



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



**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ İÇİN  
YENİ BİR SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM  
GELİŞTİRİLMESİ**

**Melek UGAR**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Analitik Kimya Programı**

**Danışman**

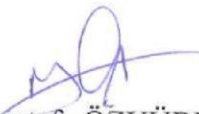
**Doç. Dr. Mustafa ÖZYÜREK**


**Ocak, 2016**

**İSTANBUL**

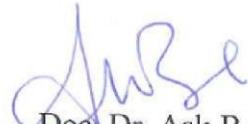
Bu çalışma 19/01/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


**Tez Jürisi:**

  
Doç. Dr. Mustafa ÖZYÜREK (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi

  
Prof. Dr. Esmâ TÜTEM  
İstanbul Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi

  
Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN  
İstanbul Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi

  
Doç. Dr. Aslı BAYSAL  
İstanbul Aydın Üniversitesi  
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu

  
Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ  
İstanbul Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 48849 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa ÖZYÜREK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel kariyerimin her aşamasında çalışmalarına katkıda bulunan, her sorunla yakından ve içtenlikle ilgilenen Sayın Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ'ye, Sayın Yard. Doç. Dr. Burcu BEKDEŞER'e ve Sayın Uzman Ayşe Nur TUFAN'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Yard. Doç. Dr. Saliha Esin ÇELİK ve Araş. Gör. Esin AKYÜZ'e teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olup desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme, çalışmalarım süresince her türlü laboratuvar imkanı sağlayan Analitik Kimya Anabilim Dalı'na ve bu bölümdeki tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tezimle aynı adı taşıyan 48849 numaralı yüksek lisans tez projesine destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve bursiyer olarak görev aldığım TÜBİTAK 112T372 nolu proje kapsamındaki desteklerinden dolayı TÜBİTAK KBAG Grubu Yürütücü Sekreterliği'ne teşekkür ederim.

Ocak, 2016

Melek UGAR

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ .....	v
SEMBOL LİSTESİ .....	vi
ÖZET.....	vii
SUMMARY .....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>	<b>4</b>
2.1. RADİKALLER.....	4
2.2. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ .....	5
2.2.1.Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	8
2.3. OKSİDATİF STRES .....	9
2.4. ANTİOKSİDANLAR.....	11
2.5. ANTİOKSİDANLARIN SINIFLANDIRILMASI.....	13
2.6. ANTİOKSİDAN ENZİMLER VE SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	15
2.6.1.Glutasyon Peroksidaz, GSH-Px: (EC 1.11.1.9).....	16
2.7. GSH-PX AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMLERİ.....	18
2.7.1.PAGLIA ve VALENTİNA Yöntemi.....	18
2.7.1.1. Ticari Kit Yöntemi .....	18
2.7.2.GSH-Px-DTNB Yöntemi .....	19
2.7.3.Florometrik Yöntemler .....	19
2.7.3.1. DPBM Yöntemi .....	19
2.7.3.2. NAM Yöntemi .....	20
2.8. LİTERATÜRDE VAR OLAN GSH-PX AKTİVİTESİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR .....	21
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>24</b>
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR .....	24
3.2. KİMYASAL MADDELER.....	24
3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI .....	25
3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER .....	26
3.4.1.Mikroplaka-esaslı CUPRAC Yöntemi .....	26

3.4.2. Biyolojik Örneklerin GSH-Px Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Yöntemler .....	26
3.4.2.1. <i>GSH-Px Aktivite Tayini İçin Geliştirilen Mikroplaka-esaslı GSH-Px Yöntemi</i> .....	26
3.4.2.2. <i>GSH-Px-DTNB Yöntemi</i> .....	27
3.4.2.3. <i>HPLC Yöntemi</i> .....	28
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>29</b>
4.1. MİKROPLAKA-ESASLI CUPRAC YÖNTEMİ .....	29
4.1.1. Mikroplaka-esaslı CUPRAC Yöntemi ile İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu.....	29
4.1.2. Mikroplaka-esaslı CUPRAC Yöntemi ile GSH Kalibrasyonu.....	30
4.2. MİKROPLAKA-ESASLI GSH-PX YÖNTEMİ.....	30
4.2.1. Katalaz Çözeltisi Seyrelme Oranının Referans Çözeltisine Etkisi.....	30
4.2.2. İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu .....	31
4.2.3. Mikroplaka-esaslı GSH-Px Yöntemi ile GSH-Px Kalibrasyonu.....	32
4.2.4. Biyolojik Örneklerde İnterferansların (Girişimlerin) Etkisi .....	33
4.3. GSH-PX-DTNB YÖNTEMİ .....	34
4.4. BİYOLOJİK ÖRNEKLERDE GSH-PX AKTİVİTE TAYİNİ.....	35
4.4.1. Mikroplaka-esaslı GSH-Px Yöntemi ile Karaciğer, Böbrek ve Kalp Dokularının GSH-Px Aktivite Tayini.....	35
4.4.2. Mikroplaka-esaslı GSH-Px Yöntemi ile Doku Homonejizatlarına Standart Katkı Yönteminin Uygulanması.....	36
4.4.3. Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB Yöntemleri ile Bazı Doku Homonejizatlarının GSH-Px Aktivitelerinin Karşılaştırılması.....	36
4.4.4. Mikroplaka-esaslı GSH-Px Yöntemi ve GSH-Px-DTNB Yöntemi ile Güniçi Karaciğer Dokusunun GSH-Px Aktivitesinin Değişimi .....	38
4.4.5. Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB Yöntemleri ile Günlerarası Karaciğer Dokusunun GSH-Px Aktivitesinin Değişimi.....	39
4.5. HPLC YÖNTEMİYLE MİKROPLAKA-ESASLI GSH-PX YÖNTEMİNİN DOĞRULANMASI.....	40
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>43</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>47</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>52</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Moleküler oksijenin ardışık olarak indirgenmesiyle ROS oluşumu.....	7
Şekil 2.2: Radikallerin yol açtığı hücre hasarı.....	8
Şekil 2.3: Oksidan miktarı ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki denge. ....	10
Şekil 2.4: Oksidatif stres koşullarının oluşumu. ....	11
Şekil 2.5: Antioksidanların sınıflandırılması. ....	14
Şekil 2.6: Enzimatik antioksidan savunma sistemleri. ....	15
Şekil 2.7: Antioksidan enzimler ve reaksiyonları.....	16
Şekil 2.8: DTNB (5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)) bileşiğinin kimyasal yapısı. ....	19
Şekil 2.9: Florometrik NAM yöntemi ile GSH-Px aktivite tayininin şematik gösterimi. ....	20
Şekil 4.1: İnkübasyon çözeltisi absorbansının zamana bağlı değişimi. ....	29
Şekil 4.2: Mikroplaka-esaslı CUPRAC yöntemi ile elde edilen GSH kalibrasyon doğrusu. ....	30
Şekil 4.3: Farklı oranlarda seyreltilen CAT çözeltisinin referans çözeltisine etkisinin incelenmesi. ....	31
Şekil 4.4: CUPRAC öncesi GSH-Px enzimi varlığında (a) ve yokluğunda (b) GSH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> reaksiyonları için absorbans değerlerinin zamanla değişimi. ....	32
Şekil 4.5: CUPRAC sonrası GSH-Px enzimi varlığında (a) ve yokluğunda (b) GSH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> reaksiyonları için absorbans değerlerinin zamanla değişimi. ....	32
Şekil 4.6: Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi ile elde edilen GSH-Px kalibrasyon doğrusu. ....	33
Şekil 4.7: GSH-Px-DTNB yöntemi ile elde edilen GSH-Px kalibrasyon doğrusu.....	35
Şekil 4.8: Karaciğer, Böbrek ve Kalp doku örneklerinin Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemleri ile bulunan GSH-Px aktivite değerlerinin karşılaştırılması.....	37
Şekil 4.9: Karaciğer dokusunun Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemleri ile bulunan gün içi GSH-Px aktivitelerinin karşılaştırılması. ....	38
Şekil 4.10: Karaciğer dokusunun Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemleri ile bulunan günler arası GSH-Px aktivitelerinin karşılaştırılması. ....	39
Şekil 4.11: Farklı konsantrasyonlardaki GSH kromatogramı (a) 0.06 mM, (b) 0.12 mM, (c) 0.18 mM, (d) 0.235 mM. ....	40
Şekil 4.12: HPLC doğrulama kromatogramında ortamda kalan GSH (2), oluşan GSSG (1).....	40
Şekil 4.13: GSH-Px enzimi varlığında Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve HPLC yöntemleri kullanılarak tayin edilen çözeltide kalan GSH konsantrasyonlarının (mM) karşılaştırılması.....	42

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1:</b> Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması.....	6
<b>Tablo 4.1:</b> Askorbik asit, ürik asit, glukoz, albümin, EDTA ve bilirubin'in % interferans etkileri.....	34
<b>Tablo 4.2:</b> Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemleri ile elde edilen kalibrasyon doğru denklemleri ve lineer aralıkları.....	35
<b>Tablo 4.3:</b> Karaciğer, böbrek ve kalp doku örneklerinin Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi ile elde edilen GSH-Px aktiviteleri.....	36
<b>Tablo 4.4:</b> Karaciğer dokularına uygulanan standart katkı yönteminde deneysel olarak bulunan ve teorik olarak hesaplanan GSH-Px değerlerinin karşılaştırılması.....	36
<b>Tablo 4.5:</b> Karaciğer, Böbrek ve Kalp dokularının Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemleri ile bulunan aktivite değerleri.....	37
<b>Tablo 4.6:</b> Karaciğer dokusunun Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemleri ile bulunan gün içi GSH-Px aktiviteleri ( $U mL^{-1}$ ).....	38
<b>Tablo 4.7:</b> Karaciğer dokusunun Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemleri ile bulunan günler arası GSH-Px aktiviteleri ( $U mL^{-1}$ ).....	39
<b>Tablo 4.8:</b> GSH-Px enzim varlığında Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve HPLC yöntemleri kullanılarak tayin edilen çözeltide kalan GSH konsantrasyonları (mM).....	41

## SEMBOL LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
<b>CUPRAC</b>	: bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
<b>Cu(II)-Nc</b>	: bakır(II)-neokuproin
<b>Cu(I)-Nc</b>	: bakır(I)-neokuproin
<b>CAT</b>	: katalaz
<b>GSH</b>	: glutatyon
<b>GSH-Px</b>	: glutatyon peroksidaz
<b>SOD</b>	: süperoksit dismutaz
<b>GSSG-Red</b>	: glutatyon redüktaz
<b>GSSG</b>	: oksitlenmiş glutatyon
<b>GST</b>	: glutatyon transferaz
<b>DTNB</b>	: 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asid)
<b>LDL</b>	: düşük yoğunluklu lipoprotein
<b>ROS</b>	: reaktif oksijen türleri
<b>r</b>	: lineer korelasyon katsayısı
<b>U</b>	: ünite
<b>UA</b>	: ürik asit
<b>CA</b>	: sitrik asit
<b>AA</b>	: askorbik asit
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	: süperoksit anyon radikali
<b>•OH</b>	: hidroksil radikali
<b>RO•</b>	: alkoksil radikali
<b>ROO•</b>	: peroksil radikali
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: hidrojen peroksit
<b>UV</b>	: ultraviyole
<b>DNA</b>	: deoksiribonükleik asit
<b>EDTA</b>	: etilendiamintetra asetik asit
<b>Hb</b>	: hemoglobin

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ İÇİN YENİ BİR SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

**Melek UGAR**

**İstanbul Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Analitik Kimya Programı**

**Danışman: Doç. Dr. Mustafa Özyürek**

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) hücre içi bir enzim olup aktif merkezinde selenosistein içerir. Vücutta doğal olarak bulunan bir antioksidan enzim olan GSH-Px çeşitli hastalıkların teşhisi ve tedavisinde önemli rol oynamaktadır. GSH-Px aktivite ölçülmesine dair literatürde mevcut yöntemler olmasına rağmen bu yöntemlerin birçok sakıncası ve uygulamada sınırlamaları vardır. Bu nedenle bu antioksidan enzimlerin aktivitelerinin belirlenebilmesi için basit, duyarlı, tekrarlanabilir ve hızlı analitik yöntemler gereklidir. Tez konusu; biyolojik örneklerde (doku homojenizatları) GSH-Px aktivite ölçümü için yeni bir spektrofotometrik yöntem (mikroplaka esaslı CUPRAC: ‘Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite’ yöntemi) geliştirmek, optimal deney koşullarını (reaktif konsantrasyonu, sıcaklık, reaksiyon süresi vb.) belirlemek, olası girişim etkilerini incelemek ve elde edilen sonuçlar çerçevesinde biyolojik örnekleri GSH-Px enzim aktiviteleri özelliklerine göre değerlendirmektir.

Tez kapsamında, biyolojik örneklerin GSH-Px enzim aktivitelerinin ölçülmesinde ilk defa mikroplaka okuyucu cihazı kullanılarak; tekrarlanabilir, duyarlı, pratik, hızlı ve kolay bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde, bakır(II)-neokuproin, glutasyon varlığında 450 nm’de maksimum absorpsiyona sahip bakır(I)-neokuproin (Cu(I)-Nc) kelatına indirgenmektedir. GSH-Px enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla indirgenmiş-GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile reaksiyonu sonucunda yükseltgenmiş-GSH (GSSG) formuna dönüşmekte ve reaksiyon sonunda kalan serbest GSH, geliştirilen

yöntemle (Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi) dedekte edilerek biyolojik örneklerin GSH-Px enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Bu yöntem, mikroplaka okuyucuya uyarlanarak; manuel spektrofotometrik yöntemle göre ölçüm duyarlılığı, tekrarlanabilirlik, doğruluk ve ölçüm hızı yönünden üstün bir yöntem olarak standardize edilmiştir.

GSH-Px aktivite ölçüm yöntemini mikroplaka okuyucuya uyarlayarak geliştirilen Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemiyle daha fazla sayıda örneği eş zamanlı olarak çalışabilmek mümkün olmaktadır. Geliştirilen yöntemle, bazı doku homojenizatlarının GSH-Px aktiviteleri belirlenerek sonuçlar referans yöntem olarak seçilen GSH-Px-DTNB (5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)) ve HPLC yöntemleri ile karşılaştırılıp geliştirilen yöntemin kesinliği ve doğruluğu ispatlanmıştır (yöntem valide edilmiştir). Genellikle, karaciğer dokusunun GSH-Px aktivitesi, diğer dokuların GSH-Px aktivitelerine göre daha yüksek bulunmuştur. Geliştirilen yöntemle, günüçi ve günlerarası GSH-Px aktivite değişimi incelenmiş ve doku homojenizatlarına (karaciğer, böbrek ve kalp) standart katkı yöntemi uygulanarak % hata oranlarının 2.13 ile 8.64 arasında olduğu tespit edilmiştir.

Ocak 2016, 62 Sayfa.

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan enzim, Glutatyon peroksidaz, CUPRAC yöntemi, Doku homojenizatı, Mikroplaka okuyucu.

## **SUMMARY**

**M.Sc. THESIS**

### **DEVELOPMENT OF A NEW SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR MEASUREMENT OF GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY**

**Melek UGAR**

**İstanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Science and Engineering**

**Chemistry Department**

**Analytical Chemistry Division**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa Özyürek**

Glutathione peroxidase (GSH-Px) as an intracellular enzyme contains the aminoacid selenocysteine in its active centre. GSH-Px naturally exists in human body and plays important role in diagnosis and treatment of various diseases. There are various methods for GSH-Px activity measurement in the literature, but these methods have many drawbacks and limitation of applications. Thus, simple, repeated, sensitive and rapid analytical methods have to be devised to measure antioxidant enzyme activity. The subject of this thesis is to develop of a new spectrophotometric method (microplate based CUPRAC: "Copper (II) ion reducing antioxidant capacity" method) for GSH-Px activity measurement in biological samples such as tissue homogenates, to determine optimal measurement conditions (*e.g.*, reagent concentration, temperature, reaction time), to investigate possible interference effects, and to evaluate biological samples with respect to their GSH-Px antioxidant enzyme activities.

In this thesis, a repeated, sensitive, practical, fast and easy spectrophotometric method was developed by using a microplate reader for the measurement of GSH-Px activity of biological samples for the first time. In this method, glutathione is oxidized to the GSSG and Cu(II)-Nc is reduced to the highly coloured Cu(I)-Nc chelate showing maximum absorption at 450 nm. The glutathione peroxidase catalyzed oxidation of reduced glutathione (GSH) gives rise to oxidized form of GSH (GSSG), and GSH-Px activity of biological samples was measured by detecting remaining reduced GSH using the recommended method (Microplate-based GSH-Px assay). This developed assay was standardized by adapting to the microplate reader in terms of consistency of the

measurements and reaction rate, repeatability, precision and accuracy in comparison with manual spectrophotometric method.

Therefore, greater number of samples were able to assay simultaneously by using the Microplate based-GSH-Px method which developed by adapting microplate reader to the GSH-Px activity measurement test. GSH-Px activities of some tissue homogenates were determined with respect to the modified CUPRAC assay, and the proposed methodology was validated (precision and accuracy) by comparison of the results obtained with those of reference methods (GSH-Px-DTNB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) and HPLC assays). Liver homogenates were generally shown to exhibit higher GSH-Px activity than other homogenates. Then, using this method, the intra-day and inter-day variabilities of glutathione peroxidase activity in tissues were examined, and the method of standard deviations applied to tissue homogenates (liver, kidney and heart) gave relative standard errors between 2.13 and 8.64 %.

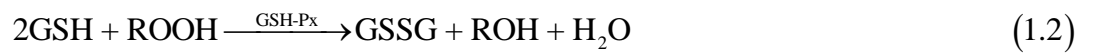
January 2016, 62 Pages.

**Keywords:** Antioxidant enzyme, Glutathione peroxidase, CUPRAC method, Tissue homogenates, Microplate reader.

## 1. GİRİŞ

Canlı bir hücre ya da organizma içerisinde enerji üretimi ve metabolizma sürekliliği için çeşitli reaksiyonlar gereklidir. Bu reaksiyonların kaçınılmaz sonucu olarak reaktif oksijen türleri (ROS) veya reaktif azot türleri (RNS) oluşmaktadır. Oldukça reaktif olan bu moleküllerin organizmadaki seviyesinin savunma mekanizmasını aşması durumunda, canlı bir hücrenin biyolojik makromoleküllerin (protein, lipid, DNA vb.) oksidatif hasarına yol açan "oksidatif stres" halinde olduğu söylenilebilir. Antioksidan bileşikler tarafından kompanse edilen düşük ROS seviyesi, verimli hücre sinyalinin oluşması için gereklidir. Organizma, düşük molekül ağırlıklı antioksidan bileşikleri ve antioksidan enzimlerden oluşan biyolojik antioksidan savunma sistemi ile ROS'a karşı korunmaktadır. Hücresel birincil antioksidan savunma sistemi, ROS'u etkisiz hale getiren enzimlerden (katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) vb.) ve düşük molekül ağırlıklı antioksidanlardan (glutatyon (GSH), C ve E vitaminleri, ürik asit vb.) oluşmaktadır [1].

GSH-Px enzimleri (EC.1.11.1.9) selenoprotein grubu içerisinde yer almakta ve hidrojen peroksitin ( $H_2O_2$ ) (Eşitlik 1.1), doymamış yağ asitlerinin organik hidroperoksitlerinin (Eşitlik 1.2) ve kümen hidroperoksitlerin suya indirgenmesi ve GSH'in indirgen özelliğine bağlı olarak ilgili alkollere dönüşümü reaksiyonlarının katalize edilmesi gibi fonksiyonları bulunmaktadır [2]. Memeli türlerinde dört tip GSH-Px (GSH-Px1-4) bulunmaktadır. GSH-Px1, klasik hücre içi GSH-Px olup GSH-Px2, GSH-Px3 ve GSH-Px4 sırasıyla GSH-Px'in gastrointestinal, plazma ve fosfolipid hidroperoksidaz türlerini ifade etmektedir. Tüm dokularda majör bileşen olarak hücresel GSH-Px (GSH-Px1 veya cGSH-Px) bulunmakta ve bu GSH-Px'in bu türü eritrositler, böbrek ve karaciğerde GSH-Px aktivitesinin büyük kısmını oluşturmaktadır [3].



GSH-Px bir substrat olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için CAT enzimi ile yarışmakta ve böylelikle oldukça toksik özelliğe sahip hidroksil radikallerinin (•OH) 'Fenton reaksiyonu' ile üretimini engellemektedir. GSH-Px aktivitesindeki düşüşle birlikte organizmada •OH üretimi artabilir ve bu radikal artışı oksidatif stres koşullarında kanser, koroner kalp rahatsızlığı, hücrel yıpranma ve yaşlanma, mutajenizm, bağışıklık sistemi hastalıklarına neden olmaktadır. Diğer taraftan, GSH-Px redoks döngüsü orta seviyedeki oksidatif strese karşı majör bir koruma kaynağını oluştururken, CAT enzimi daha şiddetli oksidatif strese karşı korunmada önem kazanmaktadır. GSH-Px dolayısıyla oksidatif stresin bir göstergesi olarak serbest radikallerin organizmadaki oksidatif hasarına karşı korunmada önemli bir biyolojik rol üstlenmektedir. Bu nedenle biyolojik örneklerin GSH-Px aktivitelerinin ölçülmesi önemlidir. Literatürde, GSH-Px aktivitenin ölçümü için sınırlı sayıda yöntem bulunmaktadır. GSH-Px aktivitenin ölçümünde en yaygın olarak kullanılan yöntem Paglia ve Valentine spektrofotometrik yöntemidir [4]. Bu yöntem, NADPH ile GSSG'nin reaksiyonu sonucunda 340 nm'de absorbans değişiminin ölçülmesine dayanmaktadır. Bu yöntem GSH-Px aktivite ölçümü için uygun ve seçimli bir yöntem olmasına karşın düşük duyarlılığa sahiptir [5]. GSH-Px aktivitesi aynı zamanda, Ellman reaktifini kullanan DTNB yöntemiyle reaksiyon ortamında GSH'ın absorbansındaki düşüşü izleyerek ölçülebilmektedir [6]. Yaygın kullanım alanına sahip DTNB yöntemi diğer testlerle karşılaştırıldığında duyarlı olmayan bir yöntemdir [7].

Literatürde, GSH tayini için geliştirilen enzim-esaslı amperometrik biyosensör, pirolitik grafit-çalışma elektrodu üzerine GSH-Px enziminin tutturulması sonucunda elde edilmekte, ancak bu sensör doğrudan serum örneklerinin GSH-Px aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılamamaktadır [7]. Sıçan karaciğerlerinin GSH-Px aktivitelerinin tayini için geliştirilen florometrik yöntem, reaksiyon ortamında reaksiyona girmeden kalan GSH'ın N-{p-[2-(6-dimetilamino)benzofuranil]fenil}maleimid reaktifi ile belirlenmesine dayanmaktadır. Bu yöntem, yaklaşık bir saat içerisinde tamamlanabilmektedir [8]. İnsan eritrositleri, sıçan karaciğeri ve insan plazmasında GSH-Px aktivite tayini için bazı enzim-bağlı immünosorbent yöntemleri (ELISA) geliştirilmiştir [9]. Ancak, bu enzim-bağlı yöntemlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin, Jacobsen [9] tarafından belirtildiği gibi ELISA bulgularının gerçek GSH-Px seviyesine göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Literatürdeki diğer GSH-Px aktivite ölçüm uygulamaları ise, HPLC [10], kapiler elektroforez [11], NMR [12], ve

boyut eleme kromatografisi [13] yöntemlerini içermektedir. Bütün bu yöntemlerin biyolojik örneklerde GSH-Px aktivite ölçümünde kullanımında bazı sınırlamalar bulunmaktadır.

Böylece, bu çalışmanın ana amacı bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi [14] kullanılarak biyolojik örneklerde (doku homojenizatları vb.) GSH-Px aktivitenin belirlenmesinde yeni bir yöntem geliştirilmesidir (Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi). Önerilen yöntem, spektrofotometrik CUPRAC yönteminin mikroplaka okuyucuya uyarlanması ve manuel spektrofotometrik yöntemle karşılaştırıldığında ölçümlerin tutarlılığı ve reaksiyon hızı açısından standardize edilmiştir. Bu tez çalışmasında bazı doku homojenizatlarının GSH-Px aktiviteleri geliştirilen otomatik yöntemle tayin edilip sonuçlar referans yöntemlerle (GSH-Px-DTNB (5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asid) [6,15] ve HPLC [16]) elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak önerilen metodoloji valide edilmiştir (duyarlılık ve doğruluk).

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. RADİKALLER

Radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük, etkin atom veya atom gruplarıdır. Dış yörünge orbitallerinde eşleşmemiş elektron bulundurmaları, kimyasal türün reaktivitesini arttırır [17]. Ömürleri çok kısa olan ve kararsız bir yapı gösteren bu tanecikler, etrafındaki moleküllerle etkileşime girerek elektron almaya çalışır ve bir an önce kararlı hale ulaşmak isterler. Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivlik kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik yapıda hasara yol açabilmektedir. Bu zararın yaşlanma, kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama ve sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır [18].

Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptirler. Ancak biyolojik sistemlerde en çok görülen reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan radikallerdir. Serbest oksijen radikalleri, ROS, reaktif oksijen metabolitleri (ROM) ve uyarılmış oksijen türleri terimleri çoğunlukla birbirlerinin yerine kullanılmaktadır. Canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevre kirleticileri, radyasyon, pestisitler, çeşitli tıbbi tedavi yolları ve kontamine sular gibi birçok etmen kaçınılmaz bir şekilde oksijen türevi serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadır [19].

Reaktif oksijen metabolitleri (ROM) başlıca iki gruba ayrılmaktadır:

- I. Oksijen üzerinde ortaklanmamış elektron çifti içeren radikaller ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-} \leftrightarrow \text{HO}_2^{\cdot}$ ,  $\text{RO}\cdot$  ve  $\text{ROO}\cdot$ )
- II. Moleküler oksijen içeren bileşikler ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ROOR}$ ,  $\text{ROOH}$ , singlet oksijen, epoksitler, endoperoksitler ve bazı aldehitlerin enzimatik oksidasyonu esnasında oluşan bir ara ürün olan 1,2-dioksietan).

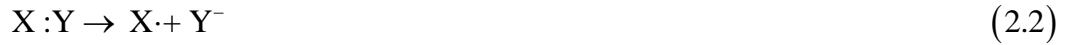
Uyarılmış oksijen türleri, süperoksit anyon radikalleri, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit ve singlet oksijen veya uyarılmış triplet karbonil bileşikleri gibi elektronik olarak uyarılmış türleri kapsamaktadır.

Serbest radikaller üç temel mekanizma ile oluşur:

1. Kovalent Bağların Homolitik Kırılması: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500-600 °C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalmasıyla homolitik kırılma gerçekleşir. Her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır.



2. Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi: Radikal özelliği olmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalmasıyla radikal formu oluşur. Örneğin glutatyon gibi hücrel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur. Glutatyon (GSH) radikalleri indirgerken, kendisinin tiyil radikali (GS<sup>•</sup>) oluşur. İki tiyil radikalinin birbiriyle tepkimesi sonucu glutatyonun oksitlenmiş (GSSG) formu oluşur.



3. Normal Bir Moleküle Elektron Transferi: Radikal özelliği olmayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin oluşumuna neden olur [20,21].



## 2.2. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Oksijen bütün canlılar için vazgeçilmez bir element olup hidrojen, karbon, azot ve kükürt ile birlikte organik moleküllerin temel yapısal unsurlarıdır. Aerobik canlılar yaşamları için mutlaka moleküler oksijene gereksinim duyarken, anaerobik canlılar büyüme ve çoğalmaları için oksijene bağımlı değildirler. Anaerobik canlılardaki oksijenin toksik etkisinin nedeni, oksijenden kaynaklanan bazı reaktif türlerin biyolojik molekülleri oksitlemeleri ve bu reaktif türlere karşı anaerobik canlılarda savunma sisteminin bulunmamasıdır. Oksijen sadece anaerobik türlerde değil, yaşamları için mutlaka moleküler oksijene bağımlı olan canlılarda da toksik etkilidir. Bugün, oksijenin canlılardaki toksik etkisinin “oksijen radikalleri” olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması sırasında oluşan reaktif türlerden kaynaklandığı bilinmektedir [22].

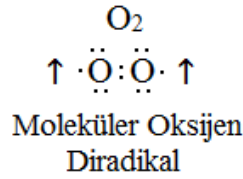
Birçok serbest radikal, oksijen solunumu gibi metabolik prosesler sonucunda doğal olarak meydana gelir. Hücreler enerji üretmek için oksijen kullandığında mitokondri tarafından ATP üretimi sonucunda serbest radikaller de üretilmiş olur. Oksijenin kullanılması serbest radikal miktarını arttırır.

ROS, serbest radikaller ve radikal olmayan bileşikler olmak üzere başlıca iki gruba ayrılmaktadır (Tablo 2.1).

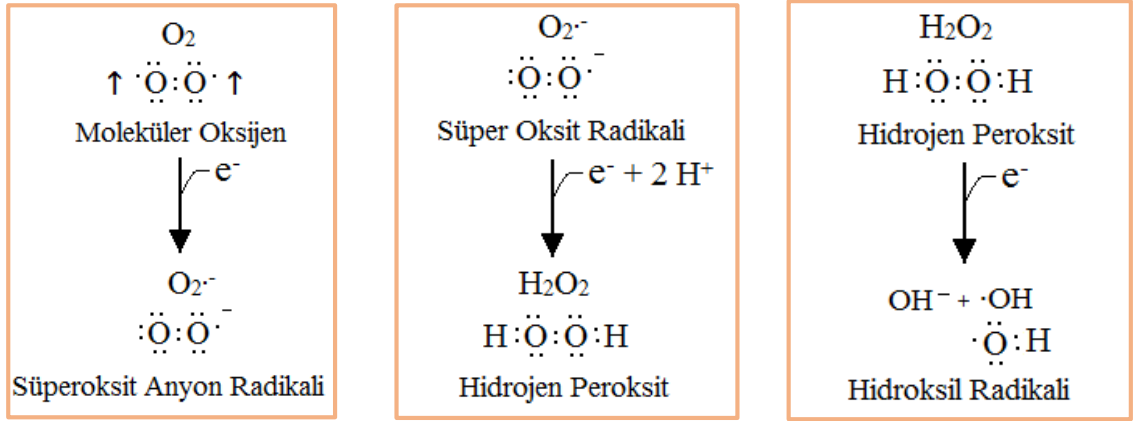
**Tablo 2.1:** Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması.

Serbest Radikaller	Radikal Olmayan Bileşikler
Süperoksit anyon radikali, $O_2^{\bullet-}$	Hidrojen peroksit, $H_2O_2$
Hidroksil radikali, $\bullet OH$	Organik peroksitler, $ROOH$
Peroksil radikalleri, $ROO\bullet$	Singlet oksijen, $^1O_2$

Moleküler oksijen antibağ orbitallerinde eşleşmemiş iki elektron içerir. Bu elektronlar, paralel spinli ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedirler. Radikal tanımına göre oksijen ‘diradikal’ yapıya sahip bir moleküldür ve reaktivitesi beklenenin aksine çok düşüktür.

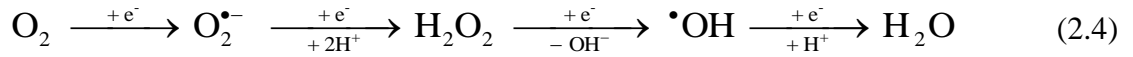


Diradikal bir yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir molekül ile tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye girebileceği molekülün de benzer yapıya sahip olması yani farklı orbitallerde spinlerin aynı yönde elektron içermesi gerekir. Ancak oksijene elektron vericiler, genellikle uygun bir orbitallerinde zıt spinli bir çift elektrona sahiptirler. Bu nedenle moleküler oksijenin reaksiyona girme eğilimi kısıtlıdır. Bu duruma “spin sınırlaması” denilmektedir. Moleküler oksijene elektron veya enerji sağlanması durumunda spin sınırlaması ortadan kalkar ve diğer ROS türleri oluşur [23].



**Şekil 2.1:** Moleküler oksijenin ardışık olarak indirgenmesiyle ROS oluşumu.

Moleküler oksijene tek elektron transferi ile süperoksit anyon radikali oluşur. Oluşan süperoksit anyon radikali oksijene göre daha reaktiftir. Solvatize elektron, suyun radyolizi ile kolaylıkla oluşturulabilir [23]. Süperoksit anyon radikaline bir elektron katılmasıyla bir başka reaktif oksijen türü olan nötral bir molekül ( $H_2O_2$ ) meydana gelmektedir. Hidrojen peroksit'e tekrar bir elektron katılması sonucunda yine bir radikal ( $\bullet OH$ ) oluşmaktadır. Hidroksil radikali son olarak  $OH^-$  iyonuna (veya  $H_2O$ ) indirgenmektedir. Sonuç olarak oksijenden suya tek elektron transfer adımlarıyla ROS türleri oluşmaktadır (Eşitlik 2.4).

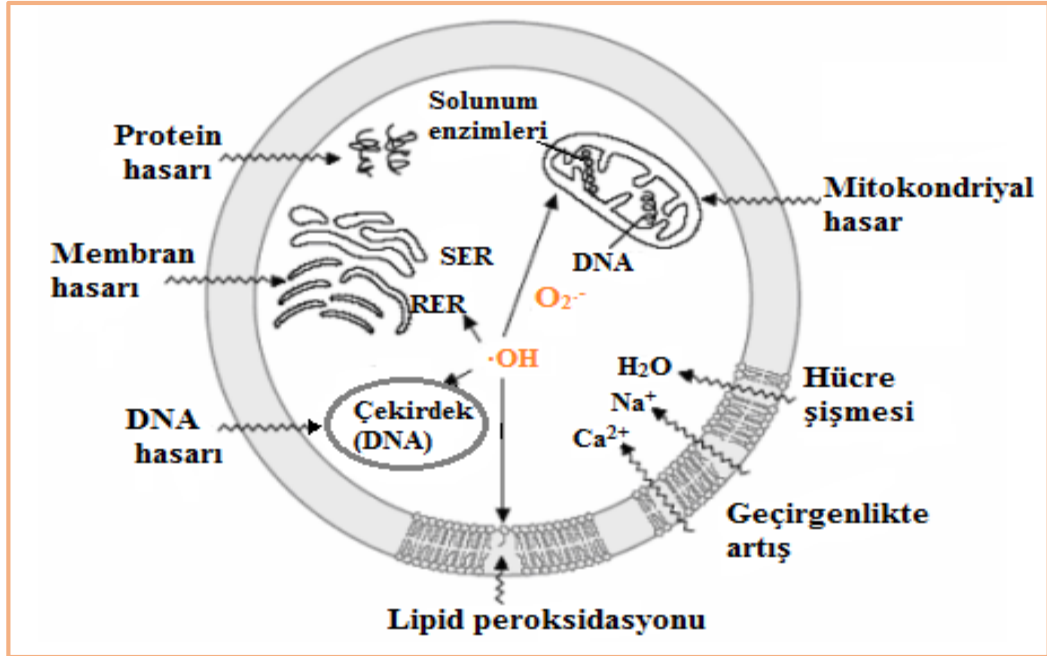


Moleküler oksijen, elektron transferleriyle suya kadar indirgenir. 4 elektron gerektiren bu mekanizmada reaktif ara moleküller olan süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksi radikalleri oluşur. Bunlar önemli oksidatif stres ajanları olup ROS olarak adlandırılır. Bu transfer, ara radikal türlerinin oluşumu şeklinde tek-elektron transfer adımlarıyla veya tek bir adımda 4 elektron transferiyle gerçekleşebilir [24].

En reaktif oksijen türü olarak bilinen hidroksil radikali vücutta serbest radikal hasarının en önemli sorumlusudur. Canlı organizmalarda hidroksil radikalının süpürülmesi için özel bir molekül veya enzim bulunmamaktadır [25]. Bu sebeple hidroksil radikali sentetik antioksidanlar veya gıdalarla alınan antioksidanlar tarafından süpürülmektedir [26].

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan hidroksil radikali, su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer. Potansiyel olarak her biyomolekül farklı

hızlarda hidroksil radikal süpürücüdür. Hidroksil radikali canlı hücrelerde bulunan her tip molekül (şekerler, aminoasitler, fosfolipitler, DNA bazları ve organik asitler gibi) ile yüksek hız sabitleriyle reaksiyona girebilmektedir [27].



Şekil 2.2: Radikallerin yol açtığı hücre hasarı.

Reaktif oksijen türleri; UV ışığı, X-ray, gamma ray, metal katalizli reaksiyonlar ile üretilir, atmosferde kirlilik olarak mevcut olabilir veya normal aerobik yaşamın bir parçası olarak mitokondride oksijenin elektron taşıma zinciri boyunca indirgenmesiyle üretilir. Bundan başka çeşitli enzimatik reaksiyonlar ile de reaktif oksijen türleri oluşmaktadır [28].

### 2.2.1. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Hidrojen peroksit yapısında eşleşmemiş elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz ve reaktif bir tür değildir. Oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucunda üretilir [29,30].





Aerobik canlılarda süperoksitlerin hidrojen peroksit'e çevrilmesi ya kendiliğinden gerçekleşir ya da katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan SOD tarafından gerçekleştirilir [31]. Bu reaksiyonda radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.



Hidrojen peroksitin yükseltgen bir tür olarak bilinmesinin nedeni, demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır (Fenton reaksiyonu). Hidrojen peroksit, özellikle proteinlerde bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü yükseltgen özelliğe sahip olup, hücre zarlarında protein ve lipid peroksidasyonu ile radikal tepkimeleri başlatabilir.



Belirtilen potansiyel yükseltgen özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan hidrojen peroksitin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki CAT ve GSH-Px antioksidan enzimleri yerine getirirler [32].

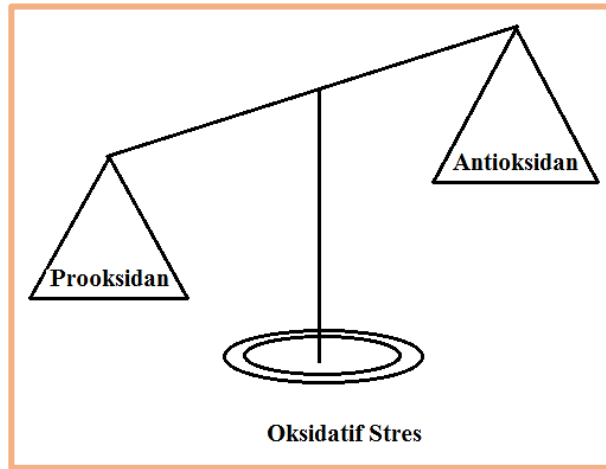


### 2.3. OKSİDATİF STRES

Aerobik organizmalar yaşamlarını sürdürebilmek için oksijene mutlak gereksinim duyarlar. Oksijen hücrede bir dizi reaksiyondan geçerek suya dönüşür ve bu sayede hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlar. Fakat bu süreçte oksijenin %2-3 kadarı suya dönüşmeyip oksijen kaynaklı radikaller oluşur [33]. Oksijen, insan vücudunda solunum zinciri içinde süperoksit anyon radikali, singlet oksijen, hidroksil radikali vb. türevlerini oluşturmaktadır. ROS, normal hücre fonksiyonları esnasında tüm aerobik organizmalar tarafından oluşturulmakta olup miktarlarındaki artma veya antioksidan savunmadaki azalma "oksidatif stres" olarak tanımlanmaktadır [34].

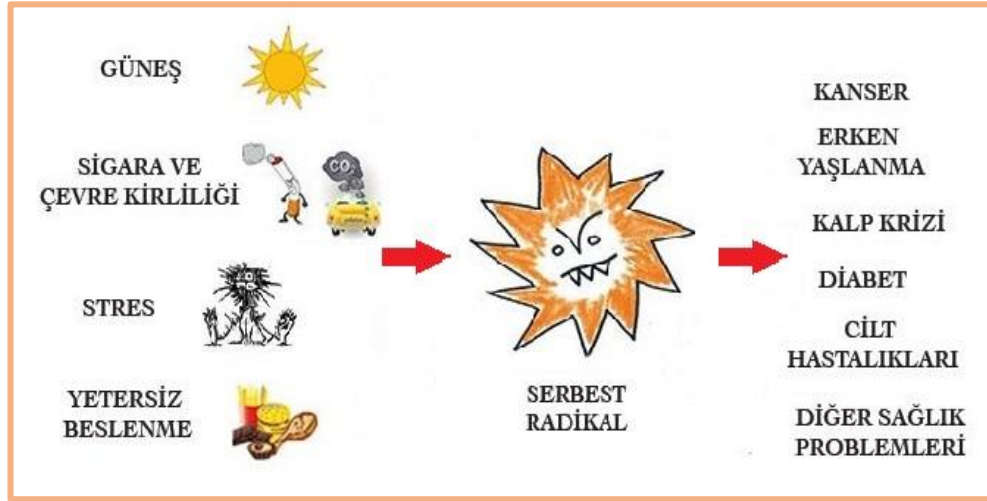
Organizmanın prooksidan-antioksidan dengesinin korunması sağlıklı bir yaşam sürdürülmesi için çok önemli ve gereklidir. Oksijenle sürekli temas halinde olmak serbest radikal oluşumunu da beraberinde getirir. Serbest radikal oluşumundaki artışa ve/veya antioksidan sistemdeki yetersizliğe bağlı olarak organizmada oksidatif stres gelişir [33]. Fizyolojik şartlarda, normal hızda üretilen serbest radikallerin zararlı etkileri antioksidan savunma sistemleri tarafından azaltılır. Ancak antioksidan sistemlerin büyük bir yedeği yoktur. Hafif bir oksidan stresde hasarlı moleküller uzaklaştırılıp yenileri yapılabilirken, şiddetli oksidan stres durumlarında hücre hasarlanması meydana gelir [35].

Reaktif oksijen birikimi organizmada var olan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenmediği takdirde; oluşan “oksidatif stres” koşulları altında kanser, hücresel yıpranma ve yaşlanma, koroner kalp rahatsızlıkları, mutajenizm, bağışıklık sistemi hastalıkları ve lipoprotein (LDL) oksidasyonu ile sonuçlanan, DNA ve hücre membranları gibi biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olabilen radikal zincir reaksiyonları meydana gelmektedir. Oksidatif stres, oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması durumudur [36].



**Şekil 2.3:** Oksidan miktarı ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki denge.

İnsan vücudunda yüksek konsantrasyonda ROS bulunması durumunda lipid, protein ve nükleik asitler gibi hücre bileşenlerinde hasar meydana gelmektedir. Bu kümülatif hasar, astım, arterosklerozis, diyabet, kanser ve nörodejeneratif hastalıkları başlatmakta veya tetiklemektedir. Oksidatif stres, hava kirlenmeleri, pestisidler, metaller, poliklorlanmış bifeniller (PCBs), nanopartiküller ve UVB radyasyon (290-320 nm) gibi bazı çevresel etkenlere maruz kalma sonucunda meydana gelmektedir [37].



Şekil 2.4: Oksidatif stres koşullarının oluşumu.

## 2.4. ANTİOKSİDANLAR

Canlı hücreler ROS'un zararlarını gidermek için bu reaktif türleri elimine edebilecek veya oluşumunu engelleyecek savunma sistemlerine sahiptirler. Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük derişimlerde, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi derecede engelleyen ya da geciktiren maddelerdir ve doku hasarlarını engelleyebilirler. Prooksidanlar ise lipitler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren bu prooksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler [38].

Yaşayan organizmalarda kompleks antioksidan sistemler bulunmaktadır. Bu sistemler enzimatik olmayan antioksidanlar olarak bilinen albumin, glutatyon, askorbik asid,  $\alpha$  tokoferol,  $\beta$ -karoten, ürik asid, bilirubin, flavonoidler ve birçok polifenolik bileşikler ile SOD, GSH-Px, askorbat peroksidaz ve CAT gibi antioksidan enzimleri içerirler [39]. Bu antioksidanlar, hücrelere zarar veren reaktif türleri (serbest radikaller) etkin bir şekilde süpürerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu reaktif bileşiklerin (ROS vb.) varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidan bileşikleri ve enzimleri önemli kılmaktadır [38,40].

Antioksidanlar, vücut hücreleri tarafından üretildikleri (endojen) gibi, gıdalar yoluyla da (eksojen) alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C ve E vitaminleri), fenolik bileşikler (basit fenolik ve hidroksisinnamik asitler, flavonoidler vb.) ve karotenoidlerdir. Birçok araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır [41].

Biyolojik yapılarda ve gıdalarda mevcut olan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, ROS'un ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) çeşitli süpürücüleri olarak bilinirler [39]. Antioksidanların en önemlileri polifenoller ve bunların türevleridir. Bu bileşikler oksidatif sistemde farklı şekillerde davranabilirler. Örneğin, oksijen konsantrasyonunu düşürebilirler veya hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali gibi ROS türlerini sönmeye uğrattırır (süpürürler). Hidroksil radikalleri gibi birincil radikalleri süpürerek zincir reaksiyonlarının başlamasını önlerler, metal iyonu katalizörlerini bağlarlar [20].

Antioksidanlar, ROS oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek açısından dört ayrı şekilde etki ederler:

- i. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha az reaktif yeni bir moleküle çevirme “toplayıcı” etkidir. Antioksidan enzimler (SOD, CAT, GSH-Px vb.) bu şekilde etkilidir.
- ii. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme “bastırıcı” etkidir. Askorbik asit (C vitamini), atokoferol (E vitamini), flavonoidler (kuersetin, kateşin vb.) bu tarz bir etkiye sahiptirler.
- iii. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincir reaksiyonlarını kırıp fonksiyonlarını engelleyici “zincir kırıcı” etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin, albumin gibi bileşikler bu şekilde etki ederler.
- iv. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması ise “onarıcı” etkidir [36].

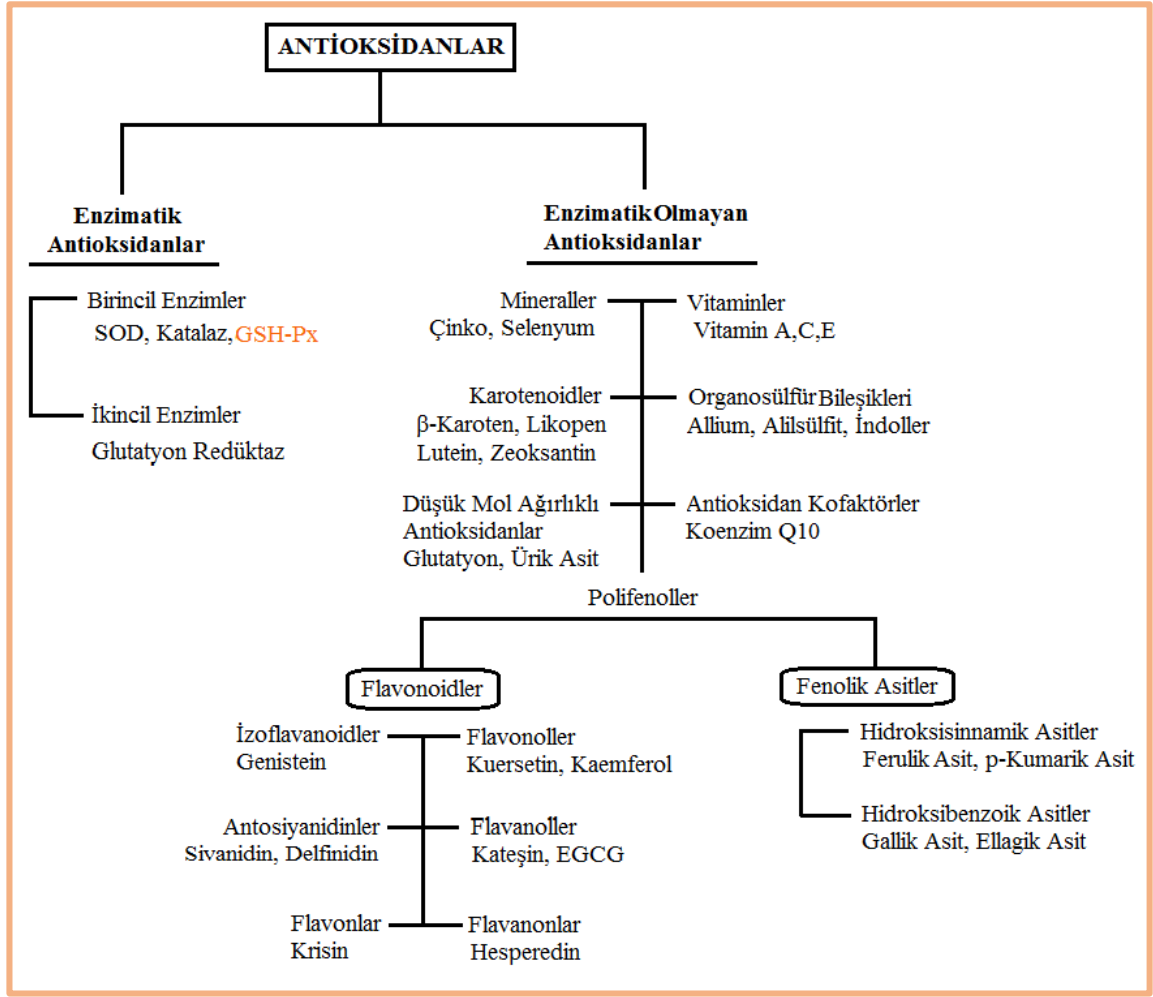
Antioksidanlar yükseltgenen maddeler olduğundan zincir reaksiyonlarını (örneğin lipidlerin oksidatif parçalanmasına yol açan radikalik zincir reaksiyonunu) kırmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bu nedenle antioksidanlar yalnız sınırlı bir zaman için yükseltgenen maddeyi (örneğin biyolojik makromolekülleri) koruyabilir

ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder. Antioksidanların kimyasal aktiviteleri, diğer bir deyişle, hidrojen veya elektron donör araçları olarak indirgeme potansiyelleri genellikle onların serbest radikal süpürme olarak göstermiş oldukları potansiyel ile ifade edilir. Zincir kırıcı antioksidan etkinliğinin değerlendirilmesinde hem antioksidanın molekül başına verebildiği elektron veya giderebildiği serbest radikal sayısı (yani reaksiyon stökiyometrisi), hem de reaksiyon hızı (kinetik) önemlidir. Antioksidan aktivite, spesifik bir antioksidan ile spesifik bir oksidan arasındaki reaksiyona ait hız sabitini işaret eder ve bir antioksidanın aktivitesi şu esaslara bağlıdır:

- Radikal süpürme yeteneği
- Hidrojen veya elektron donör aracı olarak göstermiş olduğu reaktivite (genelde redüksiyon potansiyeline bağlı olan)
- Metal kelatlama potansiyeli
- Diğer antioksidanlarla olan etkileşim [41].

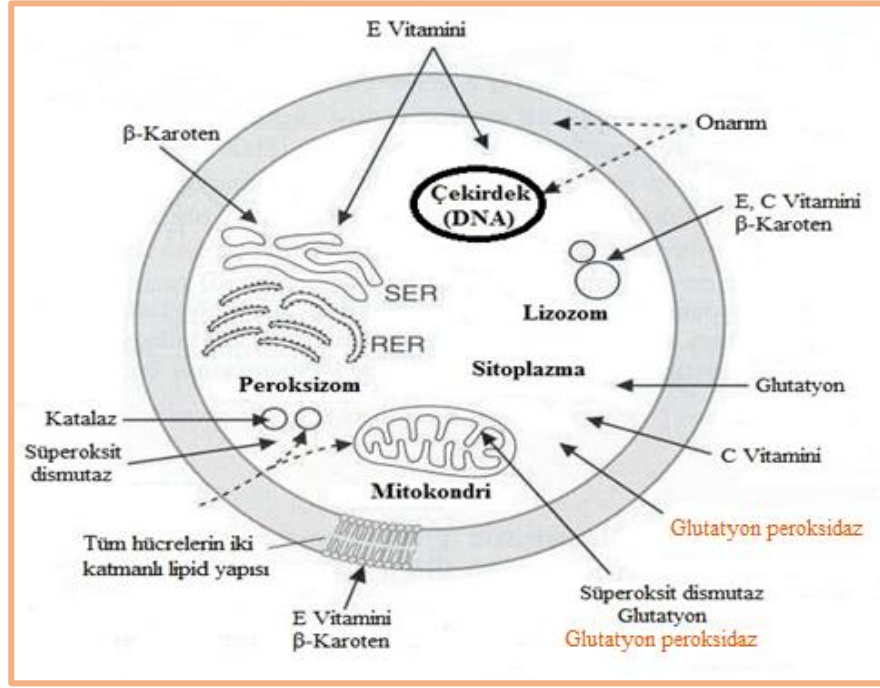
## 2.5. ANTIOKSİDANLARIN SINIFLANDIRILMASI

Antioksidanlar, yapılarına göre enzimatik ve enzimatik olmayanlar olmak üzere 2 grupta sınıflandırılabilirler. Enzimatik olmayan antioksidanların birçoğu dışarıdan diyetle alınırlar. Bunlar; albumin, glutatyon, askorbik asid,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, koenzim Q10, lutein, ürik asid, bilirubin, flavonoidler ve birçok polifenolik bileşiklerdir. Enzimatik olan antioksidanlar ise SOD, GSH-Px, GSSG-Red ve CAT gibi enzimleri içerirler [39]. Enzimatik olan antioksidanlar endojendirler ve antioksidan savunma sisteminde görev alırlar.



**Şekil 2.5:** Antioksidanların sınıflandırılması.

## 2.6. ANTIOKSİDAN ENZİMLER VE SAVUNMA SİSTEMLERİ



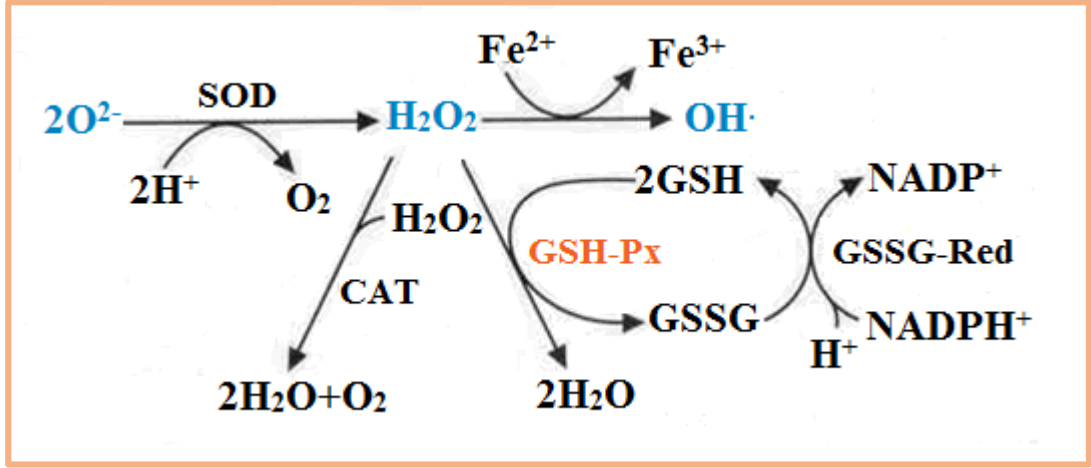
Şekil 2.6: Enzimatik antioksidan savunma sistemleri.

Enzimler çok yüksek katalizleme gücüne sahip protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Bir canlıdaki parçalanma ve yapım (sentez) reaksiyonlarının tümü enzimlerin katalitik aktiviteleri ve yöntemleriyle gerçekleştirilmektedir. Bu tanıma göre de, enzimler canlılığın oluşumu ve devamı için elzem maddelerdir. Canlı dışında da aktivite göstermeleri enzimlerin önemini bir kat daha arttırmaktadır. Enzim üretimi genlerin kontrolü altında gerçekleştirilmekte (bir gen-bir enzim) ve her enzimin kendine özgü sıcaklık, pH ve basınç koşulları bulunmaktadır.

Günümüzde enzimler gıda, ilaç ve kimya endüstrisinde, dericilik, boya ve temizlik maddeleri üretimi gibi konularda, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tıp, tarım, veterinerlik ve tekstil endüstrisi alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır [42].

Antioksidan enzimler, ROS'un zararlı etkilerine karşı geliştirilen antioksidan savunma sisteminin çok önemli bir parçasıdır. Hürelere zarar veren reaktif türleri (serbest radikaller) etkin bir şekilde süpürerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Böylece organizma serbest radikaller ve aktif oksijen türlerinden etkilenmez. Bu reaktif bileşiklerin (ROS vb.) varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidan

enzimleri önemli kılmaktadır. Biyolojik yapılarda mevcut olan enzimatik antioksidanlar çeşitli reaktif oksijen türlerinin ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^-$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) süpürücüleri olarak bilinirler [40]. Ayrıca SOD, GSH-Px, GSSG-Red ve CAT gibi antioksidan enzimler, çeşitli hastalıkların teşhisi ve tedavisinde de önemli rol oynamaktadırlar [39,40].



Şekil 2.7: Antioksidan enzimler ve reaksiyonları.

### 2.6.1. Glutasyon Peroksidaz, GSH-Px: (EC 1.11.1.9)

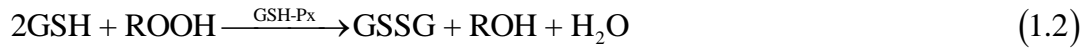
Glutasyon ( $\gamma$ -glutamil sisteinil glisin, GSH), sistein ve glisin ile glutamik asitten oluşan serbest sülfhidril gruplu tripeptid olup hücre sitoplazmasında bulunan temel antioksidandır. Hücrede indirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) formda bulunur. GSH metabolizması en önemli antioksidan savunma sistemlerinden biridir [43]. GSH-Px enzimi, hücredeki hidrojen peroksitin detoksifikasyonundan sorumlu anahtar rolü oynar. 1957’de Mills tarafından keşfedilmiştir [44].

Mills 1957 yılında GSH-Px’i kırmızı kan hücrelerinde tanımlamış ve GSH-Px’in hemoglobini oksidatif hasara karşı koruduğunu göstermiştir [45]. 1973 yılında Hoekstra ve arkadaşları sıçan örneklerinde selenyum eksikliğinin insan patolojik şartlarında favisizm hastalığının çoğalmasına sebep olabileceğini açıklamışlardır. GSH-Px aktivitesi azaldığında radyoaktif selenyum’un GSH-Px aktivitesiyle birlikte azaldığı belirtilmiştir [46]. Aynı zamanda Folhe ve arkadaşları GSH-Px1’in tetrametrik yapıdaki enzimin hücre stoplazmasında bulunduğunu ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ ’yi en etkili süpüren enzim olduğunu savunmuşlardır [45].

GSH-Px enzimi, hem normal koşullar hem de oksidatif stres koşulları altında canlı organizma antioksidan sisteminde anahtar bir enzim olarak görülmektedir. GSH-Px

serbest oksijen radikalleri, peroksitler ve kanserojenlere karşı savunmada büyük öneme sahiptir. Ayrıca GSH-Px lipooksijenaz ve siklooksijenaz yollarını değiştirerek tümör oluşumunda önemli bir rol oynar. Tümörlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve diğer peroksitlere karşı enzim savunmasının ilk enzimi olan GSH-Px aktivitesinde önemli artış olduğu bildirilmiştir [47].

GSH-Px, GSH'nin indirgeyici gücünü kullanarak hidrojen peroksitin ve doymamış yağlardan meydana gelen organik hidroperoksitlerin deaktivasyonunu kataliz eder. Peroksitlerin indirgenmesini katalizleyen GSH-Px enzimi, hücredeki indirgenmiş glutasyonu (GSH) yükseltgenmiş glutatona (GSSG) dönüştürmektedir. GSH-Px glutasyonu hidrojen donör olarak kullanarak hidrojen peroksiti elimine etmektedir. Bu reaksiyonlar, canlı organizmada oksidatif stresin zararlı etkilerinden hücresel membranları korumaya yarar.



Bugüne kadar insan organizmasında 8 adet GSH-Px var olduğu bildirilmiştir ve çoğu farklı hücre tiplerinde görülen Selenoproteinler (SecGPxs) olarak adlandırılmıştır. Bunlardan sadece GSH-Px4, GSH-Px7 ve GSH-Px8 monomerik yapıdadır. Diğerleri tetrametrik yapıdadırlar [45].

GSH-Px, selenyum bağlı ve selenyum bağlı olmayan iki formda bulunabilir. Selenyum bağlı grup, hidrojen peroksit ve diğer organik peroksitleri indirgeyen dört üyeden oluşur. Bunlar GSH-Px1 (cGSH-Px), GSH-Px2 (GSH-Px-GI), GSH-Px3 (pGSH-Px) ve GSH-Px4 (PH-GSH-Px)'dür [48].

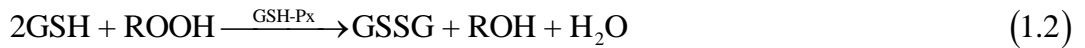
- GSH-Px1 veya hücreyel GSH-Px (cGSH-Px), bütün hücrelerde bulunan, tetrametrik yapıda sitozolik bir enzimdir. GSH-Px1, organik hidroperoksitler ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e karşı aktiftir. Bu enzim, germ hücrelerinde çok daha düşük olmakla birlikte, incelenen tüm dokularda bulunmuştur [45].
- GSH-Px2 veya gastrointestinal GSH-Px (GSH-Px-GI) insanlarda karaciğer ve gastrointestinal kanalda bulunurken böbrek, kalp ve akciğerde bulunmaz [2]. Hidrojenperoksit veya yağ asidi hidroperoksitlerini hızla indirgerken fosfolipid hidroperoksitleri indirgemezler [48].

- GSH-Px3 veya plazma GSH-Px (pGSH-Px), plazmanın en önemli GSH-Px3 kaynağı olan böbreklerde bulunur ve özellikle proksimal tübüllerin epitel hücrelerinde önemli miktarda bulunmaktadır [45,49].
- GSH-Px4 veya fosfolipit GSH-Px (PH-GSH-Px), sitozolde, mitokondri ve hücre zarında bulunur. Enzim fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirgeyerek en önemli antioksidan olan E vitamini eksikliğinde, membranı peroksidasyona karşı korur [50]. Selenyum bağımsız GSH-Px enzimi ise sadece lipid peroksitlerin metabolizmasından sorumludur [34,50].

## 2.7. GSH-PX AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

### 2.7.1. PAGLIA ve VALENTINA Yöntemi

Paglia ve Valentina yöntemi, literatürde GSH-Px aktivite tayini için en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntem GSH-Px'in tert-butil hidroperoksit (tBH) varlığında GSH'ın oksidasyonuna dayanmaktadır. Glutatyon (GSSG), GSSG-Red ve indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında indirgenmiş formuna (GSH) dönüşürken, NADPH'da yükseltgenmiş formu olan NADP<sup>+</sup>'ya dönüşmektedir. 340 nm dalgaboyunda dakikada okside olan NADPH'in absorbans değerinin azalması izlenerek GSH-Px enzim aktivitesi hesaplanmaktadır [4].

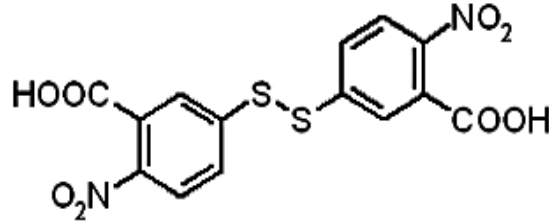
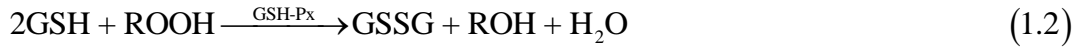


#### 2.7.1.1. Ticari Kit Yöntemi

Paglia ve Valentina Yöntemini esas alan bu uygulama, GSH-Px aktivite tayininin GSSG-Red ile birleştirilmiş bir reaksiyon prensibine dayanır. Bu çift enzim yönteminde, GSH-Px ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin redüksiyonu ve GSSG-Red ile NADPH'nin oksidasyonu 340 nm'de absorbanstaki azalma ile belirlenir. 25 °C sıcaklıkta, 1 ünite GSH-Px dakikada 1 nmol NADPH oksidasyonunu katalize eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır [4,51,52].

### 2.7.2. GSH-Px-DTNB Yöntemi

GSH-Px aktivitesi modifiye Flohe ve Günzler yöntemi ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin substrat olarak kullanılmasıyla belirlenmiştir. GSH-Px enzim aktivitesi belirlenmek istenen örneğe GSH ve hidrojen peroksit ilavesi ile reaksiyon başlatılır. GSH-Px enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla redükte formdaki glutatyon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya lipid peroksitlerle reaksiyonu sonucunda bu moleküllerin detoksifikasyonunda rol alırken kendisi başka bir GSH molekülüyle disülfür köprüsü oluşturarak okside-GSH formuna (GSSG) dönüşmektedir. Bu reaksiyondan kalan serbest GSH ile DTNB'nin (5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit) reaksiyonu sonucunda GSTNB ve TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) ürünleri oluşmaktadır. Oluşan TNB'nin 412 nm'deki absorpsiyonu ölçülerek GSH-Px aktivitesi dolaylı olarak tayin edilir. GSH-Px aktivitesi 6.22 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak hesaplanır. Bu yöntem çin karidesine, çekirgelere, sıçan karaciğerine uygulanmıştır [15].



Şekil 2.8: DTNB (5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)) bileşiğinin kimyasal yapısı.

### 2.7.3. Florometrik Yöntemler

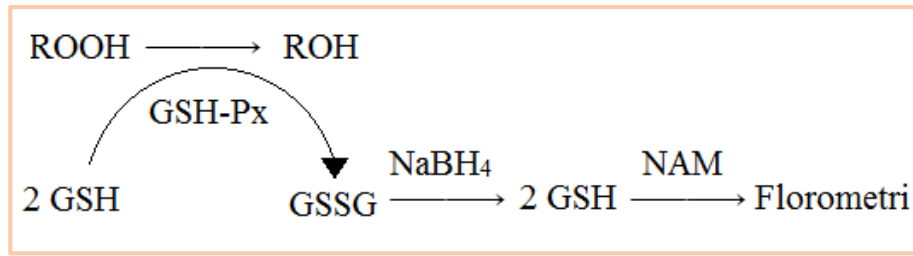
#### 2.7.3.1. DPBM Yöntemi

Sıçan karaciğerinde GSH-Px aktivite tayini için geliştirilen florometrik yöntemde florojenik reaktif olarak N-{p-[2-(6dimethylamino)benzofuranil]fenil} maleimid (DBPM) kullanılmaktadır. Yöntemin esası, reaksiyona girmeden kalan GSH konsantrasyonunun florometrik reaktifle belirlenmesine dayanmaktadır (pH=8.5). GSH ve DBPM'den oluşan reaksiyon karışımı 457 nm'de maksimum floresans göstermektedir ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 355 nm). Sodyum azid (1 mM) ile reaksiyon karışımında CAT aktivitesi inhibe

edilmiştir. Yüksek duyarlılığa sahip bu yöntemde 2 pmol mL<sup>-1</sup> GSH tayin edilebilmektedir [8].

### 2.7.3.2. NAM Yöntemi

İnsan plazma örneklerinde ve karaciğer homojenizatlarında GSH-Px aktivite ölçümü için geliştirilen bir diğer florometrik yöntemde reaktif olarak *N*-(9-akridinil)maleimid (NAM) kullanılmıştır. NaBH<sub>4</sub> ile GSSG reaksiyonu sonucunda oluşan indirgenmiş GSH, bir tiyol reaktifi olan NAM ile floresan kompleks oluşturmaktadır. NAM ayrıca karboksilik asit ve triasilgliserol içerisinde hidroperoksitin florometrik tayininde kullanılmıştır. Yöntemin esası, GSH ile GSH-Px enzimatik reaksiyonu sonucunda reaksiyona girmeden kalan GSH'ın *N*-etilmaleimid ile reaksiyon ortamından uzaklaştırılması ve enzimatik reaksiyon sonucu oluşan GSSG'nin tekrardan NaBH<sub>4</sub> ile GSH'a indirgenmesi ve oluşan GSH'ın NAM reaktifi ile florometrik olarak tayinine dayanmaktadır ( $\lambda_{em}$ : 360 nm;  $\lambda_{ex}$ : 435 nm) [5].



**Şekil 2.9:** Florometrik NAM yöntemi ile GSH-Px aktivite tayininin şematik gösterimi.

## 2.8. LİTERATÜRDE VAR OLAN GSH-PX AKTİVİTESİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Galażyn-Sidorczuk ve diğ. tarafından yapılan çalışmada çinkonun kadmiyum kaynaklı lipit peroksidasyonunu önleme yeteneği incelenerek bunun GSH-Px aktivitesi ve selenyum konsantrasyonu ile bağlantılı olup olmadığı incelenmiştir. Farelerin içme sularına farklı oranlarda Cd (5 ve/veya 50 mg L<sup>-1</sup>) ve/veya Zn (30 mg L<sup>-1</sup>) eklenerek Zn'nin koruyucu etkisi saptanmış, serum, karaciğer ve böbrek dokularında GSH-Px ve selenyum miktarları tespit edilmiştir. Çalışmada GSH-Px enzim aktivite tayini CAYMAN ticari kit kullanılarak yapılmıştır. Örnekler, sadece 5 mg Cd'ye maruz bırakıldığında GSH-Px aktivitesi artarken, yüksek miktarlarda eklenen Cd'nin aktiviteyi düşürdüğü tespit edilmiştir. Cd (50 mg L<sup>-1</sup>) uygulaması sırasında yapılan Zn (30 mg L<sup>-1</sup>) eklemesi, serum ve karaciğerdeki Cd'ye bağlı GSH-Px aktivitesi ve selenyum konsantrasyonlarındaki azalışı önlerken, böbrekteki enzim aktivitesinde azalma göstermiştir. Sonuçlar nispeten yüksek oranlarda maruz bırakıldığında oluşan Cd kaynaklı lipit peroksidasyonuna karşı Zn'nin koruyucu etkisi, serum ve dokulardaki selenyum konsantrasyonu ve GSH-Px aktivitesi üzerindeki olumlu etkisi ile bağlantılı olabileceğini göstermektedir [53].

Ćavar ve diğ. tarafından yapılan çalışmada içme sularında yüksek miktarda arseniğe maruz bırakılan kişilerin kan ve idrar örneklerindeki selenyum ve GSH-Px düzeyleri incelenmiştir. Heparinize edilmiş kandaki GSH-Px aktivite tayini için Randox marka ticari kit (Ransel, Randox Laboratories, UK) kullanılmıştır. Deneyin prensibi Paglia ve Valentine'nin yöntemine dayanmaktadır. U L<sup>-1</sup> cinsinden bulunan enzim aktivitesi dilüsyon katsayısı olan 41 ile çarpıldıktan sonra, hemoglobine bölünerek U g<sup>-1</sup> Hb cinsinden hesaplamalar yapılmıştır. Yüksek düzeyde arseniğe maruz kalan kişilerde selenyum düzeyleri ve GSH-Px aktivitelerinin düşük seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Kan ve serum örneklerinde ortalama selenyum ve GSH-Px seviyelerinin (Se: 82.34 µg L<sup>-1</sup> ve 59.02 µg L<sup>-1</sup>; GSH-Px: 45.99 U g<sup>-1</sup> Hb ve 38.38 U g<sup>-1</sup> Hb) kontrol altında tutulan kişilerden daha düşük olduğu tespit edilmiştir [54].

Kolberg ve diğ.'nin yaptığı başka bir çalışmada ilk kez, boyun ağrısı olan erkeklerin eritrositlerindeki SOD ve GSH-Px antioksidan enzimlerinin yüksek hız ve düşük genlikli (HVLA) manipülasyon tedavisi ile analjezik etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmada

GSH-Px enzim aktivitesi Flohe ve Gunzler tarafından tanımlanan, NADPH'ın 340 nm dalgaboyundaki absorbans değerinin azalması izlenerek ölçülmüştür. Sonuçlar mg-protein başına dakikada indirgenmiş hidroperoksit üzerinden nmol/dk/mg protein olarak ifade edilmiştir.  $P \leq 0.05$  olduğunda farklılıklar anlamlı kabul edilmiştir. Boyun ağrısı olan erkeklerde HVLA tedavisinden sonra metabolitlerin plazma seviyelerinde önemli bir değişiklik olmamasına rağmen, kademeli bir artış (tedavi öncesi  $0.146 \pm 0.018$  nmol L<sup>-1</sup>; üçüncü seans  $0.159 \pm 0.015$  nmol L<sup>-1</sup>; altıncı seans  $0.175 \pm 0.020$  nmol L<sup>-1</sup>) gözlenmiştir. SOD'daki azalma ve GSH-Px'deki artma eğilimine rağmen tedaviden sonra anlamlı bir değişiklik görülmemiştir [55].

Daun ve diğ. tarafından yapılan çalışmada domuz ve sığır doku örneklerinde GSH-Px enzim ve toplam çözünebilir selenyum içeriği karşılaştırılmıştır. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın 340 nm dalga boyundaki absorbans değerinin azalması izlenerek belirlenmiştir. GSH-Px aktivitesi U g<sup>-1</sup> olarak ifade edilmiştir. En yüksek GSH-Px aktivitesi domuz doku örneklerinde sırasıyla; karaciğer ( $35.0$  U g<sup>-1</sup>), dalak ( $29.3$  U g<sup>-1</sup>), böbrek ( $27.3$  U g<sup>-1</sup>), kalp ( $1.8$  U g<sup>-1</sup>) ve diyafram ( $0.8$  U g<sup>-1</sup>) şeklindedir. Sığır dokularındaki GSH-Px aktiviteleri sırasıyla; böbrek ( $8.5$  U g<sup>-1</sup>), dalak ( $8.0$  U g<sup>-1</sup>), kalp ( $5.8$  U g<sup>-1</sup>), karaciğer ( $4.0$  U g<sup>-1</sup>) ve diyafram ( $2.1$  U g<sup>-1</sup>) şeklindedir. Toplam selenyum içeriği her iki türde de benzer ve yüksek içerikli bulunmuştur. Sığır dokularının GSH-Px aktivitesindeki değişim böbrek > dalak > kalp > karaciğer > diyafram olarak kaydedilmiş ve domuz organlarındakinden daha az olduğu belirtilmiştir. Domuz böbrek, karaciğer ve dalak dokularında GSH-Px aktivitesi sığır dokularından 3 kat fazla bulunurken, sığır kalp dokusu, diyafram ve kaslı dokuların daha yüksek bir GSH-Px aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir [56].

Çoban ve diğ. tarafından yapılan çalışmada, güçlü antioksidan etkili bir dipeptit olan karnozin (b-alanil-L-histidin)'in E vitamini ile birlikte kullanıldığında dokulardaki antioksidan düzeylerini ne yönde etkilediği araştırılmıştır. Sıçanların karaciğer, kalp ve beyin dokularında malondialdehit (MDA), dien konjugat (DK), GSH düzeyleri ile SOD, GSH-Px ve GST enzim aktiviteleri ölçülmüştür. GSH-Px enzim aktivitesi NADPH'ın 340 nm dalgaboyundaki absorbans değerinin azalması izlenerek belirlenmiştir. Bulgulara göre, yaşlı sıçanlarda karaciğer, kalp ve beyin dokularında MDA ve DK düzeyleri artmıştır. Yaşlı sıçanlarda kalp ve beyinde GSH düzeyleri değişmezken karaciğer GSH

düzeylerinde azalma saptanmıştır. SOD, GSH-Px ve GST aktiviteleri yaşlı sıçanların üç dokusunda da anlamlı bir farklılık göstermediği kaydedilmiştir. Karnozin + E vitamini uygulaması ise yaşlı sıçanlarda lipit peroksit düzeylerini azaltırken karaciğerde GSH düzeylerini arttırmıştır. Bu uygulama dokularda antioksidan enzim aktivitelerini etkilememiştir. Sonuçlar, karnozin ve E vitamininin birlikte kullanımının yaşlı sıçanların dokularında oksidatif stresi baskıladığını göstermektedir [57].

Pascual ve diğerleri tarafından kapiler elektroforez tekniği kullanılarak, indirgenmiş ve yükseltgenmiş GSH'ın direk kantitatif tayini yapılmıştır [11]. Elektroforetik ayırım tamponu olarak 100 mM sodyum dodesil sülfat içeren 100 mM sodyum tetraborat (pH 8.2) kullanılarak ve GSH-Px aktivitesi GSSG pik alanı kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Aktivite} = \frac{(A-A').10^3}{BCt}$$

A: Enzimatik reaksiyon pik alanı

A': Boş (enzim olmayan) reaksiyon pik alanı

B: Deney karışımındaki 1µmol GSSG'nin alanı

C: Karışıma eklenen enzim hacmi (µL)

t: Reaksiyon süresi (dk)

Kırmızı kan hücrelerinde yapısındaki selenyum bağlı GSH-Px enzim aktivitesi, elementel kütle spektrometresi ile ölçülerek dolaylı olarak tayin edilmiştir [13]. Boyut eleme kromatografisi (SEC) ile fraksiyonlandırılan örnek daha sonra ICP-MS ile dedekte edilmiştir. Geliştirilen yöntemde selenyum ICP-MS ile tayin edilmekte ve ICP-MS yöntemi ile bir selenyum içeren GSH-Px1'e bağlı peptitlerin belirlenmesi mümkün olmaktadır. Çalışma kapsamında geliştirilen SEC-ICP-MS tekniği ile insan kırmızı kan hücrelerinin farklı örneklerindeki GSH-Px1 konsantrasyonları, spektrofotometrik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NADPH/GR yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve iyi bir korelasyon eğrisi elde edilmiştir [13].

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal maddelerin tartımı için RADWAG marka Was 220X model analitik terazi, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında Velp Scientifica marka girdap karıştırıcı, doku örneklerinin hazırlanmasında 0.45 µm gözenek çaplı selüloz asetat filtre, Biohit Proline Plus (10-100 µL ölçüm aralığında) mikropipet, çözeltilerin pH'larının belirlenmesinde HI 221 Calibration Check Microprocessor pH-metre, absorbans ölçümlerinde ≈1 nm spektral çözünürlüğe sahip Perkin Elmer Lambda 35 UV-görünür alan spektrofotometresi ve deneysel ölçümlerde Synergy H1 Multi-Mode Microplate Reader (96-well, BioTek, USA) cihazı kullanılmıştır. Kromatografik ayrımlar için; Waters Breeze™ 2 Model HPLC sistemi (Milford, MA, USA), 1525 ikili pompa, kolon termostat, 2998 foto-diyod çoklu detektör (Chelmsford, MA, USA), Symetri C18 analitik kolonu (4.6 mmx250 mm, 5µm) (Milford, MA, USA) ve Hamilton 25 µL şırınga (Reno, NV, USA) kullanıldı. Veri toplama Empower PRO (Waters Associates, Milford, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; bakır (II) klorür dihidrat ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), neokuproin (Nc) (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), amonyum asetat ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ), etil alkol (%96) (EtOH), metil alkol (MeOH), katalaz (CAT) (from bovine liver, 3691 U  $\text{mg}^{-1}$  solid), hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (ağırlıkça %30  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), disodyum hidrojen fosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), hidroklorik asid (HCl), ürik asit (UA), L-askorbik asit (AA), sitrik asit (CA), glukoz ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), albumin, glisin, üre, sitrat, etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu (EDTA), heparin, trisodyum sitrat -2 -hidrat, 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asid) (DTNB) (Eldmann Reaktifi), indirgenmiş glutatyon (GSH), okside glutatyon (GSSG), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) (from bovine erythrocytes, 100 U  $\text{mg}^{-1}$  solid), tris-HCl (tris (hidroksimetil) aminometan-hidroklörür)'dür. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

### 3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Cu(II) klorür çözeltisi,  $10^{-2}$  M olacak şekilde bakır(II)klorür dihidrat'tan ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0.4262 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Amonyum asetat ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) tamponu, 1 M ( $\text{pH}=7$ ) olacak şekilde  $\text{NH}_4\text{Ac}$ 'dan 19.27 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Neokuproin çözeltisi,  $7.5 \times 10^{-3}$  M olacak şekilde (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)'den 0.039 g tartım alınıp %96'lık etil alkolle 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. 1 mM'lık hidrojen peroksit çözeltisi, %30  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den 0.5 M'lık stok çözeltinin (permanganatla titrimetrik yöntemle ayarlanmış)  $2 \times 10^{-3}$  M olacak şekilde hazırlandı.  $10^{-3}$  M askorbik asit hazırlamak için 0.0176 g askorbik asit tartılıp 100 mL'ye distile suyla tamamlandı. Ürik asit çözeltisi,  $10^{-3}$  M olacak şekilde ürik asit'ten 0.0168 g tartılıp 20 mL 0.01 M NaOH - 8.1 mL 0.01 M HCl ile nötrleştirilip distile suyla 100 mL'ye seyreltildi. Daha sonra  $10^{-3}$  M'lık ürik asit çözeltisinin 1:100 oranında seyreltilmesiyle  $10^{-5}$  M ürik asit hazırlandı.  $10^{-3}$  M askorbik asit hazırlamak için 0.0182 g askorbik asit tartılıp 100 mL'ye distile suyla tamamlandı. Glukoz çözeltisi, 0.1 M olacak şekilde 1.86 g glukoz tartılıp 100 mL'ye distile suyla tamamlandı. 1:10 oranında seyreltme yapılarak  $10^{-2}$  M glukoz çözeltisi hazırlandı. EDTA çözeltisi, 2.7 mM olacak şekilde 0.0789 g EDTA tartılıp 100 mL'ye distile suyla tamamlandı. Albumin çözeltisi  $21.6 \text{ mg mL}^{-1}$  olacak şekilde 2.16 g tartılarak 100 mL'ye distile suyla tamamlandı. Heparin çözeltisi ve  $156.72 \text{ U mL}^{-1}$  olacak şekilde 0.8 g tartılarak 100 mL'ye distile suyla tamamlandı. Başlangıç aktivitesi  $295200 \text{ U mL}^{-1}$  olan CAT enzim çözeltisi son aktivitesi  $2952 \text{ U mL}^{-1}$  olacak şekilde distile su içerisinde çözülerek hazırlandı ve gerekli denemelerde 1:100 oranında seyreltme yapılarak çalışıldı.  $20 \text{ U mL}^{-1}$  GSH-Px çözeltisi için 1 mg GSH-Px 5 mL Tris-HCl'de çözüldü ve yine Tris-HCl ile  $1 \text{ U mL}^{-1}$  olacak şekilde seyreltilerek taze olarak hazırlandı ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı). Tris-HCl çözeltisi, 0.1 g Tris-HCl'in 2 M HCl ile  $\text{pH}=7.6$ 'ya ayarlandıktan sonra 100 mL'ye distile suyla tamamlanması ile elde edildi. Glutasyon çözeltisi,  $2 \times 10^{-3}$  M olacak şekilde 0.0307 g glutasyon tartılıp 50 mL distile suda çözülerek hazırlandı.  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  DTNB çözeltisi, 20 mg DTNB'nin 10 mL 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  ( $\text{pH}=7.4$ ) tamponunda çözülmesiyle elde edildi ve gerekli denemelerde 1:5 oranında seyreltilerek kullanıldı. 1.3799 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ve 1.7799 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ayrı ayrı distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak 0.1 M'lık çözeltileri hazırlanıp farklı oranlarda karıştırılarak  $\text{pH}=7.4$  fosfat tamponu hazırlandı. Üre tamponu, standart Tris-tampon çözeltisinde hazırlanmıştır. 0.086 M tris (hidroksimetil)

aminometan çözeltisine, 0.09 M glisin, ve 4 mM sitrat eklenerek hazırlanan standart tris tamponuna, pH=2 M olan HCl çözeltisi ilave edilerek pH=8.0'e ayarlı üre tamponu elde edilmiştir. Ayrıca hazırlanan doku homojenizatları (karaciğer, kalp ve böbrek) 0.45 µm gözenek çaplı selüloz asetat filtreden geçirilerek ve uygun seyreltmeler yapılarak inkübasyon karışımlarına alınmıştır.

### 3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER

#### 3.4.1. Mikroplaka-esaslı CUPRAC Yöntemi

CUPRAC yöntemi, Cu(II) klorür çözeltisinin neokuproin (Nc) ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisi (direkt veya asit hidrolizi sonunda) ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir. Minimize edilen bu yöntemde, orijinal CUPRAC reaktiflerinin konsantrasyonları değiştirilmeden miktarları azaltılarak µL düzeyinde çalışılmıştır.  $1 \times 10^{-2}$  M CuCl<sub>2</sub>,  $7.5 \times 10^{-3}$  M Nc ve 1 M NH<sub>4</sub>Ac çözeltilerinden 1:1:1 oranında hazırlanan CUPRAC reaktifi dispense modülüyle toplam hacmi 180 µL olacak şekilde mikroplakalara eklenerek absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

#### Mikroplaka-esaslı CUPRAC Yöntemi:

x µL GSH + (90-x) µL Su

↓ 2 dk (çalkalama + inkübasyon)

180 µL (CUPRAC reaktifi) ( $V_{\text{toplam}} = 270 \mu\text{L}$ )

↓ 2 dk (çalkalama + inkübasyon)

450 nm'de okuma

#### 3.4.2. Biyolojik Örneklerin GSH-Px Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Yöntemler

##### 3.4.2.1. GSH-Px Aktivite Tayini İçin Geliştirilen Mikroplaka-esaslı GSH-Px Yöntemi

Geliştirilen yöntemde GSH ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> arasındaki reaksiyonun GSH-Px enzimi tarafından katalizlenmesi sonucu indirgenmiş-GSH yükseltgenmiş-GSH formuna (GSSG)

dönüşmektedir. Reaksiyon sonunda kalan serbest GSH, spektrofotometrik olarak dedekte edilmektedir. Başlangıçtaki serbest GSH ( $A_0$ ) ile reaksiyon sonunda kalan GSH'nin ( $A$ ) absorptansları arasındaki farktan yararlanarak GSH-Px aktivitesi hesaplanmıştır ( $\Delta A = A_0 - A$ ).

#### Uygulanan Mikroplaka-esaslı GSH-Px Yöntemi:

40  $\mu$ L 1 mM GSH + 40  $\mu$ L 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + x  $\mu$ L (1:20 sey) GSH-Px + (50-x)  $\mu$ L Su

↓ 2 dk (çalkalama + inkübasyon)

40  $\mu$ L CAT (1:100 sey)

↓ 15 sn çalkalama

100  $\mu$ L CUPRAC çözeltisi ( $V_{\text{toplam}} = 270 \mu\text{L}$ )

↓ 2 dk (çalkalama + inkübasyon)

450 nm'de okuma

#### **3.4.2.2. GSH-Px-DTNB Yöntemi**

Referans yöntem olarak seçilen GSH-Px-DTNB yöntemine göre son hacmi 2 mL olan reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Denemede kullanılan GSH-Px, 20 U mL<sup>-1</sup> GSH-Px çözeltisinin tris-HCl (pH=7.6) ile 1:20 oranında seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. 0.5 mL  $2 \times 10^{-3}$  M GSH + 0.5 mL  $2 \times 10^{-3}$  M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + x mL (1 U mL<sup>-1</sup>) GSH-Px + (0.9-x) mL H<sub>2</sub>O karışımı hazırlandıktan sonra 5 dakika bekletilip 1:5 oranında seyreltilen DTNB (2 mg mL<sup>-1</sup>) çözeltisinden 0.1 mL ilave edilmiştir. Çözelti karıştırıldıktan sonra 5 dakika daha oda sıcaklığında bekletilip absorptans değerleri (UV-Vis. spektrofotometrede) 412 nm'de suya karşı okunmuştur. Okunan absorptans değerlerinden  $\Delta A$  değerleri dikkate alınarak GSH-Px-DTNB yöntemiyle GSH-Px kalibrasyon denklemi elde edilmiştir. Elde edilen bu doğruyla örnek içerisindeki GSH-Px aktivitesi U mL<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır.

### 3.4.2.3. HPLC Yöntemi

GSH analizi için geliştirilen HPLC yöntemi:

% 0.1 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (A) ve Asetonitril (B) ikili çözücü sisteminden oluşan hareketli fazın izokratik elüsyonu uygulandı.

HPLC parametreleri:

Akış hızı: 0.5 mL dakika<sup>-1</sup>

T<sub>kolon</sub> = 35 °C

V<sub>örnek</sub> = 20 µL

t = 10 dakika

Elüsyon = % 80 A ; % 20 B

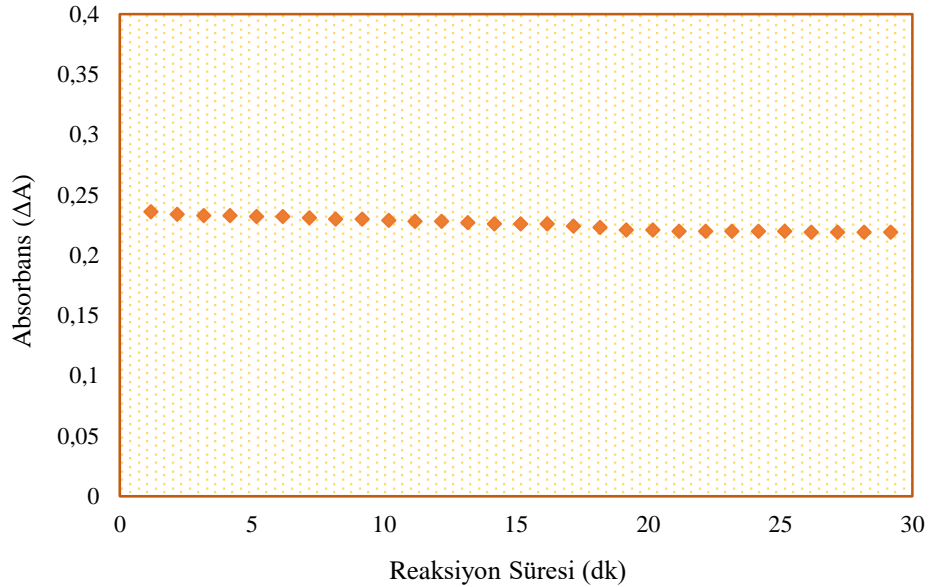
Dedeksiyon dalga boyu (λ) = 205 nm.

## 4. BULGULAR

### 4.1. MİKROPLAKA-ESASLI CUPRAC YÖNTEMİ

#### 4.1.1. Mikroplaka-esaslı CUPRAC Yöntemi ile İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

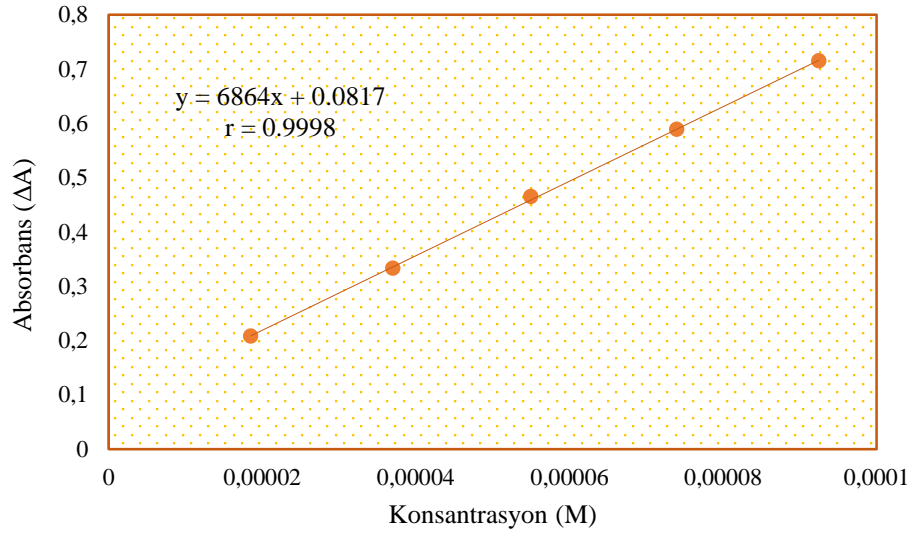
Mikroplaka-esaslı CUPRAC yöntemiyle 20  $\mu\text{L}$  0.5 mM GSH çözeltisi kullanılarak hazırlanan inkübasyon çözeltisinin zamanla absorbans değişimi incelenmiştir. 20  $\mu\text{L}$  GSH + 70  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$   $\downarrow$  2 dk (çalkalama + inkübasyon)+ 180  $\mu\text{L}$  (CUPRAC reaktifi)  $\downarrow$  2 dk (çalkalama + inkübasyon) ve 450 nm’de okuma şeklinde yapılan uygulamada 1’er dakika aralıklarla 450 nm’de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak Şekil 4.1’deki kinetik grafiği elde edilmiştir. Grafik incelendiğinde zamanla ölçülen absorbans değerlerinde (0.236-0.220 aralığında) kayda değer bir farkın olmadığı görülmektedir. Bu sebeple GSH-Px aktivite tayini için minimize edilen Mikroplaka-esaslı CUPRAC yönteminde inkübasyon süresi 2 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1: İnkübasyon çözeltisi absorbansının zamana bağlı değişimi.

#### 4.1.2. Mikroplaka-esaslı CUPRAC Yöntemi ile GSH Kalibrasyonu

Mikroplaka-esaslı CUPRAC yöntemiyle 0.0185–0.0925 mM derişim aralığında çalışılarak GSH kalibrasyon doğrusu ( $y=6864x+0.0817$ ) oluşturulmuştur. Farklı konsantrasyonlardaki GSH çözeltileriyle birlikte referans çözeltisi olarak GSH içermeyen boş CUPRAC reaktifi çözeltisi okunmuş, artan GSH konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri ( $A_0$ ) ile referans absorbans değeri ( $A$ ) arasındaki farktan yararlanarak ( $\Delta A = A_0 - A$ ) GSH kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur (Şekil 4.2).  $1 \times 10^{-2}$  M  $\text{CuCl}_2$ ,  $7.5 \times 10^{-3}$  M Nc, 1 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  çözeltilerinden 1:1:1 oranında hazırlanan CUPRAC reaktif karışımı dispense modülüyle mikroplakalara eklenerek absorbans okumaları gerçekleştirilmiştir.



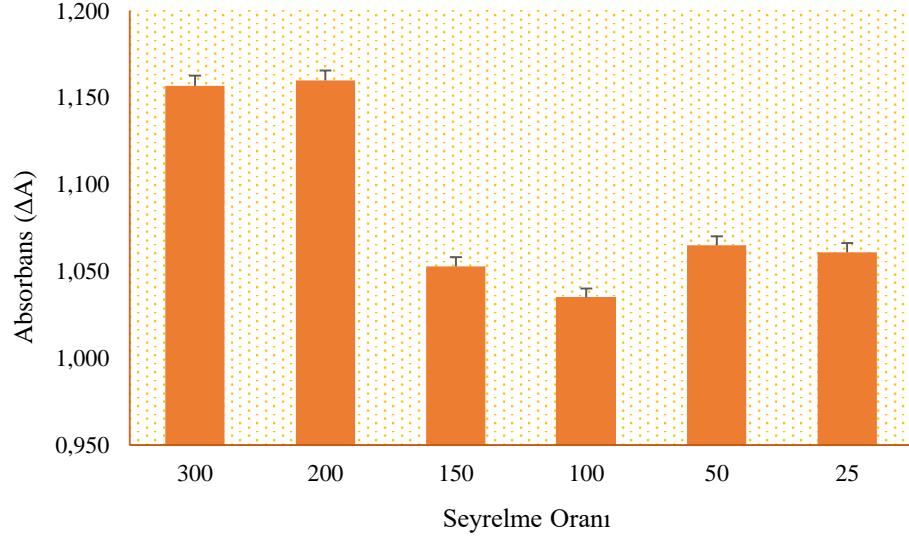
Şekil 4.2: Mikroplaka-esaslı CUPRAC yöntemi ile elde edilen GSH kalibrasyon doğrusu.

## 4.2. MİKROPLAKA-ESASLI GSH-PX YÖNTEMİ

### 4.2.1. Katalaz Çözeltisi Seyrelme Oranının Referans Çözeltisine Etkisi

Geliştirilen GSH-Px yöntemi için belirlenen referans çözeltisine ( $40 \mu\text{L } 2 \times 10^{-3}$  M GSH +  $40 \mu\text{L } 2 \times 10^{-3}$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$  +  $50 \mu\text{L } \text{H}_2\text{O}$ ) farklı seyrelme oranlarında CAT çözeltisi eklenip seyrelme yüzdesiyle absorbans arasındaki değişimler incelenmiştir (Şekil 4.3). Şekilde görüldüğü gibi seyrelme arttığında CAT çözeltisi  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'i elimine etmek için yeterli gelmemektedir. Bu yüzden absorbans değerleri kısmen daha yüksektir (1:300, 1:200 ve 1:150). Daha az seyreltme yapıldığında ise, CAT çözeltisinin kendisinden kaynaklı bir

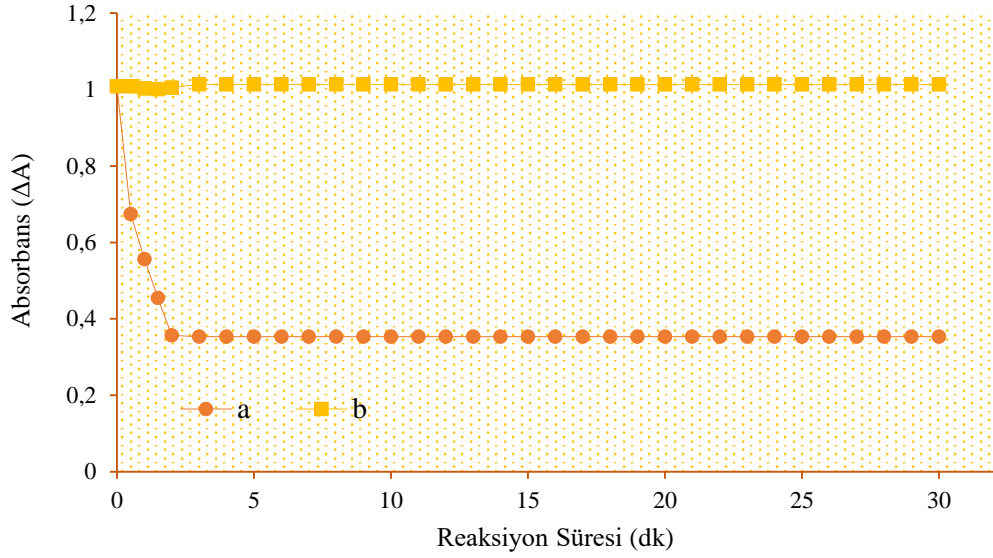
bulanıklık oluşmakta ve bu sebepten dolayı absorbanans değerleri yine yüksek ölçülmektedir (1:50 ve 1:25). En uygun seyrelme oranının 1:100 olduğu tespit edilmiştir.



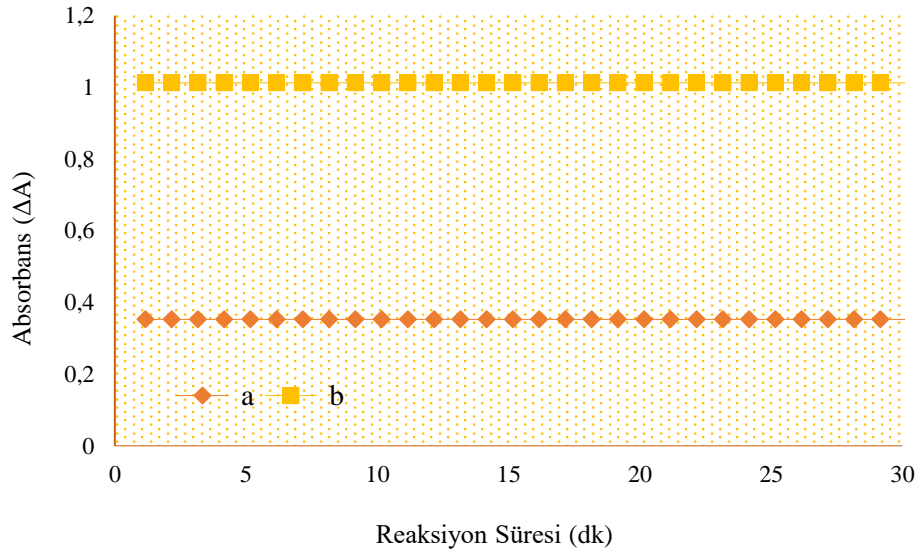
**Şekil 4.3:** Farklı oranlarda seyreltilen CAT çözeltisinin referans çözeltisine etkisinin incelenmesi.

#### 4.2.2. İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

Mikroplaka okuyucu kullanılarak, (a) GSH + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve (b) GSH + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + GSH-Px reaksiyonları için CUPRAC öncesi ve CUPRAC sonrası uygun inkübasyon süresi belirlenmiştir. Şekil 4.4'deki CUPRAC öncesi reaksiyonda inkübasyon süresine bağlı absorbanans değişim grafiğine bakıldığında, GSH-Px'in olmadığı reaksiyon ortamında (Şekil 4.4 (a)) GSH + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının zamanla değişmeden kaldığı; GSH-Px'li ortamda (Şekil 4.4 (b)) ise absorbanansın zamanla azaldığı görülmektedir. Absorbans değerindeki bu azalış 2 dakika içerisinde dengeye gelmektedir. Şekil 4.5'deki CUPRAC sonrası reaksiyonunun ise ilk dakikalarda hızlı bir şekilde tamamlandığı ve GSH + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e ait absorbanans değerinde kayda değer bir değişim görülmediği tespit edilmiştir. Bu nedenle GSH-Px'in inkübasyon süresi 2 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4: CUPRAC öncesi GSH-Px enzimi varlığında (a) ve yokluğunda (b) GSH + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaksiyonları için absorbans değerlerinin zamanla değişimi.

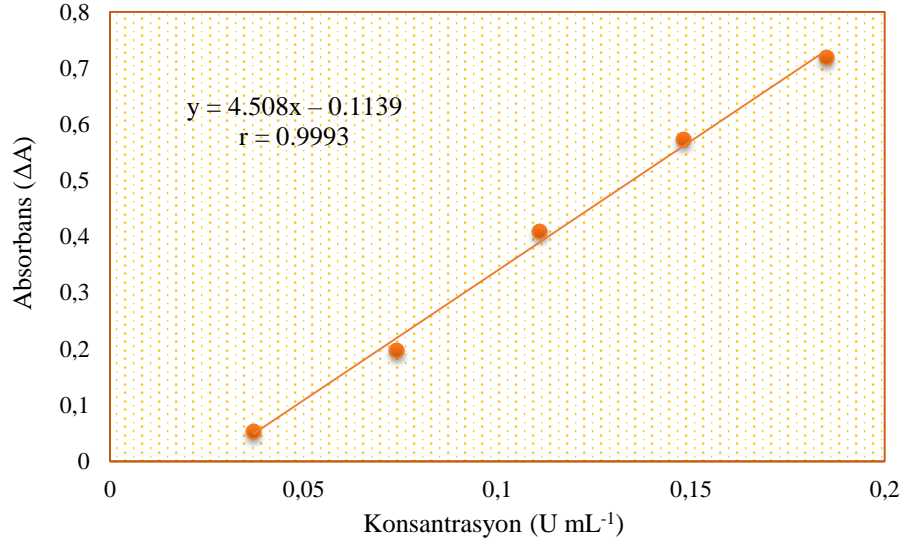


Şekil 4.5: CUPRAC sonrası GSH-Px enzimi varlığında (a) ve yokluğunda (b) GSH + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaksiyonları için absorbans değerlerinin zamanla değişimi.

#### 4.2.3. Mikroplaka-esaslı GSH-Px Yöntemi ile GSH-Px Kalibrasyonu

GSH-Px'in tris-HCl'de (pH=7.6) çeşitli konsantrasyonlarda (0.037 – 0.185 U mL<sup>-1</sup>) çözeltileri hazırlanmıştır. 2 dk bekletilen inkübasyon çözeltilerine, hazırlanan CAT çözeltilisinden 40 µL ve 1x10<sup>-2</sup> M CuCl<sub>2</sub>, 7.5x10<sup>-3</sup> M Nc, 1 M NH<sub>4</sub>Ac çözeltilerinden 1:1:1

oranında hazırlanan CUPRAC reaktifinden 100  $\mu\text{L}$  dispenser yardımıyla mikroplakalara eklenmiştir. 2 dk beklemenin ardından karışımların absorbans değerleri 450 nm'de okunmuş ve gerçek örneklerin GSH-Px aktivite tayininde kullanılacak olan kalibrasyon denklemi ( $y = 4.508x - 0.1139$ ) elde edilmiştir.



Şekil 4.6: Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi ile elde edilen GSH-Px kalibrasyon doğrusu.

#### 4.2.4. Biyolojik Örneklerde İnterferansların (Girişimlerin) Etkisi

Biyolojik örneklerde bulunabilecek çeşitli maddelerin interferans etkileri incelenmiştir. Bu amaçla GSH-Px aktivite tayini için yeni geliştirilen Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi kullanılmıştır.

- 40  $\mu\text{L}$   $2 \times 10^{-3}$  M GSH + 40  $\mu\text{L}$   $2 \times 10^{-3}$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$
- 40  $\mu\text{L}$   $2 \times 10^{-3}$  M GSH + 40  $\mu\text{L}$   $2 \times 10^{-3}$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 40  $\mu\text{L}$  GSH-Px + 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$
- 40  $\mu\text{L}$   $2 \times 10^{-3}$  M GSH + 40  $\mu\text{L}$   $2 \times 10^{-3}$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 40  $\mu\text{L}$  GSH-Px + 10  $\mu\text{L}$  interferans madde
- 40  $\mu\text{L}$   $2 \times 10^{-3}$  M GSH + 40  $\mu\text{L}$   $2 \times 10^{-3}$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 10  $\mu\text{L}$  interferans madde + 40  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$

şeklinde hazırlanan çözeltilere geliştirilen mikroplaka-esaslı GSH-Px tayin yöntemi uygulanmıştır. Daha sonra 450 nm'de absorbansları ölçülerek teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan absorbans değerleri belirlenmiş ve % interferans etki aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

$$\% \text{ İnterferan etki} = \frac{(\text{Beklenen} - \text{Gözlenen}) \times 100}{\text{Gözlenen}}$$

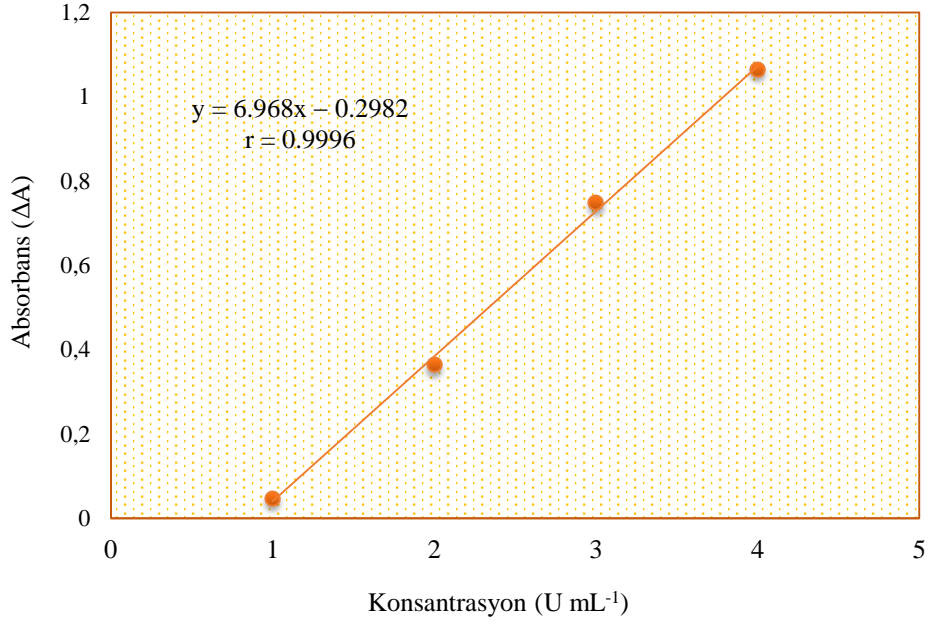
**Tablo 4.1:** Askorbik asit, ürik asit, glukoz, albümin, EDTA ve bilirubin'in % interferans etkileri.

İnterferans Madde	Konsantrasyon	Eklenen GSH-Px ( U mL <sup>-1</sup> )	Deneysel Olarak Bulunan GSH-Px ( U mL <sup>-1</sup> )	% İnterferans Etki
Askorbik asit	0.5 µM	0.148	0.149	0.68
Ürik asit	0.37 µM	0.148	0.151	2.02
Glukoz	0.035 µg mL <sup>-1</sup>	0.148	0.151	2.02
Albumin	0.2 µg mL <sup>-1</sup>	0.148	0.150	1.35
EDTA	100 µM	0.148	0.149	0.68
Bilirubin	0.018 µM	0.148	0.149	0.68

### 4.3. GSH-PX-DTNB YÖNTEMİ

0.5 mL 2 mM GSH + 0.5 mL 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + x mL (1 U mL<sup>-1</sup>) GSH-Px + (0.9-x) mL H<sub>2</sub>O karışımı hazırlandıktan sonra 5 dakika bekletilip 1:5 oranında seyreltilen DTNB (2 mg mL<sup>-1</sup>) çözeltisinden 0.1 mL ilave edilmiştir. Çözeltiler karıştırıldıktan sonra 5 dakika daha bekletilip 412 nm'de absorpsanlar suya karşı okunarak GSH-Px-DTNB yöntemiyle GSH-Px'in kalibrasyon denklemi ( $y = 6.968x - 0.2982$ ) elde edilmiştir (Şekil 4.7).

Her iki yöntem için sonuçlar Tablo 4.2'de özetlenmiştir.



Şekil 4.7: GSH-Px-DTNB yöntemi ile elde edilen GSH-Px kalibrasyon doğrusu.

Tablo 4.2: Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemleri ile elde edilen kalibrasyon doğru denklemleri ve lineer aralıkları.

Yöntem	Lineer Aralık U mL <sup>-1</sup>	Kalibrasyon Doğru Denklemi	r
Mikroplaka-esaslı GSH-Px	0.037 – 0.185	$y = 4.508x - 0.1139$	0.9993
GSH-Px-DTNB	0.037 – 0.185	$y = 6.968x - 0.2982$	0.9996

#### 4.4. BİYOLOJİK ÖRNEKLERDE GSH-PX AKTİVİTE TAYİNİ

##### 4.4.1. Mikroplaka-esaslı GSH-Px Yöntemi ile Karaciğer, Böbrek ve Kalp Dokularının GSH-Px Aktivite Tayini

Sıçanlardan alınan karaciğer, kalp ve böbrek dokularının GSH-Px enzim aktivitesi tayin edilmiştir. 40 µL 1 mM GSH + 40 µL 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + x µL (1:20 seyreltilmiş) doku homojenizatı + (50-x) µL H<sub>2</sub>O karışımının GSH-Px aktivite tayini için geliştirilen mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemiyle elde edilen absorbans değeri (reaksiyon sonunda kalan serbest GSH'in absorbans değeri) GSH-Px kalibrasyon denkleminde ( $y = 4.508x -$

0.1139) yerine yazılarak  $U mL^{-1}$  cinsinden GSH-Px aktivite değerleri hesaplanmış ve Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3:** Karaciğer, böbrek ve kalp doku örneklerinin Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi ile elde edilen GSH-Px aktiviteleri.

Karaciğer ( $U mL^{-1}$ )	Böbrek ( $U mL^{-1}$ )	Kalp ( $U mL^{-1}$ )
$10.95 \pm 0.27$	$3.94 \pm 0.16$	$3.14 \pm 0.12$
$10.35 \pm 0.15$	$4.10 \pm 0.17$	$2.88 \pm 0.10$
$12.03 \pm 0.18$	$4.08 \pm 0.13$	$3.01 \pm 0.15$

#### 4.4.2. Mikroplaka-esaslı GSH-Px Yöntemi ile Doku Homonejizatlarına Standart Katkı Yönteminin Uygulanması

İnkübasyon karışımına ilave edilen GSH-Px miktarları ( $0.074-0.148 U mL^{-1}$ ) deneysel olarak bulunan GSH-Px miktarıyla kıyaslanarak sonuçların uyumluluğu açısından karaciğer dokularında bir değerlendirme yapılmıştır. Sonuçlar  $U mL^{-1}$  cinsinden verilmiş ve % hata değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.4’te gösterilmiştir.

**Tablo 4.4:** Karaciğer dokularına uygulanan standart katkı yönteminde deneysel olarak bulunan ve teorik olarak hesaplanan GSH-Px değerlerinin karşılaştırılması.

Doku Örneği	Teorik GSH-Px Aktivite ( $U mL^{-1}$ )	Deneysel GSH-Px Aktivite ( $U mL^{-1}$ )	% Hata
Karaciğer	0.074	$0.081 \pm 0.017$	8.64
	0.111	$0.114 \pm 0.008$	2.63
	0.148	$0.141 \pm 0.008$	2.13

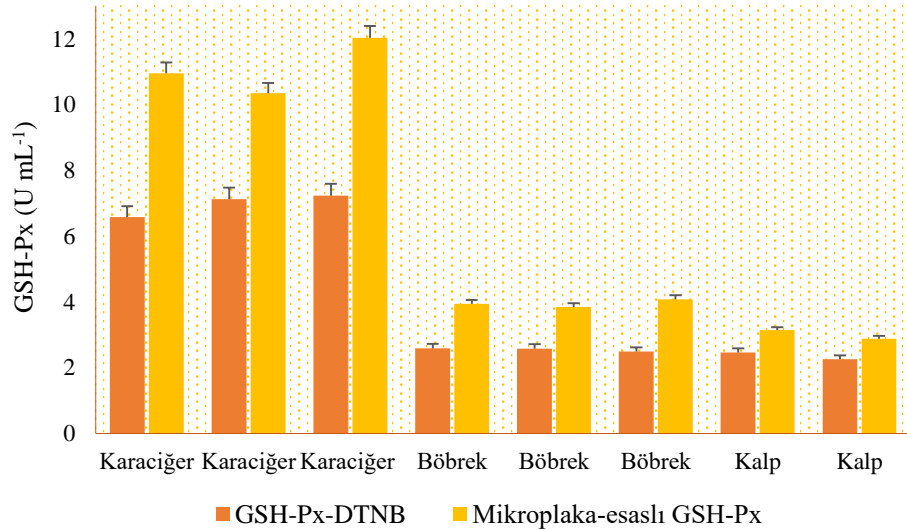
#### 4.4.3. Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB Yöntemleri ile Bazı Doku Homonejizatlarının GSH-Px Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Referans yöntem olarak kullanılan GSH-Px-DTNB yöntemi ve GSH-Px aktivite tayini için geliştirilen mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi ile böbrek, karaciğer ve kalp

dokularında bulunan GSH-Px aktivite değerleri, her iki yöntemin kalibrasyon denklemleriyle hesaplanmış ve karşılaştırmalı olarak Tablo 4.5 ve Şekil 4.8’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.5:** Karaciğer, Böbrek ve Kalp dokularının Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemleri ile bulunan aktivite değerleri.

Doku Örnekleri	GSH-Px-DTNB YÖNTEMİ (U mL <sup>-1</sup> ) $y = 6.968x - 0.2982$	Mikroplaka-esaslı GSH-Px YÖNTEMİ (U mL <sup>-1</sup> ) $y = 4.508x - 0.1139$
Karaciğer	6.58 ± 0.27	10.95 ± 0.27
Karaciğer	7.12 ± 0.24	10.35 ± 0.15
Karaciğer	7.23 ± 0.26	12.03 ± 0.18
Böbrek	2.59 ± 0.25	3.94 ± 0.17
Böbrek	2.58 ± 0.24	4.10 ± 0.18
Böbrek	2.49 ± 0.23	4.08 ± 0.14
Kalp	2.46 ± 0.20	3.14 ± 0.12
Kalp	2.26 ± 0.18	2.88 ± 0.10



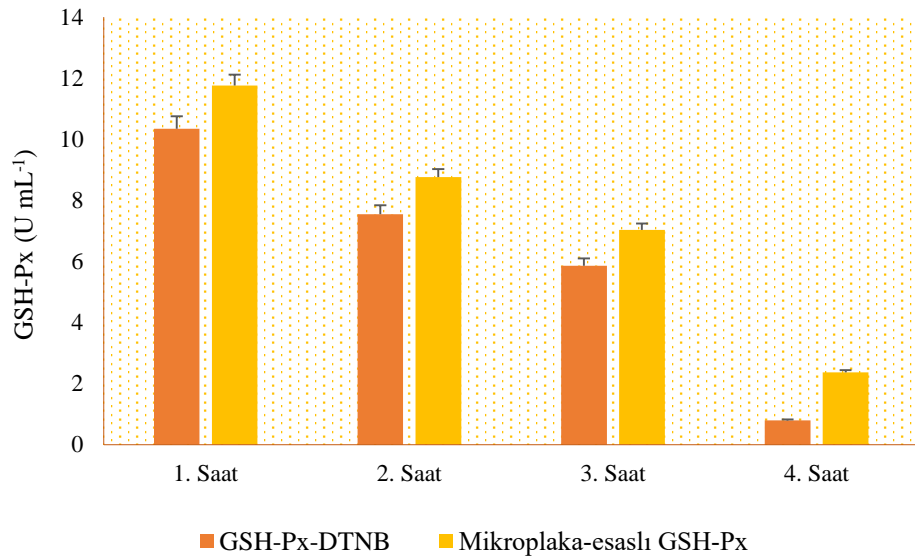
**Şekil 4.8:** Karaciğer, Böbrek ve Kalp doku örneklerinin Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemleri ile bulunan GSH-Px aktivite değerlerinin karşılaştırılması.

#### 4.4.4. Mikroplaka-esaslı GSH-Px Yöntemi ve GSH-Px-DTNB Yöntemi ile Güniçi Karaciğer Dokusunun GSH-Px Aktivitesinin Değişimi

Sıçanlardan alınan karaciğer dokusunun günüçi GSH-Px aktivitesinin değişimi incelenmiştir. Bu amaçla referans yöntem olarak seçilen GSH-Px-DTNB yöntemi ile GSH-Px aktivite tayini için geliştirilen Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi kullanılmıştır. Gün içinde  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan doku örneklerine bir saat aralıklarla yapılan denemeler sonucunda bulunan GSH-Px aktivite değerleri Tablo 4.6 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

**Tablo 4.6:** Karaciğer dokusunun Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemleri ile bulunan gün içi GSH-Px aktiviteleri ( $\text{U mL}^{-1}$ ).

Karaciğer	GSH-Px-DTNB YÖNTEMİ ( $\text{U mL}^{-1}$ )	Mikroplaka-esaslı GSH-Px YÖNTEMİ ( $\text{U mL}^{-1}$ )
1.saat	$10.34 \pm 0.46$	$11.76 \pm 0.42$
2.saat	$7.54 \pm 0.39$	$8.76 \pm 0.32$
3.saat	$5.86 \pm 0.28$	$7.03 \pm 0.25$
4.saat	$0.79 \pm 0.20$	$2.37 \pm 0.16$



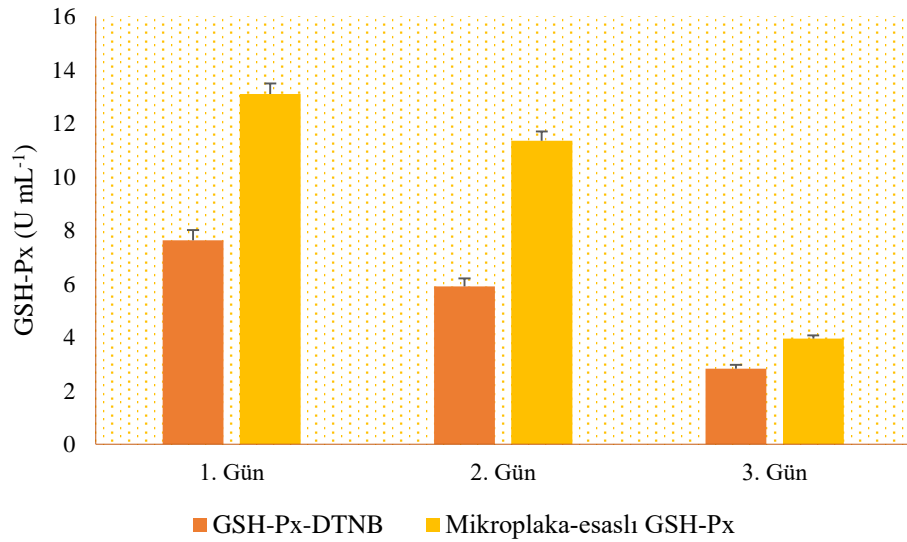
**Şekil 4.9:** Karaciğer dokusunun Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemleri ile bulunan gün içi GSH-Px aktivitelerinin karşılaştırılması.

#### 4.4.5. Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB Yöntemleri ile Günlerarası Karaciğer Dokusunun GSH-Px Aktivitesinin Değişimi

Sıçanlardan alınan karaciğer dokusu  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanarak 3 gün boyunca GSH-Px aktivitesindeki değişim incelenmiştir. Bu amaçla referans yöntem GSH-Px-DTNB yöntemi ile GSH-Px aktivite tayini için geliştirilen Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi kullanılmıştır. Gün geçtikçe karaciğer dokusundaki GSH-Px aktivitesinin her iki yöntemde de azaldığı görülmüştür. Sonuçlar Tablo 4.7 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

**Tablo 4.7:** Karaciğer dokusunun Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemleri ile bulunan günler arası GSH-Px aktiviteleri ( $\text{U mL}^{-1}$ ).

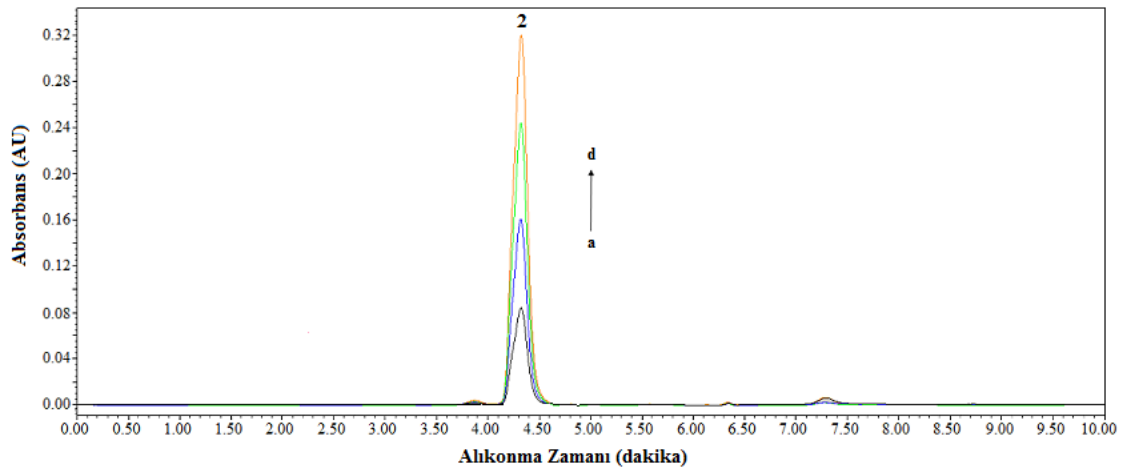
Karaciğer	GSH-Px-DTNB YÖNTEMİ ( $\text{U mL}^{-1}$ )	Mikroplaka-esaslı GSH-Px YÖNTEMİ ( $\text{UmL}^{-1}$ )
1.gün	$7.63 \pm 0.34$	$13.11 \pm 0.32$
2.gün	$5.91 \pm 0.24$	$11.36 \pm 0.26$
3.gün	$2.83 \pm 0.16$	$3.95 \pm 0.17$



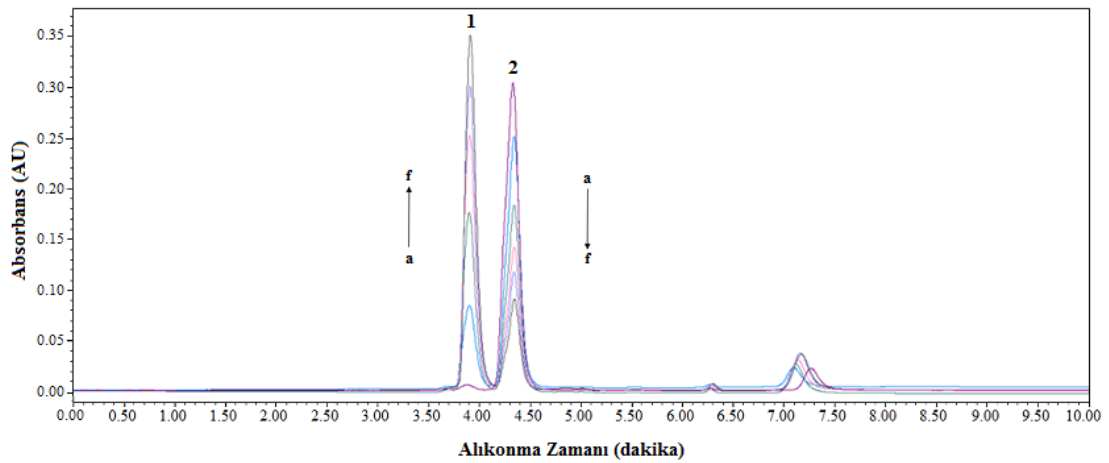
**Şekil 4.10:** Karaciğer dokusunun Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemleri ile bulunan günler arası GSH-Px aktivitelerinin karşılaştırılması.

#### 4.5. HPLC YÖNTEMİYLE MİKROPLAKA-ESASLI GSH-PX YÖNTEMİNİN DOĞRULANMASI

HPLC yöntemi ile 0.06–0.235 mM derişim aralığında çalışılarak GSH için kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur ( $y = 1.34 \times 10^{10}x - 31987$ ;  $r = 0.9995$ ). Doğrulama için 0.4 mL 1 mM GSH + 0.4 mL 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + x mL (1 U mL<sup>-1</sup>) GSH-Px + (0.5-x) mL H<sub>2</sub>O eklenerek hazırlanan çözelti 2 dakika oda şartlarında bekletildikten sonra üzerine 1:100 seyreltilmiş CAT çözeltisinden 0.4 mL ilave edilip karıştırılarak HPLC cihazına enjeksiyon yapılmıştır. İlgili kromatogramlar Şekil 4.11 ve 4.12’de verilmiştir.



**Şekil 4.11:** Farklı konsantrasyonlardaki GSH kromatogramı (a) 0.06 mM, (b) 0.12 mM, (c) 0.18 mM, (d) 0.235 mM.



**Şekil 4.12:** HPLC doğrulama kromatogramında ortamda kalan GSH (2), oluşan GSSG (1).

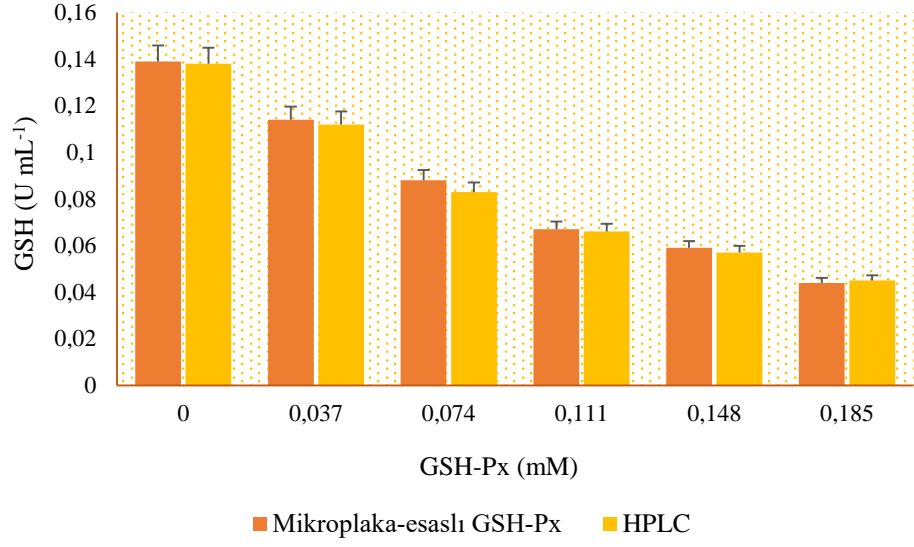
GSH-Px (1 U mL<sup>-1</sup>) reaksiyon ortamına girdikten sonra: (a) 0.4 mL 1 mM GSH + 0.4 mL 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0.4 mL CAT, (b) 0.4 mL 1 mM GSH + 0.4 mL 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0.1 mL GSH-Px + 0.4 mL

CAT, (c) 0.4 mL 1 mM GSH + 0.4 mL 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0.2 mL GSH-Px + 0.4 mL CAT, (d) 0.4 mL 1 mM GSH + 0.4 mL 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0.3 mL GSH-Px + 0.4 mL CAT, (e) 0.4 mL 1 mM GSH + 0.4 mL 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0.4 mL GSH-Px + 0.4 mL CAT ve (f) 0.4 mL 1 mM GSH + 0.4 mL 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0.5 mL GSH-Px + 0.4 mL CAT.

Farklı konsantrasyonlardaki GSH-Px enzimi (U mL<sup>-1</sup>) varlığında ve yokluğunda reaksiyon ortamında yükseltgenmeden kalan GSH (GSH-Px enzimi katalizliğinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile reaksiyona girmeden kalan kısım) miktarı HPLC yöntemiyle belirlenmiştir. Şekil 4.12’de görüldüğü gibi artan GSH-Px konsantrasyonuna bağlı olarak reaksiyon sonunda ortamdaki GSH konsantrasyonu azalmakta ve buna karşılık GSSG miktarı aynı oranda artmaktadır. Ayrıca eş zamanlı olarak GSH-Px aktivite tayini için geliştirilen Mikroplaka- esaslı GSH-Px yöntemiyle de çalışılarak bulunan sonuçlar HPLC yöntemiyle elde edilen değerler ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4.8). Bu amaçla hem Mikroplaka- esaslı CUPRAC yöntemiyle ( $y=6864x+0.0817$ ;  $r=0.9998$ ) hem de HPLC yöntemiyle ( $y=1.34 \times 10^{10}x-9681$ ;  $r=0.9995$ ) elde edilen GSH kalibrasyon doğru denklemleri kullanılarak konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.8 ve Şekil 4.13’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.8:** GSH-Px enzim varlığında Mikroplaka- esaslı GSH-Px ve HPLC yöntemleri kullanılarak tayin edilen çözeltide kalan GSH konsantrasyonları (mM).

GSH-Px (U mL <sup>-1</sup> )	Mikroplaka- esaslı GSH-Px yöntemiyle bulunan GSH (mM)	HPLC yöntemiyle bulunan GSH (mM)
0	0.139 ± 0.006	0.138 ± 0.004
0.037	0.114 ± 0.005	0.112 ± 0.003
0.074	0.088 ± 0.004	0.083 ± 0.003
0.111	0.067 ± 0.003	0.066 ± 0.003
0.148	0.059 ± 0.003	0.057 ± 0.002
0.185	0.044 ± 0.003	0.045 ± 0.004



**Şekil 4.13:** GSH-Px enzimi varlığında Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve HPLC yöntemleri kullanılarak tayin edilen çözeltide kalan GSH konsantrasyonlarının (mM) karşılaştırılması.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

CUPRAC ‘bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi’ yöntemi olarak adlandırılan ve 2004 yılında geliştirilen spektrofotometrik olarak antioksidan kapasite/aktivite tayininde kullanılan yöntem [2], bu tez çalışmasında biyolojik örneklerin GSH-Px antioksidan enzim aktivitesinin ölçülmesinde mikropilaka okuyucu ile birleştirilerek kullanılmış (mikropilaka-esaslı GSH-Px yöntemi) ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda biyolojik örneklerin GSH-Px enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Biyolojik örneklerde GSH-Px enzim aktivite tayini için Mikropilaka-esaslı GSH-Px yöntemi geliştirilmiştir. GSH-Px aktivite tayini için geliştirilen yeni Mikropilaka-esaslı GSH-Px yöntemi, GSH-Px katalizliğinde GSH’ın yükseltgenmesine dayanmaktadır. Başlangıçta sabit konsantrasyonlarda alınan  $H_2O_2$  ve GSH, GSH-Px varlığında GSSG ve suya dönüşecektir. Buna bağlı olarak GSH’ın CUPRAC absorbansındaki azalmadan doku örneği içerisindeki GSH-Px aktivitesi ölçülebilmektedir. GSH-Px konsantrasyonları ile her bir GSH-Px konsantrasyonu için ölçülen çözeltide kalan GSH’ın CUPRAC absorbansları arasında bir kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur ( $y=4.508x-0.1139$ ). GSH-Px kalibrasyon doğrusu kullanılarak doku örnekleri (karaciğer, böbrek ve kalp doku homojenizatları) içerisindeki GSH-Px aktivitesi  $U mL^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Bu amaçla sıçanlardan alınan dokularda GSH-Px için geliştirilen Mikropilaka-esaslı GSH-Px yöntemiyle yapılan denemeler sonucunda GSH-Px aktivite değerleri Tablo 4.3’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre GSH-Px aktivitesi dokudan dokuya değişiklik göstermektedir. Kullanılan dokular arasında en fazla GSH-Px aktivitesi karaciğer dokusunda tespit edilmiştir ( $10.95-12.03 U mL^{-1}$ ).

GSH-Px aktivite tayini için geliştirilen Mikropilaka-esaslı GSH-Px yöntemine göre bazı doku homojenizatlarına standart katkı yöntemi uygulanmıştır. İnkübasyon karışımına ilave edilen GSH-Px miktarları ( $0.074-0.148 U mL^{-1}$ ), deneysel olarak bulunan GSH-Px miktarlarıyla kıyaslanarak sonuçların uyumluluğu açısından bir değerlendirme yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.4’de  $U mL^{-1}$  cinsinden verilmiş ve % hata değerleri hesaplanmıştır. Tablo 4.4’deki verilere göre deneysel olarak bulunan GSH-Px miktarları, karışıma ilave edilen GSH-Px miktarına yakın olup karaciğer dokusu için bulunan GSH-

Px miktarları 0.081, 0.114, 0.141 U mL<sup>-1</sup> şeklindedir. Sonuçta hesaplanan % hata değerleri 2.13 ile 8.64 arasında değişmektedir.

Bu tez çalışmasında biyolojik örneklerdeki GSH-Px aktivite tayini için referans yöntem olarak GSH-Px-DTNB yöntemi kullanılmıştır. Yöntemin esası, GSH-Px katalizliğinde hidrojen peroksit ve GSH reaksiyonundan yükseltgenmeden kalan GSH'nin, DTNB reaktifi ile verdiği sarı renkli ürünün 412 nm'deki absorban değerini ölçülerek enzim aktivitesi hesaplanmasına dayanmaktadır.

Geliştirilen Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi ve referans yöntem GSH-Px-DTNB yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda karaciğer, böbrek ve kalp dokularının GSH-Px enzim aktivitelerine bakılmış ve sonuçlar her iki yöntemle karşılaştırmalı olarak Tablo 4.5'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre GSH-Px-DTNB ve geliştirilen Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi kullanılarak karaciğer dokuları için bulunan GSH-Px aktivite değerleri sırasıyla (6.58, 10.95 U mL<sup>-1</sup>), (7.12, 10.35 U mL<sup>-1</sup>), (7.23, 12.03 U mL<sup>-1</sup>); böbrek dokuları için bulunan GSH-Px aktivite değerleri (2.59, 3.94 U mL<sup>-1</sup>), (2.58, 3.84 U mL<sup>-1</sup>), (2.49, 4.08 U mL<sup>-1</sup>); kalp dokuları için bulunan GSH-Px aktivite değerleri (2.46, 3.14 U mL<sup>-1</sup>), (2.26, 2.88 U mL<sup>-1</sup>) şeklindedir. Görüldüğü gibi GSH-Px-DTNB yöntemi ve geliştirilen mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Özellikle karaciğer dokularında GSH-Px aktivitesi böbrek ve kalp dokularından daha yüksek çıkmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre doku homojenizatlarında GSH-Px aktivite sırası karaciğer dokusu > böbrek dokusu > kalp dokusu şeklindedir. Bunun sebebi karaciğerin detoksikasyonda en önemli organ olmasıdır. Literatürde yapılan çalışmalarda da karaciğer enzim aktivitelerinin (GSH-Px, CAT ve SOD) diğer dokulara göre (böbrek ve kalp dokuları) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [58,59]. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada karaciğer dokusunda GSH-Px aktivitesinin CAT ve SOD aktivitelerinden daha yüksek bulunduğu gösterilmiştir. GSH-Px, CAT ve SOD enzim aktiviteleri sırasıyla 10.62±6.68, 7.24±1.74, 0.33±0.15 şeklindedir [60]. Mikroplaka-esaslı GSH-Px yönteminin üstünlüğü, GSH-Px aktivite değerlerinin daha doğru, daha duyarlı ve daha hızlı bir şekilde tayin edilmesini sağlamasıdır. Geliştirilen yöntemin validasyonu iki yollu varyans analizi (ANOVA) testi ile yapılmıştır. Geliştirilen mikroplaka-esaslı GSH-Px ve referans GSH-Px-DTNB

yöntemleri sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı ANOVA testi yardımıyla bulunmuştur ( $P = 0.05$ ,  $F_{den.} = 1.487$ ,  $F_{krit.(tablo)} = 4.600$ ,  $F_{den.} < F_{krit.(tablo)}$ ).

Mikroplaka-esaslı GSH-Px ve GSH-Px-DTNB yöntemi kullanılarak günüçi ve günlerarası karaciğer dokusunun GSH-Px aktivitesinin değişimi incelemiştir. Günüçi çalışmasında,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan doku örneklerine bir günde saat başı toplam 4 ölçüm alınmıştır. Tablo 4.6'daki değerler doğrultusunda yeni geliştirilen Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi ve referans yöntem olarak kullanılan GSH-Px-DTNB yöntemiyle alınan ölçümler, GSH-Px enzim aktivitesinin 4. saate kadar azaldığını göstermektedir. Geliştirilen Mikroplaka-esaslı GSH-Px yönteminde GSH-Px aktivitesi 4. saat sonunda  $11.76$ 'dan  $2.37\text{ U mL}^{-1}$ 'ye düşerken, GSH-Px-DTNB yönteminde  $10.34$ 'den  $0.79\text{ U mL}^{-1}$ 'ye düşmüştür. Günlerarası çalışmasında ise sıçanlardan alınan ve  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan karaciğer dokusunun 3 gün boyunca GSH-Px aktivitesindeki değişim incelenmiştir. Enzimlerin özellikle de sıcaklığın etkisiyle çabuk bozunabilmesi özelliğinden dolayı her iki yöntemde de GSH-Px aktivitesinin 3 gün boyunca azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara ait veriler Tablo 4.7'de verilmiştir. Geliştirilen Mikroplaka-esaslı GSH-Px yönteminde GSH-Px aktivitesi 3. gün sonunda  $13.11$ 'den  $3.95\text{ U mL}^{-1}$ 'ye düşerken, GSH-Px-DTNB yönteminde  $7.63$ 'den  $2.83\text{ U mL}^{-1}$ 'ye düşmüştür. Aynı zamanda günler arası saklama koşullarındaki sıcaklık farkının, doku örneklerindeki GSH-Px enzim aktivitesinin azalışını olumlu yönde etkilediği ve  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan örneklerin daha geç bozunmaya uğradığı tespit edilmiştir.

Tez çalışmasının son aşamasında geliştirilen Mikroplaka-esaslı GSH-Px yönteminin doğruluğunu saptamak için HPLC yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak HPLC yöntemiyle GSH kalibrasyonu oluşturulmuştur. Daha sonra farklı konsantrasyonlardaki GSH-Px enzimi varlığında reaksiyon ortamında yükseltgenmeden kalan GSH miktarı (GSH-Px enzimi katalizliğinde  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile reaksiyona girmeden kalan miktar HPLC ile elde edilen kalibrasyon denkleminde yerine yazılarak) HPLC yöntemiyle belirlenmiştir. Aynı uygulama geliştirilen Mikroplaka-esaslı GSH-Px yönteminde de eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bulunan sonuçlar HPLC yöntemi ile elde edilen değerler ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.8'de verilmiştir. Bu amaçla hem Mikroplaka-esaslı CUPRAC yöntemiyle ( $y = 6864x + 0.0817$ ;  $r = 0.9998$ ) hem de HPLC yöntemiyle ( $y = 1.34 \times 10^{10}x - 9681$ ;  $r = 0.9995$ ) elde edilen GSH kalibrasyon doğru denklemleri

kullanılarak konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi ve HPLC yöntemiyle bulunan konsantrasyon değerleri sırasıyla (0.139, 0.138 U mL<sup>-1</sup>), (0.114, 0.112 U mL<sup>-1</sup>), (0.088, 0.083 U mL<sup>-1</sup>), (0.067, 0.066 U mL<sup>-1</sup>), (0.059, 0.057 U mL<sup>-1</sup>), (0.044, 0.045 U mL<sup>-1</sup>) şeklinde-dir. Görüldüğü gibi GSH-Px için geliştirilen Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemi ve HPLC yöntemi sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı ve sonuçların benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir ( $P = 0.05$ ,  $F_{den.} = 0.584$ ,  $F_{krit.(tablo)} = 7.709$ ,  $F_{den.} < F_{krit.(tablo)}$ ). Bu sonuçlar yeni geliştirilen yöntemin doğru, tekrarlanabilir ve duyarlı olarak GSH-Px enzim aktivitesini ölçtüğünü göstermektedir.

Sonuç olarak, tez çalışması kapsamında biyolojik örneklerde (doku homojenizatları) GSH-Px enzim aktivite tayini için mikroplaka okuyucu ile, spektrofotometrik CUPRAC yöntemine göre, ölçüm duyarlılığı, tekrarlanabilirlik, doğruluk ve ölçüm hızı yönünden üstün bir yöntem valide edilmiştir. Standart spektrofotometrelerde yapılan ölçümlerde, küvetlerde tek tek ölçüm yapıldığından ve stabil ölçümler yapabilmek için sürenin kısıtlı olmasından dolayı çok örneklı çalışmalarda aynı substrat çözeltilisinden ölçüm gerçekleştirebilmek zorlaşmaktadır. Mikroplaka-esaslı GSH-Px yöntemiyle daha fazla sayıda örnek eş zamanlı olarak çalışılarak, karmaşık ve yüksek maliyetli cihazlara gerek kalmadan kısa sürede doğru sonuç alınmaktadır.

Geliştirilen bu yeni antioksidan enzim aktivite tayin yönteminin kullanımıyla, özellikle tıp, biyokimya ve analitik kimya alanlarında, ROS'un biyolojik örneklere verdiği hasarların ve enzim aktivitesindeki değişimlerin kolaylıkla tespit edileceği, insan sağlığı ile ilgili bazı parametrelerin belirlenerek oksidatif stres kökenli hastalıkların teşhis ve tedavisini kolaylaştıracadığı öngörülmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1]. Schäfer, M., Werner, S., 2011, The cornified envelope: A first line of defense against reactive oxygen species, *Journal of Investigative Dermatology*, 131, 1409-1411.
- [2]. Knapen, M.F.C.M., Zusterzeel, P.L.M., Peters, W.H.M., Steegers, E.A.P., 1999, Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction A review, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 82 171-184.
- [3]. Ho, Y.-S., Magnenat, J.-L., Bronsoni, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., Funk, C.D., 1997, Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia, *The Journal Of Biological Chemistry*, 272, 16644-16651.
- [4]. Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 70, 158-159.
- [5]. Kamata, T., Akasaka, K., Ohrui, H., Meguro, H., 1994, Fluorometric assay of glutathione peroxidase activity in liver and plasma with N-(9- acridinyl) maleimide, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58, 878-880.
- [6]. Austin, L., Arthur, H., De Niese M., Gursinghe A., Baker, M.S., 1988, Micromethods in single muscle fibers: 2. Determination of glutathione reductase and glutathione peroxidase, *Analytical Biochemistry*, 174, 575-579.
- [7]. Zchetti, V.G.L., Granero, A.M., Robledo, S.N., Zon, M.A., Fernández, H., 2013, Development of an amperometric biosensor based on peroxidases to quantify citrinin in rice samples, *Bioelectrochemistry* (Amsterdam, Netherlands), 91, 37-43.
- [8]. Nakashima, K., Nishida, K., Nakasuji, S., Akiyama, S., 1986, Development and application of organic reagents for analysis. IX. A sensitive fluorometric method for the determination of glutathione peroxidase activity, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34, 1684-1687.
- [9]. Jacobson, G.A., Narkowicz, C., Tong, Y.C., Peterson, G.M., 2006, Plasma glutathione peroxidase by ELISA and relationship to selenium level, *Clinica Chimica Acta*, 369, 100-103.
- [10]. Back, T.G., Dyck, B.P., 1997, A novel camphor-derived selenenamide that acts as a glutathione peroxidase mimetic, *Journal of the American Chemical Society*, 119, 2079-2083.
- [11]. Pascual, P., Martinez-Lara, E., Barcena, J.A., Lopez-Barea, J., Toribio, F., 1992, Direct assay of glutathione peroxidase activity using high-performance capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography*, 581, 49-56.
- [12]. Engman, L., Stern, D., Cotgreave, I.A., Andersson, C.M., 1992, Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a proton NMR method, *Journal of the American Chemiccal Society*, 114, 9737-9743.
- [13]. Gomez-Espina, J., Blanco-Gonzalez, E., Montes-Bayon, M., Sanz-Medel, A., 2012, Elemental mass spectrometry for Se-dependent glutathione peroxidase

- determination in red blood cells as oxidative stress biomarker, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27, 1949-1954.
- [14]. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- [15]. Flohe, L., Günzler, W.A., 1984, *Methods in Enzymology, Assays of glutathione peroxidase*, In: Packer L. (ed.), Volume 105, Academic Press, New York, USA, 114-121.
- [16]. Özyürek, M., Baki, S., Güngör, N., Çelik, S.E., Güçlü, K., Apak, R., 2012, Determination of biothiols by a novel on-line HPLC-DTNB assay with post-column detection, *Analytica Chimica Acta*, 750, 173-181.
- [17]. Kopáni, M., Celec, P., Danišovič, L., Michalka, P., Biró, C., 2006, Oxidative stress and electron spin resonance, *Clinica Chimica Acta*, 364, 61-66.
- [18]. Diplock, A., 1998, *Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients*, ILSI Europe concise monograph series, 59 p., Belgium, ISBN 1-57881-003-5.
- [19]. Kaur, C. and Kapoor, H.C., 2001, Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health, *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703-725.
- [20]. Holloszy, J.O., Coyle, E.F., 1984, Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences, *The Journal of Applied Physiology*, 56, 831-838.
- [21]. Shahidi, F., 1996, *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Applications*, AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, ISBN: 0-935315-77-2.
- [22]. Gutteridge, J.M.C., Rowley D.A., Halliwell, B., 1981, Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts, *Biochemical Journal*, 199, 263-265.
- [23]. Draganic, I.G., Draganic, Z.D., 1971, *Radiation Chemistry of Water*, Chapter 8, Academic Press, New York, USA.
- [24]. Naqui, A., Chance, B., Cadenas, E., 1986, Reactive oxygen intermediates in biochemistry, *Annual Review of Biochemistry*, 55, 137-166.
- [25]. Winterbourn C.C., 1981, Hydroxyl Radical Production In Body Fluids, *Biochemical Journal*, 198, 125-131.
- [26]. Gutteridge, J.M.C., 1987, Ferrous-Salt-Promoted Damage To Deoxyribose And Benzoate. The Increased Effectiveness Of Hydroxyl-Radical Scavengers In The Presence Of Edta, *Biochemical Journal*, 243, 709-714.
- [27]. Anbar, M., Neta P., 1965, A Compilation of Specific Bi-Molecular Rate Constant for the Reaction of Hydrated Electrons, Hydrogen Atoms and Hydroxyl Radicals with Inorganic and Organic Compounds in Aqueous Solution, *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, 18, 495-523.

- [28]. Cadenas, E., 1989, Biochemistry of Oxygen Toxicity, *Annual Review Of Biochemistry*, 58, 79-110.
- [29]. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984, Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease, *Biochemical Journal*, 219, 1-14.
- [30]. Nicklas, BJ, Brinkley TE., 2009, Exercise training as a treatment for chronic inflammation in the elderly, *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 37, 165-170.
- [31]. Ukeda, H., 2000, Assay of Enzyme Superoxide Dismutase (SOD), Dojindo Newsletter, Vol: 3, Review.
- [32]. Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J., 1994, Importance of Se-Glutathione Peroxidase, Catalase, and Cu/Zn-SOD for Cell Survival against Oxidative Stress, *Free Radical Biology & Medicine*, 17, 235-248.
- [33]. Gürdöl, F., Ademoğlu, E., 2010, Biyokimya, 1. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 829-836.
- [34]. Cnubben, N.H.P, Rietjens, I.M.C.M, Wortelboer, H, Van Zanden, J., Van Bladeren, P.J., 2001, The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10, 141-152.
- [35]. Gutteridge, J.M., 1994, Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection, *Chemico-Biological Interactions*, 91, 133-140.
- [36]. Halliwell, B., Aruoma, O.I., 1991, DNA damage by oxygen-derived species: Its mechanisms and measurement in mammalian systems, *FEBS Letters*, 281, 9-19.
- [37]. Czochra M.P., Widenska A., 2002, Spectrofluorometric determination of hydrogen peroxide scavenging activity, *Analytica Chimica Acta*, 452, 177-184.
- [38]. Cao, G., Prior, R.L., 1999, In vivo antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods, *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1173-1181.
- [39]. Sroka, Z., Cisowski, W., 2003, Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids, *Food and Chemical Toxicology*, 41 753-758.
- [40]. Cao, G., Prior, R.L., 1998, Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum, *Clinical Chemistry*, 44, 1309-1315.
- [41]. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- [42]. Arosio, B., Gagliano, N., Fusaro, L.M., Parmeggiani, L., Tagliabue, J., Galetti, P., De Castri, D., Moscheni, C., Annoni, G., 2000, Aloe-Emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride, *Pharmacology & Toxicology*, 87, 229-233.
- [43]. Batcıoğlu, K., Öztürk, C., Karagözler, A., Karataş, F., 2002, Comparison of the selenium level with GSH-Px activity in the liver of mice treated with 7,12 DMBA, *Cell Biochemistry and Function*, 20, 115-118.
- [44]. Mills, G. C., 1957, Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown, *Journal of Biological Chemistry*, 229, 189-197.

- [45]. Ursini, F., Maiorino, M., 2014, Glutathione Peroxidases, *Reference Module in Biomedical Sciences, Encyclopedia of Biological Chemistry*, 399-404.
- [46]. Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G., 1973, Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science*, 179, 588-590.
- [47]. Kumaraguruparan, R., Subapriya, R., Viswanathan, N.S., 2002, Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast, *Clinical Biochemistry*, 35, 275-279.
- [48]. Imai, H., Nakagawa, Y., 2003, Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PhgpX, Gpx4) in mammalian cells, *Free Radical Biology & Medicine*, 34, 145-169.
- [49]. Avissar, N., Ornt, D. B., Yagil, Y., Horowitz, S., Watkins, R. H., Kerl, E. A., 1994, Takahashi, K.; Palmer, I. S.; Cohen, H. J. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase, *American Journal of Physiology*, 266, C367-C375.
- [50]. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999, *Free Radical Biology & Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press Inc., New York, USA.
- [51]. Ursini, F, Maiorino, M, Gregolin, C., 1985, The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 839, 62-70.
- [52]. Erejuwa, O.O., Sulaiman, S.A., Wahab, M.S., Salam, S.K., Salleh, M.S., Gurtu, S., 2010, Antioxidant protective effect of glibenclamide and metformin in combination with honey in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats, *International Journal of Molecular Science*, 11, 2056-2066.
- [53]. Galażyn-Sidorczuk, M., Brzóška, M.M., Rogalska, J., Roszczenko, A., Jurczuk, M., 2012, Effect of zinc supplementation on glutathione peroxidase activity and selenium concentration in the serum, liver and kidney of rats chronically exposed to cadmium, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26, 46-52.
- [54]. Čavar, S., Bošnjak, Z., Klačec, T., Barišić, K., Čepelak, I., Jurasović, J., Milić, M., 2010, Blood selenium, glutathione peroxidase activity and antioxidant supplementation of subjects exposed to arsenic via drinking water, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29, 138-143.
- [55]. Kolberg, C., Horst, A., Moraes, M.S., Kolberg, A., Belló-Klein, A., Partata, W.A., 2012, Effect of high-velocity, low-amplitude treatment on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in erythrocytes from men with neck pain, *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, 35, 295-300.
- [56]. Daun, C., Akesson, B., 2004, Glutathione peroxidase activity, and content of total and soluble selenium in five bovine and porcine organs used in meat production, *Meat Science*, 66, 801-807.
- [57]. Çoban, J., Bingül, I., Yeşil-Mizrak, K., Dogru-Abbasoglu, S., Oztezcan, S., Uysal, M., 2013, Effects of carnosine plus vitamin E and betaine treatments on oxidative stress in some tissues of aged rats, *Current Aging Science*, 6, 199-205.

- [58]. Casalino, E., Calzaretti, G., Sblano, C., Landriscina, C., 2002, Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium, *Toxicology*, 179, 37-50.
- [59]. Powell, G.M., Miller, J.J., Olavesen, A.H., Curtis, C.G., 1974, Liver as major organ of phenol detoxication, *Nature*, 252, 234-235.
- [60]. Ismail, N.A., Okasha, S.H., Dhawan, A., Abdel-Rahman, A.M.O., Hamid, N.A., Shaker, O., 2012, Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in children with chronic hepatitis, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 972-977.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler



Adı Soyadı	Melek UGAR
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	04.10.1989, Gebze
Telefon	0 555 6773313
E-mail	ugarmelek@gmail.com

### Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü / Analitik Kimya Anabilim Dalı / Analitik Kimya Programı	2015
Lisans	İ.Ü. / Mühendislik Fakültesi / Kimya Bölümü	2012
Lise	Süleyman Demirel Lisesi	2006