz kalmıştır. Bunun nedeni kopan her bir parçadan, yeni bir bitkinin oluşmasıdır (Jaffrennou ve Odonne 1994, Escoubet vd 1998, Robert ve Gravez 1998).

1.3.2. Fizikokimyasal metotlar

- ✓ Siyah plastik torbalarla güneş almalarını engelleme
- ✓ $CuSO_4.5H_2O$ ilavesi
- ✓ Kuru buz
- ✓ Klorlama
- ✓ Algisid

Bu yöntemlerin hiç biri istenilen sonuca ulaşmayı sağlayamamıştır (Jaffrennou ve Odonne 1994, Escoubet vd 1998, Robert ve Gravez 1998).

1.3.3. Biyolojik savaş

Bu türlere karşı biyolojik savaşta *Caulerpa* türlerini tüketen bazı deniztavşanları gibi yumuşakçaların kullanılabileceği önerilmiştir. Yapılan çalışmalarda dört farklı Sacoglossans türünün, *Oxynoe olivacea*, *Oxynoe azuropunctata*, *Lobiger serradifalci* ve *Elysia subornata*, *C. taxifolia* ve *C. racemosa*'ya karşı biyolojik kontrol maddesi olarak potansiyelleri incelenmiştir (Meinesz vd 1996, Thibaut vd 1998, Thibaut ve Meinesz 2000, Thibaut vd 2001). Bu türlerden *Oxynoe azuropunctata* ve *Elysia subornata* tropikal kuzeybatı Atlantik'te yaşamakta ve *Caulerpa* türleri ile beslenmektedir. Yapılan laboratuar denemelerinde bu türlerin sıra ile günde 3-4,5 cm ve 5-6 cm *C. taxifolia* frondu tükettikleri, ancak Akdeniz'in kış koşullarında yaşayamadıkları rapor edilmiştir. Diğer taraftan Akdeniz türleri olan *Oxynoe olivacea* ve *Lobiger serradifalci*'nin doğal olarak *C. prolifera* ile beslendiği, fakat diğer ekzotik *Caulerpa* türlerini de besin olarak tüketmeye başladığı bilinmektedir (Madl ve Yip 2005). Zuljevic ve arkadaşları tarafından 2001 yılında sonuçlandırılan bir çalışmada

Lobiger serradifalci'nin (Şekil 1.11); *Caulerpa* türlerini küçük, kendini rejenere edebilecek parçalara ayırmak suretiyle yediği ve böylece bu türlerin yayılımını arttırıcı bir etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Zuljevic vd 2001).



Şekil 1.11. *Lobiger serradifalci* (Cavas 2010)

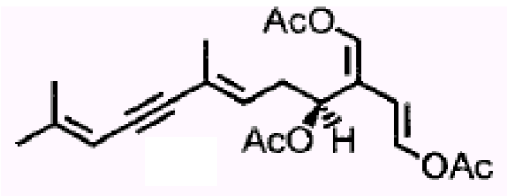
Oxynoe olivacea (Şekil 1.12) isimli deniztavşanının da *Caulerpa* türlerini delerek, çıkan hücre materyalini emdiği, ancak tüketimin yeterince hızlı olmadığı laboratuarımızda gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, biyolojik savaşta kullanılması önerilen türlerin *Caulerpa* yayılımını engellemede çok başarılı olamadığı söylenebilir.



Şekil 1.12 *Oxynoe olivacea* (Cavas 2010)

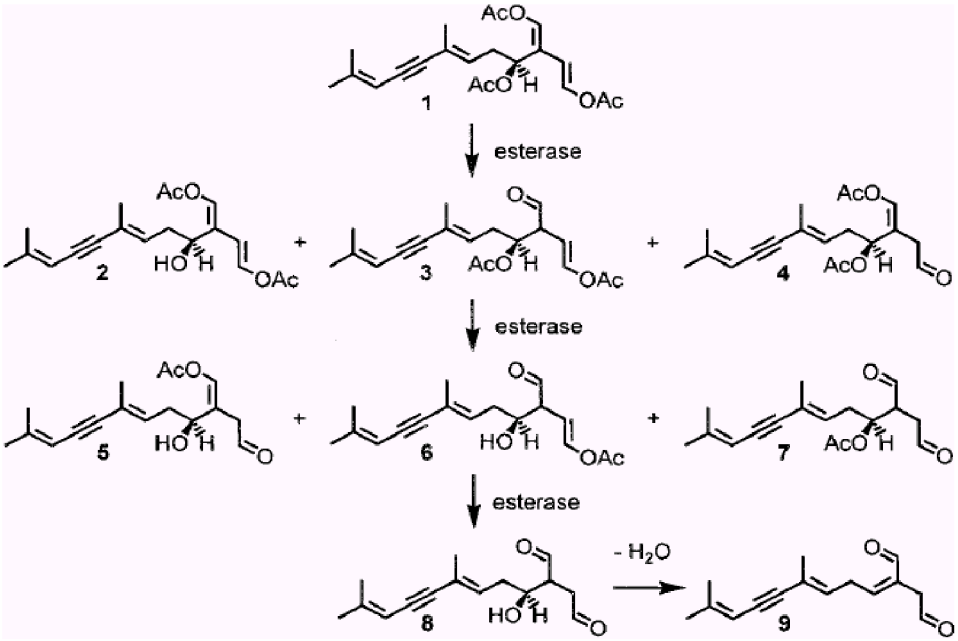
1.4. Caulerpenyne (CYN) Üzerine Yapılan Biyokimyasal Araştırmalar

Sifonlu yeşil algler arasında yer alan *Caulerpa* türleri, kendileri için tehdit oluşturabilecek otçul canlılardan korunabilmek amacıyla bazı kimyasal mekanizmalar geliştirmişlerdir. Terpenoid sınıfı bileşenler, bu tür kimyasal silahların başında gelmektedir ki bunlardan en önemlisi de seskiterpenoid yapıdaki caulerpenyne (CYN) isimli sekonder metabolittir (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. CYN'nin molekül yapısı

CYN, yapısındaki bis enol asetat grupları sayesinde antibiyotik aktivitesi göstermekte ve memeli hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluşturmaktadır (Paul ve Fenical 1986). Yapıdaki asetil grupları; yosun hücrelerinin koparılma, yaralanma gibi mekanik bir etki sonucunda hasar görmesi durumunda aktive olan esteraz enzimi tarafından parçalanmakta ve farklı türevleri oluşturabilmektedir. CYN'nin esteraz enzimi aktivitesiyle diğer bazı toksik metabolitlere dönüşümünü gösteren bu mekanizma, Almanya Friedrich-Schiller Üniversitesinden Prof. Dr. Georg Pohnert ve arkadaşlarınca aydınlatılmış ve Şekil 1.14'de gösterildiği şekilde özetlenmiştir.



Şekil 1.14. Esteraz enzimi varlığında CYN (1)'nin deasetilasyon basamakları (4: oksitoksin 1, 9: oksitoksin 2) (Jung vd 2002)

CYN'nin yapısında bulunan asetil gruplarından birinin esteraz enzimi tarafından parçalanmasıyla 2, 3 ve 4 nolu moleküller gibi üzerinde iki tane asetil grubu taşıyan 3 farklı olası ara ürün meydana gelebilir. Esterazlar bir sonraki aşamada yapıdaki 2 asetil grubundan birini daha koparark, tek asetil grubuna sahip 5, 6 ve 7 nolu molekülleri oluşturabilir. Oluşan tek asetil grubuna sahip bu yapılara esteraz enziminin bir kez daha etki etmesiyle 8 nolu yapı ve bu yapının dehidrasyonu sonucunda da çok daha toksik olan 9 nolu yapı oluşabilir. 4 ve 9 nolu yapılar 1 nolu yapıdan çok daha fazla toksik özellik taşımakta ve özellikle de balıklar üzerinde güçlü toksisite göstermektedir (Jung vd 2002).

Bugüne kadar *Caulerpa* türlerinde salgılanan seskiterpen yapıdaki CYN ve türevlerinin biyokimyasal öneminin ortaya konduğu çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Caulerpa salgılarının denizkestaneleri üzerindeki öldürücü etkisi ilk kez Boudouresque vd (1996) tarafından ortaya konmuştur. Grup; yapmış olduğu çalışmalarda, içinde *C. taxifolia* bulunan bir akvaryumda beslenen 5 denizkestanesinin 2 ay sonunda öldüğünü göstermiştir. *C. taxifolia* ile aynı akvaryumu paylaşan denizkestanelerinin bu yosuna dokunmaktansa kendi atıklarını yemeye başlamaları ve böylece kendilerini ölüme sevk etmeleri de not edilen bir diğer ilginç gözlemdir. Denizkestaneleri (*Paracentrotus lividus*) ile yapılan bir diğer çalışmada, doğal olarak *P. oceanica* ile beslenen sağlıklı bir tür, ters çevrilmiş ve bunun tekrar kendi doğal pozisyonuna dönmesinin 1 dakikadan az bir zaman aldığı gözlenmiştir. Oysa aynı işlem, yalnızca *C. taxifolia* ile beslenen türe yapıldığında, tekrar eski durumuna dönmesi 30 dakikada gerçekleşmiştir (Galgani vd 1996).

Fischel ve arkadaşları yaptıkları çalışmada CYN'nin antiproliferatif (çoğalmayı engelleyici) etkisini incelemişlerdir. Çalışmada medikal alanda kullanılmakta olan 6 ilaç ve CYN'nin insan orjinli 8 farklı kanser hücresi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda *in vitro* koşullarda CYN'nin farklı hücre kültürleri arasında bazı farklılıklar göstermekle birlikte çalışılan bütün hücreler üzerinde antiproliferatif aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Hatta bu çalışmada CYN'nin IC_{50} değerinin, ticari fotemustin ve cisplatin ile benzer olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bir hücrede CYN varken

hücre bölünmesine ait S fazının uyarıldığı ve premitotik G_2/M fazının inhibe edildiği de belirtilmiştir. Çalışmada CYN'nin antiproliferatif aktivitesinin doğrulanması için tümörlü hayvanlar üzerinde test edilmesi gerektiği de vurgulanmıştır (Fischel vd 1995).

Nicoletti ve arkadaşları tarafından CYN'in antiviral özelliklerinin saptanmasına ilişkin yapılan çalışmada, *C. taxifolia*'nın ham özütünün HIV (Human Immunodeficiency Virus) çalışmalarında model virüs olarak kullanılan FIV (Feline Immunodeficiency Virus) virüsü üzerindeki antiviral özelliği gösterilmiştir (Nicoletti vd 1999).

Barbier vd (2001), yaptıkları çalışmada CYN'nin neuroblastoma SK-N-SH hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışma sonucunda CYN'nin, zamana ve konsantrasyona bağlı olarak SK-N-SH hücre büyümesini inhibe ettiği ve kısa süreli bir etkileşimde bile bu hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında CYN ile 35 dakika inkübe edilmiş tubülin ve mikrotübül proteinlerinin (hücre içi iskelet yapısına katılan proteinler) polimerizasyonlarında inhibisyon gözlenmiş ve ayrıca CYN'nin tubülin agregasyonuna da neden olduğu ortaya konmuştur.

Cavas vd (2006), yaptıkları çalışmada *C. racemosa* özütü ile saf CYN'nin; iki tür neuroblastoma hücresi, SHSY5Y ve Kelly, üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik (kontrollü hücre ölümü) etkilerini incelemiştir. Çalışma sonucunda, *C. racemosa* özütü ile CYN'nin antiproliferatif ve apoptotik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, *C. racemosa* özütü ve CYN'nin bugün kullanılan kanser önleyici ilaçlarla karşılaştırıldığında, antitümör ilaçları için alternatif bir doğal kaynak olabileceği önerisinde bulunulmuştur.

Smyrniotopoulos ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *C. prolifera* özütünün antibakteriyal aktivitesi, tanımlanmamış 6 tür deniz bakterisinin büyüme hızı tespit edilmek suretiyle incelenmiş ve özütlerin bu bakterilerin büyümesinde inhibisyona neden oldukları rapor edilmiştir (Smyrniotopoulos vd 2003).

Ghosh vd (2004) *C. racemosa*'nın sıcak su özütünden izole edilen sülfatlanmış polisakkarit bileşenlerinin herpes simplex virüsüne karşı etkisini incelemişler ve bu bileşenin *in vitro* koşullarda anti-herpetik aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Sınırlı sayıda da olsa, bilimsel literatürde CYN'nin enzim inhibitörü olarak potansiyelinin değerlendirildiği bazı çalışmalar da yer almaktadır. Mayer vd (1993) yaptıkları çalışmada 21 farklı alg türünden 29 farklı bileşen izole etmiş ve bu bileşenlerin PLA_2 enzimi inhibisyon etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada CYN ve türevlerinin de PLA_2 enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiş ve *C. prolifera*'dan izole edilen CYN'nin iyi bir inhibitör (% 92 inhibisyon) olduğu gösterilmiştir.

Ninomiya vd (1998) 12-LOX enziminin aktivitesini inhibe eden *C. taxifolia*'nın etil asetat ekstraktında inhibisyondan sorumlu aktif bileşenin CYN'nin bir türevi olduğunu rapor etmişlerdir.

Bitou vd (1999) tarafından yapılan çalışmada 54 farklı türdeki deniz alginin metanol ve etil asetatla hazırlanan özütlerinin lipaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi incelenmiştir. *C. taxifolia*'nın her iki çözücüyle hazırlanan CYN özütünün de oldukça iyi bir lipaz inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Çalışmada ayrıca CYN'nin plazma triaçilgliserol (TG) düzeyi üzerine bir etkisinin var olup-olmadığı da değerlendirilmiştir. Bu amaçla yetiştirilen 2 grup sıçanın; kontrol grubu yalnızca mısır yağı ile beslenirken, diğer grup CYN içeren mısır yağı ile beslenmiş ve CYN varlığında plazma TG düzeyinin düştüğü tespit edilmiştir.

Tunus kıyılarından toplanan 7 farklı alg türünün etanol ile hazırlanan özütlerinin gastrik ve pankreatik lipaz enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi Rebah vd (2008) tarafından yürütülen çalışmada incelenmiştir. İncelenen türlerden *C. prolifera* özütünün yaklaşık 1 saatlik inkubasyon sonucunda her iki enzimde de yüksek oranda (% 100) inhibisyon gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen verilere dayanarak grup, *C. prolifera*'nın antiobezite ilaçlarının üretiminde kullanılabilecek potansiyel bir materyal olduğu önerisinde bulunmuştur.

Teixeira ve arkadaşları 2007 yılında yayınladıkları kısa bir raporla *C. racemosa*'dan elde edilen ham aseton özütünün α-amilaz enzimini inhibe ettiğini göstermiştir (ED_{50}: 0,09 mg/mL). Çalışma sonucunda *C. racemosa* özütünün, hiperglisemi tedavisinde kullanılan bileşikler için yol gösterici bir bileşen olabileceği vurgulanmıştır (Teixeira vd 2007).

CYN sekonder metabolitinin, *Caulerpa* türleri içerisinde en fazla *C. taxifolia* tarafından salgıladığına yönelik bulgular vardır. *C. taxifolia* frondunun yaş ağırlığının ilkbaharda % 0,2'sini ve yaz aylarında % 13'ünü CYN isimli bu sitotoksik madde oluşturmaktadır (Amade vd 1994).

Jung vd (2002) yaptıkları çalışmada çeşitli *Caulerpa* türlerindeki CYN miktarını, zedelenmemiş taze algin g ağırlığı başına mg CYN olarak belirlemiş ve birbirleriyle karşılaştırmıştır. Bu çalışmada 1 g alg materyali; sıvı azotla muamele edilip, öğütülmüş ve daha sonra içerisinde 1 mg/mL 4-metoksiasetofenon internal standart maddesi bulunan 1 mL etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Sonuçlar; *C. racemosa*'ya kıyasla, *C. taxifolia* ve *C. prolifera*'nın yaklaşık 2 kat daha fazla CYN içerdiğini göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada CYN tayini için önerilen yöntemin, daha önce bu amaçla kullanılan geleneksel metanolik ekstraksiyon (Amade ve Lemée 1998) yöntemine göre daha etkin olduğu da belirlenmiştir.

Araştırma grubumuzca tamamlanan 109T512 nolu TÜBİTAK projesinde de *C. racemosa* ve *C. prolifera* türlerinin CYN içeriği sezonal olarak tayin edilmiştir. Sonuçlar; *C. racemosa*'nın CYN düzeyinin yaz sezonunda maksimum düzeye ulaştığını göstermektedir. Öte yandan, *C. prolifera* türünün CYN düzeyinin sezonal değişiminde düzenli bir artış ya da azalış gözlenmemiştir. En yüksek CYN düzeyi ilkbahar sezonunda gözlenirken, en düşük CYN düzeyi ise kış sezonunda saptanmıştır.

Caulerpa türlerindeki CYN miktarının tespitine yönelik olarak literatürde yer alan çalışmaların sonuçları genel olarak Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. *Caulerpa* türlerinin CYN içeriği

Kaynak	*Caulerpa* türleri	CYN miktarı	Sezon ve bölge verileri
Amico vd 1978	*C. prolifera*	Kuru kütlenin % 0,35'i	Akdeniz
Meyer ve Paul 1992	*C. racemosa* frondları	Kuru kütlenin % 0,5'i	Guam (Pasifik okyanusu)
Meyer ve Paul 1992	*C. racemosa* frondları	Kuru kütlenin % 0,75'i	Bahama adaları
Amade ve Lemée 1998	*C. taxifolia* frondları	5±0,1 mg/mL	Fransa, Cap Martin, yaz ve sonbahar
Amade ve Lemée 1998	*C. taxifolia* stolonları	4,7±0,1 mg/mL	Fransa, Cap Martin, yaz ve sonbahar
Amade ve Lemée 1998	*C. taxifolia* frondları	4,4±0,1 mg/mL	Fransa, Cap Martin, kış ve ilkbahar
Amade ve Lemée 1998	*C. taxifolia* stolonları	4,3±0,1 mg/mL	Fransa, Cap Martin, kış ve ilkbahar
Jung vd 2002	*C.racemosa*	3 mg/g	Fransa, yaz sonu
Jung vd 2002	*C. prolifera*	6 mg/g	Fransa, yaz sonu
Jung vd 2002	*C. taxifolia*	6 mg/g	Fransa, yaz sonu

Bu çalışmalarda farklı habitatlardan ve farklı canlı etkileşimleri arasından toplanan alg örneklerinin kullanılmış olması, kullanılan deneysel yöntemlerin, çalışılan sezonların vb birbirinden farklı olması nedeniyle sonuçların karşılaştırılması çok uygun değildir. Bu durum Klein ve Verlaque tarafından 2008 yılında yapılmış çalışmada da dile getirilmiştir. Örneğin Jung vd (2002) *C. racemosa*'nın CYN içeriğinin (3 mg/g taze ağırlık), *C. taxifolia* ve *C. prolifera*'nın (6 mg/g taze ağırlık) CYN içeriğinin yaklaşık yarısı kadar daha az olduğunu rapor etmiş; buna karşın Dumay vd (2002) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise *C. racemosa*'nın, *C. taxifolia*'dan gram kuru ağırlık başına daima 35 - 80 kez daha az CYN'e sahip olduğu belirtilmiştir. Klein ve Verlaque (2008)'a göre, birinci çalışmada yaz boyunca güney Fransa kıyılarından toplanan ve daha sonra akvaryumda yetiştirilen materyal kullanılmıştır (Jung vd 2002), oysa ikinci çalışmada farklı interspesifik rekabet düzeyleri altında ve farklı sezonlarda Leghorn (İtalya)'dan toplanan materyalde direk analiz yapılmıştır (Dumay vd 2002). Dolayısıyla grup; bu iki çalışmada çok farklı deneysel yaklaşımların ve farklı ölçü birimlerinin kullanılmış olması nedeniyle karşılaştırma yapmanın uygun olmayacağını rapor etmiştir (Klein ve Verlaque 2008).

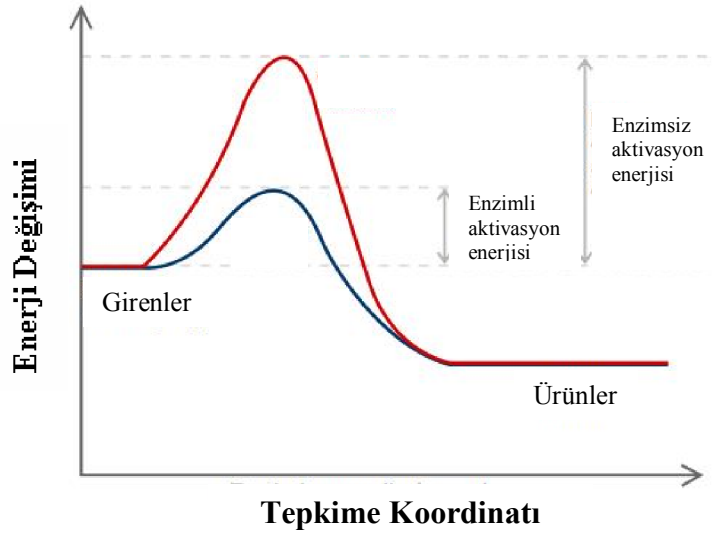
Daha önce de belirtildiği gibi CYN salgısı, aslında türün kendini diğer canlılara karşı savunmasında da önemli bir yere sahiptir. Bu salgının bulunduğu türün lezzeti üzerindeki olumsuz etkisi nedeniyle pek çok canlı, CYN içeren türleri besin olarak tüketmeyi tercih etmemektedir. Bu nedenle sucul ekosistemde *Caulerpa* türlerinin yayılımını engelleyecek predatörlere çok rastlanmamaktadır. Ayrıca CYN'nin güçlü bir yara kapatma özelliği de bulunmaktadır. Böylece *Caulerpa* türlerinde oluşabilecek herhangi bir fiziksel hasar ve parçalanmadan sonra, ilgili bölge CYN türevlerinin yapıdaki aminoasitlerle yapacağı kovalent bağ sonucunda oluşan tıpa ile kapatılacak ve sonuç olarak sitoplazmanın dışarı akarak canlının ölmesi engellenecektir. *Caulerpa* türlerinde olası hasarlardan sonra yaraların iyileşmesi oldukça etkindir ve proteinimsi kabukların oluşumu ile sitoplazmanın yaralı bölgeden çekilmesi saniyeler içinde gerçekleşmektedir (Dreher vd 1978, Jung vd 2002). Yayılımda önemli olduğu düşünülen parametrelerden biri de bu türlerin çevresel stres koşullarına karşı oldukça güçlü bir direnç sergileyebiliyor olmasıdır. Stres koşulları altında, reaktif oksijen türlerinin (ROS) normal üretimi, hücrelerde ciddi hasarlar oluşturabilecek düzeylere kadar artar. ROS ile baş edebilmek için hücreler; oksijen radikalini, su ve moleküler oksijene dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimlerinden oluşan bir antioksidan sisteme sahiptirler. Akdeniz makrofitleri ile karşılaştırıldığında, *C. racemosa*'da daha yüksek düzeyde SOD ve CAT enzim aktivitesi gözlenmiştir ki bu durum, *C. racemosa*'nın çevresel stresle baş edebilmek için daha yüksek bir kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir (Cavas ve Yurdakoc, 2005a).

Sonuç olarak, *Caulerpa* türlerinin yayılımında CYN içeriğinin önemi üzerine farklı görüşler bulunsa da "CYN içeriği, türün yayılım başarısını tek başına açıklayamamakla birlikte bu salgının varlığı gerek türün herbivorlarca tüketimini azaltması gerekse oluşan hasar sonrası tamir mekanizmasını hemen devreye sokması nedeniyle yayılımda önemli bir parametredir" genellemesine ulaşılabilir. Raniello vd (2007) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları da bu genellemeyi destekler niteliktedir. Bu çalışmada *C. racemosa*'dan izole edilen CYN'nin doğada genellikle *Caulerpa* ile birlikte bulunan doğal deniz bitkisi *Cymodocea nodosa*'nın yaprak dokusu üzerinde fitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Araştırma sonucunda *C. racemosa*'nın, deniz bitkileri gibi

doğal makrofitlerle başarılı bir şekilde yarışmasında CYN'nin olası bir allelopatik aktivitesinin rol oynuyor olabileceği önerilmiştir.

1.5. Enzimler

Kimyasal reaksiyonları genelde hızlandıran bileşiklere **katalizör** denir. Enzimler pek çok spesifik fonksiyonu gerçekleştirmek üzere hücreler tarafından sentezlenen büyük ve kompleks yapılı organik moleküllerdir. Yalnızca canlılar tarafından doğal olarak sentezlenen bu biyolojik katalizörler, hücrelerde meydana gelen pek çok reaksiyonun hızını ve spesifikliğini düzenlerler (Şekil 1.15).



Şekil 1.15. Enzim mekanizmasının şematik gösterimi

1.5.1. Enzimlerin yapısı

Protein yapısında olan her bir enzimin aminoasit dizilimi kendisine özgüdür. Enzimlerin bir kısmı yalnızca proteinlerden, bir kısmı da protein ve koenzimlerden oluşmuştur. Enzimlerin protein kısmına apoenzim adı verilir. Bu kısım enzimin hangi maddeye etki edeceğini saptar. Apoenzim kısmı katalitik olarak aktif ya da inaktif olabilir.

Birçok enzimin katalitik etki gösterebilmesi için ise metal iyonuna ya da organik bir bileşiğe ihtiyacı vardır. Bu iyon veya bileşiğe genel olarak kofaktör adı verilir. Bu kısım kimyasal etkinlik merkezidir, protein kısmı da yine spesifiklikten sorumludur. Böylece aynı kofaktör, farklı proteinlerle birleşerek farklı enzimleri meydana getirebilir. Organik bileşik; enzimin protein kısmı ile oldukça sıkı birleşmiş ve ayrılmıyorsa prostetik grup, çok sıkı birleşmemiş ve ayrılabiliyorsa koenzim adını alır. Koenzim kısmı, protein kısmına göre çok daha küçük moleküllü bir kısımdır. Enzimde esas işi yapan bu kısım bünyesinde birçok vitamini (tiamin, niasin, riboflavin vb) bulundurur (Telefoncu 1992).

1.5.2. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler katalizledikleri reaksiyonun türüne bağlı olarak International Union of Biochemistry and Molecular Biology – Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği - (IUBMB) tarafından başlıca 6 gruba ayrılmışlardır. Bu gruplar;

- ***Oksidoredüktazlar:*** Yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- ***Transferazlar:*** Fonksiyonel grupların transfer reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- ***Hidrolazlar:*** Hidrolitik reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
- ***Liyazlar:*** C-C, C-O ve C-N arasındaki bağların hidroliz ve oksidasyon dışında bir yolla kırılması veya bu atomlar arasına bir çift bağ ilave edilmesi reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- ***İzomerazlar:*** Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri, yani izomerleşme reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- ***Ligazlar (Sentetazlar):*** C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bir bağ oluşmasını sağlayan enzimlerdir (Telefoncu 1992).

IUBMB komitesine göre her enzim bir EC (Enzyme Commission) numarası ile ifade edilir. Örneğin, EC 1.11.1.6 "katalaz" da birinci numara sınıfını, ikinci numara alt sınıfını, üçüncü numara grubunu, dördüncü numara da kendine özgü sıra numarasını verir. (Ophardt 2006).

1.5.3. Enzim aktivitesi

Belirli pH, sıcaklık ve iyon şiddeti koşullarında; birim zamanda 1 mol substratı dönüşüme uğratan enzim miktarı, enzim aktivitesi olarak ifade edilir (Elliott ve Elliott 2001).

Uluslararası birim sisteminde (SI) tanımlanan katal (kat), 1 saniyede dönüşüme uğratılan substratın mol miktarıdır. Bu birim oldukça büyük olup, pratik uygulamalarda daha çok mikro ya da nanokatal olarak kullanılır.

1960'da Uluslararası Birim olarak kabul edilen ve hala geniş ölçüde kullanılan Unit (U) ise 1 dakikada dönüşüme uğratılan substratın mikromol miktarıdır. Bu birimler arasında 1U = 16,67 nkat tanımlaması yapılabilir (Telefoncu 1992).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan bir diğer birim de spesifik aktivite olup, 1 mg toplam protein tarafından 1 dakikada dönüşüme uğratılan mikromol substrat miktarı olarak tanımlanır.

1.5.3.1. Enzim aktivitesine etki eden faktörler

- **Substrat konsantrasyonu**

Diğer tüm koşullar sabit tutulursa, reaksiyon hızı artan substrat konsantrasyonuna bağlı olarak artar. Artan substrat konsantrasyonu ile birlikte reaksiyon hızındaki artış giderek azalarak, sonuçta bir maksimum değere ulaşır. Bu andan itibaren substrat konsantrasyonundaki artış, reaksiyon hızını etkilemez.

- **Sıcaklık**

Genellikle kimyasal reaksiyonların hızı, sıcaklık arttıkça moleküllerin kinetik enerjilerinin artışına bağlı olarak artar. Enzimatik reaksiyonlarda da optimum sıcaklığa ulaşılıncaya kadar hız, sıcaklık arttıkça artar. Bu değerin üzerinde ise enzimin konformasyonel yapısı bozulacağından, substrata olan ilgisi azalır ve sonuç olarak da

hız düşer. Belirli bir sıcaklık değerinin üzerinde ise sıcaklık artışı, enzimde denatürasyona neden olur.

- **pH**

Enzimler pH değişimine karşı çok duyarlıdırlar. Genellikle çok fazla asidik ya da bazik ortamda etkinlik gösteremezler. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği pH değerine, optimum pH denir.

- **Tuz konsantrasyonu**

Her enzimatik kataliz reaksiyonu için bir optimum tuz konsantrasyonu değeri mevcuttur. Çok düşük ya da yüksek tuz konsantrasyonu değerleri, enzim denatürasyonuna neden olacağı için aktiviteyi etkiler.

- **Aktivatör ve inhibitör varlığı**

Enzim molekülüne etki ederek aktivitesini arttıran maddelere aktivatör, azaltan maddelere ise inhibitör adı verilir. (Catalase 2006).

1.5.4 Enzim kinetiği - Michaelis-Menten mekanizması

Michaelis-Menten mekanizması, biyokimyada önemli bir yere sahip olan enzim kontrollü reaksiyonlar için oluşturulmuş bir modellemedir (Atkins ve Paula 2006). Reaksiyon hızının enzim ve substrat konsantrasyonlarına bağlılığını gösterir.

Enzim kinetiğiyle ilgili deneysel çalışmalar; içerisinde çok düşük konsantrasyonlarda enzim bulunan çözeltideki, ürün oluşumunun başlangıç hızının izlenmesiyle yürütülür.

Pek çok enzim katalizli reaksiyonun temel özellikleri şu şekilde ifade edilebilir:

1. Verilen başlangıç substrat konsantrasyonunda, $[S]_0$, ürün oluşumunun başlangıç hızı; toplam enzim konsantrasyonu, $[E]_0$, ile doğru orantılıdır.

2. Verilen enzim konsantrasyonu, $[E]_0$, ve düşük substrat konsantrasyonu, $[S]_0$, değerlerinde ürün oluşum hızı; substrat konsantrasyonu, $[S]_0$, ile doğru orantılıdır.
3. Verilen enzim konsantrasyonu, $[E]_0$, ve yüksek substrat konsantrasyonu, $[S]_0$, değerlerinde ise ürün oluşum hızı; substrat konsantrasyonundan, $[S]_0$, bağımsız olarak bir maksimuma ulaşır. Bu değer maksimum hız olarak adlandırılır (υ_{max}) (Atkins ve Paula 2006).

Michaelis-Menten mekanizması, bu özelliklerin sebebini açıklar. Bu mekanizmaya göre, reaksiyonun birinci basamağında bir enzim-substrat kompleksi, ES, oluşur. Bu kompleks daha sonra ya tekrar enzim ve substratı oluşturmak üzere parçalanır, ya da ürün oluşumu sağlanır.

$$E + S \rightarrow ES \qquad \upsilon = k_a.[E][S]$$

$$ES \rightarrow E + S \qquad \upsilon = k_a'.[ES]$$

$$ES \rightarrow E + Ü \qquad \upsilon = k_b.[ES]$$

Bu mekanizmaya göre, ürün oluşum hızı aşağıda verilen Michaelis-Menten eşitliği ile ifade edilir:

$$\upsilon = \frac{k_b[E]_0}{1 + \frac{K_M}{[S]_0}} \tag{1}$$

$$K_M = \frac{k_a' + k_b}{k_a} \quad \text{(Michaelis sabiti)}$$

K_M değeri, belli bir substrata etki eden enzim için karakteristiktir. Bu nedenle farklı enzimlerin, substratlarına olan ilgilerinin karşılaştırılmasında K_M değerinden yararlanılabilir. Yüksek Michaelis sabiti, enzimin o substrata ilgisinin yüksek olmadığını gösterir. Birçok enzim için K_M değeri, 10^{-4} – 10^{-6} aralığında yer alır (Elliott ve Elliott 2001).

Michaelis-Menten eşitliği $[S]_0 << K_M$ iken aşağıdaki şekilde düzenlenir ve hız substrat konsantrasyonu, $[S]_0$, ile orantılıdır:

$$\upsilon = \frac{k_b}{K_M} \cdot [S]_0 \cdot [E]_0 \tag{2}$$

$[S]_0 >> K_M$ iken hız, maksimum değerine ulaşır ve substrat konsantrasyonundan, $[S]_0$, bağımsızdır:

$$\upsilon = \upsilon_{max} = k_b \cdot [E]_0 \tag{3}$$

1 nolu denklemde υ_{max} değeri yerine koyulursa, aşağıdaki eşitlik elde edilir:

$$\upsilon = \frac{\upsilon_{max}}{1 + \frac{K_M}{[S]_0}} \tag{4}$$

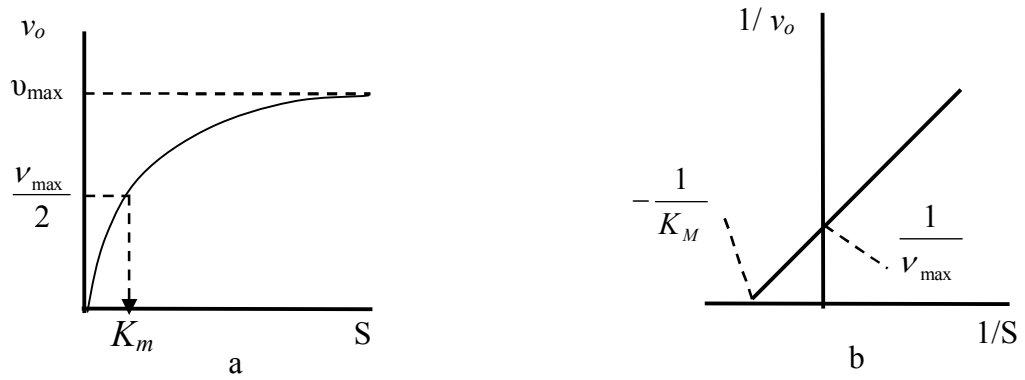
Bu eşitlik düzenlenerek yaygın olarak kullanılan Michaelis-Menten denklemi elde edilir:

$$\upsilon = \frac{\upsilon_{max} \cdot [S]_0}{K_M + [S]_0} \qquad \text{(Michaelis-Menten Denklemi)} \tag{5}$$

Bu ifade, lineer regresyondan yararlanılarak veri analizi için daha uygun olan bir forma dönüştürülebilir:

$$\frac{1}{\upsilon} = \frac{1}{\upsilon_{max}} + \left(\frac{K_M}{\upsilon_{max}}\right) \cdot \frac{1}{[S]_0} \qquad \text{(Lineweaver-Burk Denklemi)} \tag{6}$$

Lineweaver-Burk grafiği; 1/υ değerine karşılık $1/[S]_0$ değerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir (Şekil 1.16). Bu grafikte eğim K_M / υ_{max}'ı, y ekseninin kesim noktası 1/ υ_{max}'ı, ve x ekseninin kesim noktası da $-1/K_M$'i verir (Atkins ve Paula 2006).



Şekil 1.16. a.) Michaelis-Menten ve b.) Lineweaver-Burk grafikleri

k_b değeri, y ekseninin kesim noktası ve $\upsilon_{max} = k_b \cdot [E]_0$ eşitliğinden yararlanılarak hesaplanabilir. Bununla birlikte grafik; K_M eşitliğinde yer alan k_a ve k_a' sabitlerini vermez (Atkins ve Paula 2006).

1.5.5. Enzim inhibisyonu

Enzim inhibisyonu, tersinir ya da tersinmez olmak üzere iki şekilde gerçekleşebilir. Tersinmez inhibisyonda genellikle inhibitör madde, enzim molekülü ile kimyasal reaksiyona girerek yapı değişimine neden olur. Buna karşın tersinir inhibisyonda ise, inhibitör madde; enzim molekülüne ya da enzim substrat kompleksine kovalent bağ oluşumu dışında, farklı etkileşimlerle bağlanır. Bu nedenle uygun koşullarda inhibisyon geri döndürülebilir.

1.5.5.1. Tersinir inhibisyon

İnhibitörün, enzime bağlanması H- bağları, elektrostatik ya da hidrofobik etkileşimlerle gerçekleştirilir. Enzim inhibisyonuna ilişkin genel kinetik şema;

$$E + S \rightarrow ES \qquad \upsilon = k_a.[E][S] \tag{7}$$

$$ES \rightarrow E + S \qquad \upsilon = k_a^{'}.[ES] \tag{8}$$

$$ES \rightarrow E + \ddot{U} \qquad \upsilon = k_b\ .[ES] \tag{9}$$

$$EI \leftrightarrow E + I \qquad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \tag{10}$$

$$ESI \leftrightarrow ES + I \qquad K_I^{'} = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \tag{11}$$

K_I ve K_I' ne kadar küçük olursa, inhibitör de o kadar etkili olur (Atkins ve Paula 2006).

İnhibitör varlığında reaksiyonun hızı, aşağıdaki eşitlikle ifade edillir:

$$\upsilon = \frac{\upsilon_{\max}}{\alpha^{'} + \alpha.K_M/[S]_0} \tag{12}$$

$$\alpha = 1 + [I]/K_I \qquad \text{ve} \qquad \alpha^{'} = 1 + [I]/K_I^{'}$$

Bu eşitlik, inhibe olmayan enzim için türetilen Michaelis-Menten eşitliğine çok benzemektedir ve Lineweaver-Burk grafiği ile analizlenmeye de uygundur.

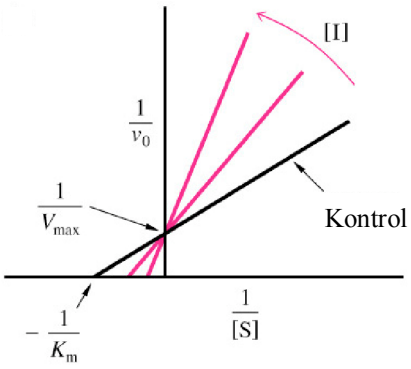
$$\frac{1}{\upsilon} = \frac{\alpha'}{\upsilon_{\max}} + \left(\frac{\alpha \cdot K_M}{\upsilon_{\max}}\right) \cdot \frac{1}{[S]_0} \tag{13}$$

Tersinir inhibisyon, temelde farklı kinetik davranışların egemen olduğu 3 şekilde gerçekleşir.

✦ **Kompetetif inhibisyon:** Bu tür inhibitörler, substrat ile benzer bir yapı gösterirler. Bu nedenle substrat ve inhibitör molekülü, enzim aktif merkezine

bağlanabilmek üzere yarışmalı bir reaksiyon sürdürür. Kompetetif inhibitörler, sadece enzim aktif merkezine bağlanır ve böylece substratın aktif merkeze bağlanmasına engel olurlar. Bu durumda $\alpha > 1$ olur. ESI kompleksi oluşmadığı için $\alpha' = 1$'dir (Atkins ve Paula 2006).

Lineweaver-Burk grafiğinin eğimi, α bağıl değişkenine bağlı olarak artar (inhibe olmamış enzimde $\alpha = \alpha' = 1$'dir). Bu tür inhibisyonda y ekseninin kesim noktası değişmez, yani υ_{max} değeri sabittir (Atkins ve Paula 2006) (Şekil 1.17).



E + S ↔ ES → E + Ü

+

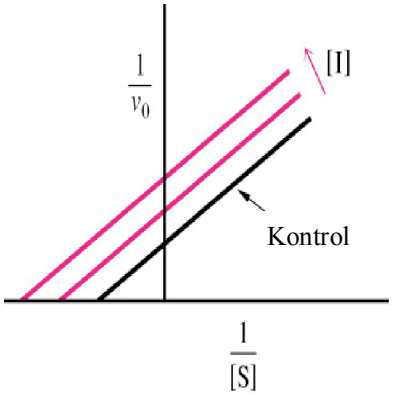
İ ↔ Eİ → Ü oluşmaz

$$\upsilon = \frac{\upsilon_{max}.[S]}{K_M.\left(1+\frac{[I]}{K_I}\right)+[S]}$$

Şekil 1.17. Kompetetif inhibisyon için şematize Lineweaver-Burk grafiği

Kompetetif inhibisyonda K_M değeri artar, υ_{max} değeri sabit kalır. Bu tür inhibisyon, yeterince yüksek konsantrasyonda substrat molekülü alınarak önlenebilir.

✦ **Unkompetetif inhibisyon:** Bu tür inhibisyonda, inhibitör molekülleri, substratın bağlanmış olduğu aktif merkeze bağlanır. Oluşan ESI kompleksi, aktif ES kompleksinin konsantrasyonunu azalttığı için inhibisyon gerçekleşir. Bu durumda EI oluşmadığı için, $\alpha = 1$'dir. Ancak ESI kompleksinin oluşumuna bağlı olarak $\alpha' > 1$ olur (Atkins ve Paula 2006).



$$E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + Ü$$
$$+$$
$$İ \leftrightarrow ESİ \rightarrow Ü \text{ oluşmaz}$$

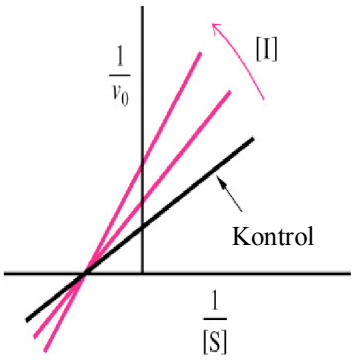
$$\upsilon = \frac{\upsilon_{max}.[S]}{K_M + [S]\left(1 + \frac{[I]}{K_I'}\right)}$$

Şekil 1.18. Unkompetetif inhibisyon için şematize Lineweaver-Burk grafiği

Lineweaver-Burk grafiğinde, y ekseninin kesim noktası α′ bağıl değişkenine bağlı olarak artar, fakat doğrunun eğimi değişmez (Atkins ve Paula 2006) (Şekil 1.18).

İnhibisyon sonucunda hem K_M hem de υ_{max} değeri azalır. Yüksek substrat konsantrasyonu inhibisyon etkisini azaltır, fakat bu şekilde inhibisyonun tamamen önlenmesi mümkün değildir.

✦ **Nonkompetitif inbibisyon:** Nonkompetetif inhibisyonda; inhibitör madde enzimin aktif merkezinin dışında bir noktadan enzime bağlanarak enzim molekülünün konformasyonunda değişime neden olur. Bu değişiklik substratın, enzim aktif merkezine bağlanma olasılığını azaltır ve böylece inhibisyon gerçekleşir. Bu tür inhibitörler, hem enzim hem de ES kompleksine bağlanıp, inhibisyona neden olabilirler. Bu durumda $\alpha = \alpha' > 1$, $K_I = K_I'$ olur (Atkins ve Paula 2006).



$$E + S \leftrightarrow ES \leftrightarrow E + Ü$$
$$\updownarrow +İ \qquad \updownarrow +İ$$
$$Eİ + S \leftrightarrow ESİ \rightarrow Ü \text{ oluşmaz}$$

$$\upsilon = \frac{\upsilon_{max}.[S]}{K_M\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]\left(1 + \frac{[I]}{K_I'}\right)}$$

Şekil 1.19. Nonkompetetif inhibisyon için şematize Lineweaver-Burk grafiği

Lineweaver-Burk grafiğinde, hem eğim hem de y ekseninin kesim noktası, inhibitör ilavesine bağlı olarak artar (Atkins ve Paula 2006) (Şekil 1.19).

İnhibisyon sonucunda K_M değeri değişmezken, υ_{max} değeri azalır.

1.5.5.2. Tersinmez inhibisyon

Tersinmez inhibitörler genellikle azot, aldehit, alken vb gibi fonksiyonel gruplar içerirler. Bu elektrofilik gruplar, enzimin yapısındaki aminoasitlerle kovalent bağlar oluştururlar. Tersinmez inhibitörler; genellikle enzimlerin bir sınıfı için spesifik olup, bütün proteinleri inaktive etmezler.

Tüm çalışmalarda inhibitörün etkinliği, aşağıdaki süreçten yararlanarak belirlenebilir:

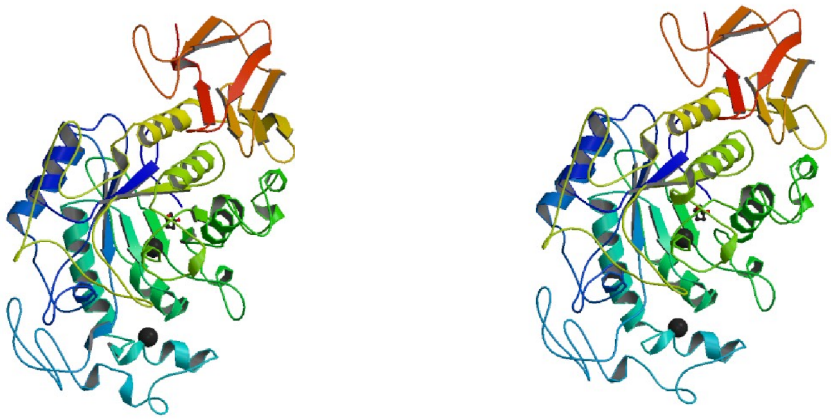
- ✓ İnhibe edilmemiş bir enzimle yapılacak deneysel çalışmadan yararlanarak K_M ve υ_{max} değerleri bulunur.
- ✓ Çalışma, bilinen konsantrasyonda inhibitör içeren sistemde tekrar edilir.
- ✓ Her iki durum için oluşturulan Lineweaver-Burk grafiklerinde; eğim ve y ekseninin kesim noktasından yararlanılarak inhibisyon türü, α, α', K_I ve K_I' değerleri belirlenir (Atkins ve Paula 2006).

1.5.6. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan enzimler

1.5.6.1. Amilaz (EC 3.2.1.1)

Glukoz vücudun temel enerji kaynağı olmasına karşın, beslenme sonucunda serbest glukoz alımı pek mümkün değildir. Sukroz, laktoz vb gibi moleküllerin sindirimi sonucunda oluşan glukoz birimleri, kan yoluyla hücrelere taşınır ve enerji kaynağı olarak kullanılır.

Amilaz enzimi, nişasta ve glikojen formundaki depo karbohidratı glukoza dönüştüren enzimdir. Bu enzimin α, β ve γ amilaz olmak üzere üç formu bulunmaktadır.



Şekil 1.20. Tükrük amilazı (Ramasubbu vd 1996) ve pankreas amilazının (Brayer vd 1995) üç boyutlu yapısı (sırayla)

Karbohidrat metabolizmasında yer alan bir enzim olan α-amilaz (α-1,-glukan-4-glukanohidrolaz), nişastayı maltoz ve dekstrine parçalar. α-amilaz formu, amilaz enziminin insan ve diğer memelilerde en fazla bulunan türüdür (Voet ve Voet 2005). Enzim aktivitesi üzerine özellikle klorür olmak üzere bazı iyonlar aktivatör olarak etki eder. Kofaktör olarak kalsiyum içeren bu enzim, kalsiyum eksikliğinde aktivite göstermez. Substrat üzerindeki herhangi bir noktaya etki edebilmesi nedeniyle α-amilaz enziminin aktivitesi, β-amilazdan daha fazladır. Tükrük bezi ve pankreasta sentezlenen serum alfa amilazı, iki ayrı izoenzim şeklinde tayin edilebilmektedir (Şekil 1.20). Pityalin olarak da bilinen tükrük amilazı, çözünmez formdaki nişastayı çözünebilir maltoz ve dekstrin birimlerine parçalar. Tükrük amilazı midede gastrik asit tarafından inaktive edilir. Moleküler çapları aynı olan bu iki izoenzimin elektrik yükleri farklıdır. Tükrük amilazının anyonik karakteri daha baskındır.

Bakteri, fungi ve bitkilerde de sentezlenen β-amilazlar, ikincil α-1,4 glikozit bağlarının hidrolizi sonucunda serbest glukoz birimlerinin oluşumunu sağlarlar.

γ-amilazlar ise α-1,6 glikozit bağlarına etki ederler (Amylase 2010).

Karbohidrat metabolizmasında, insülin salgısı ya da aktivitesinin eksikliğinin neden olabileceği herhangi bir metabolik problem, artan kan glukoz düzeyi ile karakterize edilen diyabet rahatsızlığının oluşumuyla sonuçlanabilir (Ali vd 2006, Bhandari vd 2008). Diyabetin 5 temel türü tanımlanmıştır: insülin bağımlı diyabet (tip I), insülinden bağımsız diyabet (tip II), azalmış glukoz toleransı, gestasyonel (gebelik) diyabet, gizli diyabet. Diyabet hastalığında karşılaşılabilecek uzun süreli komplikasyonların;

- Körlüğe kadar uzanabilen göz retinası problemleri ve katarakt
- Böbrek rahatsızlıkları
- Sinir sistemi rahatsızlıkları
- Ayaklarda iltihaplı yara, enfeksiyon ve hatta kangren oluşumu
- Damar sertliği, kalp rahatsızlıkları ve felç oluşumuna kadar uzanabilen rahatsızlıklar olduğu belirtilmiştir (Heidari vd 2005, Segura ve Ruilope 2006, Matsui vd 2007)

Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı raporda dünya nüfusunun % 5'inin bu problemin tehdidi altında olduğu ifade edilmiştir (WHO 2002, Bhandari vd 2008). Bu verilerden yola çıkan araştırmacılar, diyabet tedavisinde daha etkili ve daha güvenli bir ilaç geliştirme konusundaki çalışmalara hız vermişlerdir. Ancak, vücutta herhangi bir yan etki oluşturmadan bu hastalığı tedavi etmek henüz mümkün değildir (Chakraborty ve Rajagopalan 2002). Diyabet tedavisi ile ilgili terapötik yaklaşımlardan biri, sindirim sisteminden glukoz emilimini azaltmaktır (Ali vd 2006, Bhandari vd 2008, Fred-Jaiyesimi vd 2009). Bu nedenle α-amilaz gibi karbohidratları hidrolizleyen enzimlerin inhibisyonu diyabet, obezite, hipertansiyon, dolaşım sistemi rahatsızlıkları gibi hastalıkların tedavisinde oldukça önemlidir (Octivio ve Rigden 2000, Heidari vd 2005, Segura ve Ruilope 2006). Günümüzde bu amaçla acarbose, voglibose ve miglitol isimli ilaçlar yaygın olarak kullanılmakta, fakat bu ilaçların karında şişlik-midede gaz oluşumu, ishal vb çok sayıda yan etkiye neden oldukları bilinmektedir (Chakrabarty ve Rajagopalan 2002, Kimmel ve Inzucchi 2005, Fred-Jaiyesimi vd 2009). Bu yan etkilerin; α-amilazın tam inhibisyonu sonucu bağırsaklara ulaşabilen karbohidratların, buradaki fermentasyonundan kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (Bischoff 1994). Bilinen bu yan etkilere ilaveten, ilgili ilaçların bir kısmının böbrek tümörleri, karaciğer

hasarı ve akut hepatit gibi bazı hastalıkların oluşum sıklığını da arttırdığı düşünülmektedir (Shobana vd 2009).

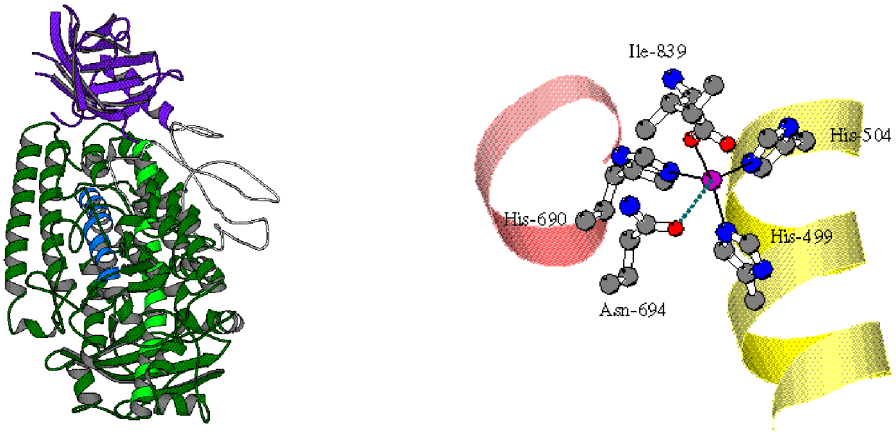
Kullanılan ilaçlarda karşılaşılan bu olumsuzluklarla baş edebilmek için özellikle doğal kaynaklardan, minimum yan etkili ve güçlü inhibitörlerin bulunmasının gerekli olduğu açıktır. Farias vd (2007) tarafından yayınlanan bir çalışmada bitkilerin özellikle de savunma mekanizması ile ilişkili bazı bileşenlerinin, α-amilaz gibi hidrolitik enzimler için inhibitör olarak görev yapabileceği vurgulanmıştır (Farias vd 2007). Bu nedenle farklı araştırmacılar tarafından diyabete çare bulmak amacıyla çeşitli kaynaklar analizlenmiştir (Ali vd 2006, Bhandari vd 2008, Chethan vd 2008, Loizzo vd 2008, Aguilar-Santamaria vd 2009, Fred-Jaiyesimi vd 2009, Shobana vd 2009). Bu çalışma kapsamında *Caulerpa* türlerinin başlıca sekonder metaboliti olan CYN seçilmiş ve bu bileşenin diyabet tedavisindeki potansiyeli değerlendirilmiştir.

1.5.6.2. Lipoksigenaz (LOX, EC 1.13.11.34)

Bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan lipoksigenazlar (LOX); hem grubu içermeyen, demir içeren dioksigenazlardır. Bunlar; yapısında en az bir tane 1,4-pentadien sistemi içeren doymamış yağ asitlerinin radikalik oksidasyonunu katalizler (Feussner ve Wasternack 2002). Enzimin aktif halinde yapıdaki Fe, +3 oksidasyon basamağındadır. LOX tarafından katalizlenen reaksiyonun birinci basamağında doymamış yağ asitlerinin yapısındaki 1,4-pentadien sistemi, Fe^{3+} iyonu tarafından oksitlenerek pentadienil radikalini oluşturur. Bu sırada aktif merkezdeki Fe^{3+} iyonu da indirgenerek, Fe^{2+} iyonuna dönüşür. Moleküler oksijen ile gerçekleşen ikinci adımdaki reaksiyon sonucunda peroksil radikali oluşur ki bu ürün de Fe^{2+}'yi tekrar Fe^{3+}'e oksitleyip enzimi aktive ederken hidroperoksit ürünlerinin oluşumu gerçekleşir (Prigge vd 1997, Feussner ve Wasternack 2002).

LOX enzimleri, ilk olarak, oldukça fazla LOX içerdiği bilinen soya fasülyesi tohumlarından elde edilmiştir (Theorell vd 1947). LOX enzimleri, izoelektrik noktalarının farklılığına göre 3 grupta (LOX-1, LOX-2 ve LOX-3) toplanır (Axelrod vd 1981). Bu izoenzimlerin optimum pH değerleri de birbirlerinden farklı olup, LOX-1 için

pH=9, LOX-2 için pH=6,5 ve LOX-3 için de pH=7 koşullarının optimum koşullar olduğu belirtilmiştir. Bu izoenzimlerin ürün spesifiklikleri de birbirlerinden farklı olup, linoleik asitin LOX-1 ile reaksiyonunda neredeyse daima 13-hidroperoksi linoleik asit ürünü oluşurken; LOX-2 ve LOX-3 ile reaksiyonu yaklaşık olarak eşit miktarda 9- ve 13-hidroperoksit türevlerinin oluşumuyla sonuçlanır (Siedow 1991).



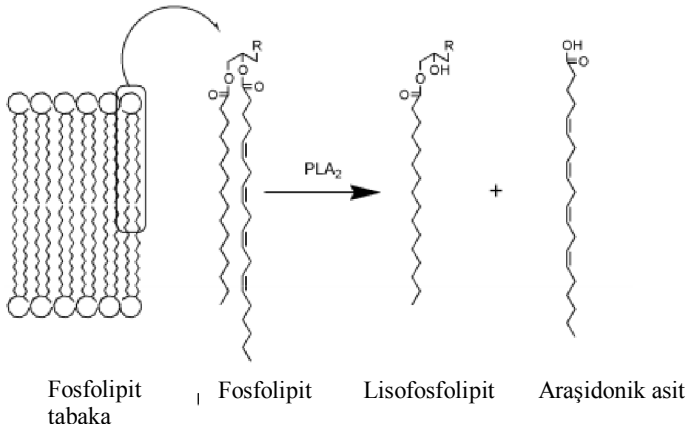
Şekil 1.21. Soya fasülyesi lipoksigenaz enzimi ve aktif merkezinin üç boyutlu yapısı (Lipoxygenase structure 2010)

Soya fasülyesi lipoksigenaz enzimi küçük bir N-terminal protein domaini (mor renkli) ile aktif merkezi de bulunduran büyük bir C-terminal protein domaini (koyu yeşil) içermektedir. N-terminal protein bölgesi, 1 adet α-heliks ile 8 adet anti-paralel β-tabakalı yapı birimlerinden oluşmuştur. C-terminal protein bölgesi ise 22 heliks ve 2 anti-paralel β-tabakalı yapı birimi içermektedir. En uzun 2 heliks birimi olan heliks 9 (açık yeşil) ve heliks 18 (açık mavi) aktif merkezden geçmekte ve buradaki Fe atomuna 3 His ligandı sağlamaktadır. Temel domaindeki 2 oyuk (I ve II), yüzeyden aktif merkeze doğru uzanır. Huni şeklindeki I. oyuk, dioksijen kanalı; daha uzun ve geniş olan II. kanal ise muhtemelen substrat cebi olabilir. Aktif merkezde yer alan Fe atomu; His499, His504, His690 ligandları ve C-terminaldeki karboksil grubunda bulunan bir O atomu ile kuşatılmıştır. Ayrıca Asn694'ün yan zincirindeki O atomu da aktif merkezdeki Fe atomu ile zayıf bir etkileşim içindedir (Şekil 1.21) (Kraulis 1991, Boyington vd 1993).

Memeli LOX enzimleri bronşiyal astım, allerjik nezle, bağırsak iltihabı, cilt hastalıkları, iltihaplı romatizma, dolaşım sistemi rahatsızlıkları, osteoporoz ve kanser gibi çok sayıdaki hastalık için mediyatörlerin oluşturulmasından sorumludur (Rioux ve Castonguay 1998, Iversen ve Kragballe 2000, Nasser ve Lee 2002, Kudryavtsev vd 2005, Werz 2007). Ayrıca bu enzimlerin Alzheimer gibi çeşitli nörodejeneratif rahatsızlıkların mekanizmasında da rol alabileceği rapor edilmiştir (Khanna vd 2003). LOX aktivitesinin inhibisyonu, bu hastalıkların tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Soya fasülyesi LOX-1 enzimi hem yapısal hem de fonksiyonel olarak memeli LOX enzimlerini temsil ettiğinden, inhibisyon çalışmalarında model enzim olarak genellikle bu yapı tercih edilir (Gundersen vd 2003, Maiga vd 2006, Serpen ve Gökmen 2007, Cengiz vd 2010b). LOX enzimi metabolizması ile ilgili yapılan çalışmalar araştırmacıları yeni inhibitörlerin bulunması konusunda çalışmaya teşvik etmiştir (Bouriche vd 2005, Banerjee 2006, Deschamps vd 2006, Blecha vd 2007, Akula ve Odhav 2008, Doiron vd 2009, Seyedi vd 2009). Özellikle kara bitkilerinden elde edilen çeşitli doğal ürünlerin LOX inhibitörü olarak etkisi araştırılmış ve medikal uygulamalar için potansiyelleri değerlendirilmiştir (Malterud ve Rydland 2000, Maiga vd 2006, Wangensteen vd 2006, Ha vd 2009). Bu çalışma kapsamında, yine benzer amaçlar doğrultusunda sucul bir canlı olan *Caulerpa* türlerinden bir sekonder metabolit olan CYN izole edilmiş ve bu bileşenin LOX inhibitörü olarak potansiyeli değerlendirilmiştir.

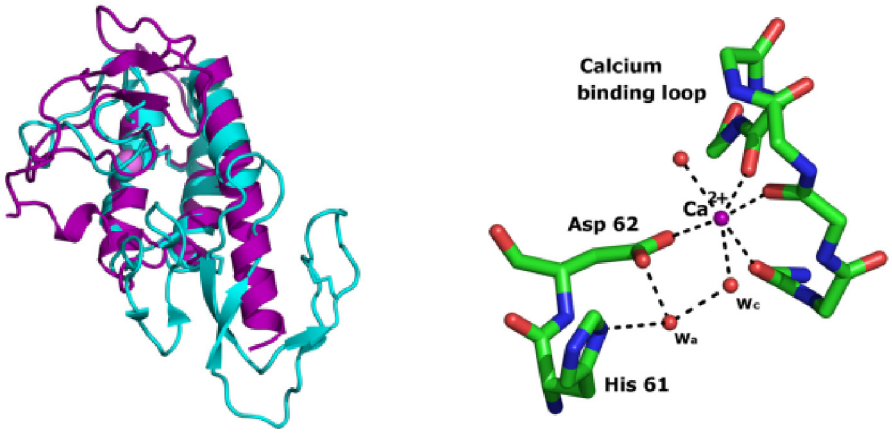
1.5.6.3. Fosfolipaz A_2 (PLA_2, EC 3.1.1.4)

Fosfolipaz A_2 enzimi; fosfolipidlerin sn-2 pozisyonundaki esterlerinin hidrolizini spesifik olarak katalizleyerek, serbest yağ asitleri ve lisofosfolipidlerin oluşumunu sağlar (Dennis 1994). Şekil 1.22'de PLA_2 enziminin mekanizması şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.22. PLA_2 enzim mekanizmasının şematik gösterimi (R grubu genellikle kolin, etanolamin, serin veya inositolü temsil etmektedir) (Andersson 2009)

PLA_2 enzim ailesi biyolojik özelliklerine göre sınıflandırıldığında 3 temel tür tanımlanır: sekretuvar PLA_2 ($sPLA_2$), hücre içi Ca bağımlı PLA_2 ($cPLA_2$), hücre içi Ca bağımsız PLA_2 ($iPLA_2$) (Balsinde vd 1999). Bunların içinde en iyi tanımlanmış tür olan, pankreas, inflamatuvar hücreler vb tarafından salgılanan $sPLA_2$ (Şekil 1.23) oldukça küçük (molekül ağırlığı yaklaşık 14 kDa) olup, katalitik kofaktör olarak milimolar düzeyde Ca^{2+}'ye gereksinim duymaktadır (Gelb vd 1994). Daha yüksek molekül ağırlığına sahip (87 kDa) olan $cPLA_2$ türü, $sPLA_2$'ye kıyasla mikromolar düzeylerin altındaki Ca^{2+} iyon konsantrasyonlarında aktive olmakta ve tercihen sn-2 pozisyonunda araşidonik asit (AA) bulunduran fosfolipitleri hidrolizlemektedir (Gelb vd 1994). Membran fosfolipitlerinde, genellikle doymuş yağ asitleri sn-1 pozisyonunda, AA gibi çoklu doymamış yağ asitleri ise sn-2 pozisyonunda bulunmaktadır (Balsinde vd 1995). $cPLA_2$ türü Ca^{2+} iyonu bulunmadığında hücrelerin sitoplazmalarında yer alırken, mikromolar düzeyde Ca^{2+} varlığında yer değiştirmektedir (Gelb vd 1994). Gross (1992) miyokardial sitoplazmada Ca bağımsız PLA_2'nin varlığını göstermiştir. Sığır beyin sitozolünde de bu türün varlığı rapor edilmiştir (Hirashima vd 1992).



Şekil 1.23. Fosfolipaz A_2 enzimi ve aktif merkezinin üç boyutlu yapısı (Guy vd 2009)

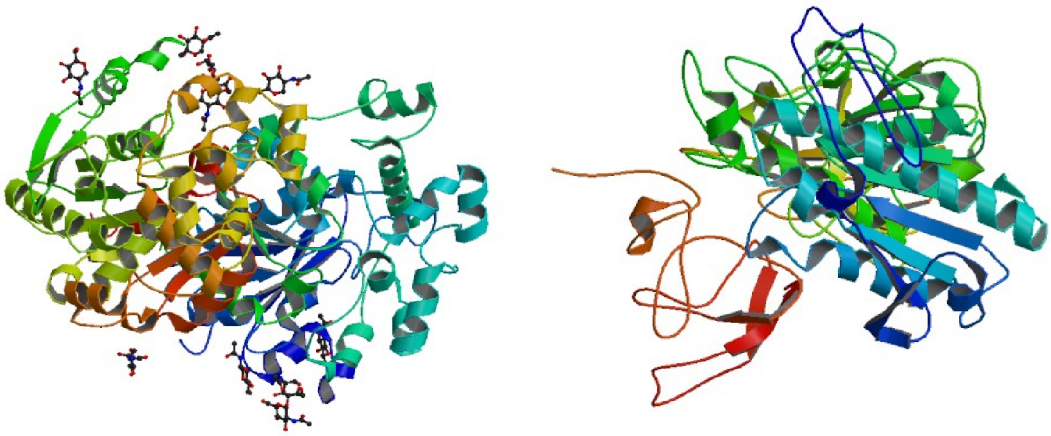
Genellikle inflamatuvar hücrelerde yeralan $sPLA_2$ türünün aminoasit sekansı, pankreasta salgılanan tip I $sPLA_2$'den çok yılan zehirinde olan tip II $sPLA_2$'ye benzemektedir (Gelb vd 1994). Araşidonat metabolitlerinin alerjik ve inflamatuvar reaksiyonlar için potansiyel haberci moleküller olmaları nedeniyle PLA_2 inhibitörlerinin klinik bir değere sahip olması beklenmektedir. Sindirim organlarında daha yaygın olarak görülen pankreatik $sPLA_2$'nin anti-inflamatuvar özellik taşıdığı düşünülmektedir (Arita ve Hanasaki 1993). $cPLA_2$ sinyal-iletim yolağında görev almakta ve eikosanoid biyosentezi için membranlardan AA'nın hızlı bir şekilde salınımını sağlamaktadır (Qiu vd 1993). PLA_2 tarafından membran fosfolipidlerinden araşidonik asit salınımının, hücre içinde eikosanoid oluşumunun kontrolü için anahtar basamak olduğu düşünülmektedir. Tüm PLA_2 enzimlerinin reaksiyonları sonucunda AA salınımı gerçekleşebiliyor olsa da özellikle $cPLA_2$ türünün AA metabolitlerinin oluşumunda önemli bir yere sahip olduğu gösterilmiştir. Araşidonik asit; çeşitli fizyolojik proseslerin regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bunun yanında ağrı, inflamasyon, aşırı duyarlılık ve alerji oluşum mekanizmalarında da yer alır. Bu madde; eklem iltihabı, astım, sedef hastalığı, ülser vb sebeplerle acı çeken hastalarda olağanüstü miktarlarda bulunmuştur. Ca bağımsız PLA_2 de miyokart infarktüsü ile birlikte gerçekleşen membran yıkım sürecinde rol oynuyor olabilir (Gross 1992). Bununla birlikte, romatizmal rahatsızlık geçiren hastaların sinoviyal sıvılarında, eklem kıkırdaklarında ve kanlarında da yüksek düzeyde PLA_2'nin var olduğu bilinmektedir (Bomalaski ve Clark 1993). Tüm bu sayılan sebeplerden dolayı pek çok ilaç üreticisi PLA_2 için yeni

inhibitörlerin geliştirilmesi konusunda çalışmalarını yürütmektedirler. Bu çalışma da doğal olarak elde edilen bir bileşen olan CYN'nin bu amaçla kullanılabilirliğini test etmektedir.

1.5.6.4. Lipaz (triaçilgliserol açilhidrolaz, EC 3.1.1.3)

Lipaz enzimleri; lipitlerin ester bağlarının hidrolizini katalizleyen bir enzim olup, esterazların bir alt sınıfıdır (Saifuddin ve Raziah 2008). Lipazlar, çoğu canlıda trigliseritlerin sindirimi, taşınması ve işlenmesinde önemli rol oynarlar.

Lipaz enzimleri, bu sınıfın kendine özgü yapısal özellikleri nedeniyle, esterazlardan farklı olarak yağ-su ara yüzeyinde daha aktiftirler (Martinelle vd 1995, Sharma vd 2001). İnsan sindirim sisteminde yer alan başlıca lipaz enzimleri, mide tarafından salgılanan gastrik lipaz ve pankreas tarafından salgılanan pankreatik lipazdır (Şekil 1.24).



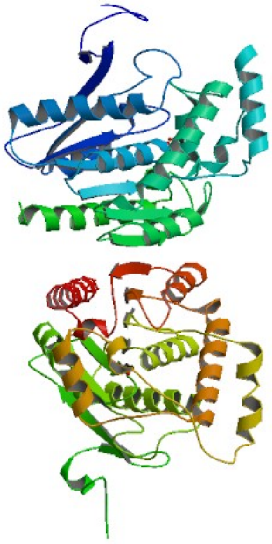
Şekil 1.24. İnsan gastrik lipaz enzimi (Roussel vd 1999) ve insan pankreatik lipaz-kolipaz kompleksinin (van Tilbeurgh vd 1992) üç boyutlu yapıları

Pankreatik lipaz, trigliseritlerin bir ve üçüncü konumundaki ester bağlarını hidrolizleyerek 2-monoaçilgliserol ve serbest yağ asitleri oluşmasına neden olan enzimdir. Gastrik lipaz asidik bir lipaz türü olup, oldukça yüksek asitliğe sahip olan midede aktivitesini korur. Bu tür, pankreatik lipaz gibi alkali lipazlardan farklı olarak optimum aktivite için safra asitleri ya da kolipaza gereksinim duymaz. Kolipaz, pankreatik lipazın optimum aktivite için gereksinim duyduğu bir koenzimdir. Bu yapı;

pankreas tarafından inaktif pro-kolipaz olarak salgılanır ve intestinal lümende tripsin tarafından aktive edilir. Kolipaz, lipazın katalitik olmayan C-terminal domainine bağlanarak bir yandan yapının aktif konformasyonunu stabilize ederken, diğer yandan da toplam hidrofobik bağlanma bölgesinin önemli ölçüde arttırılmasını sağlar (Lowe 1997). Triglisteritlerin % 10-30'u gastrik lipaz tarafından, geri kalanı da pankreatik lipaz tarafından sindirilir.

Yağlar; her ne kadar insan beslenmesinde olmazsa olmaz bileşenler olsa da, bunların fazla miktarda alınması vücuttaki depo yağların artmasına neden olmaktadır. Dünya çapında giderek yüksek kalorili besinlerden oluşan Batı tarzı beslenme biçiminin tercih edilmesi de bu problemi tetiklemektedir. Vücutta lipid metabolizmasının işleyişinin bozulması ile ortaya çıkan obezite; kalp yetmezliği, kalp büyümesi, ritim bozukluğu, damar tıkanıklığı, yüksek tansiyon, diyabet ve buna bağlı böbrek yetmezliği, solunum zorluğu, astım, eklem rahatsızlıkları, karaciğerde yağlanma ve hatta kanser gibi pek çok hastalığın oluşmasına neden olarak yaşamı olumsuz yönde etkilemektedir. Lipit metabolizmasının kontrolü, belirtilen hastalıkların tedavisinde etkili olacaktır. Bu konuda diyet, egzersiz, ilaç ve hatta cerrahi müdaheleyi de kapsayan pek çok yaklaşım mevcuttur. Ancak obezite tedavisinde, özellikle yağ metabolizmasında anahtar enzim olan pankreatik lipaza yönelik spesifik inhibitörlerin geliştirilmesi çalışmaları temel oluşturmaktadır. Bu enzimin inhibisyonu halinde vücuda alınan yağların önemli bir kısmı metabolize olmadan atılabilecek, böylece vücuttaki depo yağların artışına katkı sağlayamayacaktır.

Gastrik ve pankreatik lipaz enzimlerine ilaveten vücutta önemli görevler üstlenen bir diğer lipaz enzimi ise monoaçilgliserol lipaz (MGL)'dır (Şekil 1.25). Serin hidrolaz ailesinin bir üyesi olan 33 kDa'luk bu enzim; monogliseridlerin, serbest yağ asitleri ve gliserole dönüştürülmesinden sorumludur (Karlsson vd 1997).



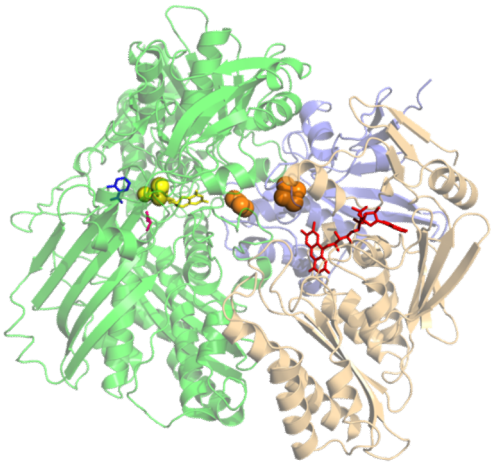
Şekil 1.25. İnsan monoaçilgliserol lipaz enziminin üç boyutlu yapısı (Labar vd 2010)

Lipid metabolizmasının gerçekleştirildiği memeli dokularında bu enzimin ekspresyonunun yüksek olması, enzimin; depo triaçilgliserollerden yağ asitlerinin salınımını gerçekleştiren lipolitik kaskatın son adımını katalizlediğini düşündürmektedir (Chon vd 2007). Beyinde ise MGL enziminin başlıca rolünün bir endocannabinoid madde olan 2-araşidonil gliserolün hidrolizi olduğu düşünülmektedir (King vd 2007). Endocannabinoid sistem; vücuttaki çeşitli düzenleyici fonksiyonları da içeren (vücudun normal işleyişi, duygusal yanıtlar, kavrama ve motor kontrol) bir lipid-sinyal sistemidir. Başlıca endocannabinoidler; araşidoniletanolamid (AEA) ve 2-araşidonil gliserol (2-AG)'dür. Lipid yapılı bazı haberci moleküllerin uyarımı sonucunda salınımları gerçekleşen bu moleküller, hücre içine oldukça spesifik bir sistem tarafından taşınırlar ve işlevleri sona erdiğinde başlıca iki enzim (yağ asidi amid hidrolaz - FAAH -, monoaçilgliserol lipaz –MGL-) tarafından biyolojik aktivitelerini sonlandıran bir hidroliz işlemine tabi tutulurlar. MGL gibi bir serin hidrolaz olan FAAH, AEA'yı da içeren pek çok yağ asit amidini hidrolizleyebilir. Her ne kadar FAAH, 2-AG'yi de hidrolizleyebilirse de, bu monogliseridin inaktivasyonundan sorumlu başlıca enzim MGL'dir. Bu endocannabinoid hidrolazlar için inhibitörlerin bulunması; yüksek endocannabinoid aktivitesinin yararlı olabileceği ağrı, obezite ve çeşitli nörolojik hastalıkların tedavisinde farklı bir yaklaşım sunabilecektir (Monoacylglycerol Lipase Inhibitor Screening Assay Kit 2008). Bu çalışmada CYN'nin lipaz enzimleri için olası inhibisyon potansiyeli belirlenmiştir.

1.5.6.5. Ksantin Oksidaz (XOD, EC 1.17.3.2)

Ksantin oksidoredüktaz (XOR) enzimi, molibdo enzim ailesinin bir üyesi olup, ilk kez sütte tanımlanmıştır. Bu yapı; birbirlerine dönüşebilen, fonksiyonel olarak farklı iki formdan oluşmaktadır: ksantin dehidrogenaz (XDH) ve ksantin oksidaz (XOD) (Berry ve Hare 2004). Her iki form da pürin yıkım metabolizmasının son iki adımı olan hipoksantinin, ksantine ve ksantinin de ürik asite dönüşümünü katalizler. Bu iki form; yapısal konformasyon ve flavin adenin dinükleotiti (FAD) kuşatan elektrostatik ortam bakımından farklılık gösterir (Kelley vd 2010). Normal koşullar altında bu enzimin büyük bir kısmı nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+) bağımlı dehidrogenaz formunda olup NADH ve ürat oluştururken; küçük bir kısmı ise oksijen bağımlı oksidaz formunda olup oksijen radikali ya da hidrojen peroksit ile ürat oluşturmaktadır (Cejková vd 2002). Aslında XDH, NAD^+'ya ilaveten XOD gibi oksijenin indirgenmesinde de görev alabilir, fakat NAD^+'ya ilgisi daha yüksektir (Berry ve Hare 2004). Bakteri, yüksek bitkiler, omurgalı ve omurgasızlar dahil pek çok canlı grubunda yer alan XOD enzimi sitozolik bir enzim olup, memelilerde karaciğer ve bağırsaklarda en yüksek aktiviteye sahiptir (Parks ve Granger 1986). Fizyolojik koşullar altında, hücre dışındaki XOR'nin yalnızca XOD formunda buna karşın hücre içi XOR'nin yaklaşık % 10-20'sinin XOD, % 80-90'ının ise XDH formunda bulunduğu söylenebilir (Cejková vd 2002).

Inflamasyon koşullarında posttranslasyonel modifikasyonla XDH'nin, XOD'ye dönüşümü gerçekleşmektedir (Amaya vd 1990, Kelley vd 2010). Bununla birlikte, iskemi ve hipoksi koşulları gibi NAD^+'nın azalmış olduğu çeşitli durumlarda XDH da bir parça oksidaz aktivitesi gösterebilmektedir (Harris ve Massey 1997, Kelley vd 2010).



Şekil 1.26. Sığır süt XOD enziminin üç boyutlu yapısı. Burada enzim yapısında yer alan Fe-S merkezi turuncu, molibdopterin kofaktörü sarı ve FAD kırmızı olarak gösterilmiştir (Enroth vd 2000)

Aktif haldeki XOD, molekül ağırlığı 290 kDa olan bir homodimer olup, kataliz süresince her bir monomer birbirinden bağımsız olarak işlevini sürdürmektedir (Lin vd 2008). Her bir alt ünite dört redoks merkezi içermektedir: bir Mo^{4+} kofaktörü, Fe/S I ve Fe/S II olarak adlandırılan iki Fe/S merkezi ve bir FAD birimi (Şekil 1.26). Bu birimlerden Mo ve FAD merkezleri ikişer elektron kabul ederken, her bir Fe/S merkezi de bir elektron alabilir. Ksantinin ürik asite dönüşüm reaksiyonu enzimin Mo merkezinde gerçekleşir. Tüm enzim molekülündeki toplam indirgenmenin sağlanabilmesi için üç molekül ksantin gerekmektedir. Oksijenin, peroksit ve süperoksite dönüştürüldüğü diğer katalitik yarı reaksiyon ise enzimin FAD merkezinde gerçekleştirilmektedir (Sau vd 2001).

XOD'nin fonksiyonu sonucunda fazla miktarda ürik asit oluşması hiperürisemi ve bununla ilişkilendirilen gut hastalığına neden olabilir. Son yıllarda insanların yaşam standardının da artmasıyla daha da yaygın hale gelen bu hastalıklar, ürik asit kristallerinin eklemlerde ve böbreklerde birikmelerine neden olmakta, böylece artrit ve böbrek rahatsızlıkları oluşabilmektedir. Ayrıca hiperürisemi hastalığının hipertansiyon, diabet, obezite ve bazı kanser türleri ile de ilişkili olduğu düşünülmektedir (Lin vd 2000, Liu vd 2008). Tedavide temel çıkış noktası; ürik asit oluşumunun azaltılması ya da vücuttan atılımının arttırılmasıdır. Ksantin oksidaz inhibitörleri, daha az yan etki oluşturması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Bunların içinde tedavi amacıyla en

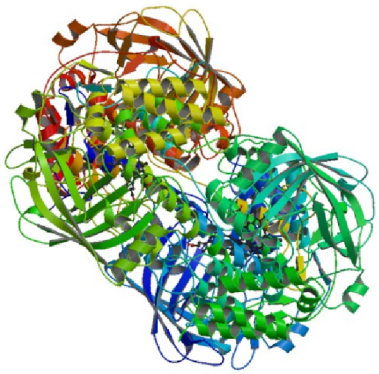
yaygın olarak kullanılanı allopurinol olup, bunun hipersensitivite ve Stevens Johnson sendromu, böbrek hastalıkları, alerjik reaksiyonlar ve cilt problemleri gibi yan etkiler oluşturabildiği rapor edilmiştir (Kong vd 2000, Burke vd 2006, Liu vd 2008, Umamaheswari vd 2009). Bu nedenle XOD için daha etkili, güvenli ve daha az yan etkiye sahip olan yeni inhibitörlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Geliştirilecek bu inhibitörlerin, XOD aktivitesinin arttığı tespit edilen hepatit ve beyin tümörü gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılması mümkün olabilir (Kokoglu vd 1990, Kong vd 2000). Ayrıca XOD'nin pek çok doku ve damar hastalıklarında, inflamasyona dayalı rahatsızlıklarda ve kronik kalp yetmezliğinde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiş olup (Kelley vd 2010), geliştirilecek inhibitörlerden bu alanlarda da yararlanılması olası olabilecektir. Bu çalışma kapsamında da CYN sekonder metabolitinin XOD inhibitörü olarak potansiyeli değerlendirilmiştir.

1.5.6.6. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6)

Doğada geniş bir yayılıma sahiptir. Bütün aerobik mikroorganizmalar ile pek çok bitki ve hayvan hücresinde bulunur (Aebi 1974). Ancak anaerob bakterilerde bulunmaz. Hidrojen peroksiti (H_2O_2) serbest oksijen ve suya parçalayan oksidoredüktaz türü bir enzimdir.

Katalaz enzimi, her biri aktif merkezinde demir atomu içeren dört protein alt ünitesinden oluşur (Halliwell ve Gutteridge 2003) (Şekil 1.27). Bu demir grupları, katalazın enzimatik aktivitesinden sorumludur. Katalaz, dakikada 500 milyon mol H_2O_2'i su ve oksijene çevirmesiyle en yüksek turnover sayısına sahip enzimlerden birisidir (Costa vd 2001).

Katalaz hidrojen peroksiti, su ve oksijene dönüştürmenin yanısıra, peroksidaz aktivitesi de gösterebilir. Bu reaksiyonlardan hangisinin gerçekleşeceğini belirleyen parametre, ortamdaki H_2O_2 konsantrasyonudur (Aebi 1974).



Şekil 1.27. İnsan eritrosit katalaz enziminin üç boyutlu yapısı (Safo vd 2001)

Katalaz; kanser, diabet, katarakt, ateroskleroz, iskemik-reperfüzyon hasarı, artrit, nörodejeneratif hastalıklar, beslenme yetersizliği ve yaşlanmayı içine alan pek çok patolojik şartlarda ortaya çıkan oksidatif strese karşı savunmada antioksidan sistemin öncelikli bir enzimidir (Kumaraguruparan vd 2002).

1.5.6.7. Süperoksid Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1)

Superoksid dismutaz (SOD) enzimi, serbest radikallerin hidrojen perokside dönüşmesinin katalizlenmesinde bir antioksidan olarak görev alır (Halliwell ve Gutteridge 2003). İnsan SOD1 enziminin üç boyutlu yapısı Şekil 1.28'de gösterilmiştir.

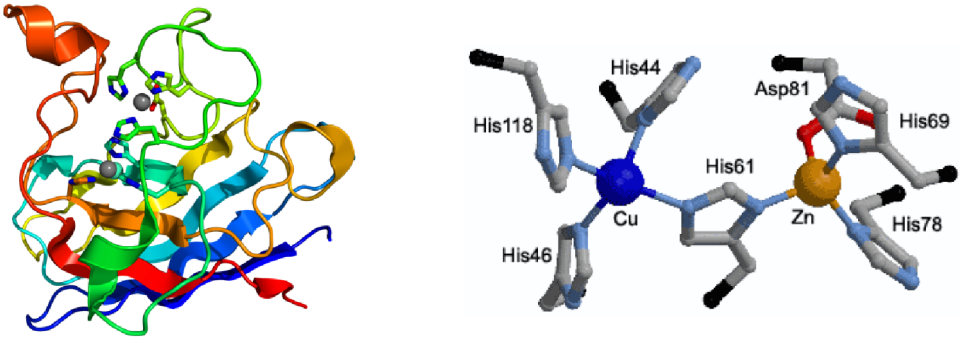
Reaksiyon mekanizması aşağıdaki yarı reaksiyonlarla ifade edilir:

$$M^{(n+1)+} - SOD + O_2^{-\bullet} \rightarrow M^{n+} - SOD + O_2$$

$$M^{n+} - SOD + O_2^{-\bullet} + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+} - SOD + H_2O_2$$

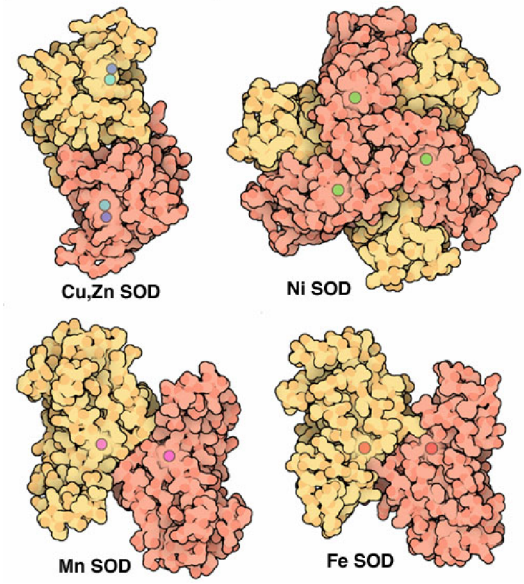
M = Cu (n=1) ; Mn (n=2) ; Fe (n=2) ; Ni (n=2)

Bu reaksiyonda metal katyonunun oksidasyon basamağı n ile n+1 arasında değişir.



Şekil 1.28. İnsan SOD1 enziminin (Cao vd 2008) ve Cu,Zn-SOD aktif merkezinin üç boyutlu yapısı (Cu/Zn SOD 2010)

Yapıda bulunan metal kofaktörüne bağlı olarak üç temel SOD enzim ailesi tanımlanabilir. Bunlar; Cu/Zn SOD (her iki metal atomu ile de bağ oluşturulur), Fe ve Mn SOD (bu atomlardan biri ile bağ oluşturulur), Ni SOD (Ni atomu ile bağ oluşturulur) olarak tanımlanmıştır. Bu izoform modelleri Şekil 1.29'da gösterilmiştir. Bu izoformlardan Cu/Zn SOD genel olarak ökaryotlarda, Fe ve Mn SOD prokaryotlar, protistler ile ökaryotların mitokondrilerinde ve Ni SOD da yine genellikle prokaryotlarda bulunur.



Şekil 1.29. SOD enziminin farklı isoform modelleri (PDB 2010)

Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) hücredeki en önemli reaktif oksijen türlerinden biridir. Bu radikal kendiliğinden O_2 ve H_2O_2'e dönüşerek sönümlenebileceği gibi, NO gibi bazı moleküllerle oldukça hızlı reaksiyon vererek toksik peroksinitritleri de oluşturabilir. Yüksek turnover sayısına sahip olan SOD, radikallerin hidrojen perokside dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek, hücreleri süperoksitlerin toksik etkisinden korur.

Memelilerde SOD enziminin üç farklı türü mevcuttur. Bir dimer olan SOD1 sitoplazmada, birer tetramer olan SOD2 ve SOD3 ise sırasıyla mitokondri ve ekstrasellüler bölgede lokalize olmuştur. Bu enzimlerden SOD1 ve SOD3 aktif merkezinde Cu/Zn içerirken, SOD2 Mn içermektedir.

SOD, antioksidan aktivitede anahtar rolü oynayan önemli bir enzimdir ve fizyolojik önemi pek çok kez test edilmiştir. Li vd (1995) SOD2 eksikliğinde, farelerin doğumdan birkaç gün sonra öldüğünü rapor etmişlerdir. Yine farelerle yapılan çeşitli çalışmalarda, SOD1 eksikliğinin karaciğer kanseri, yaşa bağlı kas kaybı, katarakt ve yaşam süresinin azalması gibi birçok patolojik problemin oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Elchuri vd 2005, Muller vd 2006). SOD3 eksikliğinde ise herhangi bir problem gözlenmemiştir.

Antioksidan savunma sistemi, hücreyi serbest radikal veya diğer reaktif moleküllerin oksidatif hasarından korur. Bundan dolayı bu savunma sisteminde yer alan CAT, GSH-Px ve SOD gibi antioksidan enzimler yaşamımızda büyük öneme sahiptir. Çeşitli hastalıkların önlenmesinde hedef enzimlere karşı inhibitör olarak kullanımı planlanan *Caulerpa* metabolitlerinin, vücutta neden olabileceği hasarı belirlemede yapılabilecek ilk inceleme, ilgili özütlerin antioksidan sistemin önemli enzimleri üzerindeki etkisini tespit etmek olacaktır. Bu nedenle *Caulerpa* özütlerinin, CAT ve SOD enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri de bu çalışma kapsamında değerlendirilmiştir.

1.6. Çalışmanın Amacı

Son zamanlarda tıp alanında kaydedilen hızlı gelişme, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek ilaçların potansiyel hammaddelerinin araştırılmasına yönelik yoğun bir çalışmayı da beraberinde getirmiştir. Temelde karasal canlılar farmasötik endüstrinin çıkış maddelerini oluştursa da, denizlerimizde yaşayan çok sayıdaki canlı türü; ticari öneme sahip yeni bileşiklerin sağlanabilmesi için yüksek bir potansiyele sahiptir. Bilindiği gibi ülkemizi de kuşatan Akdeniz ekosistemi yayılımcı özellikteki bazı türlerce işgal edilmektedir. Bu türlerden en çok dikkat çekeni, salgıladıkları metabolitler sayesinde kendilerini otçul canlılardan koruyabilme özelliği gösteren *Caulerpa* türleridir. Akdeniz'de hızla yayılan bazı *Caulerpa* türlerinin salgıları moleküler düzeyde incelendiğinde; bu salgıların anti-mikrobiyal, anti-kanserojen, anti-viral ve apoptotik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Ulaşılan dikkat çekici bu sonuçlar; ilgili salgıların diğer canlılar üzerindeki etkilerinin araştırılmasını tetiklemiş; ancak tıbbi önemi olan enzimlere yönelik araştırmalar henüz sınırlı sayıda kalmıştır.

Bu araştırmada öncelikle ülkemiz kıyılarını işgal eden bazı *Caulerpa* türlerinin sekonder metabolitlerinin, tıbbi öneme sahip çeşitli enzimler – α-amilaz, lipoksigenaz, fosfolipaz A_2, lipaz ve ksantin oksidaz – üzerindeki inhibisyon etkilerinin belirlenmesi ve gerçekleşecek enzim inhibisyonlarının kinetik olarak incelenmesi hedeflenmiştir.

Çeşitli araştırma enstitülerinde yayılımcı deniz yosunlarının salgılarının incelenmesine yönelik çok sayıda çalışma yürütülmesine karşın, üç tarafı denizlerle çevrili ülkemizde *Caulerpa* türlerinin sekonder metabolitlerine yönelik araştırmaların sayısı henüz istenen düzeyde değildir. Yapılacak bu çalışma sonucunda ülkemiz kıyılarında yer alan ve ilaç sektöründe potansiyel hammadde olarak kullanılabilecek olan bazı *Caulerpa* türlerinden, ekonomik değeri olan biyomateryal geliştirilmesinin hedeflenmiş olması çalışmanın önemini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte ülke ekonomisine ciddi katkıları olan kıyılarımızın, bu türün şiddetli yayılımından olumsuz etkileniyor olması da bu türlerin metabolik özelliklerine yönelik biyokimyasal araştırmalara ciddi gereksinim bulunduğunu göstermektedir.

Bu nedenle çalışmadan elde edilecek sonuçların ışığında; denizlerimizdeki yayılımcı özellikli biyolojik bir materyalin, toplum sağlığına hizmet eden yararlı bir ürüne, bilime özellikle de farmasötik endüstriye kazandırılması planlanmaktadır.

2. MATERYAL ve METOT

Bu çalışma biri, diğerinin sonuçlanmasını takiben şekillenen 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. Öncelikle İzmir kıyılarından toplanan 2 tür *Caulerpa* materyalinin (*C. racemosa* ve *C. prolifera*) çeşitli çözücülerle hazırlanan özütlerinin çalışılması planlanan tıbbi önemli bazı enzimler üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir. Bu aşamada sonuçların hızlı bir şekilde elde edilebilmesi ve daha sonra inhibisyonun önemli ölçüde gerçekleştiği enzimler için kinetik incelemenin başlatılabilmesi amacıyla (temin edilebildiği ölçüde) ticari enzim aktivite ölçüm kitlerinden yararlanılmıştır. İkinci aşamada literatürde CYN içeriğinin daha yüksek olduğu gösterilmiş olan *C. prolifera* türünden CYN izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bu standart materyal kullanılarak türlerdeki CYN içeriği tespit edilmiştir. Ayrıca özütlerle önemli ölçüde inhibe olduğu gözlenen enzimler için saf CYN kullanılarak inhibisyondan sorumlu bileşenin CYN olup-olmadığı test edilmiştir. Son aşamada da manuel enzim aktivite ölçüm yöntemleri ve saf CYN kullanılarak, önemli ölçüde inhibisyonun gerçekleştiği türlerde kinetik incelemeler yapılmış ve enzim inhibisyonun mekanizması belirlenmiştir.

2.1. Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Adı	Üretici Firma
Metanol	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Dimetilsülfoksit	Riedel de Haen
Aseton	Merck
Etil asetat	Carlo Erba
Petrol eteri	Carlo Erba
Dietileter	Carlo Erba
Hidrojen peroksit	Merck
Triton X-100	Fluka
Dipotasyum hidrojen fosfat	Sigma-Aldrich
Potasyum dihidrojen fosfat	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür	Carlo Erba
Susuz sodyum sülfat	Carlo Erba
3,5- dinitro salisilik asit	Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich
Ksantin	Sigma-Aldrich
p-nitrofenilpalmitat	Alfa Aeser
Silika	Merck
Nişasta	Merck
Linoleik asit	Sigma-Aldrich
SOD kit	Ransod
PLA_2 kit	Cayman Chemical Co., Katalog No. 765001
LOX kit	Cayman Chemical Co., Katalog No. 760700
MGL kit	Cayman Chemical Co., Katalog No. 10005192
α-amilaz	Sigma-Aldrich
Katalaz	Sigma-Aldrich
Lipoksigenaz	Sigma-Aldrich
Ksantin oksidaz	Ransod
Pankreatik lipaz	Sigma-Aldrich

2.2. Kullanılan Cihazlar

Cihazın Adı	Markası	Çalışmalardaki Kullanım Amacı
Etüv	Memmert	Temizlenen malzemelerin kurutulmasında
Terazi	Scaltec SBC 21	Tartım işlemlerinde
Homojenizatör	Heidolph silentcrusher	Alg materyalinin homojenizasyonunda
Soğutmalı santrifüj	Hettich universal 32 R	Hücre kalıntısı vb kalıntıların çöktürülmesinde
-60 ºC soğutucu	Sanyo ultra low	Saf enzim ve bazı kitlerin saklanmasında
Magnetik karıştırıcı	Heidolph	Gerekli çözeltilerin hazırlanmasında
Çalkalamalı inkübatör	MaxQ 4000	Enzim-inhibitör karışımlarının inkübasyonunda
UV Spektrofotometre	Schimadzu 1601	Enzim aktivitelerinin belirlenmesinde
Microplate Reader	Biotek	Enzim aktivitelerinin belirlenmesinde
Evaporatör	Buchi R-210	CYN saflaştırma işleminde çözücü uzaklaştırılmasında
HPLC cihazı	HP Agilent 1100 series	CYN tayininde
NMR	200 MHz Bruker	CYN saflık kontrolünde
UV Lamba	Camag	CYN fraksiyonlarının tespitinde

2.3. *Caulerpa* Türlerinin Toplanması

C. racemosa türü Seferihisar/İzmir kıyılarından, *C. prolifera* türü ise Çeşme/İzmir kıyılarından manuel olarak toplanmıştır. Çalışma süresince örnekler sürekli olarak herhangi bir deniz kirliliğinin bulunmadığı bu bölgelerden ve aynı derinlikten (2 m) toplanmıştır. İlgili bölgelerin coğrafi koordinatları sırasıyla 38°19′37,23″ K – 26°17′57,45″ D ve 38°07′56,82″ K – 26°50′06,72″ D olarak tespit edilmiştir. Dikkatle toplanan alg materyali, Jung vd (2002)'nin tanımladığı şekilde CYN'nin diğer aldehitlere transformasyonunu engellemek için, öncelikle deniz suyu ile yıkanmış ardından hızla buz dolu kaba aktarılmış ve bu şekilde laboratuara getirilmiştir. Bu materyal, laboratuarda deiyonize su ile yıkanarak tuz ve epifitlerinden arındırılmıştır. Daha sonra materyal, kullanılıncaya kadar -20 ºC'de saklanmıştır.

2.4. *Caulerpa* Türlerinden Çeşitli Özütlerin Hazırlanması

Literatürde deniz yosunları üzerine yapılan çalışmaların verileri incelendiğinde farklı organik çözücülerle özütler hazırlandığı ve bunlar için farklı sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Bu çalışmada en iyi sonucu alabilmek için incelenecek enzime olan etkisi de göz önüne alınarak su, metanol, etanol veya dimetilsülfoksit (DMSO) ile hazırlanan *Caulerpa* özütleriyle çalışılmıştır. Denemelerden önce alg, soğuk ortamda ilgili çözücülerle önce havanda daha sonra da homojenizatörde homojenize edilmiş ve hücre kalıntıları 10000 rpm, +4 °C'de 10 dakika santrifüjleme işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Süpernatant kullanılıncaya kadar -20 ºC'de saklanmıştır.

2.5. *Caulerpa* Özütlerinin Çeşitli Enzimler Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

Bu çalışmada farklı çözücülerle hazırlanan alg özütleri, inhibitör olarak kullanılmıştır. Saf enzim çözeltisine farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek, oluşturulan enzim-inhibitör karışımları ve saf enzim için ilgili metoda göre enzim aktivite tayini yapılmıştır. Daha sonra saf enzim için bulunan değerle, enzim-inhibitör karışımı için bulunan değerin kıyaslanması sonucu inhibisyon yüzdeleri belirlenmiştir.

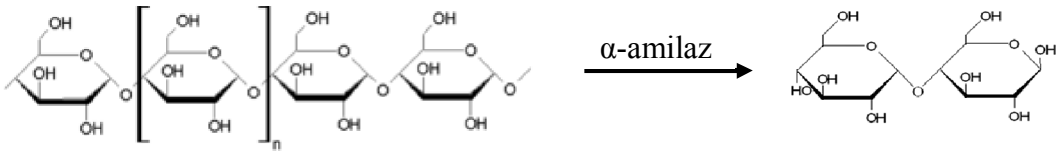
2.5.1. α-amilaz enzimi için inhibisyon etkisinin belirlenmesi

α-amilaz enzimi, nişasta molekülündeki α-1,4 glikozidik bağları parçalayarak maltoz ve dekstrinlerin oluşumunu sağlar (Amylase 2010).

Teixeira vd (2007) yayınladıkları çalışmalarında, *C. racemosa*'nın aseton özütünün α-amilaz enzim aktivitesi üzerinde güçlü bir inhibisyon etkisi oluşturduğunu ifade etmişlerdir. Dolayısıyla bu çalışmada, çeşitli çözücülerle hazırlanan *C. racemosa* ve *C. prolifera* özütleri inhibitör olarak kullanılmış ve α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Enzim aktivitesinin tayininde, Bernfeld tarafından uyarlanan Sigma-Aldrich kromojenik metottan yararlanılmıştır. Bu metotta nişastanın hidrolizi ile serbest hale geçen gruplar; 3,5-dinitro salisilik asit ile türevlendirilerek, 540 nm'de yapılan absorbans ölçümü yardımıyla belirlenir (Bernfeld 1951). Enzim aktivitesi; 1 dakikada ortama salınan maltozun mikromol miktarı olarak ifade edilir. Farklı standart maltoz konsantrasyonları için oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi yardımıyla deney koşullarında oluşan maltozun mikromol miktarı tespit edilir.

<u>Mekanizma:</u>



Caulerpa özütlerinin hazırlanması için kullanılan çözücülerin, ilgili enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisini belirleyebilmek amacıyla saf çözücü kullanılarak deney tekrarlanmıştır. Bu çalışmada ölçüm ortamına, kullanılan özüt ile aynı hacimde saf çözücü inhibitör gibi eklenmiş ve bunun için de aktivite ölçümü yapılmıştır. Çizelge 2.1'de deney ortamının bileşimi gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. α-amilaz enzim aktivitesi ölçüm ortamının bileşimi

Örnek	Ortamdaki konsantrasyonu (mg yaş alg/mL)	İnhibitör miktarı (µL)	Enzim miktarı (µL)	Substrat miktarı (µL)	Dinitrosalisilik asit (µL)	Çözücü (µL)	Su miktarı (µL)
KÖR	-	-	-	100	200	-	2000
KONTROL	-	-	100	100	200	-	2000
İNHİBİTÖR (1 g/mL)	25	10	100	100	200	-	1990
ÇÖZÜCÜ ETKİSİ	-	-	100	100	200	10	1990

Sonuçlar; *Caulerpa* türlerinden elde edilen özütlerin α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin, saf çözücülerin inhibisyon etkisinden daha düşük olduğunu göstermiştir. Bu nedenle çalışma için optimum koşulların bulunması ve yöntemin standardizasyonunun sağlanması amacıyla çalışmalar bilinen bir amilaz inhibitörü kullanılarak tekrarlanmıştır. Bu amaçla, hazırlanan $CdCl_2$ tuzu inhibitör olarak kullanılmış ve ölçüm ortamına farklı konsantrasyonlarda ilave edilerek, enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi değerlendirilmiştir. İnhibitörün etkisi; enzim ile 37 °C, 170 rpm'de 30 dakika inkübe edilmesi ve direk ölçüm ortamına ilave edilmesi durumunda olmak üzere iki koşulda incelenmiştir. Sonuçlar, kullanılan yöntemle ilgili bir problemin olmadığını ortaya koymuş ve bunu takiben çalışma metanol içinde hazırlanmış olan CYN'nin inhibitör olarak kullanılması ile devam ettirilmiştir. Enzim aktivitesi üzerinde çözücünün etkisinin belirlenebilmesi amacıyla metanol için de kontrol denemeleri gerçekleştirilmiştir.

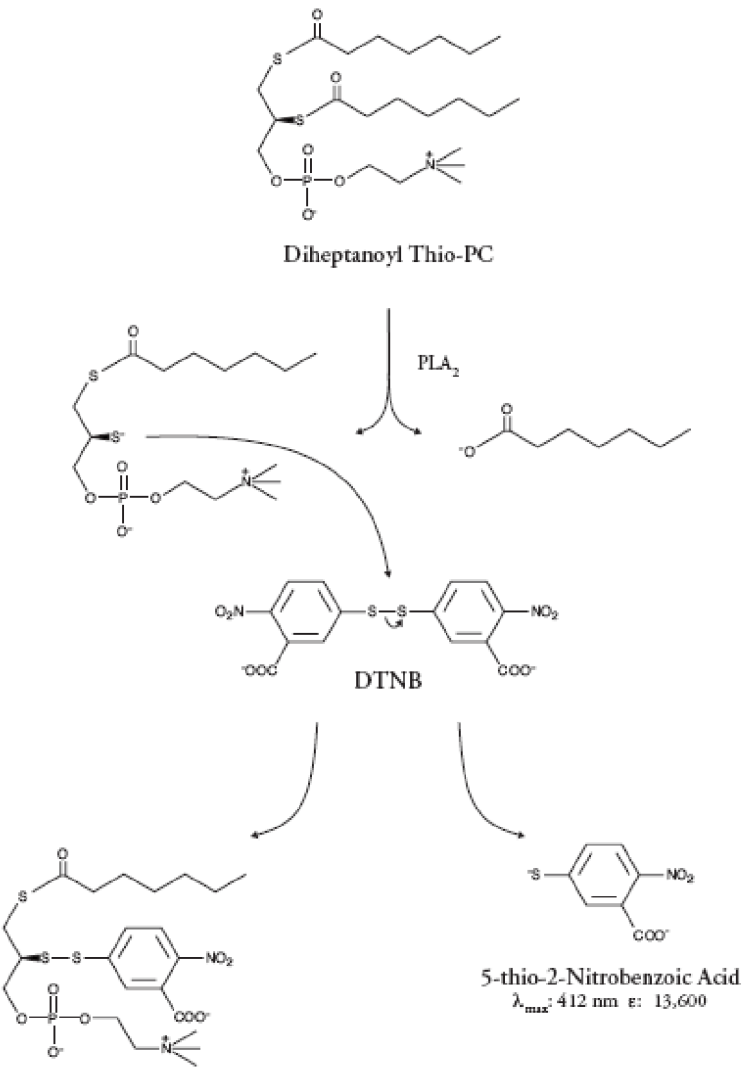
2.5.2. Fosfolipaz A_2 (PLA_2) enzimi için inhibisyon etkisinin belirlenmesi

PLA_2; fosfolipidlerin sn-2 pozisyonundaki esterlerinin hidrolizini katalizleyerek, serbest yağ asitleri ve lisofosfolipitleri oluşturur (Dennis 1994).

PLA_2 aktivitesinin tayininde Cayman marka ticari aktivite tayin kiti kullanılmıştır. Bu yöntemde pek çok PLA_2 için substrat gibi görev yapan diheptanoil fosfatidilkolinin 1,2-ditiyo analoğu kullanılır. PLA_2 aktivitesi ile sn-2 pozisyonundaki tiyoester bağının hidrolizi sonucunda oluşan serbest tioller; 5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB,

Ellman's reagent) kullanılarak, 405 nm'deki absorbans artışı ile belirlenir (sPLA$_2$ Assay Kit 2006).

Mekanizma:



Çalışmada, uygulanan yöntem için girişim etkisi bulunmayan DMSO çözücüsü kullanılarak öncelikle 2 g/mL derişimli *C. racemosa* ve *C. prolifera* özütleri hazırlanmıştır. Daha sonra uygun seyreltmelerle 1 g/mL, 0,5 g/mL ve 0,25 g/mL'lik seyreltik özütler oluşturulmuştur. Hazırlanan alg özütleri, inhibitör olarak kullanılmış ve çalışma ortamına farklı konsantrasyonlarda ilave edilerek, bu enzim-inhibitör karışımları ve saf enzim için ilgili metoda göre aktivite tayini yapılmıştır. Reaksiyon

ortamındaki alg konsantrasyonu 6 - 22 mg yaş alg/mL aralığında değişmektedir. Çizelge 2.2'de reaksiyon ortamının bileşimi gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. PLA_2 enzim aktivitesi ölçüm ortamının bileşimi

Örnek	Ortamdaki alg konsantrasyonu (mg yaş alg/mL)	İnhibitör miktarı (µL)	Enzim miktarı (µL)	Tampon miktarı (µL)	Substrat miktarı (µL)	DTNB (µL)	Çözücü (DMSO) (µL)
KÖR	-	-	-	10	200	10	5
KONTROL	-	-	10	-	200	10	5
İNHİBİTÖR (1 g/mL)	22	5	10	-	200	10	-
İNHİBİTÖR (0,5 g/mL)	11	5	10	-	200	10	-
İNHİBİTÖR (0,25 g/mL)	6	5	10	-	200	10	-

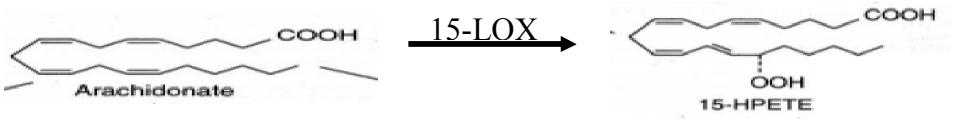
Sonuçlar; kullanılan kitin manuelinde belirtildiği şekilde hesaplanmış ve saf enzim için bulunan değerle, enzim-inhibitör karışımı için bulunan değerin kıyaslanması sonucu inhibisyon yüzdeleri belirlenmiştir.

2.5.3. Lipoksigenaz (15-LOX) enzimi için inhibisyon etkisinin belirlenmesi

Lipoksigenazlar; hem grubu içermeyen, demir içeren dioksigenazlardır. Bunlar; yağ asitlerine moleküler oksijenin katılım reaksiyonunu katalizlerler (Feussner ve Wasternack 2002).

15-LOX aktivitesinin tayininde Cayman marka ticari kitten yaralanılmıştır. Bu yöntemde substrat olarak araşidonik asit kullanılmıştır. Yağ asitlerine moleküler oksijenin katılım reaksiyonunun başlangıç ürünü; doymamış yağ asidi içindeki 4-hidroperoksi cis-trans-1,3-konjuge pentadienil kısmıdır. Lipoksigenasyon reaksiyonu sırasında üretilen hidroperoksitler, 490 nm'deki absorbans artışından yararlanarak belirlenir (Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit 2008).

Mekanizma



Bu çalışmada, kit manuelinde kullanılabileceği önerilen DMSO, etanol ve metanol çözücüleri kullanılarak öncelikle 2 g/mL derişimli *C. racemosa* ve *C. prolifera* özütleri hazırlanmıştır. Daha sonra uygun seyreltmelerle 1 g/mL, 0,5 g/mL ve 0,25 g/mL'lik seyreltik özütler oluşturulmuştur. Hazırlanan alg özütleri, inhibitör olarak kullanılmış ve çalışma ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek, bu enzim-inhibitör karışımları ve saf enzim için ilgili metoda göre aktivite tayini yapılmıştır. Reaksiyon ortamındaki alg konsantrasyonu 12 - 48 mg yaş alg/mL aralığında değişmektedir. Çizelge 2.3'de reaksiyon ortamının bileşimi gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. LOX enzim aktivitesi ölçüm ortamının bileşimi

Örnek	Ortamdaki alg konsantrasyonu (mg yaş alg/mL)	İnhibitör miktarı (µL)	Enzim miktarı (µL)	Tampon miktarı (µL)	Substrat miktarı (µL)	Chromogen (µL)
KÖR	-	-	-	100	10	100
KONTROL	-	-	90	10	10	100
İNHİBİTÖR (1 g/mL)	48	10	90	-	10	100
İNHİBİTÖR (0,5 g/mL)	24	10	90	-	10	100
İNHİBİTÖR (0,25 g/mL)	12	10	90	-	10	100

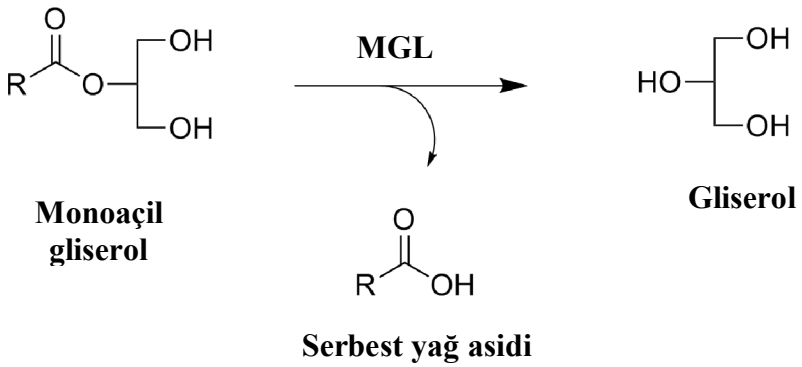
Sonuçlar; kullanılan kitin manuelinde belirtildiği şekilde hesaplanmış ve saf enzim için bulunan değerle, enzim-inhibitör karışımı için bulunan değerin kıyaslanması sonucu inhibisyon yüzdeleri belirlenmiştir.

2.5.4. Monoaçil Gliserol Lipaz (MGL) enzimi için inhibisyon etkisinin belirlenmesi

Serin hidrolaz ailesinin bir üyesi olan MGL enzimi; monogliseridlerin, serbest yağ asitleri ve gliserole dönüştürülmesinden sorumludur (Karlsson vd 1997).

MGL aktivitesinin tayininde Cayman marka ticari kit kullanılmıştır. MGL; 2-AG'yi, araşidonik asit ve gliserole hidrolizler. Bu yöntemde 2-AG'nin bir tiyoester analoğu olan araşidonil-1-tiyo-gliserol substrat olarak kullanılır. Tiyoester bağının MGL tarafından hidrolizi, serbest bir tiyol oluşumu ile sonuçlanır. Bu yapı, hızla DTNB ile reaksiyona girerek, 412 nm'de absorbans veren sarı renkli bir ürün oluşturur (Monoacylglycerol Lipase Inhibitor Screening Assay Kit 2008).

<u>Mekanizma:</u>



Bu çalışmada, uygulanan yöntem için girişim etkisi bulunmayan etanol, metanol ve DMSO çözücüleri kullanılarak öncelikle 2 g/mL derişimli *C. racemosa* ve *C. prolifera* özütleri hazırlanmıştır. Daha sonra uygun seyreltmelerle 1 g/mL, 0,5 g/mL ve 0,25 g/mL'lik seyreltik özütler oluşturulmuştur. Hazırlanan alg özütleri, inhibitör olarak kullanılmış ve çalışma ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek, bu enzim-inhibitör karışımları ve saf enzim için ilgili metoda göre aktivite tayini yapılmıştır. Reaksiyon ortamındaki alg konsantrasyonu 0,013 - 0,1 mg yaş alg/mL aralığında değişmektedir. Çizelge 2.4'de reaksiyon ortamının bileşimi gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. MGL enzim aktivitesi ölçüm ortamının bileşimi

Örnek	Ortamdaki alg konsantrasyonu (mg yaş alg/mL)	İnhibitör miktarı (µL)	Enzim miktarı (µL)	Tampon miktarı (µL)	Substrat miktarı (µL)	DTNB (µL)	Çözücü (µL)
KÖR	-	-	-	160	10	10	10
KONTROL	-	-	10	150	10	10	10
İNHİBİTÖR (2 g/mL)	105,2	10	10	150	10	10	-
İNHİBİTÖR (1 g/mL)	52,6	10	10	150	10	10	-
İNHİBİTÖR (0,5 g/mL)	26,3	10	10	150	10	10	-
İNHİBİTÖR (0,25 g/mL)	13,2	10	10	150	10	10	-

Sonuçlar; kullanılan kitin manuelinde belirtildiği şekilde hesaplanmış ve saf enzim için bulunan değerle, enzim-inhibitör karışımı için bulunan değerin kıyaslanması sonucu inhibisyon yüzdeleri belirlenmiştir.

Caulerpa özütlerinin tıbbi önemli çeşitli enzimler üzerindeki inhibisyon etkisinin belirlendiği bu çalışmalar sırasında kullanılan özütlerin, antioksidan sistemin temel enzimleri olan katalaz ve süperoksit dismutaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri de değerlendirilerek canlı organizmada oluşabilecek olası hasarların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.5.5. Katalaz (CAT) enzimi için inhibisyon etkisinin belirlenmesi

CAT; hidrojen peroksiti serbest oksijen ve suya parçalayan oksidoredüktaz türü bir enzimdir (Aebi 1974).

Bu çalışmada CAT aktivitesi, Aebi metoduna göre birim zamanda hidrojen peroksitin 240 nm'deki absorbans azalışından yararlanılarak ölçülmüştür (ε_{240}= 0,00394 ± 0,0002 L $mmol^{-1}$ mm^{-1}) (Aebi 1974).

Mekanizma

$$H_2O_2 \xrightarrow{CAT} H_2O + 1/2\ O_2$$

Öncelikle 10 – 1000 mg/mL konsantrasyon aralığında stok *C. racemosa* özütleri hazırlanmıştır. Enzim çözeltisine toplam hacim sabit olacak şekilde stok özütlerden farklı hacimlerde eklenmiş ve oluşturulan enzim-inhibitör karışımları 27 °C, 200 rpm'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Oluşturulan enzim-inhibitör karışımlarındaki alg konsantrasyonu 0,05 - 50 mg yaş alg/mL aralığında değişmektedir. Çizelge 2.5'de enzim – inhibitör sisteminin bileşimi gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. CAT enzimi – inhibitör sisteminin bileşimi

Örnek	**Ortamdaki alg konsantrasyonu (mg yaş alg/mL)**					**Enzim miktarı (µL)**	**Tampon miktarı (µL)**	**İnhibitör miktarı (µL)**
1	10 mg/mL	30 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	1000 mg/mL	20	975	5
	0,05	0,15	0,25	0,50	5			
2	10 mg/mL	30 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	1000 mg/mL	20	955	25
	0,25	0,75	1,25	2,50	25			
3	10 mg/mL	30 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	1000 mg/mL	20	930	50
	0,50	1,50	2,50	5	50			
4	0					20	980	0

Oluşturulan bu enzim-inhibitör karışımları ve saf enzim için standart koşullarda aktivite tayini yapılmıştır. Ölçümlerde substrat olarak 10 mM H_2O_2 çözeltisi kullanılmıştır. Substrat çözeltisinin 950 µL'si üzerine 50 µL enzim (ya da enzim-inhibitör karışımı) ilave edilerek aktivite belirlenmiştir. Bu aşamada sonuçların doğru değerlendirilebilmesi için inhibitör yerine sadece çözücü kullanılarak kontrol denemeleri de yapılmıştır.

2.5.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi için inhibisyon etkisinin belirlenmesi

SOD, serbest radikallerin hidrojen perokside dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (Halliwell ve Gutteridge 2003).

SOD aktivitesinin tayininde Ransod marka ticari kit kullanılmıştır. Bu metotta, ksantin ve ksantin oksidaz varlığında oluşturulan süperoksit radikalleri; 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazoliyum klorid ile reaksiyona girerek kırmızı renkli formazan boyasını oluştururlar. Ortamda SOD enziminin varlığında süperoksit radikalleri ortamdan uzaklaştırılacağı için formazan oluşumu inhibe edilir. SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon düzeyinin ölçülmesi ile belirlenir (Ransod superoxide dismutase kit 2006).

Mekanizma

$$\text{Ksantin} \xrightarrow{\text{XOD}} \text{Ürik asit} + O_2^{-\bullet}$$

$$\text{I.N.T} \xrightarrow{O_2^{-\bullet}} \text{Formazan boya}$$

ya da

$$O_2^{-\bullet} + O_2^{-\bullet} + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} O_2 + H_2O_2$$

Farklı konsantrasyondaki *C. racemosa* özütlerinin SOD enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin gözlenmesi amacıyla hazırlanan 100 mg/mL'lik stok alg özütünün farklı hacimleri, enzim çözeltisine ilave edilerek farklı karışımlar oluşturulmuştur. Enzim-inhibitör karışımları 27 ºC, 200 rpm'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Oluşturulan karışımlardaki alg konsantrasyonu 0,5 - 5 mg yaş alg/mL aralığında değişmektedir. Çizelge 2.6'da enzim – inhibitör sisteminin bileşimi gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. SOD enzimi – inhibitör sisteminin bileşimi

Örnek	Ortamdaki alg konsantrasyonu (mg yaş alg/mL)	Enzim miktarı (µL)	Tampon miktarı (µL)	İnhibitör miktarı (µL)
1	0,5	10	985	5
2	1	10	980	10
3	2,5	10	965	25
4	5	10	940	50
5	-	10	990	0

Bu enzim-inhibitör karışımları ve saf enzim için standart koşullarda aktivite tayini yapılmıştır. Kullanılan özütlerin, belirtilen konsantrasyonların hiç birinde SOD enzim aktivitesi üzerinde kayda değer bir inhibisyon oluşturmaması nedeniyle çözücü kullanılarak kontrol denemeleri yapılmamıştır.

Çalışmanın bir sonraki adımında, *C. prolifera* türü kullanılarak CYN saflaştırılmış ve elde edilen ürünün saflığı; zıt faz HPLC ve NMR spektroskopik yöntemleri ile test edilmiştir. Son aşamada ise *Caulerpa* özütleri ile önemli ölçüde inhibe olduğu saptanan α-amilaz, lipoksigenaz ve lipaz enzimlerinin *Caulerpa* türlerinin başlıca sekonder metaboliti olan CYN ile inhibisyonu için kinetik incelemeler yapılmıştır. Burada ayrıca ksantin oksidaz enzimi de incelenmiştir. *Caulerpa* özütleriyle ön çalışmaları tamamlanan diğer enzimler (PLA_2, CAT ve SOD) için gözlenen inhibisyon değerinin çok yüksek olmaması nedeniyle bu konuda daha ileri bir inceleme yapılmamıştır.

2.6. *C. prolifera* Türünden CYN'nin Saflaştırılması

Gerek kullanılan *Caulerpa* özütleri içindeki CYN miktarının tespiti gerekse özütlerle önemli ölçüde inhibisyonu gerçekleşen enzimlerin inhibisyonundan sorumlu bileşenin CYN olup-olmadığının belirlenebilmesi için, ticari olarak herhangi bir şekilde ulaşılamayan bu ürünün *Caulerpa* türlerinden izole edilmesi gerekmektedir.

Çeşme kıyılarından manuel olarak toplanan *C. prolifera* türü, canlılığını hemen yitirmemesi için deniz suyu içeren akvaryuma aktarılmış ve ortama hava verilmiştir. CYN saflaştırma işlemi için öncelikle fazla suyu filtre kağıdı ile uzaklaştırılan alg örneği hızla sıvı azotla muamele edilmiş ve etil asetat özütü hazırlanmıştır. Hazırlanan etil asetat özütü 3000 rpm'de 10 saniye santrifüjlenerek, süpernatant alınmıştır. Organik faz; susuz sodyum sülfat ile kurutulmuş, vakum evaporatöründe 50 °C'de, düşük basınç altında çözücüsü uçurulduktan sonra, petrol eteri – etil asetat (7:3) çözücü sistemiyle silikajel kolondan geçirilerek, farklı renkteki lekelere karşılık gelen örnekler farklı fraksiyonlarda toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlardaki CYN içeriği; ince tabaka kromatografisi (TLC) metodu ile UV ışık altında basit olarak tespit edilmiş ve ilgili fraksiyonlar bir kapta toplanmıştır. Hazırlanan bu faz deriştirildikten sonra tekrar petrol

eteri – dietileter (6:4) çözücü sistemiyle silikajel kolondan geçirilerek, 15'er mL'lik numune toplama kaplarında toplanmıştır. Toplanan örneklerde TLC analizi ile CYN tespiti yapılmış ve ilgili fraksiyonlar birleştirilerek, deriştirilmiştir. Çözücü uçurma işlemi yapılan balonun başlangıç ve son kütle değerleri arasındaki farktan yararlanılarak elde edilen CYN miktarı tespit edilmiştir. Örnek 10 mL metanol ile çözülerek, vialler halinde -20 °C'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Elde edilen son ürünün saflığı; zıt faz HPLC ve NMR spektroskopik yöntemleri ile belirlenmiştir (Cengiz vd 2009).

2.6.1. CYN'nin H-NMR spektrumu

CYN'nin ^{1}H NMR analizi Prof. Dr. Georg Pohnert tarafından Friedrich Schiller Üniversitesi (Jena-Almanya)'nde yapılmıştır. Spektrumlar; dötero kloroform ($CDCl_3$) çözücüsü kullanılarak, 200 MHz'de kaydedilmiştir.

2.6.2. HPLC'de CYN analizi

2.6.2.1. CYN için kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması

CYN konsantrasyonunun belirlenmesinde "HP Agilent 1100 Series" marka HPLC cihazı kullanılmıştır. Örnekler HPLC'de zıt faz C18 kolonu kullanılarak, DAD (Diode Array Detector) dedektörde analiz edilmişlerdir. Analizlerde "Teknokroma C18 150x4 mm" HPLC kolonundan yararlanılmıştır. HPLC çalışma koşulları aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

- Enjeksiyon Miktarı: 10 µL
- Kolon Fırın Sıcaklığı: 25 ºC
- Mobil Faz Akış Hızı: 0,4 mL/dk.
- Mobil Faz A: Su
- Mobil Faz B: metanol
- Dedeksiyon Dalga Boyu: 220 nm, 254 nm, 273 nm

Çalışmada öncelikle bilinen konsantrasyonlarda CYN içeren standart çözeltiler hazırlanmış ve bu çözeltiler HPLC'de analizlenmiştir. Analizlerde ortama internal standart (IS) madde olarak 4-metoksiasetofenon eklenmiştir. Ölçümler 3 kez tekrarlanmış ve sonuçta elde edilen değerlerin ortalamaları alınarak, CYN için kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır.

2.6.2.2. Kıyılarımızda yaygın olarak bulunan türlerdeki CYN içeriğinin tespiti

Kıyılarımızda yaygın olarak bulunan *Caulerpa* türlerindeki CYN içeriğinin tespit edilebilmesi amacıyla toplanan örneklerden hasar görmemiş yapılar seçilmiş, tuzlarından arındırılmak üzere yıkanmış ve yıkanan örneklerdeki su kalıntıları giderildikten sonra 1 g yaş alge 5 mL metanol eklenerek, soğuk ortamda, havanda homojenize edilmiştir. Homojenat 2 mL'lik santrifüj tüplerine alınarak 10000 rpm, +4 ^{o}C'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve daha ileri analizler için süpernatant kısmı ayrılmıştır. Bu kısım SPE C18 (Teknokroma) kartuşa uygulanarak, filtre edilmiştir. Filtrasyon sırasında kartuşa uygulanan örnekteki CYN kolonda tutularak, kolonu terk eden diğer bileşenlerden ayrılmıştır. Daha sonra bu bileşen, etil asetat – metanol (1:1) çözücü sistemi kolondan geçirilerek elde edilmiştir. Kolondan alınan son örnek, HPLC cihazında analize uygundur (Box vd 2008). Belirlenen optimum koşullar altında yapılan paralel analizler sonucunda elde edilen değerlerin ortalamaları alınarak, kıyılarımızda bulunan türlerdeki CYN içeriği belirlenmiştir.

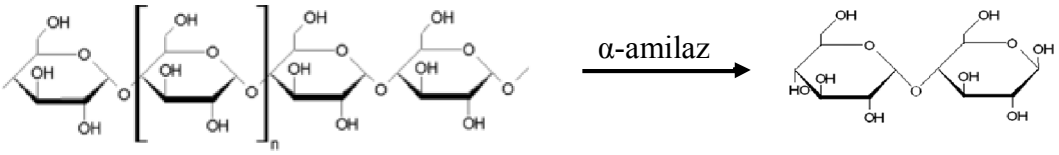
2.7. Çeşitli Enzimlerin CYN ile İnhibisyon Kinetiği

2.7.1. α-amilaz enziminin CYN ile inhibisyonunun kinetiği

Bakteriden izole edilen α-amilaz enzimi (EC. 3.2.1.1, Type II A) Sigma, nişasta da Merck firmalarından temin edilmiştir. α-amilaz enziminin aktivite tayini, Bernfeld tarafından uyarlanan Sigma-Aldrich kromojenik metoda göre yapılmıştır. Enzim aktivitesi; 6,7 mM NaCl içeren, pH=6,9 20 mM fosfat tamponunda hazırlanmış, % 1'lik nişasta çözeltisi kullanılarak tespit edilmiştir. Substrata ilavesinden önce enzim çözeltisi farklı konsantrasyonlarda CYN ile 1:1 oranında karıştırılmış ve optimum koşulların

belirlenebilmesi için 37 ºC'de 10 ve 30 dakikalık sürelerle inkübe edilmiştir. 30 dakikalık sürenin, enzim-inhibitör karışımı için optimum inkübasyon süresi olduğu tespit edilmiş ve daha sonraki çalışmalar bu koşullarda yapılmıştır. Bu metotta; nişastanın hidrolizi ile serbest hale geçen gruplar 3,5-dinitro salisilik asit ile türevlendirilerek, 540 nm'de yapılan absorbans ölçümü yardımıyla belirlenmiştir (Bernfeld 1951).

Mekanizma:



Enzim İnhibisyon Kinetiği

İnhibisyon türü, Michaelis-Menten ve Lineweaver–Burk eşitlikleri kullanılarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi, farklı konsantrasyonlardaki CYN'nin (0,25 mM, 0,75 mM ve 1 mM) ortamda bulunması ve bulunmaması durumlarında ayrı ayrı tespit edilmiştir. Çalışmalarda substrat olarak farklı konsantrasyonlarda nişasta çözeltisi (% 0,25 - 2,5) kullanılmış ve elde edilen veriler grafiğe geçirilerek; K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Tüm çalışmalar iki kez tekrarlanmış, ayrıca çözücü kontrolleri de yapılmıştır. Sonuçlar bağımsız iki ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir.

2.7.2. Lipoksigenaz (LOX) enziminin CYN ile inhibisyonunun kinetiği

Soya fasülyesinden izole edilen LOX-1 enzimi (EC. 1.13.11.12) ve linoleik asit Sigma firmasından temin edilmiştir. 27 mg linoleik asit; 50 mL 1,8 mM NaOH çözeltisinde çözülerek, pH=8,9 olan 1,8 mM'lık stok çözelti hazırlanmıştır. Çalışmada gerekli farklı konsantrasyonlardaki substrat çözeltileri, bu stok çözeltinin pH=9,0, 0,2 M fosfat tamponu ile seyreltilmesi ile hazırlanmıştır. LOX aktivitesi, 234 nm'de substrat olarak kullanılan linoleik asit çözeltisinin üzerine enzim ilavesinden sonraki 30. ve 90. saniyeler arasındaki absorbans artışı ölçülerek tespit edilmiştir.

Mekanizma:

$$\text{Yağ asidi} + O_2 \rightarrow \text{yağ asidi hidroperoksit}$$

Substrat çözeltileri her bir deneme öncesinde taze olarak hazırlanmıştır. Enzimin reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonu 167 U/mL'dir. Tüm çalışmalar 25 °C'de yürütülmüş ve denemeler süresince stok enzim çözeltisi buzda saklanmıştır.

Enzim İnhibisyon Kinetiği

İnhibisyon türü, Michaelis-Menten ve Lineweaver–Burk eşitlikleri kullanılarak belirlenmiştir. Metanolde hazırlanan stok inhibitör çözeltisi (10 mg/mL), fosfat tamponu ile seyreltilerek çalışmada kullanılan inhibitör konsantrasyonları hazırlanmıştır. Enzim çözeltisi, farklı konsantrasyonlarda CYN ile 1:1 oranında karıştırılmış ve oda koşullarında 10 dakikalık bir inkübasyon sonrasında ölçüm ortamına ilave edilmiştir. Enzim aktivitesi, farklı konsantrasyonlardaki CYN'nin ortamda bulunması ve bulunmaması durumlarında ayrı ayrı tespit edilmiştir. Çalışmalarda substrat olarak değişen konsantrasyonlarda linoleik asit çözeltisi (10 – 75 μM) kullanılmış ve elde edilen veriler grafiğe geçirilerek; K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Tüm çalışmalar beş kez tekrarlanmış, ayrıca çözücü kontrolleri de yapılmıştır. Sonuçlar bağımsız beş ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir.

2.7.3. Ksantin oksidaz (XOD) enziminin CYN ile inhibisyonunun kinetiği

Sütten izole edilen ksantin oksidaz (XOD) enzimi (EC. 1.1.3.22) Ransod firmasından, substrat olarak kullanılan ksantin Sigma firmasından temin edilmiştir. Ksantin suda çözünmediği için, örnek çok küçük hacimdeki NaOH çözeltisi içinde çözülmüş, daha sonra pH=9,0, 50 mM fosfat tamponu eklenerek 25 mM'lık stok çözelti oluşturulmuştur. Son çözeltinin pH=9,0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışmada gerekli farklı konsantrasyonlardaki substrat çözeltileri, bu stok çözeltinin pH=9,0, 50 mM fosfat tamponu ile seyreltilmesi ile hazırlanmıştır. Enzim aktivitesi, aerobik koşullar altında

reaksiyon sonucunda oluşan ürik asitin 292 nm'de absorbansının ölçülmesine dayalı olarak tayin edilmiştir.

Mekanizma:

$$\text{Ksantin} + H_2O + O_2 \rightarrow \text{Ürik asit} + H_2O_2$$

Substrat çözeltileri her bir deneme öncesinde taze olarak hazırlanmıştır. Enzimin reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonu 10 U/L'dir. Tüm çalışmalar 37 °C'de yürütülmüş ve denemeler süresince stok enzim çözeltisi buzda saklanmıştır. İnhibisyon denemelerinde enzim-inhibitör (CYN) 1:1 oranında karıştırılmış ve optimum koşulların belirlenebilmesi için 37 ºC'de 30 ve 60 dakikalık sürelerle inkübe edilmiştir. 60 dakikalık sürenin, enzim-inhibitör karışımı için optimum inkübasyon süresi olduğu tespit edilmiş ve daha sonraki çalışmalar bu koşullarda yapılmıştır.

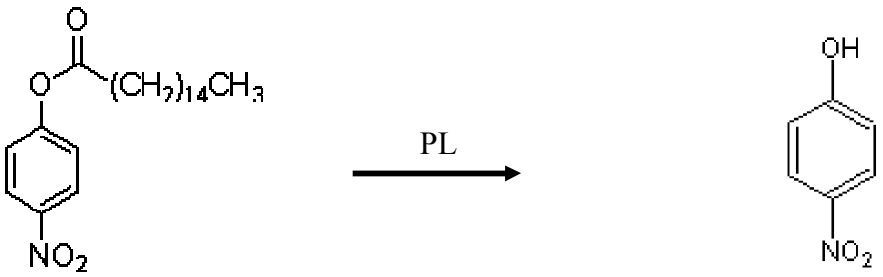
Enzim İnhibisyon Kinetiği

İnhibisyon türü, Michaelis-Menten ve Lineweaver–Burk eşitlikleri kullanılarak belirlenmiştir. Metanolde hazırlanan stok inhibitör çözeltisi (10 mg/mL), fosfat tamponu ile seyreltilerek çalışmada kullanılan inhibitör konsantrasyonları hazırlanmıştır. Enzim çözeltisi, farklı konsantrasyonlarda CYN ile 1:1 oranında karıştırılmış ve 37 ºC'de 60 dakikalık bir inkübasyon sonrasında ölçüm ortamına ilave edilmiştir. Enzim aktivitesi, farklı konsantrasyonlardaki CYN'nin ortamda bulunması ve bulunmaması durumlarında ayrı ayrı tespit edilmiştir. Çalışmalarda substrat olarak farklı konsantrasyonlarda ksantin çözeltisi (0,015 – 0,2 mM) kullanılmış ve elde edilen veriler grafiğe geçirilerek; K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Tüm çalışmalar iki kez tekrarlanmış, ayrıca çözücü kontrolleri de yapılmıştır. Sonuçlar bağımsız iki ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir.

2.7.4. Pankreatik lipaz (PL) enziminin CYN ile inhibisyonunun kinetiği

Domuzdan izole edilen pankreatik lipaz (PL) enzimi (Tip II, EC. 3.1.1.3) Sigma firmasından, p-nitrofenilpalmitat (p-NPP) Alfa Aeser firmasından ve Triton X-100 de Fluka firmasından temin edilmiştir. Yöntemde 5 mg p-NPP, 1 mL 2-propanolde çözülmüş, üzerine % 2 oranında Triton X-100 içeren 50 mM pH=8,0 fosfat tamponu eklenerek 1324 µM derişimli stok substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Çalışmada gerekli farklı konsantrasyonlardaki substrat çözeltileri, bu stok çözeltinin Triton X-100 içeren 50 mM pH=8,0 fosfat tamponu ile seyreltilmesi ile hazırlanmıştır. Enzim; 50 mM pH=8,0 fosfat tamponu kullanılarak derişimi 10 mg/mL olacak şekilde hazırlanmış, bu çözeltinin 250 µL'si 450 µL substrat ve 300 µL tampon içeren ölçüm ortamına ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı 37 ºC, 300 rpm'de 30 dakika inkübe edilmiş ve süreç sonunda üzerine 1 mL 2-propanol eklenerek, 4000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Enzim aktivitesi, p-NPP'nin hidrolizi ile serbest hale geçen p-nitrofenolün (p-NP) absorbansının 410 nm'de ölçümü yardımıyla belirlenmiştir. Enzim aktivitesi; 1 dakikada ortama salınan p-NP'nin mikromol miktarı olarak ifade edilmiştir. Tüm çalışmalar 37 °C'de yürütülmüş ve denemeler süresince stok enzim çözeltisi buzda saklanmıştır.

Mekanizma:



Enzim İnhibisyon Kinetiği

İnhibisyon türünün belirlenmesine yönelik çalışmalarda metanolde hazırlanan stok inhibitör çözeltisi (10 mg/mL), fosfat tamponu ile seyreltilerek çalışmada kullanılan inhibitör konsantrasyonları (0,5; 1; 5; 8; 10; 16; 20; 24; 32; 48; 64; 80; 100; 150 ve 200 µM) hazırlanmıştır. Enzim çözeltisi, farklı konsantrasyonlarda CYN ile

1:1 oranında karıştırılmış ve optimum koşulların belirlenebilmesi için 37 ºC'de 15 ve 30 dakikalık sürelerle inkübe edilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon süresinin daha anlamlı sonuçlar verdiği tespit edilmiş ve daha sonraki çalışmalar bu koşullarda yapılmıştır. Enzim aktivitesi, farklı konsantrasyonlardaki CYN'nin ortamda bulunması ve bulunmaması durumlarında ayrı ayrı tespit edilmiştir. Çalışmalarda substrat olarak farklı konsantrasyonlarda p-NPP çözeltisi (200 - 1250 µM) kullanılmıştır. Tüm çalışmalar beş kez tekrarlanmış, ayrıca çözücü kontrolleri de yapılmıştır.

2.8. İstatiksel Analiz

Yapılan analizler sonucunda elde edilen bilimsel verilerin değerlendirilmesinde MiniTAB 14.0 paket programı kullanılmıştır. Deneysel verilerin arasındaki farklılığın belirlenmesinde ANOVA ve Tukey testlerinden yararlanılmıştır. Bu analizlerde $p<0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. Veriler arasındaki korelasyonun tespiti ise Pearson korelasyon testi ile yapılmıştır.

3. BULGULAR

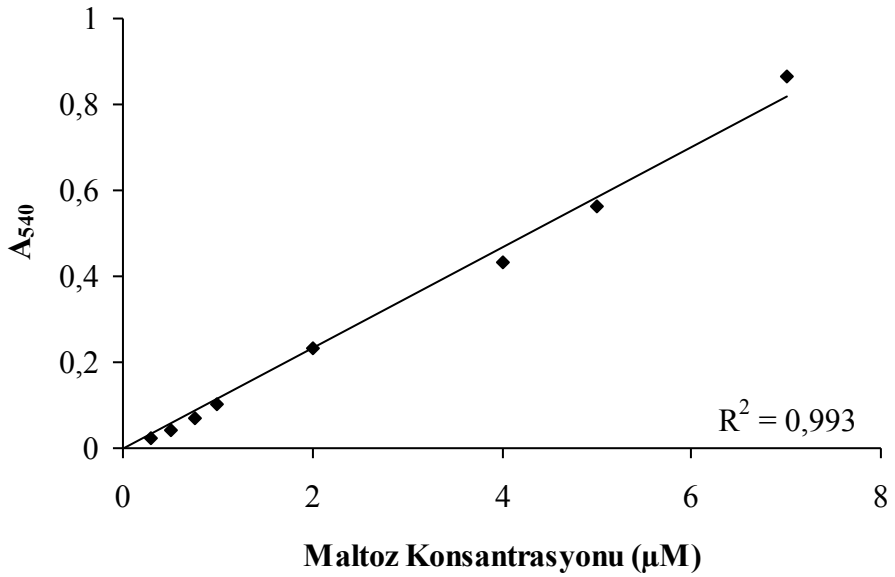
3.1. *Caulerpa* Özütlerinin Enzim İnhibitörü Olarak Etkisinin Belirlenmesi

Son yıllarda tıp alanında önemli gelişmeler kaydedilmektedir. Bu gelişmelerle birlikte hem daha önce tedavisi pek mümkün olmayan çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek hem de hâlihazırda kullanılan ancak etkinliği azalmış (buna karşı direnç sağlanmış) ya da çeşitli yan etkilere sahip ilaçlara alternatif olabilecek ilaçların üretimi konusunda da artan bir hızla çalışmalar sürdürülmektedir. Bu konuda yapılan bazı çalışmaların sonuçları, konuya ilgi duyan araştırmacıları doğal ürünlerin kullanımına teşvik etmektedir. Bu aşamada özellikle de çeşitli toplumlarda geleneksel olarak bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan karasal bitkiler önemli bir hammadde kaynağı oluşturmaktadır. Ancak dünyanın büyük bir kısmının su ile kaplı olduğu ve sucul ekosistemde yaşayan canlıların kendilerini predatörlerinden koruyabilmek için daha çok metabolit salgılıyor olabileceği düşünülürse, bu ortamda yaşayan türlerin de potansiyellerinin incelenmesi gerektiği açıkça görülecektir.

Bu çalışma da üç tarafı denizlerle çevrili olan ülkemizde, denizlerimizde yüksek oranda yayılım gösteren *Caulerpa* türünün olası farmakolojik potansiyelinin belirlenmesi ve türün medikal endüstriye kazandırılmasını amaçlamaktadır.

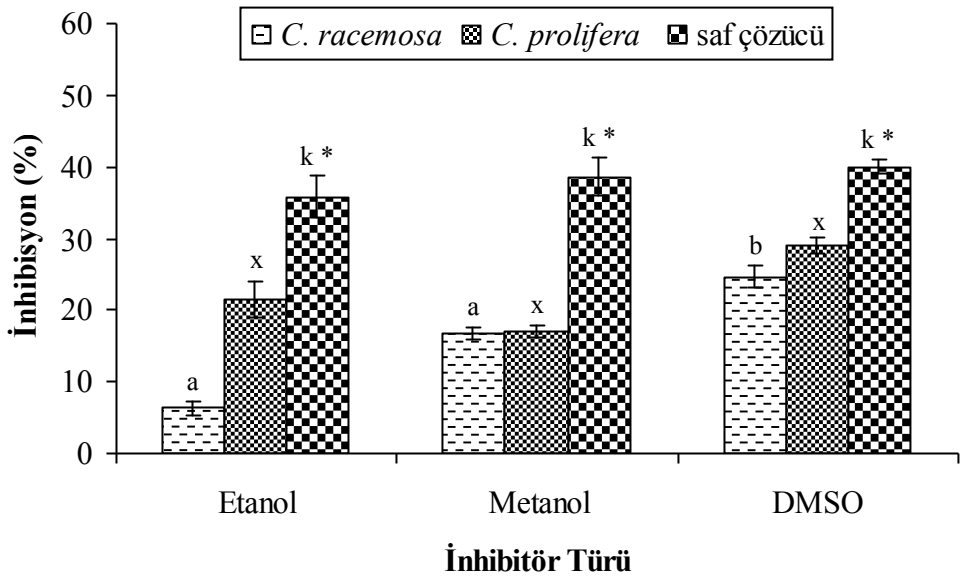
3.1.1. *Caulerpa* özütlerinin α-amilaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çalışmada öncelikle maltoz standardı kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.1).



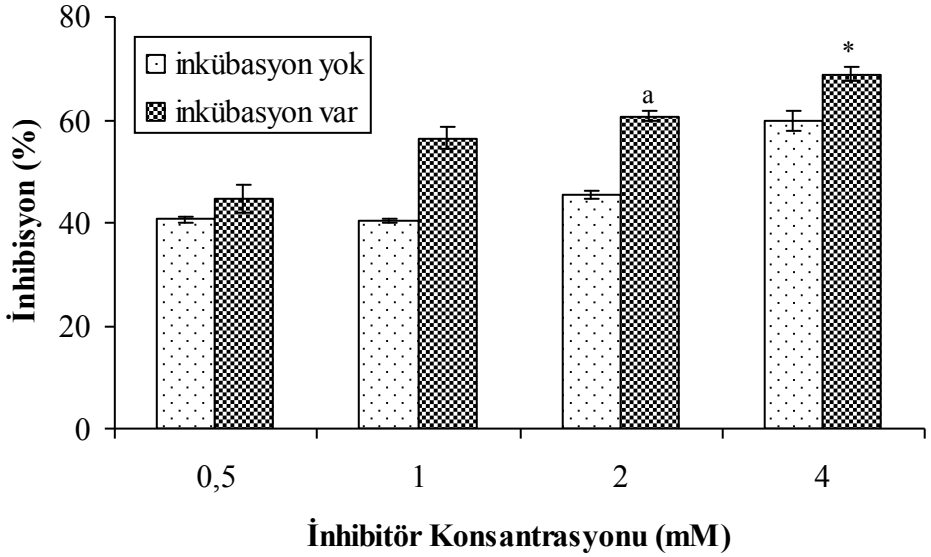
Şekil 3.1. α-amilaz enzim aktivitesi tespiti için kalibrasyon grafiği

Caulerpa özütlerinin α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin belirlenebilmesi için farklı çözücüler kullanılarak 1 g/mL derişimli örnekler hazırlanmış ve bunların varlığında enzimin aktivitesindeki değişim değerlendirilmiştir. İki türün ham özütleri ve saf çözücü ile yapılan kontrol testlerinde bulunan inhibisyon değerleri Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. *C. racemosa* ve *C. prolifera*'nın etanol, metanol ve DMSO özütlerinin α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi. t= 37 °C, substrat: % 1'lik nişasta çözeltisi. Ortamdaki inhibitör konsantrasyonu; 25 mg yaş alg/mL'dir. Sonuçlar üç bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları üzerindeki harfler; *C. racemosa*, *C. prolifera* ve saf çözücü gruplarının kendi içindeki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$). Hata çubukları üzerindeki yıldız işareti; saf çözücü ve *C. prolifera* özütünün, aynı çözücü ile hazırlanan *C. racemosa* özütü ile istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$)

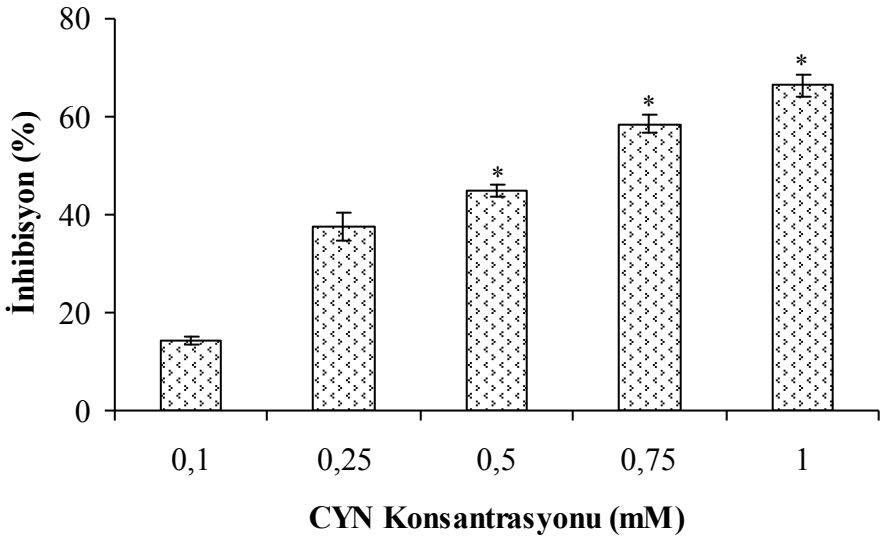
Deneysel veriler incelendiğinde, *Caulerpa* türlerinden elde edilen çeşitli özütlerin α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin maksimum % 29 civarına ulaşabildiği, buna karşın saf çözücü ile yapılan denemelerde bu değerin % 40'a yaklaştığı görülmektedir. Oysa Teixeira vd (2007) *C. racemosa*'nın aseton özütünün, α-amilaz enzim aktivitesi üzerinde güçlü bir inhibisyon etkisi oluşturduğunu ifade etmişlerdir. Bu nedenle çalışmada kullanılan yöntemin uygun koşullarda uygulanıp-uygulanmadığının test edilmesine karar verilmiştir. Bu noktada α-amilaz enzimi için literatürde tanımlanmış bir inhibitör olan $CdCl_2$ tuzundan yararlanılmıştır. Hazırlanan $CdCl_2$ tuzu inhibitör gibi kullanılmış ve ölçüm ortamına farklı konsantrasyonlarda ilave edilerek, enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi değerlendirilmiştir. İnhibitörün etkisi; enzim ile 37 °C, 170 rpm'de 30 dakika inkübe edilmesi ve doğrudan ölçüm ortamına ilave edilmesi durumunda olmak üzere iki koşulda incelenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Cd^{2+} iyonunun α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi. t= 37 °C, substrat: % 1'lik nişasta çözeltisi. Sonuçlar üç bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir Hata çubukları üzerindeki yıldız işareti; 0,5 mM derişimdeki inhibitör ile karşılaştırılma durumundaki istatistiksel farklılığı, [a] harfi ise aynı konsantrasyondaki inhibitörün, farklı koşullardaki inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması durumundaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$)

Sonuçlar; α-amilaz enziminin Cd^{2+} iyonu varlığında konsantrasyona bağlı olarak inhibe olduğunu göstermektedir. Substrat ilavesi öncesinde, enzimin inhibitör ile inkübasyonu inhibisyon oranını arttırmaktadır. Bu sonuçların ışığı altında, aktivite belirlemede kullanılan yöntemin uygulanmasında problem olmadığına karar verilmiştir. Şekil 3.2'de saf çözücülerin α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin, ilgili çözücülerle hazırlanan *Caulerpa* özütlerine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum; *Caulerpa* türlerinden ilgili özütlerin hazırlanması sırasında çözücülerin, alglerin hücresel yapısı içerisinde yüksek oranda bulunan su nedeniyle seyrelmesinden kaynaklanmış olabilir. Yine bu grafik dikkatle incelenecek olursa CYN içeriğinin daha yüksek olduğu bilimsel literatürde rapor edilen *C. prolifera* türünün, *C. racemosa*'ya göre daha güçlü bir inhibisyon oluşturduğu görülmektedir. Bu nedenle ortama ilave edilen çözücü oranı azaltılıp, aktif bileşen CYN oranı arttırılabilirse inhibisyon yüzdesinin de artacağı düşünülmüş ve bu ön çalışma saf CYN'nin çeşitli

konsantrasyonlarda ortama ilavesi sonunda aktivitenin belirlenmesi ile sonlandırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.4'de gösterilmiştir.

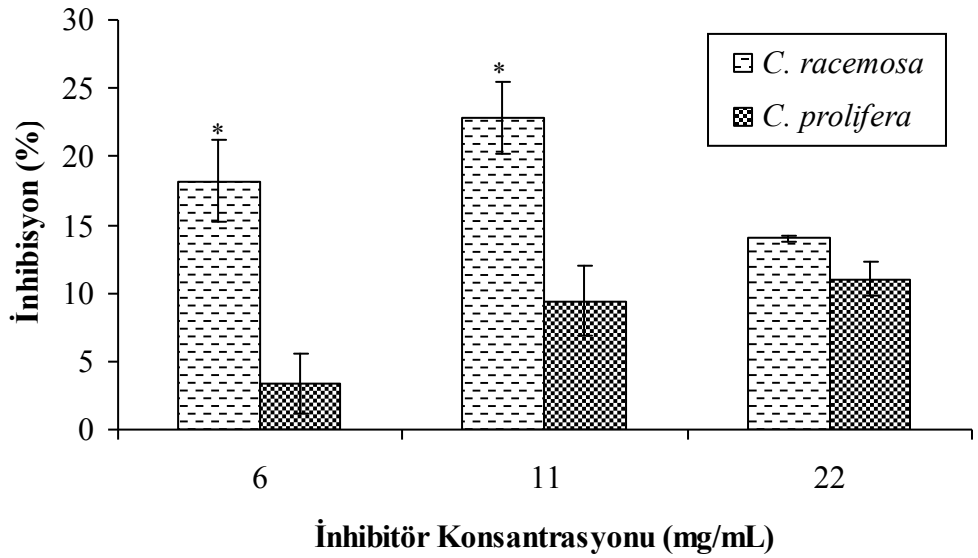


Şekil 3.4. Saf CYN'nin α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi. t= 37 °C, substrat: % 1'lik nişasta çözeltisi. Sonuçlar iki bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları üzerindeki yıldız işareti; 0,1 mM derişimdeki CYN ile karşılaştırılma durumundaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$)

Bu grafikten de net olarak görüldüğü üzere α-amilaz enzimi saf CYN ile konsantrasyona bağlı olarak önemli ölçüde inhibe olmaktadır (IC_{50}: 0,51 mM). Bu nedenle ilgili enzimin inhibisyon kinetiğinin incelenmesi ve inhibisyon türünün belirlenmesi kararlaştırılmıştır.

3.1.2. *Caulerpa* özütlerinin PLA_2 enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Bu çalışmada kıyılarımızda yaygın olarak bulunan iki farklı *Caulerpa* türünün, aktivite belirlemede kullanılan kitte yöntemle girişim etkisi bulunmadığı ifade edilen DMSO ile hazırlanmış özütlerinin farklı konsantrasyonlarının PLA_2 (arı zehiri) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.5'de sunulmuştur.



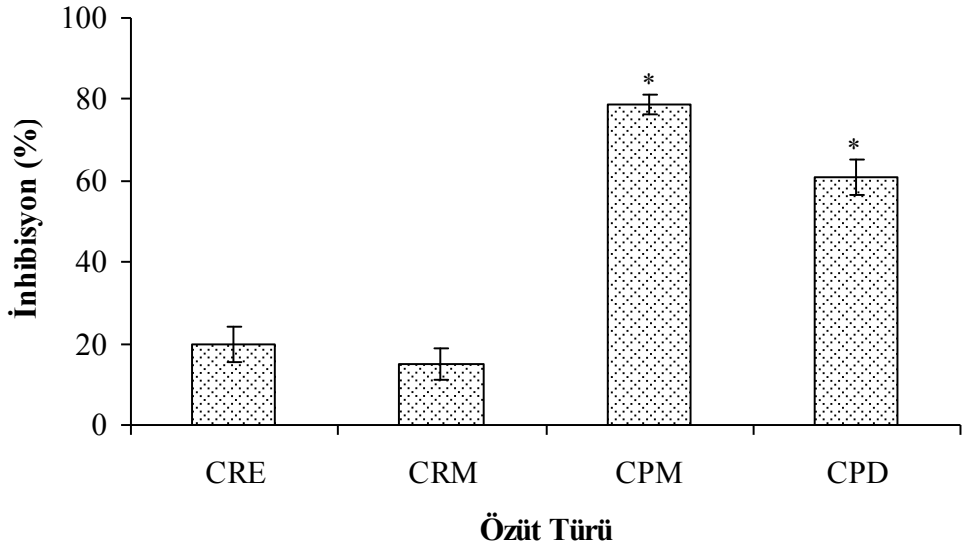
Şekil 3.5. *C. racemosa* ve *C. prolifera*'nın DMSO özütlerinin PLA_2 enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlılığı. Sonuçlar iki bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları üzerindeki yıldız işareti; farklı alg türü kullanılarak aynı konsantrasyonda hazırlanmış özütler arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$)

Çalışmada her iki tür için de PLA_2 enzim aktivitesi üzerinde çok yüksek bir inhibisyon etkisi gözlenememiştir. Maksimum inhibisyon değeri *C. racemosa* özütü için % 23 civarında, *C. prolifera* özütü için % 11 civarında bulunmuştur (Şekil 3.5). Grafikten de görülebileceği gibi *C. racemosa* için inhibisyon yüzdesi inhibitör konsantrasyonuna bağlı değildir. Bu durum, yüksek inhibitör konsantrasyonu ile çalışılması koşulunda, kullanılan kitin manuelinde yönteme girişim yaptıkları belirtilen "tiyol süpürücü" grupların konsantrasyonunun artmasından kaynaklanıyor olabilir. Buna karşın, *C. prolifera* için inhibisyon yüzdesi inhibitör konsantrasyonu ile uyumludur.

3.1.3. *Caulerpa* özütlerinin 15-LOX enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

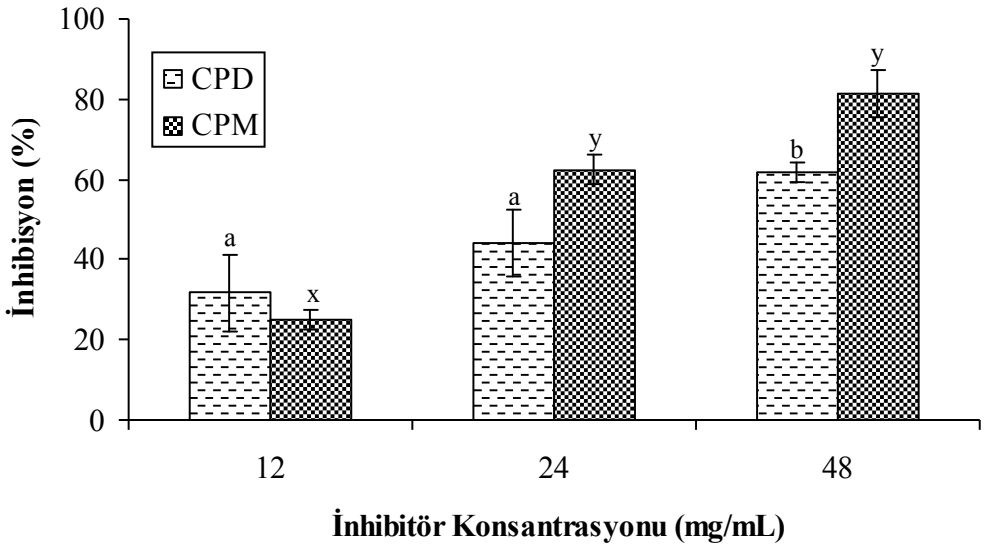
Öncelikle farklı çözücülerle hazırlanan *C. racemosa* ve *C. prolifera* özütlerinin 15-LOX enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir (Şekil 3.6). Çalışmada, DMSO ile hazırlanan *C. racemosa* (CRD) ve etanol ile hazırlanan *C. prolifera* (CPE) özütleri için negatif inhibisyon değerleri elde edilmiştir. Bu nedenle

hazırlanan tüm özütler, uygulanan koşullarda girişim yapıp yapmadıklarının belirlenebilmesi için aktivite belirlemede kullanılan kitin manuelinde belirtildiği şekilde girişim testine tabi tutulmuş ve belirtilen iki özütün (CRD ve CPE) yöntemde girişim oluşturduğu tespit edildiğinden ilgili veriler grafikte gösterilmemiştir.



Şekil 3.6. *C. racemosa*'nın etanol (CRE) ve metanol (CRM) özütleri ile *C. prolifera*'nın metanol (CPM) ve DMSO (CPD) özütlerinin 15-LOX enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi. Ortamdaki inhibitör konsantrasyonu; 48 mg yaş alg/mL'dir. Sonuçlar üç bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları üzerindeki yıldız işareti; CRE özütü ile karşılaştırıldığındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$)

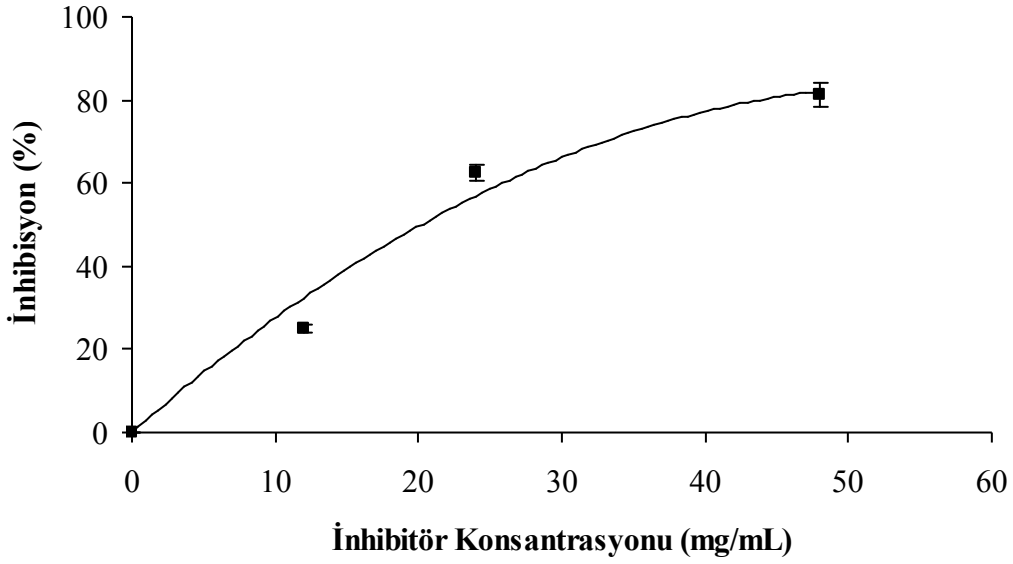
Şekil 3.6 *C. prolifera* özütlerinin, *C. racemosa* özütlerinden daha güçlü bir inhibisyon etkisi oluşturduğunu göstermektedir. Aynı çözücü (metanol) kullanılarak oluşturulan *C. prolifera* özütü için elde edilen inhibisyon değeri, *C. racemosa* özütü için elde edilene göre anlamlı bir fark oluşturmaktadır ($p<0,05$). Bu nedenle sonraki çalışmalar için *C. prolifera* özütü seçilmiş ve farklı konsantrasyonlardaki *C. prolifera* özütleri inhibitör olarak kullanılarak, inhibisyon etkisinin inhibitör konsantrasyonuna bağlılığı gözlenmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. *C. prolifera*'nın metanol (CPM) ve DMSO (CPD) özütlerinin 15-LOX enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlılığı. Sonuçlar üç bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları üzerindeki harfler; CPM ve CPD gruplarının kendi içindeki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$)

Yapılan korelasyon testine göre 15-LOX enziminin % inhibisyon değeri ile hem DMSO özütü konsantrasyonu hem de metanol özütü konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir ($r= 0,917$, $p<0,05$; $r= 0,910$, $p<0,05$). Maksimum inhibisyon değeri DMSO özütü için % 62 civarında, metanol özütü için ise % 81 civarında bulunmuştur (Şekil 3.7).

15-LOX enzim aktivitesi üzerinde oldukça güçlü bir inhibisyon etkisi oluşturan *C. prolifera* türünün metanolik özütü için IC_{50} değeri 19 mg/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. 15-LOX enziminin inhibisyon değerinin (%) *C. prolifera* metanolik özütünün konsantrasyonuna bağlı değişimi. Sonuçlar dört bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir

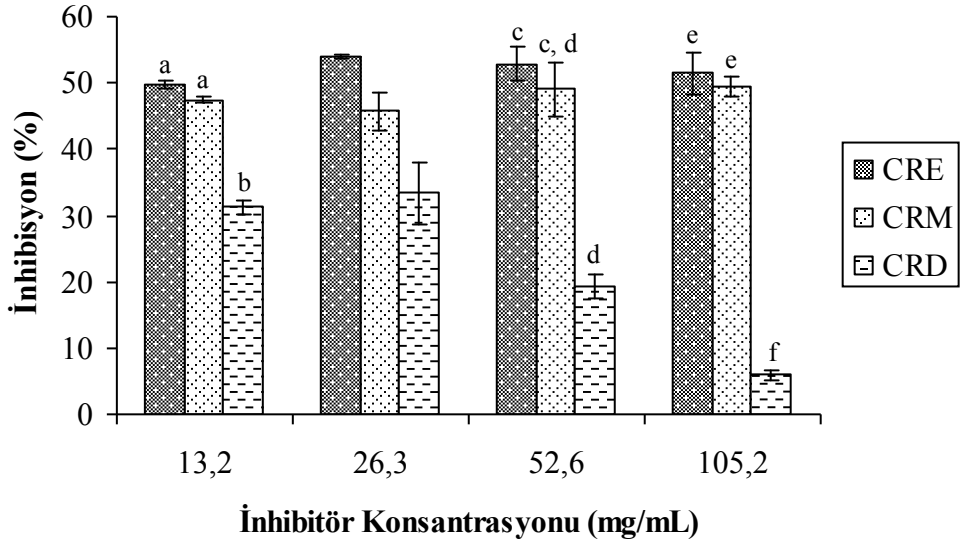
Maiga vd (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, Afrika'da geleneksel olarak terapötik amaçlı kullanılan bazı bitkilerin antioksidan özellikleri incelenmiştir. Bu bitkilerin antioksidan aktiviteleri ile ilişkili olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde etkili olabilecekleri düşünülmüş ve bu nedenle hazırlanan özütlerin 15-LOX enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi yine aynı çalışma kapsamında değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçları; radikal sönümleme etkisinin yüksek olduğu özütlerde, 15-LOX aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin de yüksek olduğunu göstermiştir (Maiga vd 2006). Yine yapılan çeşitli çalışmalarda lipoksigenaz inhibitör aktivitesinin; kolon kanser hücrelerini de içeren tümörlü hücrelerde büyümeyi inhibe ettiği ve apoptosise neden olduğu gösterilmiştir (Rioux ve Castonguay 1998, Steele vd 1999, Bednar vd 2007). Cavas ve Yurdakoc (2005a) Akdeniz makrofitlerinin antioksidan sistemlerinin karşılaştırmasını yaptıkları çalışmalarında, *C. racemosa*'nın antioksidan enzim aktivitelerinin çalışılan diğer türlere kıyasla oldukça yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Yine aynı grup yapmış oldukları bir diğer çalışmada *C. racemosa*'nın metanol özütü ve CYN'nin 2 tür nöroblastoma hücresi, SHSY5Y ve Kelly, üzerinde apoptotik etki gösterdiğini bulmuşlardır (Cavas vd 2006). Yukarıda belirtilen radikal sönümleme etkisi ile 15-LOX enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi arasında gözlenen pozitif korelasyonun

varlığı ve lipoksigenaz inhibitörlerinin apoptosise neden olması gibi faktörler göz önüne alındığında *Caulerpa* türleri için daha önceki çalışmalarda ortaya konmuş olan bu sonuçlar, ilgili türlerin LOX enzim aktivitesinin inhibisyonuna yönelik olarak kullanılabileceğini desteklemektedir.

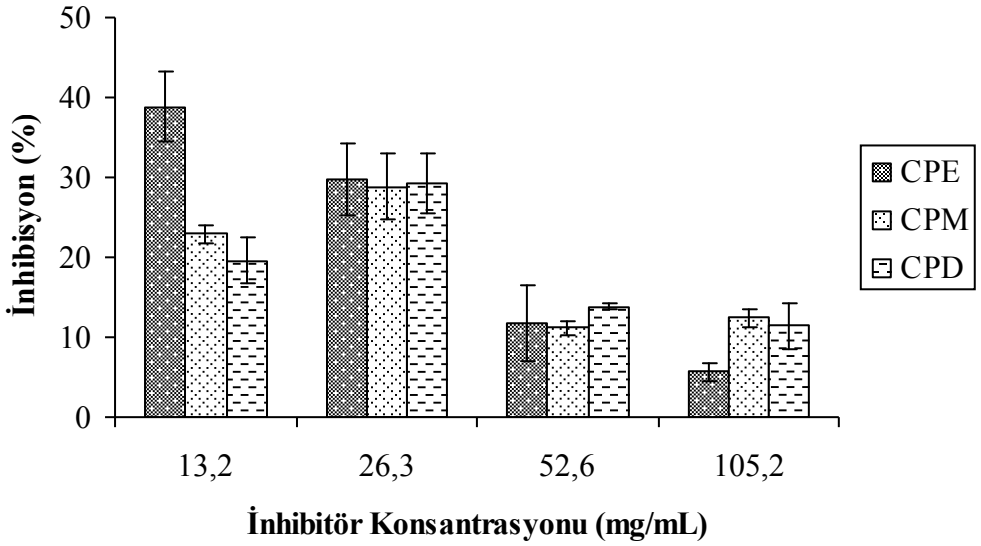
3.1.4. *Caulerpa* özütlerinin MGL enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Farklı çözücülerle hazırlanan *C. racemosa* ve *C. prolifera* özütlerinin MGL enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir. Sonuçlar, *C. racemosa* ve *C. prolifera* için sırasıyla Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da gösterilmiştir.

Ham *Caulerpa* özütleri için elde edilen sonuçlar incelendiğinde özellikle *C. racemosa* türünden etanol ve metanol varlığında hazırlanmış özütlerin, enzim aktivitesi üzerinde yaklaşık olarak % 50 oranında inhibisyona neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.9). Buna karşın, eşdeğer konsantrasyondaki *C. prolifera* özütleri için bulunan % inhibisyon değerleri daha düşüktür (Şekil 3.10).

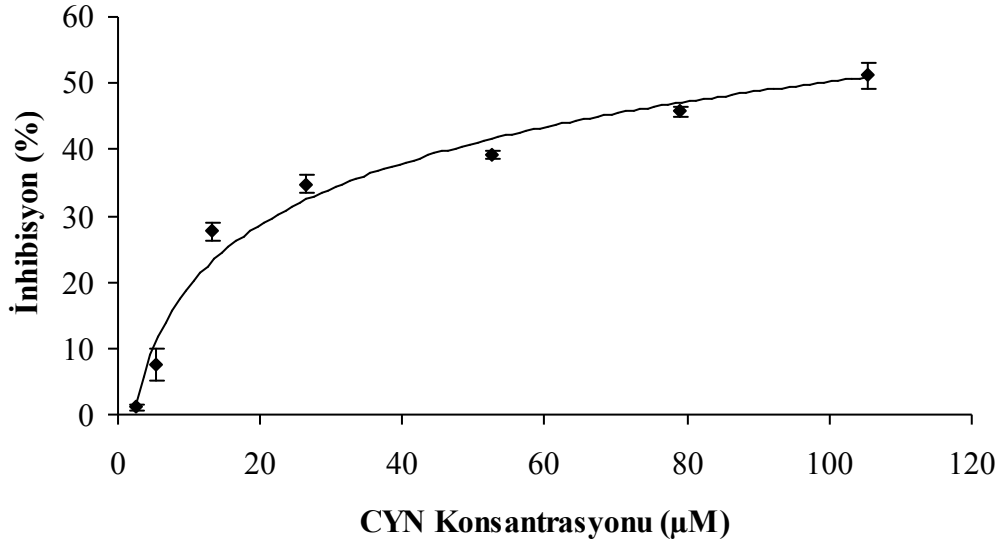


Şekil 3.9. *C. racemosa*'nın etanol (CRE), metanol (CRM) ve DMSO (CRD) özütlerinin MGL enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi. Sonuçlar iki bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları üzerindeki harfler; farklı çözücüler kullanılarak aynı konsantrasyonda hazırlanmış özütler arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$)



Şekil 3.10. *C. prolifera*'nın etanol (CPE), metanol (CPM) ve DMSO (CPD) özütlerinin MGL enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi. Sonuçlar iki bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir

Ham özüt içinde pek çok farklı bileşen olması mümkün olduğundan inhibisyon etkisinin hangi bileşenden kaynaklandığı veya ortamdaki çeşitli bileşenlerin sinerjetik bir etkisi sonucu oluşup-oluşmadığı bilinmemektedir. Yapılan çalışmada inhibitör konsantrasyonu ile inhibisyon yüzdesi arasında net bir korelasyon gözlenemiyor olması da bu nedenden kaynaklanıyor olabilir. % inhibisyonun *C. prolifera* türünden elde edilen özütlerde daha düşük oranda gözlenmesi, inhibisyondan sorumlu bileşenin CYN olup-olmadığı konusundaki şüpheleri arttırmaktadır. Bu nedenle MGL inhibisyonundan sorumlu bileşenin, *Caulerpa* türlerinin başlıca sekonder metaboliti olan CYN maddesi olup-olmadığını ve eğer sorumlu ise etkisini belirlemek amacıyla çalışma, ortama ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki CYN ile tekrarlanmıştır. Sonuçlar; MGL enziminin CYN ile miktara bağlı olarak inhibe olduğunu göstermektedir. CYN varlığında MGL inhibisyonu için IC_{50} değeri 98,4 μM olarak belirlenmiştir (Şekil 3.11).



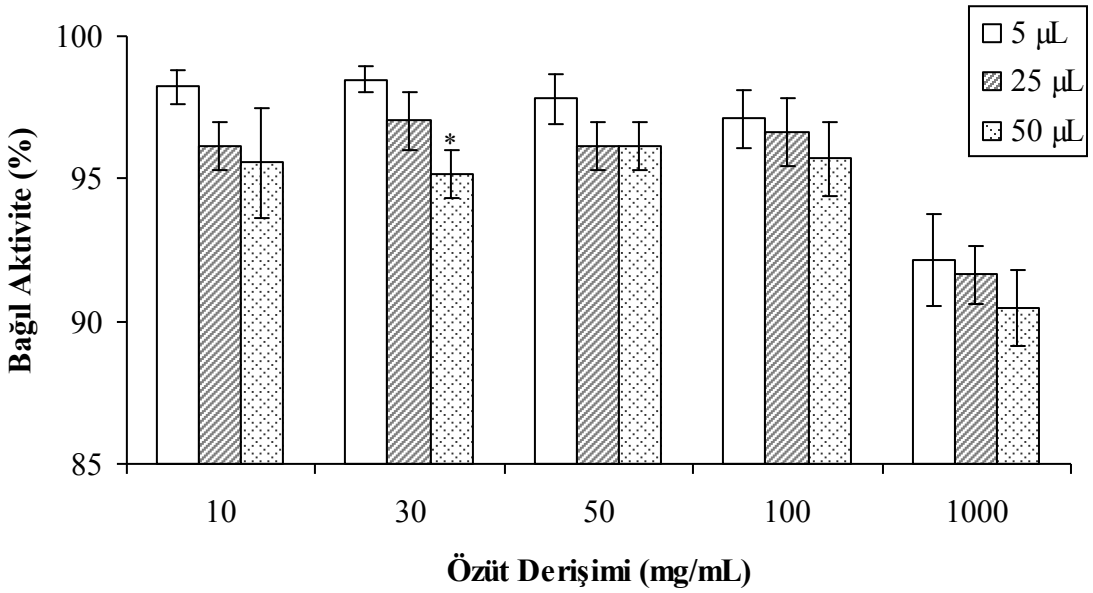
Şekil 3.11. Saf CYN'nin MGL enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlılığı. Sonuçlar üç bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir

Çalışma sonuçları, MGL enzimi inhibisyonunda CYN'nin oldukça etkili bir bileşen olduğunu ortaya koymaktadır. Artan CYN konsantrasyonu ile MGL enzimi inhibisyonu arasında pozitif bir korelasyonun var olduğu saptanmıştır. CYN varlığında gözlenen bu dikkat çekici inhibisyon için kinetik inceleme yapılmasına karar verilmiştir. Ancak enzim kitleri ile yapılan çalışmalarda sadece belirli konsantrasyonlarda substrat kullanımının mümkün olması nedeniyle kinetik inceleme yapmak mümkün değildir. Bu nedenle kinetik çalışmalarda, inhibitör ile benzer etkileşimler göstereceği düşünülen pankreatik lipaz enzimi kullanılmıştır.

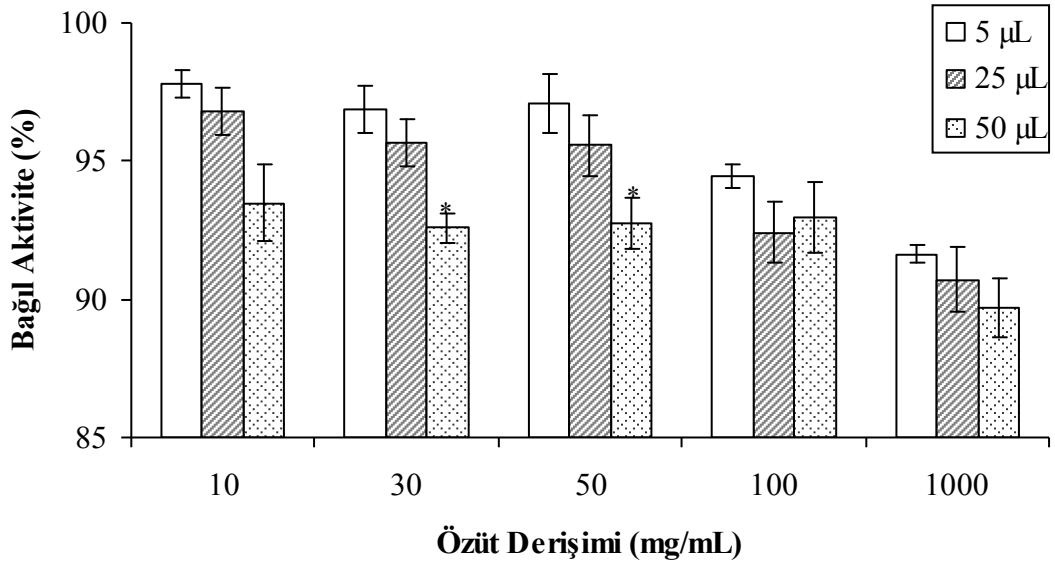
3.1.5. *Caulerpa* özütlerinin CAT enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çalışmada, çeşitli enzimler için inhibisyon etkisi belirlenen *Caulerpa* özütlerinin, vücudun savunma sisteminin bir parçasını oluşturan antioksidan enzimler üzerindeki olası etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bu amaçla yapılan ön çalışmalarda hacimsel olarak fazla miktarda *Caulerpa* özütü kullanılmasının; hem kullanılan çözücünün ortamdaki enzime etkisi hem de enzimin aktivite göstermesi için gerekli tampon ortamının bozulması nedeniyle uygun olmayacağı, aktivite kaybının da bu

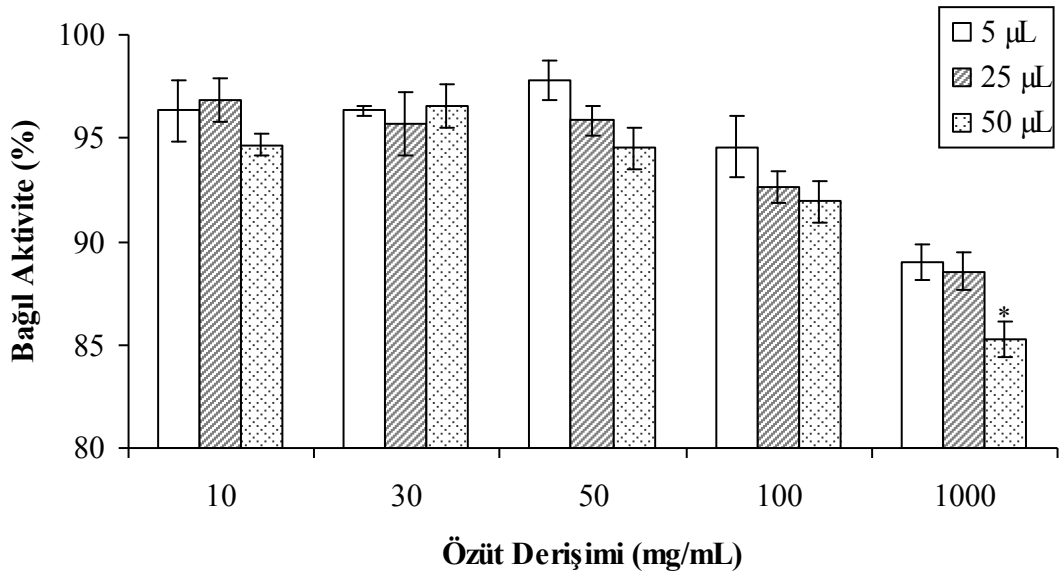
nedenden kaynaklanabileceği belirlenmiştir. Bu nedenle derişimleri 10 mg/mL, 30 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL ve 1000 mg/mL olacak şekilde çeşitli özütler hazırlanmış, bu özütler 27 °C, 200 rpm'de 10 dakika boyunca enzim ile inkübe edildikten sonra optimum koşullarda aktivite belirlenmiştir. *C. racemosa* türünün farklı çözücülerle hazırlanan özütleri için bulunan sonuçlar Şekil 3.12, Şekil 3.13 ve Şekil 3.14'de gösterilmiştir.



Şekil 3.12. *C. racemosa*'nın su özütünün CAT enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlı değişimi. t= 27 °C, [CAT]=20 µg/mL, $[H_2O_2]$=10 mM. Sonuçlar üç bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları üzerindeki yıldız işareti; aynı özüt derişiminde, 5 µL'lik örnek ile karşılaştırılma durumundaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$)

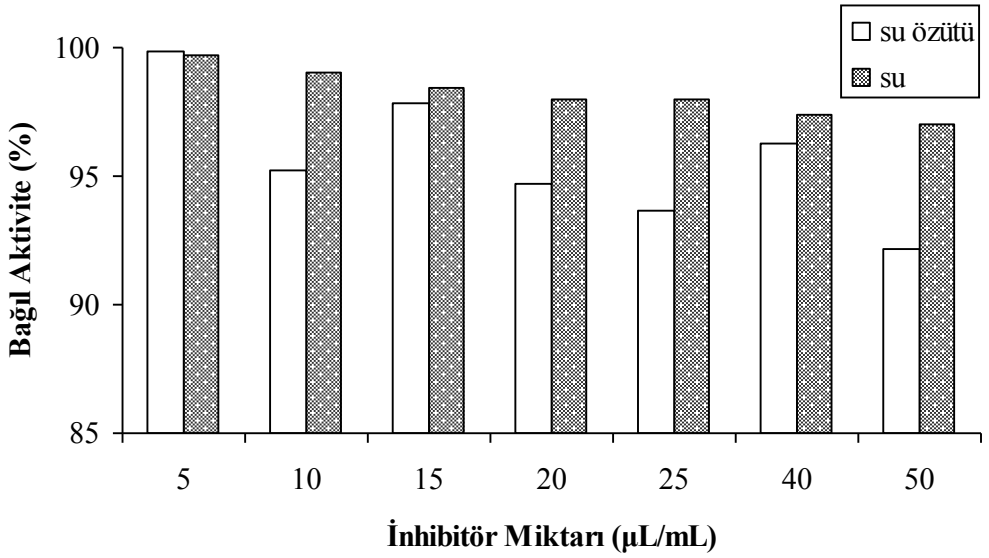


Şekil 3.13. *C. racemosa*'nın etanol özütünün CAT enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlı değişimi. t= 27 °C, [CAT]=20 µg/mL, [H_2O_2]=10 mM. Sonuçlar üç bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları üzerindeki yıldız işareti; aynı özüt derişiminde, 5 µL'lik örnek ile karşılaştırılma durumundaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$)

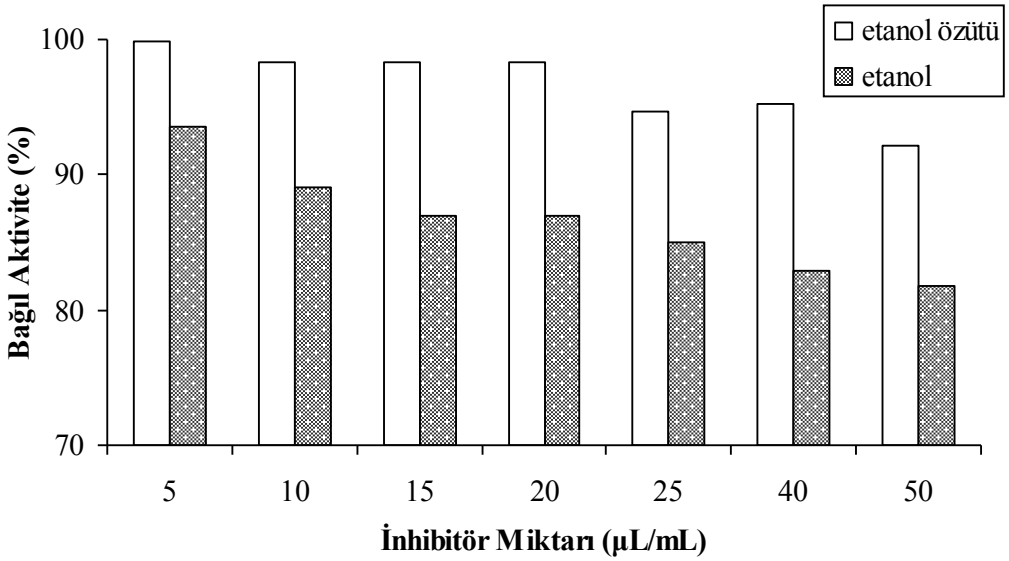


Şekil 3.14. *C. racemosa*'nın metanol özütünün CAT enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlı değişimi. t= 27 °C, [CAT]=20 µg/mL, [H_2O_2]=10 mM. Sonuçlar üç bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları üzerindeki yıldız işareti; aynı özüt derişiminde, 5 µL'lik örnek ile karşılaştırılma durumundaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$)

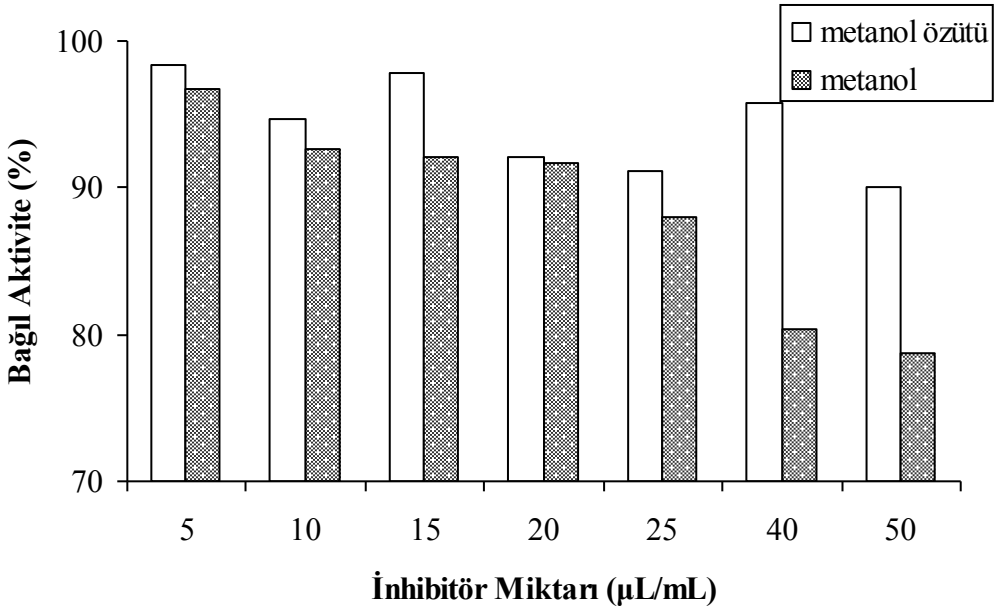
Deneysel veriler incelendiğinde, *C. racemosa* türünden elde edilen etanol, metanol ve su özütlerinin, CAT enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyon etkisi oluşturmadığı görülmektedir. İnhibisyonda çözücünün etkisini belirleyebilmek amacıyla ölçüm ortamına inhibitör hacmi kadar saf çözücü eklenerek, yine aynı işlemler yapılmış ve enzim aktivitesi belirlenmiştir (Şekil 3.15, Şekil 3.16 ve Şekil 3.17).



Şekil 3.15. *C. racemosa*'nın su özütü ve saf suyun CAT enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi. t= 27 °C, [CAT]=20µg/mL, [H_2O_2]=10 mM



Şekil 3.16. *C. racemosa*'nın etanol özütü ve saf etanolün CAT enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi. t= 27 °C, [CAT]=20µg/mL, [H_2O_2]=10 mM

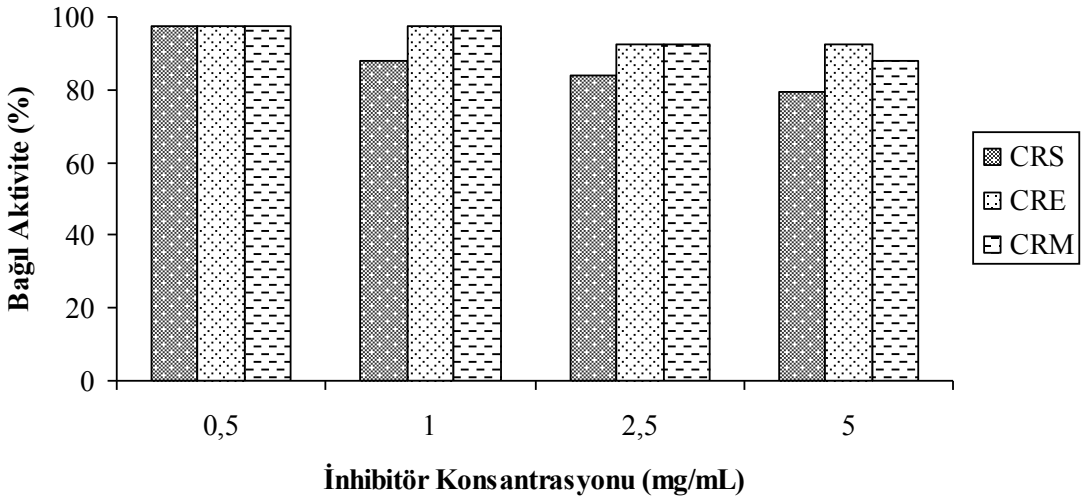


Şekil 3.17. *C. racemosa*'nın metanol özütü ve saf metanolün CAT enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi. t= 27 °C, [CAT]=20µg/mL, [H_2O_2]=10 mM

Sadece çözücü kullanılarak yapılan denemelerde *Caulerpa* özütleri ile yapılan denemelerdekine benzer sonuçlara ulaşılması; inhibisyon etkisinin özütteki bileşenlerden çok, çözücüden kaynaklandığını göstermektedir. Hatta Şekil 3.16 ve 3.17 dikkatle incelenecek olursa saf çözücünün CAT enzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin, aynı çözücülerle hazırlanan özütlerin inhibisyon etkisinden daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum, özüt hazırlanırken algin yapısında bulunan su nedeniyle çözücünün seyrelmesinden kaynaklanıyor olabilir.

3.1.6. *Caulerpa* özütlerinin SOD enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Bu çalışmada inhibitör olarak 100 mg yaş alg/mL derişiminde stok *C. racemosa* özütü hazırlanmış ve daha sonra farklı hacimlerdeki özüt örnekleri, enzim çözeltisi ile 27 °C, 200 rpm'de 10 dakika inkübe edilerek optimum koşullar altında aktiviteleri belirlenmiştir. Su, etanol ve metanol çözücüleri ile hazırlanmış olan özütlerin SOD enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri Şekil 3.18'de gösterilmiştir.



Şekil 3.18. *C. racemosa*'nın su (CRS), etanol (CRE) ve metanol (CRM) özütlerinin SOD enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi. t= 37 °C

Kullanılan *Caulerpa* özütlerinin hiçbirinin SOD enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyon etkisi oluşturmadığı sonuçlardan açıkça görülmektedir. SOD enzim aktivitesinin tayininde kullanılan kitlerin oldukça pahalı olması ve özütlerle yapılan denemelerde çok yüksek inhibisyon etkisinin gözlenmemiş olması nedeniyle saf çözücü kullanılarak kontrol denemeleri yapılmamıştır.

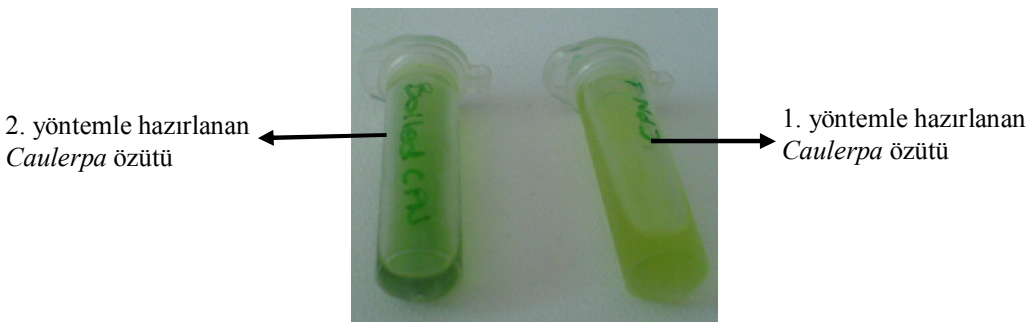
Bulunan tüm bu sonuçlar, *Caulerpa* özütlerinin antioksidan enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyona neden olmadığını göstermektedir. Dolayısıyla türün çeşitli hastalık belirtilerinin önlenmesi amacıyla kullanımında vücutta herhangi bir hasara neden olmayacağı söylenebilir. Zaten özellikle Uzak Doğu'da bu türün besin olarak hâlihazırda tüketilen ve henüz insan sağlığı için herhangi bir olumsuz sonuç rapor edilmeyen bir tür olması da bu sonuçları destekler niteliktedir.

3.2. *C. prolifera* Türünden CYN'nin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

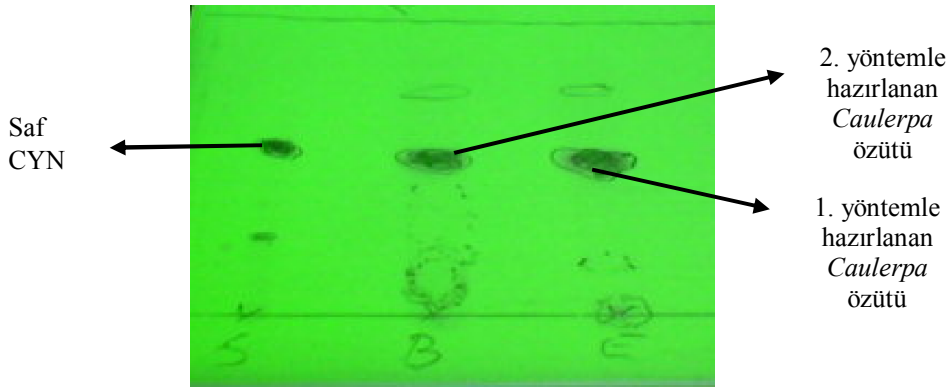
Caulerpa türlerinin başlıca sekonder metaboliti olan CYN ilk kez 1978 yılında Amico vd tarafından, *C. prolifera*'dan izole edilmiş ve yapısı aydınlatılmıştır (Amico vd 1978). Bünyesinde üç asetil grubu bulunduran bu yapının tayini için yapılan

araştırmalar 1994 yılında yayınlanan bir çalışma ile sonuçlanmıştır. Valls vd (1994) tarafından yapılan bu çalışmada *Caulerpa* türlerinde CYN tayini için hızlı, basit ve tekrarlanabilirliği yüksek bir HPLC metodu tanımlanmıştır. Bu metodun uygulanmasıyla CYN tayinine ilişkin sonuçların 10 dakika gibi kısa bir sürede elde edilebildiği belirtilmiştir. Bu çalışmada ayrıca UV dedeksiyonu ile refraktometrik dedeksiyon karşılaştırılmış ve UV dedeksiyonun diğerine göre yaklaşık 500 kat daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir.

Bu çalışmada da *C. prolifera* türü kullanılarak, CYN sekonder metaboliti saf olarak elde edilmiş, bu bileşenin H-NMR ile saflık kontrolü yapıldıktan sonra HPLC'de analizi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işlemindeki ilk adım algin ilgili çözücü içindeki özütünün hazırlanmasıdır. Çalışmanın bu aşamasında 2 farklı yöntem uygulanarak, karşılaştırılmış ve yöntem optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Birinci yöntemde akvaryumdan alınarak, fazla suyu filtre kağıdı ile uzaklaştırılan alg örneğinin; doğrudan sıvı azotla muamele edilerek etil asetat özütü hazırlanmıştır. İkinci yöntemde ise aynı miktardaki alg örneği, öncelikle 1 dakika süre ile kaynayan suda bekletilmiş, daha sonra sıvı azotla muamele edilerek etil asetat özütü hazırlanmıştır. Hazırlanan özütlerdeki CYN içeriği; basit olarak TLC metodu ile saf CYN için elde edilen sonuçla kıyaslanarak belirlenmiştir ($R_f \approx 0,5$). UV ışık altında gözlenen rengin şiddeti, CYN konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bu özütlerden her ikisinde de CYN varlığı tespit edilmesine rağmen, kaynatılmış suda bekletilen örnek için UV ışık altında elde edilen renk şiddetinin daha az olması ve bu örnekte klorofilin daha fazla olması nedeniyle daha sonraki çalışmalarda doğrudan sıvı azotla muamele edilerek özüt hazırlanması işlemi uygulanmıştır (Şekil 3.19 ve Şekil 3.20).



Şekil 3.19. Farklı yöntemlerle hazırlanmış *Caulerpa* özütleri



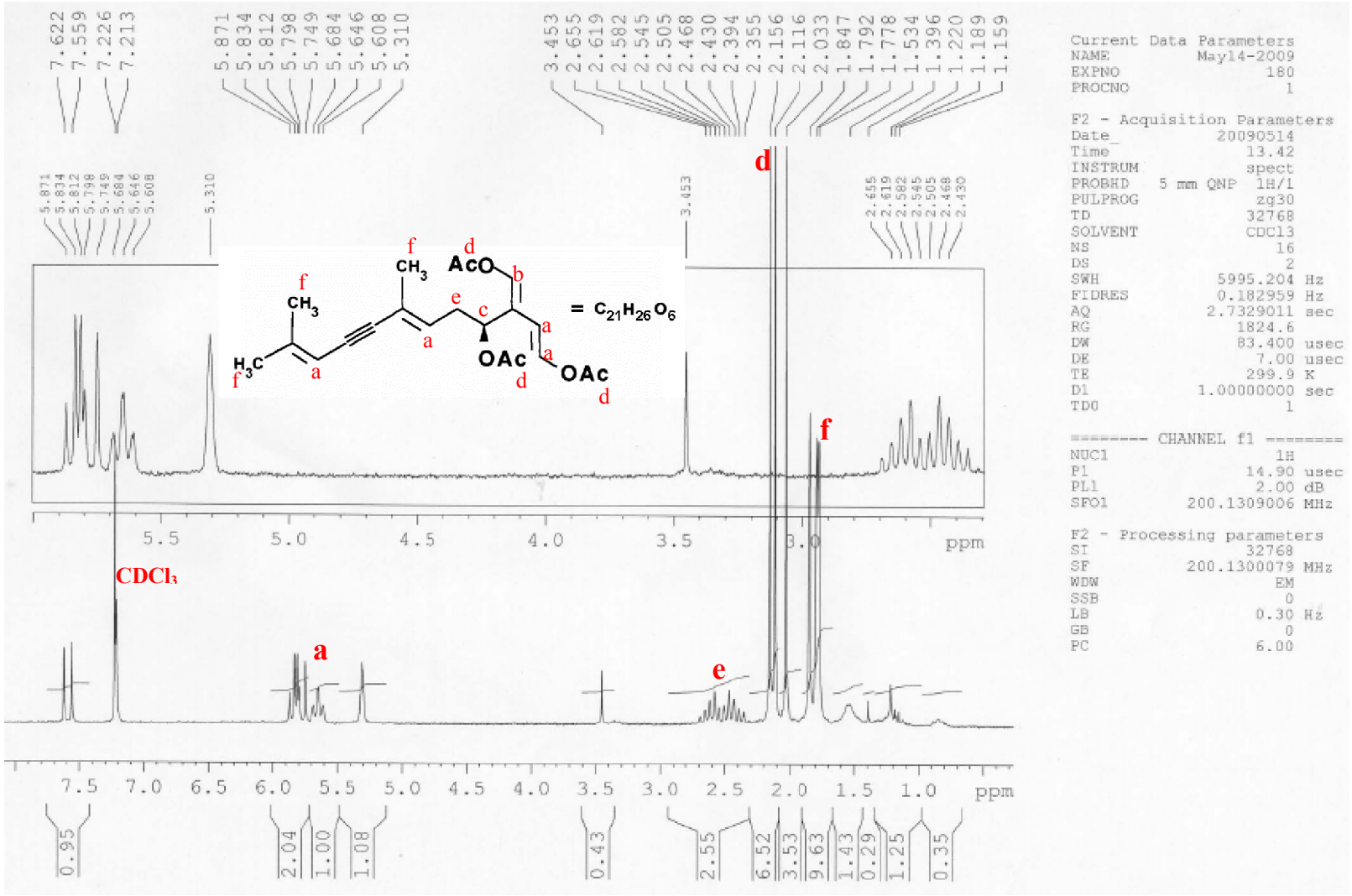
Şekil 3.20. Farklı yöntemlerle hazırlanmış *Caulerpa* özütleri ve saf CYN için TLC analiz sonuçları

Daha sonraki adımda hazırlanan bu özütten silikajel kolonda farklı çözücü sistemleri uygulanarak CYN saflaştırılmıştır. Elde edilen CYN'nin saflığı; zıt faz HPLC ve NMR spektroskopik yöntemleri ile belirlenmiştir (Cengiz vd 2009).

3.2.1. CYN'nin H-NMR spektrumu

CYN'nin ^{1}H-NMR spektrumu Bruker NMR spektrometresi ile 200 MHz'de kaydedilmiştir (Şekil 3.21). Elde edilen spektrumun analiz sonuçları;

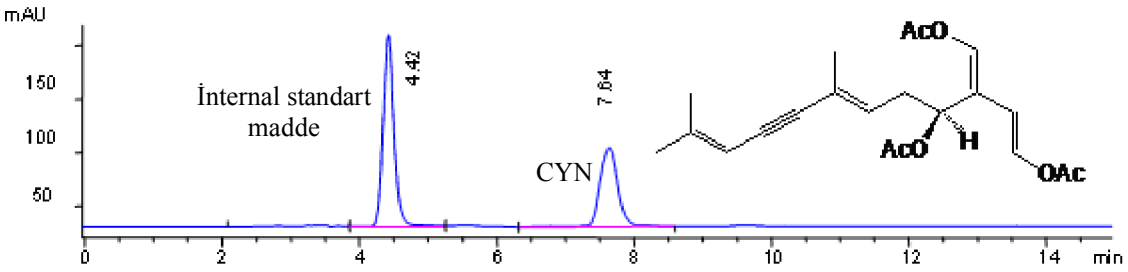
CYN ($CDCl_3$, 200 MHz) δ: 1.78 (s, 3H); δ: 1.79 (s, 3H); δ: 1.85 (s, 3H); δ: 2.03 (s, 3H); δ: 2.12 (s, 3H); δ: 2.16 (s, 3H); δ: 2.66-2.43 (m, 2H); δ: 5.87-5.31 (t, 4H) olarak belirlenmiştir. Bulunan sonuçlar, Amico vd (1978) tarafından raporlanan sonuçlarla uyumludur.



Şekil 3.21. Saflaştırılan CYN için H-NMR spektrumu

3.2.2. HPLC'de CYN analizi

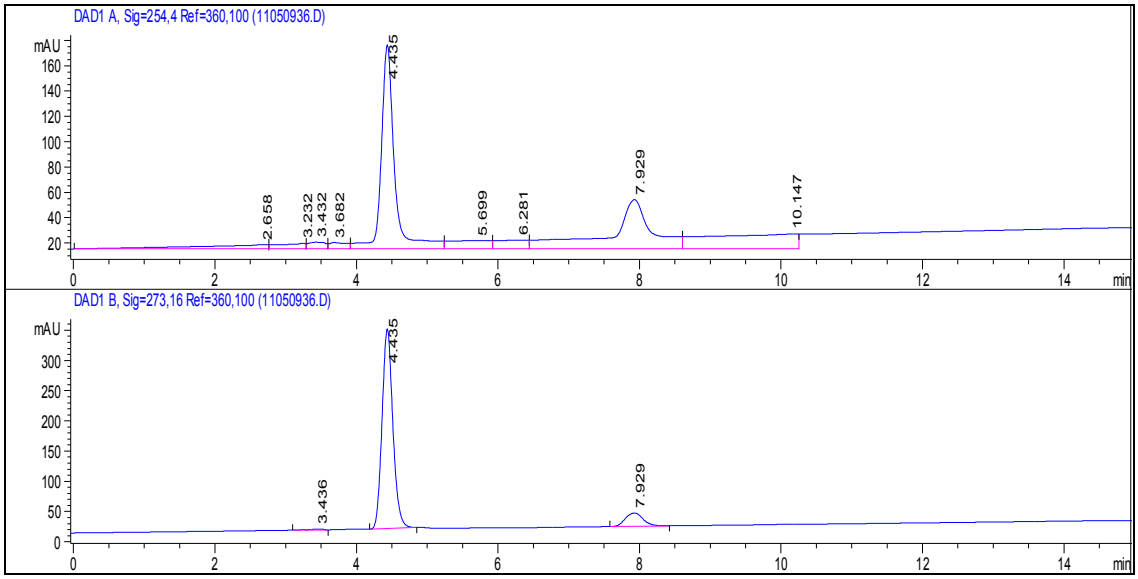
Çalışmada *C. prolifera* türünden saflaştırılarak, H-NMR ile saflık kontrolü gerçekleştirilen CYN standart bileşeni kullanılmıştır. CYN, 254 nm dalga boyunda bir maksimum ve 273 nm dalga boyunda 254 nm'dekine kıyasla daha düşük bir soğurma yapmaktadır. Bu nedenle DAD dedektör kullanılarak, her iki dalga boyunda da ölçüm yapılmıştır. Analizlerde ortama internal standart (IS) madde olarak 4-metoksiasetofenon eklenmiştir. Bu analizlerde elde edilen standart bir kromatogram Şekil 3.22'de gösterilmiştir.



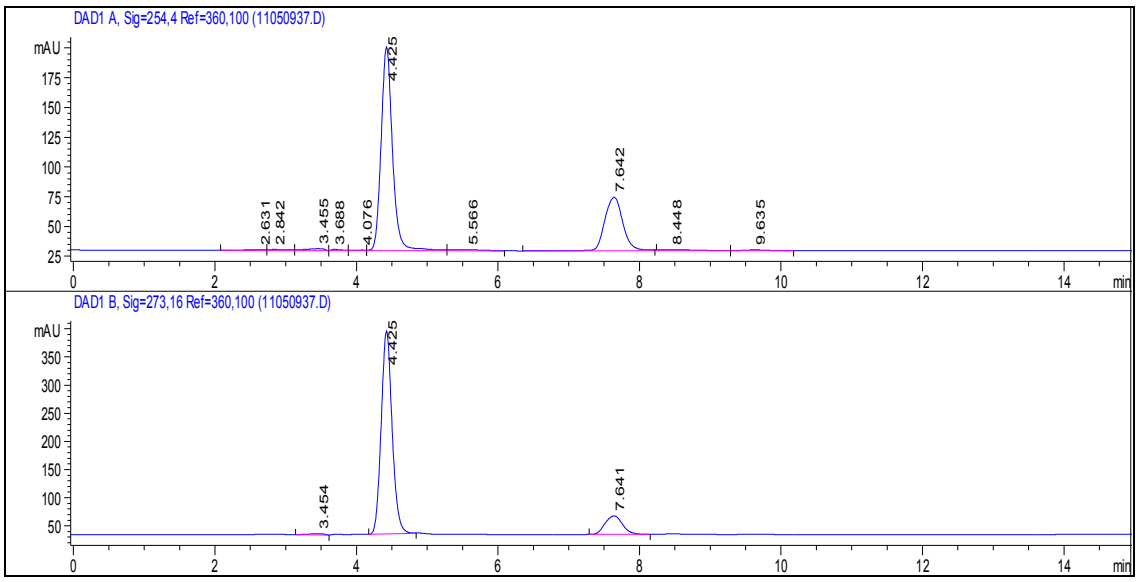
Şekil 3.22. Saf CYN'nin HPLC kromatogramı (UV dedeksiyon, 254 nm). Alıkonma süresi: 7,6 dakika. Ortamda 15 mg/L CYN ile 25 mg/L internal standart (4-metoksiasetofenon) bulunmaktadır. Koşullar: ters faz (3 µm partikül boyutlu) Teknokroma marka kolon (150x4 mm) kullanılmıştır. Mobil faz; 0,4 mL/dakika akış hızındaki su:metanol (20:80, v:v) karışımıdır

3.2.2.1. CYN kalibrasyon grafiğinin oluşturulması

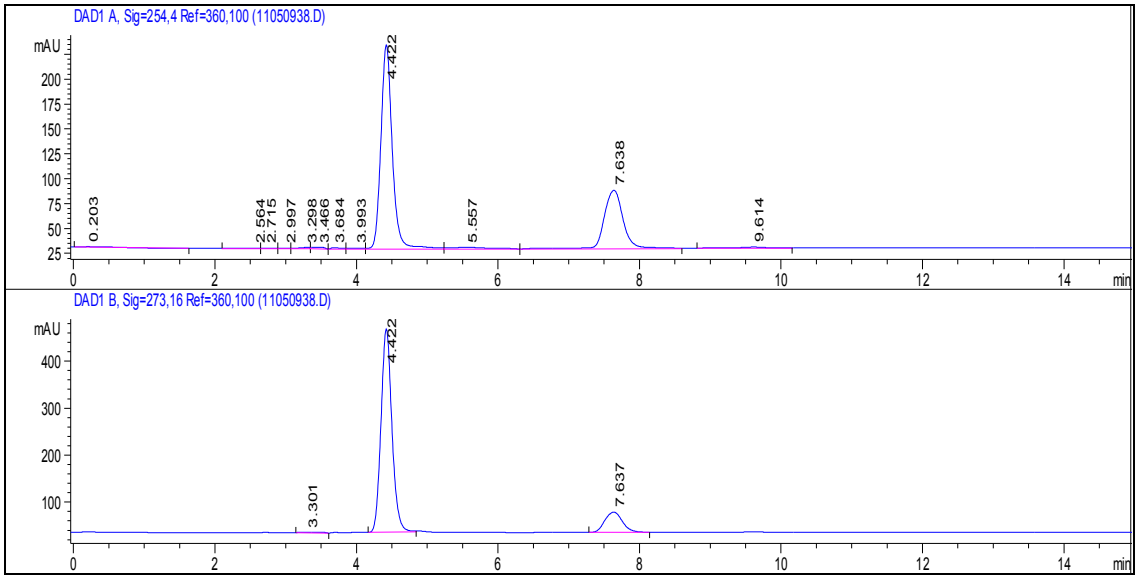
Farklı konsantrasyonlardaki saf CYN örnekleri aynı yöntemle analizlenmiştir. Bu analizlerde Şekil 3.23 - 3.28 arasında gösterilen kromatogramlar elde edilmiştir.



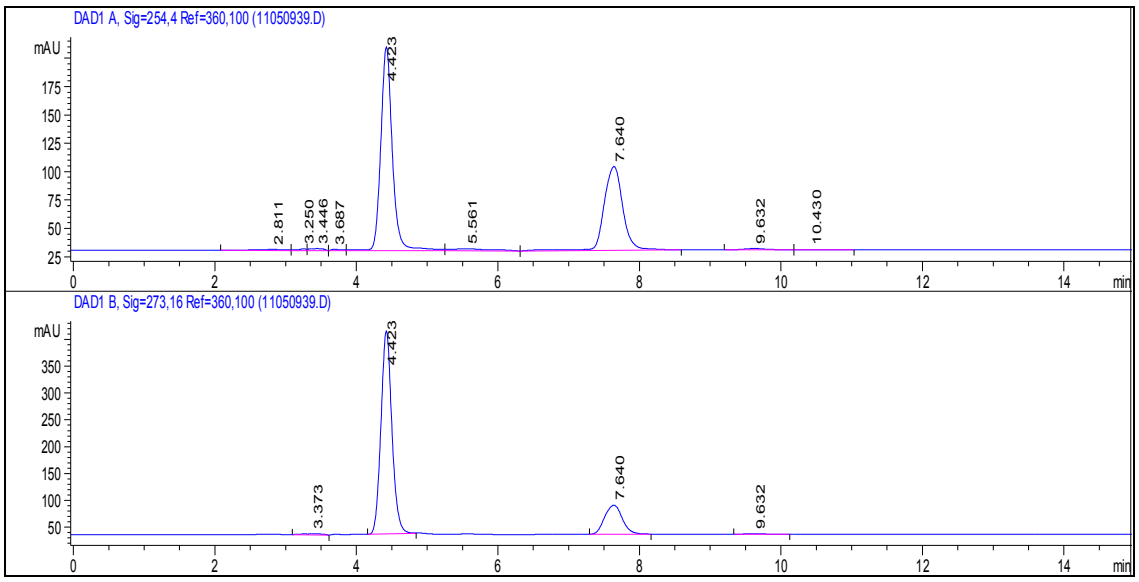
Şekil 3.23. 5 ppm CYN + 25 ppm IS örneği için HPLC kromatogramı



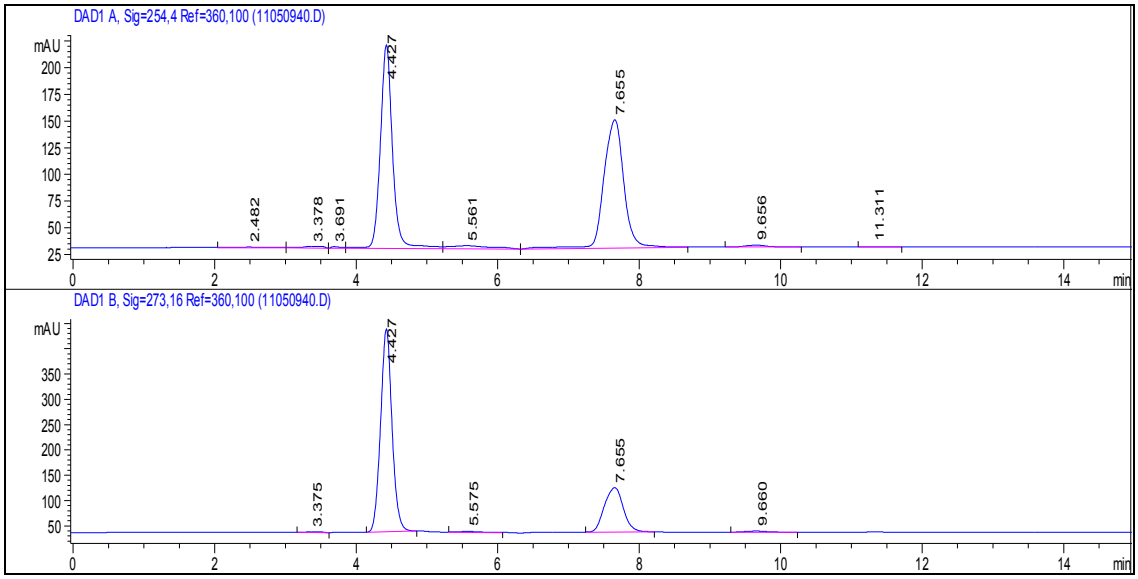
Şekil 3.24. 7,5 ppm CYN + 25 ppm IS örneği için HPLC kromatogramı



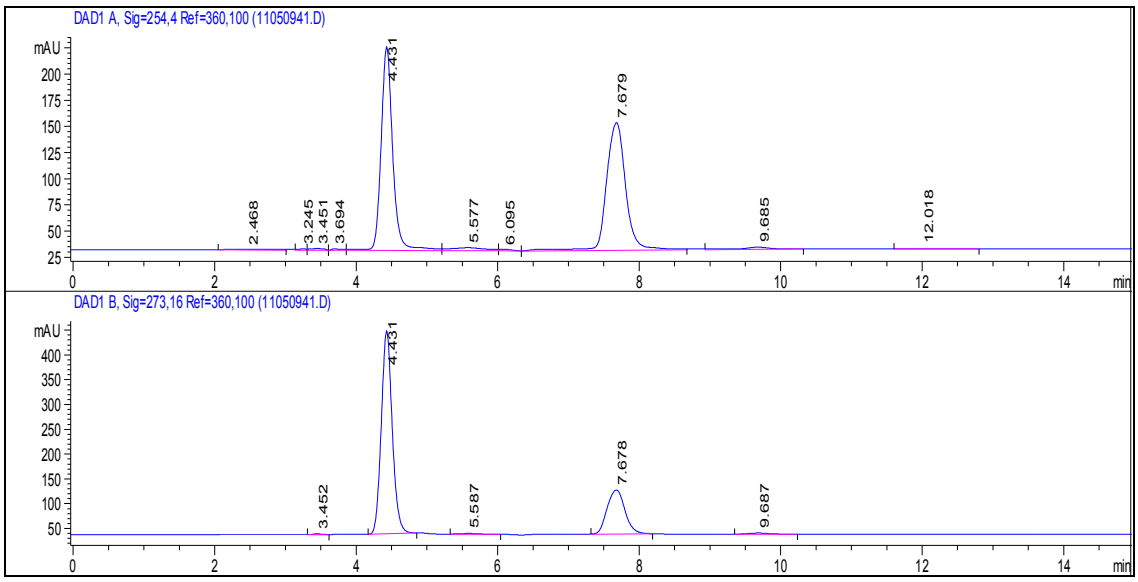
Şekil 3.25. 10 ppm CYN + 25 ppm IS örneği için HPLC kromatogramı



Şekil 3.26. 15 ppm CYN + 25 ppm IS örneği için HPLC kromatogramı

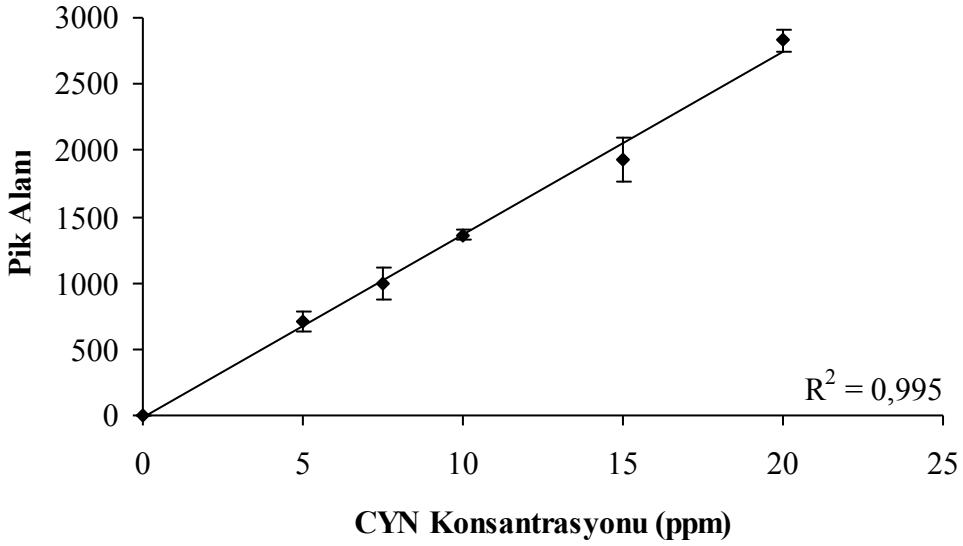


Şekil 3.27. 20 ppm CYN + 25 ppm IS örneği için HPLC kromatogramı



Şekil 3.28. 25 ppm CYN + 25 ppm IS örneği için HPLC kromatogramı

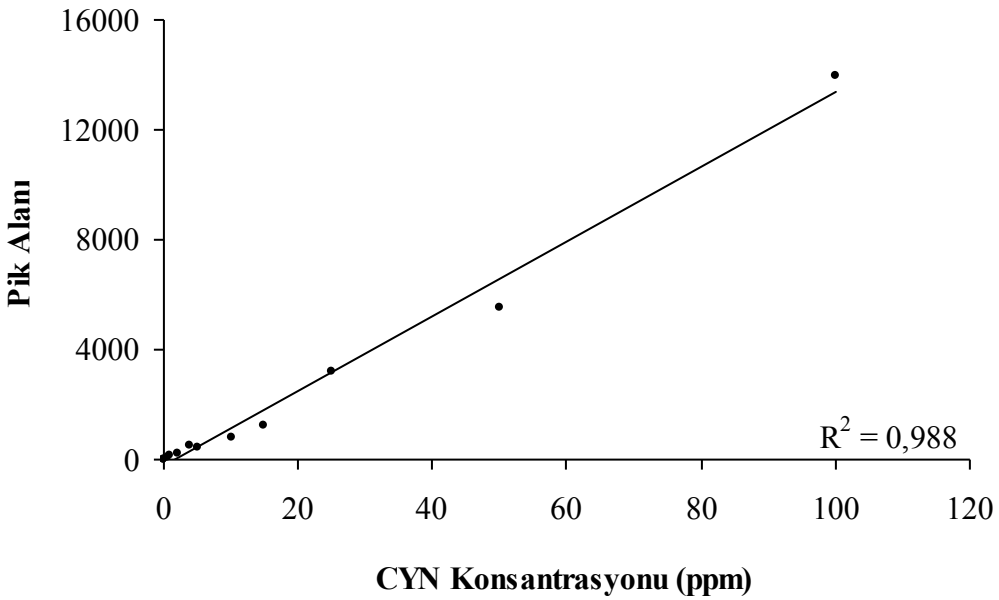
Her bir CYN konsantrasyonu için 3'er kez tekrarlanan ölçümler sonucunda bulunan değerlerin ortalamaları alınarak, HPLC'de CYN tayini için standart kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır (Şekil 3.29).



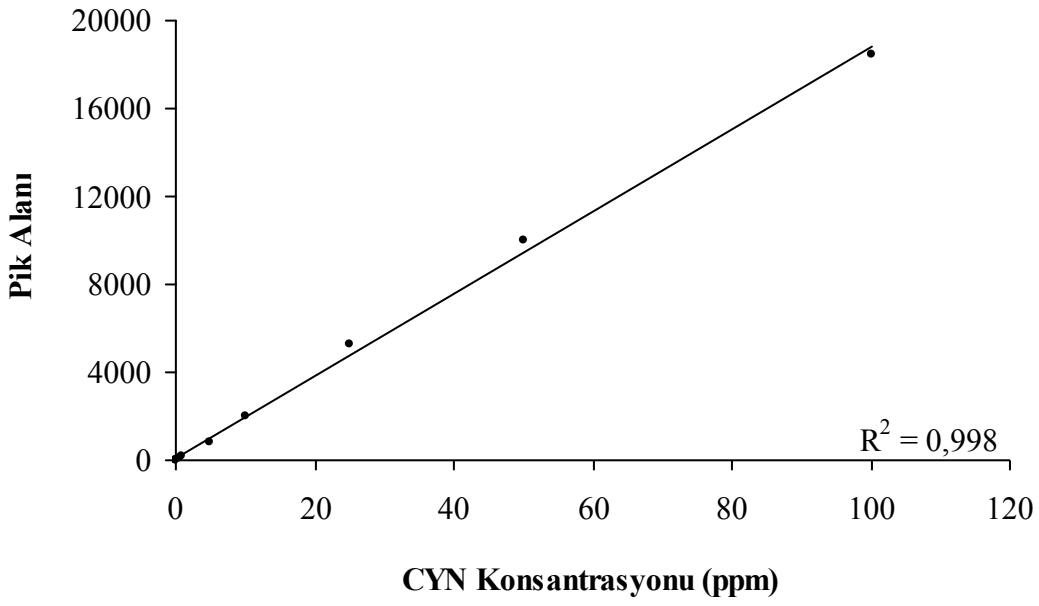
Şekil 3.29. CYN kalibrasyon grafiği. Sonuçlar üç bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir

3.2.2.2. *C. racemosa* ve *C. prolifera* türlerindeki CYN içeriğinin mevsimsel olarak belirlenmesi

Türlerdeki CYN içeriğinin mevsimsel olarak belirlenebilmesi için dört mevsimi temsil eden Ekim 2009, Ocak 2010, Nisan 2010 ve Haziran 2010 aylarında *C. racemosa* ve *C. prolifera* toplanmıştır. Bu türlerden literatürde belirtilen protokol gereğince numuneler hazırlanmış ve HPLC'de analizleri yapılarak, CYN içerikleri belirlenmiştir (Box vd 2008). Şekil 3.30 ve Şekil 3.31 sırasıyla Ekim 2009 - Ocak 2010 ve Nisan 2010 - Haziran 2010 örneklerinin CYN içeriğinin belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon grafiklerini göstermektedir.

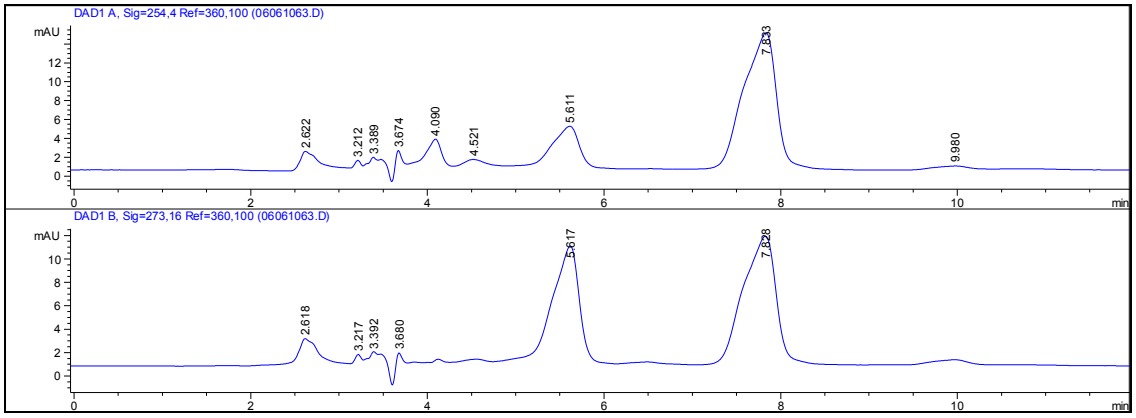


Şekil 3.30. Ekim 2009 ve Ocak 2010 örnekleri için CYN kalibrasyon grafiği



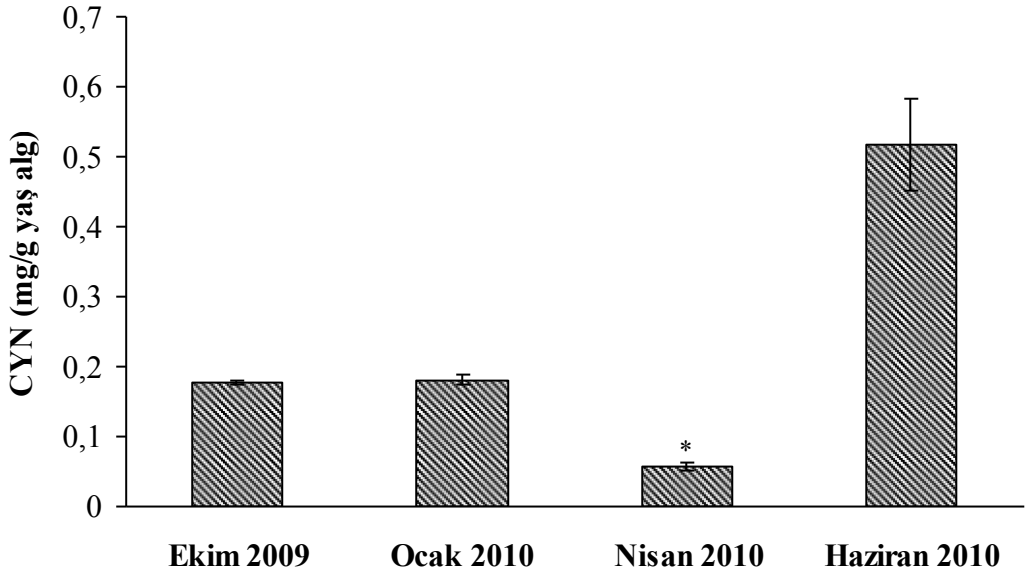
Şekil 3.31. Nisan 2010 ve Haziran 2010 örnekleri için CYN kalibrasyon grafiği

C. racemosa örneği için yapılan analizler sonucunda Şekil 3.32'de gösterilen kromatograma benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.32. *C. racemosa*'nın Haziran 2010 örnekleri için HPLC kromatogramı

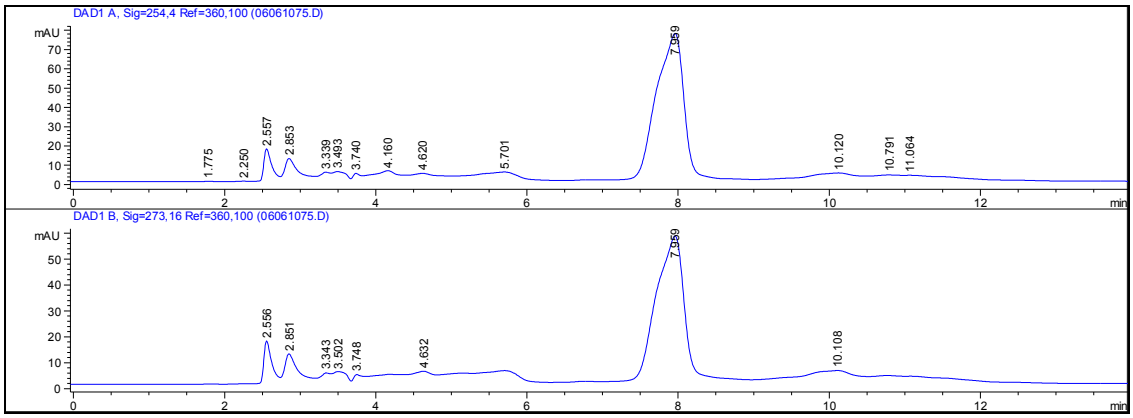
Tüm örnekler için yapılan analizlerin değerlendirilmesi ile *C. racemosa*'nın CYN konsantrasyonunun mevsimsel olarak değişim profili oluşturulmuştur (Şekil 3.33).



Şekil 3.33. *C. racemosa* türünün CYN konsantrasyonunun mevsimsel değişimi. Sonuçlar 6 bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları üzerindeki yıldız işareti; Ekim 2009 örneklerindeki CYN konsantrasyonuna göre istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$)

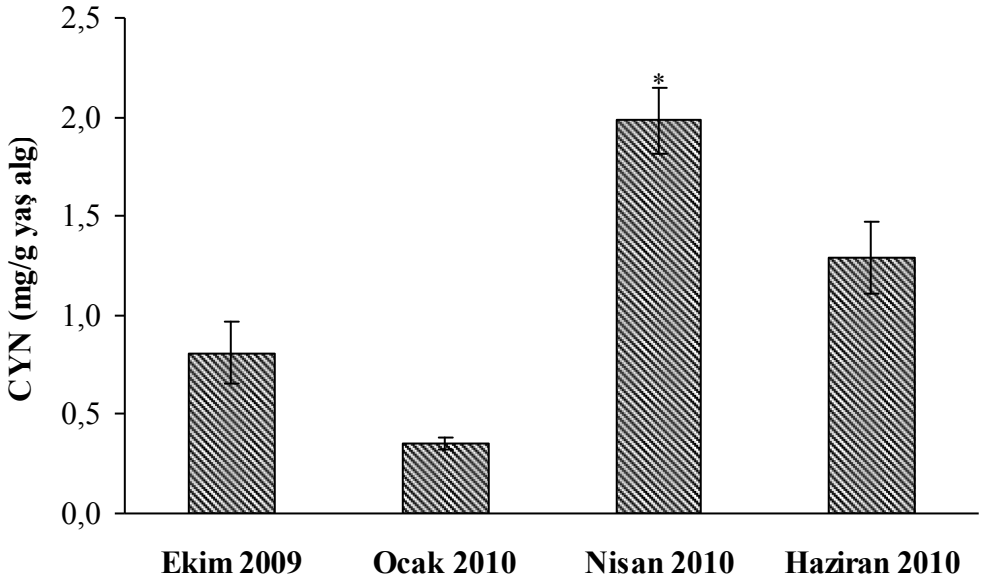
C. racemosa türündeki CYN miktarları Ekim 2009, Ocak 2010, Nisan 2010 ve Haziran 2010 aylarında sırasıyla 0,1784±0,0030 mg/g yaş alg, 0,1807±0,0071 mg/g yaş alg, 0,0573±0,0054 mg/g yaş alg, 0,5178±0,1596 mg/g yaş alg olarak tayin edilmiştir. Nisan ayında saptanan CYN miktarı Ekim 2009'daki miktardan istatistiksel olarak farklıdır ($p<0,05$). Tüm sezon göz önüne alındığında en yüksek CYN derişimi Haziran 2010 ayında tespit edilmiştir.

C. prolifera örneği için yapılan analiz sonucunda Şekil 3.34'de gösterilen kromatograma benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.34. *C. prolifera*'nın Nisan 2010 örnekleri için HPLC kromatogramı

Yine tüm mevsimler için toplanan örneklerin analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ile *C. prolifera*'nın CYN konsantrasyonunun mevsimsel olarak değişim profili oluşturulmuş ve sonuçlar Şekil 3.35'de verilmiştir. CYN miktarları Ekim 2009, Ocak 2010, Nisan 2010 ve Haziran 2010 aylarında sırasıyla 0,8091±0,3834 mg/g yaş alg, 0,3511±0,0713 mg/g yaş alg, 1,9851±0,4057 mg/g yaş alg, 1,2935±0,4420 mg/g yaş alg olarak saptanmıştır. Şekil 3.35'ten de görülebileceği üzere *C. prolifera*'nın CYN düzeyleri mevsimsel olarak düzenli bir değişim göstermemiştir. En yüksek CYN düzeyi ilkbahar mevsiminde gözlenirken, en düşük CYN düzeyi ise kış mevsiminde saptanmıştır.



Şekil 3.35. *C. prolifera* türünün CYN konsantrasyonunun mevsimsel değişimi. Sonuçlar 6 bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları üzerindeki yıldız işareti; Ekim 2009 örneklerindeki CYN konsantrasyonuna göre istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$)

3. 3. Çeşitli Enzimlerin CYN ile İnhibisyon Kinetiklerinin Belirlenmesi

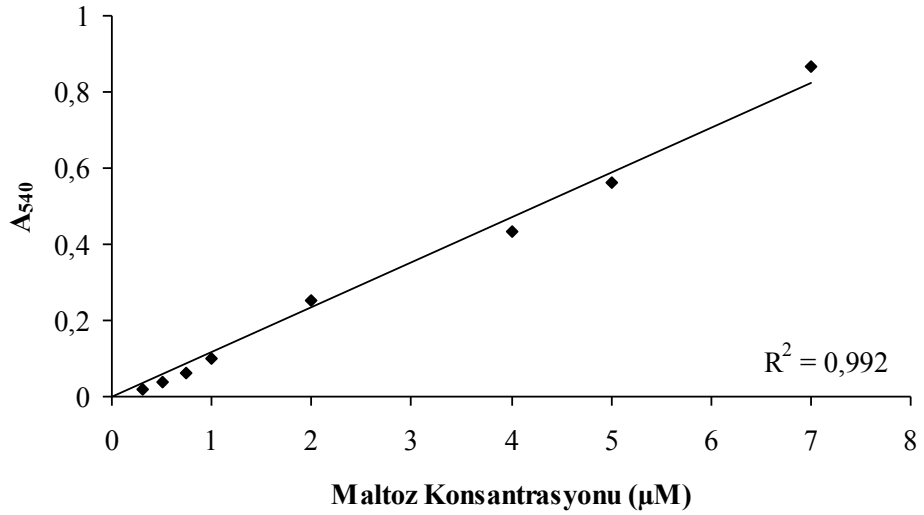
Caulerpa özütleri ile yapılan denemelerde bazı medikal öneme sahip enzimler için oldukça yüksek oranda inhibisyonun varlığı tespit edilmiştir. Çalışmanın son aşamasını oluşturan bu adımda, saf CYN inhibitör olarak kullanılmış ve ilgili enzimler için kinetik incelemeler yapılmıştır. Bu analizlerle hem gerçekleşen inhibisyonun mekanizması aydınlatılmış hem de K_M, V_{max} ve daha ileri çalışmalar için gerekli olacak K_I parametreleri belirlenmiştir.

3.3.1. α-amilaz-CYN inhibisyonunun kinetiği

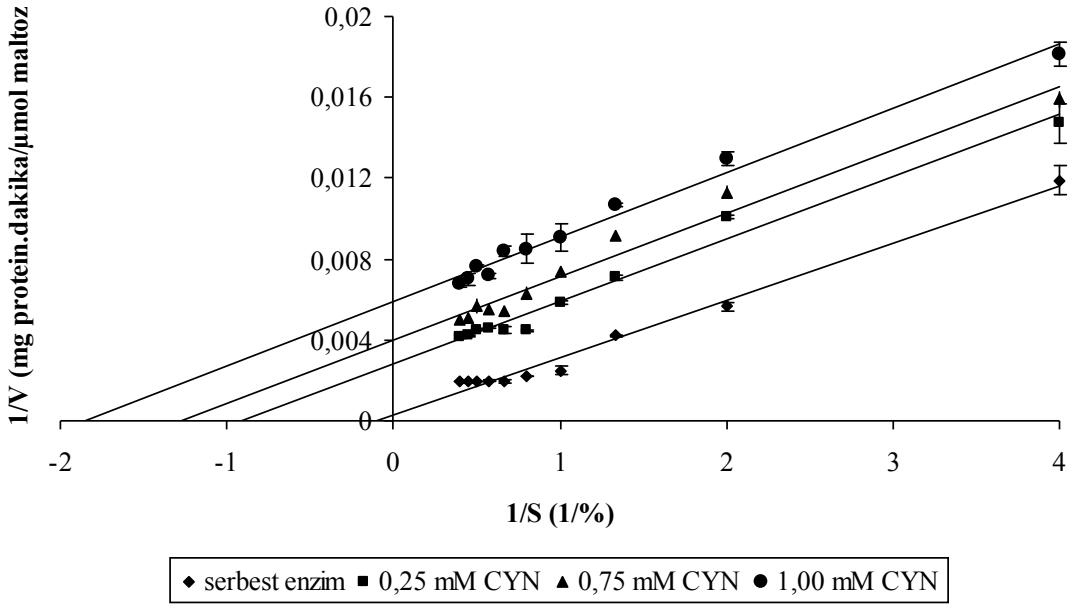
Çalışmada öncelikle maltoz standardı kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.36).

Sonraki adımda serbest enzim ve inhibitör olarak çeşitli konsantrasyonlardaki CYN içeren sistemlerde farklı konsantrasyonlardaki substrat çözeltileri kullanılarak yapılan

analizler sonucunda, görüntüsü ile inhibisyonun türünü belirlememize yardımcı olan Lineweaver–Burk grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.37).



Şekil 3.36. α-amilaz enzim aktivitesinin tespiti için kalibrasyon grafiği



Şekil 3.37. Değişen konsantrasyonlarda CYN varlığında α-amilaz enzim aktivitesi (96 U/mL) için Lineweaver–Burk grafiği. t= 37 °C. Nişasta konsantrasyonu % 0,25 ile % 2,5 arasında değişmektedir. Sonuçlar, 2 bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir

Lineweaver–Burk grafiğinden yararlanarak hem serbest enzim hem de çeşitli konsantrasyonlarda inhibitör ile etkileştirilen enzim örnekleri için K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Serbest enzime göre farklı çıkan K_M ve V_{max} değerleri bu inhibisyonun unkompetetif inhibisyon modeli ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Serbest enzim ve çeşitli konsantrasyonlarda inhibitör varlığında hesaplanan K_M ve V_{max} değerleri Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. α-amilaz enziminin inhibisyonuna ilişkin kinetik veriler

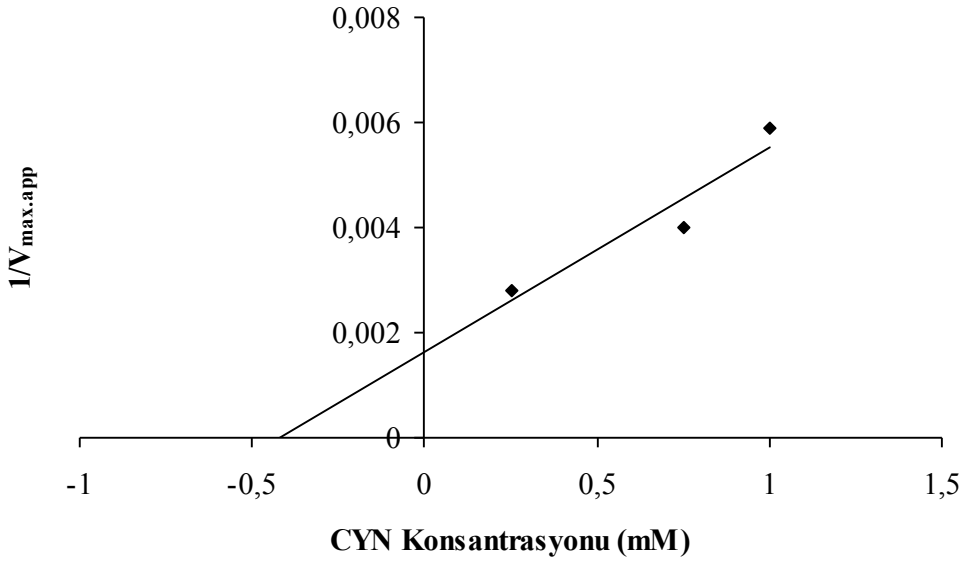
CYN Konsantrasyonu	**V_{max} (µmol maltoz/mg protein.dakika)**	**K_M (%)**	**R^2**
0 mM	3333	10,0	0,99
0,25 mM	357	1,1	0,98
0,75 mM	250	0,8	0,97
1,00 mM	169	0,5	0,98

CYN'nin α-amilaz enzim aktivitesi için inhibisyon sabitinin (K_I) belirlenebilmesi amacıyla aşağıdaki eşitliklerden yararlanarak grafikler oluşturulmuştur (Şekil 3.38 ve Şekil 3.39).

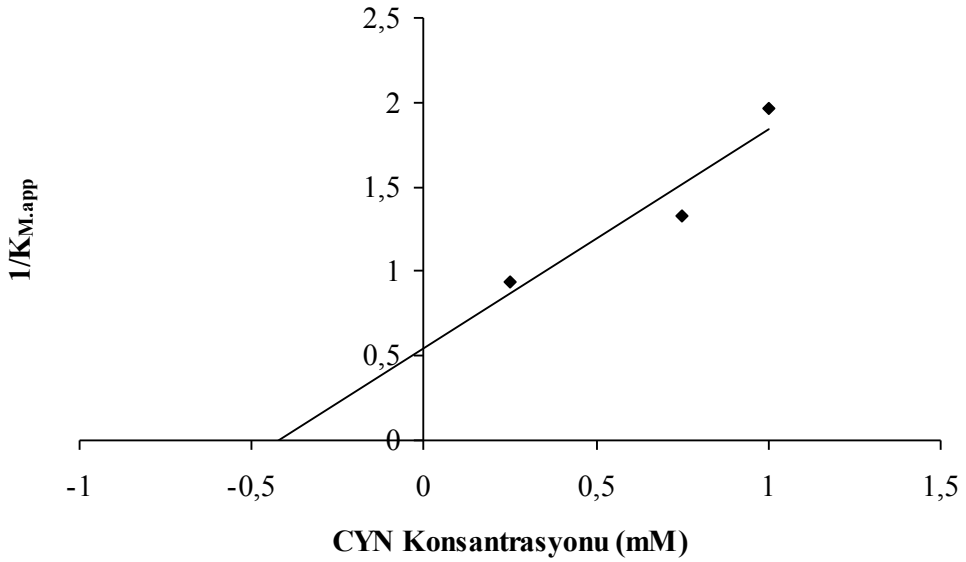
$$\frac{1}{V_{\max_{app}}} = \frac{1}{V_{\max} \cdot K_I} \cdot [I] + \frac{1}{V_{\max}} \quad \textbf{(1)}$$

$$\frac{1}{K_{M_{app}}} = \frac{1}{K_M \cdot K_I} \cdot [I] + \frac{1}{K_M} \quad \textbf{(2)}$$

Burada V_{max} reaksiyonunun maksimum hızını, K_M Michaelis-Menten sabitini, [I] inhibitör konsantrasyonunu, K_I inhibitörün enzim-substrat kompleksine bağlanması ile ilgili dissosiyasyon sabitini, $V_{max.app}$ ve $K_{M.app}$ ise inhibitor varlığında gözlenen V_{max} ve K_M değerlerini ifade etmektedir. Bu grafiklerin eğimlerinden yararlanarak K_I sabiti sırayla 0,41 mM ve 0,42 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.38. İnhibitör konsantrasyonunun $1/V_{max.app}$ ile değişim grafiği (1. eşitlik uyarınca)



Şekil 3.39. İnhibitör konsantrasyonunun $1/K_{M.app}$ ile değişim grafiği (2. eşitlik uyarınca)

Araştırmacılar; özellikle medikal araştırmalarda doğal kaynakların kullanımına gün geçtikçe daha da artan bir ilgi göstermekte ve bu konuda çalışmalar yapmaktadırlar.

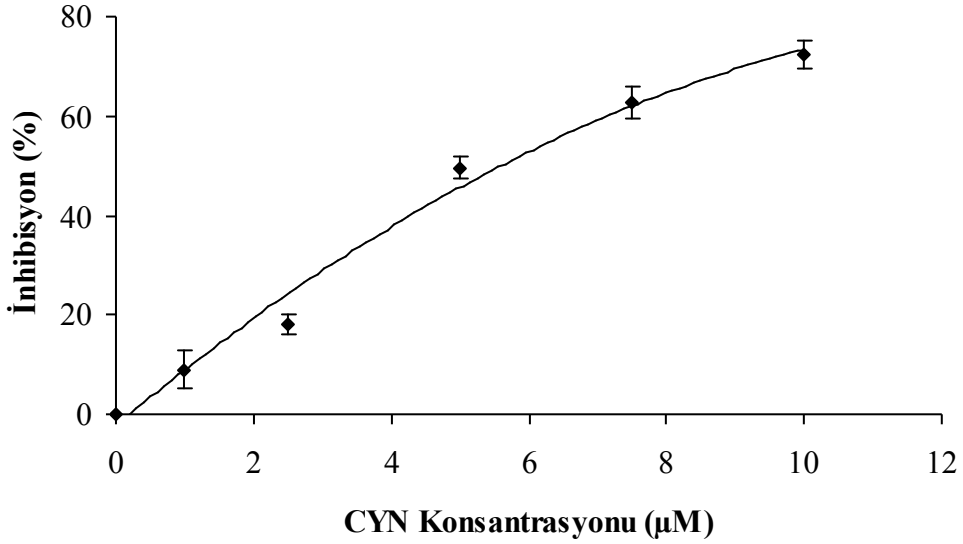
α-amilaz enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren, doğal kaynaklardan elde edilen bazı bileşenler için literatürde rapor edilen sonuçlar Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. Doğal kaynaklardan elde edilen bazı bileşenlerin α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin karşılaştırılması

Kaynak	İnhibitör Madde	İnhibisyon Türü	K_I, % inhibisyon, IC_{50}
Bu çalışma	CYN	Unkompetetif	K_I: 0,41 mM
Teixeria vd 2007	*C. racemosa* ham aseton özütü	-	ED_{50}: 0,09 mg/mL
Ali vd 2006	*Phyllanthus amarus* hekzan özütü	-	IC_{50}: 32 µg/mL
Bhandari vd 2008	*Bergenia ciliata*, Haw.'dan izole edilen, (-)-3-*O*-galloylepicatechin ve (-)-3-*O*-galloylcatechin olarak tanımlanan iki aktif bileşen	-	Sırasıyla, IC_{50}: 739 µM ve 401 µM
Fred-Jaiyesimi vd 2009	*Spondias mombin* dietileter özütü	-	70 mg/mL derişimde % 73 inhibisyon
Fred-Jaiyesimi vd 2009	*Spondias mombin*'den izole edilen 3β-olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate	-	20 mg/mL derişimde % 57 inhibisyon
Loizzo vd 2008	*Marrubium radiatum* ve *Salvia acetabulosa* metanol özütü	-	IC_{50} (*M.r*): 61,1 µg/mL ve IC_{50} (*S.a*): 91,2 µg/mL
Shobana vd 2009	*Eleusine coracana* L. 'dan izole edilen fenolik bileşen	nonkompetetif	IC_{50}: 23,5 µg K_I: 10 µg
Chethan vd 2008	Polifenolleri içeren ham darı özütü	karışık nonkompetetif	K_I: 66,7 µg
Chethan vd 2008	Polifenol özütünden izole edilen gallik asit, vanillik asit vb gibi saf polifenolik bileşenler	Unkompetetif	Gallik asit: % 67,7 Vanillik asit: % 71,9 Kuersetin: % 73,5 trans-sinnamik asit: % 79,2

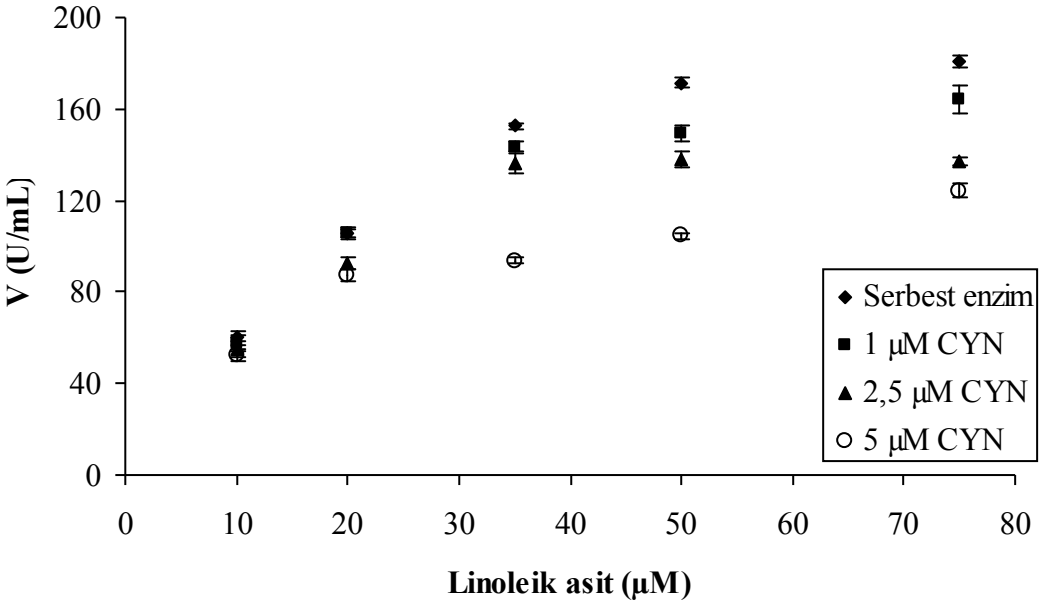
3.3.2. LOX-CYN inhibisyonunun kinetiği

Caulerpa özütlerinin LOX enzimi üzerinde güçlü bir inhibisyon oluşturması üzerine inhibisyondan sorumlu temel bileşenin, CYN olup-olmadığı merak edilmiştir. Bu amaçla değişen konsantrasyonlarda CYN'nin LOX enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiş ve LOX'un CYN sekonder metaboliti ile doza bağlı olarak inhibe olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.40). Bu inhibisyon için IC_{50} değeri 5,1 µM'dır.

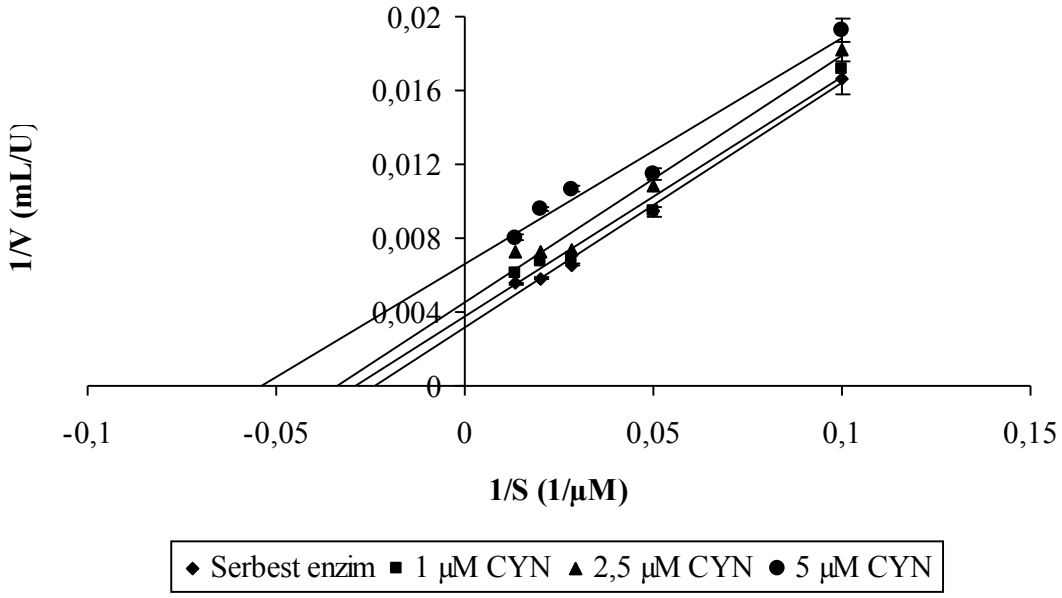


Şekil 3.40. Saf CYN'nin LOX enzim aktivitesi (167 U/mL) üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlılığı. t= 25 °C, substrat: 100 µM linoleik asit. Sonuçlar 5 bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir

Gerçekleşen inhibisyonun türünün belirlenebilmesi için saf CYN varlığında kinetik incelemeler yapılmıştır. Bu amaçla serbest enzim ve inhibitör olarak çeşitli konsantrasyonlardaki CYN içeren sistemlerde farklı konsantrasyonlardaki substrat çözeltileri kullanılarak analizler yapılmış ve sonuçlardan yararlanarak Michaelis-Menten ve Lineweaver–Burk grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.41 ve Şekil 3.42).



Şekil 3.41. Değişen konsantrasyonlarda CYN varlığında soya fasülyesi lipoksigenaz enzim aktivitesi (167 U/mL) için Michaelis-Menten grafiği. t= 25 °C. Sonuçlar, 5 bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir



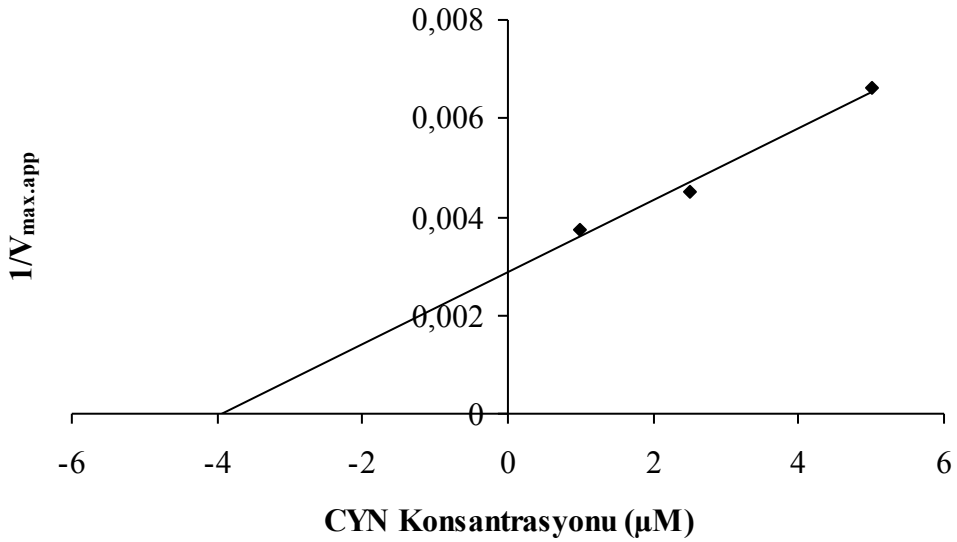
Şekil 3.42. Değişen konsantrasyonlarda CYN varlığında soya fasülyesi lipoksigenaz enzim aktivitesi (167 U/mL) için Lineweaver–Burk grafiği. t= 25 °C. Linoleik asit konsantrasyonu 10 – 75 µM arasında değişmektedir. Sonuçlar, 5 bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir

Lineweaver–Burk grafiğinden yararlanarak hem serbest enzim hem de çeşitli konsantrasyonlarda inhibitör ile etkileştirilen enzim örnekleri için K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar; LOX enziminin CYN varlığında inhibisyonunun unkompetetif inhibisyon modeli ile açıklanabileceğini göstermektedir. Linoleik asit substratı için serbest enzimin K_M değeri 0,041 mM ve V_{max} değeri 312,5 U/mL olarak tespit edilmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda inhibitör varlığında hesaplanan K_M ve V_{max} değerleri Çizelge 3.3'de özetlenmiştir.

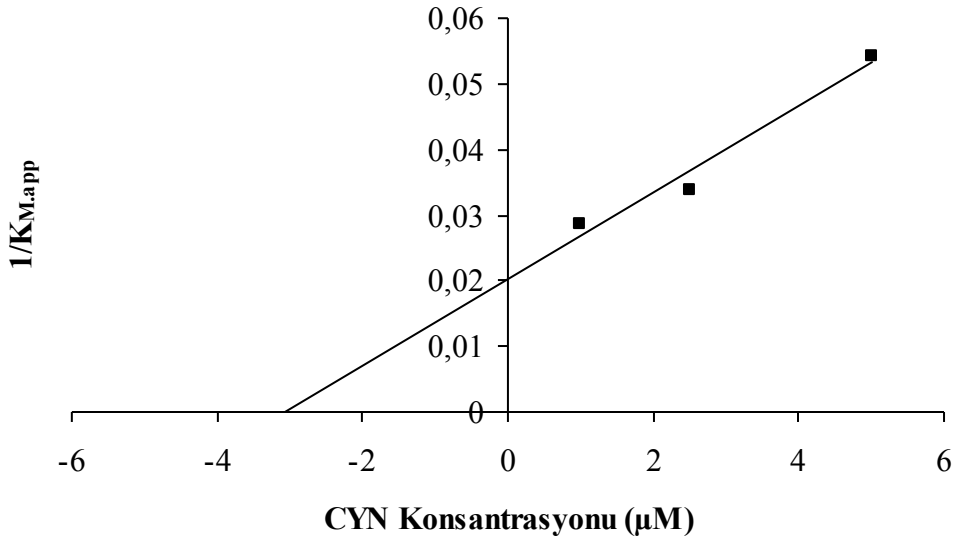
Çizelge 3.3. LOX enziminin inhibisyonuna ilişkin kinetik veriler

CYN Konsantrasyonu	**V_{max} (U/mL)**	**K_M (mM)**	**R^2**
0 µM	312,500	0,041	0,99
1 µM	263,158	0,034	0,98
2,5 µM	222,222	0,030	0,98
5 µM	151,515	0,019	0,97

CYN varlığında LOX enzim aktivitesinin inhibisyonu kinetik olarak incelenmiş ve daha önce tanımlanan (1) ve (2) numaralı eşitlikler kullanılarak inhibisyon sabiti (K_I) değeri belirlenmiştir (Şekil 3.43 ve Şekil 3.44). Bu grafiklerin eğimlerinden yararlanarak K_I sabiti sırayla 4.1 µM ve 3.1 µM olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.43. İnhibitör konsantrasyonunun $1/V_{max.app}$ ile değişim grafiği (1. eşitlik uyarınca)



Şekil 3.44. İnhibitör konsantrasyonunun $1/K_{M.app}$ ile değişim grafiği (2. eşitlik uyarınca)

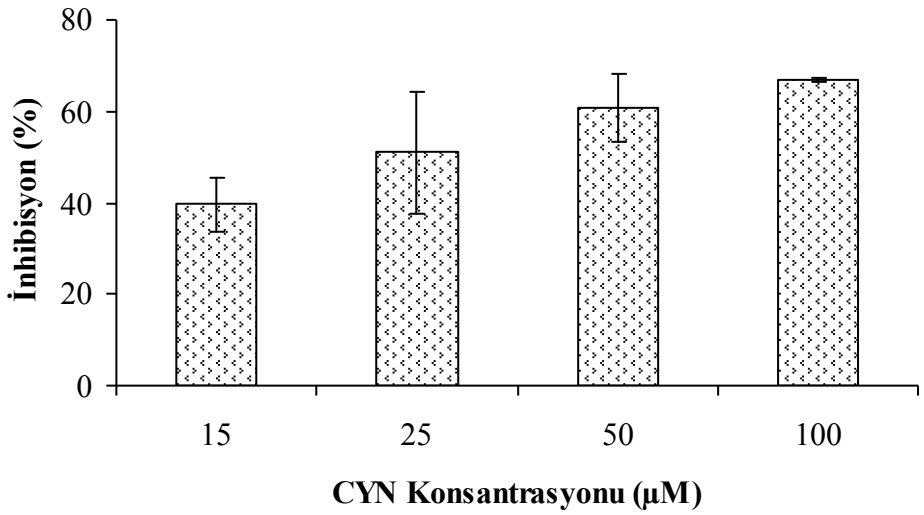
Bu çalışmada elde edilen sonuçların literatürdeki yerinin belirlenebilmesi amacıyla, LOX enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren, doğal kaynaklardan elde edilen bazı bileşenler için literatürde rapor edilen sonuçlar Çizelge 3.4'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.4. Doğal kaynaklardan elde edilen bazı bileşenlerin LOX enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin karşılaştırılması

Kaynak	İnhibitör Madde	İnhibisyon Türü	K_I, % inhibisyon, IC_{50}
Bu çalışma	CYN	Unkompetetif	K_I: 3,1 µM, IC_{50}: 5,1 µM
Sadik vd 2003	Baicalein	-	IC_{50}: 35 µM
Sekhar Rao 2002	Bisfenol A	-	IC_{50}: 0,16 mM
Wangensteen vd 2006	Sarcolobin Tephrosin Kuersetin	-	IC_{50}: 60±4 µM IC_{50}: 64±1 µM IC_{50} : 29±2 µM
Bouriche vd 2005	*Cleome arabica* yaprakları özütü Kuersetin Rutin	-	IC_{50}: 10 µg/mL IC_{50}: 11 µM IC_{50}: 14 µM
Serpen ve Gökmen 2007	β-karoten	Nonkompetetif	IC_{50}: 2,49±0,21 µM IC_{50}: 2,56±0,14 µM
Ha vd 2009	*Vitis amurensis* yaprak ve saplarından elde edilen oligostilben türevleri	-	IC_{50}: 6,39 ± 0,08 µM ile 96,8 ± 1,20 µM değerleri arasında değişmektedir.

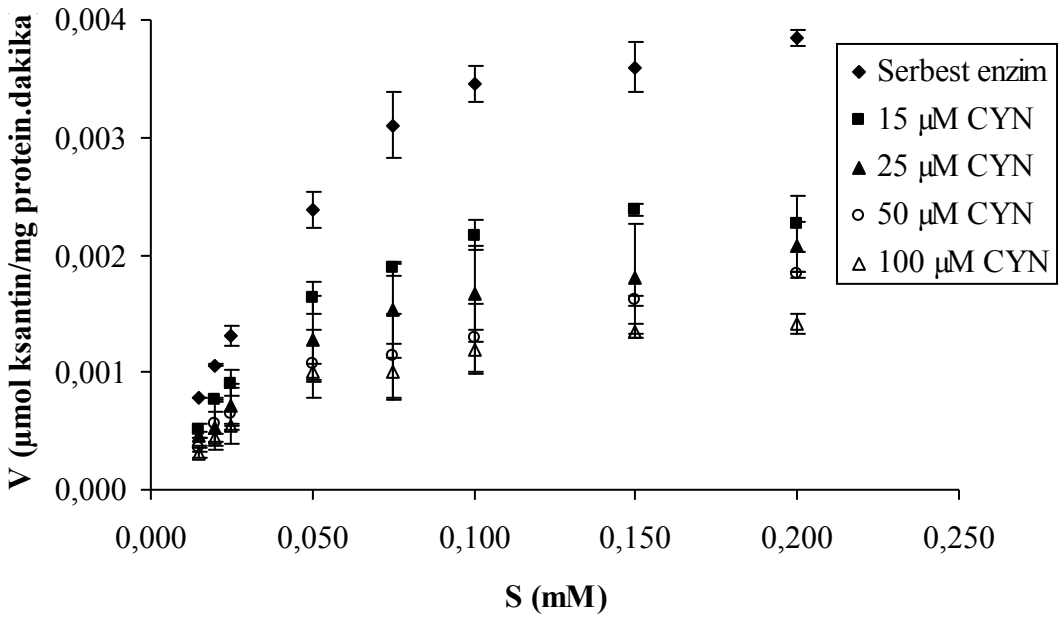
3.3.3. XOD-CYN inhibisyonunun kinetiği

Özellikle hiperürisemi ve bununla ilişkilendirilen gut hastalığının tedavisi için hedef enzim olarak seçilen XOD'nin, CYN varlığında inhibe olup-olmadığının belirlenebilmesi için değişen konsantrasyonlarda CYN'nin XOD enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Sonuçlar XOD'nin CYN sekonder metaboliti ile doza bağlı olarak inhibe olduğunu göstermiştir (Şekil 3.45). Bu inhibisyon için IC_{50} değeri 26,92 µM'dır.

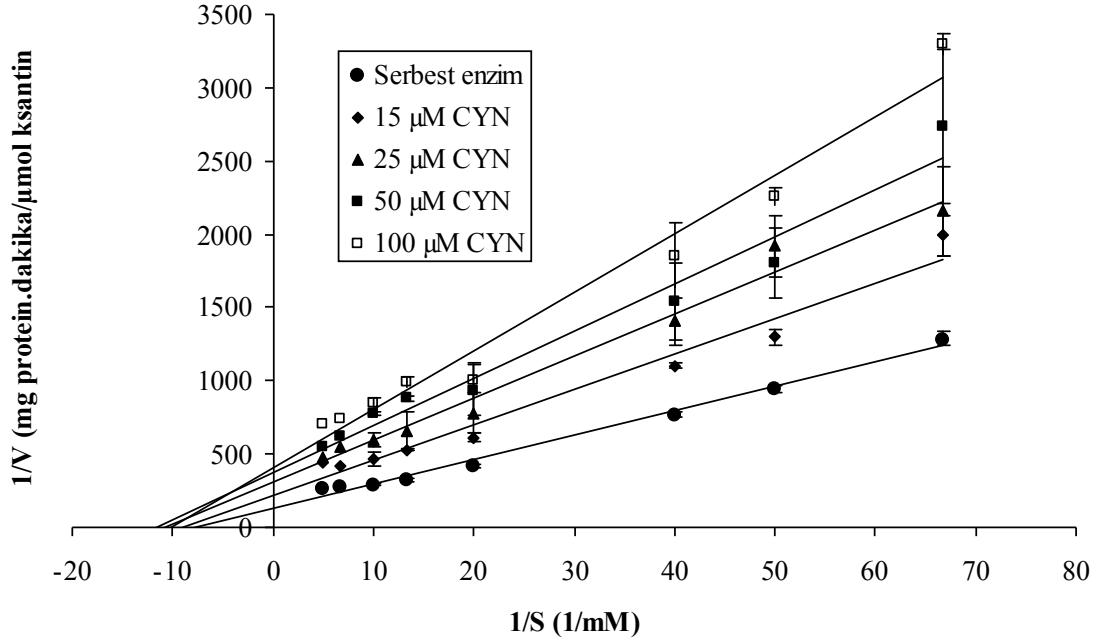


Şekil 3.45. Saf CYN'nin XOD enzim aktivitesi (10 U/L) üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlılığı. t= 37 °C, substrat: 0,25 mM ksantin çözeltisi. Sonuçlar iki bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir

Gerçekleşen inhibisyonun türünün tespit edilebilmesi amacıyla serbest enzim ve inhibitör olarak çeşitli konsantrasyonlardaki CYN içeren sistemlerde farklı konsantrasyonlardaki substrat çözeltileri kullanılarak analizler yapılmış ve sonuçlardan yararlanarak Michaelis-Menten ve Lineweaver–Burk grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.46 ve Şekil 3.47).



Şekil 3.46. XOD enziminin (10 U/L) değişen konsantrasyonlarda CYN varlığında reaksiyonu için Michaelis-Menten grafiği. t= 37 °C. Sonuçlar, iki bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir



Şekil 3.47. XOD enziminin (10 U/L) değişen konsantrasyonlarda CYN varlığında reaksiyonu için Lineweaver–Burk grafiği. t= 37 °C. Ksantin konsantrasyonu 0,015 – 0,2 mM arasında değişmektedir. Sonuçlar, iki bağımsız ölçümün ortalaması ± SEM olarak ifade edilmiştir

Lineweaver–Burk grafiğinden yararlanarak hem serbest enzim hem de çeşitli konsantrasyonlarda inhibitör ile etkileştirilen enzim örnekleri için K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar; XOD enziminin CYN varlığında inhibisyonunun nonkompetetif inhibisyon mekanizmasına göre gerçekleştiğini, bu nedenle V_{max} değeri azalırken K_M değerinin deneysel koşullar içinde neredeyse sabit kaldığını göstermektedir. Serbest enzimin K_M değeri 0,13 mM ve V_{max} değeri 0,0077 µmol ksantin/mg protein.dakika olarak tespit edilmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda inhibitör varlığında hesaplanan K_M ve V_{max} değerleri Çizelge 3.5'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.5. XOD enziminin inhibisyonuna ilişkin kinetik veriler

CYN Konsantrasyonu	**V_{max} (µmol ksantin/mg protein.dakika)**	**K_M (mM)**	**R^2**
0 µM	0,0077	0,13	0,99
15 µM	0,0046	0,11	0,97
25 µM	0,0032	0,09	0,98
50 µM	0,0026	0,09	0,97
100 µM	0,0025	0,10	0,97

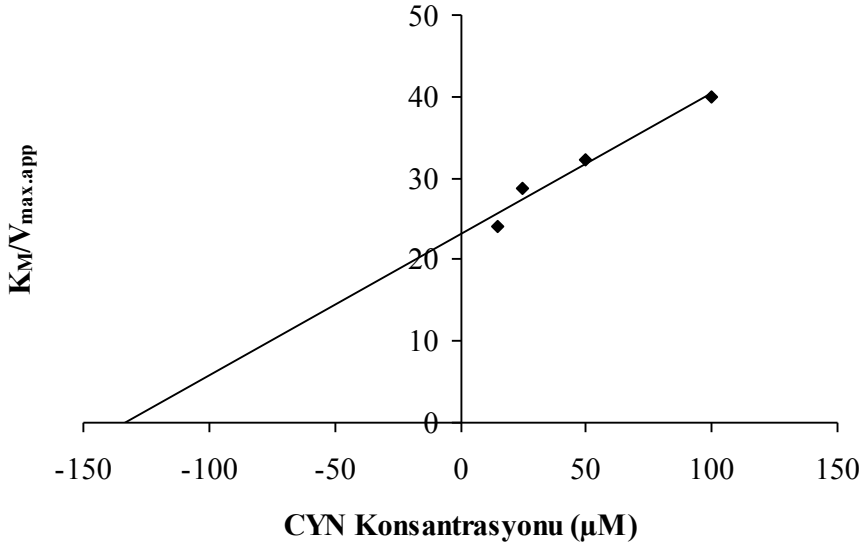
CYN varlığında XOD enzim aktivitesinin inhibisyonu kinetik olarak incelenmiş ve aşağıdaki eşitlikler kullanılarak inhibisyon sabiti (K_I) değeri belirlenmiştir (Şekil 3.48 ve Şekil 3.49).

$$\frac{K_M}{V_{\max_{app}}} = \frac{K_M}{V_{\max} \cdot K_I} \cdot [I] + \frac{K_M}{V_{\max}} \quad \textbf{(3)}$$

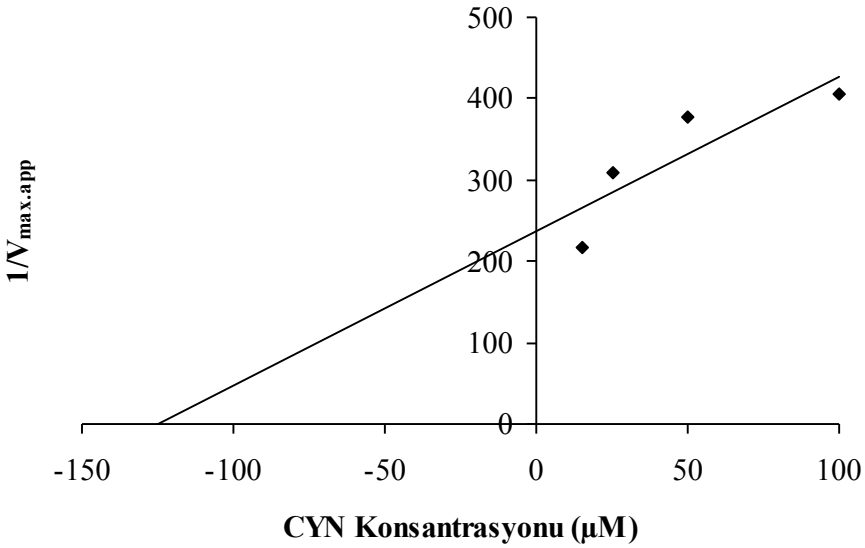
$$\frac{1}{V_{\max_{app}}} = \frac{1}{V_{\max} \cdot K_I} \cdot [I] + \frac{1}{V_{\max}} \quad \textbf{(4)}$$

Burada V_{max} reaksiyonunun maksimum hızını, K_M Michaelis-Menten sabitini, [I] inhibitör konsantrasyonunu, K_I inhibitörün enzim-substrat kompleksine bağlanması ile

ilgili dissosiyasyon sabitini, $V_{max.app}$ ise inhibitör varlığında gözlenen V_{max} değerini ifade etmektedir. Bu grafiklerin eğimlerinden yararlanarak K_I sabiti sırayla 133,88 µM ve 125,42 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.48. İnhibitör konsantrasyonunun $K_M/V_{max.app}$ ile değişim grafiği (3. eşitlik uyarınca)



Şekil 3.49. İnhibitör konsantrasyonunun $1/V_{max.app}$ ile değişim grafiği (4. eşitlik uyarınca)

XOD enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren, doğal kaynaklardan elde edilen bazı bileşenler için literatürde rapor edilen sonuçlar Çizelge 3.6'da özetlenmiştir.

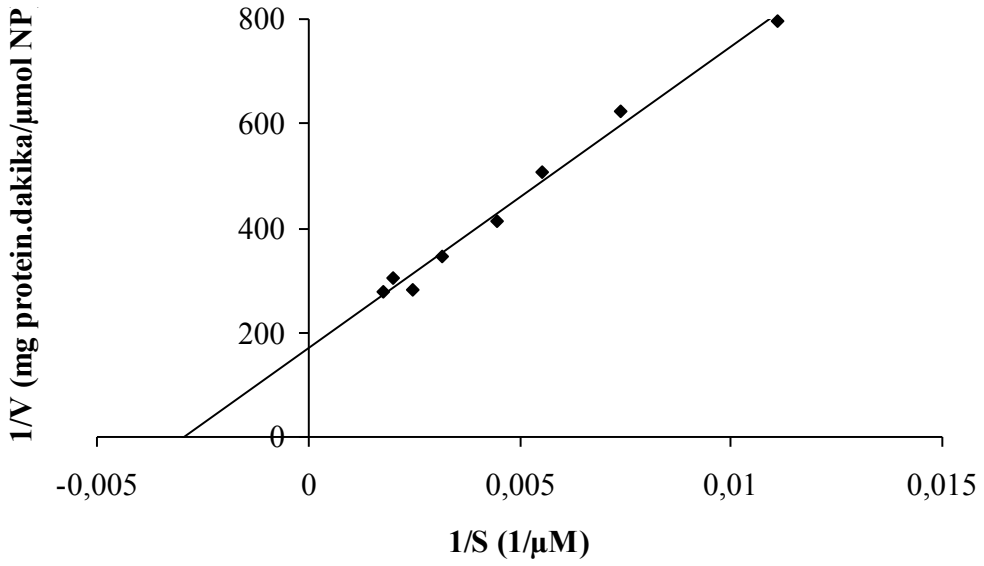
Çizelge 3.6. Doğal kaynaklardan elde edilen bazı bileşenlerin XOD enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin karşılaştırılması

Kaynak	İnhibitör Madde	İnhibisyon Türü	K_I, % inhibisyon, IC_{50}
Bu çalışma	CYN	Nonkompetetif	K_I: 125,42 µM
Kong vd 2000	allopurinol liquiritigenin isoliquiritigenin	karışık	K_i: 7,3 µM, $K_ı$: 28,9 µM K_i: 4,0 µM, $K_ı$: 151,6 µM K_i: 17,4 µM, $K_ı$:81,9 µM
Lin vd 2008	4-hidroksikumarin eskuletin 4-Metileskuletin allopurinol.	kompetetif	IC_{50}: 78,13±3,11 µM IC_{50}: 10,84±0,14 µM IC_{50}: 75,79±1,98 µM IC_{50}: 1,07±0,01 µM
Özyürek vd 2009	apigenin kuersetin naringin	-	IC_{50}: 1,50 µM IC_{50}: 2,08 µM IC_{50}: 1,50 µM
Umamaheswari vd 2009	*Erythrina stricta*'nın petrol eteri özütü	-	IC_{50}: 30,2±2,2 µg/mL
Umamaheswari vd 2009	*Erythrina stricta*'nın kloroform özütü	-	IC_{50}: 21,2±1,6 µg/mL
Umamaheswari vd 2009	*Erythrina stricta*'nın etil asetat özütü	-	IC_{50}: 44,9±1,4 µg/mL

3.3.4. PL-CYN inhibisyonunun kinetiği

Dünyada pek çok hastalığın temel sorumlusu olarak düşünülen obezite problemi giderek daha fazla bireyi tehdit eden bir problem haline gelmektedir. Günümüzde bir milyarı aşkın yetişkin bireyin fazla kilolu olduğu ve bunlardan en az 300 milyonunun klinik obez olarak adlandırıldığı rapor edilmiştir (WHO 2009, Yun 2010). Bu hastalığın tedavisinde genellikle PL enziminin inhibisyonu sonucunda yağ emiliminin azaltılması prensibi ile çalışan ilaçlardan yararlanılmaktadır. Kullanılan ilaçların baş ağrısı, uykusuzluk, kabızlık, damar tıkanıklığı, yüksek tansiyon vb bazı problemlerin oluşumuna neden olmasından dolayı, tüm dünyada aynı amaçla kullanılabilecek doğal ürünlerin geliştirilmesi konusunda yoğun bir çalışma yapılmaktadır. Bu çalışma kapsamında da PL enziminin CYN varlığında inhibe olup-olmadığının belirlenebilmesi için değişen konsantrasyonlarda CYN'nin PL enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir.

Sonuçlar; serbest enzim için aktivite tayin yönteminin başarı ile uygulandığını, fakat enzimin CYN ile etkileşimini içeren inhibisyon sistemlerinde beklenmedik verilerin elde edildiğini göstermektedir. Serbest enzimin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenebilmesi için Lineweaver–Burk grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.50). Grafikten yararlanarak serbest enzimin K_M değeri 0,34 mM ve V_{max} değeri 0,0059 µmol NP/mg protein.dakika olarak tespit edilmiştir.

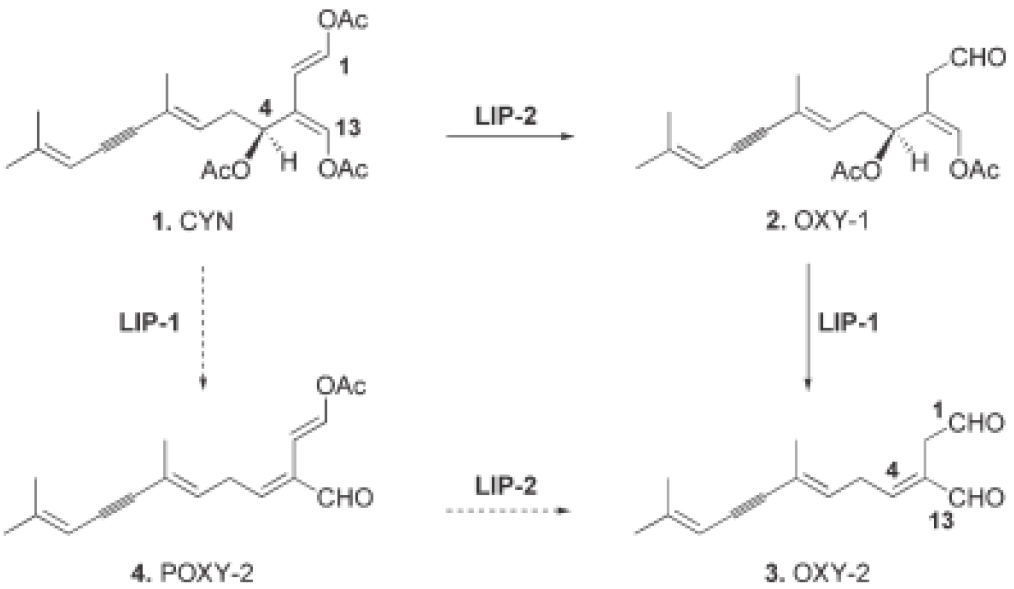


Şekil 3.50. PL enzim aktivitesi için Lineweaver–Burk grafiği

Çalışmada PL enziminin aktivitesinin tayininde yaygın olarak kullanılan kolorimetrik yöntemlerden biri uygulanmıştır. Yöntemde substrat olarak p-NPP bileşeni kullanılmış ve hidrolizi ile salınan p-NP'nin spektrofotometrik tespiti ile enzimin aktivitesi belirlenmiştir. Yöntemin optimizasyonunu takiben yapılan inhibisyon çalışmalarında ortama inhibitör olarak CYN ilave edilmesi durumunda reaksiyon sonunda oluşan sarı rengin arttığı gözlenmiştir. Enzim aktivitesinin belirlenmesi de oluşan renk reaksiyonu ile ilişkili olduğu için, bu durum enzim aktivitesinin belirlenmesinde sıkıntı yaratmaktadır. İnhibitör ilavesi sonucunda oluşan sarı rengin şiddetinin, ortama ilave edilen CYN konsantrasyonu arttıkça artıyor olması dikkat çekicidir. Bu durum, inhibitör olarak kullanılan CYN'nin substrat olan p-NPP ya da ürün olan p-NP ile reaksiyonundan kaynaklanıyor olabilir. Bu amaçla, substrat ve CYN, ortamda enzim

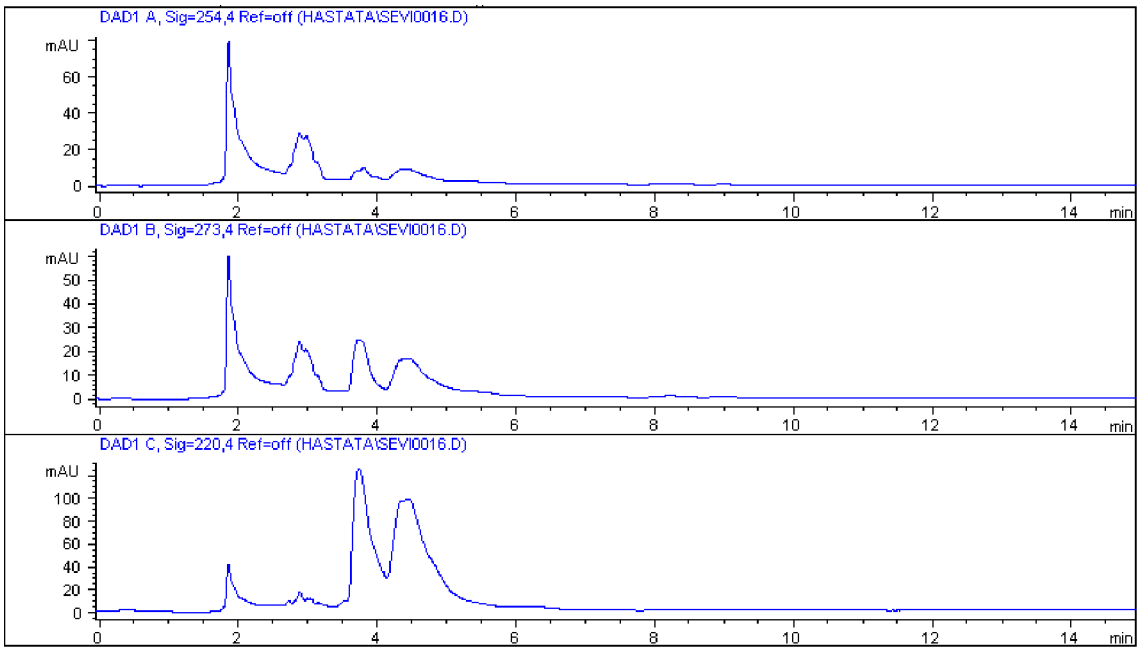
olmadan, aynı reaksiyon koşullarında etkileştirilmiş, fakat bu durumda herhangi bir renk oluşumu gözlenmemiştir. Bu sonuç, etkileşimin muhtemelen reaksiyon sonucunda oluşan ürün ve CYN arasında oluştuğunu düşündürmektedir.

CYN'nin yöntemle girişim oluşturmasının bir diğer nedeni de esteraz enzimlerinin bir türü olan lipaz enziminin CYN ile reaksiyona girip, onun ortamdaki substrat ya da ürünlerle renk reaksiyonu verebilecek farklı türlere dönüşmesini sağlıyor olmasından kaynaklanabilir. Bilindiği üzere CYN, esteraz enzimleri varlığında deasetillenerek transformasyona uğramakta ve ana moleküle göre çok daha aktif olan farklı türlere dönüşmektedir (Jung vd 2002). Cutignano vd (2004) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları da bu görüşü destekler niteliktedir. Bu çalışmada *Oxynoe olivacea* (*O. olivacea*) ve *C. prolifera* türlerinde CYN'nin lipaz enzimleri varlığında transformasyona uğradığı belirtilmiş ve bu işlem sonucunda oluşan ürünler gösterilmiştir. *O. olivacea* türünde CYN'nin ilgili ürünlere dönüşümü için Şekil 3.51'de gösterilen mekanizma önerilmiştir.

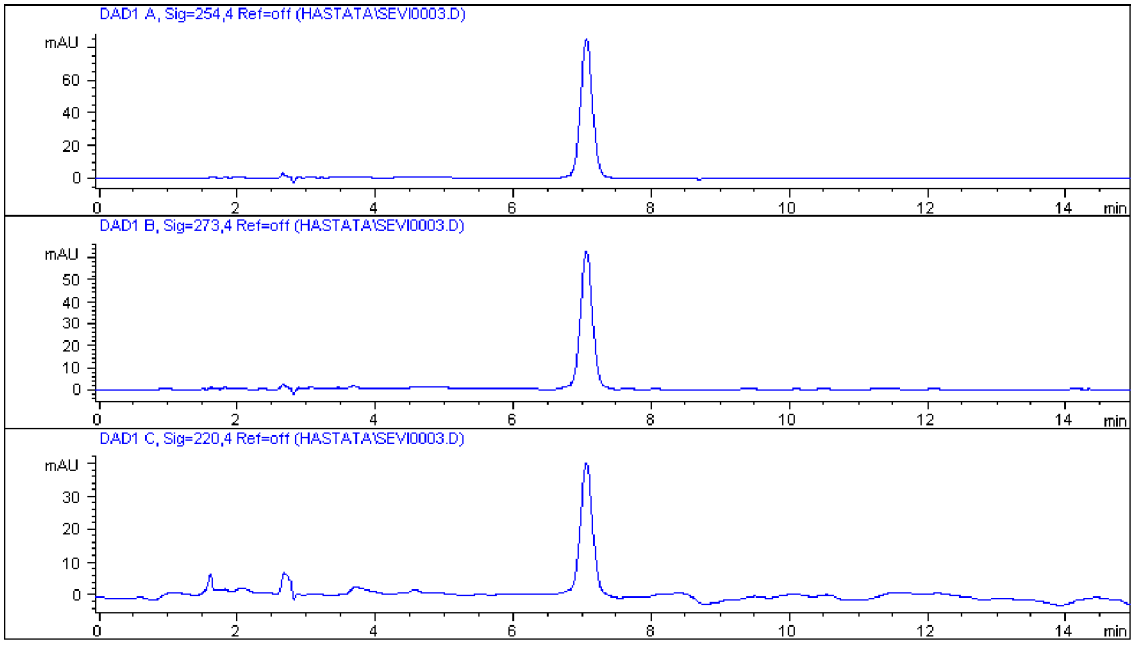


Şekil 3.51. *O. olivacea*'de CYN'nin *in vivo* (LIP-2/LIP-1 yolu) ve *in vitro* (LIP-1/LIP-2 yolu) koşullarda oksitoksinlere dönüşüm mekanizması (Cutignano vd 2004)

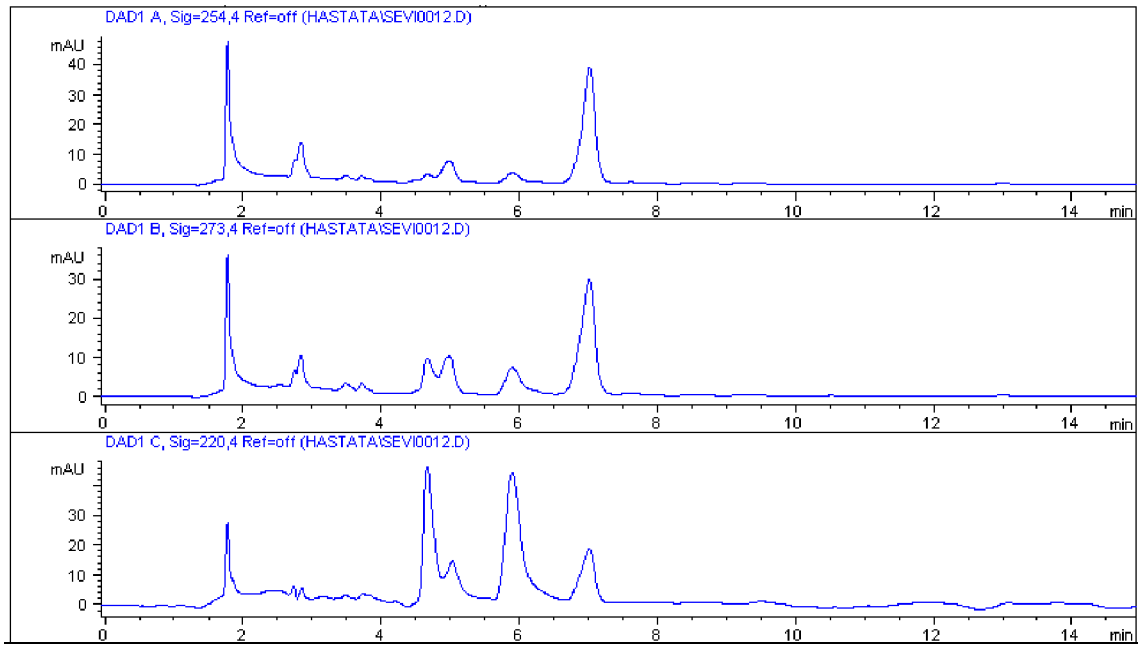
Lipaz enzimi ile etkileştirilen CYN'nin farklı ürünlere olası transformasyonunu gözlemek adına, CYN tespiti için optimize edilen HPLC analiz koşullarında ilgili konjugatların analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde öncelikle PL enziminin tek başına varlığında HPLC kromatogramı kaydedilmiş, daha sonra 25 ppm CYN ile farklı sürelerde (0, 15, 30, 45 dakika) etkileştirilen enzim için analizler tekrarlanmıştır. İlgili sürelerin sonunda reaksiyonu sonlandırmak için ortama metanol ilave edilmiş ve HPLC'de analiz başlatılmıştır. Bu analizlerde elde edilen kromatogramlar Şekil 3.52 – Şekil 3.57 arasında gösterilmiştir.



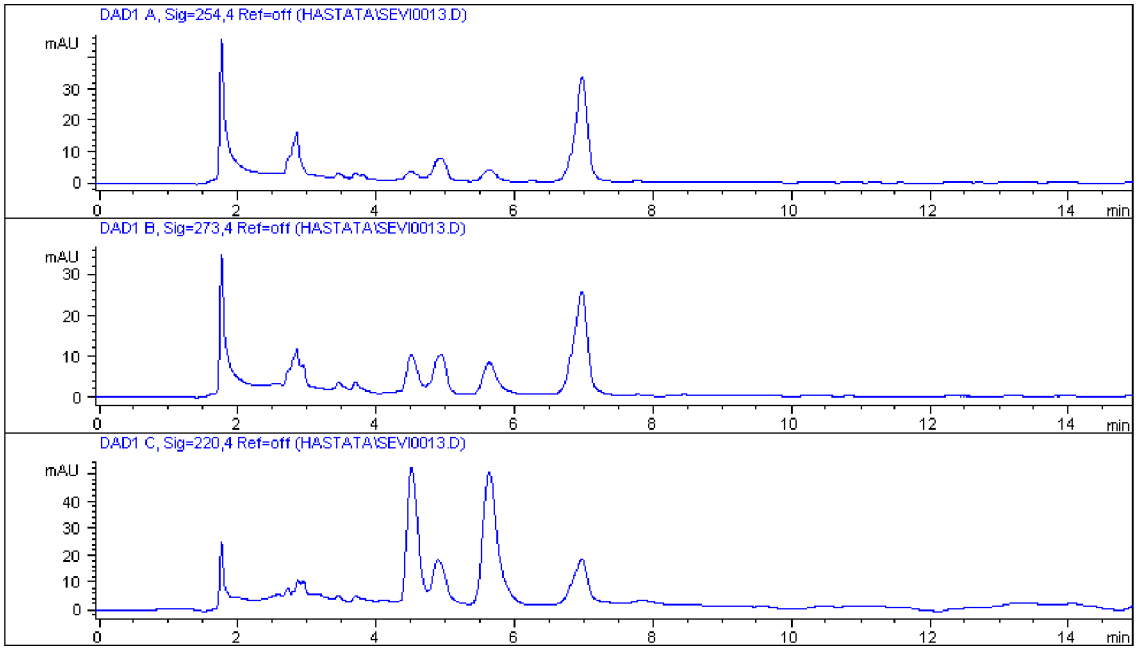
Şekil 3.52. PL enziminin HPLC kromatogramı (10 mg/mL). Koşullar: ters faz (5 µm partikül boyutlu) Hypersil ODS marka C18 kolon (4,6x250 mm) kullanılmıştır. Mobil faz; 0,4 mL/dakika akış hızındaki su:metanol (20:80, v:v) karışımıdır



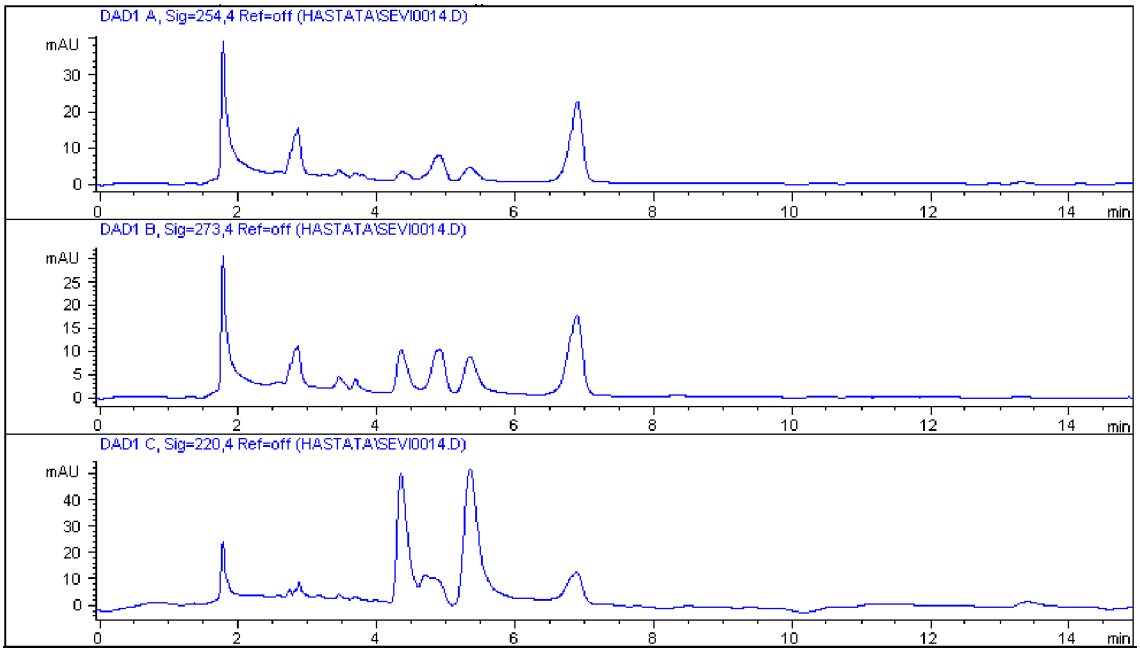
Şekil 3.53. 10 ppm CYN örneği için HPLC kromatogramı



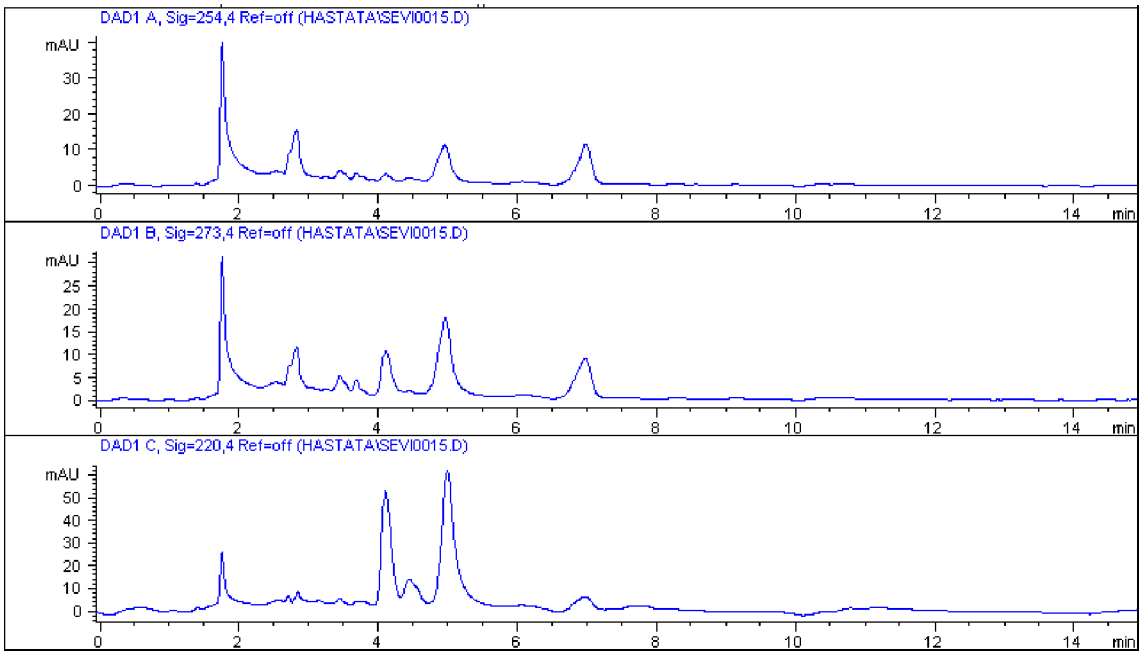
Şekil 3.54. PL enzimi varlığında CYN'nin transformasyonu (0. dakika)



Şekil 3.55. PL enzimi varlığında CYN'nin transformasyonu (15. dakika)



Şekil 3.56. PL enzimi varlığında CYN'nin transformasyonu (30. dakika)



Şekil 3.57. PL enzimi varlığında CYN'nin transformasyonu (45. dakika)

Verilen kromatogramlardan da görüldüğü gibi (Şekil 3.52 – Şekil 3.57) CYN sekonder metaboliti PL enzimi ile etkileştirildiğinde önemli ölçüde transformasyona uğramakta ve böylece ortamdaki miktarı azalmaktadır. Oluşturulan kalibrasyon grafiğinden yola çıkılarak, PL enziminin varlığında CYN'nin transformasyon oranı belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.7'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.7. PL enzimi varlığında CYN'nin transformasyonuna ilişkin veriler

PL ve CYN'nin Etkileşim Süresi (dakika)	**% Transformasyon**
0	26
15	38
30	56
45	77

Lipaz enzimi varlığında CYN'nin transformasyonu ile oluşabilecek bu aktif bileşenler, ortamdaki substrat molekülleri ile reaksiyona girip renkli ürünler oluşturmuş olabilir. Oluşan bu ürünler de enzimin aktivitesini belirlemek için gerekli olan renk oluşumunu maskelemiş olabilir. Dolayısıyla çalışma sonuçları CYN'nin PL enzimi üzerinde inhibisyon etkisi olmadığını değil, kullanılan yöntemin bu amaca uygun olmadığını göstermektedir. MGL enzimi için yaptığımız çalışmalarda inhibisyon gözlenmesi ve literatürde *Caulerpa* özütleri ya da saf CYN'nin lipaz enzimi üzerindeki inhisyon etkisinin değerlendirildiği çalışmaların yer alması da bu görüşü destekler niteliktedir (Bitou vd 1999, Rebah vd 2008).

Lipaz enzim aktivitesini belirlemek üzere çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Lipaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonun hızı; substratın azalma hızı, yağ asitlerinin oluşum hızı ya da kullanılan emülsiyonun şeffaflaşma hızı ölçülerek belirlenebilir (Smeltzer vd 1992, Hasan vd 2009). Bu nedenle lipaz enziminin CYN ile inhibisyonuna yönelik bu çalışma ortamdaki bileşenlerin yöntemle girişim oluşturmayacağı farklı bir yöntem kullanılarak tekrarlanabilir.

4. TARTIŞMA

Sunulan çalışmada, yayılımcı özelliğe sahip yeşil deniz algi *C. racemosa* ve yayılımcı olmayan *C. prolifera* dokularındaki sekonder metabolit olan CYN'i içeren çeşitli özütlerin ve saf CYN'nin medikal öneme sahip bazı enzimler üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir.

Bilindiği üzere CYN sekonder metabolitinin miktarı sezon, sıcaklık, derinlik, stres koşulları vb bazı faktörlere bağlı olarak değişim göstermektedir (Amade ve Lemee 1998, Kandemir-Cavas vd 2008, Sureda vd 2009). Bu çalışma kapsamında da ülkemiz kıyılarında yaygın olarak gözlenen iki farklı *Caulerpa* türündeki (*C. racemosa* ve *C. prolifera*) CYN miktarları sezonal olarak tayin edilmiş ve bulunan değerler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. *C. racemosa* türü ile yapılan analizler için, tüm sezon göz önüne alındığında en yüksek CYN derişimi Haziran 2010 ayında tespit edilmiştir. Bu durum; yaz sezonunda artan deniz suyu sıcaklığına paralel olarak epifitik aktivitenin artmasından ya da metabolik hızın artmasından kaynaklanıyor olabilir. Benzer etki Box vd (2008) tarafından da rapor edilmiştir. Grup, yaptıkları çalışmada *C. taxifolia* üzerinde epifitik aktivite gösteren yayılımcı kırmızı alg *Lophocladia lallemandii* (*L. lallemandii*)'nin etkisini incelemişlerdir. Bu araştırma sonuçlarına göre üzerinde *L. lallemandii* bulunduran *C. taxifolia* örneklerinin, üzerinde *L. lallemandii* bulundurmayan *C. taxifolia* örneklerine kıyasla daha fazla CYN salgısı ürettiği belirtilmiştir (Box vd 2008). Aynı çalışma *Caulerpa* türlerinin CYN salgısını, epifitik aktiviteyi engellemek için kullandıklarına da iyi bir örnek oluşturmaktadır. Sureda vd (2009) tarafından yapılan çalışmada da *C. taxifolia* frondlarındaki CYN miktarının *Bittium reticulatum* (*B. reticulatum*) varlığında artış gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada ayrıca toksik *C. taxifolia* algiyle beslenen *B. reticulatum*'ların antioksidan enzim aktivitelerinin değişimi de incelenmiştir. Bu amaçla *B. reticulatum*, besin olarak birinde *C. taxifolia* diğerinde *P. oceanica* bulunan iki farklı ortamda yetiştirilmiş ve bu iki grup için antioksidan enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır. *C. taxifolia* varlığında yetişen canlıların antioksidan enzim aktivitelerinin *P. oceanica* varlığında yetişen canlılarınkinden daha fazla olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmada ayrıca *C. racemosa* için sonbahar ve kış sezonu örneklerinin CYN düzeylerinin birbirlerine oldukça yakın olup, ilkbahar örneğinde ise bunlara kıyasla ani bir düşüşün oluştuğu gözlenmiştir. Bu durum, Mart ve Nisan aylarında bölgede görülen yoğun yağışların etkisinden kaynaklanıyor olabilir. *C. prolifera*'nın CYN düzeyleri sezonal olarak düzenli bir değişim göstermemektedir. En yüksek CYN düzeyi ilkbahar sezonunda gözlenirken, en düşük CYN düzeyi ise kış sezonunda saptanmıştır. *C. prolifera* türü için elde edilen sonuçlar da deniz suyu sıcaklığının artmış olduğu ilkbahar-yaz döneminde, sonbahar-kış dönemine göre artan miktarlarda CYN salgılandığını destekler niteliktedir.

Daha önce de belirtildiği gibi *Caulerpa* türlerindeki bu önemli sekonder metabolik maddenin miktarının tayinine yönelik literatürde de bazı çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda kullanılan materyalin farklı bölgelerden ve farklı habitatlardan toplanmış olması, kullanılan deneysel yöntemlerin, çalışılan sezonların vb birbirinden farklı olması nedeniyle bu verilerin karşılaştırılması doğru değildir. Bu konuda detaylı incelemeler yapan bir araştırma grubu da ilgili çalışmalarda çok farklı deneysel yaklaşımların ve farklı ölçü birimlerinin kullanılmış olması nedeniyle karşılaştırma yapmanın uygun olmayacağını rapor etmiştir (Klein ve Verlaque 2008).

Bilimsel literatürde *Caulerpa* türleri ve salgılarının biyokimyasal önemi konusunda önemli bazı çalışmalar yer almaktadır. Bu türlerin; tümör ve kanser hücrelerine karşı antiproliferatif ve apoptotik etki gösterdiği (Fischel vd 1995, Barbier vd 2001, Cavas vd 2006), sitotoksik (Boudouresque vd 1996, Galgani vd 1996), antiviral (Nicoletti vd 1999) ve fitotoksik (Raniello vd 2007) özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir. Mozzachiodi vd (2001), CYN'nin *Hirudo medicinalis*'in dokunmaya duyarlı hücrelerinin elektriksel özelliklerini modifiye ettiğini belirtmişler ve bu etkinin CYN'nin dokunma nöronlarındaki Na^+/K^+-ATPaz'ların bazal ve sodyum-indüklenmiş aktivitelerininin her ikisini de inhibe etmesinden kaynaklanıyor olabileceğini önermişlerdir. Bourdron vd (2009) yaptıkları çalışmada kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanılan vinca alkaloidleri ve taksoidlerin yerine, tubülin ve mikrotubülinlerin birleşmesini inhibe etmesinden dolayı yeşil deniz algi *C. taxifolia* tarafından sentezlenen CYN sekonder metabolitinin kullanılabileceğini önermişlerdir. Literatürde

ayrıca *Caulerpa* özütleri ve CYN sekonder metabolitinin enzim inhibitörü olarak potansiyelinin değerlendirildiği birkaç çalışma da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda CYN ve türevlerinin PLA_2 (Mayer vd 1993), LOX (Ninomiya vd 1998), lipaz (Bitou vd 1999, Rebah vd 2008) ve α-amilaz (Teixeira vd 2007) enzim aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkileri değerlendirilmiş, fakat çalışmaların hiçbirinde inhibisyon kinetiği incelenmemiştir. Dolayısıyla bu çalışma kapsamında bulunan sonuçlar literatürde bir ilk olma özelliği taşımaktadır (Cengiz vd 2010a, Cengiz vd 2010b).

Araştırmacılar; özellikle medikal araştırmalarda doğal kaynakların kullanımına gün geçtikçe daha da artan bir ilgi göstermekte ve bu konuda çalışmalar yapmaktadırlar. Örneğin, Grover vd (2002)'nin çalışmasında da belirtildiği gibi 1123'ten fazla bitki türünün diyabet tedavisindeki potansiyel rolü incelenmiştir. Bununla birlikte 200'den fazla saf bileşenin de kan glukoz düzeyini düşürdüğü gösterilmiştir (Marles ve Farnsworth 1994). Diyabet tedavisi ile ilgili terapötik yaklaşımlardan biri, sindirim sisteminden glukoz emilimini azaltmaktır (Ali vd 2006, Bhandari vd 2008, Fred-Jaiyesimi vd 2009). Bu nedenle α-amilaz gibi karbohidratları hidrolizleyen enzimlerin inhibisyonu diyabet, obezite, hipertansiyon, dolaşım sistemi rahatsızlıkları gibi hastalıkların tedavisinde oldukça önemlidir

Ali vd (2006) Malezya'da yetişen bazı bitkilerin α-amilaz enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisini incelemişler ve *Phyllanthus amarus*'un hekzan özütünün enzimde önemli bir inhibisyona neden olduğunu göstermişlerdir (IC_{50} değeri 32 µg/mL). Yapılan bir diğer araştırmada tarih öncesi çağlardan bu yana diyabet tedavisi için kullanılan, Nepal'de yetişen Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.) türünün *in vitro* koşullarda antidiyabetik aktivitesi değerlendirilmiştir. Bu türün hem ham metanolik özütünün hem de bu türden izole edilen iki aktif bileşenin, (-)-3-*O*-galloylepicatechin ve (-)-3-*O*-galloylcatechin, α-amilaz enzim aktivitesi üzerinde önemli ölçüde inhibisyona neden olduğu ve bu saf bileşenler için IC_{50} değerlerinin sırasıyla 739 µM ve 401 µM olarak belirlendiği gösterilmiştir (Bhandari vd 2008). Fred-Jaiyesimi vd (2009) tarafından yapılan çalışmada eski çağlardan bu yana diyabet, bağırsak problemleri, ateş vb rahatsızlıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanılan *Spondias mombin* türünün antidiyabetik etkisi değerlendirilmiştir. Sonuçlar; α-amilaza karşı en aktif fraksiyonun

dietil eter fraksiyonu olduğunu ve 70 mg/mL'lik özütün *Aspergillus oryzae*'dan elde edilen α-amilaz enzim aktivitesi üzerinde % 73 inhibisyona neden olduğunu göstermiştir. Çalışmada ayrıca bu türden izole edilen bir aktif bileşenin, 3β-olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate, 20 mg/mL'lik konsantrasyonunun aynı enzim üzerinde % 57 inhibisyon oluşturduğu da belirtilmiştir. Loizzo vd (2008) geleneksel olarak diyabet tedavisinde kullanılan dokuz farklı bitki türünün α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisini incelemişler ve bu türlerden *Marrubium radiatum* ve *Salvia acetabulosa*'nın sırasıyla 61,1 µg/mL ve 91,2 µg/mL olarak belirlenen IC_{50} değerleri ile en güçlü inhibitörler olduklarını rapor etmişlerdir. *Caulerpa* özütlerinin α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi ilk kez 2007 yılında çalışılmış ve *C. racemosa*'nın ham aseton özütünün α-amilaz enzimi için güçlü bir inhibitör (ED_{50}: 0,09 mg/mL) olduğu rapor edilmiştir (Teixeira vd 2007). İlgili çalışmada da inhibitör olarak *Caulerpa* türlerinin etkisi incelenmiş olmasına karşın, çalışma kapsamında herhangi bir kinetik inceleme yapılmamıştır. Zaten literatürde yer alan çalışmalar genellikle kinetik yaklaşımlardan yoksundur. Bu çalışmada *Caulerpa* türlerinin başlıca sekonder metaboliti olan CYN, *C. prolifera* türünden saflaştırılmış ve bu bileşenin α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir. Çalışma sonuçları CYN varlığında gerçekleşen α-amilaz inhibisyonunun unkompetetif inhibisyon modeli ile açıklanabileceğini göstermektedir. Shobana vd (2009) yaptıkları çalışmada *Eleusine coracana* L.'dan elde edilen fenolik bileşenlerin α-glukozidaz ve pankreatik amilaz üzerindeki inhibisyon etkisini incelemişler ve pankreatik amilazın bu bileşenlerin varlığındaki inhibisyonunun nonkompetetif inhibisyon modeli ile uyumlu olduğunu tespit etmişlerdir. Chethan vd (2008) de polifenollerin α-amilaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisini kinetik olarak incelemişler ve bu inhibisyonun karışık tür nonkompetetif inhibisyon modeline göre gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada polifenolik özütler dışında, bu özütlerden izole edilen gallik asit, vanillik asit, kuersetin, trans-sinnamik asit gibi bileşenlerin de inhibisyon kinetikleri incelenmiş; polifenol özütlerinde gözlenen karışık tür nonkompetetif inhibisyona karşı saf bileşenlerde unkompetetif inhibisyon modelinin geçerli olduğu rapor edilmiştir.

Fosfolipaz enzimleri, hücre membranında bulunan fosfolipid tabakadan araşidonik asitin salınımını gerçekleştirirler. Fosfolipazların bu reaksiyonu katalizlemesi, bazı

fiziksel ve biyolojik sinyallere yanıt olarak oluşur. Araşidonik asit salınım basamağı, eikosanoid biyosentezinde hız kısıtlayan basamağı oluşturmaktadır. Serbestleşen araşidonik asit; iki farklı enzim tarafından katalizlenen iki farklı metabolik yol ile genel olarak eikosanoidler olarak adlandırılan farklı farmakolojik etkileri olan farklı aktif molekülleri oluşturmaktadır.

Bu çalışma kapsamında *C. racemosa* ve *C. prolifera* özütlerinin PLA_2 enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiş ve her iki türle hazırlanan özütün de PLA_2 enzim aktivitesi üzerinde çok yüksek bir inhibisyon etkisi oluşturmadığı belirlenmiştir. Maksimum inhibisyon değeri *C. racemosa* özütü için % 23 civarında, *C. prolifera* özütü için % 11 civarında bulunmuştur.

Çalışma sonuçları Mayer vd (1993) tarafından yapılan çalışmanın verileri ile karşılaştırıldığında, bu çalışmada kullanılan özütlerin CYN'nin transformasyonu ile oluşan diğer türleri içeriyor olabileceği yorumu yapılabilir. Çünkü bu grup yapmış olduğu çalışmada; *C. prolifera*'dan izole edilen CYN için maksimum inhibisyon değerini % 92, *C. bikinensis*'den izole edilen CYN türevi için max inhibisyon değerini % 63 ve *C. racemosa*'dan izole edilen CYN türevi için max inhibisyon değerini % 26 olarak belirlemiştir. Bu çalışmada *C. racemosa* özütü için elde edilen sonuçlar; Mayer vd (1993)'nin *C. racemosa*'nın CYN türevi için tespit ettiği sonuçlar ile oldukça benzerdir.

Fosfolipitlerden ayrılan araşidonik asitin eikosanoidlere dönüşümünün gerçekleştirildiği yollardan biri LOX enzimlerince katalizlenmektedir. Bronşiyal astım, allerjik nezle, bağırsak iltihabı, cilt hastalıkları, iltihaplı romatizma, dolaşım sistemi rahatsızlıkları, osteoporoz ve kanser gibi çok sayıdaki hastalık için mediyatörlerin oluşturulmasından sorumlu olduğu düşünülen bu enzimin inhibisyonu ilgili hastalıkların tedavisinde önemli bir yere sahiptir (Rioux ve Castonguay 1998, Iversen ve Kragballe 2000, Nasser ve Lee 2002, Kudryavtsev vd 2005, Werz 2007).

Bugüne kadar lipid peroksidasyonuna yönelik pek çok inhibitör tanımlanmıştır. En çok tanınan LOX inhibitörleri genellikle fenolik bileşikler olup, yapılarındaki

–OH gruplarının sayısı arttıkça inhibitör olarak aktiviteleri de artış göstermektedir (Sadik vd 2003). Bu durum –OH gruplarının, radikal sönümleyici etkisinden kaynaklanıyor olabilir (Akdemir vd 2001). Buna karşın, tüm LOX inhibitörleri yapısında –OH grupları içermek zorunda değildir ki oldukça etkili inhibitörler olan β-karoten ve özellikle astım tedavisinde kullanılan zileutonun yapısında –OH grubu bulunmamaktadır (Wenzel ve Kamada 1996, Serpen ve Gökmen 2006). Bir yapıda hidrofobik grupların yer alması da inhibitörün etkinliğini arttırmaktadır ki bu durum yapısında hidrofobik alkil grubu içeren E vitamininin troloksa göre daha güçlü olan inhibisyon etkisinin nedenini de açıklamaktadır (Chan 1993). Bu tür moleküllerle gerçekleşen inhibisyon mekanizması, büyük olasılıkla radikal sönümleme ve enzimin hidrofobik aktif bölgesine bağlanma fonksiyonlarının bir bileşkesi olarak gerçekleşmektedir.

Bu çalışmada öncelikle yayılımcı *C. racemosa* ve yayılımcı olmayan *C. prolifera* özütlerinin LOX enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri belirlenmiştir. İnhibisyon etkisinin en fazla olduğu *C. prolifera* ham metanol özütünün LOX enziminin inhibisyonu için IC_{50} değerinin 19,4 mg/mL olduğu tespit edilmiştir. Aynı çözücü ile hazırlanan *C. racemosa* özütünün LOX enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin daha düşük olması, bu türün *C. prolifera* türüne göre daha düşük konsantrasyonda CYN içermesinden kaynaklanıyor olabilir. İnhibitör olarak yapısında bisenolasetat grubu içeren saf CYN'nin kullanıldığı çalışmalar, bu bileşenin LOX enzim aktivitesi için IC_{50} değerinin 5,1 µM olduğunu göstermektedir. Bu değer Ninomiya vd (1998) tarafından CYN türevinin LOX enzim inhibitörü olarak potansiyelinin değerlendirildiği çalışmada bulunan değere kıyasla oldukça küçük bir değer olup (IC_{50} 86 µM), algin bünyesinde halihazırda mevcut olan CYN bileşeninin eser oranda bulunan CYN türevinden daha güçlü bir inhibitör olduğunu ifade etmektedir. Yapılan kinetik incelemeler CYN'nin LOX enzimi için unkompetetif bir inhibitör olduğunu ve ortamda 5 µM CYN varlığında K_M ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 0,041 mM'dan 0,019 mM'a ve 312,5 U/mL'den 151,5 U/mL'ye düştüğünü göstermektedir (Cengiz vd 2010b).

Bu çalışma kapsamında incelenen bir diğer medikal önemli enzim XOD'dir. Metabolizmanın normal işleyişi içinde XOD enzimi, pürin bileşiklerinin degradasyonu

sırasında oluşan ksantin ve hipoksantin ile reaksiyona girerek ürik asit oluşturur. Oluşan ürik asitin sudaki çözünürlüğü oldukça az olduğundan, fazlaca üretim olması özellikle eklem ve böbreklerde ürik asitin birikmesi ile sonuçlanır. İnsanlar dışında pek çok canlı türünde yer alan ürikaz enzimi, ürik asitin daha çözünür bir form olan allantoine dönüşümünü katalizler, ki bu nedenle kan ürik asit düzeyleri daha düşüktür.

Kandaki ürik asit düzeyini azaltmak amacıyla bu bileşenin oluşumunu azaltacak XOD inhibitörleri ya da vücuttan atılımını arttıracak ürikosürik ilaçlar kullanılabilir. XOD inhibitörleri iki farklı mekanizma üzerinden etki gösterebilirler, çünkü enzim substratın bağlanabilmesi için iki farklı bağlanma bölgesi içermektedir. Dolayısıyla XOD inhibitörleri ya allopurinol gibi pürin bağlanma merkezi ile etkileşerek (Hille ve Massey 1981, Hawkes vd 1984) ya da benzimidazol gibi FAD kofaktörünün bağlanma merkezi ile etkileşerek (Skibo 1986) inhibisyona neden olurlar.

Allopurinol; gut ve hiperürisemi tedavisinde yaygın olarak kullanılan potansiyel bir inhibitör olsa da bunun pek çok yan etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle istenmeyen yan etkilerin giderildiği, etkili yeni inhibitörlerin geliştirilmesi gerekmektedir. XOD'nin allopurinol ile inhibisyonunun kompetetif modele uygun olarak gerçekleştiği ve bu inhibisyon için K_i değerinin 0,34 µM olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmaya göre apigenin kuersetin, mirisetin, izoviteksin ve genistein de bu enzim aktivitesi üzerinde kompetetif inhibisyona neden olmaktadır. Yapılan kinetik incelemelerde bu bileşenlerce oluşturulan inhibisyon için inhibisyon sabiti sırasıyla 0,61±0,31 µM, 1,40±0,78 µM, 2,17±1,13 µM, 5,22±2,02 µM ve 3,23±1,01 µM olarak belirlenmiştir (Lin vd 2002).

Bilimsel literatürde doğal polifenollerin özellikle de flavonoidlerin XOD inhibisyon potansiyellerinin değerlendirildiği pek çok çalışma bulunmaktadır. Chan vd (1995) kafeik asit ve klorogenik asitin XOD inhibisyonu için IC_{50} değerlerini sırasıyla 74,6 ± 11,04 µM ve 126,28 ± 2,86 µM olarak belirlemişlerdir. Kafeik asit için bulunan bu sonuç, Nguyen vd (2006) tarafından bulunan sonuçla da uyumludur (IC_{50} 85,4 µM). Bu çalışmada ayrıca XOD inhibisyonu kinetik olarak da değerlendirilmiş ve luteolin ve apigeninin XOD'yi kompetetif olarak inhibe ettiği rapor edilmiştir. Lin vd (2002) de

apigenin ve kuersetinin XOD üzerindeki inhibisyonunun kompetetif modelle açıklanabileceğini belirtmişlerdir. Buna karşın literatürde luteolin, kaempferol ve apigeninin ilgili enzim üzerinde karışık tür inhibisyon oluşturduğuna ilişkin yayınlar da yer almaktadır (Nagao vd 1999). Bu çalışmaların sonuçları arasında gözlenen farklılıklar, farklı metotların ya da farklı enzim-substrat konsantrasyonlarının kullanılmasından kaynaklanıyor olabilir. Lin vd (2008) tarafından yapılan bir diğer çalışmada XOD enzim aktivitesi üzerinde kumarinin yapısal analoglarının etkisi incelenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm bileşenlerin XOD enzimini kompetetif olarak inhibe ettikleri belirlenmiştir. Hatta bu bileşenlerden biri olan esculatinin inhibisyon etkisinin, allopurinol ile kıyaslanabilir büyüklükte olduğu ifade edilmiştir (Lin vd 2008). Çalışmada kullanılan analogların aynı zamanda süperoksit radikallerini sönümleyici bir ajan olduğu, hatta bu bileşenlerin antioksidan, anti-inflamatuar ve antikanserojen özelliklerinin daha önceki çalışmalarda tespit edilmiş olduğu belirtilmiştir. *Caulerpa* türleri için de benzer özelliklerin daha önceki çalışmalarda ortaya çıkarılmış olması bu nedenle oldukça önemlidir. Literatürde inhibitör olarak sentetik yolla üretilen bileşenler yerine bitkisel kökenli aktif bileşenlerin kullanıldığı başka çalışmalar da yer almaktadır. Örneğin, *Lagerstroemia speciosa* yapraklarının sulu özütlerinden izole edilen iki aktif bileşenin, valoneik asit dilakton (VAD) ve ellagik asit (EA), XOD enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiş ve VAD'nin etkisinin allopurinolden bile daha güçlü olduğu belirtilmiştir. XOD için IC_{50} değerleri VAD, allopurinol ve EA için sırasıyla 2,5 µM, 10,4 µM ve 71,5 µM olarak gösterilmiştir. VAD bileşeni ile yapılan kinetik incelemeler, XOD'nin VAD ile inhibisyonunun nonkompetetif model açıklanabileceğini göstermektedir. Bu sonuç *Mallotus japonicus*'tan izole ettiği VAD'nin XOD'yi nonkompetetif olarak inhibe ettiğini gösteren Hatano vd (1990)'nin sonuçları ile de uyumludur (Unno vd 2004). Liu vd (2008) de yapmış oldukları çalışmada, *Salvia miltiorrhiza* türünden izole edilen litospermik asitin (LSA), XOD enzimi üzerindeki inhibisyon etkisini incelemiş ve bu bileşenin XOD enzimi için kompetetif inhibitör olduğunu belirtmiştir (IC_{50}: 5,2 µg/mL). Sonuçlar bu şekilde ifade edilmiş olsa da, yayında verilen Lineweaver–Burk grafiği incelendiğinde inhibisyonun nonkompetetif model ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada saf CYN inhibitörünün XOD enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiş ve bu inhibisyon için IC_{50} değeri 26,92 µM olarak belirlenmiştir. Doğal bir bileşen olan CYN için bulunan bu değer literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında oldukça güçlü bir inhibisyonun oluştuğu görülmektedir. CYN varlığında XOD inhibisyonunun yine doğal bileşenler olan VAD (Hatano vd 1990, Unno vd 2004) ve LSA (Liu vd 2008)'da olduğu gibi nonkompetetif inhibisyon modeli ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bu inhibisyonda muhtemelen CYN, enzime aktif merkez dışında bir bölgeden bağlanmakta ve böylece enzimde oluşturduğu yapısal değişimle substratın, enzim aktif merkezine bağlanma olasılığını veya enzimin substrata olan afinitesini azaltmaktadır. Ortama eklenen CYN konsantrasyonu arttıkça V_{max} değeri giderek azalmakta (0,0077 µmol ksantin/mg protein.dakika'dan 0,0025 µmol ksantin/mg protein.dakika'ya), buna karşın K_M değeri neredeyse sabit kalmaktadır (0,13 mM - 0,10 mM).

İnsan vücudunda farklı fonksiyonlara sahip lipaz türü çeşitli enzimler bulunmaktadır. Bu enzimlerden gastrik ve pankreatik lipaz türlerinin fonksiyonlarında oluşabilecek herhangi bir aksaklık kalp yetmezliği, kalp büyümesi, ritim bozukluğu, damar tıkanıklığı, yüksek tansiyon, diyabet ve buna bağlı böbrek yetmezliği, solunum zorluğu, astım, eklem rahatsızlıkları, karaciğerde yağlanma ve hatta kanser gibi pek çok hastalığın oluşması ile de ilişkilendirilebilen obezite rahatsızlığının gelişimine neden olmaktadır. Obezite ve onunla bağlantılı diğer rahatsızlıkların tedavisinde ilgili lipaz enzimlerinin inhibisyonu büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada CYN sekonder metabolitinin pankreatik lipaz inhibitörü olarak potansiyeli belirlenmeye çalışılmıştır. Bu konudaki ilk çalışmalar 1999 yılında Bitou ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada *C. taxifolia*'dan izole edilen CYN'nin oldukça iyi bir lipaz inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Yapılan sıçan deneylerinin sonuçları da CYN'nin plazma TG düzeyinin düşürülmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Rebah vd (2008) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları da bu sonuçları destekler niteliktedir. Bu çalışmada Tunus kıyılarından toplanan 7 farklı alg türünün etanol ile hazırlanan özütlerinin gastrik ve pankreatik lipaz enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi incelenmiş ve *C. prolifera* özütünün bu enzimler için oldukça güçlü bir inhibitör olduğu tespit edilmiştir. Elde

edilen verilerden hareketle *C. prolifera*'nın antiobezite ilaçlarının üretiminde kullanılabilecek potansiyel bir materyal olduğu önerisinde bulunulmuştur.

İlgili çalışmaları referans alarak başlatılan bu çalışmada CYN bileşeninin PL enzimi üzerinde oluşturması beklenen inhibisyon etkisi gözlenememiştir. Aktivite ölçüm yönteminin optimizasyonunu takiben yapılan inhibisyon çalışmalarında ortama CYN ilave edilmesi durumunda reaksiyon sonunda oluşan sarı rengin şiddetinin arttığı, bu durumun da inhibisyon etkisinin belirlenmesini engellediği tespit edilmiştir.

CYN'nin lipaz enzimi ile etkileşimi sonucunda Jung vd (2002) tarafından rapor edilen transformasyon gerçekleşmiş ve CYN'e göre çok daha aktif olan bileşenler oluşmuş olabilir. Oluşması muhtemel bu bileşenlerin ortamdaki substrat molekülleri ile reaksiyonu sonucunda oluşabilecek renkli ürünler, reaksiyon ortamında gözlenmesi gereken renk değişiminin gözlenmesini engellemiş olabilir. Lipaz enzimleri varlığında CYN'nin transformasyona uğradığını gösteren bir diğer çalışma da Cutignano vd (2004) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada *O. olivacea* ve *C. prolifera* türlerinde CYN'nin lipaz enzimleri varlığında transformasyona uğradığı belirtilmiş ve bu işlem sonucunda oluşan ürünler gösterilmiştir. *O. olivacea* homojenatına CYN ilavesi ile birlikte hızla oksitoksin 2 ve bunun bir öncülü oluşmakta ve yaklaşık 15 dakika içinde tüm CYN bu şekilde transformasyona uğramaktadır. Bu işlem *O. olivacea* homojenatı yerine ticari olarak alınan 6 farklı lipaz enzimi ile tekrarlanmış ve farklı süreler ve farklı transformasyon oranları geçerli olmak üzere temelde benzer reaksiyonların oluştuğu rapor edilmiştir. Bu farklılıklar da aslında CYN'nin bu enzimler üzerindeki inhibisyon etkisinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Çalışmada benzer dönüşümlerin mekanik hasara uğramış alg hücrelerinde de gözlendiği, fakat bunlarda yumuşakçalardan farklı olarak oksitoksin 2 ve onun öncülüne ilaveten oksitoksin 1'in de oluştuğu ve transformasyonun tam olarak tamamlanamadığı belirtilmiştir. Yumuşakçalarda CYN ve türevlerinin varlığına ilişkin bir diğer çalışma da Ciavatta vd (2006) tarafından rapor edilmiştir. Çalışmada Güney Hindistan kıyılarından toplanan *Elysia* cf. *expansa*'nın sekonder metabolitlerinin kimyasal analizleri gerçekleştirilmiş, yapıda CYN ve bununla birlikte bulunan iki yeni metabolitin (dihidrocaulerpenyne ve expansinol) varlığı gösterilmiştir.

Gastrik ve pankreatik lipaz enzimlerine ilaveten vücutta önemli görevler üstlenen bir diğer lipaz enzimi ise MGL'dir. Bu yapı vücutta bir haberci molekül olarak işlev gören 2-AG'nin işlevi tamamlandığında hidrolizlenerek, görevinin sonlandırılmasından sorumludur. MGL inhibisyonunun ağrı, obezite ve çeşitli nörolojik hastalıkların tedavisinde ve ayrıca kanserli hücrelerin yayılımının engellenmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda bu enzimin aktivitesinin, yayılımcı özellikteki kanser hücrelerinde yayılımcı olmayanlara göre önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Jessani vd 2005). Bu çalışmanın sonuçları, MGL enzimi inhibisyonunda CYN'nin oldukça etkili bir bileşen olduğunu ortaya koymaktadır. MGL enziminin CYN ile miktara bağlı olarak inhibe olduğu gösterilmiş ve CYN varlığında MGL inhibisyonu için IC_{50} değeri 98,4 μM olarak belirlenmiştir.

Caulerpa türlerinin; metabolizma için önemli olan bu tepkimelerde rol oynuyor olması, bu türlerin vücuda alınması halinde herhangi bir olumsuzluk yaşanıp-yaşanmayacağının sorgulanması problemini de beraberinde getirmiştir. Bu amaçla ilgili türlerden elde edilen çeşitli özütlerin, vücudun birincil savunma sistemi içinde yer alan antioksidan enzimler (SOD, CAT) üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, *Caulerpa* özütlerinin antioksidan enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyona neden olmadığını göstermektedir. Dolayısıyla türün vücut için zararlı olmadığı yorumu yapılabilir.

Bu konuda ayrıntılı bir inceleme Kumar vd (2010) tarafından yapılmış olup, çalışmada üç farklı *Caulerpa* türünün (*C. veravelensis*, *C. scalpelliformis*, *C. racemosa*) yaklaşık besin ve mineral içeriği ile enzimatik ve non-enzimatik antioksidan aktivite potansiyeli değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre her üç türün kurutulmuş formlarında da yüksek oranda karbohidrat (% 37,23 - % 48,95) ve protein (% 7 - % 13), buna karşın düşük miktarda yağ (% 4'ten daha az) bulunmaktadır. Bu türlerin protein içeriği, soya fasülyesi gibi protein içeriği yüksek bitkisel ürünlerle karşılaştırılabilir büyüklüktedir. Mineral içerikleri oldukça yüksek olan bu türler; Fe, Cu, Zn ve Mn gibi vücutta önemli işlevlere sahip eser elementlerce de zengindirler. Ayrıca türlerde süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimatik

antioksidanlar ile enzimatik olmayan karotenoid gibi antioksidanların yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçların ışığında giderek artan dünya nüfusunun besin ihtiyaçlarının karşılanmasında *Caulerpa* türlerinin kullanılabileceği önerisinde bulunulmuştur. Ayrıca incelenen türlerden *C. scalpelliformis* ve *C. veravelensis* C18:2, C18:3, C20:4 ve C20:5 gibi esansiyel yağ asitlerini yüksek oranda içermesinden dolayı kalp rahatsızlıkları, tromboz ve damar tıkanıklığı gibi problemlerin oluşum riskini azaltabilir. Yüksek enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan aktivite göstermesi de türün, doğal bir antioksidan olarak kullanımını destekler niteliktedir (Kumar vd 2010). Buradan hareketle türün vücudumuzda herhangi bir sorun oluşturmak bir yana, pek çok açıdan önemli faydalarının olacağı görülmektedir.

.

5. SONUÇ

Karasal bitkilerde olduğu gibi pek çok alg türü de bilimsel araştırmalar için önemli özelliklere sahip, çeşitli türlerde biyokimyasal ürünler sentezlerler. Sentezlenen bu ürünlerin kullanıldığı en önemli araştırma alanlarından biri de medikal endüstridir. Zaten pek çok bitki ve alg türünün, çeşitli hastalıkların tedavisinde tarih öncesi çağlardan beri kullanıldığı bilinmektedir. Bu çalışma da ülkemiz kıyılarında yaygın olarak bulunan, hatta varlıkları ile zaman zaman Akdeniz ekosistemini tehdit eden *Caulerpa* türlerinin medikal endüstrideki potansiyel önemini ortaya çıkarmayı amaçlamaktadır. *Caulerpa* türlerinin başlıca sekonder metaboliti olan CYN'nin çeşitli hücre kültürleri üzerinde antiproliferatif, apoptotik ve antiviral özellikler gösterdiği daha önce sonuçlandırılan bilimsel çalışmalarla ortaya konmuştur (Fischel vd 1995, Nicoletti vd 1999, Barbier vd 2001, Cavas vd 2006). Bununla birlikte CYN'nin medikal öneme sahip bazı enzimlerin aktivitelerini inhibe ettiği verisi de bilimsel literatürde yer almaktadır (Mayer vd 1993, Ninomiya vd 1998, Bitou vd 1999, Teixeira vd 2007, Rebah vd 2008).

Bütün bu bilgilerin ışığında şekillenen bu çalışmanın sonuçları *Caulerpa* türlerinin seskiterpenoid yapıdaki biyoaktif bileşenler açısından oldukça zengin birer kaynak olduğunu göstermektedir. Bu türlerin başlıca sekonder metaboliti olan CYN proje kapsamında saflaştırılmış ve özütlerle önemli ölçüde inhibe olan medikal önemli enzimler üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda CYN'nin α-amilaz, LOX ve XOD enzim aktiviteleri üzerinde *in vitro* koşullarda ciddi bir inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir. Bu enzimlerden α-amilaz ve LOX'un CYN varlığında inhibisyonu unkompetetif olarak, buna karşın XOD'nin aynı bileşenle inhibisyonu nonkompetetif olarak gerçekleşmiştir. Medikal çalışmalarda çeşitli hastalıklarla ilişkili oldukları gösterilen bu enzimlerin CYN varlığında inhibe oluyor olması farmasötik araştırmalarda yeni yaklaşımlar sunabilecektir. Yapılması gereken ilk işlem, *in vitro* koşullarda gösterilen bu inhibisyonların *in vivo* koşullarda incelenmesi olmalıdır.

6. KAYNAKLAR

AEBI, H.E. 1974. Catalase. In: H.U. Bergmeyer (Editor), Methos of enzymatic analysis (3rd ed.), pp. 672-684, Weinheim, Germany: Verlag Chemie.

AGUILAR-SANTAMARÍA, L., RAMÍREZ, G., NICASIO, P., ALEGRÍA-REYES, C. and HERRERA-ARELLANO, A. 2009. Antidiabetic activities of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *Journal of Ethnopharmacology*, 124: 284-288.

AKDEMİR, Z.Ş., TATLI İ.İ., SARACOĞLU İ., İSMAİLOĞLU, U.B., ŞAHİN-ERDEMLİ İ. and ÇALIŞ, İ. 2001. Polyphenolic compounds from *Geranium pratense* and their free radical scavenging activities. *Phytochemistry*, 56: 189-193.

AKULA, U.S. and ODHAV, B. 2008. *In vitro* 5-Lipoxygenase inhibition of polyphenolic antioxidants from undomesticated plants of South Africa. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2(9): 207-212.

ALI, H., HOUGHTON, P.J. and SOUMYANATH, A. 2006. α-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107: 449-455.

AMADE, P. and LEMÉE, R. 1998. Chemical defence of the mediterranean alga *Caulerpa taxifolia:* variations in caulerpenyne production. *Aquatic Toxicology*, 43: 287-300.

AMADE, P., VALLS, R., BOUAICHA, N., LEMÉE, R. and ARTRAUD, J. 1994. Méthodes de dosage de la caulerpényne produite par *Caulerpa taxifolia*. In: C.F. Boudouresque, A. Meinesz, V. Gravez (Editors), First International Workshop on *Caulerpa taxifolia*, GIS Posidonie Publications, pp. 163-167, France.

AMAYA, Y., YAMAZAKI, K., SATO, M., NODA, K. and NISHINO, T. 1990. Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O_2-dependent type: amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *The Journal Of Biological Chemistry*, 265: 14170-14175.

AMICO, V., ORIENTE, G., PIATTELLI, M. and TRINGALI, C. 1978. Caulerpenyne, an unusual sequiterpenoid from the green alga *Caulerpa prolifera*. *Tedrahedron Letters*, 38: 3593-3596.

AMYLASE, 2010. Amylase. http://en.wikipedia.org/wiki/Amylase

ANDERSSON, E. 2009. Studies on the activation of cytosolic phospholipase A_2 and 15-Lipoxygenase-1 in hematopoietic cells. Ph.D. Thesis, Karolinska University, 50 pp.

ARITA, H. and HANASAKI, K. 1993. Physiological aspects of a high affinity binding site for pancreatic-type phospholipase A_2. *Journal of Lipid Mediators*, 6: 217-222.

ATKINS, P. and PAULA, J. 2006. Physical Chemistry for the Life Sciences. (2nd ed.) Oxford, New York, 699 pp.

AXELROD, B., CHEESBROUGH, T.M. and LAAKSO, S. 1981. Lipoxygenase from soybeans. *Methods Enzymology*, 71: 441-451.

AYSEL, V., GÖNÜZ, A., ŞENKARDEŞLER, A., ALPASLAN, M. and AYSEL, F. 2001. Problems of *Caulerpa* Lamour (*Caulerpaceae*) of Turkey and will be take measures. *OT Sistematik Botanik Dergisi*, 8: 151-156.

BALSINDE, J., BALBOA, M.A., INSEL, P.A. and DENNIS, E.A. 1999. Regulation and inhibition of phospholipase A_2. *Annual Review of Pharmocology and Toxicology*, 39: 175-189.

BALSINDE, J., BIANCO, I.D., ACKERMANN, E.J., CONDE-FRIEBOES, K. and DENNIS, E.A. 1995. Inhibition of calcium-independent phospholipase A_2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in $P388D_1$ macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 8527-8531.

BANERJEE, S. 2006. Inhibition of mackerel (*Scomber scombrus*) muscle lipoxygenase by green tea polyphenols. *Food Research International*, 39: 486-491.

BARBIER, P., GUISE, S., HUITOREL, P., AMADE, P., PESANDO, D., BRIAND, C. and PEYROT, V. 2001. Caulerpenyne from *Caulerpa taxifolia* has an antiproliferative activity on tumor cell line SK-N-SH and modifies the microtubule network. *Life Sciences*, 70: 415-429.

BEDNAR, W., HOLZMANN, K. and MARIAN, B. 2007. Assessing 12(*S*)-lipoxygenase inhibitory activity using colorectal cancer cells overexpressing the enzyme. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 508-514.

BERNFELD, P. 1951. Enzymes of Starch Degradation and Synthesis. In: F.F. Nord (Editor), Advances in Enzymology, Interscience Publishers, pp. 379-428, New York.

BERRY, C.E. and HARE, J.M. 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *Journal of Physiology*, 555 (3): 589-606.

BHANDARI, M.R., JONG-ANURAKKUN, N., HONG, G. and KAWABATA, J. 2008. α-Glucosidase and α-amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). *Food Chemistry*, 106: 247-252.

BISCHOFF, H. 1994. Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. *European Journal of Clinical Investigation*, 24: 3-10.

BITOU, N., NINOMIYA, M., TSUJITA, T. and OKUDA, H. 1999. Screening of Lipase Inhibitors from Marine Algae. *Lipids*, 34: 441-445.

BLECHA, J.E., ANDERSON, M.O., CHOW, J.M., GUEVARRA, C.C., PENDER, C., PENARANDA, C., ZAVODOVSKAYA, M., YOUNGREN, J.F. and BERKMAN, C.E. 2007. Inhibition of IGF-1R and lipoxygenase by nordihydroguaiaretic acid (NDGA) analogs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17: 4026-4029.

BOMALASKI, J.S. and CLARK, M.A. 1993. Phospholipase A_2 and arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 36: 190-198.

BOUDOURESQUE, C.F., LEMEE, R., MARI, X. and MEINESZ, A. 1996. The invasive alga *Caulerpa taxifolia* is not a suitable diet for the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquatic Botany*, 53: 245-250.

BOUDOURESQUE, C.F., RUITTON, S. and VERLAQUE, M. 2005. Large-scale disturbances, regime shift and recovery in littoral systems subject to biological invasions. In: V. Velikova, N. Chipev (Editors), Large-scale Disturbances (Regime Shifts) and Recovery in Aquatic Ecosystems: Challenges for Management Towards Sustainability, UNESCO Publisher, pp. 85-101, Varna, Bulgaria.

BOURDRON, J., BARBIER, P., ALLEGRO, D., VILLARD, C., LAFITTE, D., COMMEIRAS, L., PARRAIN, J.L. and PEYROT, V. 2009. Caulerpenyne

Binding to Tubulin: Structural Modifications by a Non Conventional Pharmacological Agent, *Medicinal Chemistry*, 5: 182-190.

BOURICHE, H., MILES, E.A., SELLOUM, L. and CALDER, P.C. 2005. Effect of *Cleome arabica* leaf extract, rutin and quercetin on soybean lipoxygenase activity and on generation of inflammatory eicosanoids by human neutrophils. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 72: 195-201.

BOX, A., SUREDA, A., TERRADOS, J., PONS, A. and DEUDERO, S. 2008. Antioxidant response and caulerpenyne production of the alien *Caulerpa taxifolia* (Vahl) epiphytized by the invasive algae *Lophodadia lallemandii* (Montagne), *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 364 (1): 24-28.

BOYINGTON, J.C., GAFFNEY, B.J. and AMZEL, L.M. 1993 The three dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science*, 260: 1482-1486.

BRAYER, G.D., LUO, Y. and WITHERS, S.G. 1995. The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 A resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Science*, 4 (9): 1730-1742.

BURKE, A., SMYTH, E. and FITZGERALD, G.A. 2006. Analgesic–antipyretic agents: pharmacotherapy of gout. In: L.L. Brunton, J.S. Lazo, K.L. Parker (Editors), Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill Medical Publishing Division, pp. 706-710, New York.

CAO, X., ANTONYUK, S.V., SEETHARAMAN, S.V., WHITSON L.J., TAYLOR A.B., HOLLOWAY, S.P., STRANGE R.W., DOUCETTE, P.A., VALENTINE J.S., TIWARI, A., HAYWARD, L.J., PADUA, S., COHLBERG J.A., HASNAIN, S.S. and HART, P.J. 2008. Structures of the G85R variant of SOD1 in familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (23): 16169-16177.

CATALASE, 2006. Catalase FAQ. http://www.all-science-fair-projects.com/science_fair_projects/105/901/69adbb37c02f0fb4f8b674fbae189d9f.html

CAVAS, L. 2010. http://kisi.deu.edu.tr/lcavas/

CAVAS, L. and YURDAKOC, K. 2005-a. A comparative study: Assessment of the antioxidant system in the invasive green alga *Caulerpa racemosa* and some macrophytes from the Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 321: 35-41.

CAVAS, L. and YURDAKOC, K. 2005-b. An investigation on the antioxidant status of the invasive alga *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (Sonder) Verlaque, Huisman, et Boudouresque (Caulerpales, Chlorophyta). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 325: 189- 200.

CAVAS, L., BASKIN, Y., YURDAKOC, K. and OLGUN, N. 2006. Antiproliferative and newly attributed apoptotic activities from an invasive marine alga: *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 339: 111-119.

CEJKOVA, J., ARDAN, T., FILIPEC, M. and MIDELFART, A. 2002. Xanthine oxidoreductase and xanthine oxidase in human cornea. *Histology and Histopathology*, *Cellular and Molecular Biology*, 17: 755-760.

CENGIZ, S., CAVAS, L. and YURDAKOC, K. 2010-a. Alpha amylase inhibition kinetics by caulerpenyne. *Mediterranean Marine Science,* 11(1): 93-103.

CENGIZ, S., CAVAS, L., YURDAKOC, K. and POHNERT, G. 2009. Chromatographic isolation of bioactive agent caulerpenyne from *Caulerpa prolifera*. *Turkish Journal of Biochemistry*, 34: 103-104.

CENGIZ, S., CAVAS, L., YURDAKOC, K. and POHNERT, G. 2010-b. The sesquiterpene caulerpenyne from *Caulerpa* spp. is a lipoxygenase inhibitor. *Marine Biotechnology*, DOI 10.1007/s10126-010-9303-1.

CEVİK, C., YOKES, M.B., CAVAS, L., ERKOL, L.I., DERİCİ, O.B. and VERLAQUE, M. 2007. First report of *Caulerpa taxifolia* (Bryopsidales, Chlorophyta) on the Levantine coast (Turkey, Eastern Mediterranean). *Coastal and Shelf Science*, 74: 549-556.

CHAKRABORTY, R. and RAJAGOPALAN, R. 2002. Diabetes and insulin resistance associated disorders: Disease and therapy. *Current Science*, 83: 1533-1538.

CHAN, A.C. 1993. Partners in defense, vitamin E and vitamin C: Nutrients involved in free radical generation and defense. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 71: 725-731.

CHAN, W.S., WEN, P.C. and CHIANG, H.C. 1995. Structure-activity relationship of caffeic acid analogues on xanthine oxidase inhibition. *Anticancer Research*, 15 (3): 703-707.

CHETHAN, S., SREERAMA, Y.N. and MALLESHI, N.G. 2008. Mode of inhibition of finger millet malt amylases by the millet phenolics. *Food Chemistry*, 111: 187-191.

CHON, S.H., ZHOU, Y.X., DIXON, J.L. and STORCH, J. 2007. Intestinal monoacylglycerol metabolism: developmental and nutritional regulation of monoacylglycerol lipase and monoacylglycerol acyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 33346-33357.

CIAVATTA, M.L., GRESA, M.P.L., GAVAGNIN, M., MANZO, E., MOLLO, E., D'SOUZA, L. and CIMINO, G. 2006. New caulerpenyne-derived metabolites of an *Elysia* sacoglossan from the South Indian coast. *Molecules*, 11: 808-816.

CİRİK, Ş. ve AKÇALI, B. 2002. Denizel Ortama Yabancı Türlerin Taşınıp Yerleşmesi: Biyolojik İşgalin Kontrolü, Hukuksal, Ekolojik ve Ekonomik Yönleri. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 19: 507-527.

COSTA, S.A., TZANOV, T., PAAR, A., GUDELJ, M., GUBITZ, G.M. and CAVACO-PAULO, A. 2001. Immobilization of catalases from Bacillus SF on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 815-819.

Cu/Zn SOD, 2010. Cu/Zn Superoxide Dismutase: A Key Player in the Antioxidant Defense System. http://www.riverbendds.org/index.htm?page=sod.html

CUTIGNANO, A., NOTTI, V., D'IPPOLITO, G., COLL A.D., CIMINO, G. and FONTANA, A. 2004. Lipase-mediated production of defensive toxins in the marine mollusc *Oxynoe olivacea*. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2: 3167-3171.

DAWES, C.J. 1998. Marine Botany (2nd ed.). John Wiley and Sons Inc., New York.

DAWES, C.J. and RHAMSTINE, E.L. 1967. An ultrastructural study of the giant green algal coenocyte *Caulerpa prolifera*. *Journal of Phycology,* 3: 117-126.

DENNIS, E.A. 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A_2. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 13057-13060.

DESCHAMPS, J.D., KENYON, V.A. and HOLMAN, T.R. 2006. Baicalein is a potent in vitro inhibitor against both reticulocyte 15-human and platelet 12-human lipoxygenases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14: 4295-4301.

DOIRON, J., BOUDREAU, L.H., PICOT, N., VILLEBONET, B., SURETTE, M.E. and TOUAIBIA, M. 2009. Synthesis and 5-lipoxygenase inhibitory activity of new cinnamoyl and caffeoylclusters. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19: 1118-1121.

DOSTAL, R. 1928. Observations morphogeniques sur Ie *Caulerpa prolifera* de la baie de Villefranche-sur-Mer. *Comptes-rendus Hebdomadaires des Seances de l'Académie des Sciences de Paris*, 185 (23): 1298-1299.

DREHER, T.W., GRANT, B.R. and WETHERBEE, R. 1978. The wound response in the siphonous *Caulerpa simpliciuscula* C. Ag.: Fine structure and cytology. *Protoplasma*, 96 (1-2): 189-203.

DUMAY, O., PERGENT, G., PERGENT-MARTINI, C. and AMADE, P. 2002. Variations in caulerpenyne contents in *Caulerpa taxifolia* and *Caulerpa racemosa*. *Journal of Chemical Ecology*, 28 (2): 343-352.

DURAND, C., MANUEL, M., BOUDOURESQUE, C.F., MEINESZ, A., VERLAQUE, M. and LE PARCO, Y. 2002. Molecular data suggest a hybrid origin for the invasive *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta) in the Mediterranean Sea. *Journal of Evolutionary Biology*, 15: 122-133.

ELCHURI, S., OBERLEY, T.D., QI, W., EISENSTEIN, R.S., JACKSON ROBERTS, L., VAN REMMEN, H., EPSTEIN, C.J. and HUANG, T.T. 2005. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*, 24: 367-80.

ELLIOTT, W.H. and ELLIOTT, D.C. 2001. Biochemistry and Molecular Biology. (2nd ed.) Oxford University Press, New York, 614 pp.

ENROTH, C., EGER, B.T., OKAMOTO, K., NISHINO, T., NISHINO, T. and PAI, E.F. 2000. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (20): 10723-10728.

ERTAN, Ö.O., TURNA, İ.İ. and CORMACI, M. 1998. A new record for the marine algal flora of Turkey: *Caulerpa scalpelliformis* (Brown *ex* Turner) C. Agardh (*Caluerpaceae*, *Chlorephyceae*). *Turkish Journal of Botany*, 22: 285-287.

ESCOUBET, S., DUPEUX, D. and ESCOUBET, P. 1998. Utilisation du chlorure de sodium comme moyen d'éradication de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C.Agardh. In: C.F. Boudouresque, V. Gravez, A. Meinesz, F. Palluy (Editors), Third international workshop on *Caulerpa taxifolia*, GIS Posidonie Publications, pp. 117-124, Marseille, France.

FARIAS, L.R., COSTA, F.T., SOUZA, L.A., PELEGRINI, P.B., GROSSI-de-SÁ, M.F., NETO, S.M., BLOCH Jr, C., LAUMANN, R.A., NORONHA, E.F. and FRANCO, O.L. 2007. Isolation of a novel *Carica papaya* α-amylase inhibitor with deleterious activity toward *Callosobruchus maculatus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87: 255-260.

FEUSSNER, I. and WASTERNACK, C. 2002. The Lipoxygenase Pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 275-297.

FISCHEL, J.L., LEMÉE, R., FORMENTO, P., CALDANI, C., MOLL, J.L., PESANDO, D., MEINESZ, A., GRELIER, P., PIETRA, P., GUERRIERO, A.

and MILANO, G. 1995. Cell growth inhibitory effects of Caulerpenyne, a sesquiterpenoid from the marine algae *Caulerpa taxifolia*. *Anticancer Research*, 15: 2155-2160.

FRED-JAIYESIMI, A., KIO, A. and RICHARD, W. 2009. α-Amylase inhibitory effect of 3β-olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate isolated from *Spondias mombin* leaf. *Food Chemistry*, 116: 285-288.

GALGANI, I., PESANDO, D., PORTHE-NIBELLE, J., FOSSAT, B. and GIRARD, J.P. 1996. Effect of caulerpenyne, a toxin extracted from *Caulerpa taxifolia* on mechanisms regulating intracellular pH in sea urchin eggs and sea bream hepatocytes. *Journal of Biochemical Toxicology*, 11: 243-250.

GELB, M.H., JAIN, M.K. and BERG, O.G. 1994. Inhibition of phospholipase A_2. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8: 916-924.

GHOSH, P., ADHIKARI, U., GHOSAL, P.K., PUJOL, C.A., CARLUCCI, M.J., DAMONTE, E.B. and RAY, B. 2004. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. *Phytochemistry*, 65: 3151-3157.

GROSS, R.W. 1992. Myocardial phospholipases A_2 and their membrane substrates. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2: 115-121.

GROVER, J.K., YADAV, S. and VATS, V. 2002. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 81 (1): 81-100.

GUIRY, M.D. 2011. Algaebase. http://www.algaebase.org/

GUIRY, M.D. and GUIRY, G.M. 2007. *AlgaeBase* version 4.2. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Http://www.algaebase.org

GUNDERSEN, L.L., MALTERUD, K.E., NEGUSSIE, A.H., RISE, F., TEKLU, S. and ØSTBY, O.B. 2003. Indolizines as novel potent inhibitors of 15-lipoxygenase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11: 5409-5415.

GUY, J.E., STAHL, U. and LINDQVIST, Y. 2009. Crystal structure of a class XIB phospholipase A2 (PLA2): rice (oryza sativa) isoform-2 PLA2 and an octanoate complex. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 19371-19379.

HA, D.T., KIM, H., THUONG, P.T., NGOC, T.M., LEE, I., HUNG, N.D. and BAE, K.H. 2009. Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity of oligostilbenes from the leaf and stem of *Vitis amurensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 125: 304-309.

HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. 2003. Free Radicals in Biology and Medicine. (3rd ed.) Oxford University Press, USA, 936 pp.

HAMEL, G. 1926. Quelques alguesrares ou nouvelles pour la flore méditerranéenne. *Bulletin Muséum National d'Histoire Naturelle*, 32: 420.

HAMEL, G. 1930. Les Caulerpes Méditerranéennes, *Revue Algologique*, 5: 229-230.

HARRIS, C.M. and MASSEY, V. 1997. The oxidative half-reaction of xanthine dehydrogenase with NAD: reaction kinetics and steady-state mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 28335-28341.

HASAN, F., SHAH, A.A. and HAMEED, A. 2009. Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 27: 782–798.

HATANO, T., YASUHARA, T., YOSHIHARA, R., AGATA, I., NORO, T. and OKUDA, T. 1990. Effects of interaction of tannins with co-existing

substances. VII. Inhibitory effects of tannins and related polyphenols on xanthine oxidase. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 38: 1224-1229.

HAWKES, T.R., GEORGE, G.N. and BRAY, R.C. 1984. The structure of the inhibitory complex of alloxanthine (1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-4,6-diol) with the molybdenum centre of xanthine oxidase from electron-paramagnetic-resonance spectroscopy. *The Biochemical Journal*, 218 (3): 961-968.

HEIDARI, R., ZAREAE, S. and HEIDARIZADEH, M. 2005. Extraction, Purification, and Inhibitory Effect of Alpha-Amylase Inhibitor from Wheat (*Triticum aestivum* var. Zarrin). *Pakistan Journal of Nutrition*, 4 (2): 101-105.

HILLE, R. and MASSEY, V. 1981. Tight binding inhibitors of xanthine oxidase. *Pharmacology and Therapeutics*, 14 (2): 249-263.

HINE, A.E. and HUMM, H.J. 1971. *Caulerpa ollivieri* in the Gulf of Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 21 (2): 552-555.

HIRASHIMA, Y., FAROOQUI, A.A., MILLS, J.S. and HORROCKS, L.A. 1992. Identification and purification of a calcium-independent phospholipase A_2 from bovine brain cytosol. *Journal of Neurochemistry*, 59: 708-714.

IVERSEN, L. and KRAGBALLE, K. 2000. Arachidonic acid metabolism in skin health and disease. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 63 (1-2): 25-42.

JAFFRENNOU, B. and ODONNE, L. 1994. Procédé de maîtrise et de réduction du développement de *Caulerpa taxifolia* en Méditerranée. In: C.F. Boudouresque, A. Meinesz, V. Gravez (Editors), First international workshop on *Caulerpa taxifolia*, GIS Posidonie Publications, pp. 339-340, Nice, France.

JESSANİ, N., NİESSEN, S., WEİ, B.Q., NİCOLAU, M., HUMPHREY, M., Jİ, Y., HAN, W., NOH, D.Y., YATES III, J.R., JEFFREY, S.S. and CRAVATT, B.F. 2005. A streamlined platform for high-content functional proteomics of primary human specimens. *Nature Methods*, 2: 691-697.

JUNG, V., THIBAUT, T., MEINESZ, A. and POHNERT, G. 2002. Comparison of the wound-activated transformation of caulerpenyne by invasive and noninvasive *Caulerpa* species of the Mediterranean. *Journal of Chemical Ecology*, 28: 2091-2105.

KANDEMIR-CAVAS, C., CAVAS, L., YOKES, B., HLYNKA, M., SCHELL, R. and YURDAKOC, K. 2008. A novel application of queueing theory on the caulerpenyne secreted by *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C.Agardh: A preliminary study. *Mediterranean Marine Science*, 9/1: 67-75.

KARLSSON, M., CONTRERAS, J.A., HELLMAN, U., TORNQVIST, H. and HOLM, C. 1997. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 27218-27223.

KELLEY, E.E., KHOO, N.K.H., HUNDLEY, N.J., MALIK, U.Z., FREEMAN, B.A. and TARPEY, M.M. 2010. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, 48: 493-498.

KHANNA, S., ROY, S., RYU, H., BAHADDURI, P., SWAAN, P.W., RATAN, R.R. and SEN, C.K. 2003. Molecular basis of vitamin E action: Tocotrienol modulates 12-lipoxygenase, a key mediator of glutamate-induced neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 43508-43515.

KIMMEL, B. and INZUCCHI, S.E. 2005. Oral agents for type 2 diabetes: An update. *Clinical Diabetes*, 23: 64-76.

KING, A.R., DURANTI, A., TONTINI, A., RIVARA, S., ROSENGARTH, A., CLAPPER J.R., ASTARITA, G., GEAGA, J.A., LUECKE, H., MOR, M., TARZIA, G. and PIOMELLI, D. 2007. URB602 inhibits monoacylglycerol lipase and selectively blocks 2-arachidonoylglycerol degradation in intact brain slices. *Chemistry and Biology*, 14: 1357-1365.

KLEIN, J. and VERLAQUE, M. 2008. The *Caulerpa racemosa* invasion: A critical review. *Marine Pollution Bulletin*, 56: 205-225.

KOKOGLU, E., BELCE, A., OZYURT, E. and TEPELER, Z. 1990. Xanthine oxidase levels in human brain tumors. *Cancer Letters*, 50: 179-181

KONG, L.D., ZHANG, Y., PAN, X., TAN, R.X. and CHENG, C.H.K. 2000. Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated *Sinofranchetia chinensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 500-505.

KRAULIS, P.J. 1991. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structure. *Journal of Applied Crystallography*, 24: 946-950.

KUDRYAVTSEV, I.A., GUDKOVA, M.V., PAVLOVA, O.M., ORESHKIN, A.E. and MYASISHCHEVA, N.V. 2005. Lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in growth control of tumor cells of different type. *Biochemistry*, 70: 1396-1403.

KUMAR, M., GUPTA, V., KUMARI, P., REDDY, C.R.K. and JHA, B. 2010. Assessment of Nutrient Composition and Antioxidant Potential of Caulerpaceae Seaweeds. *Journal of Food Composition and Analysis*, DOI:10.1016/J.JFCA.2010.07.007.

KUMARAGURUPARAN, R., SUBAPRIYA, R., KABALIMOORTHY, J. and NAGINI, S. 2002. Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast. *Clinical Biochemistry*, 35: 275-279.

LABAR, G., BAUVOIS, C., BOREL, F., FERRER, J.L., WOUTERS, J. and LAMBERT, D.M. 2010. Crystal structure of the human monoacylglycerol lipase, a key actor in endocannabinoid signaling. *Chembiochem* 11: 218-227.

LEVİ, B. and FRİEDLANDER, M. 2004. Identification of two putative adhesive polypeptides in *Caulerpa prolifera* rhizoids using an adhesion model system. *Journal of Applied Phycology*, 16: 1-9.

Lİ, Y., HUANG, T.T., CARLSON, E.J., MELOV, S., URSELL, P.C., OLSON, J.L., NOBLE, L.J., YOSHİMURA, M.P., BERGER, C., CHAN, P.H., WALLACE, D.C. and EPSTEİN, C.J. 1995. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genetics,* 11: 376-381.

LIN, C.M., CHEN, C.S., CHEN, C.T., LIANG, Y.C. and LIN, J.K. 2002. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294 (1): 167-172.

LIN, H.C., TSAI, S.H., CHEN, C.S., CHANG, Y.C., LEE, C.M., LAI, Z.Y. and LIN, C.M. 2008. Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochemical Pharmacology*, 75: 1416-1425.

LIN, K.C., LIN, H.Y. and CHOU, P. 2000. The interaction between uric acid level and other risk factors on the development of gout among asymptomatic hyperuricemic men in a prospective study. *Journal of Rheumatology*, 27: 1501-1505.

LIPOXYGENASE INHIBITOR SCREENING ASSAY KIT, 2008. Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA, Catalog No. 765001.

LIPOXYGENASE STRUCTURE, 2010. Lipoxygenase structure. http://metallo.scripps.edu/PROMISE/2SBL.html

LITTLER, D.S. and LITTLER, M.M. 2000. Caribbean reef plants. Offshore Graphics, Inc., Washington, D.C. USA, 542 ss.

LIU, X., CHEN, R., SHANG, Y., JIAO, B. and HUANG, C. 2008. Lithospermic acid as a novel xanthine oxidase inhibitor has anti-inflammatory and hypouricemic effects in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 176: 137-142.

LOIZZO, M.R., SAAB, A.M., TUNDIS, R., MENICHINI, F., BONESI, M., PICCOLO, V., STATTI, G.A., de CINDIO, B., HOUGHTON, P.J. and MENICHINI, F. 2008. *In vitro* inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 109-116.

LOWE, M.E. 1997. Structure and function of pancreatic lipase and colipase. *Annual Review of Nutrition*, 17: 141-158.

MADL, P. and YIP, M. 2005. Literature Review of *Caulerpa taxifolia*. Contribution for the 31th BUFUS Newsletter. Http://www.sbg.ac.at/ipk/avstudio/pierofun/ct/ct-1.htm

MAIGA, A., MALTERUD, K.E., DIALLO, D. and PAULSEN, B.S. 2006. Antioxidant and 15-lipoxygenase inhibitory activities of the Malian medicinal plants *Diospyros abyssinica* (Hiern) F. White (Ebenaceae), *Lannea velutina* A. Rich (Anacardiaceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Afzel) Benth. (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 104: 132-137.

MALTERUD, K.E. and RYDLAND, K.M. 2000. Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5576-5580.

MARLES, R. and FARNSWORTH, N. 1994. Plants as sources of antidiabetic agents. In: H. Wagner, N.R. Farnsworth (Editors), Economic and Medicinal Plant Research, Academic Pres Ltd., pp. 149-187, United Kingdom.

MARTINELLE, M., HOLMQUIST, M. and HULT, K. 1995. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1258: 272-276.

MATSUI, T., TANAKA, T., TAMURA, S., TOSHIMA, A., MIYATA, Y. and TANAKA, K. 2007. Alpha-glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 99-105.

MAYER, A.M.S., PAUL, V.J., FENICAL, W., NORRIS, J.N., CARVALHO, M.S. and JACOBS, R.S. 1993. Phospholipase A_2 inhibitors from marine algae. *Hydrobiologia*, 260/261: 521-529.

MCCONNELL, O.J., HUGHES, P.A., TARGETT, N.M. and DALEY, J. 1982. Effects of secondary metabolites from marine algae on feeding by the sea urchin, *Lytechinus variegatus*. *Journal of Chemical Ecology*, 8: 1437-1453.

MEINESZ, A. 1999. Killer algae. The true tale of a biological invasion. The University of Chicago Press, Chicago, London, 360 pp.

MEINESZ, A. and HESSE, B. 1991. Introduction of the tropical alga *Caulerpa taxifolia* and its invasion of the northwestern Mediterranean. *Oceanologica Acta*, 14: 415-426.

MEINESZ, A., MELNICK, J., BLACHIER, J. and CHARRIER, S. 1996. Etude preliminaire en aquarium de deux ascoglosses tropcaux consommant *Caulerpa*

taxifolia: une voi de recherche pour la lutte biologique. In: A. Ribera-Siguan, E. Ballesteros, A. Gomez, C.F. Boudouresque, V. Gravez (Editors), Proceedings of the second international workshop on *Caulerpa taxifolia*, Universitat Barcelona Publications, pp. 157-161, Barcelona, Spain.

MEINESZ, M., BELSHER, T., THIBAUT, T., ANTOLIC, B., BEN, M.K., BOUDOURESQUE, C.F., CHIAVERINI, D., CINELLI, F., COTTALORDA, J.M., DJELLOULI, A., EL ABED, A., ORESTANO, C., GRAU, A.M., IVEŠA, L., JAKLIN, A., LANGAR, H., MASSUTI-PASCUAL, E., PEIRANO, A., TUNESI, L., VAUGELAS, J de, ZAVODNIK, N. and ZULJEVIC, A. 2001. The introduced alga *Caulerpa taxifolia* continues to spread in the Mediterranean. *Biological Invasions*, 3: 201-210.

MEYER, K.D. and PAUL, V.J. 1992. Intraplant variation in secondary metabolite concentration in three species of *Caulerpa* (Chlorophyta, Caulerpales) and its effects on herbivorous fishes. *Marine Ecology Progress Series*, 82: 249-257.

MONOACYLGLYCEROL LIPASE INHIBITOR SCREENING ASSAY KIT, 2008. Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA, Catalog No. 10005192.

MOZZACHIODI, R., SCURI, R., ROBERTO, M. and BRUNELLI, M. 2001. Caulerpenyne, a toxin from the seaweed *Caulerpa taxifolia*, depresses after hyperpolarization in invertebrate neurons, *Neuroscience*, 107: 519-526.

MULLER, F.L., SONG, W., LIU, Y., CHAUDHURI, A., PIEKE-DAHL, S., STRONG, R., HUANG, T.T., EPSTEIN, C.J., ROBERTS, L.J., CSETE, M., FAULKNER, J.A. and VAN REMMEN, H. 2006. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radical Biology and Medicine*, 40 (11): 1993-2004.

NAGAO, A., SEKI, M. and KOBAYASHI, H. 1999. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63 (10): 1787-1790.

NASSER, S.M.S. and LEE, T.H. 2002. Products of 15-lipoxygenase: are they important in asthma? *Clinical and Experimental Allergy*, 32: 1540-1542.

NGUYEN, M.T., AWALE, S., TEZUKA, Y., UEDA, J.Y., TRAN, Q. and KADOTA, S.A. 2006. Xanthine oxidase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum sinense*. *Planta Medica*, 72: 46-51.

NICOLETTI, E., DELLA PIETA, F., CALDERONE, V., BANDECCHI, P., PISTELLO, M., MORELLI, I. and CINELLI, F. 1999. Antiviral properties of a crude extract from a green alga *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh. *Phytotherapy Research*, 13: 245-247.

NINOMIYA, M., ONISHI, J. and KUSUMI, T. 1998. 12-Lipoxygenase inhibitory activity of Japanase seaweeds and isolation of caulerpenyne derivative from green alga *Caulerpa taxifolia* as an inhibitor. *Fisheries Science*, 64: 346-347.

OCTIVIO, L. and RIGDEN, D. 2000. Activity of wheat α-amylase inhibitors towards bruchid α-amylase and structural explanation of observed specificities. *European Journal of Biochemistry*, 267: 2166-2173.

OLLIVIER, G. 1928. Contribution a la conaissance de la fiore marine des Alpes Maritimes. *Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco*, 522: 1-8.

OPHARDT, C.E. 2006. Virtual Chembook. http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/570enzymes.html

OULD-AHMED, N. and MEINESZ, A. 2007. First record of the invasive alga *Caulerpa racemosa* on the coast of Algeria. *Cryptogamie, Algologie*, 28: 303–305.

ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K. and APAK, R. 2009. Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Analytica Chimica Acta*, 636: 42-50.

PANAYOTIDIS, P. and ŽULJEVIC, A. 2001. Sexual reproduction of the invasive green alga *Caulerpa racemosa* var. *occidentalis* in the Mediterranean Sea. *Ocaenologica Acta*, 24: 199- 203.

PARKS, D.A. and GRANGER, D.N. 1986. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 548: 87-99.

PAUL, V.J. and FENICAL, W. 1986. Chemical defense in tropical green algae, order Caulerpales. *Marine Ecology Press Series*, 34: 157- 169.

PDB, 2010. An Information Portal to Biological Macromolecular Structures. http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb94_2.html

PESANDO, D., LEMEE, R., FERRUA, C., AMADE, P. and GIRARD, J.P. 1996. Effects of caulerpenyne, the major toxin from *Caulerpa taxifolia* on mechanisms related to sea urchin egg cleavage. *Aquatic Toxicology*, 35: 139-155.

POR, F.D. 1978. Lessepsian Migrations. The Influx of Red Sea Biota into the Mediterranean by Way of the Suez Canal. Springer Publications, Berlin, 228 pp.

PRIGGE, S.T., BOYINGTON, J.C., FAIG, M., DOCTOR, K.S., GAFFNEY, B.J. and AMZEL, L.M. 1997. Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie*, 79: 629-636.

QIU, Z.H., de CARVALHO, M.S. and LESLIE, C.C. 1993. Regulation of phospholipase A_2 activation by phosphorylation in mouse peritoneal macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 24506-24513.

RAMASUBBU, N., PALOTH, V., LUO, Y., BRAYER, G.D., LEVINE, M.J. 1996. Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 A resolution: implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallographica D*, 52: 435 – 446.

RANIELLO, R., MOLLO, E., LORENTI, M., GAVAGNIN, M. and BUIA, M.C. 2007. Phytotoxic activity of caulerpenyne from the Mediterranean invasive variety of *Caulerpa racemosa*: a potential allelochemical. *Biological Invasions*, 9: 361-368.

RANSOD SUPEROXIDE DISMUTASE KIT, 2006. RANDOX Laboratories Ltd., Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, United Kingdom.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F. and EICHHORN, S.E. 1992. Biology of Plants. Worth Publishers, New York.

REBAH, F.B., SMAOUI, S., FRIKHA, F., GARGOURI Y. and MILED, N. 2008. Inhibitory Effects of Tunisian Marine Algal Extracts on Digestive Lipases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151: 71-79.

RIOUX, N. and CASTONGUAY, A. 1998. Inhibitors of lipoxygenase: a new class of cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis*, 19: 1393-1400.

ROBERT, P. and GRAVEZ, V. 1998. Contrôle de l'algue *Caulerpa taxifolia* dans le Parc National de Port-Cros (Var, France). In: C.F. Boudouresque, V. Gravez, A. Meinesz, F. Palluy (Editors), Proceedings of the third international workshop on *Caulerpa taxifolia*, GIS Posidonie Publications, pp.79-87, France.

ROMERO, J. 1997. Conséquences de l'expansion de *Caulerpa taxifolia* en Méditerranée. In: Académie des Sciences Paris (Ed.) Dynamique d'espèces

marines invasives: application à l'expansion de *Caulerpa taxifolia* en Méditerranée. Lavoisier Publications, pp. 241-254. Paris, France.

ROUSSEL, A., CANAAN, S., EGLOFF, M.P., RIVIERE, M., DUPUIS, L., VERGER, R. and CAMBILLAU, C. 1999. Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 16995-17002.

RUITTON, S., JAVEL, F., CULIOLI, J.M., MEINESZ, A., PERGENT, G. and VERLAQUE, M. 2005. First assessment of the *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta) invasion along the French Mediterranean coast. *Marine Pollution Bulletin*, 50: 1061-1068.

SADIK, C.D., SIES, H. and SCHEWE, T. 2003. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochemical Paharmacology*, 65: 773-781.

SAFO, M.K., MUSAYEV, F.N., WU, S.H., ABRAHAM, D.J. and KO, T.P. 2001. Structure of tetragonal crystals of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallographica D*, 57: 1-7.

SAIFUDDIN, N. and RAZIAH, A.Z. 2008. Enhancement of lipase enzyme activity in non-aqueous media through a rapid three phase partitioning and microwave irradiation. *E-Journal of Chemistry*, 5: 864-871.

SANT, N., DELGADO, O., RODRIGUEZ-PRIETO, C. and BALLESTEROS, E. 1996. The spreading of the introduced saeweed *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh in the Mediterranean Sea: testing the boat transportaion hypothesis. *Botanica Marina*, 39: 427-430.

SAU, A.K., MONDAL, M.S. and MITRA, S. 2001. Interaction of Cu^{2+} ion with milk xanthine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1544: 89-95.

SEGURA, J. and RUILOPE, L.M. 2006. Antihypertensive therapy in patients with metabolic syndrome. *Current Opinion Nephrology Hypertension*, 15: 493-497.

SEKHAR RAO, K.C., DIVAKAR, S., APPU RAO, A.G., KARANTH, N.G. and SATTUR, A.P. 2002. A lipoxygenase inhibitor from *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 539-542.

SERPEN, A. and GÖKMEN, V. 2006. A proposed mechanism for the inhibition of soybean lipoxygenase by beta-carotene. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 401-406.

SERPEN, A. and GÖKMEN, V. 2007. Effects of β-carotene on soybean lipoxygenase activity:kinetic studies. *European Food Research and Technology*, 224: 743-748.

SEYEDI, S.M., JAFARI, Z., ATTARAN, N., SADEGHIAN, H., SABERI, M.R. and RIAZI, M.M. 2009. Design, synthesis and SAR studies of 4-allyoxyaniline amides as potent 15-lipoxygenase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17: 1614-1622.

SHAFIK, M.A. and MANAWY, I.M. 2008. Physiological and Structural Characteristics of Three Varieties of *Caulerpa racemosa* (Försskal) J. Agardh. From the Mediterranean Sea. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 3 (1): 97-110.

SHARMA, R., CHISTI, Y. and BANERJEE, U.C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19: 627-662.

SHOBANA, S., SREERAMA, Y.N. and MALLESHI, N.G. 2009. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α-glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry*, 115: 1268-1273.

SIEDOW, J.N. 1991. Plant Lipoxygenase: Structure and Function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 145-188.

SKIBO, E.B., 1986. Noncompetitive and irreversible inhibition of xanthine oxidase by benzimidazole analogues acting at the functional flavin adenine dinucleotide cofactor. *Biochemistry*, 25(15): 4189-4194.

SMELTZER, M.S., HART, M.E. and IANDOLO, J.J. 1992. Quantitative Spectrophotometric Assay for Staphylococcal Lipase. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2815–2819.

SMITH, C.M. and WALTERS, L.J. 1999. Fragmentation as a strategy for *Caulerpa* species: fates of fragments and implications for management of an invasive weed. *Marine Ecology*, 20: 307-319.

SMYRNIOTOPOULOS, V., ABATIS, D., TZIVELEKA, L.A., TSITSIMPIKOU, C., ROUSSIS, V., LOUKIS, A. and VAGIAS, C. 2003. Acetylene Sesquiterpenoid Esters from the Green Alga *Caulerpa prolifera*. *Journal of Natural Products*, 66: 21-24.

$sPLA_2$ ASSAY KİT, 2006. Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA, Catalog No. 760700.

STEELE, V.E., HOLMES, C.A., HAWK, E.T., KOPELOVICH, L., LUBET, R.A., CROWELL, J.A., SIGMAN, C.C. and KELLOFF, G.J. 1999. Lipoxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 8: 467-483.

STRASSBURGER, E., 1998. Lehrbuch der Botanik. 33rd ed.; Fischer Verlag; Stuttgart – FRG.

SUREDA, A., BOX, A., DEUDERO, S. and PONS, A. 2009. Reciprocal effects of caulerpenyne and intense herbivorism on the antioxidant response of *Bittium reticulatum* and *Caulerpa taxifolia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 795-801.

SWEAT, L.H. 2009. Green Feather Alga. *Caulerpa sertularioides*. http://www.sms.si.edu/irlspec/Cauler_sertul.htm

TEIXEIRA, V.L., ROCHA, F.D., HOUGHTON, P.J., KAPLAN, M.A.C. and PEREIRA, R.C. 2007. α-Amylase inhibitors from Brazilian seaweeds and their hypoglycemic potential. *Fitoterapia*, 78: 35-36.

TELEFONCU, A. 1992. Tıp ve Fen Bilimciler için Biyokimya. Arkadaş Tıp Kitapları, Kırklareli, 464 ss.

THEORELL, H., HOLMAN, R.T. and AKESON, A. 1947. Crystalline Lipoxidase. *Acta Chemica Scandinavica*, 1: 571-576.

THIBAUT, T. and MEINESZ, A. 2000. Are the Mediterranean ascoglossan molluscs *Oxynoe olivacea* and *Lobiger serradifalci* suitable agents for a biological control against the invading alga *Caulerpa taxifolia*? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, *Paris, Life Science*, 323: 477-488.

THIBAUT, T., MEINESZ, A., AMADE, P., CHARRIER, S., de ANGELIS, K., IERARDI, S., MANGIALAJO, L., MELNICK, J. and VIDAL, V. 2001. *Elysia subornata* (Mollusca) a potential control agent of the alga *Caulerpa taxifolia*

(Chlorophyta) in the Mediterranean Sea. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom*, 81: 497-504.

THIBAUT, T., MEINESZ, A., BURTAIRE, L., CHARRIER, S., MANGIALAJO, L., IERARDI, S. and VIDAL, V. 1998. Biological control of *Caulerpa taxifolia* in the Mediterranean Sea: use of tropical and Mediterranean Ascoglossans. In: C.F. Boudouresque, V. Gravez, A. Meinesz, F. Palluy (Editors), Proceedings of the third international workshop on *Caulerpa taxifolia*, GIS Posidonie Publications, pp.105-111, Marseille, France.

UMAMAHESWARI, M., ASOKKUMAR, K., SIVASHANMUGAM, A.T., REMYARAJU, A., SUBHADRADEVI, V. and RAVI, T.K. 2009. *In vitro* xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. *Journal of Ethnopharmacology*, 124: 646-648.

UNNO, T., SUGIMOTO, A. and KAKUDA, T. 2004. Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. *Journal of Ethnopharmacology*, 93: 391-395.

VALLS, R., ARTAUD, J., AMADE, P., VICENTE, N. and PIOVETTI, L. 1994. Determination of caulerpenyne, a toxin from the green alga *Caulerpa taxifolia* (Caulerpacea). *Journal of Chromatography A*, 663: 114-118.

VAN TILBEURGH, H., SARDA, L., VERGER, R. and CAMBILLAU, C. 1992. Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. *Nature*, 359: 159-162.

VERLAQUE, M. 1994. Inventaire des plantes intoduites en Méditerranée: origines et répercussions sur l'environnement et les activités humaines. *Oceanologica Acta*, 171: 1-23.

VERLAQUE, M., AFONSO-CARRILLO, J., GIL-RODRIGUES, C., DURAND, C., BOUDOURESQUE, C.F. and LE PARCO, Y. 2004. Blitzkrieg in a marine invasion: *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (Byropsidales, Chlorophyta) reaches the Canary Islands (north-east Atlantic). *Biological Invasions*, 6: 269-281.

VERLAQUE, M., BOUDOURESQUE, C.F., MEINESZ, A. and GRAVEZ, M. 2000. The *Caulerpa racemosa* complex (Caulerpales, Ulvophyceae) in the Mediterranean Sea. *Botanica Marina*, 43: 49-68.

VERLAQUE, M., DURAND, C., HUISMAN, J.M., BOUDOURESQUE, C.F. and LE PARCO, Y. 2003. On the identity and origin of the Mediterranean invasive *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 38: 325-339.

VOET, D. and VOET, J.G. 2005. Biochimie. (2e éd.). Bruxelles: De Boeck. 1583 p.

WANGENSTEEN, H., MIRON, A., ALAMGIR, M., RAJIA, S., SAMUELSEN, A.B. and MALTERUD, K.E. 2006. Antioxidant and 15-lipoxygenase inhibitory activity of rotenoids, isoflavones and phenolic glycosides from *Sarcolobus globosus*. *Fitoterapia*, 77: 290-295.

WENZEL, S.E. and KAMADA, A.K. 1996. Zileuton: the first 5-lipoxygenase inhibitor for the treatment of asthma. *Annals of Pharmacotherapy*, 30: 858-864.

WERZ, O. 2007. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta Medica*, 73: 1331-1357.

WHO, 2002. Traditional medicine strategy 2002-2005. WHO Publications, 1-6 pp.

WHO, 2009. Obesity and overweight. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/>.

WIEDENMANN, J., BAUMSTARK, A., PILLEN, T.L., MEINESZ, A. and VOGEL, W. 2001. DNA fingerprints of *Caulerpa taxifolia* provide evidence for the introduction of an aquarium strain into the Mediterranean sea and its close relationship to an Australian population. *Marine Biology*, 138: 229-234.

YUN, J.W. 2010. Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. *Phytochemistry*, 71: 1625-1641.

ZENETOS, A., ÇINAR, M.E., PANCUCCI-PAPADOPOULOU, M.A., HARMELIN, J.G., FURNARI, G., ANDALORO, F., BELLOU, N., STREFTARIS, N. and ZIBROWIUS, H. 2005. Annotated list of marine alien species in the Mediterranean with records of the worst invasive species. *Mediterranean Marine Science*, 6: 63-118.

ŽULJEVIĆ, A. and ANTOLIĆ, B. 2000. Synchronous release of male gametes of *Caulerpa taxifolia* (Caulerpales: Chlorophyta) in the Mediterranean Sea. *Phycologica*, 39: 157- 159.

ŽULJEVIĆ, A., THIBAUT, T., ELLOUKAL, H. and MEINESZ, A. 2001. Sea slug disperses the invasive *Caulerpa taxifolia*. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 81: 343-344.

ÖZGEÇMİŞ

Sevilay CENGİZ, 1980 yılında Denizli'de doğdu. İlköğrenimini Burdur, orta ve lise öğrenimini ise Denizli'de tamamladı. 1998 yılında öğrenime hak kazandığı Dokuz Eylül Üniversitesi Kimya Öğretmenliği Bölümü'nden 2003 yılında birincilikle mezun oldu. Aynı yıl yüksek lisans eğitimine Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda başlayarak 2006 yılında "Immobilization of Catalase onto Clays" başlıklı tezini tamamlayıp mezun oldu. Doktora eğitimine yine aynı Anabilim Dalı'nda başladı, 2009 Aralık ayında Akdeniz Üniversitesi Kimya Bölümü'ne araştırma görevlisi olarak atandı ve doktora çalışmalarının geri kalan kısmını burada tamamladı.