



**ISPANAKTAN ELDE EDİLEN GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN
TAYİNİ İÇİN KARE DALGA KATODİK SIYIRMA VOLTAMETRİSİ İLE
YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

Hande AKAR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Hande AKAR

15/12/2021

ISPANAKTAN ELDE EDİLEN GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN TAYİNİ
İÇİN KARE DALGA KATODİK SIYIRMA VOLTAMETRİSİ İLE YÖNTEM

GELİŞTİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Hande AKAR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2021

ÖZET

Bu çalışmada, kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak glutatyon redüktaz enziminin (GR) aktivitesinin hesaplanması için yeni bir elektrokimyasal yöntem geliştirilmiştir. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak indirgenmiş glutatyon (GSH) pikine enzim derişimi, pH, biriktirme süresi ve biriktirme potansiyeli gibi farklı parametrelerin etkileri incelenmiştir. GR enzimini tayin edebilmek için kullanılan numune ıspanaktan izole edilmiştir. Ispanaktan izole edilen GR enziminin aktivitesi, kare dalga katodik sıyırma voltametrisi ile Unit/mL cinsinden hesaplanmıştır. Bu yöntemle elde edilen GR'nin enzimatik aktivitesi, UV-GB spektroskopisi kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır ve sonuçlar yeni yöntemin güvenilir olduğunu göstermiştir. GSH için gözlenebilme ve tayin sınır değerleri hesaplanmış olup $C_{LOD} = 4,14 \times 10^{-7}$ M ve $C_{LOQ} = 13,8 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur. Ayrıca GSH'a ait bazı elektrokimyasal davranışlar incelenmiştir. Bunun sonucunda sınır akımı $1,962 \times 10^{-9}$ A, Cottrell eğimi $2,499 \times 10^{-7}$, difüzyon katsayısı $1,849 \times 10^{-5}$ cm²/s, indirgenme esnasında mol başına transfer edilen elektron sayısı 2, difüzyon kontrollü ve indirgenme mekanizmasının 'ECE mekanizması' olduğu belirlenmiştir.

Bilim Kodu : 20102
Anahtar Kelimeler : Kare dalga sıyırma voltametrisi, glutatyon redüktaz enzimi, enzim aktivitesi tayini
Sayfa Adedi : 85
Danışman : Prof. Dr. Mehmet Sayım KARACAN

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE DETERMINATION OF GLUTATHIONE
REDUCTASE ENZYME FROM SPINACH BY SQUARE WAVE CATHODIC
STRIPPING VOLTAMMETRY

(M. Sc. Thesis)

Hande AKAR

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2021

ABSTRACT

In this study, a new electrochemical method was developed to calculate the activity of glutathione reductase enzyme (GR) using the square wave cathodic stripping voltammetry method. The effects of different parameters such as enzyme concentration, pH, deposition time and deposition potential on reduced glutathione (GSH) peak were investigated using the square wave cathodic stripping voltammetry method. The sample used to determine the GR enzyme was isolated from spinach. The activity of GR enzyme isolated from spinach was calculated in Unit/mL by square wave cathodic stripping voltammetry. The enzymatic activity of GR obtained by this method was compared with the results obtained using UV-GB spectroscopy and the results showed that the new method was reliable. Observation and detection limit values for GSH were calculated and $C_{LOD}= 4.14 \times 10^{-7}$ M and $C_{LOQ}=13.8 \times 10^{-7}$ M. In addition, some electrochemical behaviors of GSH were investigated. As a result, it has been determined that the boundary current is 1.962×10^{-9} A, the Cottrell slope is $2,499 \times 10^{-7}$, the diffusion coefficient is 1.849×10^{-5} cm²/s, the number of electrons transferred per mole during reduction is 2, diffusion-controlled and the reduction mechanism is the 'ECE mechanism'.

Science Code : 20102
Key Words : Square wave stripping voltammetry, glutathione reductase enzyme, enzyme activity determination
Page Number : 85
Supervisor : Prof. Dr. Mehmet Sayım KARACAN

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca zor ve sıkıntılı süreçlerde her daim bana destek sağlayan, bilim insanı olmanın yanında iyi bir insan olabilmenin de çok değerli olduğunu öğreten değerli danışmanım Prof. Dr. Mehmet Sayım KARACAN' a çok teşekkür ederim. Bana kattığı engin bilgileri ve manevi katkılarıyla sayın hocam Prof. Dr. Nurcan KARACAN'a, beni her zaman cesaretlendiren ve destek olan Dr. Serhat MAMAŞ'a teşekkür ederim.

Akademisyen olabilme hayalimin tohumunu gönlüme ilk kez ekerek bu tohumu yeşerten saygıdeğer Prof. Dr. Bekir SALİH'e, Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ATAKAY'a ve Arş. Gör. Dr. Ülkü GÜLER'e bana verdikleri cesaret için teşekkür ederim.

Manevi katkıları ve dostluklarından ötürü iş arkadaşlarım Arş. Gör. Özge ÇAĞLAR TEKNİKEL'e, Arş. Gör. Görkem LİMAN'a, Arş. Gör. Ahmet Furkan KAYIŞ'a ve Arş. Gör. Muhammed BÜYÜKTEMİZ'e teşekkür ederim.

Akademik telaşlarımda her zaman yanımda olup hayallerime destek olan Arş. Gör. Güneş SUCU'ya, hayatıma bir ödül gibi giren minik kedim NOBEL'e, sevgili dostlarım Burcu DURMUŞ ile Yusufcan ÖZKAYIT başta olmak üzere Deniz ÇAKMAZ'a ve bütün dostlarıma hayatımda oldukları süre zarfında bana hissettirdikleri şans için çok teşekkür ederim.

Ve teşekkürlerin en büyüğünü hak eden aileme; beni bugünlere getiren, kendim olmamı sağlayan, beni ben yapan her şeyi kendisinden öğrendiğim annem Fatma AKAR'a, gitmek istediğim her yolda beni cesur kılan ve her daim maddi ve manevi destek sağlayan babam Faruk AKAR'a, hayatımın en büyük şansısı olan canım kardeşim Esra AKAR'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Glutasyon.....	3
2.2. Bitkilerde Antioksidan Sistemler	6
2.2.1. Reaktif oksijen türleri.....	6
2.2.2. Oksidatif stres	7
2.3. Enzimlerin Doğası.....	7
2.3.1. Enzim mekanizması	8
2.3.2. Enzim inhibitörleri	8
2.3.3. Enzim aktivitesi.....	9
2.3.4. Glutasyon redüktaz enzimi	10
2.3.5. Glutasyon redüktaz enzimi aktivite tayin yöntemleri.....	11
2.4. Elektrokimyasal Yöntemler	12
2.4.1. Voltametri	13
2.5. Elektrokimyasal Özelliklerin İncelenmesi	17
2.5.1. Maddenin elektrokimyasal indirgenme mekanizmasının tayini	17

Sayfa

2.5.2. Maddenin yükseltgenme veya indirgenmesi esnasında transfer edilen elektron sayıları ve difüzyon katsayılarının tayini	18
2.5.3. Adsorbsiyon kontrollü reaksiyonun belirlenmesi	21
2.6. Literatür Araştırması	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Kullanılan Cihazlar	25
3.1.1. Potansiyostat cihazı.....	25
3.1.2. pH metre.....	25
3.1.3. Ultra saf su cihazı.....	25
3.1.4. Analitik terazi.....	25
3.1.5. Yüksek devirli soğutmalı santrifüj.....	26
3.1.6. Elektrotlar.....	26
3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	27
3.3. Numuneler, Reaktifler ve Çözeltilerin Hazırlanmaları	28
3.3.1. Elektrokimyasal analiz için hazırlanan çözeltiler	28
3.3.2. UV-GB spektroskopisi ile GR enzim tayin yöntemi için hazırlanan çözeltiler.....	29
3.4. GR Enziminin Ispanaktan İzole Edilmesi	30
3.5. GR Enziminin UV-GB Spektroskopisi ile Tayini.....	30
4. DENEYSEL BULGULAR	33
4.1. İndirgenmiş Glutasyonun Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi	33
4.1.1. İndirgenmiş glutasyonun elektrokimyasal davranışının tayini.....	33
4.1.2. İndirgenmiş glutasyonun indirgenme mekanizmasının tayini.....	37
4.2. Bazı Elektrokimyasal Yöntemler ile Enzim Aktivite Tayininin Optimizasyonu	38
4.2.1. Kare dalga voltametrisi yöntemi ile enzim aktivite tayini	38
4.2.2. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile enzim aktivite tayini	44

Sayfa

4.2.3. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi ile enzim aktivite tayini	54
4.2.4. Bazı elektrokimyasal yöntemler ile optimizasyon parametrelerinin karşılaştırılması	64
4.3. İndirgenmiş Glutasyon İçin Gözlenebilme ve Tayin Sınırı.....	65
4.4. Kare Dalga Katodik Sıyırma Voltametrisi ile Ispanaktan Elde Edilen GR Enzimi Derişimin Tayini.....	67
4.5. UV-GB Spektroskopisi Yöntemi ile Ispanaktan Elde Edilen GR Enziminin Tayini	71
4.5.1. UV-GB spektroskopisi yöntemi ile karşılaştırılarak kesinliğin belirlenmesi.....	73
5. SONUÇLAR.....	75
KAYNAKLAR	77
EKLER.....	83
EK-1. %95 güven seviyesi için kritik F değerleri.....	84
ÖZGEÇMİŞ	85

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddelerin listesi	28
Çizelge 4.1. $1,0 \times 10^{-4}$ M GSH'a ait farklı tarama hızlarında tayin edilen indirgenme potansiyelleri.....	34
Çizelge 4.2. GSH'ait Cottrell eğimleri (N=3).....	35
Çizelge 4.3. 1×10^{-4} M GSH'ın indirgenmesi esnasında transfer edilen elektron sayısı ve difüzyon katsayısı	35
Çizelge 4.4. Kare dalga voltametrisi yöntemi ile farklı derişimlerde enzim içeren elektrokimyasal hücrelere ait potansiyostatın çalışma şartları	39
Çizelge 4.5. Kare dalga voltametrisi ile farklı GR enzimi derişimlerine karşı gelen akım değerleri	40
Çizelge 4.6. Kare dalga voltametrisi yöntemi ile farklı pH ortamlarında optimizasyon için potansiyostatın çalışma şartları	42
Çizelge 4.7. Kare dalga voltametrisi yöntemi ile farklı pH'a sahip tampon çözeltilere karşılık gelen akım değerleri.....	43
Çizelge 4.8. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi için potansiyostatın çalışma şartları	44
Çizelge 4.9. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı biriktirme potansiyellerine karşılık gelen akım değerleri	46
Çizelge 4.10. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi ile enzim derişiminin belirlenebilmesi için potansiyostatın çalışma şartları.....	47
Çizelge 4.11. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı derişimlerde enzimlere karşılık gelen akım değerleri	48
Çizelge 4.12. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi ile farklı derişimlerde enzim içeren elektrokimyasal hücrelere ait potansiyostatın çalışma şartları	50
Çizelge 4.13. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı biriktirme sürelerine karşılık gelen akım değerleri	51
Çizelge 4.14. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı pH ortamlarında optimizasyon için potansiyostatın çalışma şartları.....	52
Çizelge 4.15. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı pH'a sahip tampon çözeltilere karşılık gelen akım değerleri.....	53

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.16. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisiyle biriktirme potansiyelinin GSH akımına etkisini belirlemek için kullanılan potansiyostatın çalışma şartları	55
Çizelge 4.17. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı biriktirme potansiyellerine karşılık gelen akım değerleri	56
Çizelge 4.18. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi için potansiyostatın çalışma şartları	57
Çizelge 4.19. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi ile farklı derişimlerde enzim içeren hücrelere karşılık gelen akım değerleri	58
Çizelge 4.20. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi ile farklı derişimlerde enzim içeren hücrelere ait potansiyostatın çalışma şartları	60
Çizelge 4.21. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı biriktirme sürelerine karşı akım değerleri	61
Çizelge 4.22. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile ortam pH'nın optimizasyonu için potansiyostatın çalışma şartları	62
Çizelge 4.23. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı pH'a sahip tampon çözeltilere karşılık gelen akım değerleri	63
Çizelge 4.24. Kullanılan 3 farklı voltametrik yöntem için elde edilen optimum değerler	64
Çizelge 4.25. Şahit numuneye ait pikin akım değerleri	65
Çizelge 4.26. GSH için kalibrasyon grafiği eğim değeri, gözlenebilme ve tayin sınırı değeri	66
Çizelge 4.27. Ticari GR enzimi ile farklı derişimlere karşı elde edilen akım değerleri .	68
Çizelge 4.28. Ispanaktan elde edilen GR enzimi ile farklı derişimlere karşı elde edilen aktivite değerleri	70
Çizelge 4.29. Ispanaktan elde edilen GR enzimi ile aynı derişimde elde edilen aktivite değerleri	71
Çizelge 4.30. UV-GB spektroskopisi yöntemi ile ıspanaktan izole edilen GR enzimi derişim tayini	71

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. İndirgenmiş glutatyonun kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2.2. Yükseltgenmiş glutatyonun kimyasal yapısı	4
Şekil 2.3. Glutatyon sentezi	4
Şekil 2.4. GR enziminin katalizlediği tepkime	10
Şekil 2.5. Glutatyon peroksidaz (GP) ve glutatyon redüktaz (GR) tarafından katalize edilen GSH:GSSG reaksiyonu.....	11
Şekil 2.6. Glutatyon redüktaz içeren reaksiyon karışımının spektral değişimi (A) 340 nm'de izlenen zamana karşı absorpsiyon değişimi (B).....	11
Şekil 2.7. Elektroanalitik tekniklerin sınıflandırılması	13
Şekil 2.8. Bir SWV yönteminde uyarma potansiyelinin oluşumu ve elde edilen basamaklı sinyal	15
Şekil 2.9. CV'de uygulanan potansiyelin zamanla değişim grafiği.....	16
Şekil 2.10. Zamanın kareköküne karşı akım grafiği	19
Şekil 2.11. Kronoamperometrik yöntemlerde çalışma elektrotuna uygulanan potansiyelin zaman ile değişim grafiği (E_i : başlangıç potansiyeli, E_s : basamak potansiyeli, E_f : bitiş potansiyeli, τ : sabit potansiyelde bekletilen süredir.).....	20
Şekil 4.1. $1,0 \times 10^{-4}$ M GSH'ın pH:7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponunda dönüşümlü voltamogramı (Ag/AgCl elektroda karşı, $v = 0,5$ V/s)	33
Şekil 4.2. Damlayan cıva elektrot kullanılarak 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 V/s tarama hızlarında 10^{-4} M GSH' ait dönüşümlü voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH:7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu içerisinde).....	34
Şekil 4.3. GSH'ın $\log v$ 'ye karşı $\log I_{p_k}$ grafiği.....	36
Şekil 4.4. GSH'ın tarama hızının karekökünün I_{p_k} 'ya karşı grafiği.....	37
Şekil 4.5. GSH'ın tarama hızının $I_{p_k}/v^{1/2}$ 'ye karşı grafiği	38
Şekil 4.6. Kare dalga voltametrisi yöntemi için 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 unit enzim derişimlerinde elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu içerisinde).....	40
Şekil 4.7. Kare dalga voltametrisi yöntemi ile elde edilen voltamogramlara göre derişime göre akım grafiği.....	41

Şekil	Sayfa
Şekil 4.8. Kare dalga voltametrisi yöntemi ile farklı pH'a sahip tampon çözeltilerden elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ tamponu içerisinde)	42
Şekil 4.9. Kare dalga voltametrisi yöntemi ile pH'a karşı GSH'a ait akım grafiği	43
Şekil 4.10. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi ile farklı biriktirme potansiyellerinde elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ tamponu içerisinde)	45
Şekil 4.11. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı biriktirme sürelerine karşı GSH'a ait akım grafiği	46
Şekil 4.12. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi ile 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 unit enzim için farklı derişimlerden elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ tamponu içerisinde).....	48
Şekil 4.13. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile elde edilen voltamogramlara göre derişime karşı GSH'a ait akım grafiği.....	49
Şekil 4.14. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi ile farklı biriktirme sürelerinde elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ tamponu içerisinde).....	50
Şekil 4.15. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile elde edilen voltamogramlara göre biriktirme süresine karşı GSH'a ait akım grafiği	51
Şekil 4.16. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile pH'a karşı elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ tamponu içerisinde)	53
Şekil 4.17. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile pH'a karşı GSH'a ait akım grafiği.....	54
Şekil 4.18. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi ile farklı biriktirme potansiyellerinde elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ tamponu içerisinde)	55
Şekil 4.19. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile elde edilen voltamogramlara göre biriktirme potansiyeline karşı GSH'a ait akım grafiği.....	56
Şekil 4.20. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 unit enzim derişimleri için elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ tamponu içerisinde).....	58
Şekil 4.21. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile elde edilen voltamogramlara göre derişime karşı GSH'a ait akım grafiği.....	59

Şekil	Sayfa
Şekil 4.22. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi ile farklı biriktirme sürelerinde elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ tamponu içerisinde).....	60
Şekil 4.23. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile elde edilen voltamogramlara göre biriktirme süresine karşı GSH'a ait akım grafiği	61
Şekil 4.24. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak farklı pH'larda elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı)	63
Şekil 4.25. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile pH'a karşı GSH'a ait akım grafiği.....	64
Şekil 4.26. GSH'ın gözlenebilme ve tayin sınırının tayini için oluşturulan kalibrasyon grafiği.....	66
Şekil 4.27. Ticari GR enzimi ile kare dalga sıyırma katodik voltametri yöntemi kullanılarak 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 unit enzim derişimlerinde elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ tamponu içerisinde)	67
Şekil 4.28. Ticari GR enzimi ile kare dalga sıyırma katodik voltametrisi yöntemi kullanılarak farklı derişimlere karşı GSH'a ait akım grafiği	68
Şekil 4.29. Ispanaktan elde edilen GR enzimi ile farklı derişimler için elde voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ tamponu içerisinde)	69
Şekil 4.30. Ispanaktan izole edilen GR enzimine ait absorbansa karşı zaman grafiği....	72
Şekil 4.31. İki örneklem varyansının oranından elde edilen F değeri	73

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Potansiyostat cihazı	25
Resim 3.2. Standart gümüş/gümüş klorür elektrot.....	26
Resim 3.3. Platin tel.....	26
Resim 3.4. Ultra mikro elektrot	27

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

Hz

Hertz

K_m

Michaelis sabiti

rpm

Dakikadaki dönme sayısı

s

Saniye

Unit

Enzim ünitesi birimi

V

Volt

V_{max}

Maksimum hız

μA

Mikroamper

μL

Mikrolitre

Kısaltmalar

Açıklamalar

ASV

Anodik sıyırma voltametrisi

CV

Dönüşümlü voltametri

CSV

Katodik sıyırma voltametrisi

GR

Glutasyon redüktaz

GSH

İndirgenmiş glutasyon

GSSG

Yükseltgenmiş glutasyon

NADPH

Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

PVP

Polivinil prolidon

ROS

Reaktif oksijen türleri

SWV

Kare dalga voltametrisi

1. GİRİŞ

Glutasyon; insanlarda, hayvanlarda, bitkilerde, mantarlarda ve bazı bakterilerde bulunan antioksidan bir moleküldür. Glutasyon, serbest radikaller, peroksitler, lipid peroksitler ve metaller gibi reaktif türlerin neden olduğu önemli hücresel bileşenlerin zarar görmesini önlemede kullanılır. Glutasyon, hem indirgenmiş (GSH) hem de yükseltgenmiş (GSSG) formda bulunabilir. Glutasyon bir elektron donörü olarak görev yapar ve sitoplazmik proteinler içinde oluşan disülfid bağlarını sisteinlere indirger. Bu süreçte glutasyon yükseltgenmiş formu olan GSSG'ye dönüştürülür. Yükseltgenmiş GSSG, elektron donörü olarak nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) kullanılarak glutasyon redüktaz tarafından hızla geri indirgenir [1].

Antioksidan savunma mekanizması, hücreleri ve dokuları reaktif oksijen türleri (ROS) kaynaklı oksidatif hasarlara karşı korur. Bir flavoprotein oksidoredüktaz olan glutasyon redüktaz, çeşitli stresler altında bitkilerin toleransının belirlenmesinde GSH ile birlikte çok önemli bir rol oynadığı askorbat-glutasyon (ASH-GSH) döngüsünün potansiyel bir hücresel antioksidan enzimidir [2].

Glutasyon redüktaz (GR), NADPH varlığında GSSG ile GSH reaksiyonunu katalize eder ve böylece hücredeki olması gereken GSH seviyesini korur. İndirgenmiş glutasyon, çoğu aerobik organizmanın hücrelerinin hayatta kalması için gereklidir. Hücre içinde bulunur ve hidroperoksitler ve serbest radikallerden koruma sağlar.

GR enzimi; domuz, sığır gibi hayvanların eritrositlerinden ya da sıçan, koyun, hindi gibi hayvanların karaciğerinden elde edilebileceği gibi mantar, siyanobakteri gibi mikroorganizmalardan ya da buğday, mısır, bezelye ve ıspanak gibi bitkisel kaynaklardan elde edilebilmektedir [3].

GR enziminin aktivitesi yaygın olarak spektrofotometrik yöntem kullanılarak 340 nm'de absorbans değerindeki azalmadan faydalanılarak dolaylı yoldan ölçülerek yapılır [4]. Kolorimetrik yöntemler özellikle de NADPH veya 2-nitrobenzoik asit kullanılarak absorbans değişikliğine dayalı olanlar yöntemler, GR aktivitesini tespit etmek için en sık kullanılan yöntemlerdir.

GR aktivitesini belirlemek için literatürde raman spektroskopisi, yüzey plazmon rezonansı, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez, floresans spektrometrisi gibi başka teknikler de uygulanmıştır. Son yıllarda ise GR aktivitesini tespit etmek için elektrokimyasal yöntemler de kullanılmaktadır.

Bu çalışmada yeni bir kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak katalizör olarak kullanılan GR nin aktivitesinin tayini yapılmıştır. GSSG ile NADPH'ın tepkimesi sonucu açığa çıkan elektroaktif GSH'ın sinyalinden yararlanarak ıspanaktan izole edilen GR enziminin aktivitesi tayin edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

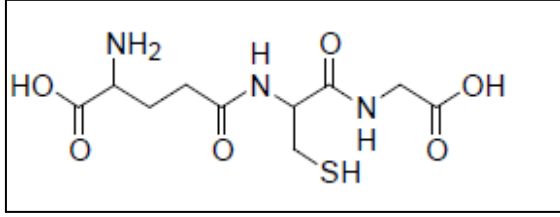
2.1. Glutasyon

Glutasyon glutamat, sistein ve glisinden oluşan, γ -Glu-Cys-Gly gösterimi ile temsil edilen bir tripeptittir. [5] Glutamat ve sistein arasında olağandışı bir γ -peptit bağı bulunur. Böyle bir bağ, GSH' ın çoğu peptidaz tarafından hidrolize edilmesini önler.

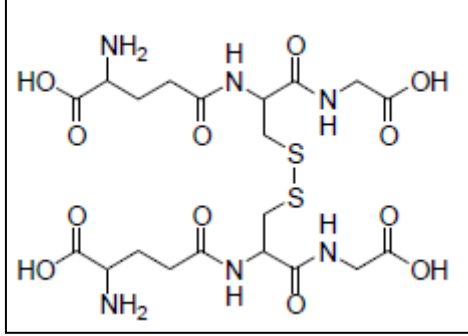
Glutasyon, en önemli hücrel antioksidan sistemlerden biridir. İndirgenmiş glutasyon, reaktif oksijen ve azot türlerini bertaraf edebilir ve böylece redoks hücre içi denge kontrolüne katkıda bulunabilir. Genel olarak yükseltgeme-indirgeme tepkimelerinde bir indirgeyici olarak önemli bir role sahiptir ve ayrıca büyük önem taşıyan diğer birkaç hücrel fonksiyona hizmet eder [6]. GSH bir koenzim olarak amino asit taşınmasına katılır. Metabolizma ve proteinlerin tiyol kısımlarının ve sistein ile koenzim A gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin korunmasında rol oynar. Metabolizmada normal olarak oluşabilecek reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif hasara karşı korur. ROS ile enzimatik olmayan şekilde reaksiyona girebilir. Hidrojen peroksitler ve diğer peroksitler GSH peroksidaz ile detoksifiye edilir [7].

GSH hücreler, dokular ve plazmada birkaç ek formda bulunur. Bu formlardan biri GSSG'dir. GSSG oksidasyon ile oluşup "yükseltgenmiş glutasyon" olarak adlandırılır. Ancak GSH'dan, örneğin sülfonatlerden başka oksidasyon ürünleri de oluşturulur. Diğer disülfid formları, proteinler üzerindeki glutasyon-sisteinil disülfidler olarak bilinen GSSR'dir [8].

Glutasyon sistemi, hücrelerin çoğunda temel redoks tamponu görevi görür ve bu nedenle genel olarak indirgenmiş ortamdan sorumludur. Ortalama olarak, sitozol içindeki hücrel konsantrasyon, 30:1 ila 100:1 aralığında genel bir GSH/GSSG oranı ile 1 mM ile 10 mM arasında değişebilir [9].



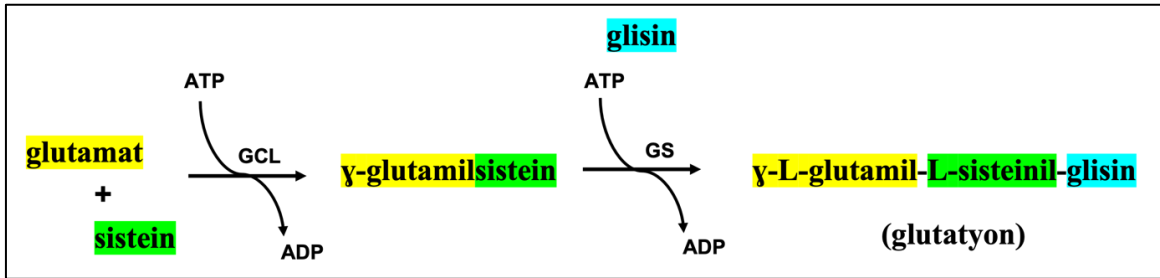
Şekil 2.1. İndirgenmiş glutatyonun kimyasal yapısı



Şekil 2.2. Yükseltgenmiş glutatyonun kimyasal yapısı

Glutatyonun hücresel sistemi oldukça karmaşıktır ve tam olarak anlaşılmayan karmaşık bir sinyal ağı içerir. Farklı sinyaller (reaktif oksijen ve azot türleri, antioksidan moleküller, hormonlar) ve tek başına veya birçok farklı sinyalleşme ağıyla birlikte çalışan farklı mekanizmalar karmaşıklığı artırır.

Temel olarak glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinin birleşmesiyle tripeptit glutatyonu (GSH) oluşur. Başlangıçta sistein, glutamat sistein ligazın (GCL) vasıtasıyla glutamat ile birleşerek γ-glutamilsistein oluşturur. Bunun ardından sentezlenen γ-glutamilsistein, glutatyon sentaz (GS) vasıtasıyla glisine bağlanmaya devam eder.



Şekil 2.3. Glutatyon sentezi

Genel olarak ATP (Adenozin trifosfat), glisin ve glutamat sisteine göre bol miktarda bulunur. Bu nedenle sistein konsantrasyonu glutatyon sentezini sınırlama eğilimindedir. Serbest sistein, hücre dışı ortamda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit ile sistine kolayca oksitlenir, bu nedenle glutatyon depolanması avantajlıdır. Sistein mevcut olduğunda, γ -glutamilsistein sentetazın (γ -GCS) etkisinin glutatyon biyogenezinde hız azaltıcı olduğu bilinmektedir [10]. Glutatyonun kendisi, γ -GCS' yi geri dönüşümlü olarak inhibe edebilir, bu da hücre içindeki glutatyon seviyelerini kontrol eden bir geri bildirim mekanizmasını kuvvetle önermektedir [11]. Bitkiler dışındaki ökaryotlarda glutatyon sentezi sitozolik bir süreçtir. Bitkilerde, γ -GCS enzimi sadece plastidlerde bulunur ki plastidler kloroplastların en önemli örneği olan bitkilere özgü organeller olup glutatyon sentetaz ise hem sitosol hem de plastidlerde lokalizedir.

Sistein içeren birçok molekül gibi glutatyon da kolayca yükseltgenir; GSSG oluşturmak üzere iki glutatyon molekülü arasında bir disülfid köprüsü oluşur. Dimer oluşumu, ROS bir GSH molekülüne bir elektron verdiğinde, glutatyon özellikle tiyollere karşı reaktif hale gelir. Hücredeki en bol tiyol genellikle glutatyondur, bu nedenle dimer oluşumu tercih edilir.

Glutatyonun bitkilerdeki önemi

GSH bitkilerde önemli bir antioksidan moleküldür. Bitki gelişimini ve abiyotik ve biyotik çevreye verilen tepkileri düzenlemede rol oynar ve hücreler içindeki milimolar derişim düzeyinde bulunur.

GSH'nın biyolojik fonksiyonları temel olarak sistein sülfür grubunun tersinir redoks reaksiyonları ile ilgilidir, bu da iki GSH molekülünün bir disülfid bağı yoluyla bağlandığı indirgenmiş halinin ve yükseltgenmiş halinin bir arada bulunmasıyla sonuçlanır [12].

GSH ayrıca, GSH polimerleri olan fitoşelatinlerin oluşumu yoluyla bitkileri ağır metallere karşı korur [13].

2.2. Bitkilerde Antioksidan Sistemler

Genetik mühendisliğine göre enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların artan aktiviteleri sayesinde abiyotik strese karşı toleransı artırma açısından önemli sonuçlar ortaya konulmuştur [14].

Süperoksit dismutaz, katalazlar, glutatyon peroksidazlar, askorbat peroksidaz, glutatyon redüktaz ve enzimatik olmayan antioksidanlar gibi çeşitli antioksidan enzimler ile askorbik asit, glutatyon ve karotenoidler gibi enzimatik olmayan antioksidanlar, hücre içerisindeki stresle mücadelede önemli bir rol oynar hayatta kalmasında kritik bir rol oynar [15]. Bunun sonucunda bitkiler, enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar aracılığıyla oksidatif stresle mücadele eder [16].

2.2.1. Reaktif oksijen türleri

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren herhangi bir tür olarak tanımlanır. Reaktif oksijen türleri (ROS), hem süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($RO_2^{\cdot}$) hidroperoksil ($HO_2^{\cdot}$) radikalleri gibi oksijen radikallerini hem de kolayca radikallere dönüşebilen hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloröz asit ($HOCl$) ve ozon (O_3) gibi bazı radikal olmayan oksitleyici ajanları içeren bir terimdir [17]. Reaktif oksijen türleri aslında hücrenin normal metabolizmasının bir parçasıdır, ancak üretilen ROS ile atılan ROS arasındaki denge bozulduğunda zararlı etki gerçekleşir [18].

Abiyotik stresle ilişkili olan oksidatif stres, toksik reaktif oksijen türlerinin aşırı üretiminden kaynaklanmaktadır. Abiyotik stres ise bitkinin büyümesini, gelişmesini ve nihayetinde verimini ciddi şekilde etkilemektedir [16].

Bitki öldürücü olarak bilinen pestisitler de reaktif oksijen türlerinin oluşmasına ve antioksidanların yok olmasına neden olmaktadır [19].

2.2.2. Oksidatif stres

Düşük veya yüksek sıcaklık, besin eksikliği, tuzluluk, kuraklık, yüksek veya düşük sıcaklık ve yüksek ışık gibi çeşitli çevresel stresler, bitkilerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu tetikler [20].

Oksijen gereksinimi, solunum işlemi sırasında reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açar. Örneğin süperoksit radikal anyonu, mitokondride solunum yolundan geçen serbest elektronlar veya fotosentetik organizmaların kloroplastlarındaki fotosentetik yol arasında endojen olarak oluşturulabilir. Aerobik organizmalar bu nedenle kendilerini oksidatif hasarlardan korumak için mekanizmalara ihtiyaç duyarlar ve çok çeşitli antioksidanlara dayanan etkili koruyucu ağlar geliştirmişlerdir [21, 22].

Farklı ROS tipleri arasındaki ortak görülen özellik proteinlere, DNA'ya ve lipitlere oksidatif hasara neden olma kapasiteleridir. ROS' un bu sitotoksik özellikleri, bitkilerdeki enzimatik detoksifikasyon mekanizmalarının karmaşık dizilerinin değişiklikleri açıklar. ROS ayrıca gelişme ve patojen savunma yanıtlarının düzenlenmesinde yer alan bitkilerde sinyal molekülleri olarak işlev görür [23].

Reaktif oksijen ve azot türlerinin kendilerinin büyüme, hücre döngüsü, patojen savunma, gelişme ve programlanmış hücre ölümü gibi hayati süreçlerin düzenlenmesinde rol oynadıkları bilinmektedir [24].

2.3. Enzimlerin Doğası

Enzimler, canlı organizmalarda biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörler olup biyokatalizörler olarak da bilinirler. Ayrıca hücrelerden ekstrakte edilebilir ve daha sonra ticari olarak önemli çok çeşitli işlemleri katalize etmek için kullanılabilir.

19. yüzyılın sonlarında ve 20. yüzyılın başlarında birçok enzimin ekstraksiyonu, karakterizasyonu ve ticari eldesinde önemli ilerlemeler kaydedildi. 1920'lere kadar enzimler kristalleştirildi, bu da katalitik aktivitenin protein molekülleri ile ilişkili olduğunu ortaya koydu. 1980'lerde bazı ribonükleik asit (RNA) moleküllerinin de katalitik etkiler

gösterebildiği ortaya çıktı. Ribozimler olarak adlandırılan bu RNA'lar, gen ekspresyonunda önemli bir rol oynamaktadır [25].

Tüm enzimler canlı organizmalardan kaynaklanır. Enzimleri elde edebilmenin geleneksel yolu, organizmaları yetiştirerek daha sonra enzimleri bir şekilde bitkilerin belli kısımlarından, hayvan organlarından, mikroorganizmaların içinden veya yakın çevrelerinden izole etmektir [26].

2.3.1. Enzim mekanizması

Enzim katalizli reaksiyonlar genellikle üç aşamada tanımlanır:



ES kompleksi, substratın (S) enzime (E) bağlandığı, reaksiyonun daha uygun hale getirileceği bir konumu temsil eder. Reaksiyon meydana gelir gelmez ürün molekülü (P) enzimden ayrılır ve bu daha sonra başka bir substrat molekülüne bağlanmakta serbesttir. Bu işlem sırasında bir noktada substrat, bir ara forma (genellikle geçiş durumu denir) ve sonra ürüne dönüştürülür.

Enzimin reaksiyon hızını arttırmak için hareket ettiği kesin mekanizma bir sistemden diğerine farklılık gösterir. Bununla birlikte genel ilke, substratın enzime bağlanarak, substratı içeren reaksiyonun, reaksiyonun aktivasyon enerjisinin düşürülmesiyle daha uygun hale getirilmesidir [25, 27].

2.3.2. Enzim inhibitörleri

Enzimlerin katalitik aktivitesini inhibe eden kimyasal ajanlar vardır. Bazıları enzimdeki temel bölgelere veya fonksiyonel gruplara bağlanarak etkilerini gösterirler.

Tersinmez inhibitörler

Bu inhibitörler, enzim molekülünde katalitik kapasitesinde kesin bir değişikliğe neden olan kalıcı değişiklikler üretir. Bu inhibitörlerlere örnek olarak organofosfatlar, böcek öldürücüler olarak kullanılan kimyasallar gösterilebilir.

Tersinir inhibitörler

Üç tip geri dönüşümlü inhibitör vardır: yarışmalı, yarışmasız ve yarı yarışmalı.

Yarışmalı inhibitörler, Michaelis sabitinin (K_m) değerini arttırırken enzimin maksimum hızını (V_{max}) değiştirmez. Bu etkiler farklı mekanizmalarla elde edilir: Bazı durumlarda inhibitör, substrat ile yapısal benzerliğe sahiptir ve enzimdeki aktif bölge için rekabet eder.

Yarışmalı inhibitörlerin farmakolojik uygulaması vardır. Bazı güçlü antibakteriyel kemoterapötik ajanlar rekabetçi inhibitörlerdir. Katalitik merkezden farklı bir yerde enzime bağlanan yarışmasız inhibitörler olup V_{max} 'ı azaltırlar, K_m 'den ve $[S]$ 'den etkilenmezler. Yarı yarışmalı inhibitörler ise K_m ve V_{max} 'ı azaltır [28].

2.3.3. Enzim aktivitesi

Enzim ünitesi

En çok kullanılan enzim aktivitesi birimi unit (U)'dir. 1 U enzim aktivitesi, optimal koşullarda 1 dakikada 1 μ mol substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder.

Spesifik aktivite

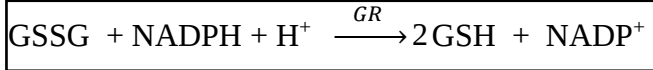
Numunede bulunan miligram protein başına enzim birimleridir. Molar aktivite veya devir sayısı, substrat doygunluğu koşulları altında enzim molekülü başına birim zaman başına ürüne dönüştürülen substrat molekülleridir.

Molar aktivite

Tek bir enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne dönüşen substrat moleküllerinin sayısı olarak bilinmektedir.

2.3.4. Glutasyon redüktaz enzimi

Glutasyon redüktaz, yükseltgenmiş glutasyonu indirgenmiş forma geri dönüştüren ve NADPH'yı indirgeyici olarak kullanan önemli bir enzimdir [16].

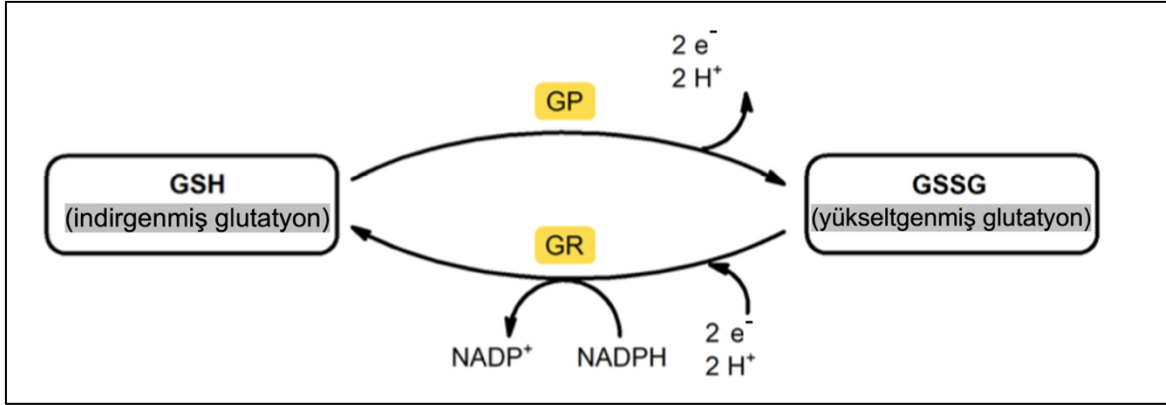


Şekil 2.4. GR enziminin katalizlediği tepkime

GR enzimi; bakteri, maya, bezelye, buğday tohumunda, ıspanakta hemen hemen tüm hayvan dokularında, eritrositlerde, trombositlerde ve insan serumunda tespit edilmiştir. E. coli ve bitkilerde bulunan glutasyon redüktaz flavoproteinlerdir [29, 30].

Bu enzim doğada yüksek oranda korunmaktadır ve E. coli, S. cerevisiae ve Homo sapiens'ten üç boyutlu yapıları arasında yüksek derecede benzerlik gösterir [31].

GR ağırlıklı olarak kloroplastta bulunur. Bununla birlikte, mitokondri, sitozol ve peroksizomlarda az miktarda enzim izoformları da bulunur [32]. Yapraklarda, GR aktivitesinin büyük kısmı kloroplastta bulunurken, kök plastidleri daha düşük oranda enzim hücresel aktivitesi sergiler [33]. Yaprak dokularındaki GR aktivitelerinin yaklaşık %80' i kloroplastik izoformlar tarafından açıklanmaktadır [32].

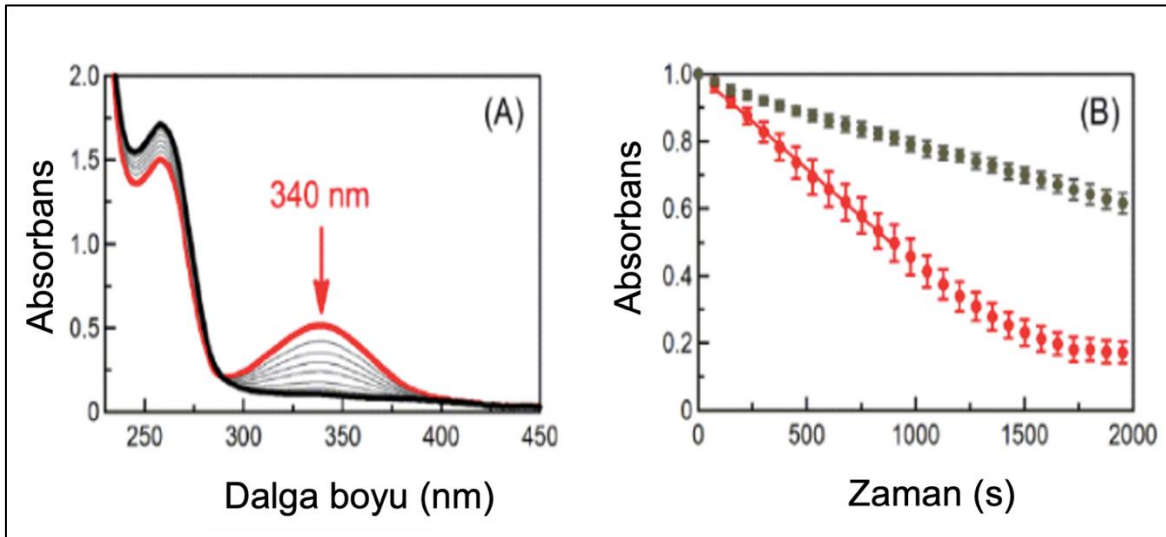


Şekil 2.5. Glutatyon peroksidaz (GP) ve glutatyon redüktaz (GR) tarafından katalize edilen GSH:GSSG reaksiyonu

Şekil 2.5’de görüldüğü gibi hücre içerisinde GSH, GP katalizörlüğünde $2 e^-$ vererek GSSG’e dönüşebilirken GSSG, GR enzimi ile $2 e^-$ alarak GSH’a dönüşebilmektedir [34].

2.3.5. Glutatyon redüktaz enzimi aktivite tayin yöntemleri

Glutatyon redüktaz aktivitesinin belirlenmesi için en yaygın şekilde kullanılan klasik yöntem, 340 nm’de NADPH derişiminin spektrometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. [6, 35]



Şekil 2.6. Glutatyon redüktaz içeren reaksiyon karışımının spektral değışimi (A) 340 nm’de izlenen zamana karşı absorpsiyon değışimi (B)

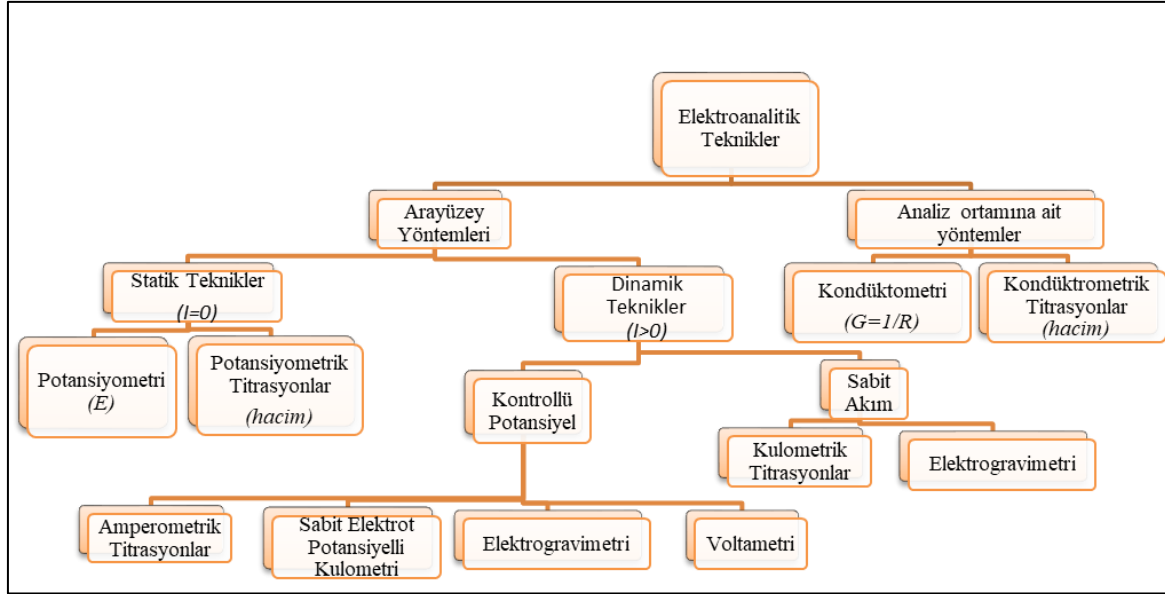
Bunun yanında, GR aktivitesini tayin edebilmek için literatürde raman spektroskopisi, yüzey plazmon rezonansı, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez, floresans spektroskopisi ve elektrokimyasal yöntemler gibi birçok teknik uygulanmıştır. Son yıllarda, GR aktivitesini tespit etmek için elektrokimyasal yöntemlerin kullanılması gelişmektedir [36].

2.4. Elektrokimyasal Yöntemler

Elektrokimyasal yöntemler, analizi yapılacak maddenin indirgenme ve yükseltgenme olaylarını inceleyen yöntemlerdir.

Ölçümler, numunenin ve en az iki elektrotun yerleştirildiği bir elektrokimyasal hücrede yapılır. Yöntemler sulu numunelerin analizinde kullanılabildiği gibi susuz çözeltilere ve gazlara da uygulanabilir. Yöntemlerin çoğunda voltaj, akım, direnç veya yük gibi derişime bağı bir elektrik parametresi ölçülürken diğ er parametreler sabit tutulur.

Elektrokimyasal yöntemlerin avantajları, yöntemlerden bazıları oldukça spesifikdir ve bu nedenle sadece ilgilenilen türleri tespit etmek için kullanılabilir. Diğ er yöntemler oldukça spesifik değildir, ancak iletkenlik ölçümlerinde iyonik türler gibi yalnızca belirli bileşik türlerini saptamak için avantaj sağlamak için kullanılabilir [37]. Bu yöntemlerin en önemli avantajlarından biri ise elektrokimyasal yöntemlerin çoğunlukla bir elementin, o yükseltgenme veya indirgenme basamağına özgü olmasıdır. Bu sayede aynı elementin farklı basamaklarına sahip bir karışım da her bir türün derişiminin tayini yapılabilmektedir.



Şekil 2.7. Elektroanalitik tekniklerin sınıflandırılması

2.4.1. Voltametri

Bir elektrolitik hücreye potansiyel uygulanmasıyla ortamdaki reaktif türlerin elektrokimyasal davranışından oluşan akımın ölçülmesi işlemine genel olarak voltametri adı verilir.

Voltametriyi diğer elektrokimyasal yöntemlerden ayıran bazı temel özellikler vardır. Elektrogravimetri ile kulometri gibi yöntemlere göre voltametri, derişim polarizasyonunun etkilerini en aza indirmek için gereken önlemlerin alınması yönünden farklılıklar gösterirken aynı zamanda voltametri yöntemi kullanılarak analit en az miktarda harcanmış olur. Voltametrizde ölçüm, tam derişim polarizasyonu şartlarında oluşan akımın ölçülmesine dayanırken potansiyometrik ölçümler akımın sifıra yaklaştığı ve polarizasyonun gerçekleşmediği şartlarda yapılmaktadır.

Voltametrik bir hücre genel olarak; cam, kuartz veya teflon olabilen bir voltametrik kap içerisinde bulunan destek elektrolit, çalışma elektrodu (CE), karşılaştırma elektrodu (referans elektrot) ve yardımcı elektrot (karşıt elektrot)'tan oluşmaktadır.

Kullanılan destek elektrolit deney sürecinde elektro aktif olmayan bir çözelti olup hidrodinamik voltametrde iyonların elektrik çekiminde ötürü göç etmelerini önlemek için ortama ilave edilmektedir.

Çalışma elektrodu

Voltametrde kullanılan çalışma elektrotları; cıva kökenli elektrot, katı elektrot, modifiye elektrot, dönen elektrotlar olarak bilinmektedir. Polarlanmanın olabilmesi için kullanılan çalışma elektrotları mikro elektrotlardır. Kullanılan mikro elektrotlar sayesinde numunede bulunan elektroaktif türlerin yalnızca küçük bir bölümü elektrokimyasal tepkimeye girdiği için numunedeki bileşim neredeyse çözeltinin her yerinde aynı kalmaktadır.

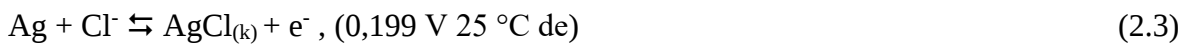
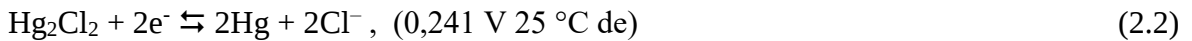
Çalışma elektrotu ile referans elektrot arasında belli bir potansiyel uygulanırken, çalışma elektrotu ile karşıt elektrot arasındaki akım kaydedilir.

Cıva Elektrotlar

Cıva elektrotlar; her damlada kendiliğinden yenilenen elektrot yüzeyine sahip olup, geniş bir katodik çalışma potansiyel aralığı sunması sebebiyle voltametrde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Cıva film elektrot, asılı cıva damla elektrodu, damlayan cıva elektrot ve durgun damla elektrot olmak üzere birkaç türden oluşmaktadır.

Karşılaştırma elektrodu (referans elektrodu)

Küçük akım şiddetlerinde polarlanmayan artan akım şiddeti ile ideallikten sapan karşılaştırma elektrotları, voltametrik sistemlerin önemli bileşenlerinden biridir. En yaygın kullanılan referans elektrotları kalomel veya Ag/AgCl elektrotlarıdır.

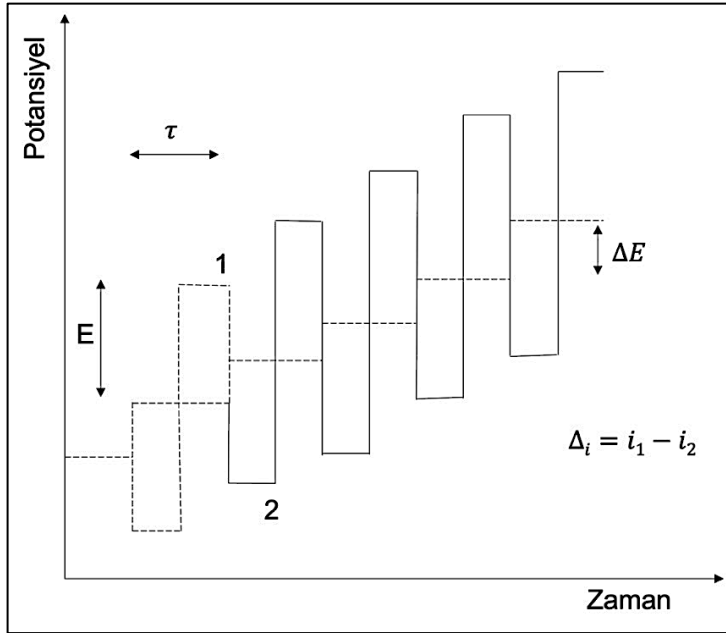


Bir referans elektrotun iyi olarak nitelendirilebilmesi için; tersinir olup Nernst eşitliğine uyması, sıcaklık ile önemli derecede değişmemesi, zamandan bağımsız olarak sabit

potansiyel veren, az miktarda akım sonrasında dahi kısa sürede eski haline dönebilmesi gereklidir.

Kare dalga voltametrisi

Kare dalga voltametrisi (SWV) çok hızlı ve duyarlı bir puls voltametrisi yöntemidir. SWV kullanılarak elde edilen voltamogramlar 10 ms'den daha az bir sürede elde edilir. Çalışma elektrodu olarak cıva elektrodu ile kullanılabildiği gibi kromatografik dedektörlerle de beraber kullanılabilen bir yöntemdir.



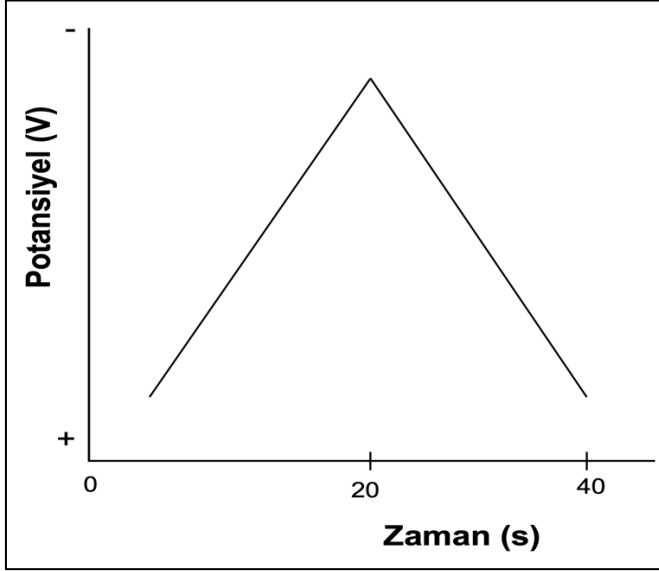
Şekil 2.8. Bir SWV yönteminde uyarma potansiyelinin oluşumu ve elde edilen basamaklı sinyal

Dönüşümlü voltametri

Dönüşümlü voltametri (CV), moleküler türlerin indirgenme ve yükseltgenme özelliklerini saptamak için kullanılan popüler bir elektrokimyasal tekniktir. CV, elektron transferi ile başlatılan kimyasal reaksiyonları incelemek için de oldukça önemlidir [38].

Burada akım, potansiyelin seçilen sınırlar arasında (pozitiften negatife ve negatiften pozitif) ileri geri taranmasıyla kaydedilir. CV, elektrotun kapasitif davranışını tahmin ederek

maddenin yükseltgenme ve indirgenme potansiyeli bulmaya imkân sağlamaktadır. Ayrıca CV yardımıyla maddenin elektrokimyasal davranışı hakkında bilgi edinilir [39].



Şekil 2.9. CV’de uygulanan potansiyelin zamanla değişim grafiği

Sıyırma voltametrisi

Sıyırma voltametrisi (SV), voltametrinin bir alt bölümünü ve elektroanalitik yöntemlerdeki en önemli teknik gruplarından birini oluşturur. SV'nin en büyük avantajı, analitin çalışan elektrot üzerinde veya içinde biriktiği bir ön biriktirme aşamasının sonucu olan son derece düşük gözlenme sınırına sahiptir. Sonraki sıyırma adımında, önceden biriktirilen analit solüsyona geri sıyırılır. Gözlemlenen akım numunedeki analit derişimi ile orantılı olur.

Anodik sıyırma voltametrisi (ASV) ve katodik sıyırma voltametrisi (CSV), SV'nin iki farklı versiyonudur ve ön biriktirme ile sıyırma adımlarının doğası bakımından farklılık gösterir. ASV'de, katodik bir ön biriktirme adımı gerçekleştirilir, bunu daha pozitif potansiyellere doğru bir potansiyel taraması izler ve anodik yani oksidatif akımlar belirlenir. CSV'de ise, anodik bir ön biriktirme adımı gerçekleştirilerek daha negatif potansiyellere doğru bir potansiyel taraması izlenir ve sonucunda katodik akımlar belirlenir. [40]

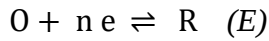
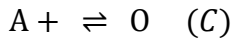
2.5. Elektrokimyasal Özelliklerin İncelenmesi

2.5.1. Maddenin elektrokimyasal indirgenme mekanizmasının tayini

Elektron transferiyle gerçekleşen kimyasal ve elektrokimyasal reaksiyonların varlığının tespiti için genellikle ilk mekanizma çalışmaları CV ile yapılmaktadır.

CE (kimyasal-elektrokimyasal) mekanizması

Elektro aktif maddenin, elektron aktarım basamağından daha önce oluşmasına yol açan mekanizma CE mekanizması olarak bilinmektedir.

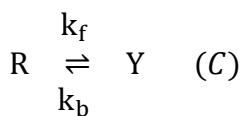
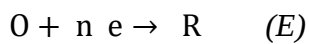


Böyle bir CE mekanizmasında C basamağının hızı çok yavaştır.

- Bir elektrokimyasal reaksiyon CE mekanizmasına göre yürüyorsa; tarama hızı arttıkça $\dot{I}_p / v^{1/2}$ azalmaktadır.
- $|\dot{I}_a / \dot{I}_p|$ oranı tarama hızı ile artar ve bu oran ≥ 1 olmalıdır.

EC (elektrokimyasal-kimyasal) mekanizması

Elektron aktarım basamağının ardından bir kimyasal reaksiyon meydana gelen mekanizmalara EC mekanizması denir.



- $|\dot{I}_k / v^{1/2}|$ oranı v arttıkça çok az da olsa azalır.
- $|\dot{I}_a / \dot{I}_k| < 1$ 'dir. Ancak v arttıkça 1'e yaklaşır.

ECE (elektrokimyasal-kimyasal-elektrokimyasal) mekanizması

İlk indirgenmenin ardından oluşan R maddesi bir kimyasal reaksiyon sonucunda tekrar indirgenebilen O maddesine dönüşmektedir.

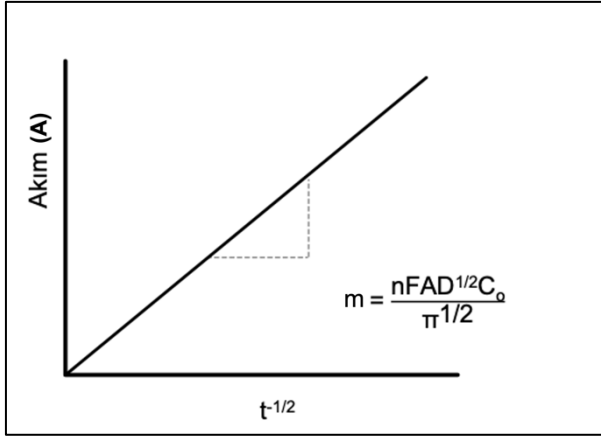
- $.102|\dot{I}_a / \dot{I}_k|$, artan tarama hızı ile artar ve yüksek tarama hızlarında 1'e yaklaşır.
- $\dot{I}_k / v^{1/2}$ değeri, tarama hızı ile değişir. Ancak yüksek ve düşük tarama hızlarında limit değere ulaşarak düşük tarama hızında $\dot{I}_k / v^{1/2}$ oranı, yüksek tarama hızında $\dot{I}_k / v^{1/2}$ oranından büyüktür.

2.5.2. Maddenin yükseltgenme veya indirgenmesi esnasında transfer edilen elektron sayıları ve difüzyon katsayılarının tayini

Kronoamperometri ile maddenin yükseltgenme veya indirgenmesi sırasında transfer edilen elektron sayısı ile difüzyon katsayısı tayin edilebilmektedir. Kronoamperometrinin temelini çalışma elektrotu ile referans elektrot arasına uygulanan sabit potansiyelde, akımın zaman ile değişiminin incelenmesi oluşturmaktadır. Bu akım-zaman ilişkisi ise Cottrell eşitliği ile verilmektedir.

$$\dot{I} = \frac{n F A D^{1/2} C_0}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (2.4)$$

($\dot{I}$: akım, n : elektron sayısı, F : faraday sabiti (96485 C/mol), A : elektrodun yüzey alanı (cm²), C_0 : indirgenen analitin molaritesi, D : difüzyon sabiti (cm²/s), t : zaman (s))



Şekil 2.10. Zamanın kareköküne karşı akım grafiği

Cottrell eşitliğinden de görüldüğü gibi akım, zamanın karekökü ile ters orantılıdır. Zamanın kareköküne karşı akım grafiği çizilirse eğim Cottrell eşitliğini verir.

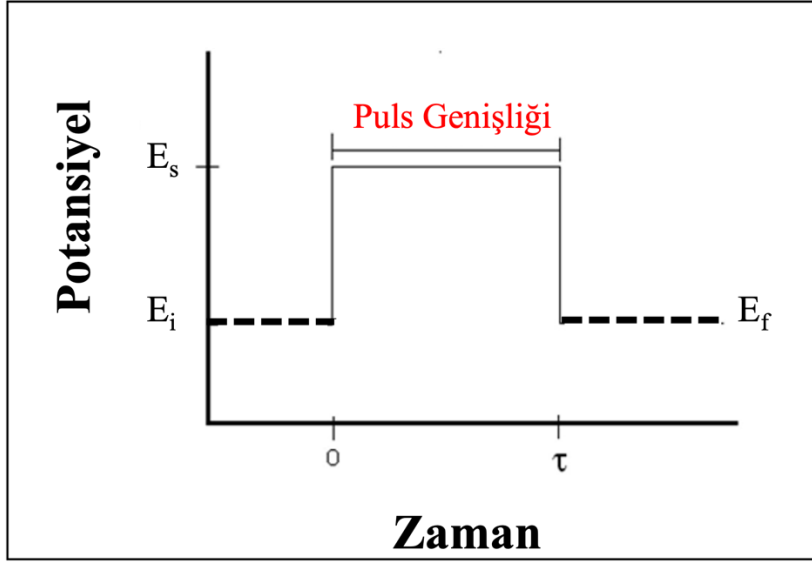
Ultra mikro elektrot (10 μm yarıçaplı platin elektrot) kullanılarak belirlenen sınır akımını veren eşitlik aşağıdaki gibi türetilmiştir.

$$\dot{I}_{ss} = 4 r n F C_0 D_0 \quad (2.5)$$

$$n = \frac{\dot{I}_{ss}}{4 r F C_0 D_0} \quad (2.6)$$

Eşitlik 2.4'teki Cottrell eşitliğinde verilen 'n' yerine yukarıda türetilen eşitlik yazılarak yeni bir eşitlik türetilir. Türetilen bu yeni eşitlikten difüzyon katsayısı hesaplanır.

$$S = \frac{\dot{I}_{ss} A}{4 r \pi^{1/2} D_0^{1/2}} \quad (2.7)$$



Şekil 2.11. Kronoamperometrik yöntemlerde çalışma elektrotuna uygulanan potansiyelin zaman ile değişim grafiği (E_i : başlangıç potansiyeli, E_s : basamak potansiyeli, E_f : bitiş potansiyeli, τ : sabit potansiyelde bekletilen süredir.)

Bir diğer yöntem ise elektrot yüzeyinde meydana gelen heterojen reaksiyonlarda aktarılan elektron sayısı, Baranski ve arkadaşlarının kullandığı tekniğe göre hesaplanabilmektedir. Baranski ve arkadaşlarının tekniğine göre aktarılan elektron sayısı ve difüzyon katsayısı, bir ultra mikro elektrot (UME) kullanılarak hesaplanabilmektedir [41]. Kullanılan bu teknik, mikro elektrotun yüzey alanını hesaplamaya gerek duyulmaması sebebiyle üstünlük taşımaktadır.

Baranski ve arkadaşları, Cottrell eşitliğini yükseltgenen veya indirgenen elektron sayısı bilinen bir madde için yeniden düzenleyerek aşağıdaki eşitlikleri türetmiştir.

$$n = \frac{n_s S^2 i_s C_s}{S_s^2 i C} \quad (2.8.)$$

$$D = \frac{D_s S_s^2 i^2}{S^2 i_s^2} \quad (2.9.)$$

(n : elektro aktif bileşiğin aktarılan elektron sayısı, S : Cottrell eğimi, C : derişimi (mol/cm^3), i : UME' deki sınır akımı, D : difüzyon katsayısı; n_s : standart olarak kullanılan ferrosen bileşiğinin elektron sayısı, S_s : Cottrell eğimi, i_s : UME' deki sınır akımı, D : difüzyon katsayısıdır.)

Standart olarak kullanılan ferrosen kullanılmasının avantajı, ferrosen bileşiğinin iyi çözünür olmasının yanı sıra net bir şekilde 1 elektronluk indirgenme verdiğinin bilinmesidir.

2.5.3. Adsorbsiyon kontrollü reaksiyonun belirlenmesi

Elektrokimyasal davranışları incelenen maddelerin, CV kullanılarak alınan voltamogramlarından, difüzyon ya da adsorpsiyon kontrollü olduğu anlaşılabılır.

Elektrokimyasal analizlerde kütle aktarımının sadece difüzyon ile gerçekleştiği varsayılırsa, ‘O’ ve ‘R’ türleri için Fick yasaları geçerlidir. Böyle durumlarda pik akımı (i_p) Randles-Sevcik Eşitliği ile verilmektedir.

$$i_p = 0.4463 n F A \left(\frac{nF}{RT} \right)^{1/2} C_o^\infty D^{1/2} v^{1/2} \quad (2.10.)$$

25 °C’de için türetilen eşitlik:

$$i_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A C_o D^{1/2} v^{1/2} \quad (2.11)$$

A: elektrodun yüzey alanı (cm^2), n: aktarılan elektron sayısı, C_o : elektroaktif türün başlangıçtaki derişimi (mol/cm^3), v: tarama hızı (V/s)

Fick yasalarından türetilen eşitliğinin en önemli göstergelerinden biri, pik akımının tarama hızının kareköküyle doğru orantılı olarak değişmesidir. Eğer analit, elektrot yüzeyine adsorbe oluyor ise CV’de pik akımı tarama hızının karekökü ile orantılı olarak değişmez.

Difüzyon pikinden önce veya sonra gözlenen bir pik, olayda kuvvetli bir adsorpsiyon varlığına işaretler. Adsorpsiyonun şiddetli olmaması halinde adsorpsiyon olup olmadığını anlamak için kullanılan yöntemle göre, $\log i_p$ değerleri, $\log v$ ’ye karşı grafiğe geçirilir. $\log i_p$ ’nin $\log v$ ile değişiminin eğimi 0,5 ise difüzyon kontrollü olduğu saptanmış olur.

2.6. Literatür Araştırması

Yapılan bir çalışmada GR enzim aktivitesini tayin için Raman Spektroskopisi kullanılmıştır. Bu çalışmada iki karakteristik Raman bandının yani GSH ve GSSG’den kaynaklanan 1051 cm^{-1} (C – N gerilmesi) bandı ve 509 cm^{-1} (S-S germe) bandının yoğunluk oranı kullanılarak

indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon arasındaki dönüşüm nicel olarak belirlenerek aktivite tayini yapılmıştır [42].

Aynı zamanda literatürde biyomoleküler etkileşimleri eş zamanlı olarak analiz edebilme imkânı veren Yüzey Plazmon Spektroskopisi (SPR) gibi farklı teknikler de aktivite tayininde kullanılmıştır [43].

Farklı bir çalışmada enzim aktivitesi hesabı için, kapiler elektroforez kullanılarak elektrokimyasal tespiti sağlanmıştır [44].

Kolorimetrik deneyler de GR aktivitesini belirlemek için NADPH derişimi ile absorbands değişikliğine dayanan yöntemler olarak en sık kullanılan yöntemlerdir [45]. Bu yöntemle geliştirilen bir çalışmada altın nano-parçacıkların kararlılığını arttırmak için GSH özelliğini kullanarak GR aktivitesini tespit etmek için yeni bir yöntem geliştirilmiştir [46].

Floresans spektroskopisi ile yapılan bir çalışmada tiyol seçici prob geliştirilerek, GR enzimi ve NADPH varlığında floresansı ve kolorimetrik yöntemle GSSG/GSH oranı belirlenebilmiştir. Geliştirilen yeni prob ile oksidatif stresin bir ölçüsü olan GR enziminin aktivitesinin belirlenebildiği bildirilmiştir [47].

Pirinçten elde edilen enzim tayininde ise Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Bu çalışmada GR enzimi ile beraber Süperoksit dismutaz (SOD) ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) gibi enzimlerin aktiviteleri de HPLC ile belirlenmiştir [48].

Yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik gibi birçok avantaj yukarıdaki yöntemle birlikte ortaya çıkmıştır. Öte yandan spektroskopik ve kromatografik yöntemlerin uygulanma prosedürlerinin zaman alıcı ve karmaşık olması gibi bazı dezavantajları da vardır. Bu nedenle, GR aktivitesini tespit etmek için uygun ve hassas bir yöntem geliştirmek büyük önem taşımaktadır. Bu noktada yapılan elektrokimyasal çalışmalar son yıllarda gelişmekte olup kullanım alanı bulmuştur.

Yapılan bir çalışmada kare dalga voltametrisi ve karbon nanotüpler (CNT–SPE) ile yüzey baskılı modifiye edilmiş bir elektrot kullanarak indirgenmiş ve toplam GSH miktarını belirlemek için elektroanalitik yöntem geliştirilmiştir [49].

Altın-karbon içeren bir elektrot (AuCE), üzerindeki indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyonun elektrokimyasal davranışını, bir elektrokimyasal hücreden oksijenin uzaklaştırılması için sodyum sülfid eklenmesi gibi farklı yöntemlerle katodik voltametri kullanılarak incelenmiştir [50].

GSH tayini için yapılan başka bir elektrokimyasal çalışmada camı karbon elektrotun (GCE) yüzeyinde, formazon bileşiği kullanarak fonksiyonelleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT) ile GSH elektrokimyasal olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, bu modifiye edilmiş GCE' nin glutatyon oksidasyonu için elektrokatalitik olarak çok aktif olduğunu göstermiştir [51].

Başka bir çalışmada elektro-birikimli nikel oksit nanopartiküller (NiONP'ler) ile modifiye edilmiş camı karbon (GC) elektrotu kullanılarak glutatyonun (GSH) elektrokimyasal tayini yapılmıştır [52].

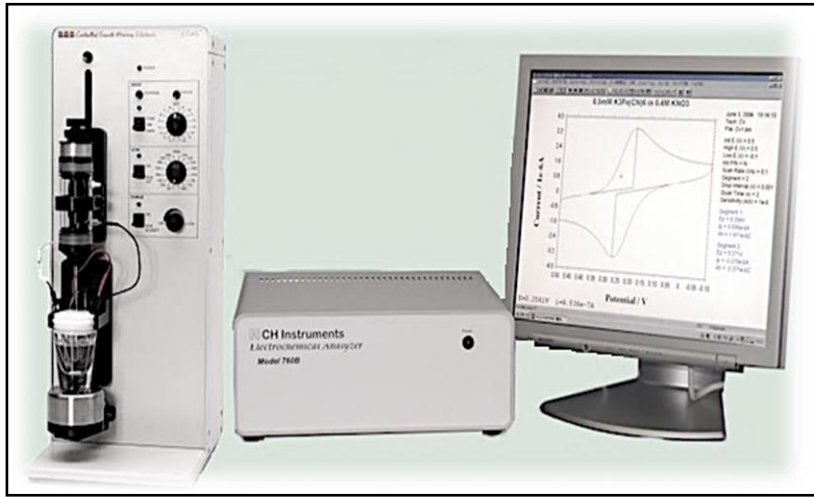
Literatürde GSH'ın doğrudan tayini için çok sayıda spektrofotometrik ve elektrokimyasal çalışma olmasına karşın GR enziminin aktivitesinin tayini için az sayıda çalışma mevcuttur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

3.1.1. Potansiyostat cihazı

Elektroanalitik deneyler, Chi760d voltametri cihazı, BAS marka CGME model hücre standı ve bilgisayardan oluşan sistem ile gerçekleştirilmiştir.



Resim 3.1. Potansiyostat cihazı

3.1.2. pH metre

Deneylerde pH ölçümleri Mettler-Toledo-S210 pH metre ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.3. Ultra saf su cihazı

Deneylerde Innovation ultra saf su cihazı kullanılmıştır. Bu cihazdan $0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$ iletkenliğinde ultra saf su elde edilmiştir.

3.1.4. Analitik terazi

Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin tartımları 0,1 miligram duyarlıklı Radwag-AS 220.R2 analitik terazi ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.5. Yüksek devirli soğutmalı santrifüj

Ispanaktan GR enziminin izole edilmesi işlemi için deneylerde Sigma-3K30 Yüksek Devirli Soğutmalı Santrifüj kullanılmıştır.

3.1.6. Elektrotlar

Standart gümüş/gümüş klorür elektrot

Bu çalışmada gümüş/gümüş klorür elektrot (3,5 M KCl) referans elektrot olarak kullanılmıştır. Bu elektrotun potansiyeli 25°C’ da 0,199 V’ dur.



Resim 3.2. Standart gümüş/gümüş klorür elektrot

Karşıtlı elektrot

Karşıtlı elektrot olarak platin tel kullanılmıştır.



Resim 3.3. Platin tel

Çalışma elektrodu

Kare dalga voltametrisinde damlayan cıva damlası elektodu kullanılmış olup sıyırma voltametrisinde ve dönüşümlü voltametri çalışmalarında ise asılı cıva damla elektrodu kullanılmıştır.

Ultra mikro elektrot çalışma elektrodu

Ultra mikro elektrot (10 μm yarıçaplı platin elektrot) kullanılarak GSH için yapılan kronoamperometrik çalışmada Cottrell eğimi hesaplanmıştır.



Resim 3.4. Ultra mikro elektrot

3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Aktivite tayini için deneylerde kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.1.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddelerin listesi

Adı	Markası	Katalog Numarası	Saklama Şartları
EDTA, Dipotasyum tuzu	Sigma	ED2P	Oda sıcaklığında
Polivinil prolidon	Sigma	P-6755	Oda sıcaklığında
Yükseltgenmiş Glutasyon, Disodyum Tuzu	Sigma	G-4626	-20°C
B-Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat, Tetrasodyum tuzu	Sigma	N-1630	-20°C
İndirgenmiş Glutasyon	Sigma	G4251-5G	2-8°C
Glutasyon Redüktaz Enzimi	Sigma	G3664-500UN	2-8°C

3.3. Numuneler, Reaktifler ve Çözeltilerin Hazırlanmaları

3.3.1. Elektrokimyasal analiz için hazırlanan çözeltiler

10⁻² M GSH çözeltisinin hazırlanması

Sigma marka indirgenmiş glutasyon katısından (307,32 g/mol) 30,7 mg alınarak ultra saf su içerisinde çözülerek hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

10⁻² M GSSG çözeltisinin hazırlanması

Sigma marka yükseltgenmiş glutasyon disodyum tuzundan (656,59 g/mol) 65,6 mg alınarak ultra saf su içerisinde çözülerek hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

2,5×10⁻³ M NADPH çözeltisinin hazırlanması

β-nikotinamid adenin dinükleotid fosfat tetrasodyum tuzundan (833,35 g/mol) 20,8 mg alınarak ultra saf su içerisinde çözülerek 10 mL'ye tamamlanmıştır.

Glutatyon redüktaz enzimi

Sigma marka 500 unit enzim çözeltisinden 100 μ L alınarak ultra saf su ile 5 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan 5 mL'lik çözeltide 27,4 unit enzim bulunmaktadır.

0,02 M (pH: 6,2) fosfat tamponun hazırlanması

0,032g NaH_2PO_4 (156,02 g/mol) ve 0,284g Na_2HPO_4 (177,99 g/mol) tuzları ultra saf su içinde çözülüp, hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

0,02 M (pH: 6,7) fosfat tamponun hazırlanması

0,032g NaH_2PO_4 (156,02 g/mol) ve 0,284g Na_2HPO_4 (177,99 g/mol) tuzları ultra saf su içinde çözülüp, hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Destek elektrolit olarak kullanılan 0,02 M (pH:7,2) fosfat tamponun hazırlanması

0,084 g NaH_2PO_4 (156,02 g/mol) ve 0,238 g Na_2HPO_4 (177,99 g/mol) tuzları ultra saf su içinde çözülüp hacmi 250 mL'ye tamamlanmıştır.

0,02 M (pH: 7,7) fosfat tamponun hazırlanması

0,269 g NaH_2PO_4 (156,02 g/mol) ve 0,076 g Na_2HPO_4 (177,99 g/mol) tuzları ultra saf su içinde çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.3.2. UV-GB spektroskopisi ile GR enzim tayin yöntemi için hazırlanan çözeltiler

3,4 mM EDTA içeren 100 mM (pH:7,6) fosfat tamponun hazırlanması

3,900 g NaH_2PO_4 tartılarak damıtık su ile 250 mL'ye tamamlandığında 100 mM'luk bazik çözelti elde edilmiş olur. 4,449 g Na_2HPO_4 tartılarak damıtık su ile 250 mL'ye tamamlandığında ise aynı derişimde asidik çözelti elde edilmiş olur. Bu iki çözelti kullanılarak pH metre yardımıyla pH istenilen değere ayarlanır. Hazırlanan 100 mL çözeltiye 0,126 g Na_2EDTA katısı eklenir.

30 mM GSSG çözeltisinin hazırlanması

Sigma marka yükseltgenmiş glutatyon sodyum tuzundan (656,59 g/mol) 98,48 mg alınarak ultra saf su içerisinde çözülerek hacmi 5 mL'ye tamamlanmıştır.

0,8 mM NADPH çözeltisinin hazırlanması

β -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat tetrasodyum tuzundan (833,35 g/mol) 3,33 mg alınarak 3,4 mM EDTA içeren 100 mM fosfat tamponu çözeltisi içerisinde çözülerek hacmi 5 mL'ye tamamlanır.

3.4. GR Enziminin Ispanaktan İzole Edilmesi

Yaklaşık olarak 100 g ıspanak tartılır. Öncelikle kirliliklerden arındırmak suretiyle önce çeşme suyu ile ardından damıtık su ile yıkanır. Ardından yaprakları saplarından ayrılarak yaprakları 0,5-1 cm uzunluğunda kesilir. Kesilen yapraklar bir havana konarak üzerini kapatacak kadar sıvı azot eklenir ve iyice ezilerek çok küçük parçalar elde edilir.

Elde edilen ıspanak parçalarının üzerine 100 mM 100 ml pH = 7,2 fosfat tamponu, 20 mg Na_2EDTA ve 1g polivinil prolidon (PVP) konularak 15000 rpm'de, +4 °C' de 20 dakika santrifüj edilir. Çökelek süzgeç kâğıdından süzülerek atılır. Elde edilen süzüntü tekrar 15000 rpm'de, +4 °C'de 5 dakika santrifüj edilerek tekrar çökeleği atılır. Enzim içeren çözelti tüplere konulup +4°C'de saklanır [53]. Burada PVP, numuneden fenol içeren bileşiklerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Fenoller enzimlere bağlanarak aktivitelerini değiştirebilmektedir [54].

3.5. GR Enziminin UV-GB Spektroskopisi ile Tayini

GR enzimi, aktivite ölçümünde reaksiyona giren NADPH'ın 340 nm'de maksimum absorbans vermesinden yararlanılarak tayin edilmiştir. GR enzimi, katalizlediği reaksiyonda NADPH'ın azalmasına sebep olmaktadır. Bu azalma spektrofotometrik olarak 340 nm'de takip edilerek enzim aktivitesi belirlenmektedir.

340 nm dalgaboyunda UV-GB Spektroskopisi ile absorbans ölçümünün yapılması için şahit çözelti ve numune çözeltileri aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

Şahit çözelti için öncelikle küvete hacim olarak 650 µL saf su üzerine 1,9 mL tampon çözeltisi ardından 100 µL 30 mM GSSG çözeltisi ve 350 µL 0,8 mM indirgenmiş β-NADPH çözeltisi eklenmiştir. Numune çözeltisi için ise hacim olarak 300 µL saf su üzerine 700 µL tampon çözeltisi ardından 150 µL 30 mM GSSG çözeltisi ve 350 µL 0,8 mM β-NADPH eklenmiştir. Son olarak izole edilen ıspanak ekstraktından ise küvete 1,5 mL eklenerek absorbans değeri 60 saniyede ölçüm alınmıştır.

1 dakikadaki absorbans değeri ile başlangıçtaki absorbans değeri kaydedilerek absorbans değişimi hesaplanmış olup bulunan değer, enzim tayini için Beer yasasından türetilen aşağıda verilen eşitlikte kullanılmıştır [55].

$$E_U / \text{ml} = \frac{\Delta AD}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E} \quad (3.1.)$$

E_U/mL : Enzim derişimi

ΔAD : Bir dakikadaki absorbans değışimi ($A_{\text{numune}} - A_{\text{şahit}}$)

6,22: Molar absorpsiyon katsayısı ($\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

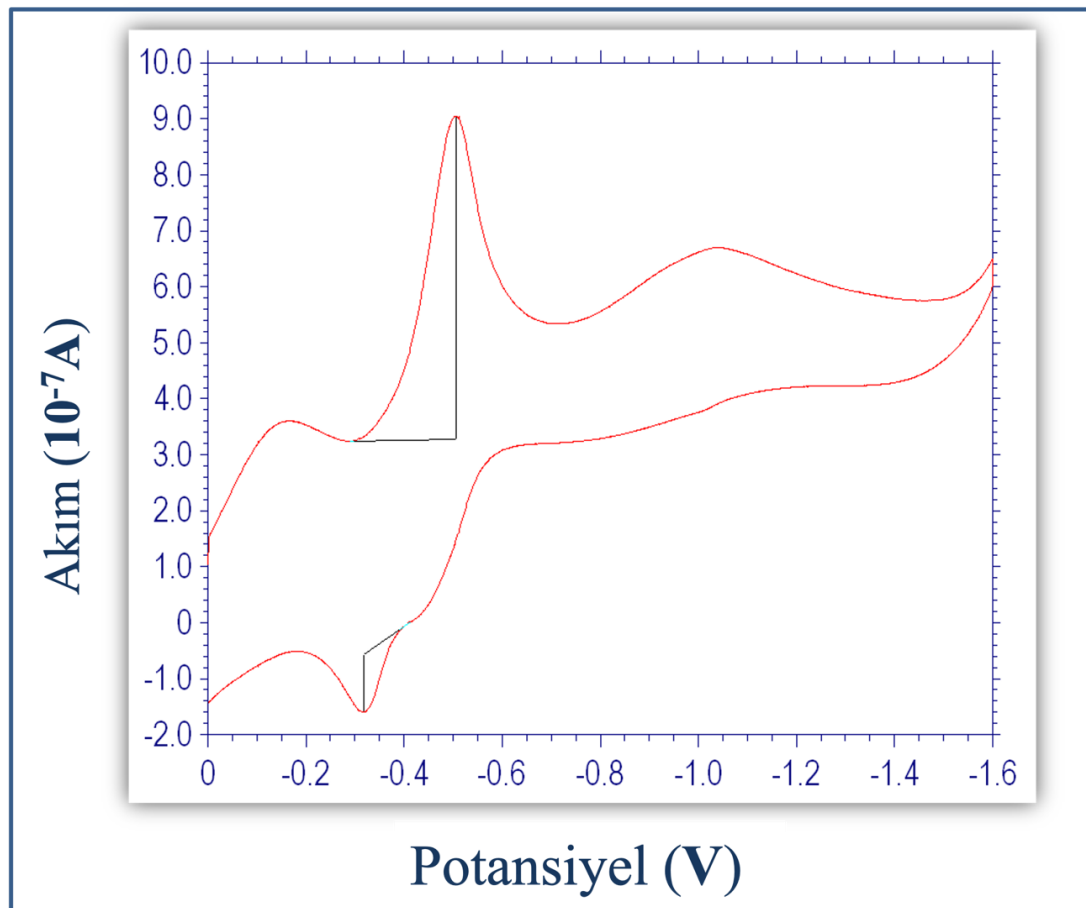
1 enzim ünitesi teorik olarak 1 µmol substratı 1 dakikada katalizleyen enzim miktarı olması nedeniyle bu miktar NADPH'ın absorbansındaki azalmaya eşittir.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. İndirgenmiş Glutasyonun Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

4.1.1. İndirgenmiş glutasyonun elektrokimyasal davranışının tayini

CV tekniği kullanılarak GSH'a ait indirgenme ve yükseltgenme potansiyelinin tayini yapılmıştır. 0 ile -1,6 V arasında yapılan taramada frekans 15 Hz, puls genliği 25 mV olacak şekilde optimize edilmiştir. pH:7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu içeren 10 mL destek elektrolit çözeltisine 100 μL 10^{-2} M GSH çözeltisi ilave edilerek 0,5 V/s tarama hızında Şekil 4.1'deki voltamogram elde edildi.



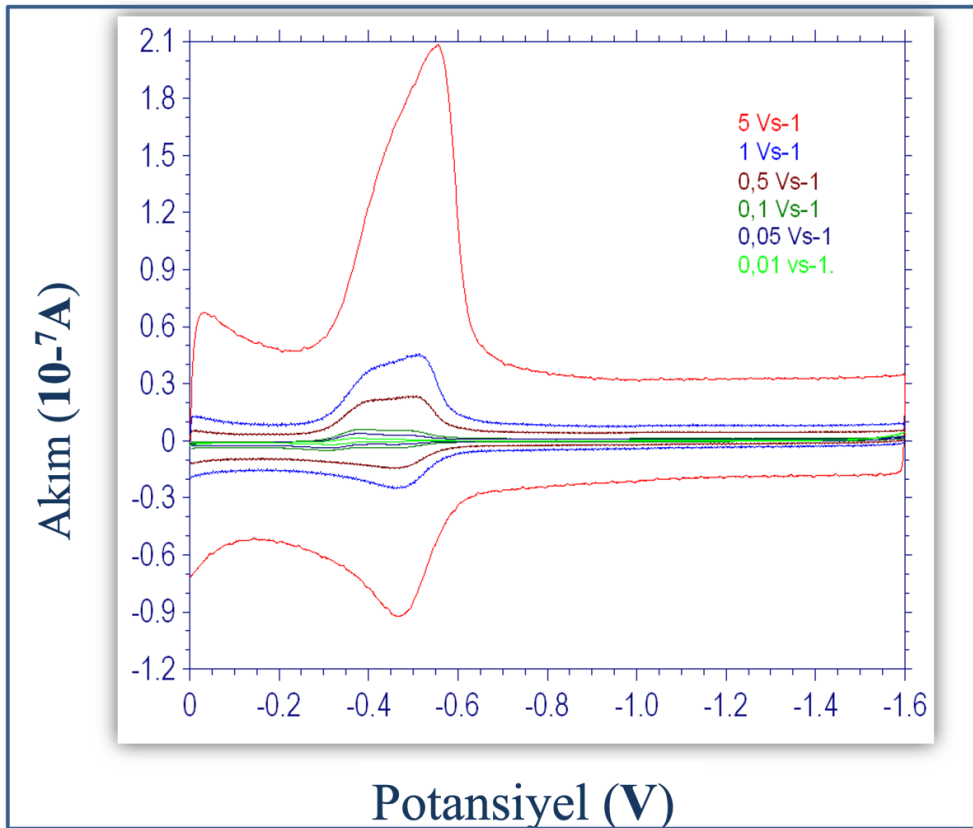
Şekil 4.1. $1,0 \times 10^{-4}$ M GSH'ın pH:7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponunda dönüşümlü voltamogramı (Ag/AgCl elektroda karşı, $v = 0,5$ V/s)

CV tekniği kullanılarak farklı tarama hızlarında GSH'a ait indirgenme potansiyelinin tayini yapılmıştır. Bu değerler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. $1,0 \times 10^{-4}$ M GSH'a ait farklı tarama hızlarında tayin edilen indirgenme potansiyelleri

Tarama hızı (V/s)	E_p^k , V
0,01	-0,373
0,05	-0,380
0,1	-0,385
0,5	-0,495
1,0	-0,506
5,0	-0,556

$1,0 \times 10^{-4}$ M GSH'ın pH:7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponunda 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 tarama hızlarında 0 V ile -1,6 V arasında yapılan taramaların sonucunda elde edilen E_p^k değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Damlayan cıva elektrot kullanılarak 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 V/s tarama hızlarında 10^{-4} M GSH' ait dönüşümlü voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH:7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu içerisinde)

$1,0 \times 10^{-4}$ M GSH'nin pH:7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponunda 0 V ile -1,6 V arasında, farklı tarama hızlarında elde edilen voltamogramları Şekil 4.2'de verilmiştir.

GSH'nin Cottrell eğimlerini hesaplamak CV yöntemiyle belirlenen GSH'nin indirgenme pikinin başlangıç (-0,230 V) ve bitiş (-0,692 V) potansiyel değerleri alınıp Kronoamperometri deneyi gerçekleştirilmiştir. 3 farklı deney sonunda Cottrell eğiminin ortalaması ve standart sapması hesaplanmıştır. Çizelge 4.2'de bulunan Cottrell eğim değerleri standart sapma ile verilmiştir.

Çizelge 4.2. GSH'ait Cottrell eğimleri (N=3)

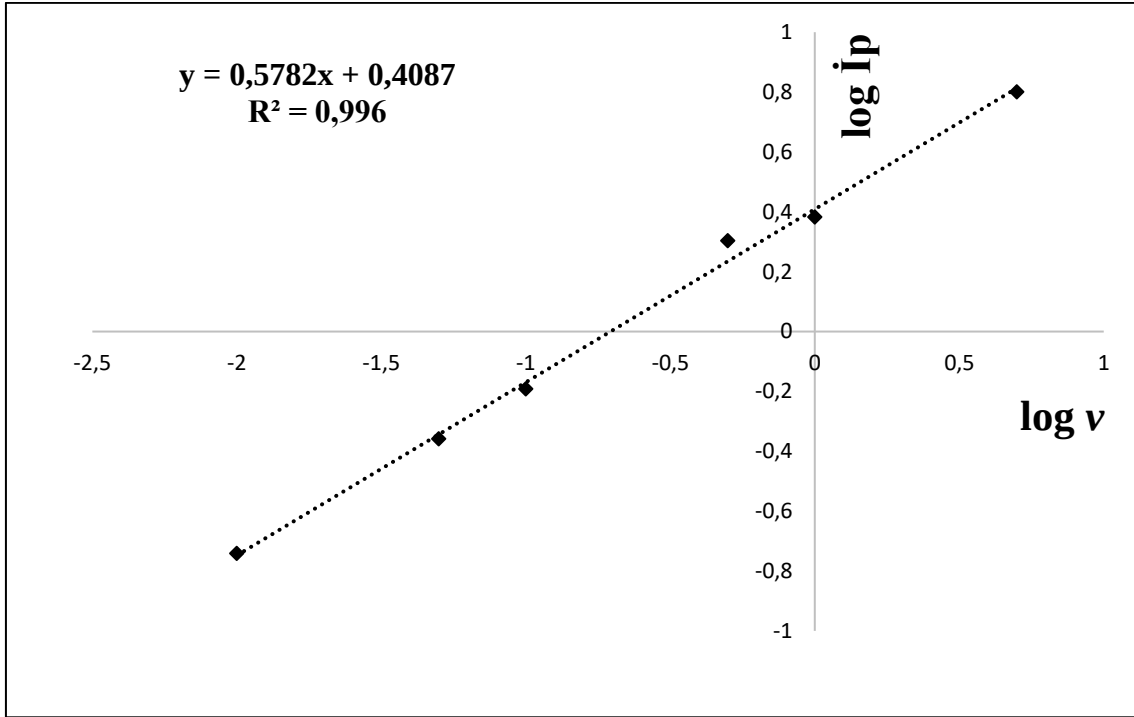
Tarama	1	2	3	Ortalama	Standart Sapma	% Bağıl hata
Cottrell Eğimi $\times 10^{-7}$ (S)	2,436	2,454	2,457	2,499	0,0139	0,556

GSH'nin sınır akım değerini saptayabilmek için CV yöntemi ile 10 μm yarıçaplı platin ultra mikro elektrot kullanılmış olup sınır akımı $1,962 \times 10^{-9}$ A bulunmuştur. Yapılan tarama 0 ile -1,6 V arasında gerçekleştirilmiştir. Tarama hızı 0,5 V/s'dir.

Çizelge 4.3. 1×10^{-4} M GSH'nin indirgenmesi esnasında transfer edilen elektron sayısı ve difüzyon katsayısı

Bileşik	E_{pk} , V (0,5 V/s)	i_{pk} , μA	Cottrell Eğimi, (S)	UME Sınır Akımı, (i, A)	Mol Başına Aktarılan Elektron Sayısı, (n)	Difüzyon Katsayısı (D, cm^2/s)
GSH	-0,495	1,997	$2,499 \times 10^{-7}$	$1,962 \times 10^{-9}$	$2,39 \pm 0,025$ (N=3)	$1,849 \times 10^{-5} \pm 0,011 \times 10^{-5}$ (N=3)

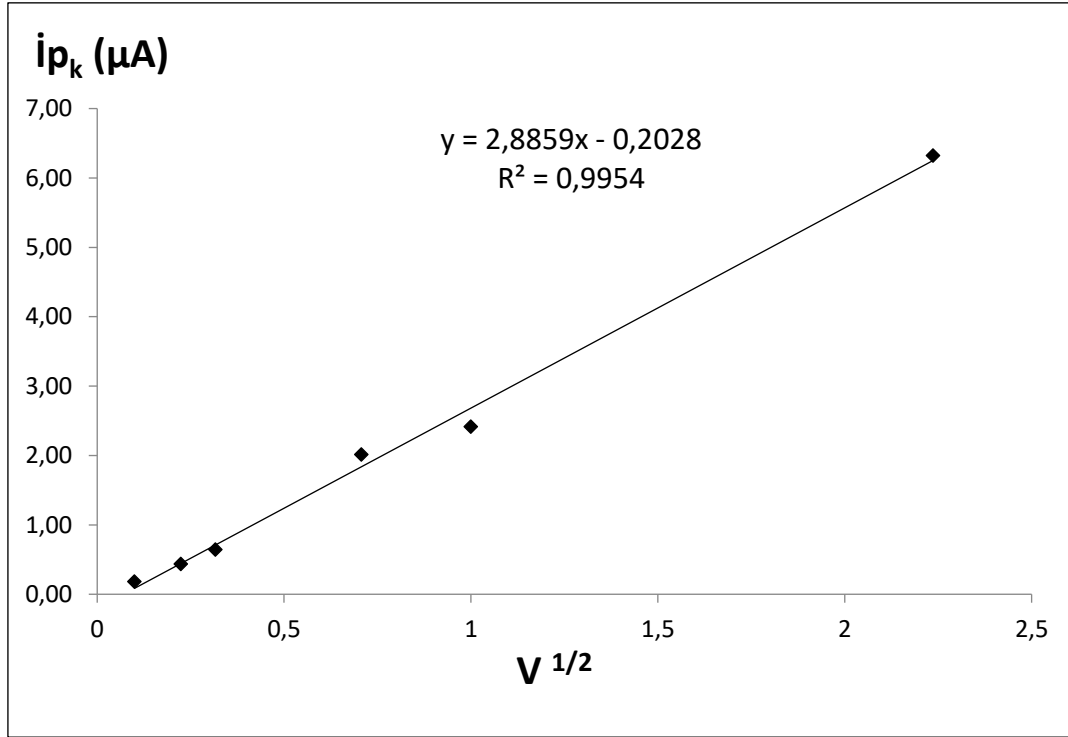
GSSG'nin GSH'a elektrokimyasal olarak indirgenme tepkimesinin difüzyon ya da absorpsiyon kontrollü olduğunu belirlemek için 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 V/s tarama hızları için $\log v$ değerlerine karşı $\log i_p$ değerleri grafiğe geçirilir. Elde edilen grafikte, GSH elektrot yüzeyine adsorbe oluyorsa, CV' de pik akımı $v^{1/2}$ ile $\log v$ değeri orantılı olarak değişmez aynı zamanda $\log i_p$ 'nin $\log v$ ile değişiminin eğiminin 0,5'ten farklı olması adsorpsiyon kontrollü olduğunu gösterir [57].



Şekil 4.3. GSH'ın $\log v$ 'ye karşı $\log i_p$ grafiği

Şekil 4.3'te eğim değerinin 0,5'e yakın olması GSH'ın civa elektrot yüzeyinde indirgenmesinin difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir.

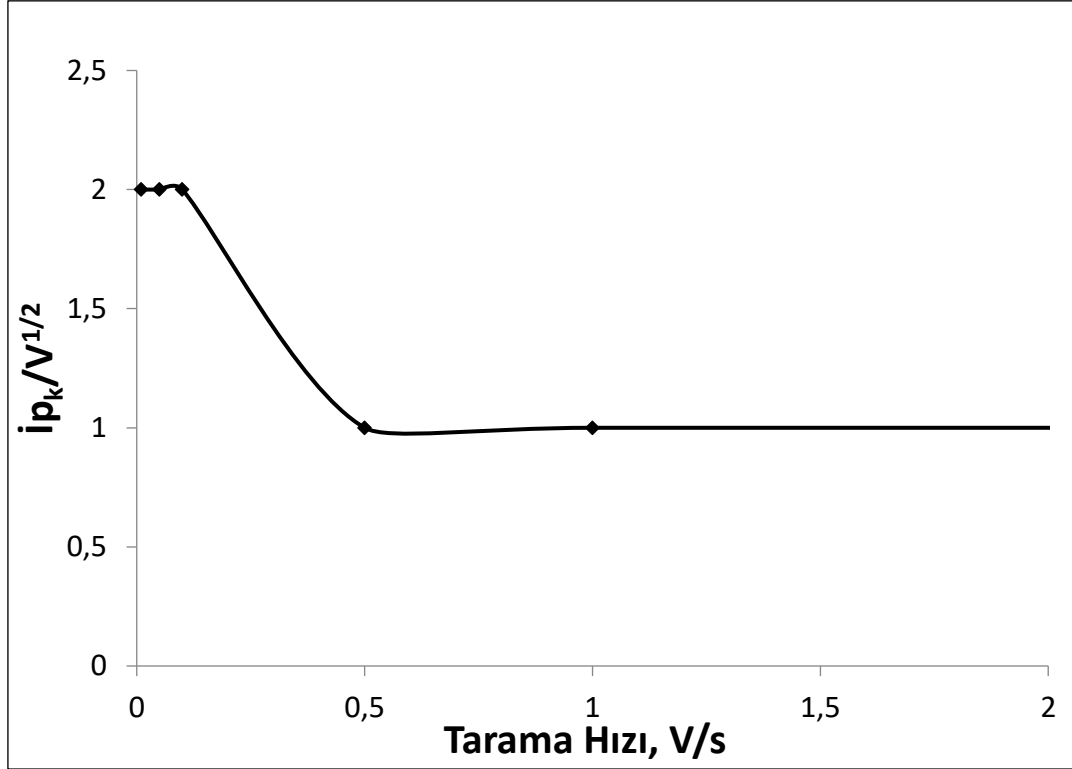
Bunun yanında katodik pik akımının, tarama hızının karekökü ile değişiminin lineer olması da GSH'ın difüzyon kontrollü olduğunu bir kanıttır.



Şekil 4.4. GSH'ın tarama hızının karekökünün i_{p_k} 'ya karşı grafiği

4.1.2. İndirgenmiş glutatyonun indirgenme mekanizmasının tayini

E_{p_k} 'lerin yüksek tarama hızlarında negatife kayması şartı sistemin tersinmezliğinin bir göstergesidir [56, 57]. Elektrokimyasal sistemde "ECE" mekanizmasının varlığı, $i_{p_k}/v^{1/2}$ değerinin tarama hızı ile değişmesi ve yüksek ve düşük tarama hızlarında limit değere ulaşması parametreleri ile desteklenir. Yavaş tarama hızlarında kütle transferinin yavaş olması sebebiyle $2 e^-$ aktarımına denk gelen pik akımı gözlenir fakat yüksek tarama hızlarında tersinir bir elektron transferine karşılık gelen pik akımı gözlenmektedir. $\log v$ değerinin $i_{p_k}/v^{1/2}$ değerine karşı çizilen grafiği Şekil 4.5'te verilmiştir. Ayrıca i_{p_a}/i_{p_k} oranı artan tarama hızı ile artmakta olup yüksek tarama hızlarında 1'e yaklaşmaktadır. Bu durumda elde edilen veriler GSH'ın indirgenme mekanizmasının 'ECE' mekanizması olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.5. GSH'ın tarama hızının $i_{p_k}/v^{1/2}$ 'ye karşı grafiği

4.2. Bazı Elektrokimyasal Yöntemler ile Enzim Aktivite Tayininin Optimizasyonu

Bu kısımda, pH:7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu içeren ve 10 dakika azot gazı geçirilmiş 10 mL destek elektrolit ortamına 200 μL NADPH ile 50 μL GSSG (1:1) ilave edilmiştir. Ardından ortama reaksiyonu katalizleyen glutatyon redüktaz enzimi eklenmiştir. Kare dalga voltametrisi, kare dalga katodik sıyırma voltametrisi ve kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemleri kullanılarak her biri için enzim derişiminin etkisi, ortam pH'ı incelenmiş olup kare dalga katodik sıyırma voltametrisi ve kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemleri yöntemlerde biriktirme süresi ve biriktirme potansiyeli gibi optimizasyon parametreleri de oluşturulmuştur.

4.2.1. Kare dalga voltametrisi yöntemi ile enzim aktivite tayini

Enzim derişimindeki artışın GSH akımına etkisi

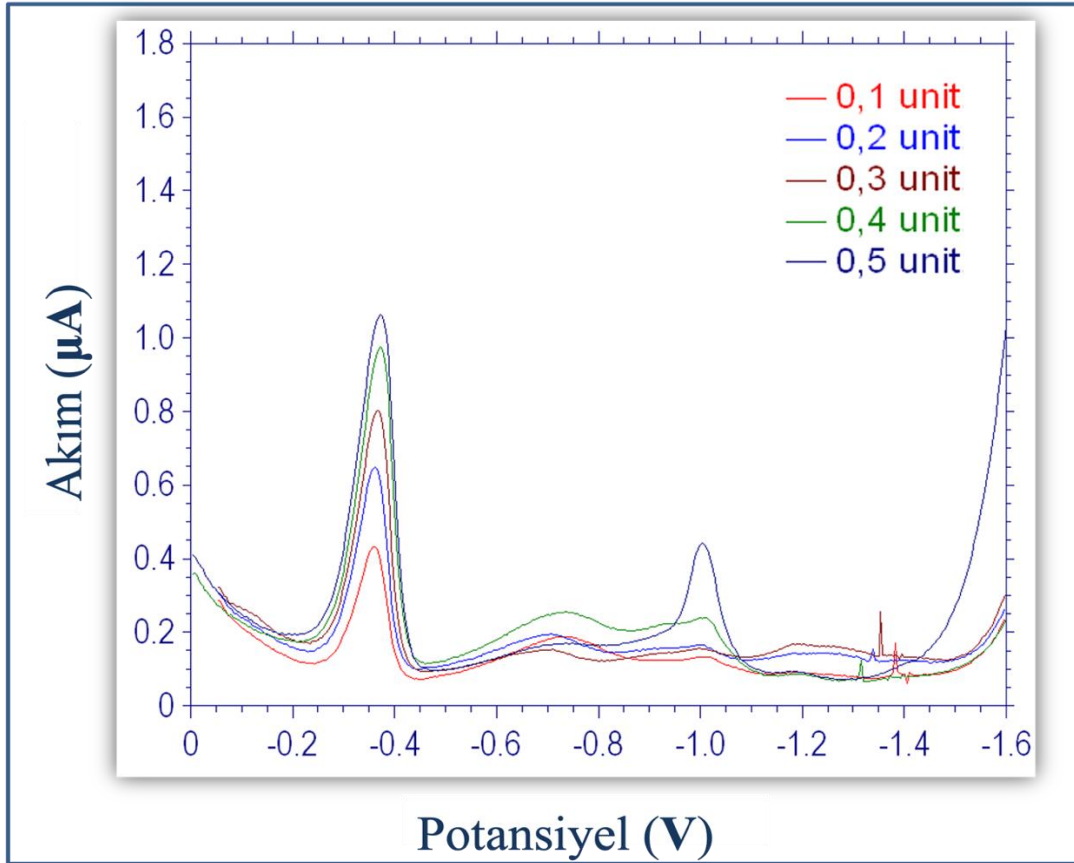
10 mL destek elektrolit içeren hücreye 200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG eklendikten sonra 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 unit olacak şekilde farklı derişimlerde GR enzimi

eklenmiştir. 10 dakika azot geçirildikten sonra kare dalga voltametrisi yöntemi ile voltamogramlar elde edilmiştir. Enzim derişimi arttıkça GSH'a ait pikin akımında artış olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.4. Kare dalga voltametrisi yöntemi ile farklı derişimlerde enzim içeren elektrokimyasal hücrelere ait potansiyostatın çalışma şartları

Parametre	Değer	Birim
Başlangıç potansiyeli	0	V
Bitiş potansiyeli	-1,8	V
Frekans	15	Hz
Puls genliği	25	mV
Hassasiyet	10^{-6}	A/V

200 μ L $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 μ L $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG ve 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 unit olacak şekilde farklı derişimlerde GR enzimi içeren hücreler için potansiyotatın çalışma şartları Çizelge 4.4'te verilmiştir.



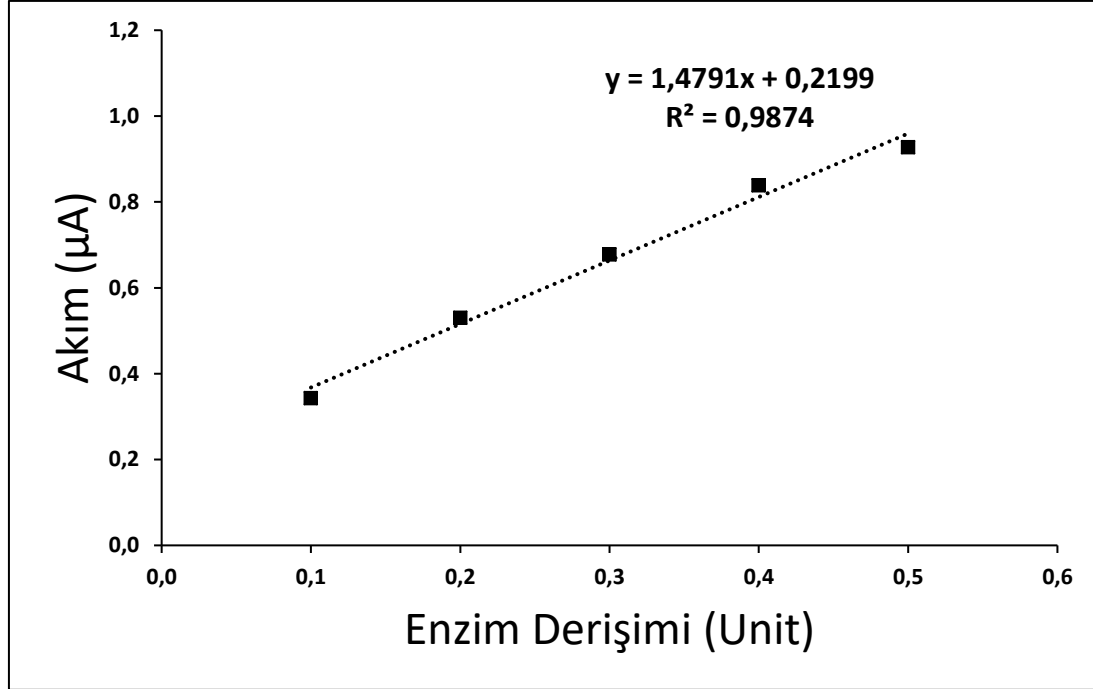
Şekil 4.6. Kare dalga voltametrisi yöntemi için 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 unit enzim derişimlerinde elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ tamponu içerisinde)

GSSG ile NADPH reaksiyonunu katalizlediği bilinen GR enziminin artan unitlerdeki derişimi ile GSH ürününe dönüşmesi sonucunda GSH'a ait akım piklerinde (-0,379 V) artış gözlenmiştir.

Çizelge 4.5. Kare dalga voltametrisi ile farklı GR enzimi derişimlerine karşı gelen akım değerleri

Derişim (Unit)	Akım (µA)
0,1	0,3429
0,2	0,5302
0,3	0,6777
0,4	0,8393
0,5	0,9279

Damlayan cıva elektrodu kullanılarak yapılan çalışmada GSSG ile NADPH reaksiyonunu katalizleyen GR enzimi farklı derişimlerde eklenerek elde edilen akım değeri Çizelge 4.5'te verilmiştir. Ortam pH'ı 7,2 olup GR enzimi hücreye, reaktiflerin eklenmesinden hemen sonra ilave edilmiştir.



Şekil 4.7. Kare dalga voltametri yöntemi ile elde edilen voltamogramlara göre derişime göre akım grafiğı

Şekil 4.7'de verildiğı üzere 0 ile -1,6 V potansiyelleri arasında damlayan cıva elektrodu kullanılarak yapılan çalışmada GR enziminin gerekli enzim derişimin optimizasyonu için 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 unit olmak üzere farklı derişimlerde elde edilen akım değeri grafiğı geçirilmiştir. Bunun sonucunda enzim derişimi arttıkça GSH'a ait pik değeri artışı gözlenmiştir.

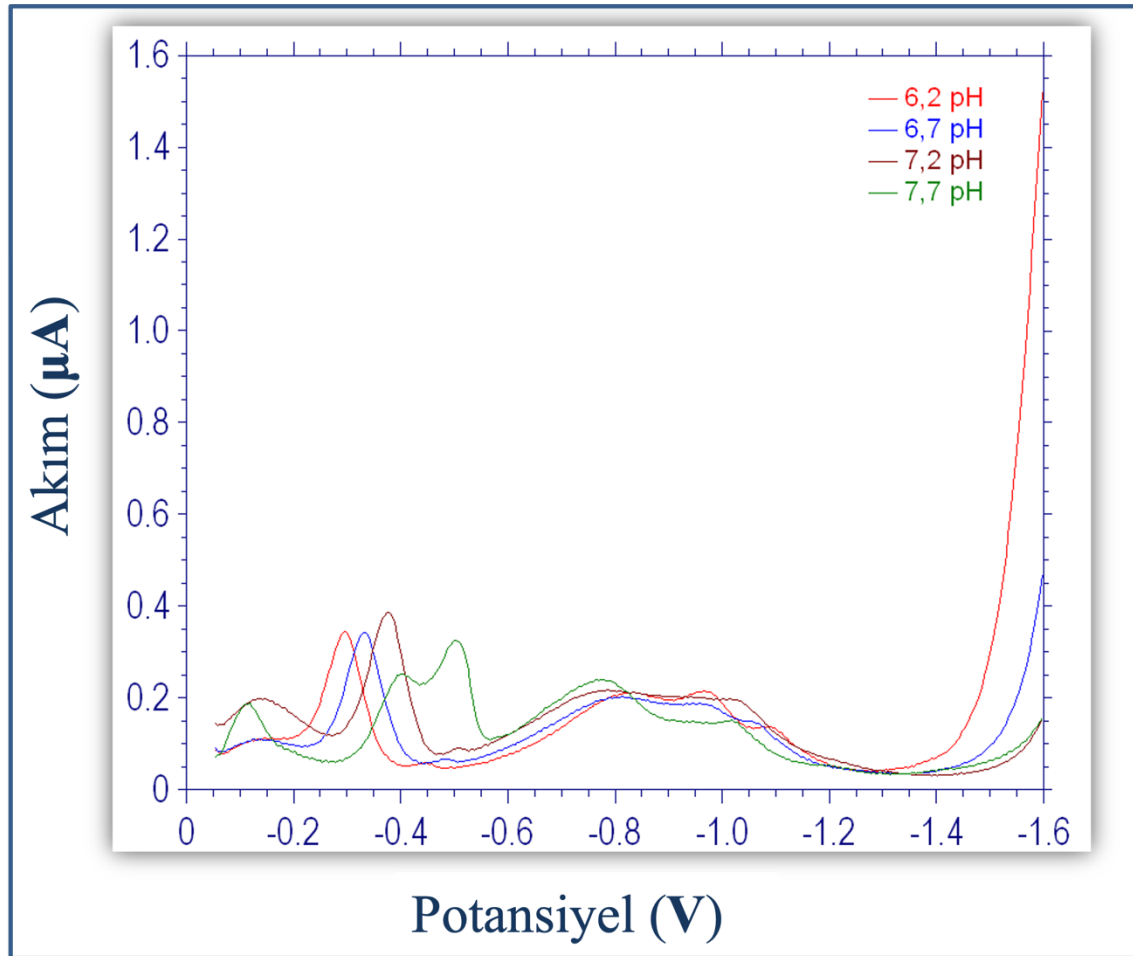
Ortam pH'ının GSH akımına etkisi

Farklı pH'larda tampon çözelti içeren hücrelere 200 µL $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 µL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG ve 0,1 unit GR enzimi eklenerek 10 dakika boyunca hücreden azot gazı geçirilmiştir.

Çizelge 4.6. Kare dalga voltametrisi yöntemi ile farklı pH ortamlarında optimizasyon için potansiyostatın çalışma şartları

Parametre	Değer	Birim
Başlangıç potansiyeli	-0,05	V
Bitiş potansiyeli	-1,6	V
Frekans	15	Hz
Puls genliği	25	mV
Hassasiyet	10^{-6}	A/V

Elektrokimyasal hücreye $200\ \mu\text{L}$ $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, $50\ \mu\text{L}$ $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG ve optimum enzim miktarı olan 0,1 unit GR enzimi ilave edilmiş olup potansiyostatın çalışma şartları Çizelge 4.6’da verildiği gibi ayarlanmıştır.



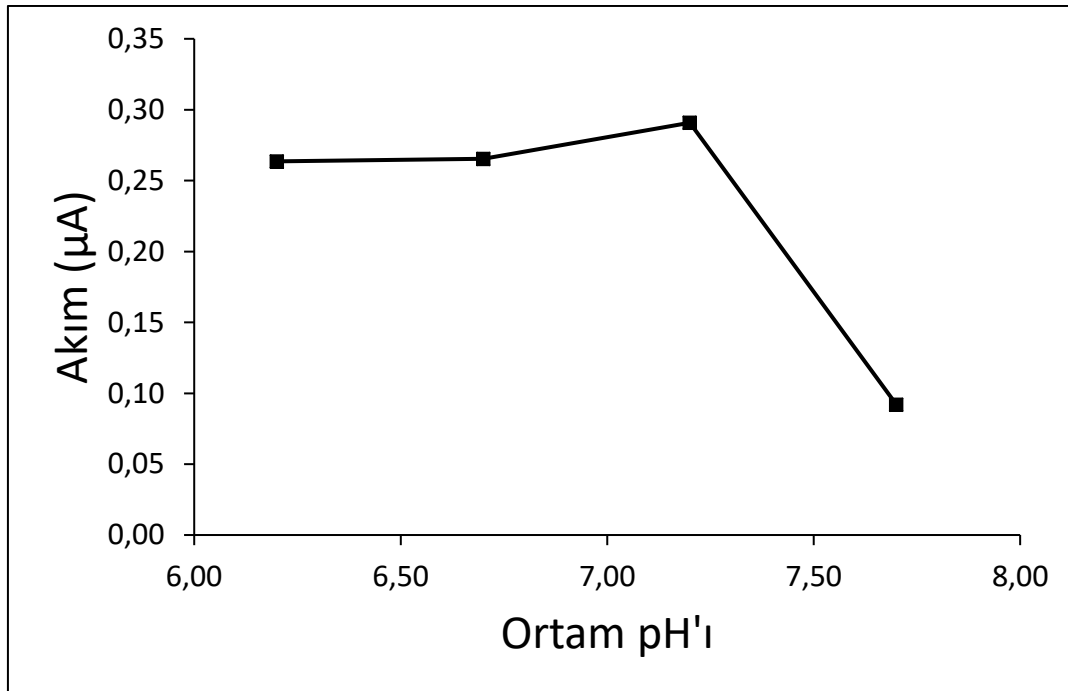
Şekil 4.8. Kare dalga voltametrisi yöntemi ile farklı pH’a sahip tampon çözeltilerden elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu içerisinde)

Ortama her bir elektokimyasal hücre için pH: 6,2; 6,7; 7,2; 7,7 olan tampon çözeltileri ilave edilerek optimum enzim miktarı ve reaktifler eklenerek, damlayan cıva elektrot kullanılarak yapılan katodik yöndeki taramalarda Şekil 4.8'deki voltamogramlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.7. Kare dalga voltametrisi yöntemi ile farklı pH'a sahip tampon çözeltilere karşılık gelen akım değerleri

pH	Akım (μA)
6,2	0,2635
6,7	0,2653
7,2	0,2908
7,7	0,0921

Farklı pH tampon çözeltileri kullanarak elde edilen GSH pikine ait akım değerleri Çizelge 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.9. Kare dalga voltametrisi yöntemi ile pH'a karşı GSH'a ait akım grafiği

Şekil 4.9'da verildiği üzere kare dalga voltametrisi kullanılarak damlayan cıva elektroduyla katodik yöndeki tarama için optimum pH değeri 7,2 olarak belirlenmiştir.

4.2.2. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile enzim aktivite tayini

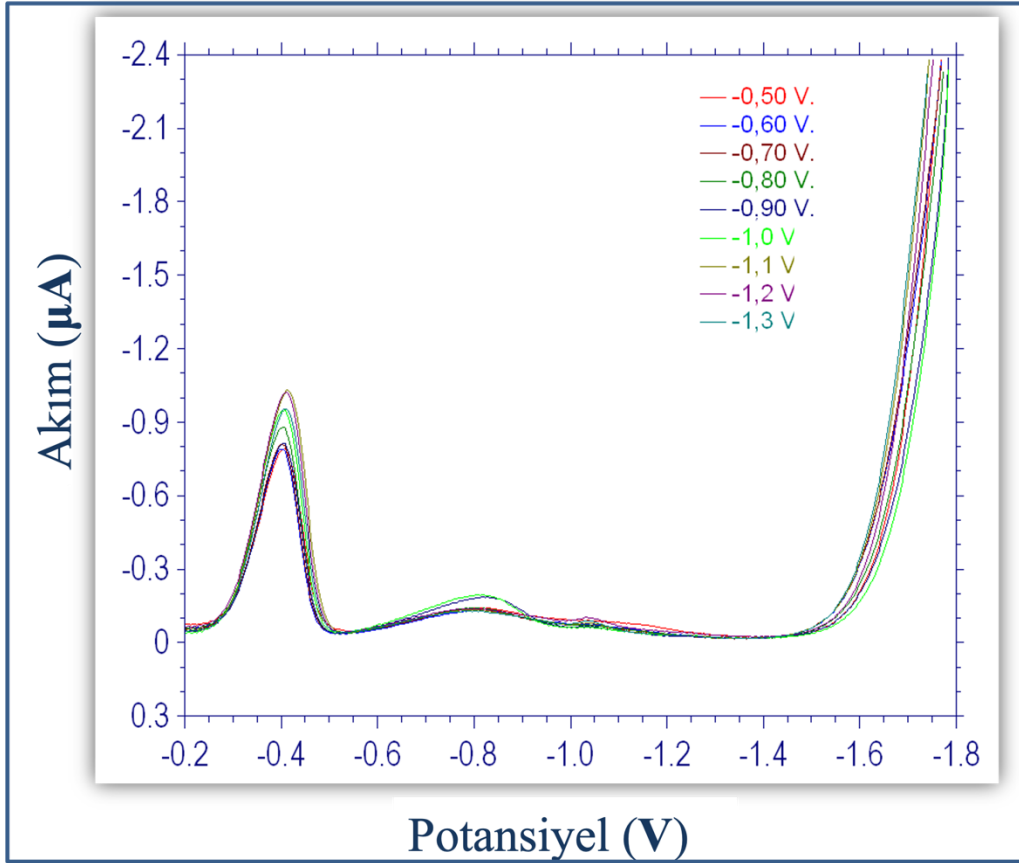
Biriktirme potansiyelinin GSH akımına etkisi

10 mL destek elektrolit içeren hücreye 200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG ve 0,1 unit GR enzimi eklenerek 10 dakika boyunca hücreden azot gazı geçirildi. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak ayrı hücrelerde -0,50; -0,60; -0,70; -0,80; -0,90; -1,00; -1,10; -1,20; -1,30 V olacak şekilde uygulanan biriktirme potansiyellerinin GSH akımı üzerine etkisi incelendi ve akımın en yüksek olduğu biriktirme potansiyelinin -1,1 V olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi için potansiyostatın çalışma şartları

Parametre	Değer	Birim
Başlangıç potansiyeli	-1,8	V
Bitiş potansiyeli	-0,15	V
Frekans	15	Hz
Puls genliği	25	mV
Hassasiyet	10^{-6}	A/V

Çalışma elektrodu olarak asılı cıva damla elektodu kullanılarak, -1,8 V ile -0,15 V arasında gerçekleştirilen anodik yöndeki taramada oluşturulan parametreler Çizelge 4.8’de verilmiştir.



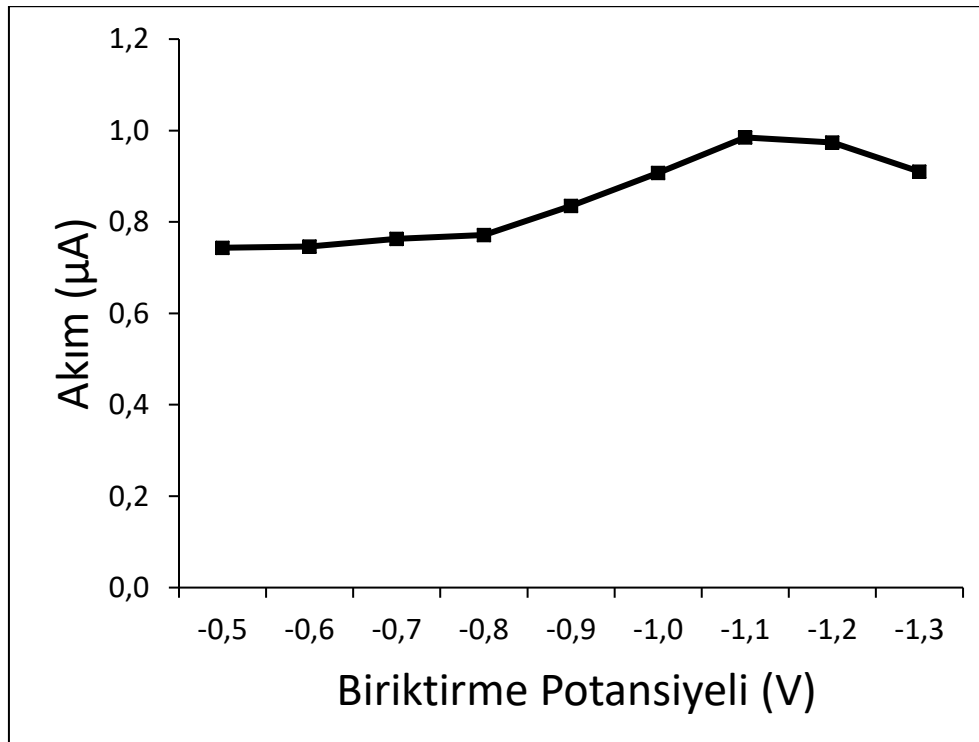
Şekil 4.10. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi ile farklı biriktirme potansiyellerinde elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu içerisinde)

-1,8 V ile -0,15 V potansiyelleri arasında, asılı cıva damla elektrodu kullanılarak yapılan çalışmada farklı biriktirme potansiyelleri kullanılarak Şekil 4.10’da verilen voltamogramlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.9. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı biriktirme potansiyellerine karşılık gelen akım değerleri

Biriktirme Potansiyeli (V)	Akım (μA)
-0,50	0,7435
-0,60	0,7459
-0,70	0,7627
-0,80	0,7714
-0,90	0,8352
-1,00	0,9071
-1,10	0,9848
-1,20	0,9740
-1,30	0,9103

Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak ayrı hücrelerde -0,50; -0,60; -0,70; -0,80; -0,90; -1,00; -1,10; -1,20; -1,30 V olacak şekilde uygulanan biriktirme potansiyellerinin GSH akımı üzerine etkileri Çizelge 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.11. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı biriktirme sürelerine karşı GSH'a ait akım grafiği

Şekil 4.11’de gözüktüğü üzere 10 mL destek elektrolit içeren hücreye 200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG ve optimum miktar olan 0,1 unit GR enzimi eklenerek kare dalga anodik sıyırma voltametrisiyle -0,50; -0,60; -0,70; -0,80; -0,90; -1,00; -1,10; -1,20; -1,30 V olacak şekilde farklı biriktirme potansiyellerinde biriktirme yapılmıştır. Bu potansiyellerin GSH akımı üzerine etkisi incelenmiş olup optimum biriktirme potansiyelinin -1,1 V olduğu belirlenmiştir.

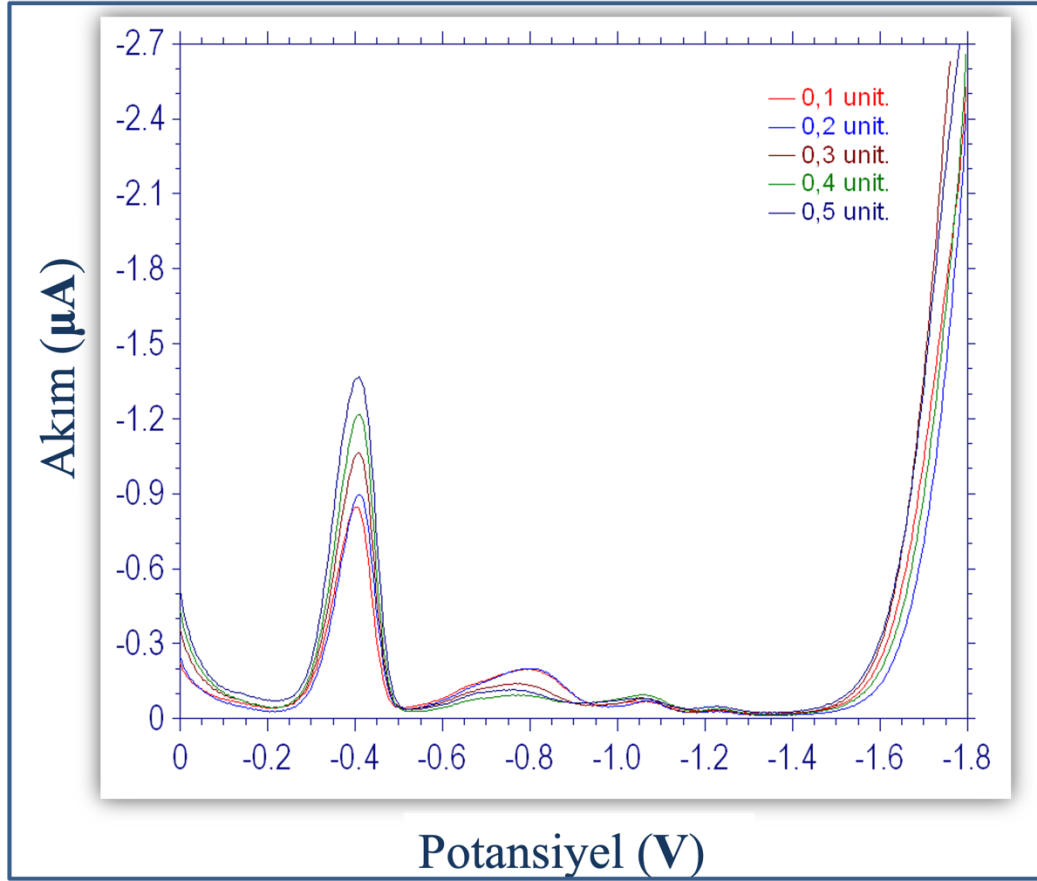
Enzim derişimindeki artışın GSH akımına etkisi

Destek elektrot içeren 10 mL hücreye 200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG eklendikten sonra farklı derişimlerinde GR enzimi eklenerek 10 dakika azot gazı geçirilmiştir.

Çizelge 4.10. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi ile enzim derişiminin belirlenebilmesi için potansiyostatın çalışma şartları

Parametre	Değer	Birim
Başlangıç potansiyeli	-1,8	V
Bitiş potansiyeli	-0,15	V
Frekans	15	Hz
Puls genliği	25	mV
Hassasiyet	10^{-6}	A/V
Biriktirme Potansiyeli	-1,1	V
Biriktirme Süresi	60	s

Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile -1,8 V’ dan +0,05 V’ a kadar yapılan anodik yönde taramada çalışma elektrodu olarak asılı cıva damla elektrodu kullanılmıştır. Ortam pH’ı 7,2 olup potansiyostatın çalışma şartları Çizelge 4.10’da verilmiştir.



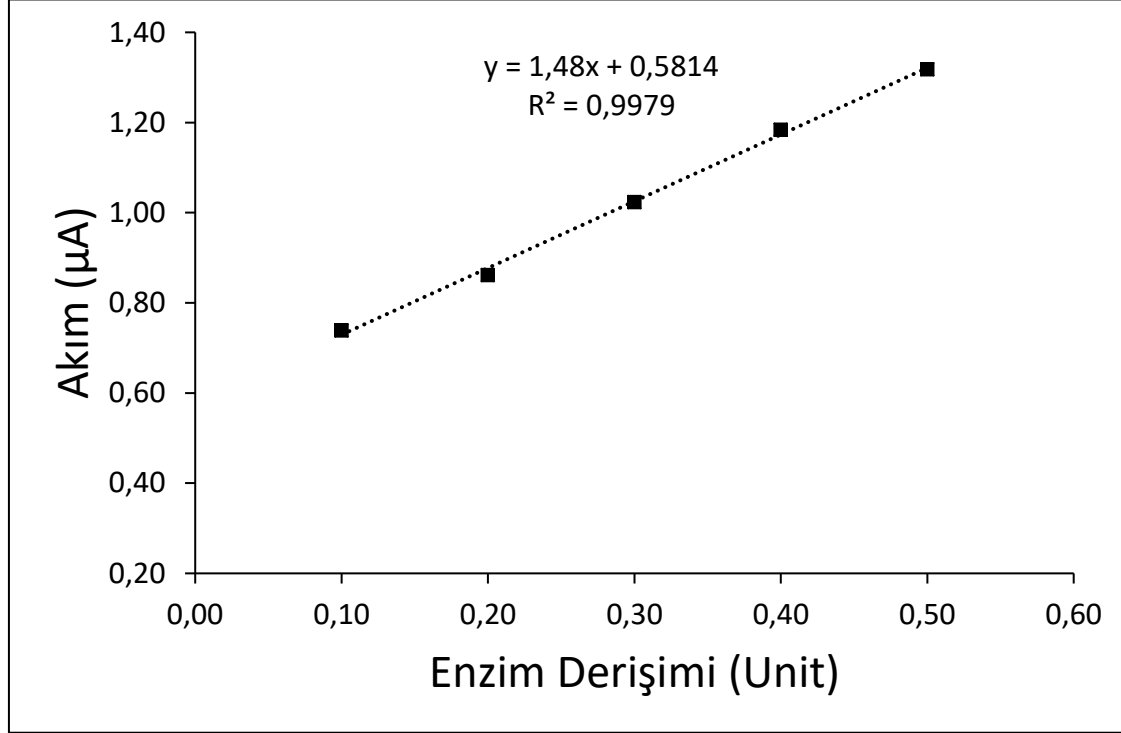
Şekil 4.12. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi ile 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 unit enzim için farklı derişimlerden elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ tamponu içerisinde)

Çizelge 4.10’da verilen çalışma şartları altında kare dalga anodik sıyırma voltametrisi kullanılarak farklı enzim derişimleri için elde edilen voltamogramlar Şekil 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı derişimlerde enzimlere karşılık gelen akım değerleri

Derişim (Unit)	Akım (µA)
0,1	0,739
0,2	0,862
0,3	1,024
0,4	1,184
0,5	1,318

Çizelge 4.11’de verildiği üzere artan derişim miktarı ile GR katalizörlüğünde GSSG ile NADPH’ın reaksiyonu sonu oluşan GSH pikinin akım değeri belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile elde edilen voltamogramlara göre derişime karşı GSH’a ait akım grafiği

Şekil 4.13’te verildiği üzere 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 unit enzim derişimlerinde GSH pikinin akım değerlerine karşı grafiğe geçirilerek kare dalga voltametrisine kıyasla (Şekil 4.7) kare dalga anodik sıyırma voltametrisi kullanılarak grafikte daha iyi bir R^2 değeri elde edildiği belirlenmiştir.

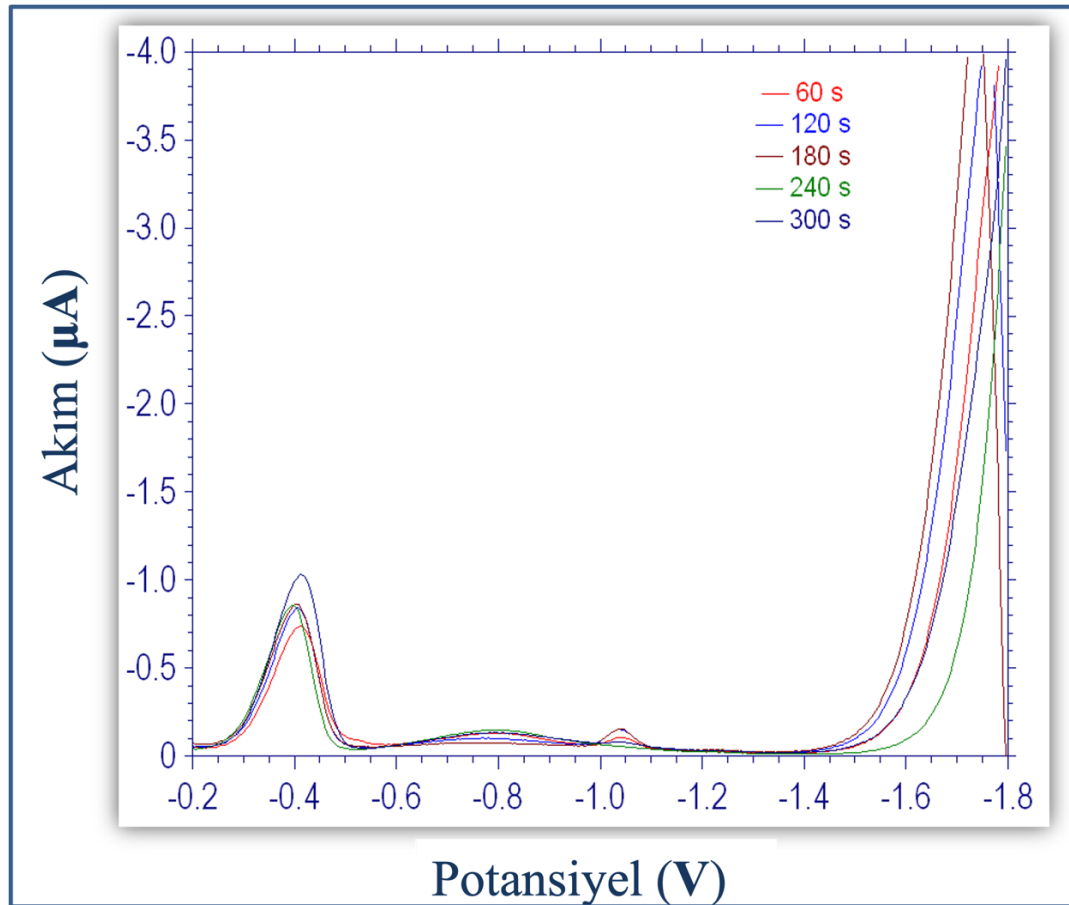
Biriktirme süresinin GSH akımına etkisi

10 mL destek elektrolit içeren hücreye 200 µL $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 µL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG, 0,1 unit GR enzimi eklenmiştir. 10 dakika azot geçirildikten sonra kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak -1,1 V biriktirme potansiyelinde farklı biriktirme sürelerinde voltamogramlar alınmıştır.

Çizelge 4.12. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi ile farklı derişimlerde enzim içeren elektrokimyasal hücrelere ait potansiyostatın çalışma şartları

Parametre	Değer	Birim
Başlangıç potansiyeli	-1,8	V
Bitiş potansiyeli	-0,15	V
Frekans	15	Hz
Puls genliği	25	mV
Hassasiyet	10^{-6}	A/V
Biriktirme Potansiyeli	-1,1	V

Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemiyle -1,8 ile -0,15 V potansiyelleri arasında, asılı cıva damla elektrodu ile farklı derişimlerdeki enzimin akıma etkisini incelemek yapılan çalışmada kullanılan cihaz parametreleri Çizelge 4.12’de verilmiştir.



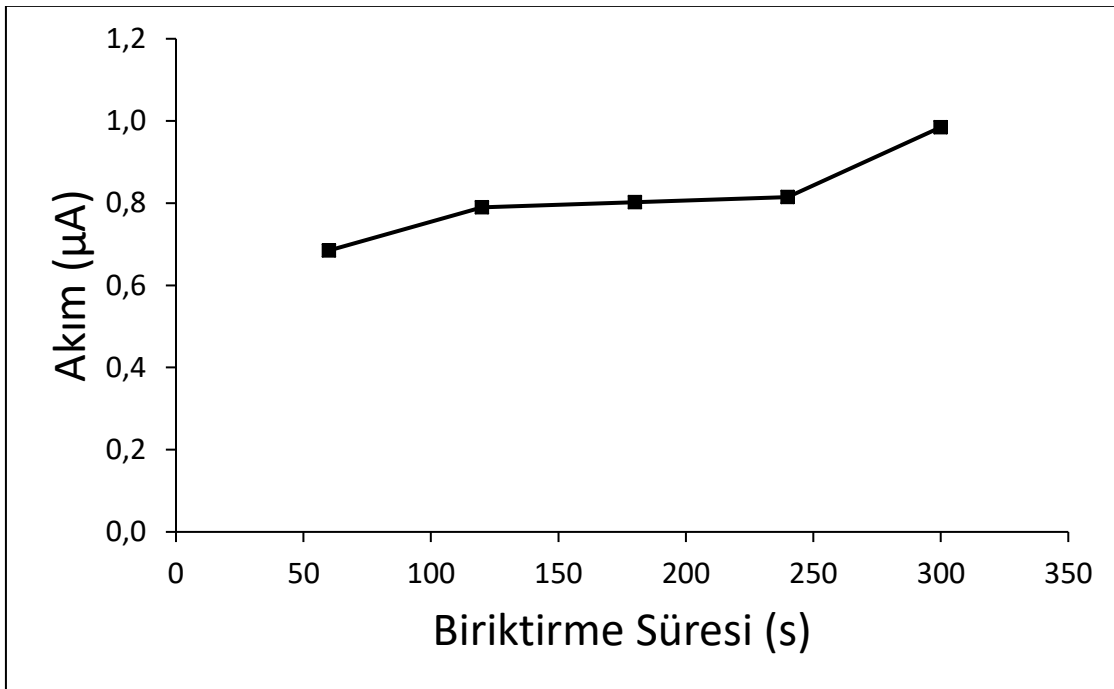
Şekil 4.14. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi ile farklı biriktirme sürelerinde elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu içerisinde)

Çizelge 4.12’de verilen çalışma şartları altında elde edilen voltamogramlar Şekil 4.14’te verilmiştir.

Çizelge 4.13. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı biriktirme sürelerine karşılık gelen akım değerleri

Biriktirme Süresi (s)	Akım (μA)
60	0,6848
120	0,7895
180	0,8020
240	0,8144
300	0,9848

200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M NAPDH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG, optimum enzim miktarı olan 0,1 unit GR enzimi eklenen hücreye farklı biriktirme sürelerinde -1,1 V’da biriktirme yapılmak üzere kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi uygulanarak 5 farklı tarama yapılmıştır. Farklı biriktirme sürelerine karşı gelen akım değerleri Çizelge 4.13’te verilmiştir.



Şekil 4.15. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile elde edilen voltamogramlara göre biriktirme süresine karşı GSH’a ait akım grafiği

Şekil 4.15'te verildiği üzere biriktirme potansiyeli -1,1 V olarak optimize edilmiş olup kullanılan bu potansiyelde biriktirme yapılarak, kare dalga anodik sıyırma voltametriyle biriktirme süresi optimize edilmiştir. Bunun sonucunda Şekil 4.15'te biriktirme süresinin 300. sn'de en yüksek pik akımını verdiği belirlenmiştir. Buna karşın enzim aktivitesi teorik olarak 1 μmol substratın optimum şartlarda, 60 saniyedeki ürüne dönüştüren enzim miktarı olması sebebiyle biriktirme süresi 60 sn olarak optimize edilmiştir.

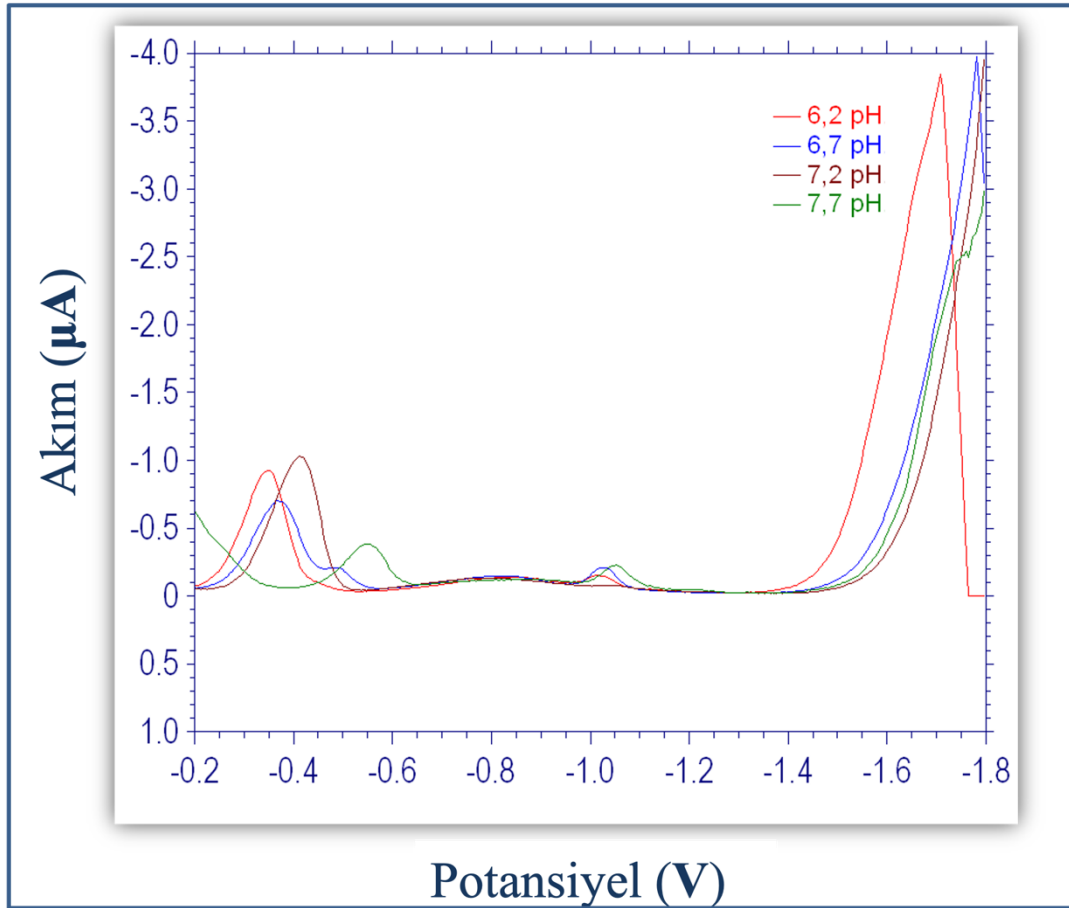
Ortam pH'ının GSH akımına etkisi

Farklı pH'lardaki tampon çözeltilere sahip hücrelere 200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG ve 0,1 unit GR enzimi eklenerek 10 dakika boyunca hücreden azot gazı geçirildi. En yüksek pik akımının pH=7,2 ortamında elde edildiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.14. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı pH ortamlarında optimizasyon için potansiyostatın çalışma şartları

Parametre	Değer	Birim
Başlangıç potansiyeli	-1,8	V
Bitiş potansiyeli	-0,15	V
Frekans	15	Hz
Puls genliği	25	mV
Hassasiyet	10^{-6}	A/V
Biriktirme Potansiyeli	-1,1	V
Biriktirme Süresi	60	s

Farklı pH'larda 200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG ve 0,1 unit GR enzimi içeren hücreler için oluşturulan çalışma şartları Çizelge 4.14'te verilmiştir.

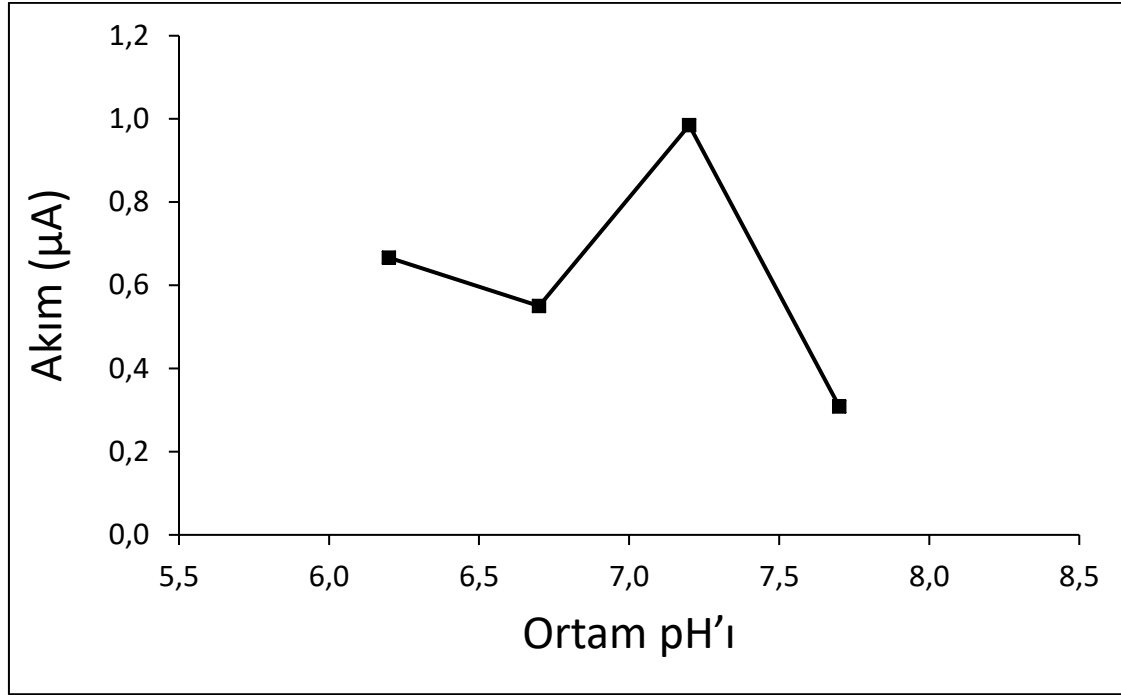


Şekil 4.16. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile pH'a karşı elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu içerisinde)

Çizelge 4.15. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı pH'a sahip tampon çözeltilere karşılık gelen akım değerleri

pH	Akım (μA)
6,2	0,6664
6,7	0,5500
7,2	0,9848
7,7	0,3088

-1,8 V ile -0,15 V arasında anodik yönde -1,1 V'da biriktirme yapılarak gerçekleştirilen çalışmada farklı pH'larda elde edilen GSH pikine ait akım değerleri Çizelge 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.17. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile pH'a karşı GSH'a ait akım grafiği

Çizelge 4.15'te verilen verilerin grafiğe geçirilmesi ile Şekil 4.17'deki grafik elde edilmiştir. Elde edilen grafikten ortam pH'ı için optimum şartın 7,2 olduğu belirlenmiştir.

4.2.3. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi ile enzim aktivite tayini

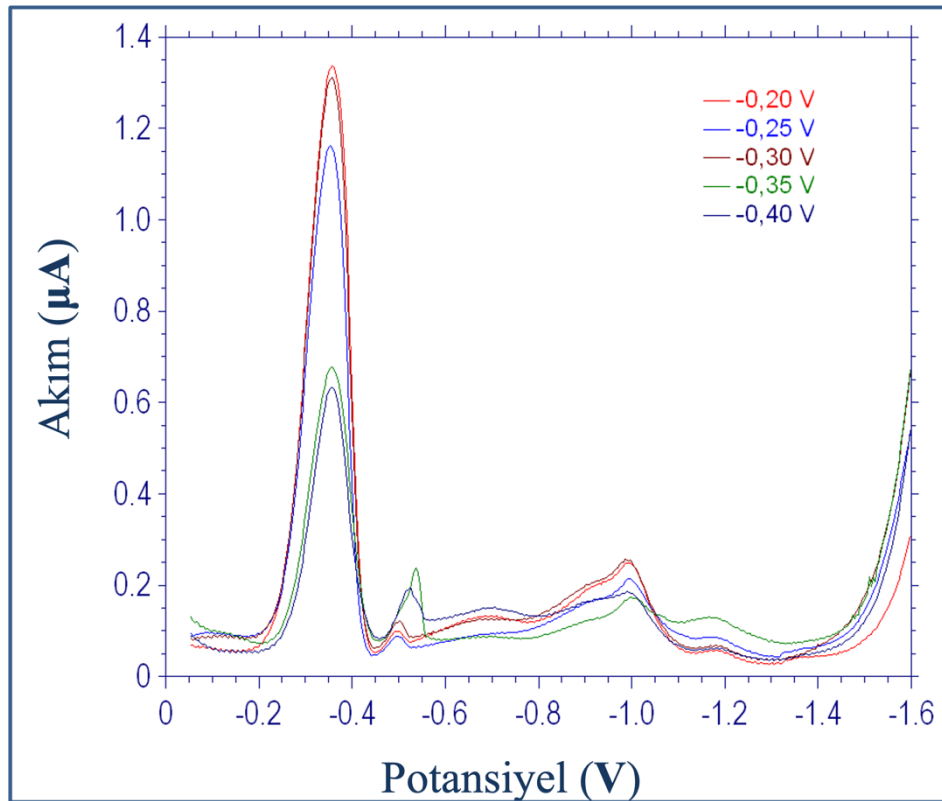
Biriktirme potansiyelinin GSH'ın indirgenme akımına etkisi

10 mL destek elektrolit içeren hücreye 200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG ve 0,1 unit GR enzimi eklenerek 10 dakika boyunca hücreden azot gazı geçirildi.

Çizelge 4.16. Kare dalga katodik sıyrma voltametrisiyle biriktirme potansiyelinin GSH akımına etkisini belirlemek için kullanılan potansiyostatın çalışma şartları

Parametre	Değer	Birim
Başlangıç potansiyeli	-0,05	V
Bitiş potansiyeli	-1,6	V
Frekans	15	Hz
Puls genliği	25	mV
Hassasiyet	10^{-6}	A/V
Biriktirme Süresi	60	s

Kare dalga katodik sıyrma voltametrisi kullanılarak, -0,05 V ile -1,6 V potansiyelleri arasında 60 saniye biriktirme yapılmak üzere farklı biriktirme potansiyellerinin GSH akımına etkisini belirlemek için gerekli şartlar Çizelge 4.16’da verilmiştir.



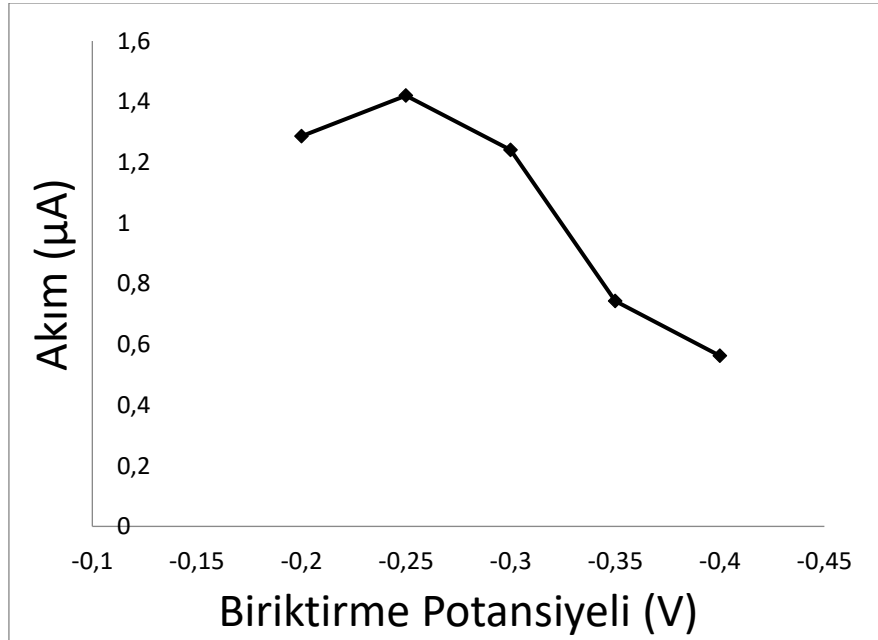
Şekil 4.18. Kare dalga katodik sıyrma voltametrisi ile farklı biriktirme potansiyellerinde elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu içerisinde)

Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak ayrı hücrelerde -0,25; -0,30; -0,35; -0,40 V olacak şekilde uygulanan, biriktirme potansiyellerinin GSH'ın indirgenme akımı üzerine etkisini incelemek üzere alınan voltamogramlar Şekil 4.18'de verilmiştir.

Çizelge 4.17. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı biriktirme potansiyellerine karşılık gelen akım değerleri

Biriktirme Potansiyeli (V)	Akım (μA)
-0,20	1,2864
-0,25	1,4200
-0,30	1,2410
-0,35	0,7424
-0,40	0,5624

200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG ve optimum miktar olan 0,1 unit GR enzimi içeren hücreye -0,25; -0,30; -0,35; -0,40 V olacak şekilde uygulanan farklı biriktirme potansiyellerinin GSH akımı üzerine etkisi Çizelge 4.17'de verilmiştir. Çalışma elektrodu olarak asılı cıva damla elektrodu kullanılmış olup ortam pH'ı 7,2'dir.



Şekil 4.19. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile elde edilen voltamogramlara göre biriktirme potansiyeline karşı GSH'a ait akım grafiği

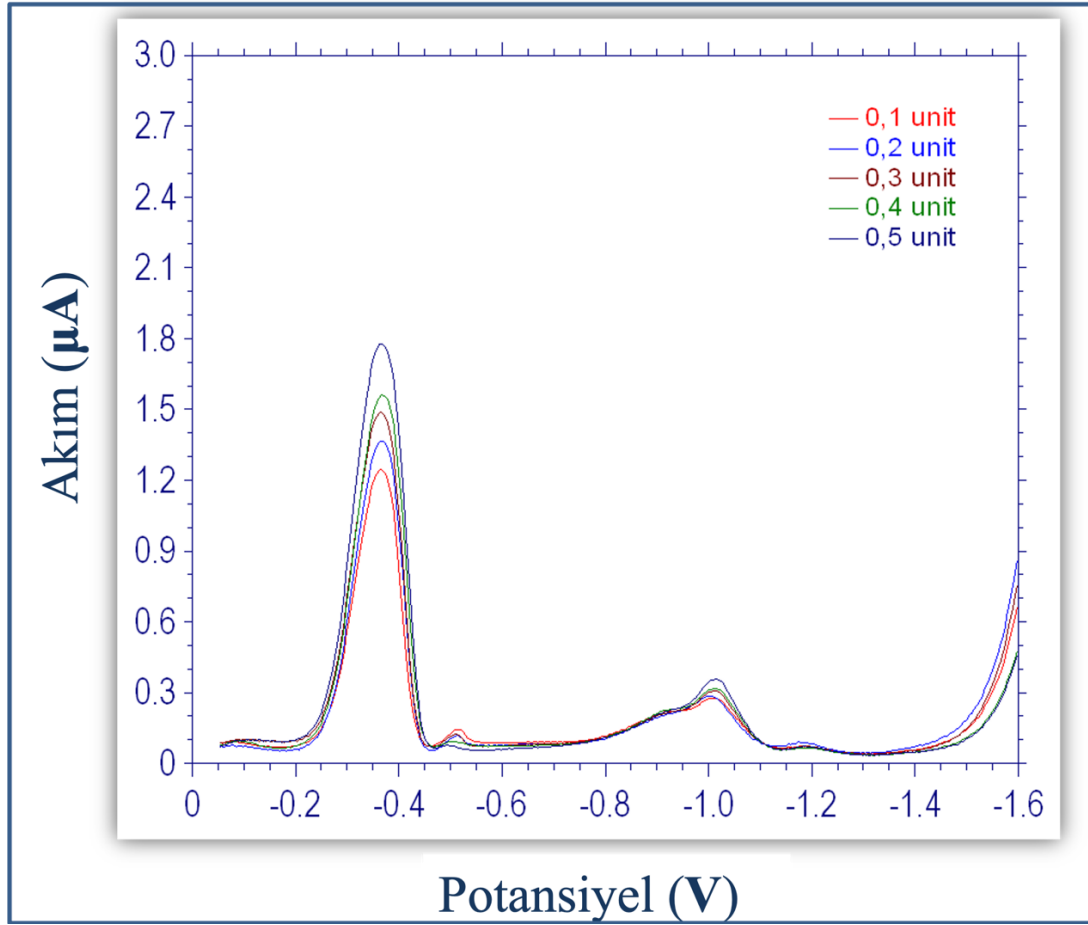
Uygulanan biriktirme potansiyellerinin GSH akımı üzerine etkisi incelenerek Şekil 4.19'daki grafik elde edildi. Akımın en yüksek olduğu potansiyel değerinin -0,25 V olduğu belirlenerek biriktirme potansiyeli optimize edildi.

Enzim derişimindeki artışın GSH akımına etkisi

10 mL destek elektrolit içeren hücreye 200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG eklendikten sonra farklı derişimlerinde GR enzimi eklenerek 10 dakika azot gazı geçirildi.

Çizelge 4.18. Kare dalga katodik sıyrma voltametrisi için potansiyostatın çalışma şartları

Parametre	Değer	Birim
Başlangıç potansiyeli	-0,05	V
Bitiş potansiyeli	-1,6	V
Frekans	15	Hz
Puls genliği	25	mV
Hassasiyet	10^{-6}	A/V
Biriktirme Potansiyeli	-0,25	V
Biriktirme Süresi	60	s



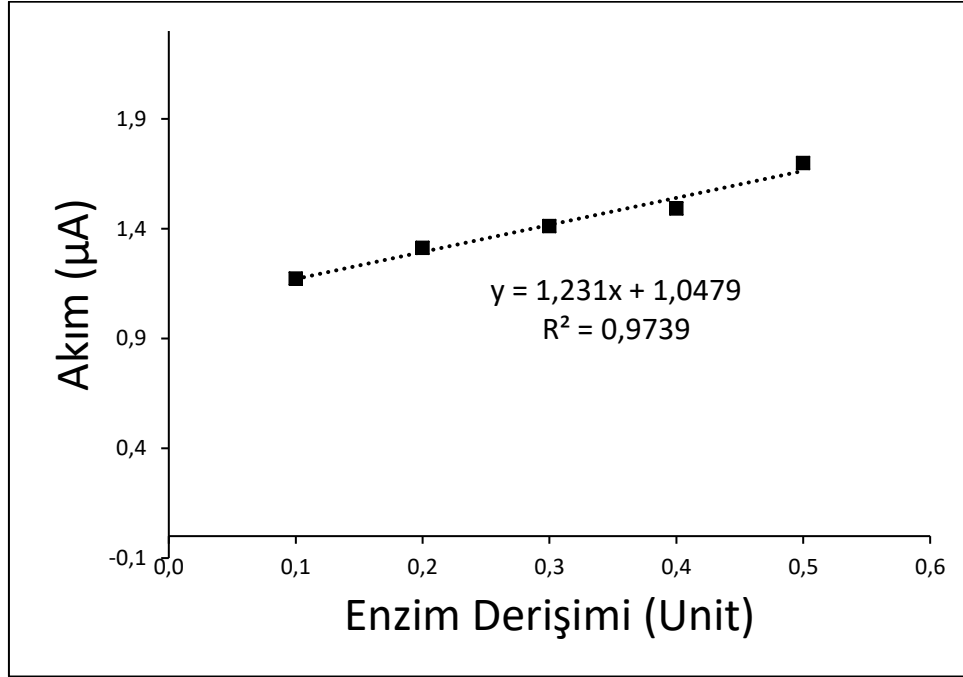
Şekil 4.20. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 unit enzim derişimleri için elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu içerisinde)

Şekil 4.20’de verildiği üzere kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak, 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 unit enzim derişimleri için voltamogramlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.19. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi ile farklı derişimlerde enzim içeren hücrelere karşılık gelen akım değerleri

Derişim (Unit)	Akım (μA)
0,1	1,173
0,2	1,312
0,3	1,411
0,4	1,491
0,5	1,699

Kare dalga katodik sıyrma voltametrisi yöntemiyle asılı cıva damla elektrodu kullanılarak yapılan taramada artan enzim derişimlerine karşılık gelen akım değerleri Çizelge 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.21. Kare dalga katodik sıyrma voltametrisi yöntemi ile elde edilen voltamogramlara göre derişime karşı GSH'a ait akım grafiğı

Kare dalga katodik sıyrma voltametrisi ile elde edilen akım değerlerinin tek başına kare dalga voltametrisine göre daha yüksek akım değerlerine sahip olduğı belirlenmiştir. Bu sebepten ötürü ıspanaktan elde edilen GR enziminin tayininde kullanılacak yöntem kare dalga katodik sıyrma voltametrisi olarak optimize edilmiştir.

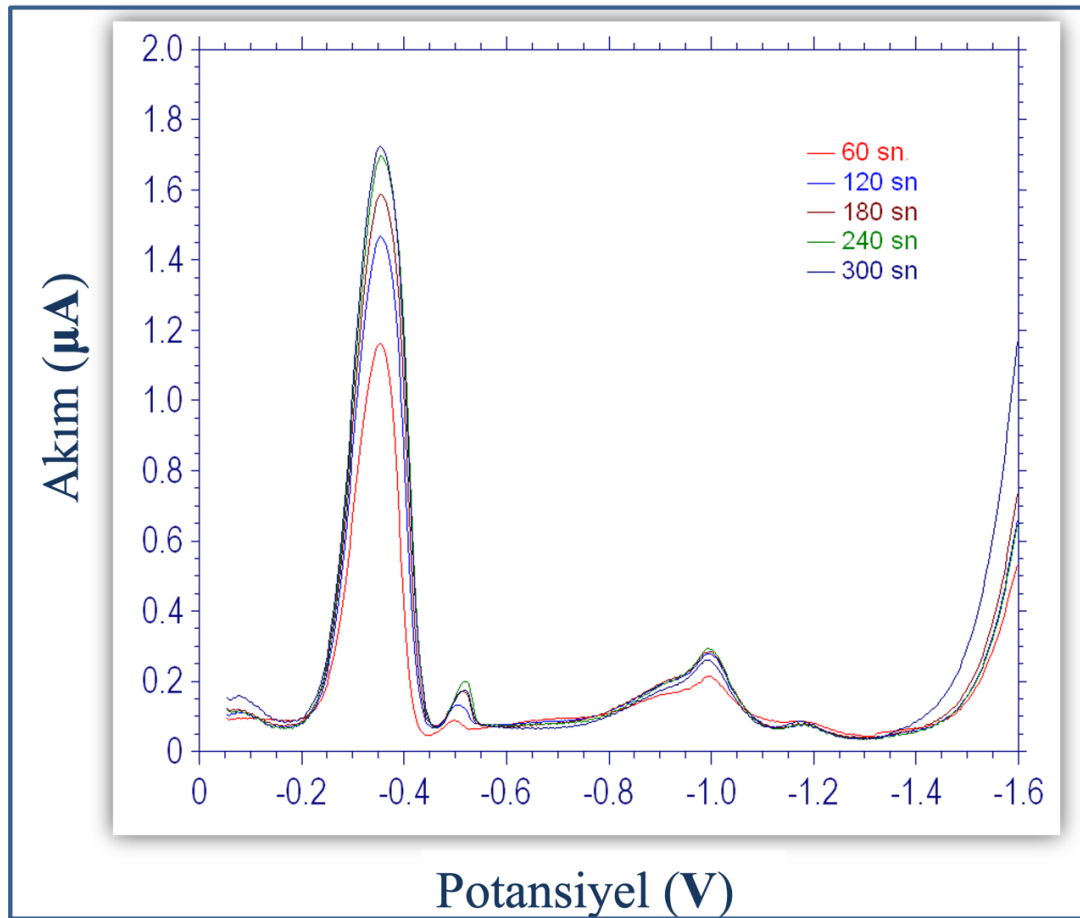
Biriktirme süresinin GSH'ın indirgenme akımına etkisi

10 mL destek elektrolit içeren hücreye 200 µL $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 µL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG, 0,1 unit GR enzimi eklenmiştir. 10 dakika azot geçirildikten sonra kare dalga katodik sıyrma voltametrisi yöntemi kullanılarak -0,25 V biriktirme potansiyelinde farklı biriktirme sürelerinde voltamogramlar elde edilmiştir. Biriktirme süresi arttıkça GSH'a ait pik akımında 240. saniyeye kadar artış, 300. saniyede ise akım değerinin sabit kalmaya başladığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.20. Kare dalga katodik sıyrma voltametrisi ile farklı derişimlerde enzim içeren hücelere ait potansiyostatın çalışma şartları

Parametre	Değer	Birim
Başlangıç potansiyeli	0,05	V
Bitiş potansiyeli	-1,8	V
Frekans	15	Hz
Puls genliğı	25	mV
Hassasiyet	10^{-6}	A/V
Biriktirme Potansiyeli	-0,25	V

Kare dalga katodik sıyrma voltametrisi yöntemi kullanılarak -0,25 V potansiyelinde biriktirme yapılmak üzere farklı biriktirme sürelerinde GSH'ın indirgenme akımına etkisini belirlemek için gerekli optimum parametreler Çizelge 4.20'de verilmiştir.



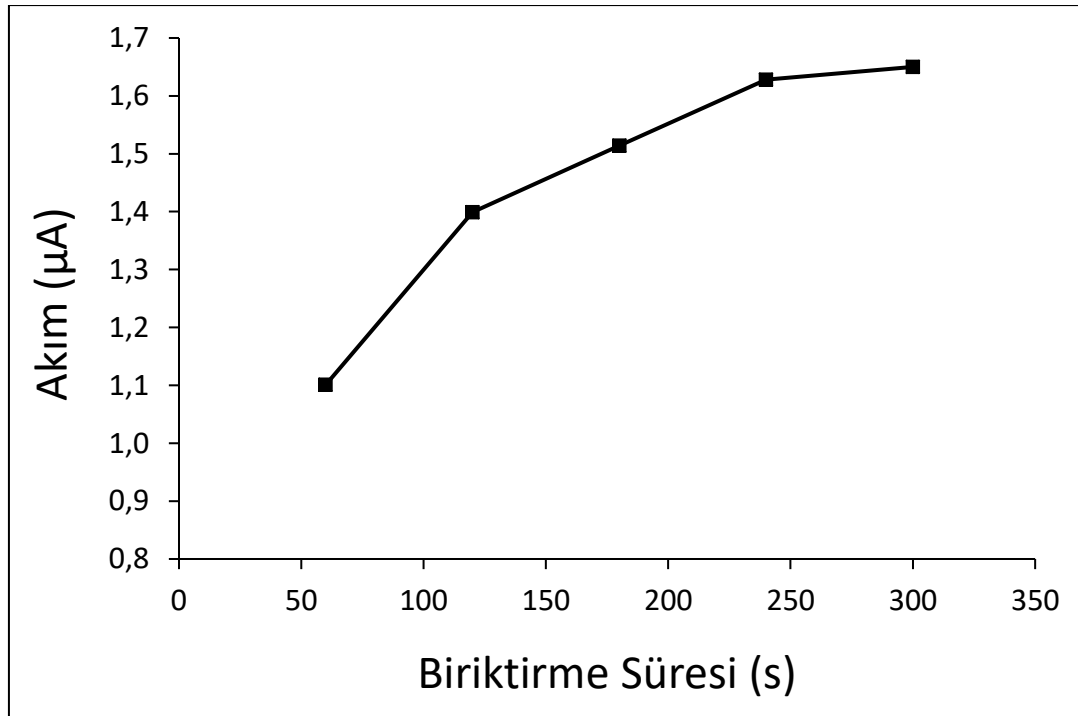
Şekil 4.22. Kare dalga katodik sıyrma voltametrisi ile farklı biriktirme sürelerinde elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu içerisinde)

Ag/AgCl elektroda karşı, çalışma elektrodu olarak asılı cıva damla elektrodu kullanılan çalışmada, -0,25 V biriktirme potansiyelinde ve 60; 120; 180; 240; 360 saniye olmak üzere farklı biriktirme sürelerinde yapılan çalışmadan alınan voltamogramlar Şekil 4.22’de verilmiştir.

Çizelge 4.21. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı biriktirme sürelerine karşı akım değerleri

Biriktirme Süresi (s)	Akım (μA)
60	1,101
120	1,399
180	1,514
240	1,628
300	1,650

Kare dalga sıyırma voltametrisi yöntemi ile asılı cıva damla elektrodu kullanılarak, +0,05 V ile -1,8 V potansiyelleri arasında yapılan çalışmada pH:7,2’de farklı biriktirme sürelerine karşılık gelen akım değerleri Çizelge 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.23. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile elde edilen voltamogramlara göre biriktirme süresine karşı GSH’a ait akım grafiği

Şekil 4.23'te verildiği üzere biriktirme süresinin artışı ile GSH pikine ait akım değerlerinde artış meydana gelmiştir. Buna karşın enzim aktivitesi teorik olarak 1 μmol substratın optimum şartlarda, 60 saniyedeki ürüne dönüştüren enzim miktarı olması sebebiyle biriktirme süresi 60 sn olarak optimize edilmiştir.

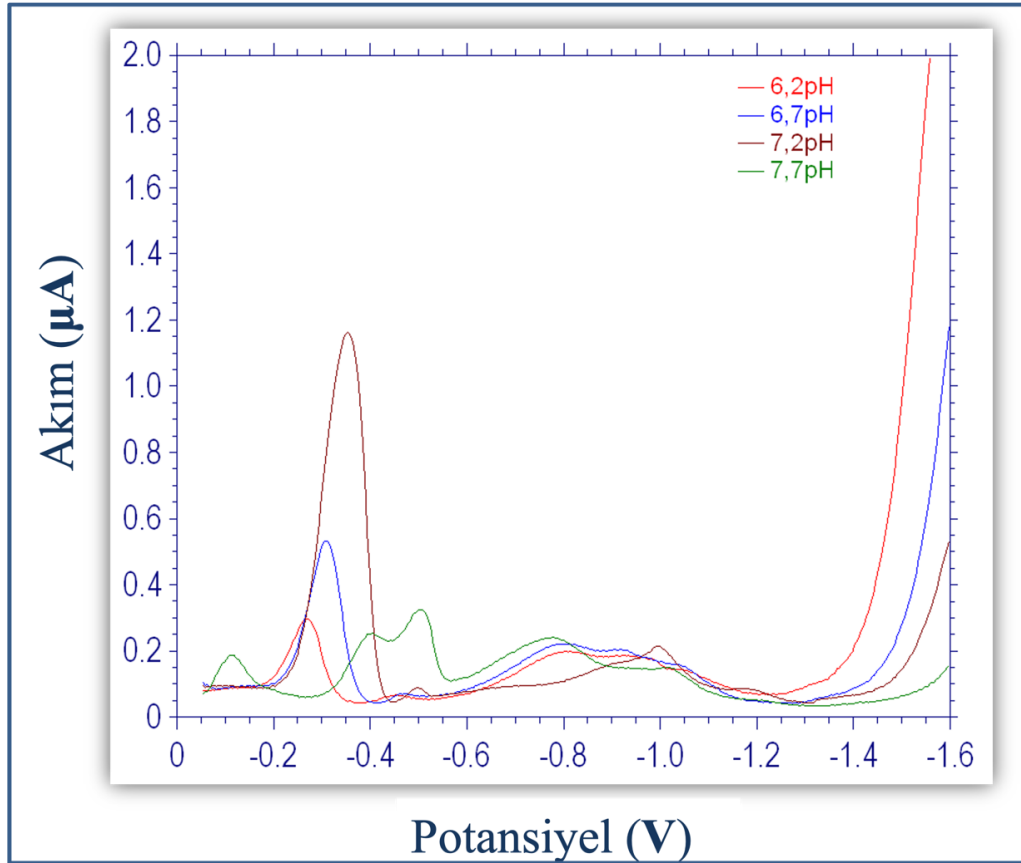
Ortam pH'ının GSH akımına etkisi

Farklı pH'lara sahip tampon çözeltilere sahip hücrelere 200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG ve 0,1 unit GR enzimi eklenerek 10 dakika boyunca hücreden azot gazı geçirildi. En yüksek pik akımının pH=7,2 ortamında elde edildiği belirlenmiştir. Bu sonuç literatür bilgisi ile uyumludur.

Çizelge 4.22. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile ortam pH'ının optimizasyonu için potansiyostatın çalışma şartları

Parametre	Değer	Birim
Başlangıç potansiyeli	0,05	V
Bitiş potansiyeli	-1,8	V
Frekans	15	Hz
Puls genliği	25	mV
Hassasiyet	10^{-6}	A/V
Biriktirme Potansiyeli	-0,25	V
Biriktirme Süresi	60	s

Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi kullanılarak ortam pH'ının GSH akımına etkisini belirleyebilmek için asılı cıva damla elektrodu kullanılarak yapılan çalışmanın çalışma parametreleri Çizelge 4.22'de verilmiştir.



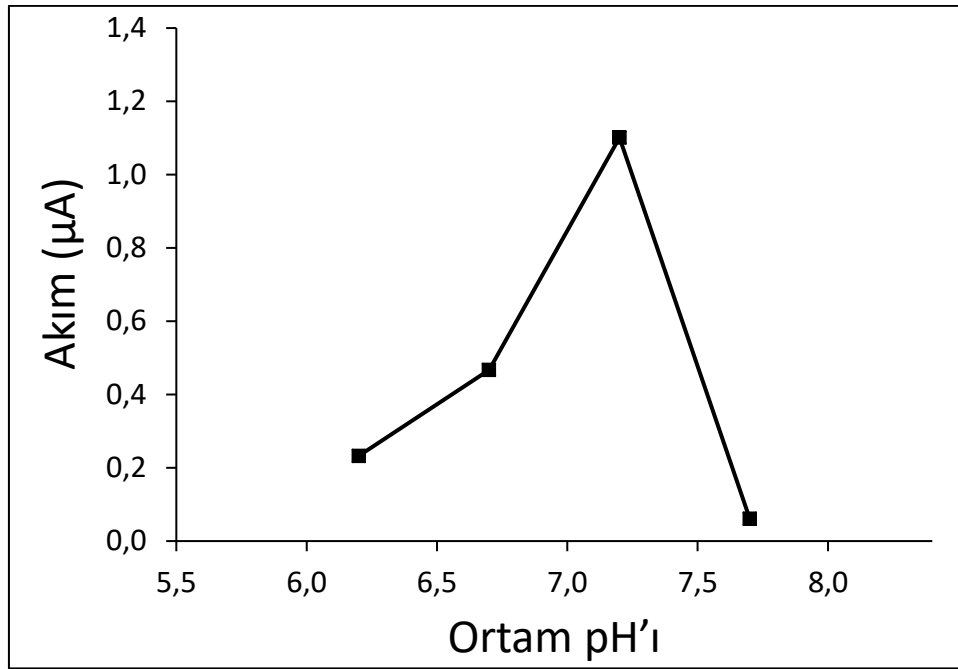
Şekil 4.24. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak farklı pH'larda elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı)

200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG ve 0,1 unit GR enzimi içeren hücrelerde -0,25 V'ta 60 saniye biriktirme yapılarak alınan voltamogramlar Şekil 4.24'te verilmiştir.

Çizelge 4.23. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile farklı pH'a sahip tampon çözeltilere karşılık gelen akım değerleri

pH	Akım (μA)
6,2	0,2326
6,7	0,4671
7,2	1,1010
7,7	0,0605

Şekil 4.24'teki voltamogramlardan elde edilen akım değerleri Çizelge 4.23'te verilmiştir. En yüksek akım değerinin pH:7,2 tamponunda elde edildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.25. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile pH'a karşı GSH'a ait akım grafiği

Kare dalga voltametrisi, kare dalga anodik sıyırma voltametrisi ve kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda 3 yöntem için de pH değerinin optimum koşulunun 7,2 olduğu belirlenmiştir.

4.2.4. Bazı elektrokimyasal yöntemler ile optimizasyon parametrelerinin karşılaştırılması

Kare dalga voltametrisi, kare dalga katodik sıyırma voltametrisi ve kare dalga anodik sıyırma voltametrisi yöntemleri kullanılarak optimizasyon parametreleri karşılaştırılmış olup elde edilen en iyi değerler Çizelge 4.24'te verilmiştir.

Çizelge 4.24. Kullanılan 3 farklı voltametrik yöntem için elde edilen optimum değerler

Yöntem Parametre	Kare Dalga Voltametrisi	Kare Dalga Katodik Sıyırma Voltametrisi	Kare Dalga Anodik Sıyırma Voltametrisi
Enzim Derişimi (Unit)	0,5	0,5	0,5
Ortam pH'ı	7,2	7,2	7,2
Biriktirme Potansiyeli (V)	-	-0,25	-1,10
Biriktirme Süresi (s)	-	300	300

En yüksek pik akımları genel olarak kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi ile elde edilmiştir. Enzim derişimi optimizasyonunda 0,5 unit enzim için kare dalga voltametrisi metodu ile yapılan çalışmada enzim derişimi 0,9279 μA olarak, kare dalga anodik sıyırma voltametrisi ile 1,318 μA olarak kaydedilirken kare dalga katodik sıyırma voltametrisi metodu kullanıldığında 1,699 μA olarak kaydedilmiştir. Kullanılan üç yöntemde de enzim derişimi ile akım arasında doğru orantı olduğu gözlenmiştir. Örneğin; Kare dalga katodik sıyırma voltametrisinde 0,1 unit enzim için ölçülen akım değeri 1,173 μA ; 0,2 unit için 1,312 μA ; 0,3 unit için 1,411 μA ; 0,4 unit için 1,491 μA ; 0,5 unit 1,699 μA olarak ölçülmüştür.

Yapılan tüm yöntemler için en yüksek pik akımı pH 7,2 'de gözlenmesi sebebiyle çalışma ortamı için elde edilen akım değerlerinden yola çıkılarak optimum pH değeri 7,2 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç literatür bilgisi ile örtüşmektedir [58]. pH 7,2'de akım değerleri, kare dalga katodik sıyırma voltametrisi için 1,1010 μA iken kare dalga anodik sıyırma voltametrisi için 0,9848 μA 'dir.

Sıyırma voltametrisi kullanılarak yapılan tüm yöntemlerde biriktirme süresinin 300 saniyede en yüksek pik akımını verdiği belirlenmiştir. Buna karşın enzim aktivitesi teorik olarak 1 μmol substratın optimum şartlarda, 60 saniyedeki ürüne dönüştüren enzim miktarı olması sebebiyle biriktirme süresi 60 saniye olarak optimize edilmiştir.

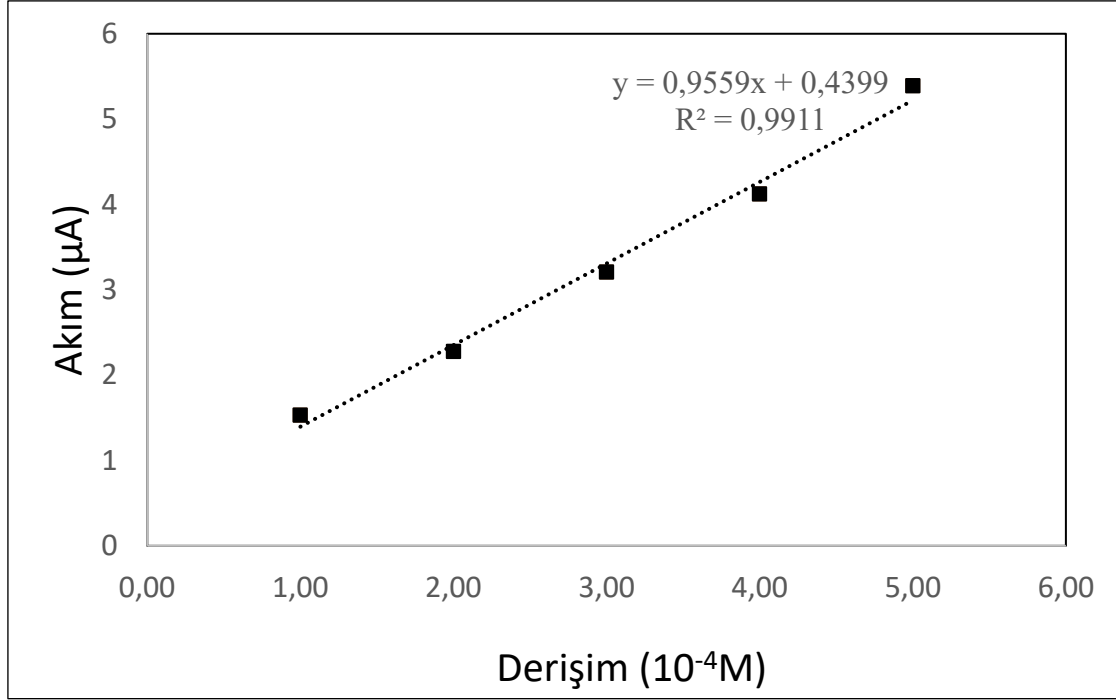
4.3. İndirgenmiş Glutasyon İçin Gözlenebilme ve Tayin Sınırı

10 mL'lik destek elektrolit çözeltisine 200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M NAPDH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG ilave edilerek enzim ilave edilmeden her seferinde reaktifler hücreye yeniden eklenerek 10 deney yapılmıştır. Bu sayede, kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak şahit numuneye ait pikin standart sapması hesaplandı. Elde edilen 10 değerlerin ortalama değeri ve standart sapması hesaplandı.

Çizelge 4.25. Şahit numuneye ait pikin akım değerleri

Tarama	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Standart Sapma	Ortalama
Akım (nA)	12,2	11,8	10,5	8,8	11,6	10,3	9,7	12,4	13,1	11,4	1,32	11,18

Ardından gözlenebilme ve tayin sınırı tayini için hücre içerisinde bulunan 10 mL destek elektrolit çözeltisi üzerine, 1×10^{-2} M GSH çözeltisinden her bir tarama öncesinde sırasıyla 100; 200; 300; 400; 500 μL ilave edilip kare dalga voltametrisi yöntemiyle kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.



Şekil 4.26. GSH'nin gözlenebilme ve tayin sınırının tayini için oluşturulan kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon grafiğiyle elde edilen eğim kullanılarak gözlenebilme sınırı (C_{LOD}) ile tayin sınırı (C_{LOQ}) elde edilir.

$$C_{LOD} = \frac{3\sigma}{m} = \frac{3 \times 1,32 \times 10^{-9} \text{ A}}{0,9559 \times 10^{-2} \frac{\text{A}}{\text{mol/L}}} = 4,14 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$$

$$C_{LOQ} = \frac{10\sigma}{m} = \frac{10 \times 1,32 \times 10^{-9} \text{ A}}{0,9559 \times 10^{-2} \frac{\text{A}}{\text{mol/L}}} = 13,8 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$$

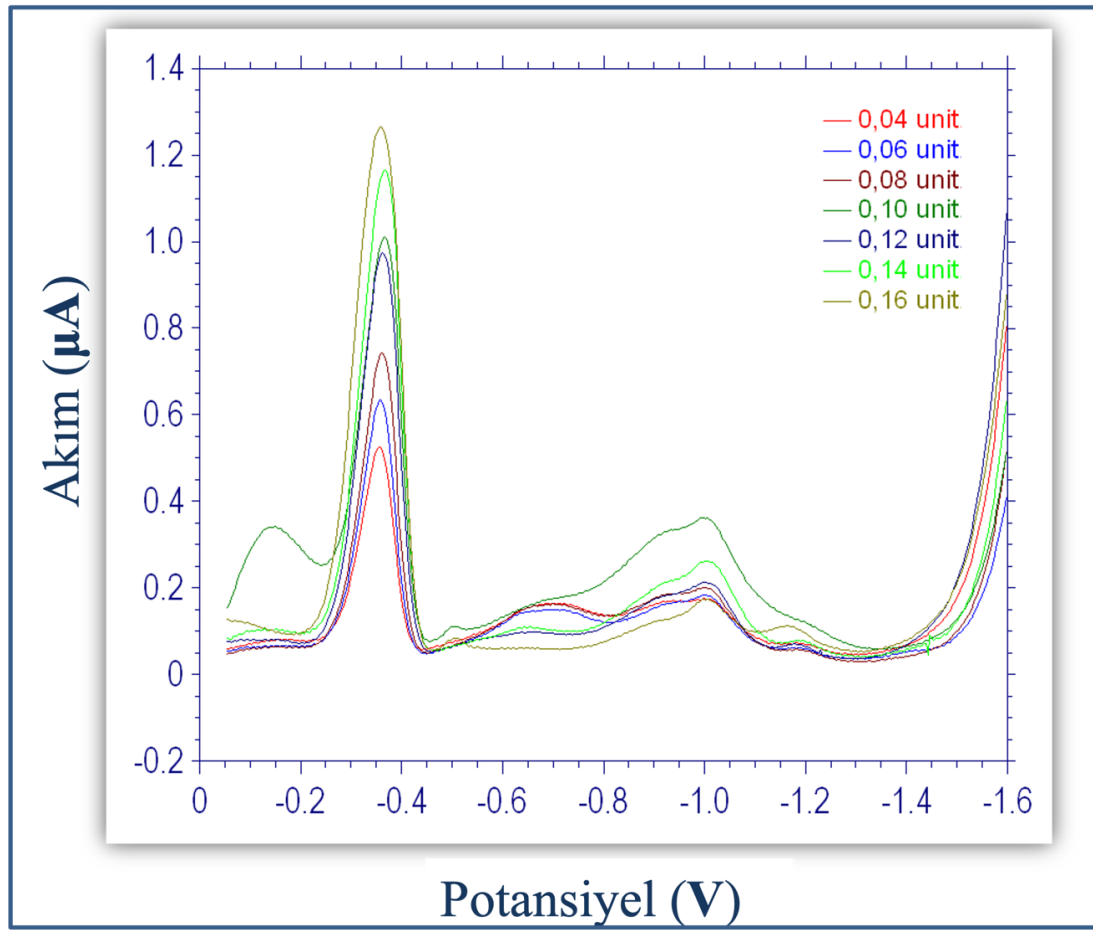
(σ : Standart sapma, m: Kalibrasyon grafiğinin eğim değeri)

Çizelge 4.26. GSH için kalibrasyon grafiği eğim değeri, gözlenebilme ve tayin sınırı değeri

Kalibrasyon grafiği eğimi	Gözlenebilme sınır değeri (C_{LOD}) (mol/L)	Tayin sınır değeri (C_{LOQ}) (mol/L)
0,9559	$4,14 \times 10^{-7}$	$13,8 \times 10^{-7}$

4.4. Kare Dalga Katodik Sıyırma Voltametrisi ile Ispanaktan Elde Edilen GR Enzimi Derişimin Tayini

Destek elektrolit ile 200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG içeren 10 mL hacimli hücrelere sırasıyla 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14; 0,16 unit ticari GR enzimi eklenmiştir. 10 dakika azot geçirildikten sonra kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak voltamogramlar elde edilmiştir. GR Enziminin unit değerlerine karşı elde edilen akım değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.



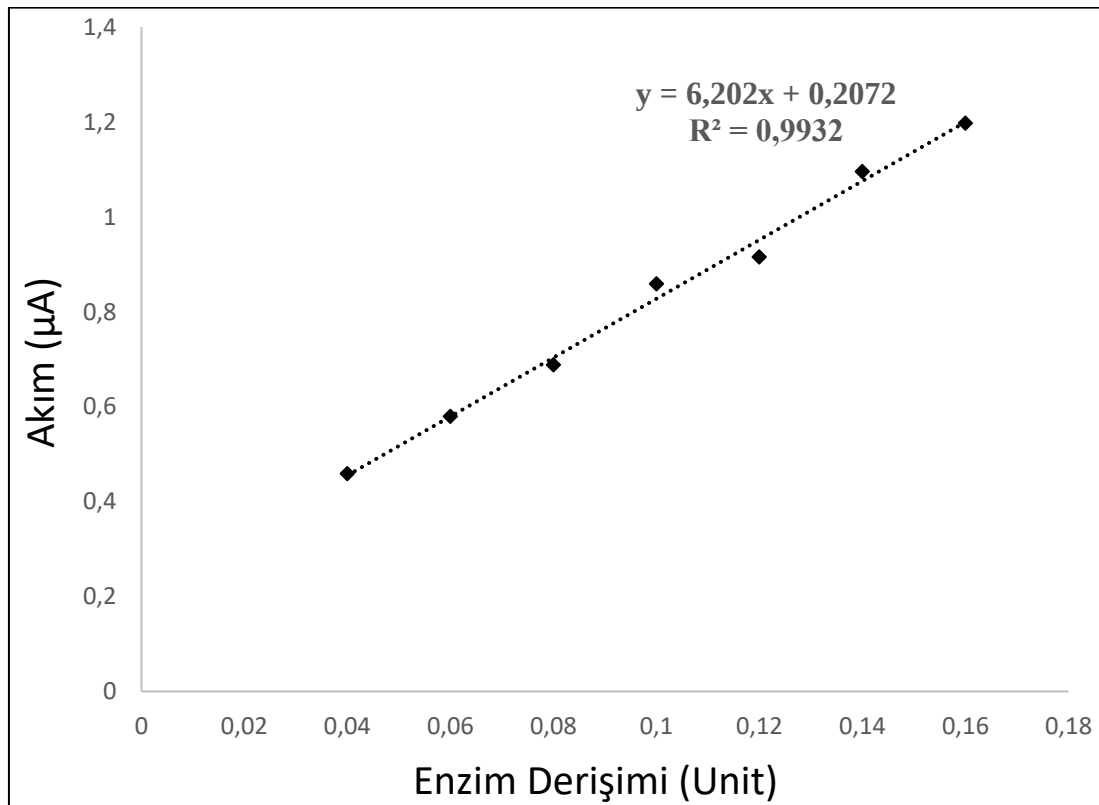
Şekil 4.27. Ticari GR enzimi ile kare dalga sıyırma katodik voltametri yöntemi kullanılarak 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 unit enzim derişimlerinde elde edilen voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu içerisinde)

Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak kalibrasyon grafiği elde edebilmek üzere alınan voltamogramlar Şekil 4.27’de verilmiştir. Yapılan çalışmada çalışma elektrodu olarak asılı cıva damla elektrot kullanılmış olup ortam pH’ı 7.2’dir.

Çizelge 4.27. Ticari GR enzimi ile farklı derişimlere karşı elde edilen akım değerleri

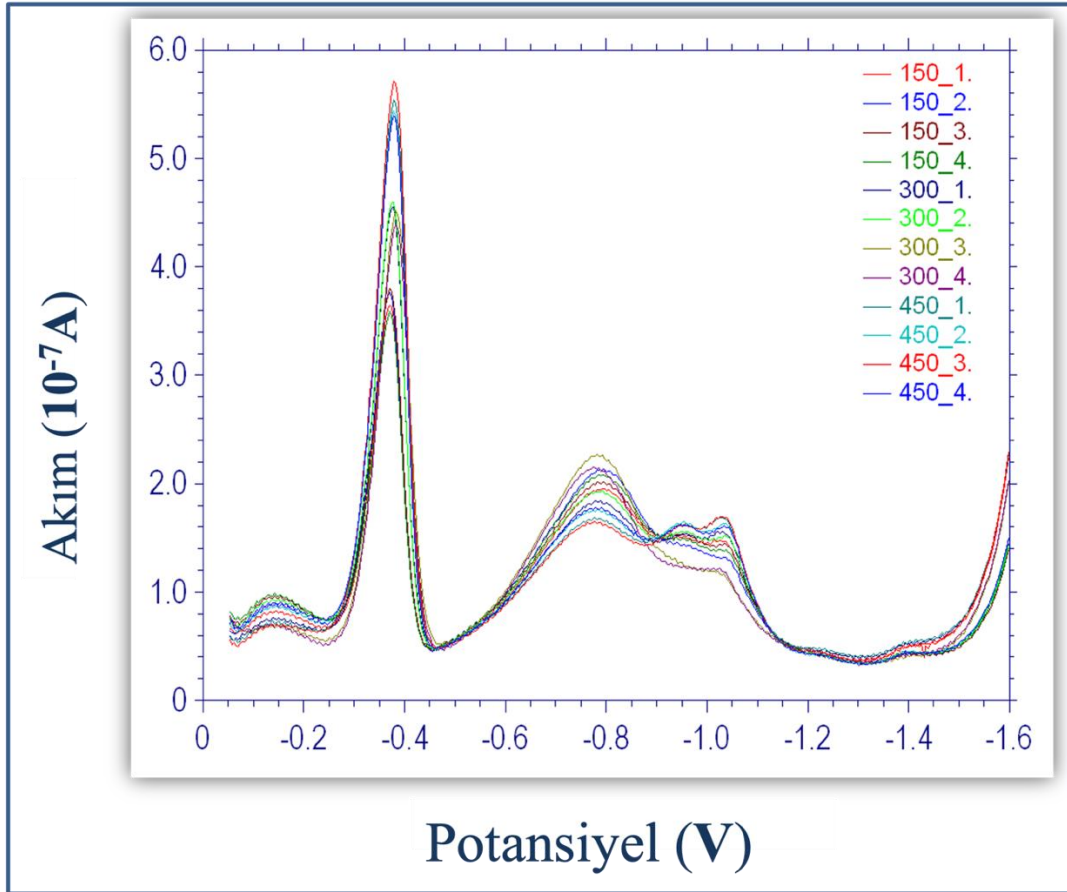
Derişim (Unit)	Akım (μA)
0,04	0,4587
0,06	0,5795
0,08	0,6879
0,1	0,8588
0,12	0,9151
0,14	1,095
0,16	1,197

200 μL $2,5 \times 10^{-3}$ M NAPDH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG içeren 10 mL destek elektrolit içeren hücrelere, kalibrasyon grafiğini elde edebilmek için standart olarak kullanılan GR enzimi ilave edilerek kare dalga katodik sıyrma voltametrisi ile yapılan çalışmada farklı enzim derişimlerinde elde edilen akım değerleri Çizelge 4.27’de verilmiştir. Çalışma elektrodu olarak asılı cıva damla elektrot kullanılmıştır.



Şekil 4.28. Ticari GR enzimi ile kare dalga sıyrma katodik voltametrisi yöntemi kullanılarak farklı derişimlere karşı GSH’a ait akım grafiği

10 mL destek elektrolit içeren hücreye GSSG ile NADPH eklendikten sonra ıspanaktan izole edilen GR enzimi farklı miktarlarda eklenerek 10 dakika azot gazı geçirildi. Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak voltamogramlar elde edilmiştir. Voltamogramlar, ortama 150; 300; 450 μL GR enzimi eklenerek elde edilmiş olup her hacim için dörder kez tekrarlanmıştır. Bunun sonucunda ise toplamda 12 veri elde edilmiştir. Ticari GR enzimi ile oluşturulan kalibrasyon grafiği kullanılarak 1 μmol substratı katalizleyen enzimin unit miktarı bulunmuştur. Enzim aktivitesi teorik olarak 1 μmol substratın optimum şartlarda, 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı olması sebebiyle 1 μmol substrat için hesaplama yapılmıştır.



Şekil 4.29. Ispanaktan elde edilen GR enzimi ile farklı derişimler için elde voltamogramlar (Ag/AgCl elektroda karşı, pH=7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu içerisinde)

pH=7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponunda 10 mL destek elektrolit içerisine $2,5 \times 10^{-3}$ M NADPH, 50 μL $1,0 \times 10^{-2}$ M GSSG ilave edilmiştir. Ardından 100 g ıspanaktan elde edilen ekstraktan 150; 300; 450 μL alınarak elektrokimyasal hücreye ayrı ayrı eklenmesi ile elde

edilen voltamogramlar Şekil 4.29’da verilmiştir. Yapılan çalışmada kare dalga katodik sıyırma voltametrisi kullanılmış olup çalışma elektrodu asılı cıva damla elektrodudur.

Çizelge 4.28. Ispanaktan elde edilen GR enzimi ile farklı derişimlere karşı elde edilen aktivite değerleri

Veri Sayısı	Ispanak ekstraktı (µL)	Akım Değeri (µA)	Unit Miktarı	Enzim Aktivitesi (U/mL)
1.	150	0,3096	0,0165	0,1100
2.	150	0,3201	0,0182	0,1213
3.	150	0,3207	0,0183	0,1220
4.	150	0,3000	0,0149	0,0993
5.	300	0,4004	0,0311	0,1036
6.	300	0,4022	0,0314	0,1046
7.	300	0,3989	0,0309	0,1030
8.	300	0,3893	0,0293	0,0976
9.	450	0,4989	0,0470	0,1040
10.	450	0,4869	0,0451	0,1002
11.	450	0,5170	0,0499	0,1109
12.	450	0,4815	0,0442	0,0982

100 g ıspanaktan izole edilen GR enzimi çözeltisinden, 150; 300; 450 µL olmak üzere 3 farklı hacimde alınarak dörder tekrarlı deneylerden elde edilen toplam 12 verinin ortalaması ıspanaktan izole edilen enzim aktivitesini vermektedir. Ispanaktan izole edilen enzimin aktivitesi kalibrasyon grafiğı yardımıyla hesaplanmıştır.

Yapılan 1. Deneyde reaktiflerin bulunduğu hücreye ıspanak ekstraktından 150 µL eklendiğinde akım değeri 0,3096 µA olarak kaydedilmiştir. $y = 6,202x + 0,2072$ denkleminde enzim miktarı 0,0165 unit olarak hesaplanarak ekstrakttaki enzim aktivitesi $0,1024 \text{ unit}/0,15 \text{ mL} = 0,1100 \text{ unit/mL}$ olarak bulunur. 3 farklı numune hacmi kullanılarak yapılan 12 deney için aynı şekilde unit/mL cinsinden enzim aktivitesi hesaplanır. Yapılan

hesaplamaların sonucunda ıspanaktan izole edilen GR enziminin aktivitesi 0,0083'lük standart sapma ile 0,1062 U/mL olarak bulunmuştur. (n=12)

Ayrıca F testi için sadece aynı hacimdeki ıspanak ekstraktları kullanılarak 10 tekrarlı bir deney daha yapılmıştır.

Çizelge 4.29. Ispanaktan elde edilen GR enzimi ile aynı derişimde elde edilen aktivite değerleri

Tekrar Sayısı	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Standart Sapma
Enzim Aktivitesi (U/mL)	0,1040	0,1002	0,1109	0,0982	0,1012	0,1037	0,1042	0,1043	0,1042	0,1005	0,0044

450 µL ıspanak içeren hücrelerle yapılan 10 çalışma için standart sapma 0,0044 olarak hesaplanarak Çizelge 4.29'da verilmiştir. Bulunan bu değer F testinde kullanılmıştır.

4.5. UV-GB Spektroskopisi Yöntemi ile Ispanaktan Elde Edilen GR Enziminin Tayini

Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi kullanılarak tespit edilen GR enziminin derişiminin doğruluğunu belirleyebilmek için literatürde yaygın olarak kullanılan UV-GB spektroskopisi yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde 340 nm'de NADPH'ın absorbanı ölçülerek dolaylı yoldan GR enziminin derişimi hesaplanmıştır.

Çizelge 4.30. UV-GB spektroskopisi yöntemi ile ıspanaktan izole edilen GR enzimi derişim tayini

Absorbans (ΔA) Zaman (s)	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	Ortalama	Standart Sapma
60	0,315	0,312	0,314	0,318	0,311	0,312	0,313	0,319	0,315	0,310	0,314	0,003

1.dakikada absorban değışimi kullanılarak enzim derişimi:

$$E_{U/mL} = \frac{0,314}{6,22} \times \frac{3,0 \text{ mL}}{1,5 \text{ mL}} = 0,1010 \text{ U/mL olarak hesaplanmıştır.}$$

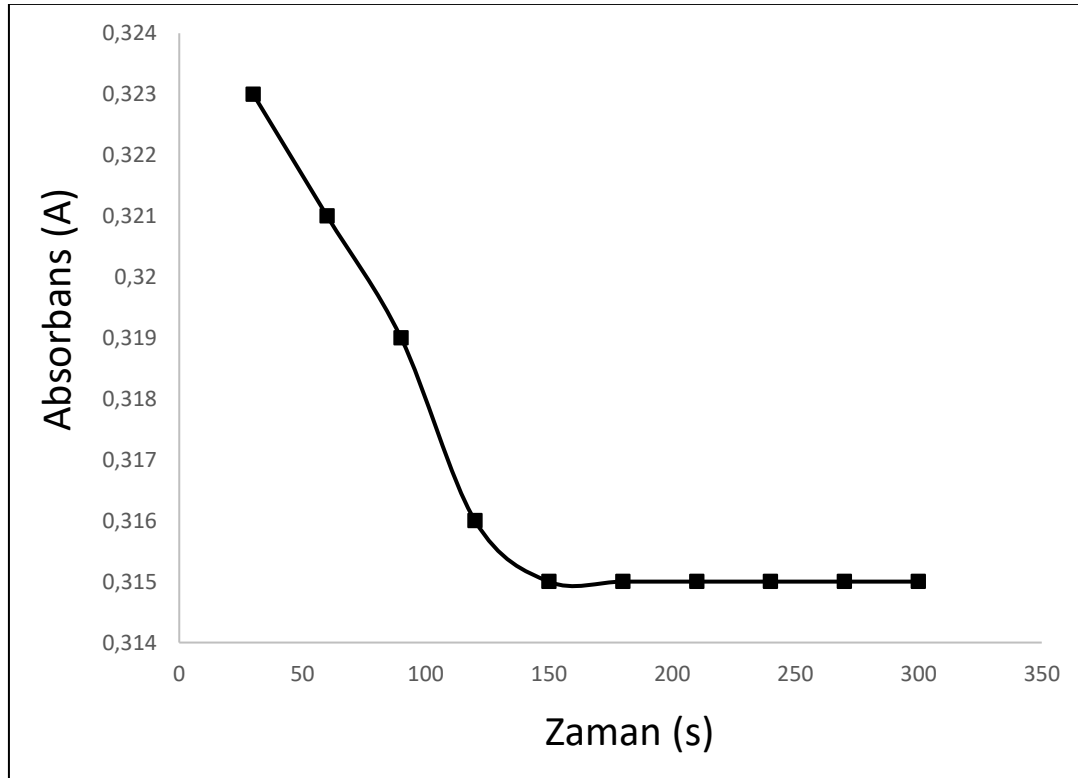
10 tekrarlı deneyde absorbans farkları alınarak yapılan işlemler sonucunda enzim ünitesinin ortalaması 0,314 unit olarak hesaplanmıştır. Bunun sonucunda da enzim aktivitesi 3×10^{-3} lük standart sapma ile 0,1010 U/mL bulunmuştur. (N=10)

Buradan elde edilen sonuç ile kare dalga katodik sıyırma voltametriyle yapılan yöntem kullanılarak yüzde hata hesabı yapılmıştır.

$$\% \text{ Hata} = \frac{\Delta X}{X_t} \times 100$$

$$\% \text{ Hata} = \frac{|0,1062 - 0,1010|}{0,1010} \times 100$$

$$\% \text{ Hata} = 5,15$$



Şekil 4.30. İspanaktan izole edilen GR enzimine ait absorbansa karşı zaman grafiği

4.5.1. UV-GB spektroskopisi yöntemi ile karşılaştırılarak kesinliğin belirlenmesi

F testi, iki ölçüm grubunun kesinliğini karşılaştırmak için yapılan bir yöntemdir. F testi bu iki ölçüm grubunun kesinlikleri hakkında bilgi edinmek için yapılır. GR tayininde kare dalga katodik sıyırma voltametrisi yöntemi kullanılarak geliştirilen yeni yöntemin kesinliği için F testi kullanılarak literatürde yaygın kullanılan UV-GB spektroskopisi yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Bunun için Şekil 4.31’de verilen F değeri hesaplanmıştır.

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

Şekil 4.31. İki örneklem varyansının oranından elde edilen F değeri

$F = (4,4 \times 10^{-3})^2 / (3,0 \times 10^{-3})^2$ değeri hesaplanarak 2,15 bulunmuştur. Ek 1.’de verilen %95 güven seviyesinde $F_{\text{kritik}} = 3,18$ bulunmuştur. $F < F_{\text{kritik}}$ olması sebebiyle geliştirilen yeni yöntemin kesinlikleri arasında belirgin bir fark yoktur. UV-GB spektroskopisi yöntemi kullanılarak hesaplanan standart sapma değeri literatür bilgisi ile uyumludur [59].

5. SONUÇLAR

- GR enzimi; elektroaktif bir bileşik olan GSH'ın, NADPH ile GSSG'nin GR katalizörlüğünde 1:1 oranında reaksiyona girmesi sayesinde tayin edilebilmiştir. U/mL cinsinden enzim aktivitesini hesaplayabilmek için, 1 μ mol substratın optimum şartlarda, 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarından yola çıkılarak gerekli substrat miktarı için hesaplama yapılmıştır.
- Kare dalga voltametrisi, kare dalga katodik sıyırma voltametrisi ve kare dalga anodik sıyırma voltametrisi gibi 3 farklı voltametrik yöntem kullanılarak optimizasyon parametreleri her bir yöntem için tekrarlanmıştır. Bunun sonucunda kare dalga sıyırma voltametrisinin diğer voltametrik yöntemlere karşı üstünlük sağladığı gözlemlenmiştir.
- Yapılan deneyde GR enzimini hızlı ve yüksek tekrarlanabilirlik ile tayin edebilmek için damlayan cıva elektrot kullanılarak kare dalga sıyırma voltametrisi ile yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Ispanaktan izole edilen GR enziminin aktivitesi bu yöntem ile tayin edildiğinde 0,1062 U/mL olarak hesaplanmıştır. Geleneksel bir yöntem olan UV-GB spektroskopisi yöntemi kullanıldığında ise 0,1010 U/mL olarak hesaplanmıştır. Buradan elde edilen verilerden hata değeri %5,15 hesaplanmıştır.
- Bulunan sonuçlar, GR enzimi tayini için geleneksel bir yöntem olan UV-GB spektroskopisi ile kare dalga sıyırma voltametrisi ile karşılaştırılarak iki yöntemin kesinliği arasında belirgin bir fark olmadığı bulunmuştur. Literatürde yaygın olarak kullanılan UV-GB spektroskopisi yöntemi kullanılarak yeni yöntemin kesinliği F testi ile belirlenmiştir. Ayrıca, kare dalga sıyırma voltametrisinin daha düşük hacimlerdeki numune miktarıyla çalışma olanağı sağladığı belirlenmiştir.
- Yapılan çalışmada GSH'ın elektrokimyasal özelliklerinin belirlenerek sınır akımı $1,962 \times 10^{-9}$ A, Cottrell eğimi $2,499 \times 10^{-7}$, difüzyon katsayısı $1,849 \times 10^{-5}$ cm²/s, indirgenme esnasında mol başına transfer edilen elektron sayısı 2 olarak hesaplanmıştır. Difüzyon kontrollü olduğu saptanmış olup elektrokimyasal olarak tersinir olmadığı, GSH'ın 'ECE' mekanizmasıyla indirgendiği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., and Casini, A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1499-1503.
2. Trivedi, D. K., Gill, S. S., Yadav, S., and Tuteja, N. (2013). Genome-wide analysis of glutathione reductase (GR) genes from rice and Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, 8(2), e23021.
3. Temel, Y., Bozkuş, T., ve Çiftçi, M. (2017). Glutatyon Redüktaz (GR) Enziminin Japon Bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 7(3), 143-150.
4. Mannervik, B. (1999). Measurement of glutathione reductase activity. *Current Protocols in Toxicology*, (1), 7-2.
5. Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., and Tuteja, N. (2013). Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 204-212.
6. Carlberg, I., and Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113, 484-490.
7. Anderson, M. E. (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*, 111, 1-14.
8. Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9-10), 916-921.
9. Zhang, H., Limphong, P., Pieper, J., Liu, Q., Rodesch, C. K., Christians, E., and Benjamin, I. J. (2012). Glutathione-dependent reductive stress triggers mitochondrial oxidation and cytotoxicity. *The FASEB Journal*, 26(4), 1442-1451.
10. Griffith, O. W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9-10), 922-935.
11. Xiong, Y., Uys, J. D., Tew, K. D., and Townsend, D. M. (2011). S-glutathionylation: from molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(1), 233-270.
12. Frendo, P., Baldacci-Cresp, F., Benyamina, S. M., and Puppo, A. (2013). Glutathione and plant response to the biotic environment. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 724-730.
13. Clemens, S. (2006). Evolution and function of phytochelatase synthases. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), 319-332.
14. Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S. J., and Willmore, W. G. (2017). A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. *Fish and Fisheries*, 18(5), 928-942.

15. Sisein, E. A. (2014). Biochemistry of free radicals and antioxidants. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 2(2), 110-118.
16. Yousuf, P. Y., Hakeem, K. U. R., Chandna, R., and Ahmad, P. (2012). Role of glutathione reductase in plant abiotic stress. In *Abiotic stress responses in plants*. New York: Springer, 149-158.
17. Bayr, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*, 33(12), 498-501.
18. Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., and Bharwana, S. A. (2015). The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8148-8162.
19. Singh, S., Kumar, V., Chauhan, A., Datta, S., Wani, A. B., Singh, N., and Singh, J. (2018). Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. *Environmental Chemistry Letters*, 16(1), 211-237.
20. Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S. M., Qian, P., Xin, W., Li, H. Y., and Tran, L. S. P. (2015). Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science*, 6, 420.
21. Dikalov, S. I., and Harrison, D. G. (2014). Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(2), 372-382.
22. Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1-13.
23. Glazener, J. A., Orlandi, E. W., and Baker, C. J. (1996). The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiology*, 110(3), 759-763.
24. D'Autréaux, B., and Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813-824.
25. Robinson, P. K. (2015). Enzymes: Principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1-41.
26. Renneberg, R., and Loroeh, V. (2016). *Biotechnology for beginners*. Cambridge: Academic Press, 65-69.
27. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2002). *Glycolysis is an energy-conversion pathway in many organisms*. *Biochemistry*. 5th ed. New York: WH Freeman, 21-26.
28. Blanco, A., and Blanco, G. (2017). Medical Biochemistry, In Blanco, A., Blanco, G., Eds, *Chapter 8—Enzymes*. Cambridge: Academic Press, 153-175.
29. Horn, H. D. (1965). Glutathione reductase. In *Methods of enzymatic analysis*. Cambridge: Academic Press, 875-879.

30. de Lamotte, F., Vianey-Liaud, N., Duviau, M. P., and Kobrehel, K. (2000). Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4978-4983.
31. Yu, J., and Zhou, C. Z. (2007). Crystal structure of glutathione reductase Glr1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 68(4), 972-979.
32. Edwards, E. A., Rawsthorne, S., and Mullineaux, P. M. (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 180(2), 278-284.
33. Foyer, C. H., and Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1), 21-25.
34. Wrotek, S., Sobocińska, J., Kozłowski, H. M., Pawlikowska, M., Jędrzejewski, T., and Działuk, A. (2020). New insights into the role of glutathione in the mechanism of fever. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1393.
35. Iwamoto, Y., Kodera, M., and Hitomi, Y. (2015). Uncaging a catalytic hydrogen peroxide generator through the photo-induced release of nitric oxide from a {MnNO} 6 complex. *Chemical Communications*, 51(46), 9539-9542.
36. Wu, Y., Jiang, L., Ning, G., Chu, L., Liu, W., Wang, Y., and Zhao, Y. (2019). A Sensitive and Simple Impedance Sensing Strategy for Glutathione and Glutathione Reductase Activity Detection. *Journal of Analytical Chemistry*, 74(5), 505-512.
37. Ivaska, A., and Bobacka, J. (2005). *Process Analysis. Electroanalytical Techniques*, Amsterdam: Elsevier, 187-192.
38. Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., and Dempsey, J. L. (2018). A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197-206.
39. Choudhary, Y. S., Jothi, L., and Nageswaran, G. (2017). Electrochemical characterization. In *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, Amsterdam: Elsevier, 19-54.
40. Achterberg, E. P., Gledhill, M., and Zhu, K. (2018). *Voltammetry—cathodic stripping*. Amsterdam: Elsevier, 165-170.
41. Baranski, A. S., Fawcett, W. R., and Gilbert, C. M. (1985). Use of microelectrodes for the rapid determination of the number of electrons involved in an electrode reaction. *Analytical Chemistry*, 57(1), 166-170.
42. Ma, S., and Huang, Q. (2015). A SERS study of oxidation of glutathione under plasma irradiation. *RSC Advances*, 5(71), 57847-57852.
43. Park, H. W., and Kim, J. D. (2009). Mucoadhesive interaction of cysteine grafted poly (2-hydroxyethyl aspartamide) with pig mucin layer of surface plasmon resonance biosensor. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 15(4), 578-583.

44. Treger, R. S., Cook, A., Rai, G., Maloney, D. J., Simeonov, A., Jadhav, A., and Vermeire, J. J. (2012). Oxadiazole 2-oxides are toxic to the human hookworm, *Ancylostoma ceylanicum*, however glutathione reductase is not the primary target. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 171-177.
45. Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, 27(3), 502-522.
46. Jiang, H., Su, X., Zhang, Y., Zhou, J., Fang, D., and Wang, X. (2016). Unexpected thiols triggering photoluminescent enhancement of cytidine stabilized Au nanoclusters for sensitive assays of glutathione reductase and its inhibitors screening. *Analytical Chemistry*, 88(9), 4766-4771.
47. Maity, D., and Govindaraju, T. (2013). A turn-on NIR fluorescence and colourimetric cyanine probe for monitoring the thiol content in serum and the glutathione reductase assisted glutathione redox process. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11(13), 2098-2104.
48. Yin, G., Xin, X., Song, C., Chen, X., Zhang, J., Wu, S., and Lu, X. (2014). Activity levels and expression of antioxidant enzymes in the ascorbate–glutathione cycle in artificially aged rice seed. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 1-9.
49. Lee, P. T., Goncalves, L. M., & Compton, R. G. (2015). Electrochemical determination of free and total glutathione in human saliva samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 221, 962-968.
50. Gashevskaya, A. S., Dorozhko, E. V., Korotkova, E. I., Pashkovskaya, E. A., Voronova, O. A., Plotnikov, E. V., and Lipskikh, O. I. (2020). Voltammetric Method for Determination of Glutathione on a Gold-Carbon-Containing Electrode. *Inorganic Materials*, 56(14), 1362-1368.
51. Mazloun-Ardakani, M., Tavakolian-Ardakani, Z., and Banitaba, H. (2020). Electrochemical determination of glutathione in hemolyzed erythrocytes. *Scientia Iranica*, 27(6), 3412-3420.
52. Yuan, B., Zeng, X., Deng, D., Xu, C., Liu, L., Zhang, J., and Pang, H. (2013). Electrochemical determination of glutathione based on an electrodeposited nickel oxide nanoparticles-modified glassy carbon electrode. *Analytical Methods*, 5(7), 1779-1783.
53. Rao, M. V., Paliyath, G., and Ormrod, D. P. (1996). Ultraviolet-B-and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 110(1), 125-136.
54. W. D. Loomis. (1974). Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods in Enzymology*, 31, 528-544
55. Internet: Sigma Aldrich. *Enzymatic Assay of Glutathione Reductase (EC 1.6.4.2)*. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/955/043/glutathionereductase.pdf>

56. Nicholson, R. S., and Shain, I. (1964). Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Analytical Chemistry*, 36(4), 706-723.
57. Bard, A. J., and Faulkner, L. R. (2001). Fundamentals and applications. *Electrochemical Methods*, 2(482), 580-632.
58. Karacan, M. S., Rodionova, M. V., Tunç, T., Venedik, K. B., Mamaş, S., Shitov, A. V., and Allakhverdiev, S. I. (2016). Characterization of nineteen antimony (III) complexes as potent inhibitors of photosystem II, carbonic anhydrase, and glutathione reductase. *Photosynthesis Research*, 130(1), 167-182.
59. İnternet: ZeptoMetrix. *Glutathione Reductase Assay Kit*. URL: <https://www.zeptometrix.com/media/documents/PI0805004.pdf>

EKLER

EK-1. %95 güven seviyesi için kritik F değerleri

Serbestlik Derecesi	2	4	6	9	10	11	12	20
2	19,00	19,25	19,33	19,38	19,40	19,40	19,41	19,45
4	6,94	6,39	6,16	6,00	5,96	5,94	5,91	5,80
6	5,14	4,53	4,28	4,10	4,06	4,03	4,00	3,87
9	4,26	3,63	3,37	3,18	3,14	3,10	3,07	2,94
10	4,10	3,48	3,22	3,02	2,98	2,94	2,91	2,77
11	3,98	3,36	3,09	2,90	2,85	2,82	2,79	2,65
12	3,89	3,26	3,00	2,80	2,75	2,72	2,69	2,54
20	3,49	2,87	2,60	2,39	2,35	2,31	2,28	2,12



GAZİ GELECEKTİR..