

**DOĞAL KAYNAKLARDAN GLUTATYON ELDE EDİLMESİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE FARMASÖTİK FORMDA
DEĞERLENDİRİLMESİ**

FATMANUR BOSTAN

**DOKTORA TEZİ
DOĞAL BİTKİSEL VE KOZMETİK ÜRÜNLER ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. UFUK KOCA ÇALIŞKAN**

DÜZCE, 2024

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOĞAL KAYNAKLARDAN GLUTATYON ELDE EDİLMESİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE FARMASÖTİK FORMDA
DEĞERLENDİRİLMESİ

Fatmanur BOSTAN tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Haydar GÖKSU

Düzce Üniversitesi

Doç. Dr. Ceyhan HACIOĞLU

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Seyhun YURDUGÜL

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Yasin HAZER

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 17/09/2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

17 Eylül 2024

Fatmanur BOSTAN



TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimimde, bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN'a en içten dileklerimle teşekkür ederim. Tez izleme komitemde yer alan Prof. Dr. Haydar GÖKSU ve Doç. Dr. Ceyhan HACIOĞLU' na destekleri ve yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca laboratuvar olanaklarını sunan, malzeme ve cihaz desteği sağlayan Nobel İlaç Arge' ye çok teşekkür ederim. Analitik analizlerde sağladığı katkılardan dolayı Farmasötik Arge Uzmanı Mukaddes DİKCİ, karakterizasyon çalışmalarında Farmasötik Arge Teknisyeni Cabir DİKCİ ve Farmasötik Arge Uzmanı Sinem YETİM ve liyofilizasyon çalışmalarında Farmasötik Arge Uzmanı Pelin İrem SERT'e değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Akademik eğitimim boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, bu hayattaki en büyük şansım olduğunu düşündüğüm sevgili ailem, başta babam Çetin BOSTAN, annem Vesile BOSTAN ve kardeşim İbrahim BOSTAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Her zaman yanımda olan desteklerini hep hissettiğim sevgili arkadaşlarım Gülce GÜRALP, Kübra ÇELİK ve Yasemin ACAR'a çok teşekkür ederim.

Doktora sürecinde en zor zamanlarda desteklerini her daim hissettiğim Cemre TOSUN ve Sümeyye ZARF TOKAN'a çok teşekkür ederim.

Son olarak, doktora eğitimim süresince TUBİTAK 2244 Sanayi Doktorası Programı kapsamında 118C153 numaralı "Tıbbi ve Aromatik Bitkilerden Katma Değeri Yüksek Hammadde Eldesi" isimli projede bursiyer olarak destekte bulunan TUBİTAK'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi 2023. 14.02.1383 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

17 Eylül 2024

Fatmanur BOSTAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
KISALTMALAR.....	xi
SİMGELER.....	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
EXTENDED ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. GLUTATYON'UN YAPISI VE FONKSİYONLARI.....	1
1.1.1. GSH Sentezi	2
1.1.2. GSH'un Yapısı.....	3
1.1.3. GSH ve Redoks Sinyalleşme.....	4
1.1.4. GSH'ın Antioksidan Fonksiyonu.....	5
1.1.5. Glutasyon ve Biyotransformasyon.....	6
1.2. GLUTATYONUN ANALİTİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ.....	8
1.2.1. UV-Vis Spektrofotometresi ile Glutasyon Analizi.....	8
1.2.2. Florimetrik Yöntem ile Glutasyon Analizi.....	9
1.2.3. Biyoluminesans ile Glutasyon Analizi	9
1.2.4. Kapiler Elektrophorez ile Glutasyon Analizi.....	10
1.2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Glutasyon Analizi	10
1.2.5.1. HPLC -UV	10
1.2.5.2. HPLC-Elektrokimyasal Dedektör (HPLC-ECD).....	11
1.2.5.3. HPLC-FL.....	12
1.2.6. Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometrisi (LC-MS), (LC-MS/MS) ile Glutasyon Analizi	13
1.3. DOĞAL KAYNAKLARDAN GLUTATYON ELDE EDİLMESİNE YÖNELİK YAPILAN ÇALIŞMALAR	14
1.4. HİDROJELLER	15
1.4.2. Fiziksel Çapraz Bağlı Hidrojel.....	16
1.4.3. Kimyasal Çapraz Bağlı Hidrojel	16
1.5. ENJEKTE EDİLEBİLİR HİDROJELLER	16
1.5.2. Enjekte Edilebilir Hidrojel Hazırlamak İçin Kullanılan Materyallerin Özellikleri.....	17
1.5.2.1. Doğal Polimer	18
1.5.2.2. Sentetik Polimer	19
1.6. GLUTATYONUN FARMASÖTİK DEĞERLENDİRİLMESİ	20
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
2.1. BİTKİ ÖRNEKLERİNİN TEMİNİ	22
2.2. REAKTİFLER VE KİMYASALLAR	22

2.3. CİHAZLAR.....	22
2.4. KİMYASAL ÇÖZELTİLER VE HAZIRLANIŞLARI.....	23
2.5. GLUTATYON (GSH) EKSTRAKSİYONU VE ULTRAVİYOLE DEDEKTÖRLÜ HPLC (HPLC-UV) METODU	25
2.5.1. Sulu Numuneden Liyofilize Bitki Örneklerin Ekstraksiyonu.....	25
2.5.2. Sulu Numuneden Taze Bitki Örneklerin Homojenizatör ile Ekstraksiyonu.....	26
2.5.3. Glutasyon İçeriğinin Ultraviyole Dedektörlü HPLC (HPLC-UV) ile Kantitatif Tayini.....	26
2.6. GLUTATYON EKSTRAKSİYONU VE FLORESANS DEDEKTÖRLÜ HPLC (HPLC-FLD) METODU	26
2.6.1. Sulu Numuneden Liyofilize Bitki Örneklerin Ekstraksiyonu.....	26
2.6.2. Sulu Numuneden Taze Bitki Örneklerin Homojenizatör ile Ekstraksiyonu.....	27
2.6.3. Glutasyon İçeriğinin Floresans Dedektörlü HPLC (HPLC-FLD) ile Kantitatif Tayini.....	28
2.7. GLUTATYON REDÜKTE (GSH) VE OKSİDE (GSSG) FORMLARININ ORANLARININ BELİRLENMESİ	28
2.8. GLUTATYONUN HPLC-UV ANALİTİK SİSTEMDEN SAFLAŞTIRILMASI	29
2.9. SAFLAŞTIRILAN LİYOFİLİZE GLUTATYONUN KARAKTERİZASYONU	29
2.9.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	29
2.9.2. Raman Spektroskopisi.....	29
2.10. ENJEKTE EDİLEBİLİR HİDROJEL FORM TASARIMI	30
2.10.1. Enjektde Edilebilir Glutasyon (GSH) Bazlı Hidrojellerin Hazırlanması	30
2.11. ENJEKTE EDİLEBİLİR GLUTATYON (GSH) BAZLI HİDROJELİN KARAKTERİZASYONU	30
2.11.1. Z-Ortalama ve Polidispersite İndeksi	30
2.11.2. Zeta Potansiyel Ölçümü.....	31
2.11.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	31
2.11.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)	31
2.11.5. Sol-Jel Geçiş Özelliği.....	31
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	32
3.1. BİTKİ ÖRNEKLERİNDEN GLUTATYONUN ANALİTİK ANALİZİ.....	32
3.1.1. Bitki Örneklerinde Glutasyonun Ultraviyole Dedektörlü HPLC (HPLC- UV) Analiz Sonuçları ve Değerlendirilmesi.....	32
3.1.2. Bitki Örneklerinde Glutasyonun Floresans Dedektörlü HPLC Analiz Sonuçları ve Değerlendirilmesi	37
3.2. BİTKİ ÖRNEKLERİNDE GLUTATYON REDÜKTE (GSH) VE OKSİDE (GSSG) FORMLARININ ORANLARININ SONUÇLARI VE DEĞERLENDİRİLMESİ.....	42
3.3. SAFLAŞTIRILAN LİYOFİLİZE GLUTATYONUN KARAKTERİZASYONU	45
3.3.1. Saflaştırılan Liyofilize Glutasyonun Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Spektrum Sonuçları ve Değerlendirilmesi	45
3.3.2. Saflaştırılan Liyofilize Glutasyonun Raman Spektrum Sonuçları ve Değerlendirilmesi	46
3.4. ENJEKTE EDİLEBİLİR GLUTATYON (GSH) BAZLI HİDROJELİN	

KARAKTERİZASYONU	47
3.4.1. Z-Ortalama ve Polidispersite İndeksi Sonuçları ve Değerlendirilmesi...	48
3.4.2. Zeta Potansiyel Ölçümü Sonuçları ve Değerlendirilmesi	49
3.4.3. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları ve Değerlendirilmesi	51
3.4.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Sonuçları ve Değerlendirilmesi	53
3.4.5. Enjekte Edilebilir Hidrojellerin Görünümünün Değerlendirilmesi	54
4. SONUÇ.....	56
5. KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	72



ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. 1. Glutasyonun yapısı.....	2
Şekil 1. 2. Hücrede GSH sentezi.....	3
Şekil 1. 3. Glutasyon, indirgenen (tiyol-indirgenen) (L-GSH) formunun ve oksitlenen (disülfid-okside) (GSSG) formunun kimyasal yapısı.	4
Şekil 1. 4. Hücre içi protein redoks durumunun glutasyon (GSH) ve glutaredoksin (Grx) ve tioredoksin (Trx) tarafından düzenlenmesi.....	5
Şekil 1. 5. GSH antioksidan fonksiyonu.....	6
Şekil 1. 6. Ksenobiyotik metabolizmasının faz I ve II.....	8
Şekil 1. 7. Hidrojel oluşumunun şematik gösterimi.	15
Şekil 2. 1. Serbest sülfidril grupları içeren tiyol bileşikleri ile NPM çözeltisinin reaksiyonu.	27
Şekil 2. 2. Enjekte edilebilir glutasyon bazlı hidrojellerin hazırlama aşamaları. [BioRENDER tarafından oluşturuldu]	30
Şekil 3.1. Analizi yapılan liyofilize brokoli bitki örneğine ait HPLC-UV analizi ile elde edilen kromotogramı.....	32
Şekil 3. 2. Analizi yapılan liyofilize ıspanak bitki örneğine ait HPLC-UV analizi ile elde edilen kromotogramı.....	33
Şekil 3. 3. Analizi yapılan liyofilize lahana bitki örneğine ait HPLC-UV analizi ile elde edilen kromotogramı.....	33
Şekil 3. 4. Analizi yapılan liyofilize semizotu bitki örneğine ait HPLC-UV analizi ile elde edilen kromotogramı.....	34
Şekil 3. 5. Analizi yapılan taze brokoli bitki örneğine ait HPLC-UV analizi ile elde edilen kromotogramı.	34
Şekil 3. 6. Analizi yapılan taze ıspanak bitki örneğine ait HPLC-UV analizi ile elde edilen kromotogramı.	35
Şekil 3. 7. Analizi yapılan taze lahana bitki örneğine ait HPLC-UV analizi ile elde edilen kromotogramı.	35
Şekil 3. 8. 1000 ppm konsantrasyonda GSH standart kromotogramı.....	36
Şekil 3. 9. GSH standart eğrisi.....	36
Şekil 3. 10. NPM ile türevlendirilen liyofilize brokoli bitki örneğine ait HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromotogramı.....	38
Şekil 3. 11. NPM ile türevlendirilen liyofilize ıspanak bitki örneğine ait HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromotogramı.....	38
Şekil 3. 12. NPM ile türevlendirilen liyofilize lahana bitki örneğine ait HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromotogramı.....	39
Şekil 3. 13. NPM ile türevlendirilen taze brokoli bitki örneğine ait HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromotogramı.....	39
Şekil 3. 14. NPM ile türevlendirilen taze ıspanak bitki örneğine ait HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromotogramı.....	40
Şekil 3. 15. NPM ile türevlendirilen taze lahana bitki örneğine ait HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromotogramı.....	40
Şekil 3. 16. NPM ile türevlendirilen 10 ppm konsantrasyonda GSH standart kromatogramı.	41
Şekil 3. 17. Türevli GSH standart eğrisi.....	41
Şekil 3. 18. 405 nm absorbansa karşı GSSG konsantrasyonu.	43
Şekil 3. 19. 405 nm absorbansa karşı GSH konsantrasyonu.	43

Şekil 3. 20. 414 nm absorbansa karşı GSSG konsantrasyonu.	44
Şekil 3. 21. 414 nm absorbansa karşı GSH konsantrasyonu.	44
Şekil 3. 22. Saflaştırılan liyofilize glutatyonun FTIR spektrumu.	46
Şekil 3. 23. Saflaştırılan liyofilize glutatyonun Raman spektrumu.	47
Şekil 3. 24. Enjekte edilebilir glutatyon (GSH) bazlı ve GSH içeren bitki ekstre bazlı hidrojel lerin liyofilizasyon öncesi ve sonrası görüntüsü, a) GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojel, b) GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojel.	48
Şekil 3. 25. GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojin zeta potansiyel ölçümü.	50
Şekil 3. 26. GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojin zeta potansiyel ölçümü.	51
Şekil 3. 27. GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojin FTIR spektrumu.	52
Şekil 3. 28. GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojin FTIR spektrumu.	52
Şekil 3. 29. GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojin DSC termogramı.	53
Şekil 3. 30. GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojin DSC termogramı.	54
Şekil 3. 31. Enjekte edilebilir jel görüntüleri, a) GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojel, b) GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojel.	55

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 2. 1. HPLC-UV GSH standart çözeltilerinin hazırlanışı.	24
Çizelge 2. 2. HPLC-FLD GSH standart çözeltilerinin hazırlanışı.....	25
Çizelge 2. 3. Liyofilize bitki ekstraktların türevlendirme reaksiyonları.....	27
Çizelge 2. 4. Taze bitki ekstraktların türevlendirme reaksiyonları.....	28
Çizelge 3. 1. Liyofilize ve taze bitki örneklerinin GSH içeriğinin HPLC-UV analizi ile belirlenen miktarları.	37
Çizelge 3. 2. Liyofilize ve taze bitki örneklerinin GSH içeriğinin HPLC-FLD analizi ile belirlenen miktarları.	42
Çizelge 3. 3. Bitki örneklerine ait GSH/ GSSG oranları.	45
Çizelge 3. 4. Z-Ortalama ve Polidispersite indeksi sonuçları.....	49

KISALTMALAR

Cys	Sistein
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DTNB	5,5'- ditiobis-nitrobenzoik
ECD	Elektrokimyasal Dedektör
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
FDNB	1-Floro-2,4-dinitrobenzen
FLD	Floresans Dedektörlü
FMN	Flavin mononükleotidi
FTIR-ATR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
GI	Spektroskopisi
GPx	Gastrointestinal
GSH	GSH peroksidaz
GSSG	Redükte glutatyon
HA	Okside glutatyon
HPLC	Hyaluronik asit
H ₃ PO ₄	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS	Fosforik asit
mCB	Sıvı Kromatografi-Mass Spektrofotometri
NaClO ₄	Monoklorobiman
NaClO ₄ *H ₂ O	Sodyum perklorat
NPM	Sodyum perklorat monohidrat
NEM	N- (lpyrenyl)maleimide
OPA	N-ethylmaleimide
PEG 4000	o-ftaldialdehit
PPF	Polietilen Glikol 4000
PVA	Poliipropilen Fumarat
SH	Polivinil Alkol
UV	Sülfidril grubu
	Ultraviyole

SİMGELER

°C	Santrigrad derece
γ	Gama
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
μm	Mikrometre
Au	Altın
Al	Aliminyum
Ba	Baryum
Ca	Kalsiyum
cm	Santimetre
COOH	Karboksil
Da	Dalton
dk	Dakika
g	Gram
H ₂ O	Su
Hg	Cıva
M	Molar
mbar	Milibar
Mg	Magnezyum
mg	Miligram
mm	Milimetre
Mm	Milimolar
mL	Mililitre
N	Azot
N	Normal
NH ₂	Amin
nm	Nanometre
OH	Hidroksit
ppm	Pikomol
rpm	Devir sayısı
sa	Saat
SO ₃ H	Sülfonik Asit
Sr	Stronsiyum

ÖZET

DOĞAL KAYNAKLARDAN GLUTATYON ELDE EDİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE FARMASÖTİK FORMDA DEĞERLENDİRİLMESİ

Fatmanur BOSTAN

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Eylül 2024, 71 sayfa

Glutasyon (GSH), hücrelerde sentezlenen düşük molekül ağırlıklı glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan bir tripeptittir. GSH, hücreleri oksidatif hasardan ve ksenobiyotik elektrofillerin toksisitesinden korumanın yanı sıra redoks homeostazını sürdürmede kritik roller oynar. GSH, çok sayıda temel biyolojik süreçte yer alan ve çeşitli dejeneratif hastalıklara müdahalelerde kullanılan güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir. GSH'ın oral yolla verilmesi gastrointestinal (GI) sistemdeki fizikokimyasal bariyerler nedeniyle diğer protein ve peptit ilaçlarına benzer şekilde zorlu olmaya devam etmekte ve düşük oral biyoyararlanıma neden olmaktadır. Dağılımı iyileştirmek için hidrojeller, nanopartiküller içine kapsülleme, mikroemülsiyonlar ve lipozomlar gibi klinik terapötik etkilere sahip uygun formülasyonlar yeni nesil stratejiler kullanılmaktadır. Bu çalışmada, öncelikle, donmuş ve taze brokoli (*Brassica oleracea*), ıspanak (*Spinacia oleracea*), lahana (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) ve semizotu (*Portulaca oleracea*)'dan etkili GSH düzeyleri elde edilmesini sağlandı. GSH'ı niceliksel olarak ve niteliksel olarak belirlemek için UV ve floresan dedektörlü HPLC kullanarak analitik yöntemler geliştirildi ve sonuçlar karşılaştırıldı. HPLC-UV sonuçlarına göre en yüksek GSH seviyesi liyofilize ıspanak bitkisi ile elde edilirken taze semizotu bitkisinden pik elde edilemedi. HPLC-FLD sonuçlarına göre en yüksek GSH seviyesi liyofilize ıspanak bitkisinde elde edilirken taze ve liyofilize semizotu bitkisinden pik elde edilemedi. HPLC sonuçları karşılaştırıldığında, sonuçlarda her iki analitik yöntem için de benzer sonuçlara ulaşıldı. Daha sonra araştırma, terapötik çalışmalar için farmasötik bir ürün geliştirme nihai hedefiyle GSH'ın biyoyararlılığını artırmaya yönelik stratejilere odaklandı. Bu amaçla doğal kaynaklı glutasyon bazlı enjekte edilebilir hidrojel ve ticari glutasyon bazlı enjekte edilebilir hidrojel tasarlandı. Kimyasal yapı açısından benzer sonuçlar elde edilirken, doğal kaynaklı glutasyon bazlı enjekte edilebilir hidrojelin daha iyi homojen bir dağılıma sahip olduğu gözlemlendi. Sonuçlar, doğal kaynaklı glutasyon bazlı enjekte edilebilir hidrojel stratejisinin, oldukça gelişmiş antioksidan ve biyoaktif özelliklere sahip yeni nesil GSH bazlı hidrojel için yeni bir strateji olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan, Biyomalzeme, Enjekte edilebilir hidrojel, Glutasyon, Tiyol

ABSTRACT

PURIFICATION OF GLUTATHIONE OBTAINED FROM NATURAL SOURCES AND EVALUATION IN PHARMACEUTICAL FORM

Fatmanur BOSTAN

Düzce University

Graduate School, Department of Natural, Herbal and Cosmetic Products

Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

September 2024, 71 pages

Glutathione (GSH) is a tripeptide consist of low molecular weight glutamic acid, cysteine and glycine amino acids synthesized in cells. GSH plays critical roles in protecting cells from oxidative damage and the toxicity of xenobiotic electrophiles and maintaining redox homeostasis. GSH is with potent antioxidant activity, which is involved in numerous basic biological processes and has been used for interventions in various degenerative diseases. Oral delivery of GSH remains challenging similarly to that of other protein and peptide drugs, due to physicochemical barriers in the gastrointestinal (GI) tract, which cause to low oral bioavailability. To improve delivery, new generation strategies are used such as hydrogels, encapsulation into nanoparticles, microemulsions and liposomes, appropriate formulations with clinical therapeutic effects. In the thesis, first of all, that lyophilized and fresh broccoli (*Brassica oleracea*), spinach (*Spinacia oleracea*), cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*), and purslane (*Portulaca oleracea*) were used to obtain efficient levels of GSH. We enhanced analytical methods both by using HPLC with an ultraviolet detector and a fluorescence detector to determine GSH quantitatively and qualitatively, and then compared the results. In the results of HPLC-UV, the highest level of GSH was obtained with the lyophilized spinach plant. However, no peak was obtained in fresh purslane. In the results of HPLC-FLD, the highest level of GSH was obtained with the lyophilized spinach plant. Likewise, no peak was obtained in fresh and lyophilized purslane. When the HPLC results were compared, the results achieved similar results for both analytical methods. Then, the research was focused on strategies to enhance the bioavailability of GSH, with the ultimate goal of developing a pharmaceutical product for therapeutic studies. To this end, natural-source glutathione-based injectable hydrogel and commercial glutathione-based injectable hydrogel were designed. While similar results were obtained in terms of chemical structure, a natural-source glutathione-based injectable hydrogel had a better homogeneous distribution. The results indicate that a novel strategy for a new generation GSH based on injectable hydrogel from natural sources with highly improved antioxidant and bioactive properties.

Keywords: Antioxidant, Biomaterials, Glutathione, Injectable hydrogel, Thiol

EXTENDED ABSTRACT

PURIFICATION OF GLUTATHIONE OBTAINED FROM NATURAL SOURCES AND EVALUATION IN PHARMACEUTICAL FORM

Fatmanur BOSTAN

Düzce University

Graduate School, Department of Natural, Herbal and Cosmetic Products

Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

September 2024, 71 pages

1. INTRODUCTION

Glutathione (GSH) is the most important low molecular weight tripeptide, with the chemical name γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine and is the major intracellular non-protein thiol compound. The sulfhydryl group of the cysteine is the site active responsible for its biochemical properties to involve reduction and conjugation reaction. Glutathione is also included physiological processes such as detoxification of xenobiotics, transport of amino acids, stabilization of cell membranes and synthesis of proteins and DNA. Glutathione is found in cells in 2 forms: the reduced (L-GSH) form and the oxidized form (GSSH). Intracellular glutathione is usually founded in the reduced form contains 98% of the total content. The antioxidant function of GSH is generally accepted to be associated with its scavenging. Activity toward free radicals that accumulate during oxidative stress thus protecting living cells by neutralizing excessive ROS from oxidative damage. In the levels of glutathione reduction can cause excess oxidative stress in various disease processes such as diabetes, alcoholic liver diseases, cancer, Parkinson's disease, human immunodeficiency virus (HIV) infection, multiple sclerosis, carcinogenesis and aging. In addition, as the GSH / GSSG ratio is considered to be an early indicator of oxidative stress or disease risk. Glutathione levels, which increase can help prevent and/or mitigate the progression of these diseases.

Sensitive quantitative and qualitative techniques can be used to determine glutathione in cells. These analytical techniques are UV-vis spectrophotometry, GSH Analysis with Fluorometry, Bioluminescence, Capillary Electrophoresis and HPLC analysis. HPLC techniques are more frequently used to determinate the content of GSH than other methods. HPLC methods are fast, have high specificity, and are very reproducible.

Oral delivery of GSH remains challenging similarly to that of other protein and peptide drugs, because the physicochemical barriers in the gastrointestinal (GI) tract lead to low

oral bioavailability. Several approaches are exploring to improve delivery, such as hydrogels, encapsulation into nanoparticles, microemulsions and liposomes, appropriate formulations with clinical therapeutic effects. To overcome this limitation, injectable hydrogel can be formed by physical or chemical crosslinking of polymer matrix into 3D and hydrophilic polymer networks. In this way, it gives rise to some interesting synergistic characteristics for use in drug delivery, biomaterials and tissue engineering.

In the thesis, first of all, to obtain efficient levels of GSH from natural sources, lyophilized and fresh plant samples from selected broccoli (*Brassica oleracea*), spinach (*Spinacia oleracea*), cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) purslane (*Portulaca oleracea*) were optimized extraction. We developed analytical methods using both HPLC with an ultraviolet detector and HPLC with a fluorescence detector to determine GSH quantitatively and qualitatively, and then compared the results. Then, the research was aimed at enhancing the bioavailability of GSH, with the goal of developing a pharmaceutical product. For this purpose, the structural properties of natural-source glutathione-based injectable hydrogel and commercial glutathione-based injectable hydrogel were compared.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Preparation of aqueous sample extracts for determination of glutathione content

For lyophilized plant sample extraction, in the lyophilizer, the plants were gradually dried from -45 °C to -20 °C under a vacuum pressure of 0,133 mbar for 72 hours. Broccoli, cabbage, purslane and spinach which dried were powdered. 1 g sample of powdered plants was placed in 12 mL of solvent (%0,1 H₃PO₄ 50 mM NaClO₄, pH 2.50) and kept in ice for 1 hour with occasional stirring. The extract was centrifuged at 8500 rpm for 15 min at 4 °C and supernatants were filtered through 0,20 µm PET 20/25 filter. For fresh plant sample extraction, 1 g sample of plants was placed in 12 mL of solvent (%0.1 H₃PO₄ 50 mM NaClO₄, pH ~2.50). The samples were homogenised at 3000 rpm in 12 mL of solvent using a tissue tearor on ice for 5 min, with 1-s intervals of homogenisation. The extract was centrifuged at 8500 rpm for 15 min at 4 °C and the supernatants were filtered through 0,20 µm PET 20/25 filter.

2.2. Quantitative determination of glutathione with Ultraviolet Detector HPLC (HPLC-UV) and Fluorescence Detector (HPLC-FL)

For ultraviolet (UV) detector HPLC analysis, UV detector was set at 215 nm and oven

temperature of 25°C for absorption measurements. The HPLC column was ACE 5 C18 column (5µm packing material) with the dimensions of 250 x 4,6 mm. The mobile phase was buffer (0,1% H₃PO₄ 50 mM NaClO₄, pH 2.5). The injection volume was 20 µL for all of the samples. The supernatants were eluted from the column isocratically at a flow rate of 0,7 mL/min and run time 12 min. For fluorescence (FLD) detector HPLC analysis, to prepare fluorescent derivatives, supernatant (50 µL lyophilized broccoli, 200 µL lyophilized cabbage and 130 µL lyophilized spinach) was derivatized with 750 µL of NPM (1 mM in acetonitrile) and completed volume to 1000 µL with distilled water. This compound reacts with the free sulfhydryl groups to form fluorescent derivatives. The resulting solution was mixed and incubated at room temperature for 5 min. 10µL of 2 N HCl were added to stop the reaction. FLD detector was set an excitation wavelength of 330 nm and an emission wavelength of 380 nm. The HPLC column was ACE 5 C18 column (5µm packing material) with the dimensions of 150 x 4,6 mm. The column temperature was 35°C for absorption measurements. The mobile phase was 35% water and 65% acetonitrile containing 1 mL/L acetic acid and 1 mL/L o-phosphoric acid (pH 2.15). The injection volume was 10 µL for all of the samples. The derivatives were eluted from the column isocratically at a flow rate of 0,5 mL/min and run time 30 min.

2.3. Determination of ratios of glutathione reduced and oxide forms (GSH/GSSH)

With the glutathione assay kit, oxidized and reduced glutathione ratios were determined by absorbance measurement at 405-414 nm on a UV spectrophotometer. The corrected absorbance values of each standard were plotted as a function of the concentration GSSH or total GSH and their values were calculated.

2.4. The purification of glutathione from Ultraviolet Detector HPLC (HPLC-UV)

Lyophilized spinach which given the highest yield was extracted on large scale. For this, 10 g of lyophilized spinach was into powder and extracted with 120 mL of solvent. Using the HPLC-UV analytical method, the time intervals during which glutathione's peak hold on to the column were determined. Glutathione peak was collected from the HPLC-UV system.

2.5. Characterization of purified glutathione

Glutathione which was purified using Ultraviolet Detector HPLC (HPLC-UV) was then lyophilized using a freeze dryer for 30 hours. Identification of the functional groups of

glutathione was done using Raman and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy.

2.6. The design of natural-source glutathione-based injectable hydrogel and commercial glutathione-based injectable hydrogel

30 wt% PEG 4000 (Polyethylene Glycol 4000) was dissolved in ultra-pure water at room temperature. As a crosslinker 20% wt of glycerol was added to the PEG solution in a magnetic stirrer at 700 rpm for 5 minutes at 60°C. After gelation, GSH-containing spinach plant extract (10 mg/mL) and commercial GSH (10 mg/mL) were added in a magnetic stirrer at 700 rpm for 1 hour at 37 °C to the prepared mixtures to form hydrogels. The pH value was adjusted with 12 M HCL to 7.

2.7. Characterization of natural-source glutathione-based injectable hydrogel and commercial glutathione-based injectable hydrogel

For the characterization of the design of glutathione (GSH)-based injectable hydrogels, the structure and stability of the gelling forms were determined by Z-Mean, Polydispersity Index and Zeta Potential before lyophilization. The gelling forms were placed in a glass petri dish and dried in a lyophilizer under 0,133 mbar vacuum pressure for 30 hours. The chemical structure and thermal behavior of the dried solid forms were identified by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) after lyophilization.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

In the first stage, extraction methods for lyophilized and fresh plant samples from selected broccoli (*Brassica oleracea*), spinach (*Spinacia oleracea*), cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) purslane (*Portulaca oleracea*) were optimized to obtain efficient levels of GSH from natural sources. Quantitatively and qualitatively, both HPLC with an ultraviolet detector and HPLC with a fluorescence detector were developed analytical methods to compare the results. In the results of HPLC-UV, 1 g of plant extraction, the highest level of GSH was obtained with the lyophilized spinach plant, 1840.42 µg. However, no peak was obtained in fresh purslane. In the results of HPLC-FLD, 1 g of plant extraction, the highest level of GSH was obtained with the lyophilized spinach plant, 733.32 µg. In the same way, no peak was obtained in fresh and lyophilized purslane. The reason for this is thought to be that the amount is too small to be determined. When the results were compared, similar results were achieved with both analytical methods. The HPLC results affirmed each other.

With the glutathione assay kit, the highest GSH/GSSG ratios were obtained in lyophilized spinach, while the lowest results were obtained in lyophilized purslane. These ratios show that they are proportional to the amount of glutathione contained in the plant. The chemical structure of purified and lyophilized GSH was determined by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and Raman spectroscopy. Amide III, amide I and sulfhydryl groups were identified.

In the last stage, for the designed form, polyethylene glycol 4000 (PEG 4000) was used as the base matrix and glycerol as the physical crosslinker. Natural-source glutathione-based injectable hydrogel and commercial glutathione-based injectable hydrogel forms were created. For the characterization of glutathione (GSH)-based injectable hydrogels, the gelling forms were determined by Z-Mean, Polydispersity Index and Zeta Potential before lyophilization. According to the results, a natural-source glutathione-based injectable hydrogel demonstrated better homogeneous distribution. Also, the pH value is located at the isoelectric point in the range of 4-7 and the presence of negatively charged groups in the structure (carboxylic groups; -OH, C=O, -COOH) caused the zeta value to be low. That's why injectable hydrogels have an unstable structure. The chemical structure of the dried solid forms was identified by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Amide III, amide I, sulfhydryl groups, COOH, and OH were identified. The thermal behavior of dried solid forms was identified by differential scanning calorimetry (DSC). While the melting points of PEG 4000 and GSH were reached in both forms, the melting points of glycerol could not be reached. The reason for this is thought to be to create a melting temperature with PEG4000, which has the closest enthalpy value nearby.

4. CONCLUSION AND OUTLOOK

In this study, extraction, purification and characterization studies of GSH obtained from natural sources were brought out. The properties of natural-source glutathione-based injectable hydrogel and commercial glutathione-based injectable hydrogel were compared. Thus, it is thought that more meaningful results can be obtained with the use of natural origin active ingredients for biomaterials developed in pharmaceutical form studies.

1. GİRİŞ

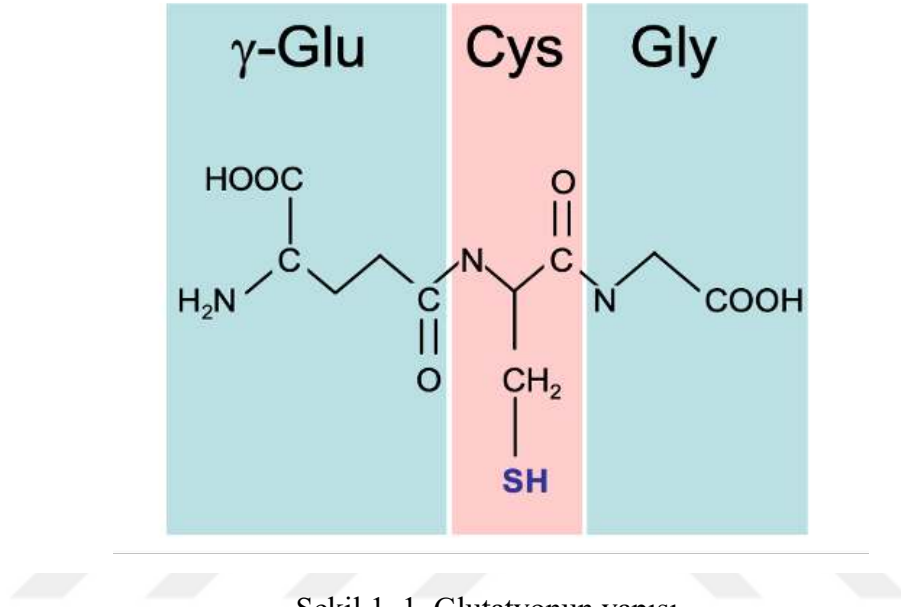
J.de Rey Pailhade tarafından *Saccharomyces cerevisiae*'de "philothion" adını verdiği madde içeriği 1888'de keşfedildi [1]. Kendiliğinden kükürt elementi ile reaksiyona girerek hidrojen sülfür veren bu madde daha sonraki çalışmalarda hayvan ve bitki dokularında yaygın olarak kullanıldı ve bileşiğin oksijen varlığında disülfid formuna tersinir oksidasyona uğrayabilen sistein içerdiği sonucuna ulaşıldı. 1921'de Hopkins tarafından, kas dokusundan ekstrakte ederek ootoksida edilebilir olduğunu ve dipeptit yapıda sistein ile glutamik asit içerdiği sonucuna ulaştı [2]. Glutatyonun, glutamik asit ve sisteinden oluşan dipeptit yapısında olduğu görüşüne, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan tripeptit olduğu iddia edildi [3]. Glutatyon'un glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan tripeptit olduğu doğrulandı [4].

Çalışmada doğal kaynaklardan elde edilecek glutatyonun farmasötik form olarak oral yolla alınmasındaki zorlukları önlemek amacıyla biyoyararlanımını arttırmaya yönelik farmasötik modifikasyonlar kullanarak çeşitli ilaç taşıma sistemleri ile üretimi oldukça önemli işlevleri yerine getirebileceği düşünülmektedir. Çalışmada doğal kaynaklardan elde edilecek glutatyon için optimize hale getirilen protokoller elde edilecektir. Glutatyon ile oluşturulan farmasötik form ile eksikliği ve düzensizliğinde meydana gelen alzheimer, kanser, kistik fibroz, multipl skleroz nörodejeneratif bozukluklar ve parkinson gibi hastalıkların ilerlemesini önlemeye ve/veya hafifletmeye yardımcı olabilecektir. Verimli seviyelerde glutatyonun doğal kaynaklardan elde edilmesine yönelik seçilen kaynak ile saflaştırma yöntemi belirlemek, analitik metot optimizasyonu gerçekleştirmektir. Çeşitli farmasötik modifikasyonlar kullanarak GSH'un biyoyararlanımını iyileştirebilecek araştırma stratejilerine odaklanarak tedavi edici çalışmalar için farmasötik formda ürün geliştirmektir.

1.1. GLUTATYON'UN YAPISI VE FONKSİYONLARI

Glutatyon (GSH), düşük moleküler ağırlıklı tripeptid yapıda, γ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin, bakterilerden memelilere (bazı bakteri ve amipler hariç) çoğu canlı hücrede bulunan en önemli hücre içi antioksidandır (Şekil 1.1) [6]. Sisteinin sülfhidril grubu

(-SH) sayesinde GSH'nin en önemli işlevleri olarak kabul edilen indirgeme ve konjugasyon reaksiyonlarında yer alan redoks aktif bir moleküldür. Bu reaksiyonlar, peroksitlerin ve birçok ksenobiyotik bileşiğin uzaklaştırılmasını sağlar. Endojen GSH, protein ve DNA sentezi, hücre proliferasyonu ve oksidasyon/indirgeme sinyali dahil olmak üzere birçok temel biyolojik süreçte ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde de rol oynayan güçlü bir antioksidandır [5].

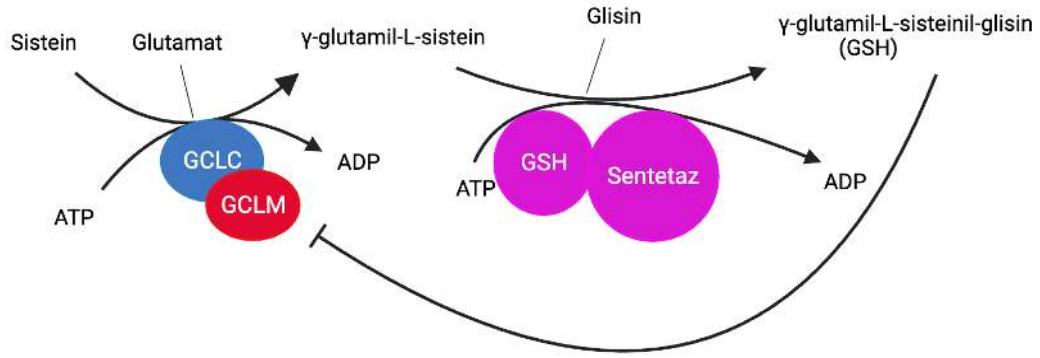


Şekil 1. 1. Glutatyonun yapısı.

1.1.1. GSH Sentezi

GSH, sitozolde γ -glutamil-sistein sentaz ve glutatyon sentaz enzimleri tarafından katalize edilen L-glutamat'a iki ardışık adımda sırasıyla L-sistein ve ardından glisin bağlanmasıyla sentezlenir (Şekil 1.2) [5]. Glutamatın γ -karboksil grubunun sisteinin amino grubuna bağlanması bu bağı proteinlerdeki peptit bağından ayırır [7], [8]. Tiyol grubu, GSH'ı en güçlü fizyolojik antioksidanlardan biri yapan güçlü bir indirgeyici ajandır. Sisteinin sülfhidril grubu(-SH), GSH'ın en önemli fonksiyonları olarak kabul edilen indirgeme ve konjugasyon reaksiyonlarında yer alır. Bu reaksiyonlar peroksitlerin ve birçok ksenobiyotik bileşiğin uzaklaştırılmasında rol oynar.

Halobakteriler gibi bazı organizmalarda glutatyonun yerini tiyosülfat gibi kükürt bileşikleri alabilir [8]. Başka bir örnek, bazı parazitik protozoalarda glutatyona benzer redoks işlevleri gerçekleştiren bileşik olan tripanotion (N^1, N^8 -bis(glutatyonil) spermidin) görev alır [9]. Bitkilerde, glutatyon hücrelerde milimolar konsantrasyonlarda birikir ve doku içeriği serbest sisteini 10 ila 50 kat aşar [10].



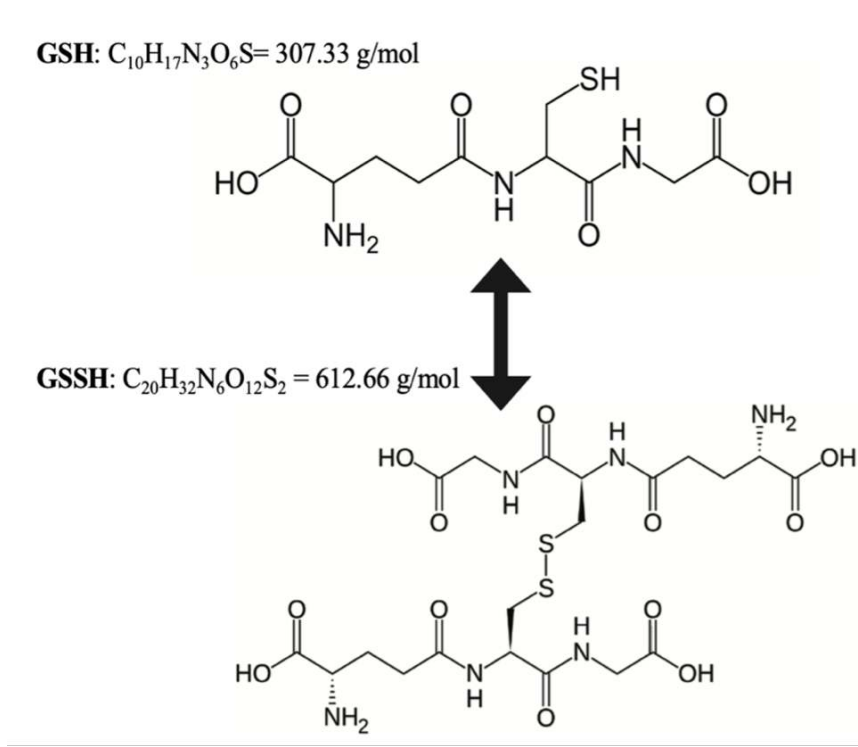
Şekil 1. 2. Hücrede GSH sentezi.

1.1.2. GSH'un Yapısı

GSH, hücrelerde (tiyol) indirgenen (L-GSH) form ve oksitlenen (disülfid) (GSSG) form olmak üzere 2 formda bulunmaktadır [11]. Şekil 1.3'de görüldüğü gibi oksitlenen glutatyon formu aslında kükürt atomları ile birbirine bağlanan 2 indirgenen glutatyondan oluşmaktadır [12].

Hücrelerde baskın olarak %98 oranında GSH formu bulunurken genellikle %1 oranında GSSG formu içermektedir [13]. Ökaryotik hücreler; sitozolde %85-80, mitokondride %15-10 ve endoplazmik retikulumda %8-3 olmak üzere [14], [15], [16] üç ana GSH deposuna sahiptir.

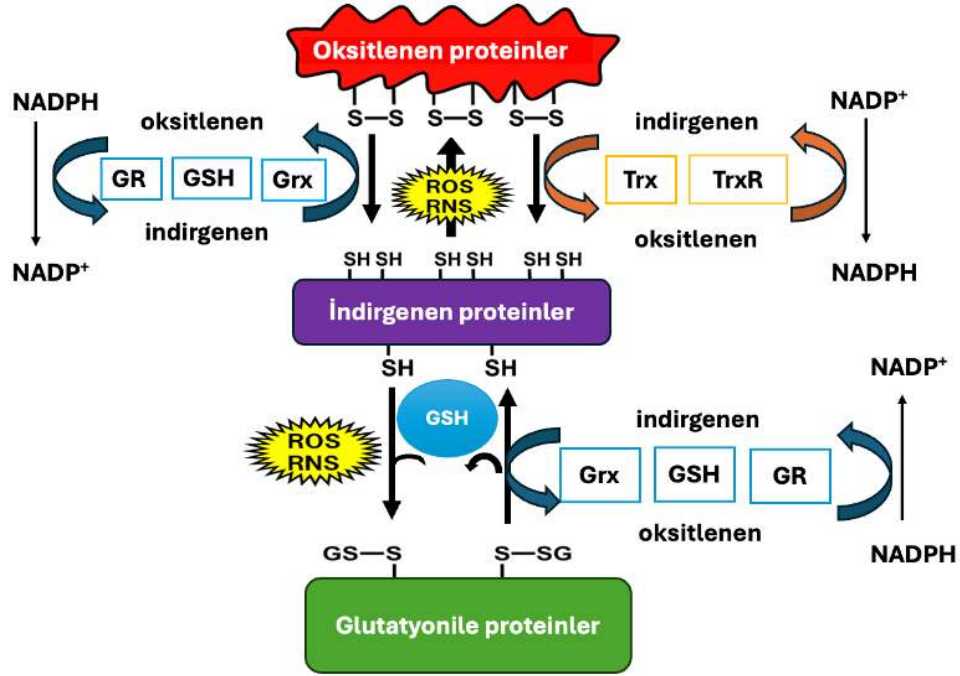
Hücrelerde toplam glutatyon serbest veya proteinlere bağlı olabilir. Serbest glutatyon esasen oksidatif stres sırasında oksitlenen forma (GSSH) dönüştürülebilen ve glutatyon redüktaz enziminin etkisiyle indirgenen forma dönüştürülebilen indirgenen formda (GSH) bulunur.



Şekil 1. 3. Glutatyon, indirgenen (tiyol-indirgenen) (L-GSH) formunun ve oksitlenen (disülfid-oksidi) (GSSH) formunun kimyasal yapısı.

1.1.3. GSH ve Redoks Sinyalleşme

Normal koşullarda, memeli hücrelerinde glutatyon redoks çifti 1-10 mM konsantrasyon aralığında bulunmaktadır. Hücre içi GSH/GSSH oranı kararlı durumda 100 veya daha fazlasıdır ancak oksidatif stres koşulları altında bu oran 10 ya da altına düşmektedir. GSH ayrıca enzim aktiviteleri, transkripsiyon faktörleri ile DNA bağlanması ve protein stabilitesi ile ilgili protein fonksiyonlarını korumak için hücre içi protein tiyol kalıntıları ile reaksiyona girebilir [18], [19]. Bu nedenle bu tür oksidatif stres koşulları altında GSH, oksidatif stres nedeniyle proteinlerde geri dönüşü olmayan değişiklikleri önlemek için tiyol kalıntılarına geri dönüşümlü olarak bağlanır. “Glutatyonilasyon” adı verilen post-translasyonel modifikasyon geri dönüşümlüdür ve hücre içi sinyal iletim sistemini oksidatif strese karşı korur (Şekil 1.4). [20]



Şekil 1. 4. Hücre içi protein redoks durumunun glutatyon (GSH) ve glutaredoksin (Grx) ve tioredoksin (Trx) tarafından düzenlenmesi.

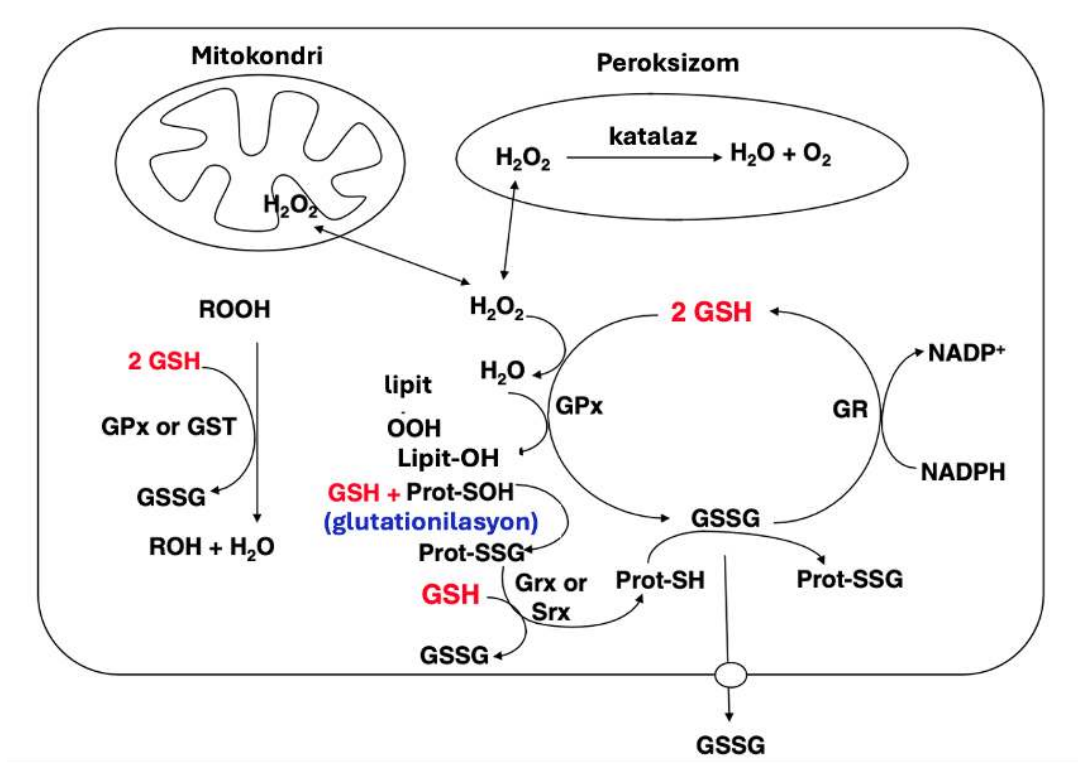
Hücre apoptozunu indükleyen kaspaz ailesinden olan Cys protezları glutatyonilasyon için potansiyel hedef olmaktadır. Apoptotik yanıtların önemli düzenleyicisi olan Kaspaz-3, glutatinyona uğrayabilir. Bu durum Kaspaz-3'ün GSSG tarafından doza ve zamana bağlı olarak etkisizleştirilmesine yol açar. Böylece apoptozun glutatyonilasyon ile düzenlenebileceği düşünülebilir [22]. Hücresel ortam oksidatif stresten kurtulduktan sonra proteinlerdeki disülfid bağları fizyolojik koşullar altında normal şekilde işlev görebilmesi için Grx tarafından geri indirgenir. Bu nedenle redoks durumunun hücre içi GSH tarafından düzenlenmesi hem fizyolojik hem de patolojik koşullar altında hücresel fonksiyonların sürdürülmesi için son derece önemlidir [23].

1.1.4. GSH'nin Antioksidan Fonksiyonu

GSH'nin antioksidan işlevi, büyük ölçüde GSH peroksidaz (GPx) ile katalizlenen reaksiyonlar tarafından gerçekleştirilir. Böylece GSH, GSSG'ye oksitlenirken hidrojen peroksit ve lipid peroksidi azalır. GSSG, GSSG redüktaz tarafından tekrar GSH'a indirgenerek redoks döngüsü oluşturur. Organik peroksitler GPx ve GSH-S-transferaz ile indirgenebilir. Katalaz ayrıca hidrojen peroksidi de azaltabilir fakat yalnızca peroksizomda bulunur. Bu durum GSH'ı hücrede oluşan oksidatif strese karşı savunmada özellikle mitokondride önemli kılar [5], [24].

GSH'dan GSSG'ye oranı, hücre içi redoks potansiyelini büyük ölçüde belirlediğinden ($[GSH]^2/[GSSG]$ logaritmasıyla orantılı), oksidatif stres hücrenin redüksiyon yeteneğini aştığında redoks dengesinde büyük bir kaymayı önlemek için GSSG'den GSH'ye, GSSG aktif olarak hücre dışına çıkarılabilir veya protein sülfhidril grubu ile reaksiyona girerek karışık disülfid oluşumuna yol açabilir. Bu nedenle, şiddetli oksidatif stres hücresel GSH'ı tüketir (Şekil 1.5) [25].

Hücrede GSH eksikliği şiddetli oksidatif strese ve hücresel işlev bozukluğuna neden olarak kanserler, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson ve Alzheimer hastalığı), kistik fibroz, multipl skleroz ve glokom gibi çeşitli dejeneratif ve kronik hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir. Hücrede artan GSH seviyelerinin bu hastalıkların ilerlemesini önlemeye ve/veya hafifletmeye yardımcı olabileceği hipotezine yol açmaktadır [26], [27].



Şekil 1. 5. GSH antioksidan fonksiyonu.

1.1.5. Glutasyon ve Biotransformasyon

Esas olarak karaciğerde hepatosit adı verilen hücrelerde gerçekleşen hem ekzojen hem de endojen maddelerin atılımını kolaylaştırmaya yardımcı metabolik süreç biyotransformasyon denir. Gerçekleşen reaksiyonları katalizleyen enzimlerin birçoğu

adipoz, bağırsak, böbrek, akciğer ve deri gibi ekstrahepatik dokularda meydana gelebilir. Transformasyon süreci, substrat ile bu hücrelerin esas olarak sitoplazma, endoplazmik retikulum ve mitokondride bulunan enzimler arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak gerçekleşir. Substratların kimyasal yapıları değiştirilerek aktif, inaktif ve hatta toksik hale dönüşmesine neden olabilir [29].

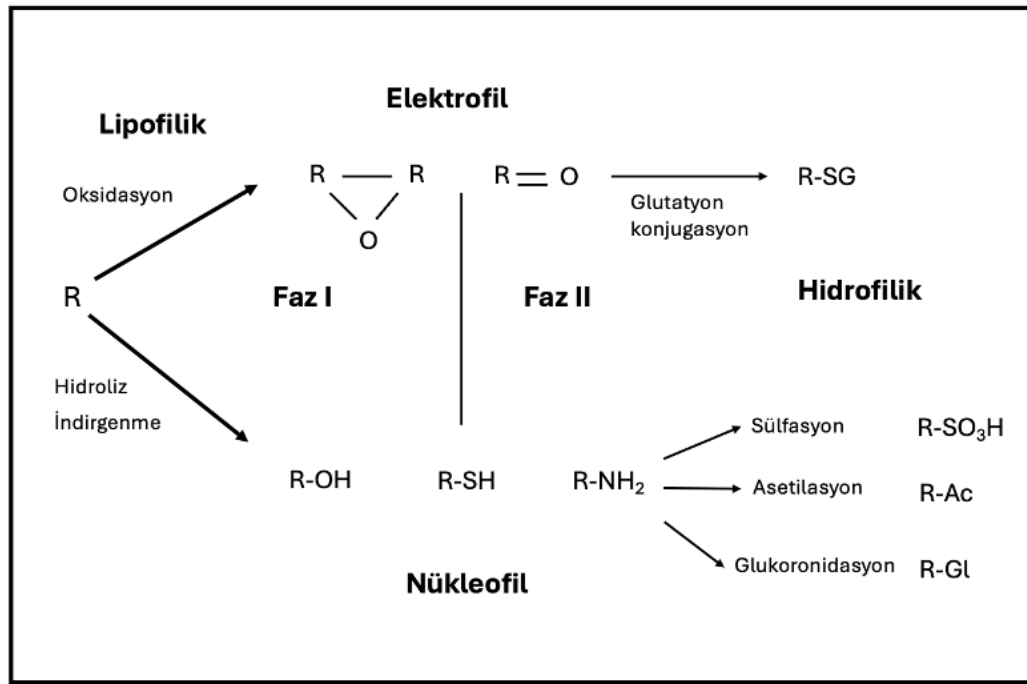
Biyotransformasyon reaksiyonları; geniş bir şekilde işlevselleştirme reaksiyonları (faz I reaksiyonları olarak bilinir) ve konjugasyon veya sentetik reaksiyonlar (faz II reaksiyonları olarak bilinir) olarak sınıflandırılabilir. Faz I reaksiyonları, işlevsel bir grubun oluşturulmasını veya mevcut bir grubun değiştirilmesini ifade etmektedir. Bu tür biyotransformasyon, substratına bir “kimyasal tutamak” getirir böylece ortaya çıkan metabolit, sentetik reaksiyona girmeye daha yatkın hale gelir. Örneğin; redoks ve hidroliz reaksiyonları bu şekilde meydana gelir. Faz II reaksiyonlar, ilacı veya faz I metabolitlerinden herhangi birini çeşitli gruplarla (örneğin, glukuronik asit, glutatyon, sülfat vb.) basit bir şekilde birleştirmektedir [30].

Faz I reaksiyonları, hidroliz reaksiyonlarında olduğu gibi veya genellikle oksidasyon reaksiyonları yoluyla -OH, -NH₂ veya -SH gibi kimyasal olarak reaktif fonksiyonel grupları ortaya çıkarmaktadır. Bu reaksiyonları katalize eden enzimler; oksijenazlar/oksidazlar (sitokrom P450 (CYP450) izozimleri, flavin içeren monooksijenazlar, monoamin oksidazlar, peroksidazlar, ksantin oksidaz, alkol oksidazlar vs. gibi), redüktazlar (aldo-keto redüktazlar gibi) veya hidrolitik enzimlerdir. (örneğin esterazlar, amidazlar) Bazı faz I enzimleri hem oksidasyonları hem de indirgemeleri katalize edebilmektedir [31].

Örneğin endoplazmik retikulum lümeni, sitozole göre oksitleyici bir ortama sahiptir (glutatyon/glutatyon disülfür oranı sitozolde 100'e kıyasla yaklaşık 3'tür). E. retikulum içindeki oksidatif ortam, protein katlanma süreci için çok önemlidir ve protein katlanmasında terminal elektron alıcısı olarak oksijen kullanımı yoluyla oksidatif stres oluşumuna da katkıda bulunabilmektedir [32].

Faz II reaksiyonlarında kimyasal bileşik; glukuronik asit, glutatyon, sülfat veya asetat gibi (genellikle polar) endojen kısımlarla konjuge edilir. Faz I ve faz II reaksiyonları arasındaki belirgin fark, faz II'nin farmakolojik olarak inaktif ve kimyasal olarak reaktif olmayan ürünler üretme eğiliminde olmasıdır. Bilinen toksik metabolitlerin sadece yaklaşık %10'u konjugasyon reaksiyonlarından kaynaklanmaktadır [33].

Faz II metabolitleri, istisnai olarak farmakolojik olarak aktiftir (tipik bir karşı örnek, morfin 6-O-glukuroniddir). Reaktif molekülleri detoksifiye etmenin yanı sıra bu tür polar grupların konjugasyon yoluyla eklenmesi, hücre zarlarından kolayca yayılmayan, yeniden emilmelerini ve dağıtımlarını koşullandıran daha hidrofilik ve daha büyük metabolitler üretmektedir. Ayrıca, faz II metabolizmasından elde edilen ürünlerin çoğu (a) fizyolojik pH aralığında neredeyse tamamen iyonize olan ve (b) albümin ile etkileşime meyilli olan ve ayrıca ekstrasvazasyonlarına karşı birlik oluşturan zayıf asitlerdir (Şekil 1.6) [29], [34].



Şekil 1. 6. Ksenobiyotik metabolizmasının faz I ve II.

1.2. GLUTATYONUN ANALİTİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Hücrelerde glutatyonun redükte (GSH) ve okside (GSSG) her iki formunun eş zamanlı ya da farklı şekillerde belirlenmesi için hassas kantitatif teknikler kullanılabilmektedir. Bu analitik teknikler UV-vis spektrofotometre, Florometri ile GSH Analizi, Biyoluminesans, Kapiler Elektforez ve HPLC analizidir.

1.2.1. UV-Vis Spektrofotometresi ile Glutasyon Analizi

Biyolojik örneklerde redükte (GSH) ve okside (GSSG) glutatyonun belirlenmesi, UV-Vis spektrofotometrede en yaygın Ellman reaktifi ya da DTNB olarak bilinen 5,5'- dithiobis-

(2-nitrobenzoic acid) ile gerçekleştirilir. “GR-bağı enzimatik geri dönüşüm testi” veya “GSH-geri dönüşüm testi” olarak bilinen bu yöntem, DTNB, Glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında GSSG'yi GSH'ye indirger [35]. Ekstraktlara ön işlem uygulanmadan, yöntem hem GSH' ı hem de GSSG'yi yani toplam serbest glutasyonu ölçer. Bu analiz yönteminde 5,5'- dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) ve GSH ile reaksiyon sonucu oluşan kromophor 5-tiyonitrobenzoat 412 nm dalga boyunda renk değişikliği GSH'ı analiz etmek için kullanılmaktadır. GSSG belirlemek için GSH'ı bloke eden tiyol reaktifleri olan N-ethylmaleimide ve 2-vinylpyridine ile işleme tabi tutmak gerekmektedir [36]. Bu yöntem basit, yeterli hassasiyet ve ulaşılabilir olması nedeniyle halen tercih edilen bir yöntemdir.

1.2.2. Florimetrik Yöntem ile Glutasyon Analizi

Cohn ve Lyle, o-ftaldialdehit (OPA) ve amino asitler arasındaki reaksiyona dayanarak, redükte glutasyonun (GSH) biyolojik dokulardaki amino asitlerin miktarını belirlemek için kullanılabilen florometrik analitik yöntem tanımladılar [37]. Hem redükte hem de okside glutasyonun belirlenmesine olanak sağlayan bu yöntem daha sonra yapılan başka bir çalışmada modifiye edildi. OPA, glutasyonun serbest tiyol grubuna bağlanarak, yüksek derecede floresan türev üreten reaktif olarak kullanılır. GSSG belirlenirken GSH'ın uzaklaştırılması için numune N-ethylmaleimide (NEM) ile muamele edilir. Bu yöntemin avantajları; yüksek hassasiyeti, düşük maliyeti ve hızlı sonuç alma gibi nedenlerle rutin uygulamada çok sayıda numunenin analizi için uygun olabilir. En büyük dezavantajı, amino asitler ve diğer tiyoller tarafından yapılan önemli müdahale nedeniyle zayıf özgüllüğe sahip olmasıdır [38].

1.2.3. Biyoluminesans ile Glutasyon Analizi

Glutasyonun (GSH) tespiti için küçük hacimlerde sıvı örnekleri ile geniş konsantrasyon aralığında kullanılabilen teknik, glutasyon disülfid (GSSG) GSSG redüktaz tarafından NADPH varlığında katalize edilen tersinir reaksiyonuna dayanmaktadır. Uygun denge koşulları altında, NADP'nin GSH tarafından indirgenmesi sağlanır ve ortamda biriken NADPH, flavin mononükleotidi (FMN) aracılığı ile bakteriyel lusiferaz bağlanır. Böylelikle elektron akışına izin vererek ışık emisyonuna neden olur. Lusiferaz reaksiyonunun biyoluminesans yoğunluğu ile sıvı numunenin GSH içeriği doğru orantılı olarak ilişkilidir. Bu yöntemin dezavantajı, semi-kantitatif olması ve glutasyon disülfid formunun bu yöntem ile belirlenememesidir [39].

1.2.4. Kapiler Elektrophorez ile Glutasyon Analizi

Kapiler elektrophorez tek hücrelilerde bile ultra küçük hacimlerde son derece verimli analitik ayırma yöntemi olarak bilinir. Piccoli ve ark. (1994) [40], basit Micro-con-10 membran ekstraksiyon prosedürü ile eritrositi GSH ve GSSG eş zamanlı olarak belirlenmesini sağlayan yüksek performanslı kapiler elektrophoretik yöntemi (HPCE) ilk kez tanımladılar.

Jin ve ark. (2000) [41] tek kırmızı kan hücresinde glutasyon belirlemek için elektrokimyasal tespit ile kapiler bölge elektrophoretik yöntemi (EC-CZE) gerçekleştirdi. Bu teknik ile tüm hücre bir ayırma kapilerine enjekte edilir. Türevlendirme veya hücre içi sıvının işlenmesi gerekmeden GSH miktarı belirlenmesini mümkün kılmaktadır. Bu yöntemin diğer kapiler elektrophoretik yöntemlere göre dezavantajı GSSG'nin miktarını belirlemek mümkün olmamasıdır. Carru ve ark. (2002) [42] tarafından tanımlanan kapiler elektrophoretik yöntem ile kırmızı kan hücrelerinde GSH ve GSSG'nin 90 saniyeden daha kısa sürede doğrudan ölçülmesine izin vermektedir. Kapiler elektrophorezin duyarlılığı olsa bile tam otomasyon olmaması ve proteine bağlı glutasyon tayininin zorluğu nedeniyle kapiller elektrophoretik yöntemleri dezavantajlı hale getirmektedir.

1.2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Glutasyon Analizi

Son zamanlarda HPLC, biyolojik numunelerde GSH'ı belirlemek için tercih edilen bir yöntem haline geldi. HPLC teknikleri; hassas, tekrarlanabilir, hızlı ve oldukça spesifiktir. Her analizde eş zamanlı GSH ve GSSG formu belirlenmesi için uygun türevlendirme reaktifi seçimi, analitik metot protokolleri ve analitik cihaz sistemi belirlenerek gerçekleştirilir.

1.2.5.1. HPLC -UV

Reeve ve Kuhlenkamp (1980) [43] ilk olarak Ellman reaktifi 5,5'- ditiobis-nitrobenzoik asit (DTNB) ile kolon öncesi türevlendirme gerçekleştirerek sıçan karaciğerindeki glutasyon miktarını tanımladılar. Bu yöntem daha sonra Reed ve ark. (1980) [44] ve Katrusiak ve ark. (2001) [45] tarafından değiştirildi. Reed ve ark. (1980) [44] yaptığı çalışmada iyodoasetik asit (IAA) ile tiyol yapısında bulunan sülfidril grupları reaksiyonu sonucunda S-carboxymethyl türevleri oluşturdu. Ardından amino grupları ile Sanger reaktifi (1-floro-2,4-dinitrobenzen) kromofor türevlendirilmesine dayalı reaksiyonu ile 2,4-dinitrofenil türevlerine dönüştürüldü. Bu türevler GSH, GSSG ve ilgili amino asitlerin nanomol seviyesinde analizine izin vermektedir. Katrusiak ve ark. (2001) [45]

yaptığı çalışmada 5,5'-dithiobis- nitrobenzoik asit (DTNB) ile kolon öncesi türevlendirme ve dithiothreitol ile tercihe bağlı ön türevlendirme reaksiyonu yaparak hem toplam amino asit seviyelerinin ölçümü için disülfidlerin kantitatif indirgenmesine hem de redükte formların belirlenmesine olanak sağladı.

Reed ve ark.(1980) [44] GSH, GSSG ve ilgili amino asitlerin eş zamanlı tayini için belirlediği yöntemde Yoshida (1996) [46] deproteinizasyon için %10'luk metafosforik asit kullandı. Ardından GSH'nin GSSG'ye yapay oto-oksidasyonunu önlemek için sülfidrid grubunu bloke eden iyodoasetik asit kullanarak GSH ve GSSG'yi 2,4-dinitroflorobenzen türevlerine dönüştüren yöntemi oluşturdu. Analiz esnasında GSH stabilitesi ve asit deproteinizasyonu korumak önemli bir durumdur. Bunun üstesinden gelmek için Garcia ve ark. (2008) [47] yaptığı çalışmada hemolize edilen eritrositler GSH kaybı oluşmadan TCA ile asit deproteinizasyonu yapıldı. Ardından 5,5-ditio-bis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile türevlendirildi. Böylelikle eritrositlerde GSH'ın DTNB temelli analiz metodu geliştirildi.

Giustarini ve ark. (2003) [48] insan kanında GSH ve GSSG belirlemesi için asitleştirme yapılmadan önce sülfidril grupları N-etilmaleimid (NEM) ile ve amino grupları 2,4-dinitrofluorobenzene (FDNB) ile türevlendirme reaktifleri kullanılarak basit, tekrarlanabilir ve eş zamanlı GSH- GSSG'nin belirlenmesi gerçekleştirildi.

GSH ve diğer tiyol yapılarının belirlenmesi için 2-kloro-1-metilkinolinyum [42], [43] ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzen [51], [52] gibi başka türevlendirme reaktifleri de kullanılmaktadır.

1.2.5.2. HPLC-Elektrokimyasal Dedektör (HPLC-ECD)

Elektrokimyasal algılamalı HPLC, cıva (Hg) havuz elektrotları kullanılarak glutatyon dahil olmak üzere tiyoller ve disülfürler gibi redoks-reaktif bileşiklerin analizi için önemli bir aracı temsil etmektedir. Biyolojik örneklerde sülfidril grubu içeren bileşiklerin belirlenmesinde basit, hızlı ve hassas bir yöntem geliştirildi [53], [54]. Bu yöntem daha sonra GSH ve GSSG eş zamanlı belirlenebilmesi için Altın-Cıva (Au-Hg) 'dan oluşan çift elektrotlu elektrokimyasal algılama sistemi geliştirildi [55].

Richie ve Lang (1987) [56] tarafından, biyolojik olarak çeşitli tiyollerin ve disülfidlerin belirlenmesine ve biyolojik örneklerde uygulanmasına olanak tanıyan Allison yönteminde değişiklik yapıldı. Numune hazırlama, metafosforik asit ile protein çökelmesi ve mobil faz ile 20 kat seyreltme basamaklarını içermektedir. Kolon eluentindeki tiyoller,

seri bağılı Au-Hg'den oluşan çift elektrotlu elektrokimyasal detektörü tarafından belirlendi.

Hiraku ve ark. (2002) [57] tarafından, GSH, GSSG ve ilgili tiyoller için yeni bir HPLC-ECD analiz yöntemi geliştirildi. Bu yöntem ile GSH'nin femtomol seviyelerinde belirlenebilmesi için GSH'a aşırı yüksek hassasiyet sağlayacak geniş yüzey alanlı altın elektrot ve ince bir conta içeren sistem oluşturulur. Altın elektrotlar kullanılırken, oksijenin sistemde kesinlikle girişinin engellendiğine emin olmak gerekmektedir. Birkaç yüz enjeksiyon sonunda Au-Hg elektrotları hassasiyetini kaybeder bu yüzden yenilenmesi gerekmektedir.

Sonraki çalışmalarda, yüksek hassasiyetlerde hem GSH hem de GSSG belirlenebilmesi için gözenekli grafit elektrotların kullanımının ana hatlarını detaylandıran prosedürler ortaya koyuldu [58], [59]. Başka bir çalışmada HPLC-ECD için işlevselleştirilen karbon nanotüplerle modifiye edilen elektrot sistemi kullanılarak elektrokimyasal algılama sistemi geliştirildi. Bu yöntem ile hayvan eritrositlerinde GSH ve GSSG konsantrasyonundaki farkı saptamak için yeterince hassas bir yöntem oluşturuldu [60].

Elektrokimyasal algılamalı analiz kolay numune işleme, özgülük, otomatik enjeksiyon, kısa çalışma süresi, büyük numune verimi ve diğer tiyollerin belirlenmesi gibi dikkat çekici özellikler sunmaktadır.

1.2.5.3. HPLC-FL

HPLC-FL yüksek duyarlılığı ve özgülüğü nedeniyle tiyol yapıdaki moleküllerin belirlenmesinde en sık tercih edilen analitik metottur.

En iyi türevlendirme ajanı çok düşük konsantrasyonlarda floresan verimi oluşturmak için tiyol grupları ile reaksiyona girebilmelidir. Ayrıca ideal reaktif kendi başına herhangi floresan karakter göstermemelidir. Tiyol bileşikleri ile kararlı ve hızlı reaksiyon oluşturmalarıdır [61], [62].

Gıdalardaki GSH konsantrasyonlarını belirlemek için türevlendirme ajanı olarak N-(1-Pirenil)maleimid (NPM) kullanıldığında, analiz sırasında GSH'daki sülfhidril fonksiyonel grubu ile reaksiyona girer. Bu türevlenme reaksiyonu 1 dakika içinde tamamlanır [63], [64].

Orto-ftaldialdehit (phthalaldehyde (OPA) ile amino asitlerin amino grupları arasındaki reaksiyon temelinde, GSH'ın OPA ile reaksiyonu yüksek derecede floresan ürün

oluşturmaktadır [37]. Neuschwander-Tetri (1989) [65] GSH ve OPA'nın reaksiyonu ile yüksek floresan özelliğe sahip stabil bir trisiklik türev oluşmaktadır GSH 'ın OPA ile türevlendirilmesi sonucu oluşan floresan miktarı pH değişimine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Reaksiyon pH'ı NaOH ile ayarlanarak en yüksek floresans özellik veren pH belirlenir. Floresan, pH 8'den düşük veya 12'den yüksek olduğunda yavaş yavaş azaldığı sonucuna ulaşılmaktadır [37].

Biman bileşikleri, yüksek foto-stabilite ve biyo-uyumlulukları nedeniyle biyolojik sistemlerde floresan etiketleme prosedürleri için sıklıkla kullanılır [66]. Canlı hücrelerde kültür ortamına monoklorobiman (mCB) eklenmesi ile hücre içi glutatyon S-transferaz enzimi florometrik olarak ölçülebilen GSH-mCB reaksiyonunu katalizlemektedir. mCB floresan yöntemi, doku homojenatlarında GSH'ını güvenilir bir şekilde ölçmek için yeterince spesifik olmasına rağmen GSSG'i ölçmek için bu prosedür başarılı olmadı [67].

Monobromobiman tiyollerle oda sıcaklığında pH 8.0 de hızlı bir şekilde reaksiyona girer ve tiyoeterleri oluştururlar [68].

Bu reaktifin dezavantajlarından bazıları, kendi kendine floresan özelliği, ışıkla parçalanabilme yeteneği ve hidroliz ürünleri oluşturmasıdır [69].

1-Floro-2,4-dinitrobenzen (FDNB), gıdalardaki GSH içeriğini belirlemek için en yaygın kullanılan reaktiftir. FDNB'deki amino grubu GSH ile reaksiyona girerek S-karboksimetildinitrofenil (DNP) türevlerini oluşturur [61], [70].

O ve ark.(2004) [71] gıdalardaki GSH'yi analiz etmek için floresan reaktifleri olan dansil klorür ve FDNB'nin kullanımını karşılaştırdı. Dansil klorürün çok hassas sonuçlar verdiği sonucuna ulaşıldı.

1.2.6. Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometrisi (LC-MS), (LC-MS/MS) ile Glutatyon Analizi

Küçük numune boyutu, saptamada yüksek hassasiyet ve spesifisite nedeniyle GSH ve GSSG'nin belirlenmesinde LC-MS kullanılmaktadır [62]. Şıra ve şarapta, GSH ve GSSG içeriği belirlemek için LC-MS/MS yöntemi geliştirildi. Bu yöntem ile herhangi türevlendirme basamağı kullanmadan analiz etmek mümkündür [72]. Buğday unu için yapılan analizde dansil klorür ile türevlendirme gerçekleştirilerek GSH analizi yapıldı [73]. Bu yöntemin, toplam otomasyon eksikliği ve ekipmanın yüksek maliyeti, diğer yöntemlere göre en büyük dezavantajlarıdır [69].

1.3. DOĞAL KAYNAKLARDAN GLUTATYON ELDE EDİLMESİNE YÖNELİK YAPILAN ÇALIŞMALAR

Çeşitli sebze ve meyvelerde biyolojik olarak önemli bazı tiyollerin seviyesi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği kullanarak incelendiğinde sebzelerden kuşkonmaz 349 nM/g taze ağırlık ile en yüksek GSH düzeyine sahipken, meyvelerden papaya 136 nM/g taze ağırlık GSH düzeyine sahip bulundu [63]. Yapılan bir çalışmada dört farklı kurutma işleminin etkileri, güneşte kurutma, fırında kurutma, vakumlu fırında kurutma, dondurarak kurutma, domates (*Solanum lycopersicum*) ve zencefil (*Zingiber officinale*) gibi bitkilerin tiyolik ve fenolik içerikleri açısından incelendi. Taze zencefilin 1399.49 ± 63.90 ve domatesin 1835.28 ± 7.95 nmol/g kuru maddede GSH içerdiği tespit edildi [74]. Manda ve ark. tarafından [64] zencefil ekstraktlarının 1076 nM/g taze ağırlık GSH içerdiğini bildirildi. Dondurarak kurutma, düşük sıcaklıkta vakum altında gerçekleştirildiğinde yüksek verimli ekstraksiyon sağladı. Bitkilerin yetiştirme yönteminin GSH seviyesine etkisini belirlemek için yapılan bir çalışmada organik olarak yetiştirilen kuşkonmaz, ıspanak, yeşil fasulye ve kırmızı biberdeki GSH konsantrasyonunun geleneksel olarak yetiştirilene kıyasla daha düşük olduğu tespit edildi [75]. Farklı baharatların (zerdeçal, zencefil, kakule, hardal, çemen ve kişniş) sulu ekstraktlarındaki biyolojik olarak önemli tiyoller, HPLC tekniği kullanılarak tiyol seviyeleri belirlenen bir çalışmada en yüksek GSH seviyesine *Zingiber officinale* 'de 1076 ± 18 nM/g (taze ağırlıkta) ulaşıldı [64]. GSH son derece hassas bir analittir ve disülfide formuna (GSSG) kolayca oksitlenir. Yapılan çalışmada GSH ve GSSG'nin eş zamanlı tespiti için HPLC-PCD yöntemi uygulandı. Geliştirilen yöntem, hem GSH hem de GSSG analitlerinin aynı anda belirlenmesine olanak tanmaktadır [76].

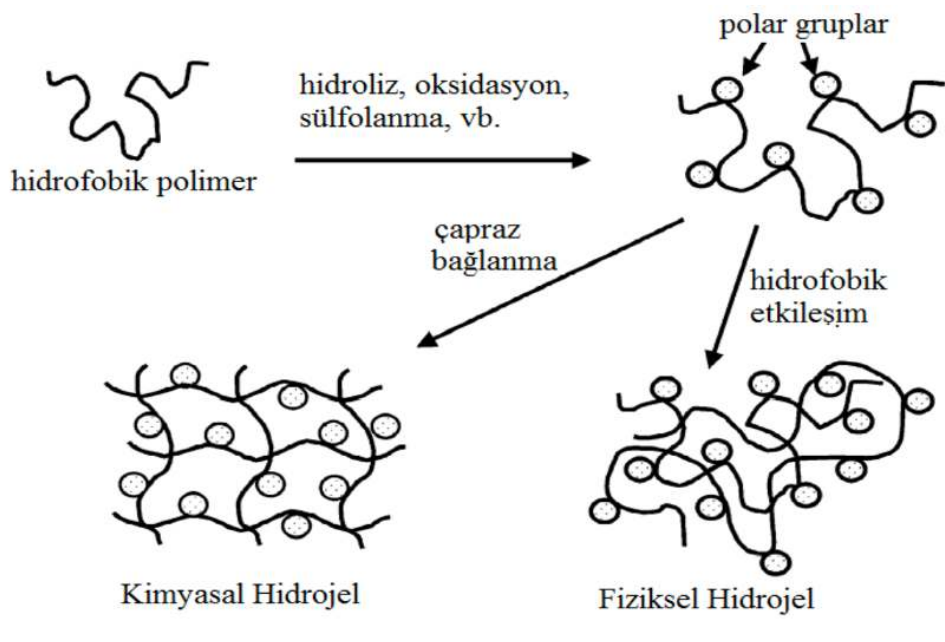
Yapılan bir çalışmada ıspanak, yeşil fasulye, kırmızı biber, salatalık ve kuşkonmazdaki GSH: GSSG oranları tespit edildi. Buna göre ıspanağın en yüksek GSH:GSSG oranına sahip olduğunu belirlendi [77].

Gıda numunelerinde GSH/GSSG analizi için bildirilen analitik protokollerin oldukça önemli bir kısmı, kolon öncesi türevlendirmeye bağlı HPLC'ye dayanmaktadır. UV-Vis bölgesindeki analitlerin düşük absorpsiyonları nedeniyle, türevlendirmenin kütle spektrometrisi kullanıldığında bile GSH'nin duyarlılığı ve stabilizasyonu açısından oldukça faydalı olduğu kanıtlandı [73], [78]. Kolon öncesi türevlendirmenin ardından HPLC veya UV veya floresan algılamaya bağlı kılcal elektroforez kullanılarak ayırma,

şaraplar [79], [80], [81], turunçgil, meyve suları [82], [83] gibi gıda maddelerine ve mayalara [84] uygulandı.

1.4. HİDROJELLER

Üç boyutlu ağ yapısına sahip hidrojeller hidrofilik polimerlerin çapraz bağlanması sonucu oluşan terapötik çalışmalar için eşsiz özelliklere sahip biyomalzemelerdir [85]. Ayrıca ayarlanabilir fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra yumuşak insan dokularına ve hücre dışı matrise olan benzerlikleri nedeniyle en çok ilgi gören biyomalzemeler haline gelmiştir. Hidrojeller, büyük miktarda su absorblayabilen ve polimer zincirleri arasındaki fiziksel veya kimyasal çapraz bağlardan dolayı çözünmeden kalabilmektedir. Hidrojinin suyu tutmasını hidroksil ($-OH$), karboksil ($-COOH$), amin ($-NH_2$) ve sülfonik asit ($-SO_3H$) grupları gibi birçok hidrofilik fonksiyonel gruba sahip olması sağlamaktadır. Polimerler arasındaki çapraz bağlar ise hidrojinin suda çözünmesini engelleyerek geometrik bir yapıda olmasını sağlar [86]. Çapraz bağlanma özelliklerine göre fiziksel ve kimyasal çapraz bağlı hidrojeller olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.7) [87]. Hidrojellerin yüksek su tutma kapasitesi ve hücre dışı matrise (ECM) benzerlikleri biyouyumluluk sağlarken aktif bileşenleri tutma yeteneği de kazandırır. Bu nedenle son yıllarda ilaç taşıma sistemleri, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları için araştırılmaktadır [88], [89].



Şekil 1. 7. Hidrojel oluşumunun şematik gösterimi.

1.4.2. Fiziksel Çapraz Bağlı Hidrojel

Hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik etkileşimler gibi kovalent olmayan etkileşimler ile fiziksel çapraz bağlanmanın gerçekleştiği hidrojeller elde edilmektedir [90]. Sıcaklık, iyonik konsantrasyon gibi fiziksel uyaranlarla toksik çapraz bağlayıcılara gerek kalmadan çapraz bağlanabilmektedir [91]. Fiziksel çapraz bağlı hidrojeller kimyasal çapraz bağlı hidrojellere göre zayıf mekaniksel özellik göstermelerine rağmen fiziksel etkileşimlerin doğal tersine çevrilebilirliği hidrojele kayma incelmesi ve kendi kendini iyileştirebilme özellikleri kazandırmaktadır. Ayrıca fiziksel çapraz bağlı hidrojellerde toksik çapraz bağlayıcılar kullanılmadığından reaksiyona girmeyen çapraz bağlayıcılar sitotoksisiteye sebep olmamakta bu durum hidrojellerin biyomedikal uygulamaları için kullanılması anlamında önemlidir [87].

1.4.3. Kimyasal Çapraz Bağlı Hidrojel

Foto-ışınlatma, disülfid bağı oluşumu, Schiff bazı, Michael katılması ve Diels-Alder vb. reaksiyonları ile polimer zincirlerinin kovalent çapraz bağlanması sonucu kimyasal çapraz bağlı hidrojeller elde edilmektedir [92]. Kimyasal çapraz bağlı hidrojeller fiziksel çapraz bağlı hidrojellere kıyasla daha iyi mekanik özelliklere ve uzun süreli kararlılığa sahiptir. Ancak bazı kimyasal çapraz bağlama yöntemlerinde kullanılan toksik çapraz bağlayıcılar (foto-başlatıcılar, çapraz bağlayıcı monomerler, katalizörler vb.) yan etkilere sebep olabilmektedir [91].

1.5. ENJEKTE EDİLEBİLİR HİDROJELLER

Enjekte edilebilir hidrojeller, ilaç taşıma sistemleri, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları için biyomalzemelerin tasarlanmasında büyük bir ilgi odağı haline gelmiştir [93]. İlaç taşıma sistemlerinde terapötiklerin hidrojel ile lokal enjeksiyonu hem terapötik etkinliği artırmakta hem de sistematik tedavinin yan etkilerini azaltmaktadır. Hücre, gen ya da etken madde gibi biyoaktif bileşenleri içeren hidrojeller *in-situ* lokal jelleşebilen veya kayma incelmesi davranışı gösterebilen hidrojeller olarak farklı şekilde tasarlanabilmektedir. Bazen her iki özellikte tek bir hidrojelde birleştirilebilmektedir [94], [95].

In-situ enjekte edilebilir hidrojeller, jelin temel matriksini oluşturan polimerin ve biyoaktif bileşenlerin sıvı formda lokal olarak enjekte edildikten sonra bu bileşenlerin

vücut içerisindeki pH, sıcaklık gibi etkenlere bağlı olarak veya kimyasal, fiziksel çapraz bağlanmasıyla jelleşebilen sistemlerdir [96].

Kayma incelenmesi davranışı gösteren hidrojel­ler ise lokal bölgeye uygulanmadan önce *in-vitro* jelleştirilerek belli kayma gerilimi altında enjekte edilebilmekte ve enjekte edildikten sonra jel yapısını koruyabilmektedir. Bu sistemlerde biyoaktif bileşenler homojen bir şekilde jel içine hapsedildikten sonra ilgili hedef bölgeye enjekte edilebilmektedir [97], [98].

Son yıllarda, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere enjekte edilebilir hidrojel­ler oluşturmak için çeşitli doğal ve sentetik materyaller kullanılmıştır [99].

1.5.2. Enjekte Edilebilir Hidrojel Hazırlamak İçin Kullanılan Materyallerin Özellikleri

Enjekte edilebilir hidrojel tasarlanmasında kullanılan polimerler hidrojin mekanik dayanımı, biyouyumluluğu ve biyobozunurluluğunu etkilediklerinden hidrojel­lerin uygulama alanına bağlı olarak polimer seçilmesi gerekmektedir. Doğal ve sentetik polimerler enjekte edilebilir hidrojel sistemi hazırlamak için kullanılmaktadır. Bu polimerlerin enjekte edilebilir hidrojel hazırlamak için sahip olması gereken özellikler bulunmaktadır [91].

- i. Biyoaktif moleküllerin oda sıcaklığında enjekte edilmesi ve kapsüllenmesini kolaylaştırarak için hazırlanan polimer çözeltisi düşük viskozite değerine sahip olmalıdır.
- ii. Enjeksiyon sonrası polimer ve biyoaktif molekülün dağılmasına engel olmak için jelleşme hızlı olmalıdır.
- iii. Terapötik amaçla hazırlanan biyoaktif molekül içeren jellerin biyobozunur olması işlevini tamamlandıktan sonra vücuttan kolaylıkla uzaklaştırılması anlamında gereklidir.
- iv. Polimerler ve bozunma ürünleri biyouyumlu olmalı vücutta inflamatuvar tepki oluşturmamalıdır.
- v. Jeller uygulanacak bölge için uygun mekanik ve fiziksel özellikler göstermektedir.

1.5.2.1. Doğal Polimer

Doğal polimerler bitkiler, hayvanlar, algler gibi doğal kaynaklardan elde edilmektedir [87]. Hidrojel hazırlamada proteinler ve polisakkaritler olmak üzere 2 ana doğal malzeme sınıfı kullanılmaktadır. Polisakkarit sınıfını oluşturan doğal polimerler, aljinat, hyaluronik asit, kitosan vb. iken, protein sınıfını oluşturan doğal polimerler ise jelatin, kolajen vb. olup hidrojel hazırlamada kullanılmaktadır [100].

Polisakkaritler ve proteinler yapışma, farklılaşma ve çoğalma gibi hücre faaliyetlerini desteklemek için fiziksel, kimyasal, ve biyolojik sinyaller sağlayan ekstraselüler matrisin bileşenleri olup ekstraselüler matrise benzerlikleri, biyouyumlu ve biyobozunur özellikte olmalarından dolayı biyomedikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadırlar [99], [101]. Ancak biyomedikal uygulamalarda önemli bir özellik olan mekanik dayanım doğal polimerler ile elde edilen hidrojellerde zayıftır [102].

Aljinat özellikle kahverengi yosun ve bakterilerden türetilen (1-4) -bağlı β -D-mannuronik asit (M) ve α -L-gluronik asit (G) monomerlerinden oluşan bir hidrofilik ve doğrusal polisakkarittir [103]. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} veya Sr^{2+} gibi iki değerlikli katyonlar iyonik köprüler oluşturmak için G monomer bloklarıyla birlikte etkileşime girdiğinde basit jelleşme oluşabilmektedir [99]. Belli koşullar altında jel oluşturma yeteneği ve düşük toksisitesi nedeniyle hücre kapsüllemesi, doku mühendisliği ve ilaç taşınımı gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır [104], [105]. Fakat tüm bu özelliklerine rağmen, aljinat tam olarak degrade edilememektedir. İyonik olarak çapraz bağlanan aljinat hidrojeller, iki değerlikli iyonların çevre ortam içerisine kaybolmasını içeren bir iyon değiştirme işlemi aracılığıyla degrade olur ve kontrolsüz bir şekilde çözünmektedir. Aljinat, doku mühendisliği uygulamalarında, özellikle hücreyle etkileşimini arttırmak üzere, lektin ve RGD ile konjuge edilerek kullanılmaktadır [104], [106].

Hyaluronik asit (HA), N-asetil-D-glukozamin ve D-glukuronik asidin birden fazla yinelenen disakkarit biriminden oluşan bir glikozaminoglikandır. İnsan ve diğer hayvanlardaki tüm bağ dokularının ECM'sinde geniş çapta dağılmış halde bulunmaktadır [107]. Hyaluronik asit, doku hidrasyonu, besin difüzyonu, proteoglikan organizasyonu ve hücre farklılaşması gibi birçok biyolojik işlemde önemli rol oynamaktadır. HA, özellikle yara iyileşmesi sırasında ve eklemlerin sinovyal sıvısında bulunmaktadır [108]. HA ve türevleri, biyouyumluluk, biyolojik bozunabilirlik ve mükemmel jel oluşturma özellikleri nedeniyle doku mühendisliğinde yaygın bir şekilde araştırılmaktadır [109].

Kitosan, kısmen deasetillenen bir kitin türevi olan doğrusal bir polisakkarittir. Bu polikasyonik polisakkarit, glukozamin ve N-asetilglukozamin moleküllerini içerdiğinden, doğal glikozaminoglikanlara yapısal olarak yüksek derecede benzerlik göstermektedir [110], [111]. Kitosan yüksek biyouyumluluk ve biyolojik bozunabilirliği, düşük immünojenisitesi ve katyonik niteliği nedeniyle son yıllarda çeşitli doku mühendisliği uygulamaları için araştırılmaktadır [112]. Bununla birlikte, modifiye edilmeyen kitosan, kuvvetli moleküllerarası hidrojen bağları nedeniyle asitli çözeltilerde çözölebilmektedir. Bu nedenle enjekte edilebilir bir hidrojel olarak kullanımını sınırlamaktadır. Kitosan türevleri, glutaraldehid ile çapraz bağlanma, UV ışınlanması ve termal varyasyonlar yoluyla jelleştirilebilmektedir [111].

Jelatin, kolajen polimerinin hidrolizi ile tek sarmallı moleküllere bölünmesiyle oluşan protein esaslı doğal bir polimerdir. Jelatinin oluşumunu sağlayan kolajenin moleküler yapısı hidrojen bağı ve kovalent bağlarla bir arada tutulan üç iç içe polipeptit sarmal zincirinden oluşmaktadır. Jelatin, öncülüne (kolajen) kıyasla daha az immünojeniktir ve RGD sekansı gibi bilgi sinyallerini tutarak hücre yapışması, göç, farklılaşma ve çoğalmayı teşvik etmektedir [113]. Jelatin hidrojellerin fizyolojik sıcaklıkta kararlı olmamasından dolayı biyomedikal uygulamalarda kimyasal olarak modifiye edilen jelatin polimerinin kovalent çapraz bağlanması tercih edilmektedir [114].

1.5.2.2. Sentetik Polimer

Sentetik polimerlerin, kimyasal ve fiziksel özellikleri doğal polimerlere göre kontrol edilebilir ve tekrarlanabilir olmaları sebebiyle hidrojel çalışmaları için sıklıkla kullanılmaktadır [100]. Ancak sentetik polimerler ile hazırlanan hidrojeller doğal polimerler ile hazırlanan hidrojellere göre daha düşük biyouyumluluk ve biyobozunurluk göstermektedir [115]. Sentetik polimerler, belirli blok yapıları, moleköl ağırlıkları ve parçalanabilir bağlarla tekrar üretilebilir şekilde geliştirilebilmektedir [116]. Polietilen glikol (PEG), polivinil alkol (PVA), polipropilen fumarat (PPF), PNIPAAm, pluronik F-127 vb. hidrojel hazırlamada en sık kullanılan sentetik polimerlerdir [99].

PEG suda çözünebilir, sitotoksik ve immünojenik olmayan özelliklerinden dolayı biyomalzeme tasarımında yaygın olarak kullanılan sentetik bir polimerdir. Ayrıca Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından ayarlanabilir özellikleri ve güvenilir profili ile birçok klinik uygulama için onaylanmıştır [117]. Özellikle, çapraz bağlanma yoğunluğunu kontrol etme kabiliyeti PEG bazlı hidrojellere hücre etkileşimi ve doku

büyümesi için esneklik ve uyarlanabilirlik sağlar. PEG ve kimyasal olarak benzer polietilen oksit, iki ucu akrilatlar veya metakrilatlar ile modifiye edilerek foto çapraz bağlanabilen hidrofilik polimerlerdir. PEG hidrojelleri, hücre iskeleleri, ilaç taşıma sistemlerinde taşıyıcı olarak kullanılmaktadır [118], [119].

PVA ve PPF de, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan sentetik hidrofilik polimerlerdir. PVA, çeşitli malzemelerle türevlendirilebilen asılı hidroksi gruplarının çokluğu sayesinde çok fonksiyonlu makromerlere dönüştürülebilmektedir [99]. Fiziksel ve kimyasal olarak hidrojel oluşturmak üzere çapraz bağlanabilmekte ve diğer suda çözünen polimerler ile birleştirilebilmektedir [115]. PVA hidrojelleri, tekrarlanan donma/çözme yöntemleriyle fiziksel olarak çapraz bağlanarak veya glutaraldehit veya epiklorohidrin ile kimyasal olarak çapraz bağlanarak oluşturulmaktadır [99]. PPF, ester bağlantısının hidroliziyle bozunmaya uğrayan lineer bir poliesterdir. PPF, hidrofilik PEG ile bir blok kopolimer olarak sentezlendiğinde UV yardımıyla veya kimyasal olarak çapraz bağlanarak hidrojel oluşturabilmektedir [115].

1.6. GLUTATYONUN FARMASÖTİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Son yıllarda GSH, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda çeşitli tıbbi müdahaleler için kullanılmaktadır [26], [120]. GSH gibi peptitler, peptit bağlarıyla bağlanan 2-50 amino asitten oluşan kimyasal bileşiklerdir. Endojen peptitler, hormonlar, nörotransmitterler, büyüme faktörleri, iyon kanalı ligandları veya anti-enfektif ajanlar olarak görev yapan birçok fizyolojik süreçte yer alırlar [121], [122]. Eşsiz farmakolojik profilleri ve içsel özellikleri, peptitleri, geleneksel "küçük moleküllü" ilaçlardan (<500 Da) daha iyi tolere edilen ve daha düşük toksisiteye sahip mükemmel ilaç adayları haline getirmektedir. Oldukça seçici reseptör bağlama özellikleri, iyi bir klinik etkinlik sağlar [121]. Bununla birlikte, GSH'nin oral yoldan verilmesi diğer protein ve peptit ilaçlarına benzer şekilde zorluklara yol açmaktadır. Çünkü gastrointestinal (GI) kanaldaki fizikokimyasal engeller, düşük oral biyoyararlanıma yol açmaktadır. Her ne kadar penetrasyon artırıcılar ve enzimatik inhibitörler ile birlikte uygulama veya nanopartiküller, mikroemülsiyonlar, niozomlar ve lipozomlar içine kapsülleme gibi iletimi iyileştirmek için çeşitli yaklaşımlar araştırılmış olsa da klinik terapötik etkileri olan uygun formülasyonlar geliştirilmeye devam edilmelidir. GI yolunda proteolitik bozulmaya karşı koruma sağlayabilecek ve epitelyal membran boyunca moleküler absorpsiyonu artırabilecek GSH dağıtım sistemi

geliştirmeye yönelik araştırılan yaklaşımlar ile formülasyonunun tasarımına yönelik çalışmalar geliştirilmelidir [123].



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. BİTKİ ÖRNEKLERİNİN TEMİNİ

Araştırmada kullanılan semizotu (*Portulaca oleracea*) İzmir’den Ağustos 2023’te temin edilerek -20 °C’de muhafaza edildi. Kullanılan ıspanak (*Spinacia oleracea*), lahana (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*), brokoli (*Brassica oleracea*) taze örnekleri Düzce’ nin yerel marketlerinden temin edildi (Kasım 2023).

2.2. REAKTİFLER VE KİMYASALLAR

Asetonitril, hidroklorik asit, asetik asit ve ortho fosforik asit [tümü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sınıfı], sodyum perklorat monohidrat Sigma-Aldrich, Gliserol Merck, Polietilen Glikol 4000 moleküler ağırlıklı Clariant, Nobel İlaç ARGE’den temin edildi. Sigma-Aldrich N-(1-Pirenil)maleimid, GoldBio L-Glutatyon Redükte ve Cayman Chemical GSH/GSSG Assay Kit satın alındı.

2.3. CİHAZLAR

Araştırmada kullanılan başlıca ekipmanlar Thermo Heraeus Biofuge Stratos High Speed Centrifuge Zentrifuge Roto 3335 soğutmalı santrifüj cihazı, IKA Orbital shaker vortex, IKA T25 digital Ultra Turrax homojenizatör, Mettler Toledo AB204, Mettler Toledo XSR225DU ve Mettler Toledo XS205DU hassas teraziler, WTW Inolab pH 7110 pH metre, Heidolph 100-1400 rpm manyetik karıştırıcı, HydraUltrasonic su banyosu, Sartorius Arium 611 UV Ultrapure Water System, Martin CHRIST, The Epsilon 1-4 LSCplus freeze dryer, Eppendorf Research 5-10 µL, 50-100 µL ve 100-1000 µL mikropipet, Chromofil PET 20/25 0,20 µm filtre, Isolab 0,45 µm membran filtre, Agilent 1290 Infinity II HPLC cihazı UV ve FLD dedektör HPLC ve Empower software, ACE 5 C18 250×4,6 mm 5µ ve ACE 5 C18 150×4,6 mm 5µ kolonlar, Bio-tek synergy-2 slfpta Mikroplaka okuyucu ve Gen5 software, Uğur Ubm 60 buz makinesi, Renishaw RA802 Raman Spektroskopisi ve. WiRE yazılımı, Agilent Cary 630 FTIR-ATR Spektroskopisi,

TA Instrument DSC 250 Discovery Diferansiyel Taramalı Kalorimetre, Malvera Panalytical Limited ZSU3305 ve ZS XPLOER Zeta Sizer Nano.

2.4. KİMYASAL ÇÖZELTİLER VE HAZIRLANIŞLARI

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır;

Çözücü

%0,1 H₃PO₄ içeren 50 mM NaClO₄; 1,2 mL %85'lik H₃PO₄, 7,023 g NaClO₄*H₂O ultra saf su ile karıştırılarak hazırlandı.

N-(1-pyrenyl)-maleimide (NPM) çözeltisi

250 mL NPM çözeltisi; 250 mL Asetonitrilde 0.075g NPM çözdürüldü. Hazırlanan bu çözelti örneklerde bulunan tiyollerin türevlendirmesi (tiyol bileşiklerini floresans ışıma yapan bileşiklere dönüştürerek floresans dedektörde okunmasını sağlamak) amacıyla kullanıldı. Hazırlanan çözelti +4 °C'de 1 ay saklandı.

Hidroklorik asit (HCl) çözeltisi

2N HCl çözeltisi; 50 mL HPLC saflıkta H₂O'da 10 mL %37'lik (12 M) HCl çözdürüldü. Hazırlanan bu çözelti türevlendirme sonrası oksidatif reaksiyonun durdurulması amacıyla kullanıldı.

Ultraviyole dedektörlü HPLC (HPLC-UV) mobil faz

%0,1 H₃PO₄ 50 mM NaClO₄ ultra saf su ile hazırlandı. 0,45 µm membran filtreden süzüldü ve 15 dk ultrasonik banyoda degaze edildi. (pH 2.5)

Floresans dedektörlü HPLC (HPLC-FLD) mobil faz

Asetonitril: Su (65:35) ve 1 mL Asetik asit ile 1 mL Fosforik asit eklendi ve karıştırıldı. 0,45 µm membran filtreden süzüldü ve 15 dk ultrasonik banyoda degaze edildi. (pH 2.15)

Ultraviyole dedektörlü HPLC (HPLC-UV) glutatyon (GSH) standart çözeltileri

Hazırlanan GSH standart stok solüsyonu:

5000 ppm: 10 mg GSH + 2 mL çözücü ile hazırlandı.

Hazırlanan standart stok solüsyonundan 6,25 ppm, 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm ve 1000 ppm konsantrasyonlarında GSH çözeltileri aşağıdaki Çizelge 2.1’deki gibi hazırlandı.

Çizelge 2. 1. HPLC-UV GSH standart çözeltilerinin hazırlanışı.

Konsantrasyon (ppm)	Standart Stok Hacim (µL)	Çözücü (µL)	Toplam Hacim (µL)
6,25 ppm	1000 µL (12,5 ppm’dan)	1000 µL	2000 µL
12,5 ppm	1000 µL (25 ppm’dan)	1000 µL	2000 µL
25 ppm	1000 µL (50 ppm’dan)	1000 µL	2000 µL
50 ppm	1000 µL (100 ppm’dan)	1000 µL	2000 µL
100 ppm	1000 µL (1000 ppm’dan)	9000 µL	10 000µL
250 ppm	1000 µL (500 ppm’dan)	1000 µL	2000 µL
500 ppm	1000 µL (1000 ppm’dan)	1000 µL	2000 µL
1000 ppm	1000 µL (5000 ppm’dan)	4000 µL	5000 µL

Floresans dedektörlü HPLC (HPLC-FLD) glutatyon (GSH) standart çözeltileri

Hazırlanan GSH standart stok solüsyonları:

5000 ppm GSH: 10 mg GSH + 2 mL mobil faz çözücü

500 ppm GSH: 100 µL (5000 ppm stoktan) + 900 µL çözücü

100 ppm GSH: 200 µL (500 ppm stoktan) + 800 µL çözücü olacak şekilde hazırlandı.

Hazırlanan standart stok solüsyonlarından 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm ve 100 ppm konsantrasyonlarında GSH çözeltileri aşağıdaki Çizelge 2.2’deki gibi hazırlandı.

Çizelge 2. 2. HPLC-FLD GSH standart çözeltilerinin hazırlanışı.

Konsantrasyon (ppm)	Standart stok hacim (µL)	Çözücü (µL)	Ultra saf su (µL)	NPM (µL)	Toplam hacim (µL)
0 ppm	0 µL	20 µL	230 µL	750 µL	1000 µL
0,5 ppm	5 µL (100 ppm stoktan)	15 µL	230 µL	750 µL	1000 µL
1 ppm	10 µL (100 ppm stoktan)	10 µL	230 µL	750 µL	1000 µL
5 ppm	10 µL (500 ppm stoktan)	10 µL	230 µL	750 µL	1000 µL
10 ppm	20 µL (500 ppm stoktan)	0 µL	230 µL	750 µL	1000 µL
20 ppm	4 µL (5000 ppm stoktan)	16 µL	230 µL	750 µL	1000 µL
50 ppm	10 µL (5000 ppm stoktan)	10 µL	230 µL	750 µL	1000 µL
100 ppm	20 µL (5000 ppm stoktan)	0 µL	230 µL	750 µL	1000 µL

2.5. GLUTATYON (GSH) EKSTRAKSİYONU VE ULTRAVİYOLE DEDEKTÖRLÜ HPLC (HPLC-UV) METODU

Glutasyon, liyofilize ve taze bitki örneklerinden su ile ekstraksiyon yapıldı ve HPLC-UV ile kantitatif tayin ile belirlendi.

2.5.1. Sulu Numuneden Liyofilize Bitki Örneklerin Ekstraksiyonu

Liyofilizatörde bitkiler -45 °C ‘den -20 °C’ye kadar kademeli olarak 0,133 mbar vakum basınç altında 72 saat boyunca kurutuldu. Liyofilizatörde kurutulan brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu çözücü ile ekstraksiyonu yapıldı. Buz üzerinde toz haline getirilen 1 g bitki örneği 12 mL çözücü ile ara ara karıştırılarak 1 saat bekletildi. +4 °C ‘de 8500 rpm devirde 15 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası yüzeyde toplanan süpernatant alındı ve 0,20 µm PET 20/25 filtreden geçirilerek HPLC viyallerine aktarıldı.

2.5.2. Sulu Numuneden Taze Bitki Örneklerin Homojenizatör ile Ekstraksiyonu

Taze brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu bitkileri çözücü ile ekstraksiyonu yapıldı. 1g bitki 12 mL çözücü içerisinde buz üzerinde doku homojenizatörü ile 3000 rpm’de 5 dk boyunca 1 dk aralıklarla homojenize edildi. +4 °C ‘de 8500 rpm devirde 15 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası yüzeyde toplanan süpernatant alındı ve 0,20 µm PET 20/25 filtreden geçirilerek HPLC viyallerine aktarıldı.

2.5.3. Glutasyon İçeriğinin Ultraviyole Dedektörlü HPLC (HPLC-UV) ile Kantitatif Tayini

Ekstraksiyonu yapılan bitki örneklerinin GSH analizi HPLC ile gerçekleştirildi. 215 nm dalga boyuna sahip ultraviyole dedektör kullanıldı. 0,7 mL/dk akış hızı ile mobil fazın izokratik akışı sağlandı. ACE 5 C18 250 x 4,6 mm 5µ kolon 25 °C kolon sıcaklığına ayarlandı. Enjeksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde analiz gerçekleştirildi. Analiz süresi 12 dk olarak belirlendi.

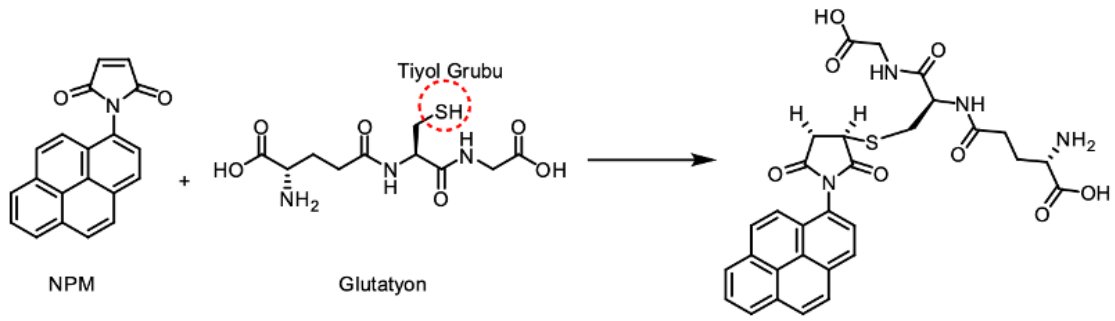
Bu analiz yöntemi ile 6,25-1000 ppm konsantrasyon aralığında kalibrasyon eğrisi oluşturuldu [124].

2.6. GLUTATYON EKSTRAKSİYONU VE FLORESANS DEDEKTÖRLÜ HPLC (HPLC-FLD) METODU

Glutasyon, liyofilize ve taze bitki örneklerin sulu numunelerinden ekstraksiyonu yapıldı ve HPLC-FLD ile kantitatif tayin ile belirlendi.

2.6.1. Sulu Numuneden Liyofilize Bitki Örneklerin Ekstraksiyonu

Liyofilizatörde kurutulan brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu bitki örnekleri çözücü ile ekstraksiyonu yapıldı. Toz haline getirilen bitki örnekleri 1 g bitki örneği 12 mL çözücü ile 15 dk boyunca buzla doldurulan ultrasonik banyoda karıştırılarak bekletildi. +4 °C’de, 8500 rpm devirde 15 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası yüzeyde toplanan süpernatant alındı. Numunelerdeki tiyol bileşiği olan glutasyonun HPLC-FLD’de belirlenebilmesi için numunelerin türevlendirilmesi gerçekleştirildi. Serbest sülfidril grupları içeren tiyol bileşikler ile NPM çözeltisinin reaksiyonu Şekil 2.1’de gösterilmiştir [125]. Numunelerde türevlendirme reaksiyonları için çeşitli reaksiyon denemeleri yapıldı. Belirlenen türevlendirme reaksiyonları Çizelge 2.3’te gösterilmektedir.



Şekil 2. 1. Serbest sülfidril grupları içeren tiyol bileşikleri ile NPM çözeltisinin reaksiyonu.

Çizelge 2. 3. Liyofilize bitki ekstraktların türevlendirme reaksiyonları.

Bitki	Süpernatant	Su	NPM	Toplam hacim
Liyofilize Brokoli	50 µL	200 µL	750 µL	1000 µL
Liyofilize Ispanak	130 µL	120 µL	750 µL	1000 µL
Liyofilize Lahana	200 µL	50 µL	750 µL	1000 µL

Türevlendirme:

Türevlendirme reaksiyonun gerçekleşebilmesi için kapağı kapalı bir şekilde 5 dakika bekletildi. Reaksiyonu durdurmak amacıyla 10 µL 2 N HCl ilave edildi. Tüpler vorteksten geçirildi. Hazırlanan 1 mL'lik bitki numuneleri 0,20 µm PET 20/25 filtrelerden geçirilerek HPLC viyallerine aktarıldı.

2.6.2. Sulu Numuneden Taze Bitki Örneklerin Homojenizatör ile Ekstraksiyonu

Taze brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu bitkileri çözücü ile ekstraksiyonu yapıldı. Taze brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu doku homojenizatöründe 1g bitki 12 mL çözücü içerisinde buz üzerinde 3000 rpm'de 5 dk boyunca 1 dk aralıklarla homojenize edildi.

+4 °C'de, 8500 rpm devirde 15 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası yüzeyde toplanan süpernatant alındı. Numunelerdeki tiyol bileşiği olan glutatyonun HPLC-FLD 'de belirlenebilmesi için numunelerin türevlendirilmesi gerçekleştirildi. Numunelerde türevlendirme reaksiyonları için çeşitli reaksiyon denemeleri yapıldı. Belirlenen

türevlendirme reaksiyonları Çizelge 2.4'te gösterilmektedir.

Çizelge 2. 4. Taze bitki ekstraktların türevlendirme reaksiyonları.

Bitki	Süpernatant	Su	NPM	Toplam hacim
Taze Brokoli	50 µL	200 µL	750 µL	1000 µL
Taze Ispanak	250 µL	0 µL	750 µL	1000 µL
Taze Lahana	200 µL	50 µL	750 µL	1000 µL

2.6.3. Glutasyon İçeriğinin Floresans Dedektörlü HPLC (HPLC-FLD) ile Kantitatif Tayini

Ekstraksiyonu yapılan bitki örnekleri GSH analizi HPLC-FLD ile gerçekleştirildi. Eksitasyon dalga boyu (λ_{ex}) 330 nm ve emisyon dalga boyu (λ_{em}) 380 nm' ye ayarlanan floresans dedektör kullanıldı. 0,5 mL/dk akış hızı ile mobil fazın izokratik akışı sağlandı. ACE 5 C18 150 x 4,6 mm 5µ kolon 35°C'de kolon sıcaklığına ayarlandı. Enjeksiyon hacmi 10 µL olacak şekilde analiz gerçekleştirildi. Analiz süresi 30 dk olarak belirlendi. Bu analiz yöntemi ile 0,5-100 ppm konsantrasyon aralığında kalibrasyon eğrisi oluşturuldu [125].

2.7. GLUTATYON REDÜKTE (GSH) VE OKSİDE (GSSG) FORMLARININ ORANLARININ BELİRLENMESİ

Glutasyon assay kiti ile okside ve redükte glutasyon oranları 405-414 nm'de absorbans ölçümü UV spektrofotometrede belirlendi. GSSG standartları, sulandırılarak hazırlanan MES tamponu ile final konsantrasyon 0-8 µM aralığında ve eşdeğer toplam GSH 0-16 µM aralığında 8 test tüpünde hazırlandı. Plate üzerine belirlenen kuyucuklara her kuyucuk için 50 µL standart, 50 µL liyofilize ve taze bitki numuneleri (1:2 oranında seyreltildi) eklendi. Standart ve test numuneleri 2 tekrarlı olacak hazırlandı. Taze hazırlanan assay cocktail reaktif (20 mL assay cocktail hazırlamak için: 11,25 mL sulandırılan MES Tamponu, 0,45 mL Sulandırılan Cofactor Mixture, 2,1 mL Sulandırılan enzim mixture, 2,3 mL ultra saf su, 0,45 mL sulandırılan DTNB. Hazırlandıktan sonra 10 dk içinde kullanılır.) standartları ve test numuneleri içeren her kuyucuğa 150 µL eklendi

Ölçüm yapılınca kadar karanlıkta 25 dakika inkübe edildi. 405-414 nm absorbans değerleri UV spektrofotometre ile belirlendi.

Her bir standart düzeltilen absorbans değeri GSSG ya da total GSH konsantrasyonun fonksiyonu olarak grafiği çizildi ve değerleri hesaplandı.

2.8. GLUTATYONUN HPLC-UV ANALİTİK SİSTEMDEN SAFLAŞTIRILMASI

Sulu numuneden bitki örnekleri ekstraksiyonunda en yüksek verim sağlanan liyofilize ıspanak ile büyük ölçekte ekstraksiyon yapıldı. Bunun için 10 g liyofilize ıspanak toz haline getirildi ve 120 mL çözücü ile ekstraksiyonu gerçekleştirildi. HPLC-UV analitik metodu ile glutatyon pikinin kolona tutunduğu zaman aralıkları belirlendi. HPLC-UV sisteminden glutatyon piki toplandı. Saflaştırılan glutatyonun konsantrasyonu 7 mg/mL elde edildi.

2.9. SAFLAŞTIRILAN LİYOFİLİZE GLUTATYONUN KARAKTERİZASYONU

HPLC-UV analizi esnasında saflaştırılan glutatyondan çözücüyü uzaklaştırmak için 30 saat boyunca liyofilizatörde çözücü uzaklaştırıldı. Liyofilize edilen saflaştırılmış glutatyon karakterizasyon için hazır hale getirildi.

2.9.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Glutatyona ait fonksiyonel grup ve atomlar arasındaki bağları belirlemek için saflaştırılan glutatyonun doğrulaması Agilent Cary 630 FTIR spektroskopisi kullanılarak belirlenmiştir. Saflaştırılan liyofilize glutatyon $0,5 \text{ cm}^{-1}$ çözünürlükte, transmisyon modunda ve $1000\text{--}3500 \text{ cm}^{-1}$ aralığında iletim spektrumu yoluyla belirlendi.

2.9.2. Raman Spektroskopisi

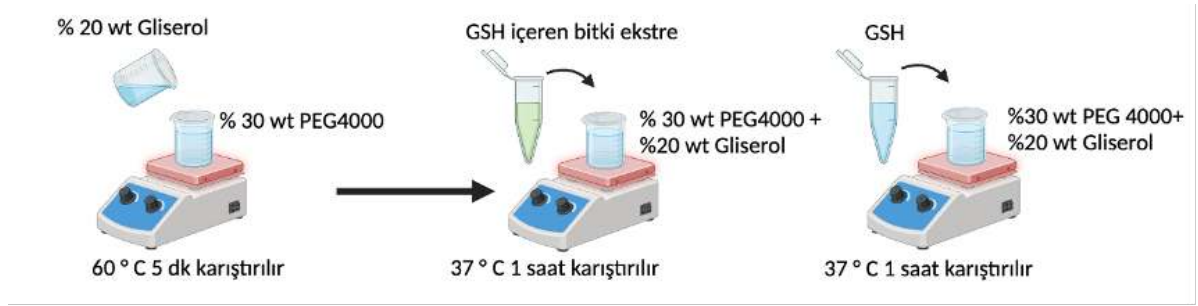
Glutatyona ait karakterize fonksiyonel grupları belirlemek amacıyla saflaştırılan glutatyonun doğrulaması Renishaw Raman spektroskopisi ve WiRE yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Saflaştırılan liyofilize glutatyon için %100 lazer gücü, 1 saniye maruz kalma süresi ve $100\text{--}2000 \text{ cm}^{-1}$ aralığında belirlendi.

2.10. ENJEKTE EDİLEBİLİR HİDROJEL FORM TASARIMI

Temel matriks bileşeni sentetik polimer olan Polietilen Glikol 4000 (PEG 4000) ile fiziksel çapraz bağlanmayı sağlayan gliserol kullanılarak oluşturulan enjekte edilebilir hidrojel form tasarım yöntemi oluşturuldu.

2.10.1. Enjekte Edilebilir Glutasyon (GSH) Bazlı Hidrojellerin Hazırlanması

%30 wt PEG 4000 ultra su saf içerisinde çözündü. Çapraz bağlayıcı olarak %20 wt gliserol 60°C’de ilave edilerek 5 dk boyunca 700 rpm hız ile manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Jelleşme sağlandıktan sonra GSH içeren ıspanak bitki ekstresi (10 mg/mL) ve GSH (10 mg/mL) bazlı hidrojel oluşturmak için hazırlanan karışımlara 37 °C’de ilave edilerek 1 sa boyunca 700 rpm ile manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 12 M HCL ile pH 7’ye ayarlandı [126] (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. Enjekte edilebilir glutasyon bazlı hidrojellerin hazırlama aşamaları.

[BioRENDER tarafından oluşturuldu]

2.11. ENJEKTE EDİLEBİLİR GLUTATYON (GSH) BAZLI HİDROJELİN KARAKTERİZASYONU

Oluşturulan enjekte edilebilir glutasyon (GSH) bazlı hidrojellerin karakterizasyonu için cam petri kabına alınan jeller liyofilizatörde 30 saat boyunca 0,133 mbar vakum basınç altında kurutuldu. Kurutulan hidrojeller FTIR ve DSC karakterizasyon çalışmaları için kullanıldı.

2.11.1. Z-Ortalama ve Polidispersite İndeksi

Işınlara saçılma davranışına bağlı enjekte edilebilir glutasyon içeren bitki ekstre bazlı ve GSH bazlı hidrojellerin Z-ortalama, partiküllerin boyut dağılımını değerlendirmek amacıyla polidispersite değerleri Malvern ZSP-Zeta Sizer Nano cihazı ve ZS XPLOER

yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Ölçüm esnasında polystyrene latex malzemedan oluşan cell malzemesi ve DTS0012 kodlu cell kullanılmıştır. Her ölçüm ortalama değeri belirlenmesi amacıyla üçer kez tekrarlanmıştır.

2.11.2. Zeta Potansiyel Ölçümü

Enjekte edilebilir glutatyon içeren bitki ekstre bazlı ve GSH bazlı hidrojellerin yüzey yükünün temsil ettiği değeri ve tasarlanan enjekte edilebilir hidrojel yapısının kararlılığını değerlendirmek amacıyla zeta potansiyel ölçümü Malvern ZSP-Zeta Sizer Nano cihazı ve ZS XPLOER yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Ölçüm esnasında polystyrene latex malzemedan oluşan cell malzemesi ve DTS1070 kodlu cell kullanılmıştır.

2.11.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Liyofilize enjekte edilebilir glutatyon içeren bitki ekstre bazlı ve GSH bazlı hidrojellerin fonksiyonel grup ve atomlar arasındaki bağlar Agilent Cary 630 FTIR spektroskopisi kullanılarak belirlenmiştir. FTIR $0,5\text{ cm}^{-1}$ çözünürlük kullanarak transmisyon modunda ve $1000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ aralığında iletim spektrumu yoluyla belirlendi.

2.11.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)

Liyofilize enjekte edilebilir glutatyon içeren bitki ekstre bazlı ve GSH bazlı hidrojellerin termal davranışlarını belirlemek amacıyla bozunma sıcaklıkları ve entalpi değerleri hakkında bilgi edinmek için TA Instrument DSC kullanıldı. 2,1 mg liyofilize glutatyon içeren bitki ekstre bazlı hidrojel ve 1,4 mg liyofilize GSH bazlı hidrojel Tzero Al pan içinde Tzero Hermatic Lid Al pan ile kapsüllendirildi. Azot gazı ortamında başlangıç sıcaklık $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve son sıcaklık $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ olmak üzere $10\text{ }^{\circ}\text{C/dk}$ ısıtma/soğutma hızında ölçülerek belirlendi.

2.11.5. Sol-Jel Geçiş Özelliği

Oluşturulan enjekte edilebilir glutatyon içeren bitki ekstre bazlı ve GSH bazlı hidrojeller cam petri kabına alınarak oda sıcaklığında ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) ve etüvde ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$)’de 24 saat boyunca form değişimleri takip edildi.

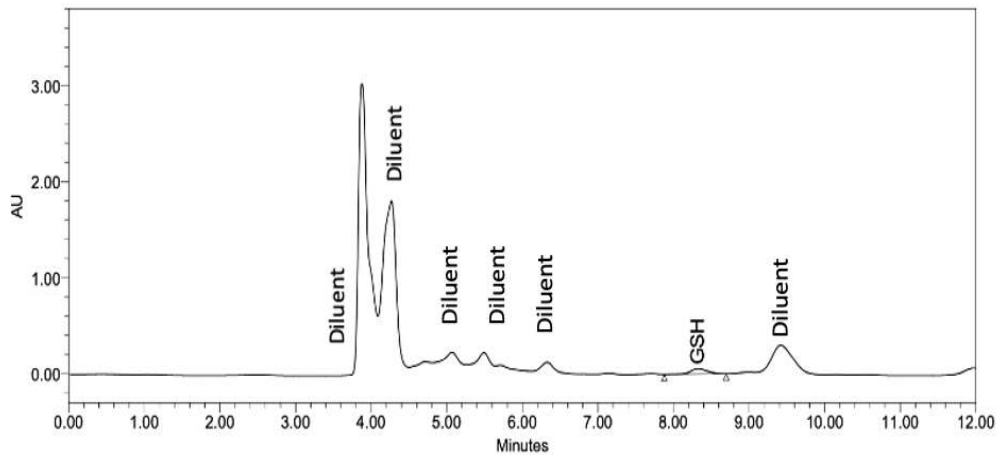
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. BİTKİ ÖRNEKLERİNDEN GLUTATYONUN ANALİTİK ANALİZİ

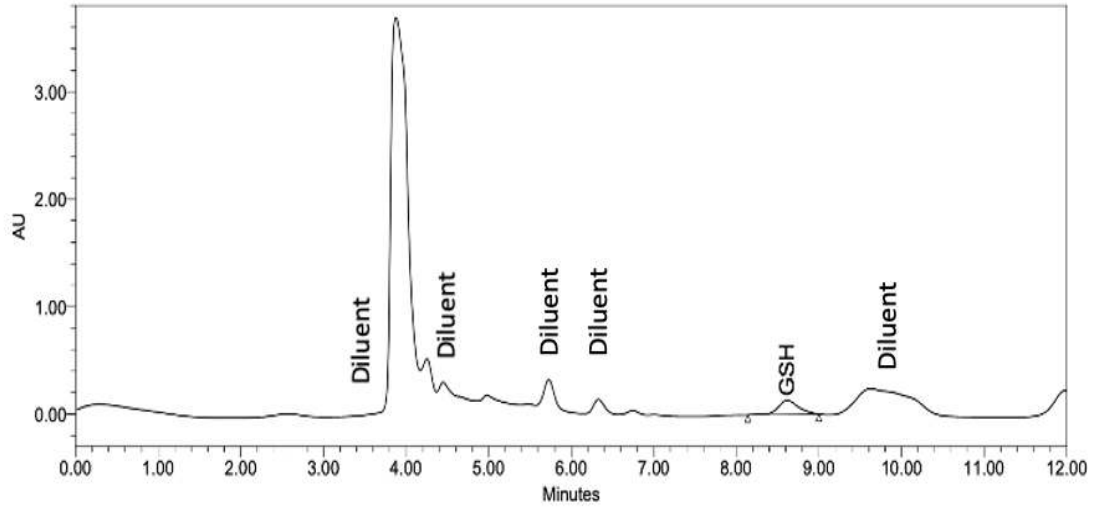
Sulu numuneden ekstraksiyonu yapılan liyofilize ve taze brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu bitki örneklerin ultraviyole dedektörlü ve floresans dedektörlü HPLC analitik yöntemler ile kalitatif ve kantitatif analizi karşılaştırıldı.

3.1.1. Bitki Örneklerinde Glutatyonun Ultraviyole Dedektörlü HPLC (HPLC-UV) Analiz Sonuçları ve Değerlendirilmesi

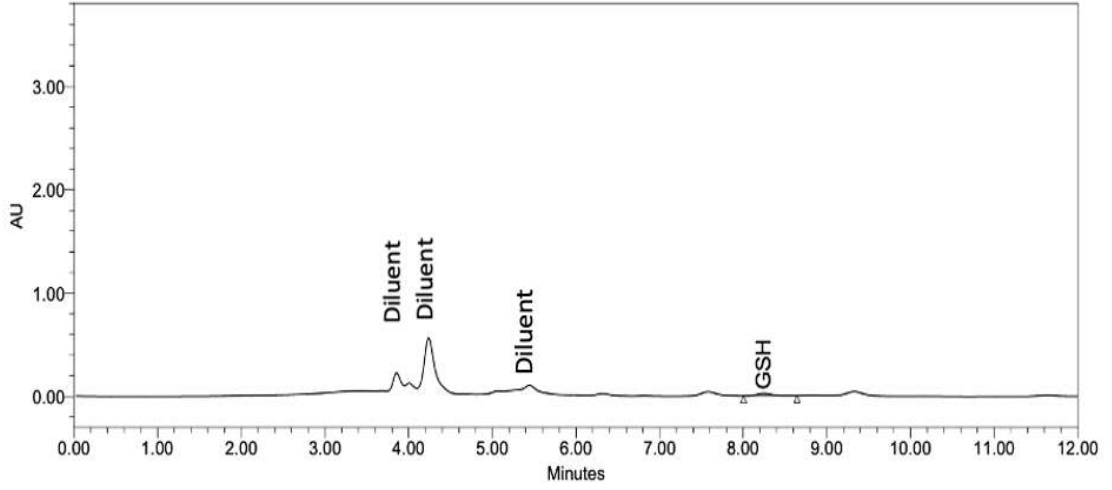
Glutatyon, liyofilize ve taze brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu bitki örneklerinden saptanabilmesi için sulu numuneden ekstraksiyon yöntemi optimize edildi. Ekstrakte edilen bitki örnekleri ultraviyole dedektörlü HPLC ile kalitatif ve kantitatif analizi gerçekleştirildi [124]. Tüm analizler üç tekrarlı olarak yapıldı. Standartların bağıl alıkonma zamanları (relative retention time) belirlendi. Böylece elde edilen standartların bağıl alıkonma zamanları yardımı ile kromatogramlardaki piklere karşılık gelenlerin GSH oldukları ortaya çıkarıldı. Analizi yapılan liyofilize bitki örneklerine ait brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu bitki örneklerinin HPLC-UV analizi ile elde edilen kromatogramları sırasıyla Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4 gösterilmektedir.



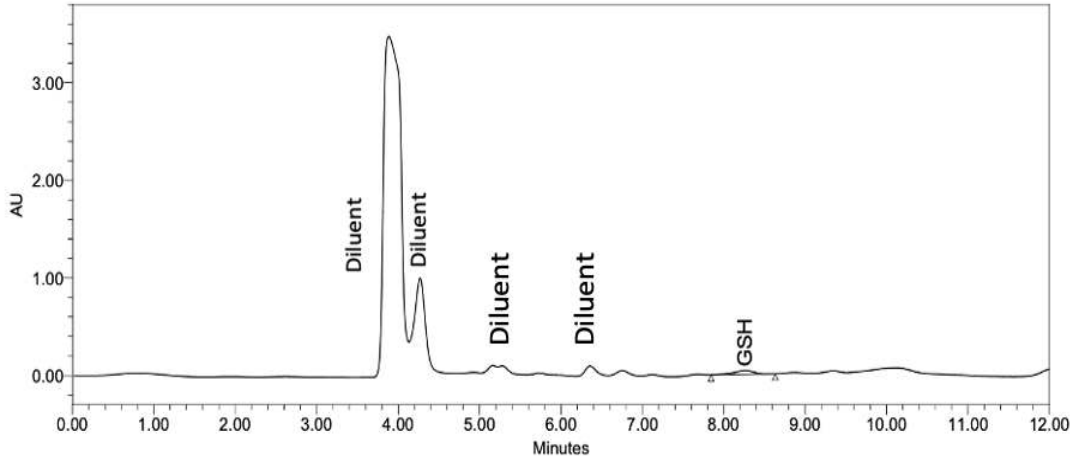
Şekil 3.1. Analizi yapılan liyofilize brokoli bitki örneğine ait HPLC-UV analizi ile elde edilen kromatogramı.



Şekil 3. 2. Analizi yapılan liyofilize ıspanak bitki örneğine ait HPLC-UV analizi ile elde edilen kromotogramı.

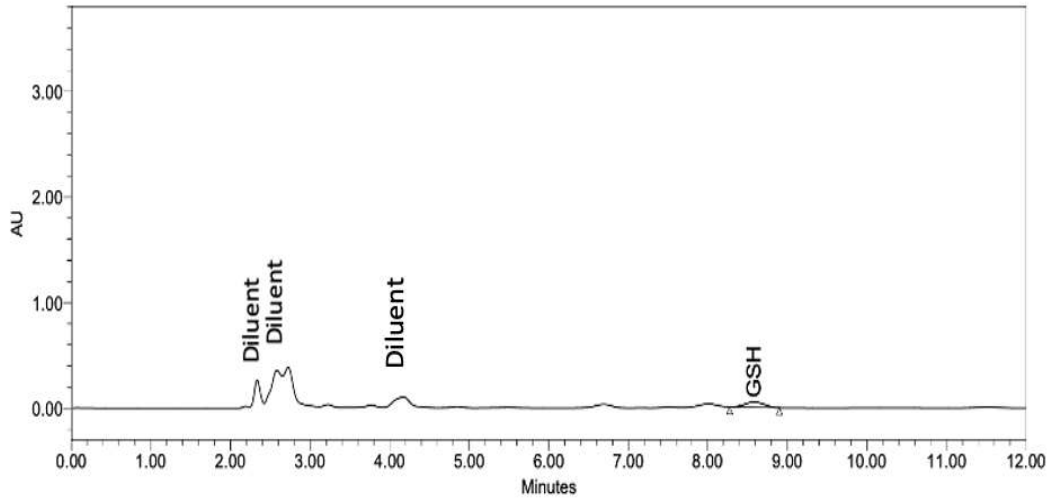


Şekil 3. 3. Analizi yapılan liyofilize lahana bitki örneğine ait HPLC-UV analizi ile elde edilen kromotogramı.

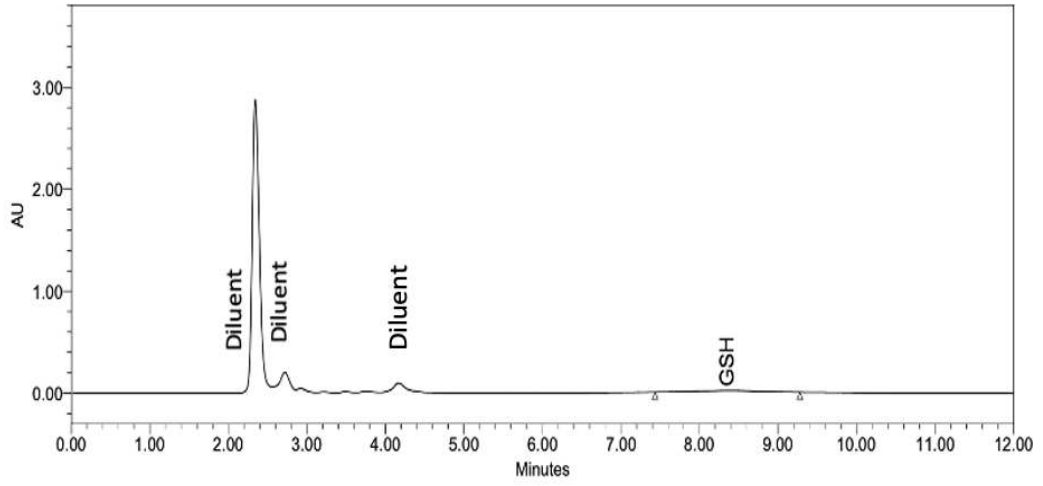


Şekil 3. 4. Analizi yapılan liyofilize semizotu bitki örneğine ait HPLC-UV analizi ile elde edilen kromotogramı.

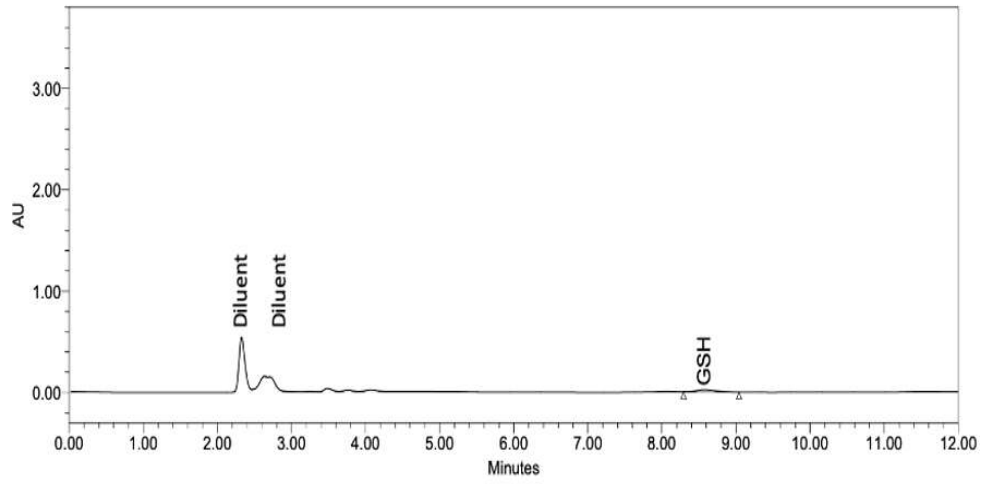
Analizi yapılan taze bitki örneklerine ait brokoli, ıspanak, lahanana ve semizotu bitki örneklerinin HPLC-UV analizi ile elde edilen kromatogramları sırasıyla Şekil 3.5, Şekil 3.6 ve Şekil 3. 7 ile gösterilmektedir.



Şekil 3. 5. Analizi yapılan taze brokoli bitki örneğine ait HPLC-UV analizi ile elde edilen kromotogramı.

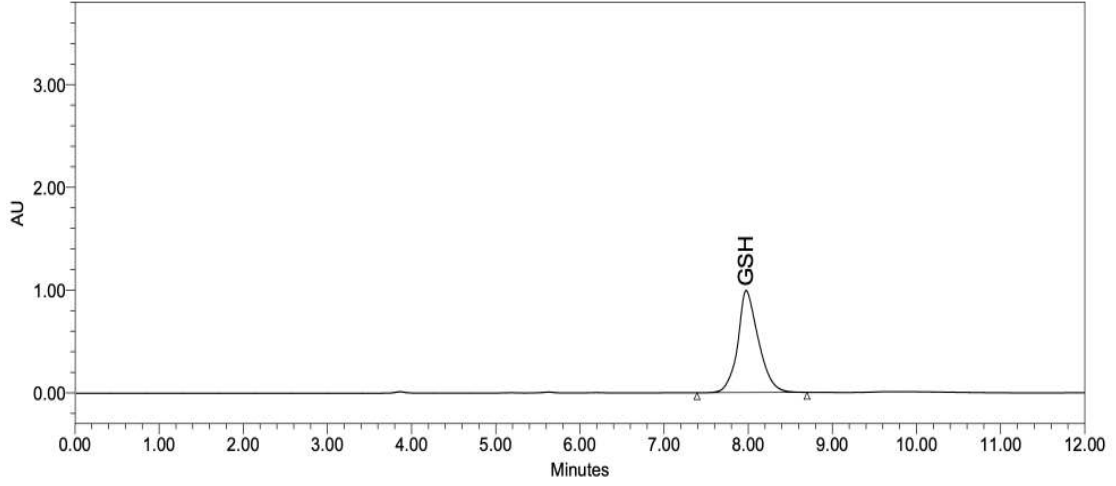


Şekil 3. 6. Analizi yapılan taze ıspanak bitki örneğine ait HPLC-UV analizi ile elde edilen kromotogramı.



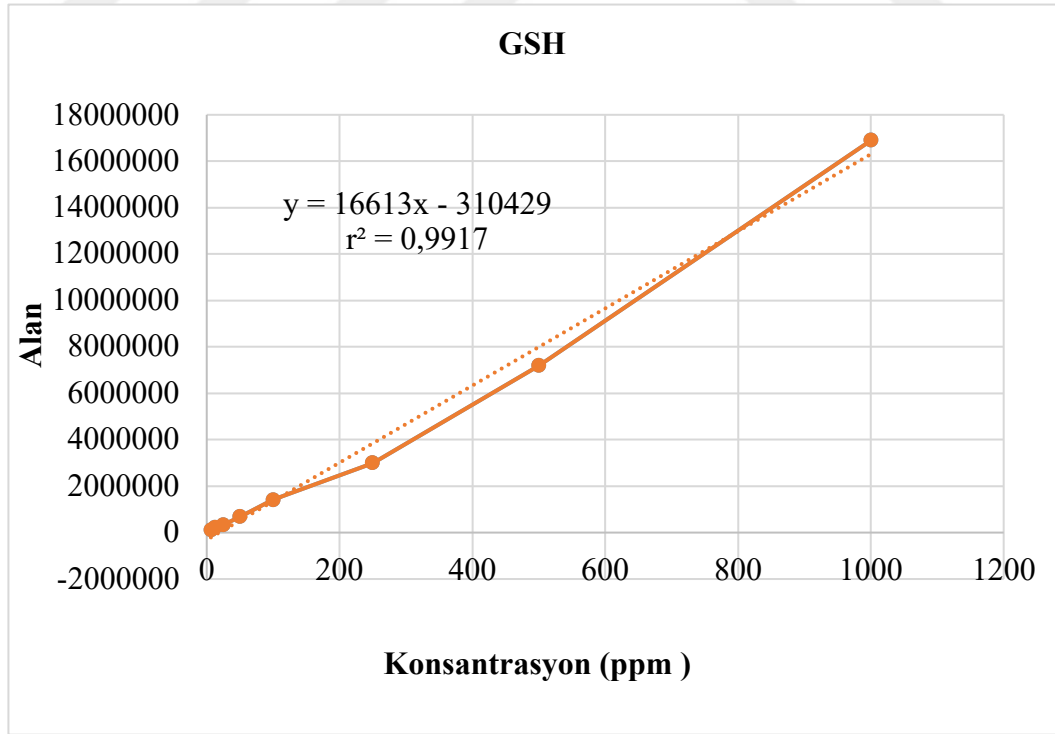
Şekil 3. 7. Analizi yapılan taze lahana bitki örneğine ait HPLC-UV analizi ile elde edilen kromotogramı.

1000 ppm konsantrasyonda hazırlanan GSH standart HPLC-UV ile analizi ile elde edilen kromatogramı Şekil 3.8'te gösterilmektedir.



Şekil 3. 8. 1000 ppm konsantrasyonda GSH standart kromotogramı.

Belirli konsantrasyonlarda hazırlanan (6,25 ppm-1000 ppm) GSH standart kalibrasyon eğrisi Şekil 3.9'te gösterilmektedir. GSH standart eğrisinden elde edilen formülden liyofilize brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu bitki örnekleri ile taze brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu bitki örneklerinin GSH içeriği $\mu\text{g/g}$ olarak hesaplandı ($r^2 = 0.9917$) (Çizelge 3.1).



Şekil 3. 9. GSH standart eğrisi.

Çizelge 3. 1. Liyofilize ve taze bitki örneklerinin GSH içeriğinin HPLC-UV analizi ile belirlenen miktarları.

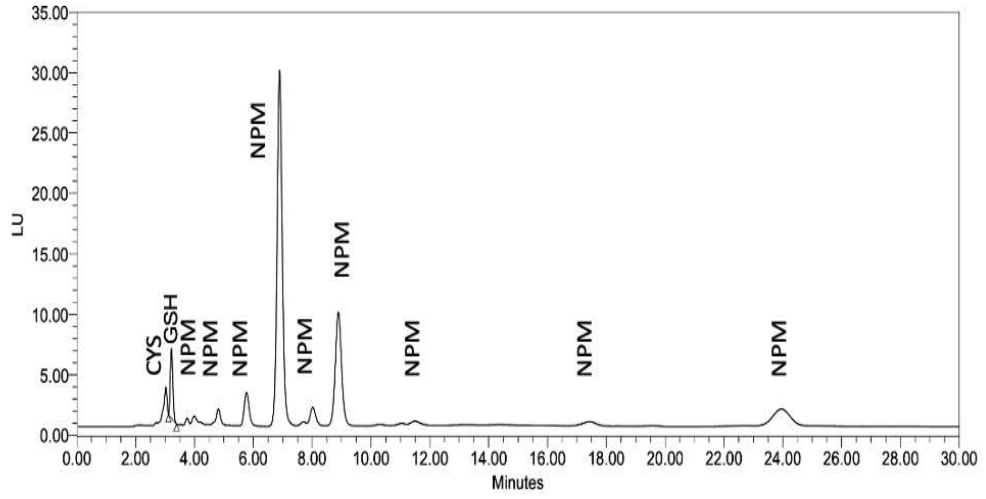
Bitki	Numunedeki miktar (µg/g)
Liyofilize Brokoli	855,15
Liyofilize Ispanak	1840,42
Liyofilize Lahana	707,62
Liyofilize Semizotu	434,55
Taze Brokoli	804,74
Taze Ispanak	847,14
Taze Lahana	504,94
Taze Semizotu	-

Sulu numuneden ekstraksiyonu yapılan liyofilize ve taze brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu bitki örneklerinin HPLC-UV analitik analiz sonuçlarına göre 1 g bitkiden elde edilen glutasyon miktarı en yüksek liyofilize ıspanak ile 1840, 42 µg elde edilirken taze semizotunda glutasyona ait pik elde edilemedi. Bunun sebebi belirlenemeyecek kadar az miktarda olması olabileceği düşünülmektedir.

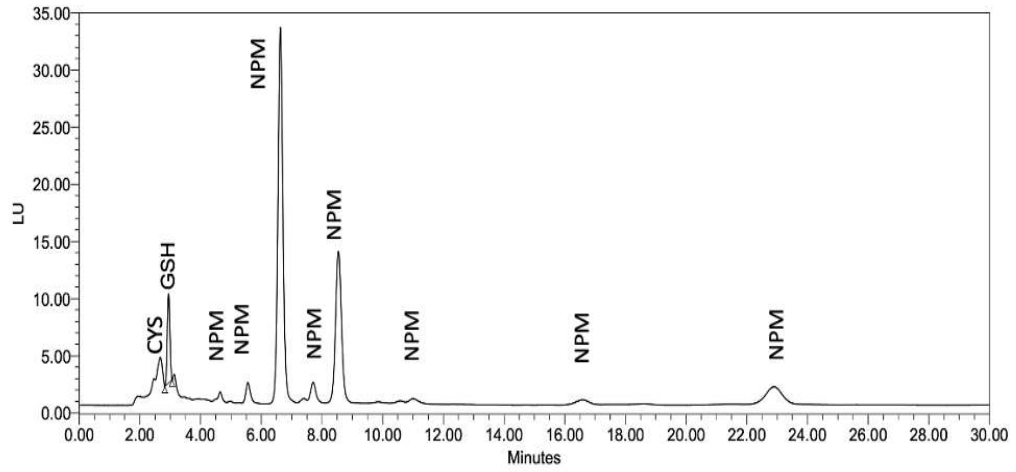
3.1.2. Bitki Örneklerinde Glutasyonun Floresans Dedektörlü HPLC Analiz Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Glutasyon (GSH), liyofilize ve taze brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu bitki örneklerinden saptanabilmesi için sulu numuneden ekstraksiyon yöntemi optimize edildi. Ekstrakte edilen bitki örnekleri floresans dedektörlü HPLC ile kalitatif ve kantitatif analizi gerçekleştirildi [125]. Bitki örneklerinin içerdiği tiyol bileşikler olan GSH ve CYS (Sistein) HPLC analizi ile saptanabilmesi için NPM ile türevlendirilmesi yoluna gidildi. Tüm analizler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Standartların bağıl alıkonma zamanları (relative retention time) belirlendi. Böylece elde edilen standartların bağıl alıkonma zamanları yardımı ile kromatogramlardaki piklere karşılık gelenlerin GSH oldukları ortaya çıkarıldı. Analizi yapılan liyofilize brokoli, ıspanak ve lahana bitki örneklerinin HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromatogramları sırasıyla Şekil 3.10,

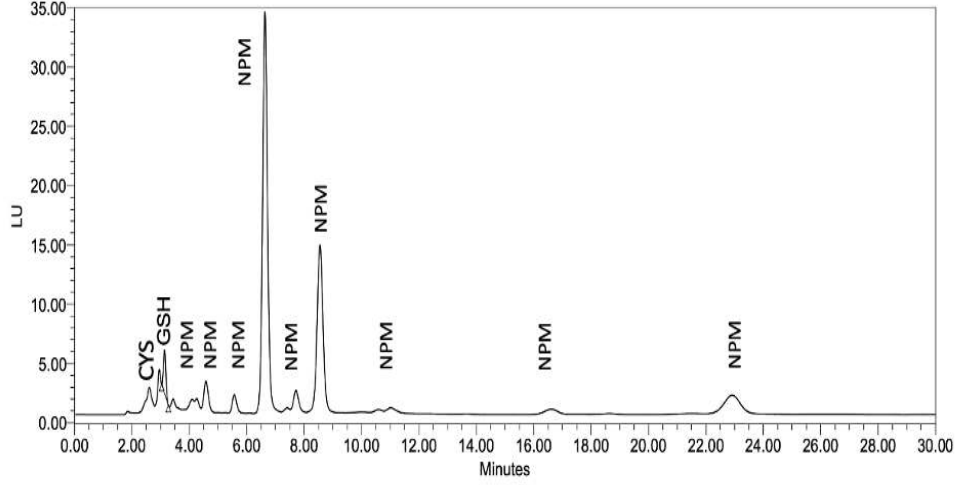
Şekil 3.11 ve Şekil 3.12 ile gösterilmektedir.



Şekil 3. 10. NPM ile türevlendirilen liyofilize brokoli bitki örneğine ait HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromotogramı.

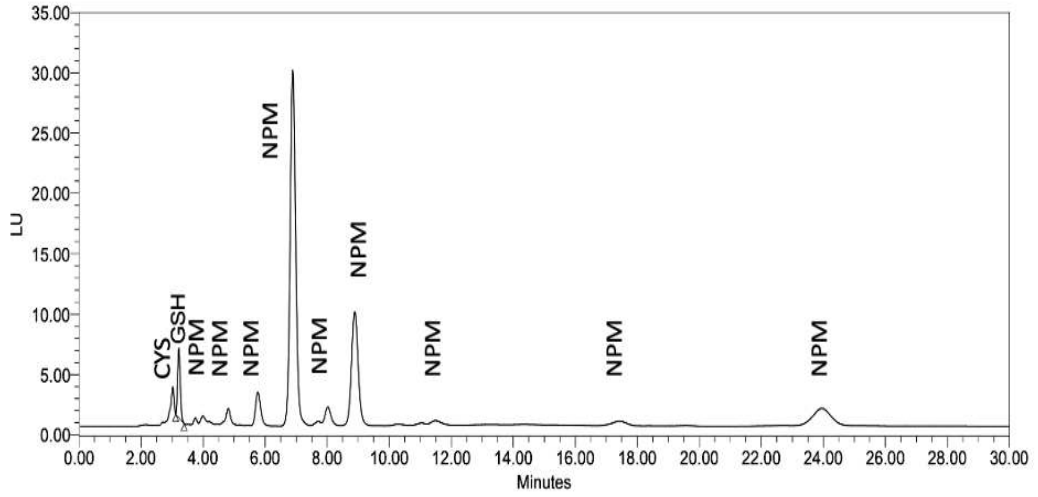


Şekil 3. 11. NPM ile türevlendirilen liyofilize ıspanak bitki örneğine ait HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromotogramı.

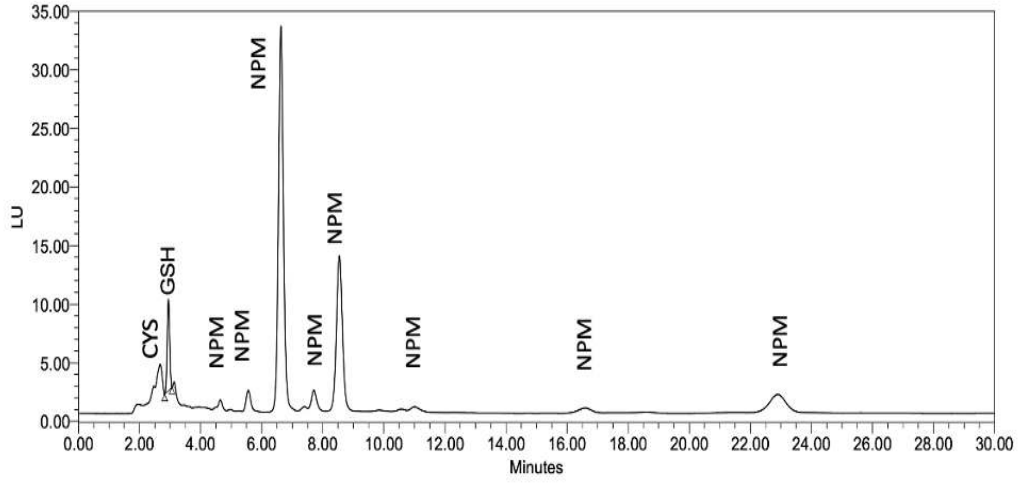


Şekil 3. 12. NPM ile türevlendirilen liyofilize lahan a bitki örneğine ait HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromotogramı.

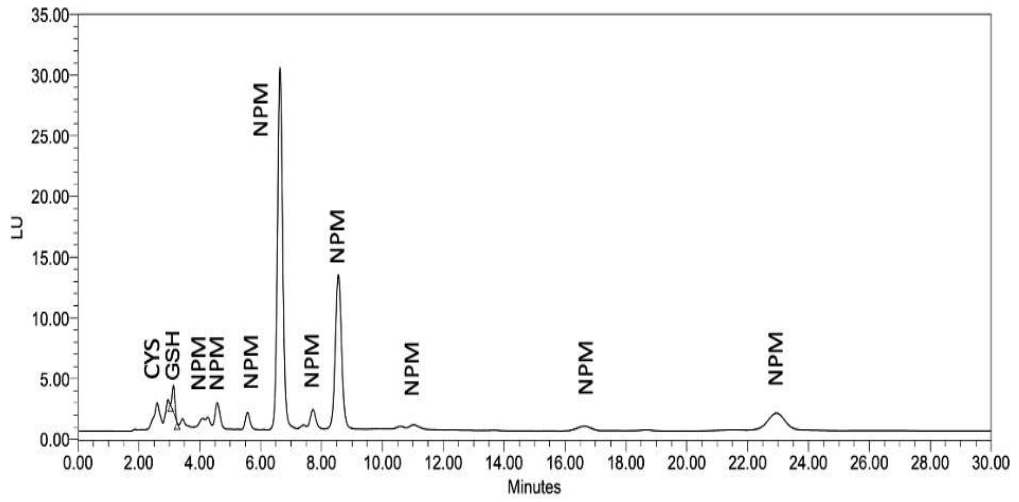
Analizi yapılan taze brokoli, ıspanak ve lahan a bitki örneğlerinin HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromatogramları sırasıyla Şekil 3.13, Şekil 3.14 ve Şekil 3.15 ile gösterilmektedir.



Şekil 3. 13. NPM ile türevlendirilen taze brokoli bitki örneğine ait HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromotogramı.

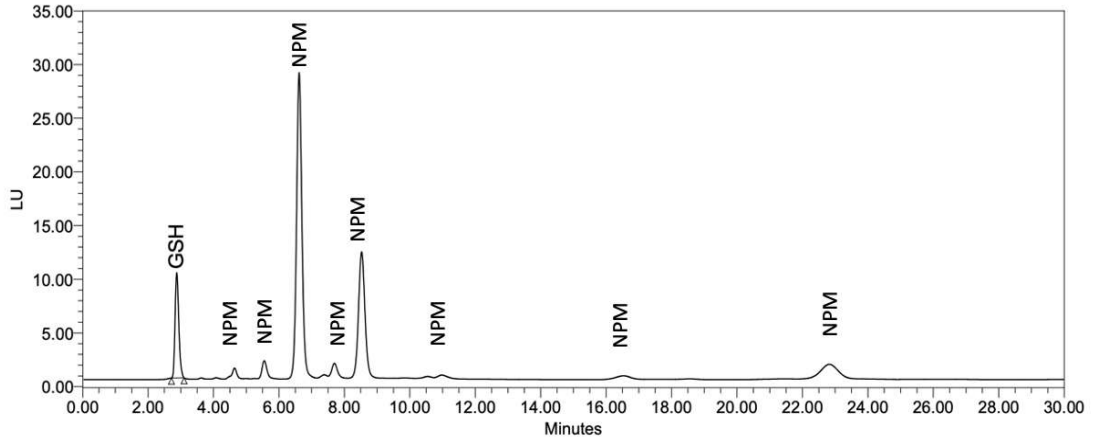


Şekil 3. 14. NPM ile türevlendirilen taze ıspanak bitki örneğine ait HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromotogramı.



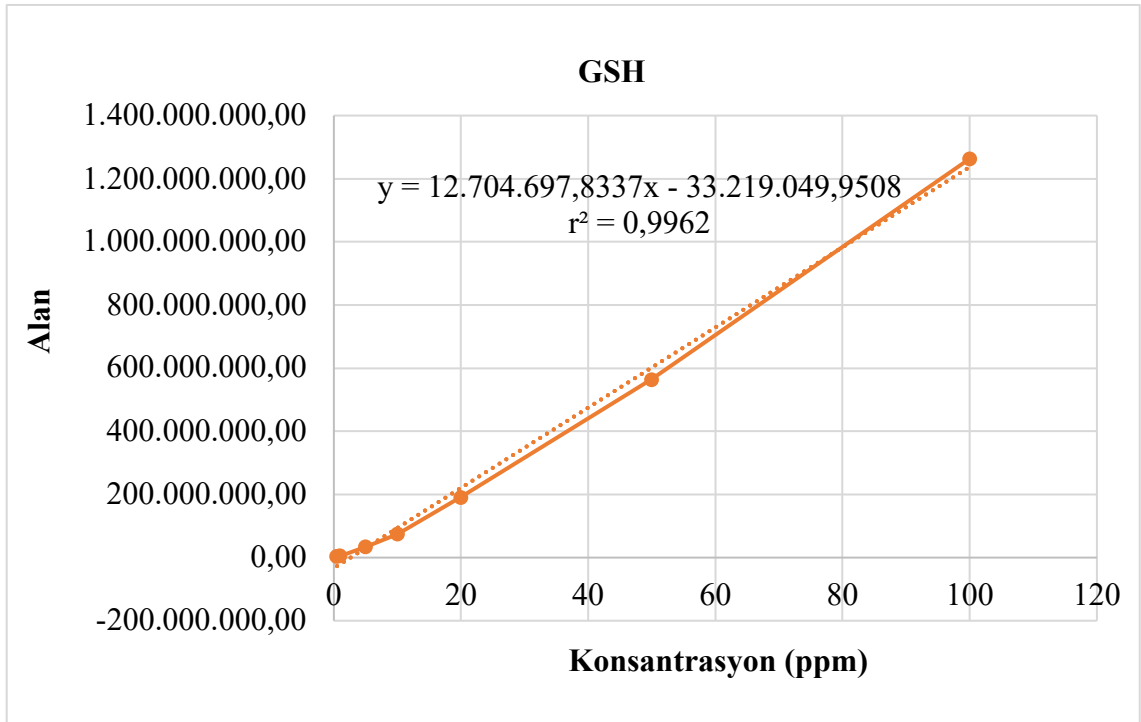
Şekil 3. 15. NPM ile türevlendirilen taze lahana bitki örneğine ait HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromotogramı.

10 ppm konsantrasyonda türevlendirilen GSH standart HPLC-FLD analizi ile elde edilen kromatogramı Şekil 3.16’de gösterilmektedir.



Şekil 3. 16. NPM ile türevlendirilen 10 ppm konsantrasyonda GSH standart kromatogramı.

Belirli konsantrasyonlarda hazırlanan (0,5 ppm-100 ppm) türevli GSH standart kalibrasyon eğrisi Şekil 3.17’de gösterilmektedir. GSH standart eğrisinden elde edilen formülden liyofilize brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu bitki örnekleri ile taze brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu bitki örneklerinin GSH içeriği $\mu\text{g/g}$ olarak hesaplandı ($r^2 = 0.9962$) (Çizelge 3.2).



Şekil 3. 17. Türevli GSH standart eğrisi.

Çizelge 3. 2. Liyofilize ve taze bitki örneklerinin GSH içeriğinin HPLC-FLD analizi ile belirlenen miktarları.

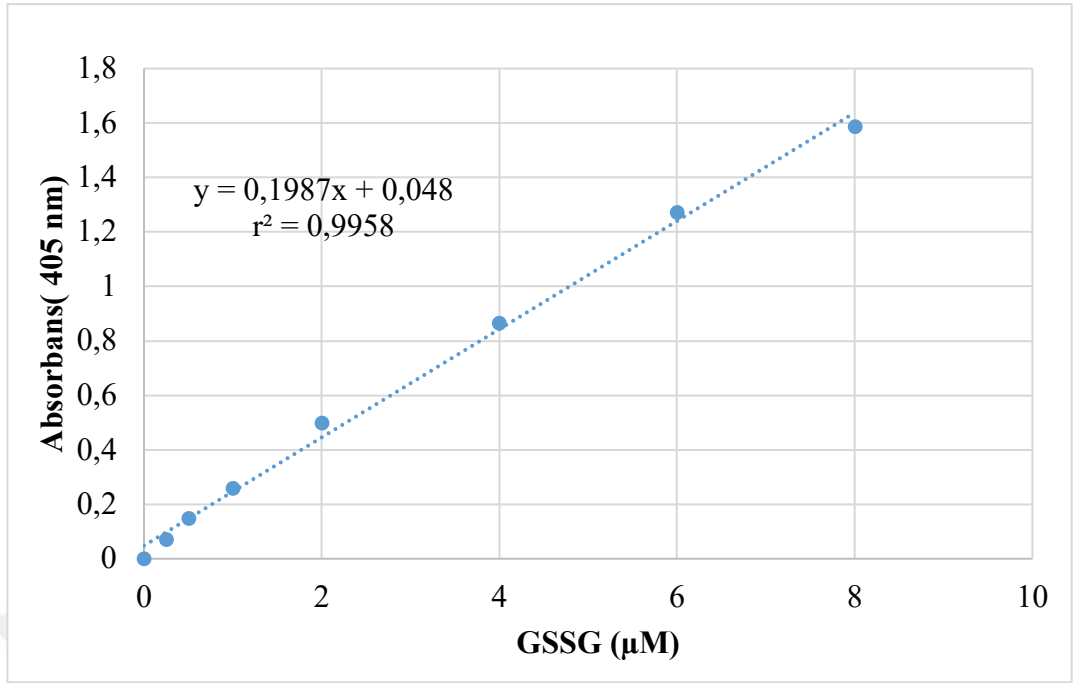
Bitki	Numunedeki miktar (µg/g)
Liyofilize Brokoli	651,81
Liyofilize Ispanak	733,32
Liyofilize Lahana	500,22
Liyofilize Semizotu	-
Taze Brokoli	632,70
Taze Ispanak	690,08
Taze Lahana	428,35
Taze Semizotu	-

Sulu numuneden ekstraksiyonu yapılan liyofilize ve taze brokoli, ıspanak, lahana ve semizotu bitki örneklerinin HPLC-FLD analitik analiz sonuçlarına göre 1 g bitkiden elde edilen glutasyon miktarı en yüksek liyofilize ıspanak ile 733,32 µg elde edilirken liyofilize ve taze semizotunda glutasyona ait pik elde edilemedi. Bunun sebebi belirlenemeyecek kadar az miktarda olabileceği düşünülmektedir.

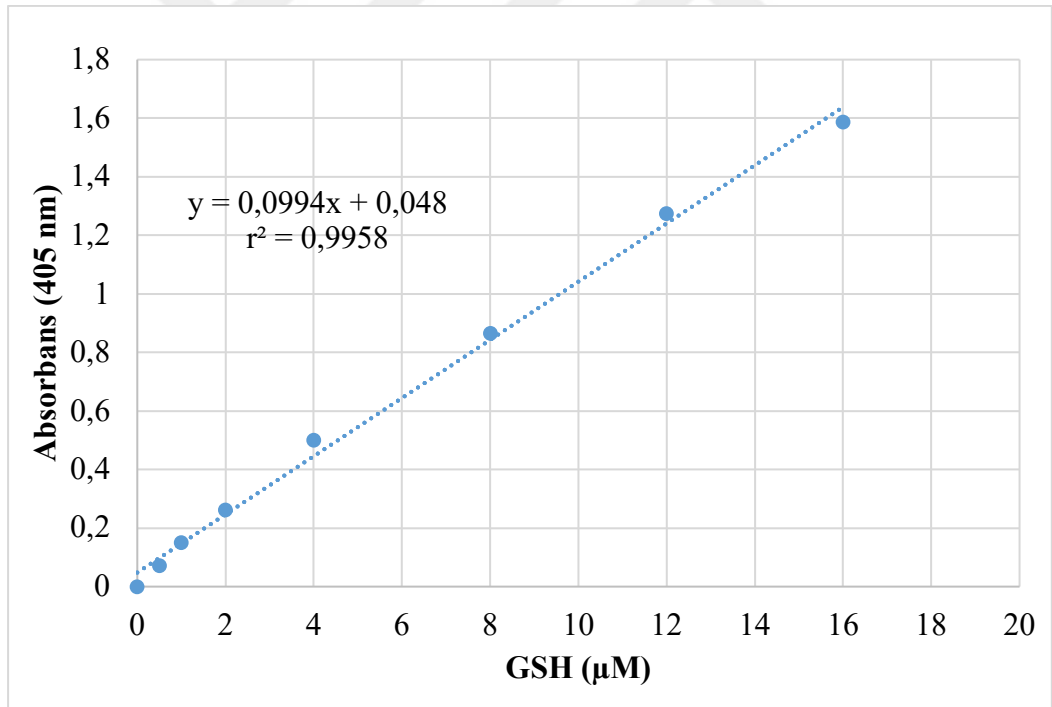
Liyofilize ve taze bitki örneklerine ait HPLC-UV ve NPM ile türevlendirilerek elde edilen HPLC-FLD analizi sonuçları karşılaştırıldı. Sonuçlar birbirini doğrular nitelikte elde edildi.

3.2. BİTKİ ÖRNEKLERİNDE GLUTATYON REDÜKTE (GSH) ve OKSİDE (GSSG) FORMLARININ ORANLARININ SONUÇLARI ve DEĞERLENDİRİLMESİ

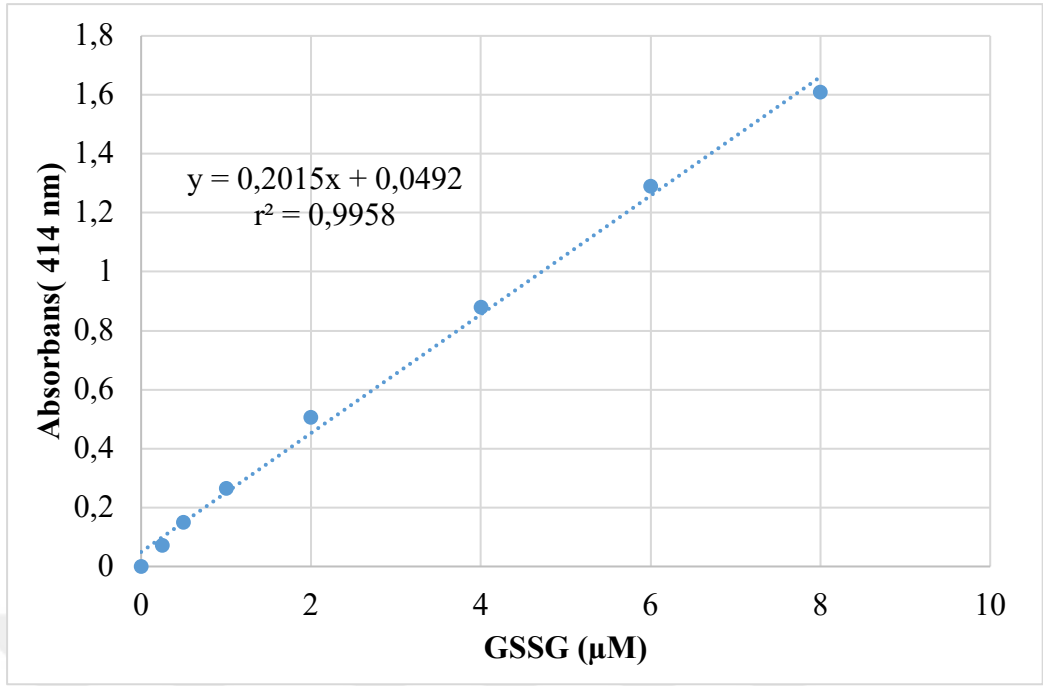
Glutasyon assay kiti ile redükte ve okside glutasyon oranları (GSH/ GSSG) 405-414 nm’de absorbans ölçümü 96 kuyulu mikropilaka okuyucu ile belirlendi. Her bir standartın düzeltilen absorbans değeri GSSG ve GSH konsantrasyonun fonksiyonu olarak grafiği çizildi ve değerleri hesaplandı (Şekil 3.18) (Şekil 3.19) (Şekil 3.20) (Şekil 3.21) (Çizelge 3.3).



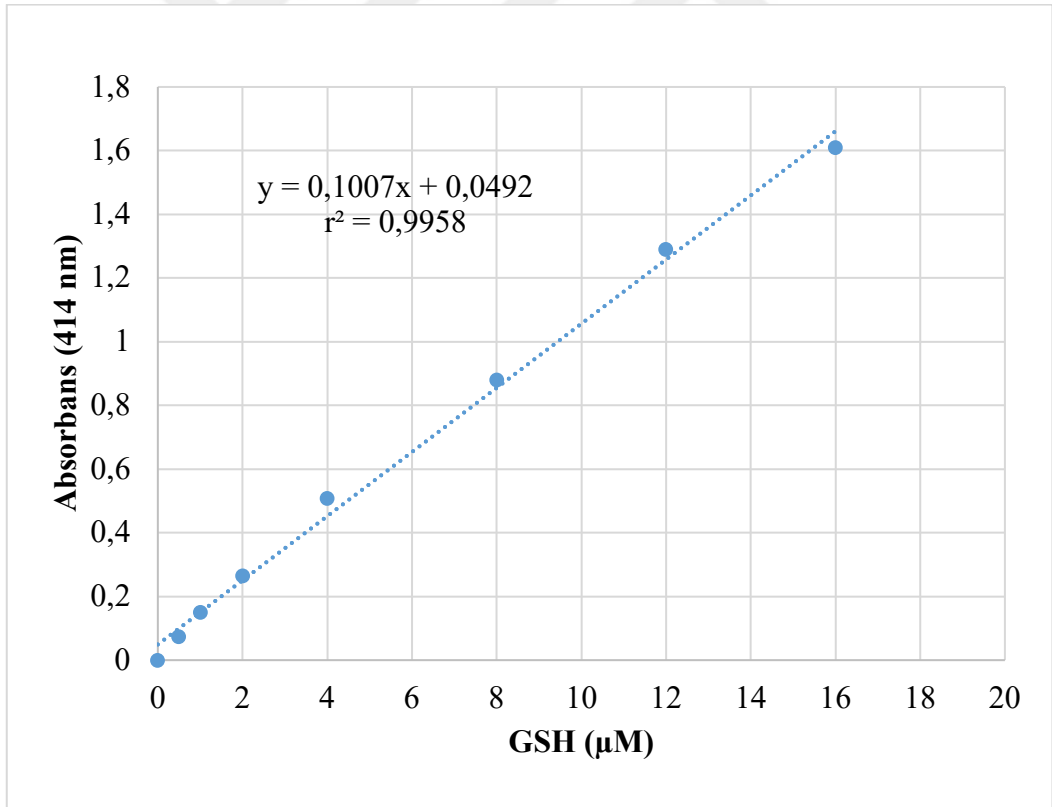
Şekil 3. 18. 405 nm absorbansa karşı GSSG konsantrasyonu.



Şekil 3. 19. 405 nm absorbansa karşı GSH konsantrasyonu.



Şekil 3. 20. 414 nm absorbansa karşı GSSG konsantrasyonu.



Şekil 3. 21. 414 nm absorbansa karşı GSH konsantrasyonu.

Çizelge 3. 3. Bitki örneklerine ait GSH/ GSSG oranları.

Bitki	GSH/GSSG oranı (μM)
Liyofilize Brokoli	0,858
Liyofilize Ispanak	0,879
Liyofilize Lahana	0,563
Liyofilize Semizotu	0,583
Taze Brokoli	0,801
Taze Ispanak	0,888
Taze Lahana	0,592
Taze Semizotu	0,586

Glutasyon assay kiti ile GSH/ GSSG oranları en yüksek liyofilize ıspanak elde edilirken en düşük liyofilize semizotu sonuçlarına ulaşıldı. Bu oranlar bitki içeriğinde bulunan glutasyon miktarı ile orantılı olduğunu göstermektedir.

3.3. SAFLAŞTIRILAN LİYOFİLİZE GLUTATYONUN KARAKTERİZASYONU

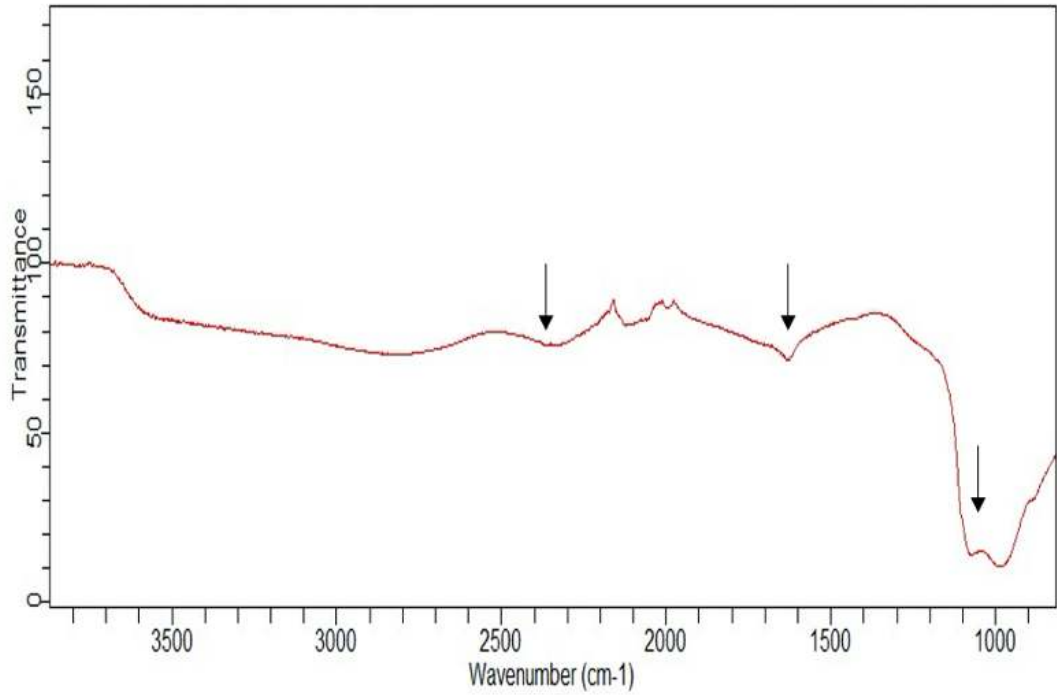
Saflaştırılan liyofilize glutasyonun kimyasal yapısını tanımlamak için FTIR ve Raman spektroskopisi ile karakterizasyonu gerçekleştirildi.

3.3.1. Saflaştırılan Liyofilize Glutasyonun Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Spektrum Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Kızılötesi ışın, kırılan bir kristalin alt yüzeyinden yansıtılarak daha sonra aynı yüzeyin üst tarafına yerleştirilen daha düşük kırılma indeksine sahip karakterizasyonu yapılacak numune ile etkileşime girer. Işık ışının kristalin yüzeyinden geçmek yerine yansması için geliş açısının kristal malzemenin kırılma indeksine bağlı olarak değişen kritik açının üzerinde olması gerekir. FTIR’ da yüksek kırılma indeksine sahip kristallerden olan elmas, germanyum ya da çinko selenit kullanılır [127].

FTIR ile saflaştırılan liyofilize glutasyonun yapısal karakterizasyonu tanımlamak için

atomlar arası bağların ve fonksiyonel bağların belirlenmesinde kullanıldı. Saflaştırılan glutatyonun FTIR spektrumu Şekil 3.22’de gösterilmektedir.



Şekil 3. 22. Saflaştırılan liyofilize glutatyonun FTIR spektrumu.

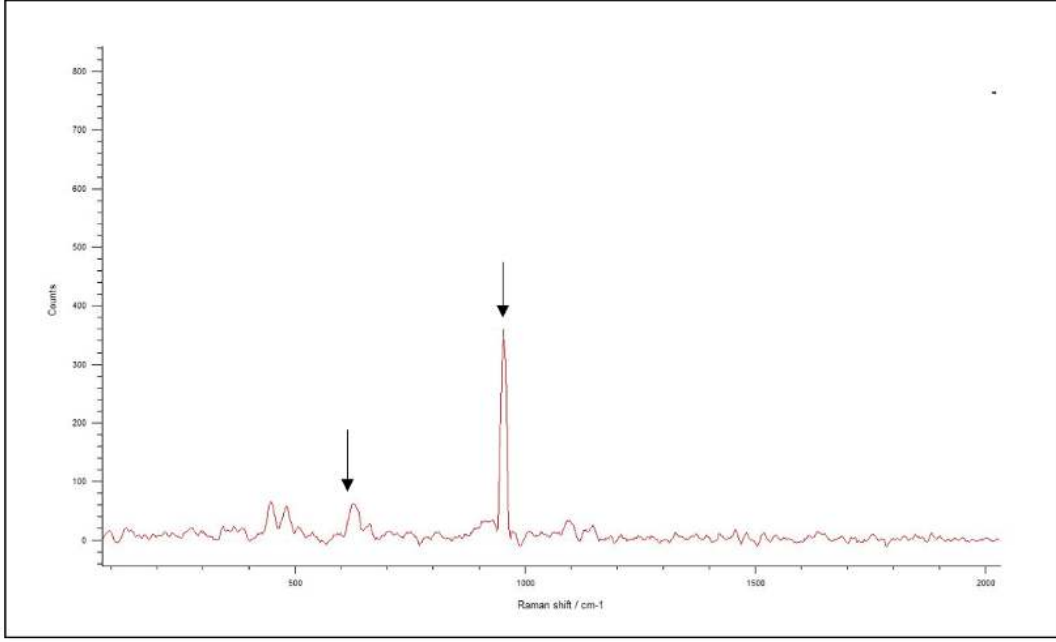
Amid bağlarının birleştirilmiş ve ayrılmamış gerilme ve bükülme modlarından kaynaklanan spektral bölgeler arasındaki Amid I ve Amid III spektral bantların ikincil yapı katlanmasında ve yapıda meydana gelecek değişikliklere karşı en duyarlı olan amid bağları olduğu ortaya koyulmuştur [128].

Glutatyonun yapısında karakterize olan Amide III ($\rho(\text{CN}) + \delta(\text{NH})$) 1100 cm^{-1} [129] ile tanımlanırken nispeten zayıf sinyale sahip olmasına rağmen kolayca çözümlenebilen ve yapının daha iyi tanımlanmasında oldukça önemlidir. Amide I: ($\delta(\text{NH}) + \rho(\text{CN})$) 1600 cm^{-1} bağı [128] ile tanımlanırken daha güçlü sinyale sahiptir. Yapının fonksiyonel grubu olan -SH: $\sim 2500 \text{ cm}^{-1}$ [130] daha zayıf sinyal elde edilmiştir.

3.3.2. Saflaştırılan Liyofilize Glutatyonun Raman Spektrum Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Raman spektroskopisi ile görünür, kızılötesi veya ultraviyole gibi tek bir dalga boyutundaki ışık kaynağına maruz bırakılması ile lazer ışınından saçılan fotonların bir kısmının numune ile etkileşimi sonucu düz yollarından sapması gerçekleşir. Böylece lazer ışını moleküllerle titreşime girerek lazer fotonlarının enerjisinin yukarıya ve aşağıya

kaymasına (raman shift) neden olur. Enerjideki değişim sistemdeki titreşim modları hakkında bilgi sağlar ve bileşikte mevcut olan bağları tanımlamada ve kimyasal bağları incelemek için kullanılır [131].



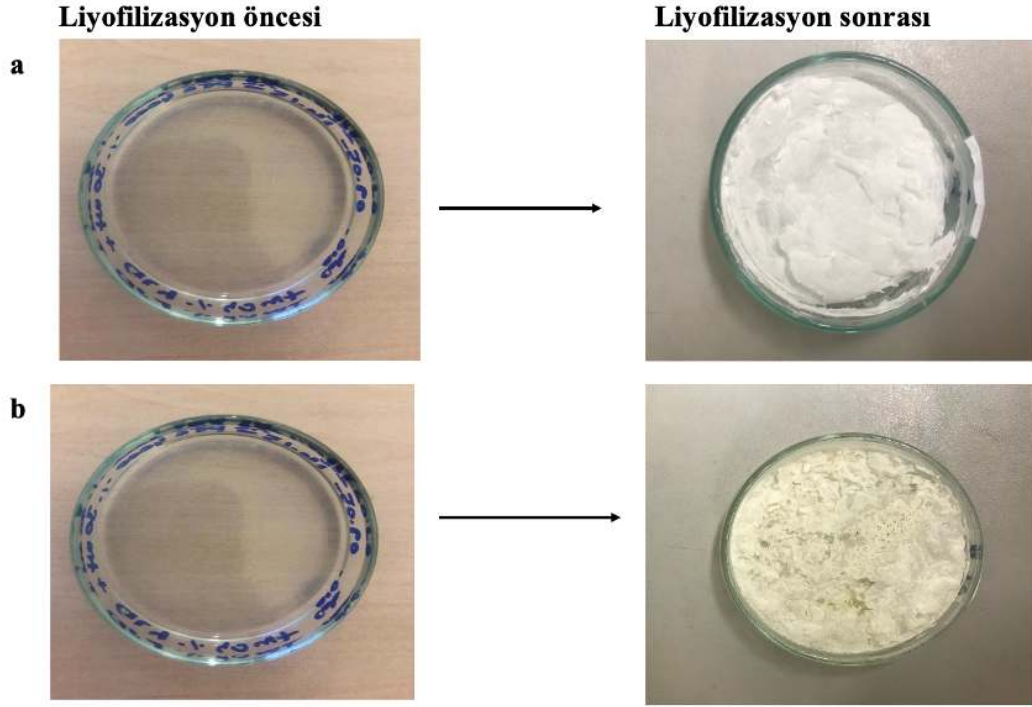
Şekil 3. 23. Saflaştırılan liyofilize glutatyonun Raman spektrumu.

Saflaştırılan liyofilize glutatyonda belirgin kimyasal yapıları tanımlamak için Raman spektroskopisi kullanıldı. Saflaştırılan glutatyonun Raman spektrumu Şekil 3.23’de gösterilmektedir. 953 cm^{-1} ’deki güçlü raman shift C-COO germe modundan kaynaklanmaktadır [132]. 640-680 cm^{-1} raman shift yapıda bulunan sisteine ait sülfidril fonksiyonel grubunu doğrulamaktadır [133].

3.4. ENJEKTE EDİLEBİLİR GLUTATYON (GSH) BAZLI HİDROJELİN KARAKTERİZASYONU

Enjekte edilebilir glutatyon (GSH) içeren bitki ekstre bazlı ve GSH bazlı hidrojellerin karakterizasyonu için liyofilizasyon işlemi öncesi ve sonrası Şekil 3.24’te gösterilmektedir. Liyofilizasyon öncesi jelleşen form için Z-ortalama, partikül boyut dağılımını değerlendirmek için Polidispersite İndeksi ve yapı kararlılığını değerlendirmek için zeta potansiyel ölçümünü yapıldı. Liyofilizasyon sonrası kurutulan katı formun kimyasal yapısını tanımlamak için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve termal davranışlarını değerlendirmek için Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)

kullanıldı.



Şekil 3. 24. Enjekte edilebilir glutatyon (GSH) bazlı ve GSH içeren bitki ekstre bazlı hidrojel­lerin liyofilizasyon öncesi ve sonrası görüntüsü, a) GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojel, b) GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojel.

Liyofilizasyon öncesi jelleşen sıvı formdan liyofilizasyon sonrası kurutulmuş katı form elde edilen GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojel beyaz renkte ve daha kalın yapıda elde edilirken GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojel bitkinin verdiği renkten dolayı sarı renkte ve ince yapıda elde edildi.

3.4.1. Z-Ortalama ve Polidispersite İndeksi Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Kolloidal sistemler, maddenin üç halinden birinin diğerinin içinde iyi bir şekilde dağılmasıyla elde edilir [134]. Liyofilizasyon öncesi jelleşen form kolloidal sistem olarak değerlendirilir.

Z-ortalama, dinamik ışık saçılımı (DLS) ile ölçülen parçacık topluluğunun yoğunluk ağırlıklı ortalama hidrodinamik boyutu olarak tanımlanır. DLS, kolloidal çözeltiden geçirilen bir lazerden saçılan ışığı ölçer. Saçılan ışık yoğunluğunun modülasyonunu zamanın bir fonksiyonu olarak analiz ederek, çözeltideki parçacığın büyüklüğü hakkında bilgi edinmemizi sağlar [135].

Partikül boyut aralığı ve dağılımını belirlemek için kullanılan polidispersite indeksi (PDI) koloidal sistemlerde homojen olup olmama derecesini değerlendirmek için kullanılır.

Numune üzerine lazer ışınlarının gönderilmesi sonucu yansıyan ve kırılan ışınlar dedektör ile belirlenir. Partiküllerin içerisinden geçen ışınların saçılma açısı parçacıkların boyutlarına bağlıdır. Işınların açısı ve şiddeti numunenin parçacık boyut dağılımını belirler [136]. İndeks boyutsuzdur ve 0,07'ten küçük değerler tek dağılımı (homojen) ifade ederken 0,7'den büyük değerler ise numunenin geniş partikül dağılımına (heterojen) sahip olduğunu göstermektedir [137].

Enjekte edilebilir GSH bazlı hidrojel ve GSH içeren bitki ekstre hidrojellere ait Z-ortalama ve polidispersite indeks sonuçları Çizelge 3.4'te gösterilmektedir.

Z-ortalama sonuçları karşılaştırıldığında GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojel 604,5 nm elde edilirken GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojel 524 nm elde edildi. Sonuç olarak, çözeltideki parçacık topluluğunun büyüklüğü ile ilgili ortalama değerler birbirine yakın elde edildi.

PDI değerleri ise GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojel 0,71 ile homojen dağılımın sınırındayken, GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojele ait değer 0,52 ile homojen dağılım göstermektedir.

Çizelge 3. 4. Z-Ortalama ve Polidispersite indeksi sonuçları.

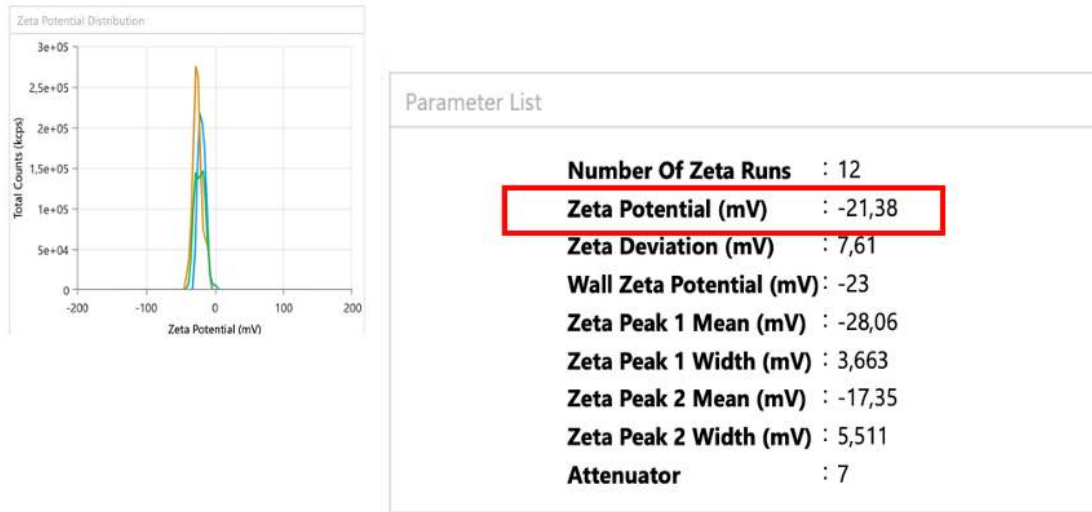
Enjekte Edilebilir Hidrojeller	Z-Ortalama	Polidispersite İndeksi
GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojel	604,5	0,7115
GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojel	524	0,5267

3.4.2. Zeta Potansiyel Ölçümü Sonuçları ve Değerlendirilmesi

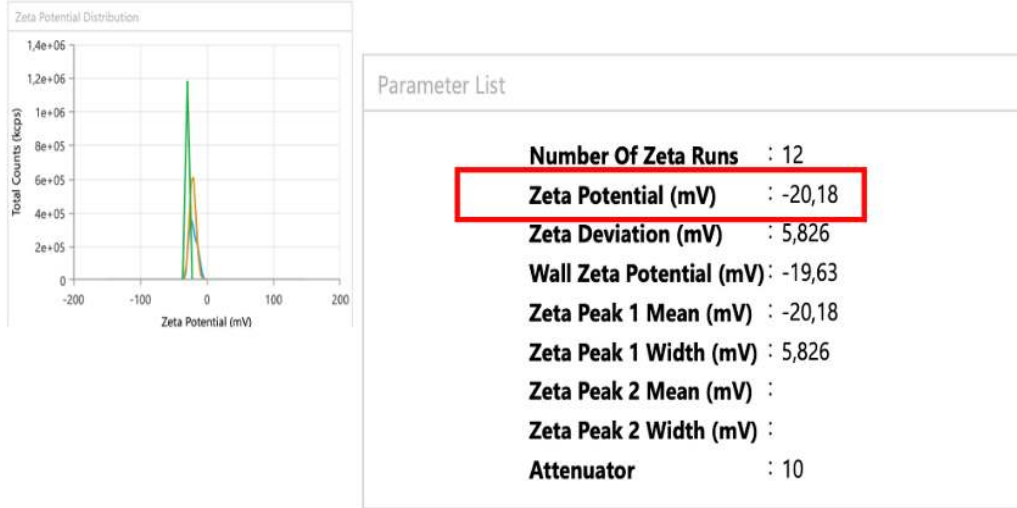
Zeta potansiyeli, partikül dağılımlarındaki elektrostatik etkileşimleri ifade eden ve

kolloidal sistemlerin kararlılığını belirlemede önemli bir parametredir. Partikül ile partikülün çevresini çevreleyen iyonik atmosfer arasındaki potansiyel farkı olarak tanımlanır. ± 30 değeri zeta potansiyel değeri olarak kritik bir değerdir ve genellikle partikülün kararlılığını belirlemek için seçilen bir değerdir. 30 mV 'den büyük bir mutlak değer kararlı bir koşulu gösterirken 30 mV' den düşük bir zeta potansiyel değer ise kümeleşme, kararsızlık, flokülasyon veya topaklaşmaya yönelik durum olduğunu gösterir. Karışımın pH'ı, sıcaklığı, kararsızlık radyasyonu, konsantrasyonu, solüsyonun iyonik gücü, partikülün boyutu, polimer/çapraz bağlayıcı oranı ve yüzey ligandlarının yapısı zeta potansiyeli etkileyen parametrelerdir [138].

GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojel ve GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojele ait zeta potansiyel ölçüm sonuçları Şekil 3.25 ve Şekil 3.26'da gösterilmektedir.



Şekil 3. 25. GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojin zeta potansiyel ölçümü.

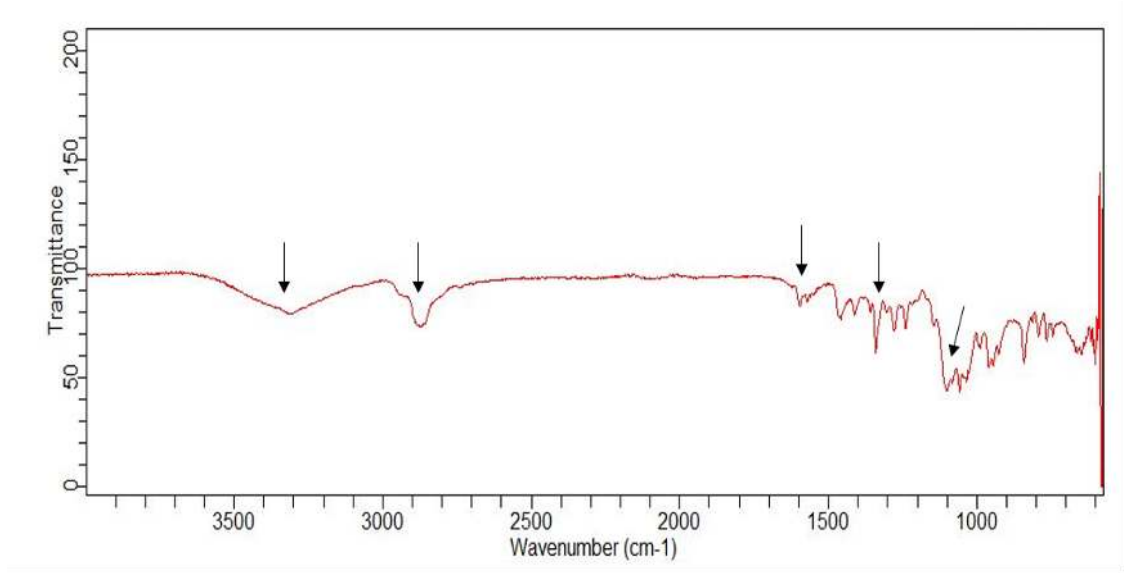


Şekil 3. 26. GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojin zeta potansiyel ölçümü.

GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojin zeta potansiyel değeri -21,38 mV ve GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojele ait zeta potansiyel değeri -20,18 mV elde edildi. Elde edilen zeta potansiyel değerleri oluşturulan hidrojel formun kararsızlığını göstermektedir. Hidrojel formların kararsızlığının sebepleri; pH değeri 4-7 aralığında izoelektrik noktada yer almasından [139] ve negatif yüklü grupların yapıda bulunması (karboksilik gruplar; -OH, C=O, -COOH) zeta değerinin azalmasına neden olmaktadır [140].

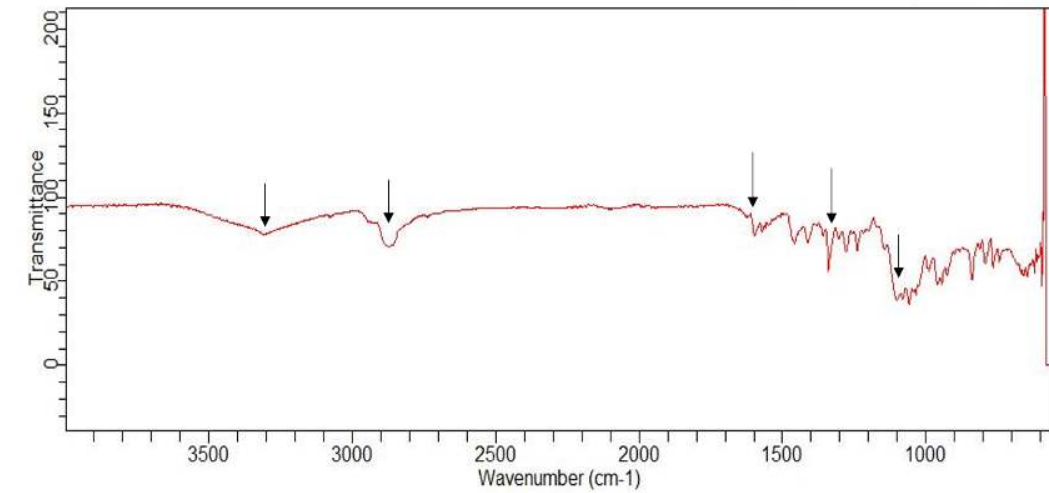
3.4.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Liyofilizasyon sonrası kurutulan, GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojin ve GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojin sahip oldukları farklı kimyasal gruplara ait transmisyon piklerinin yerleri FTIR ile belirlendi (Şekil 3.27) (Şekil 3.28).



Şekil 3. 27. GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojinin FTIR spektrumu.

GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojinin yapısında karakterize olan glutatyona ait Amide III (ρ (CN) + δ (NH)) 1101 cm^{-1} [129], Amide I: (δ (NH) + ρ (CN)) 1600 cm^{-1} bağı [128] ile tanımlandı. Yapının fonksiyonel grubu olan sülfidril grubu (-SH) 2871 cm^{-1} [130] yapıya negatif yük sağlayan -COOH 1340 cm^{-1} [141] ile fiziksel çapraz bağlanmayı sağlayan gliserole ait -OH gerilmeleri 3250 cm^{-1} [142] ile güçlü sinyaller elde edildi.



Şekil 3. 28. GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojinin FTIR spektrumu.

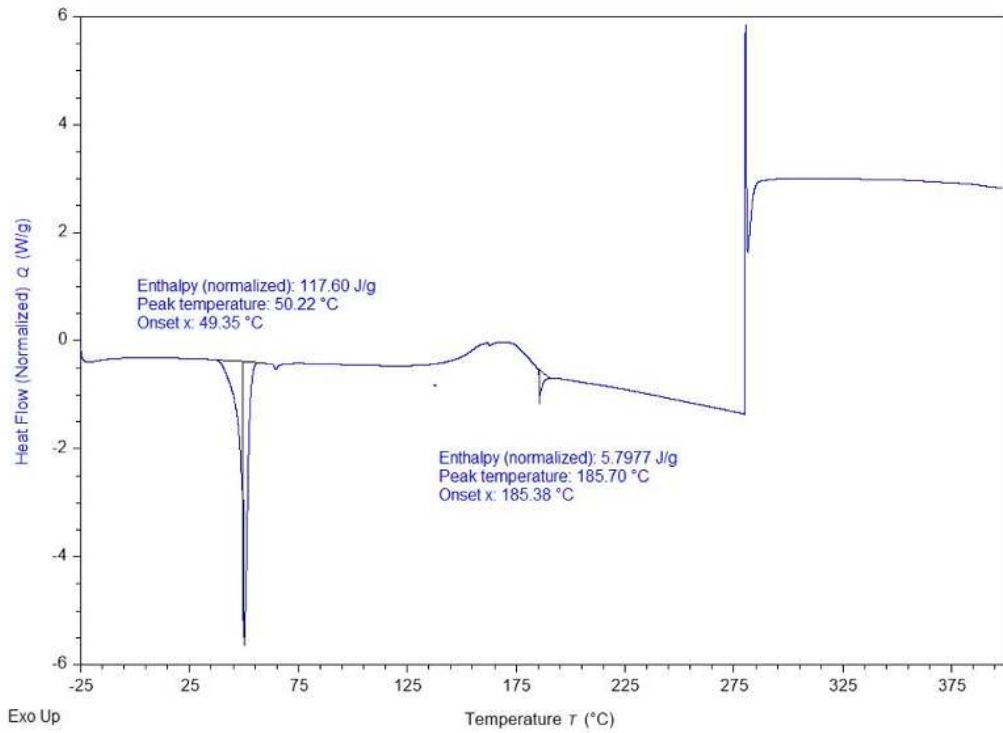
GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojinin yapısında karakterize olan glutatyona ait Amide III (ρ (CN) + δ (NH)) 1100 cm^{-1} [129], Amide I: (δ (NH) + ρ (CN)) 1602 cm^{-1} bağı [128] ile tanımlandı. Yapının fonksiyonel grubu olan -SH 2873 cm^{-1} [130], yapıya negatif yük sağlayan -COOH 1340 cm^{-1} [141] ile fiziksel çapraz bağlanmayı

sağlayan gliserole ait -OH gerilmeleri 3350 cm^{-1} [142] ile güçlü sinyaller elde edildi.

3.4.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Sonuçları ve Değerlendirilmesi

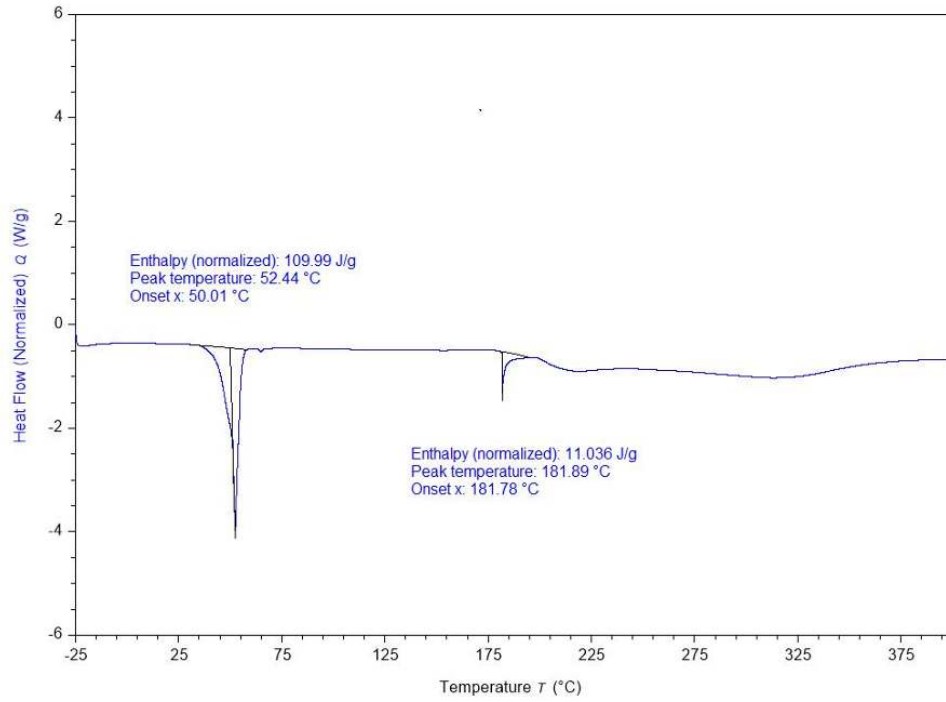
Diferansiyel tarama kalorimetrisinde (DSC), belli sıcaklıklarda ısıtılır ve soğutulurken ısı kapasitesindeki ısı akışında meydana gelen değişiklikler olarak incelenir. Numuneden gelen yada uzaklaşan ısı farkı sıcaklığa veya zamana bağlı gösterilmektedir [143].

Liyofilizasyon sonrası kurutulan, GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojelin ve GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojelin termal özellikleri açısından erime sıcaklığı ve entalpi değerleri DSC ile belirlendi (Şekil 3.29) (Şekil 3.30).



Şekil 3. 29. GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojelin DSC termogramı.

GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojele ait DSC termogramı incelendiğinde $50,22\text{ °C}$ erime sıcaklığında, $117,60\text{ J/g}$ entalpi değerinde keskin endotermik zirvesine sahip polietilen glikol 4000 (PEG 4000) ait pik [144] ve $185,70\text{ °C}$ erime sıcaklığında, $5,79\text{ J/g}$ entalpi değerinde endotermik zirveye sahip glutatyona ait pik [145] elde edildi.



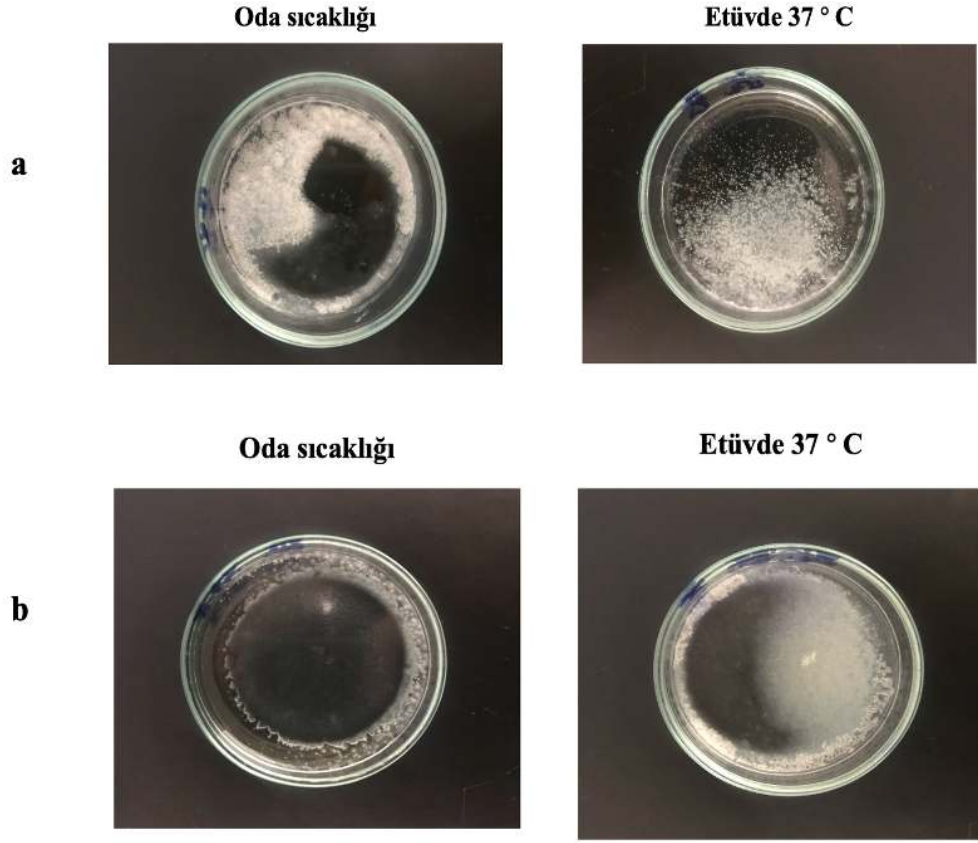
Şekil 3. 30. GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojin DSC termogramı.

GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojele ait DSC termogramı incelendiğinde 52,44 °C erime sıcaklığında, 109,99 J/g entalpi değerinde keskin endotermik zirvesine sahip polietilen glikol 4000 (PEG 4000) ait pik [144] ve 181,89 °C erime sıcaklığında, 11,036 J/g entalpi değerinde endotermik zirveye sahip glutatyon'a ait pik [145] elde edildi.

Her iki DSC termogramında gliserole ait erime sıcaklığı elde edilememesinin sebebi oluşan karışımda farklı entalpi değerlerinin etkisi ile PEG 4000 ile bir erime sıcaklığı oluşturması düşünülmektedir.

3.4.5. Enjekte Edilebilir Hidrojellerin Görünümünün Değerlendirilmesi

Enjekte edilebilir glutatyon içeren bitki ekstre bazlı ve GSH bazlı hidrojeller cam petri kabına alınarak oda sıcaklığında (25 °C) ve etüvde (37 °C)'de 24 saat boyunca form değişimlerine ait jel görüntüleri Şekil 3.31'de gösterilmektedir.



Şekil 3. 31. Enjekte edilebilir jel görüntüleri, a) GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojel, b) GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojel.

İlk oluşturulduğu anda yoğun sıvı jel formundaki hidrojeller 24 saat boyunca gözlemlendiğinde katılaşarak yoğunlaşan bir form elde edildi. GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojel ile GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojel karşılaştırıldığında etüvde (37 °C) daha homojen bir dağılım göstermektedir.

4. SONUÇ

Çalışmada öncelikle, temel biyolojik süreçlerde yer alan ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklara müdahalede kullanılan güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip glutatyonun (GSH) verimli seviyelerde doğal kaynaklardan elde edilmesi amaçlanmıştır. Daha sonra da seçilen bitkilerde verimli seviyelerde elde edilen glutatyon kullanılarak, biyoyararlanımı iyileştirebilecek araştırma stratejilerine odaklanarak tedavi edici çalışmalar için farmasötik formda ürün geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Yapılan literatür taraması sonucunda GSH'ın verimli bir şekilde elde edilmesi için seçilen brokoli, (*Brassica oleracea*), ıspanak (*Spinacia oleracea*), lahana (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) ve semizotu (*Portulaca oleracea*) bitkilerinin taze ve liyofilize edilmiş örnekleri için ekstraksiyon yöntemleri optimize edimeye çalışılmıştır. GSH'ın kantitatif ve kantitatif olarak belirlenmesi için ultraviyole dedektörlü HPLC ve floresans dedektörlü HPLC kullanılarak her iki analitik yöntem için metot geliştirilmiştir. Her iki analitik yöntem karşılaştırıldığında benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Bitkiler içerisinde, en yüksek GSH seviyesi (1840,42 µg) 1 g liyofilize ıspanak bitkisinin sulu numune ekstraksiyonu olarak elde edilmiştir. Daha yüksek miktarda (10 g) liyofilize ıspanak bitki örneği kullanılarak elde edilen ekstrenin ultraviyole dedektörlü HPLC'ye uygulanması ile GSH saflaştırılmıştır. Elde edilen saflaştırılmış GSH'ın kimyasal yapısı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve Raman Spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Ayrıca redükte formun (GSH) hücredeki oksidatif stres ile okside formuna (GSSH) dönüşmesi durumundan dolayı okside ve redükte oranları enzimatik geri dönüşüm reaksiyon yöntemi kullanılarak ölçüm yapan GSH/GSSH assay kiti kullanılarak belirlenmiştir.

Seçilen bitkilerden saflaştırılan GSH'ın farmasötik formda değerlendirilmesi için biyoyararlanımı yüksek bir form düşünülmüş ve enjekte edilebilir hidrojel formu tasarlanmıştır. Tasarlanan hidrojel formu için temel matriks olarak polietilen glikol 4000 (PEG 4000) ve fiziksel çapraz bağlayıcı olarak gliserol kullanılmıştır. Böylelikle liyofilize ıspanak bazlı glutatyon içeren enjekte edilebilir hidrojel ve glutatyon bazlı enjekte edilebilir hidrojel formları oluşturulmuştur. Karakterizasyonu için liyofilizasyon öncesi jelleşen formdaki liyofilize ıspanak bazlı glutatyon içeren enjekte edilebilir

hidrojel için 524 nm Z-ortalama, 0,526 Polidispersite İndeksi (PDI) ve – 20,18 mV Zeta Potansiyel ölçüm değerlerine ulaşıldı. Glutasyon bazlı enjekte edilebilir hidrojel için 604,5 nm Z-ortalama, 0,711 Polidispersite İndeksi (PDI) ve – 21,38 mV Zeta Potansiyel ölçüm değerlerine ulaşıldı.

Jelleşen sıvı formdan liyofilizasyon ile kurutulan katı form elde edilerek GSH bazlı enjekte edilebilir hidrojin ve GSH içeren bitki ekstre bazlı enjekte edilebilir hidrojin kimyasal yapı karakterizasyonu FTIR ve termal özellikleri Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) ile belirlenmiştir.

Bu çalışma ile doğal kaynaklar olan bitkilerden elde edilen GSH'ın ekstraksiyonu, saflaştırılması ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bitkisel kaynaklı GSH ile tasarlanan enjekte edilebilir hidrojel formu ve ticari olarak satın alınan sentetik GSH ile tasarlanan enjekte edilebilir hidrojel formu karşılaştırıldığında kimyasal yapı olarak benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bitkisel kaynaklı GSH'tan elde edilen hidrojin daha iyi homojen dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, yeşil sentez (Green synthesis) ile doğal kaynaklı, iyi düzeyde homojenite gösteren, antioksidan ve biyoaktif özelliklere sahip yeni nesil GSH bazlı hidrojel tasarımı gerçekleştirilmiştir.

İleriki çalışmalarda daha yüksek miktarda bitki kullanılarak, ekstraksiyon sistemi tekrar optimize edilerek kantitatif olarak yüksek oranda glutasyon elde edilmesi planlanmaktadır.

5. KAYNAKLAR

- [1] A. Meister, "On the discovery of glutathione", *Trends Biochem. Sci.*, c. 13, sy. 5, ss. 185-188, 1988.
- [2] F. G. Hopkins, "XXXII. ON AN AUTOXIDISABLE CONSTITUENT OF THE CELL," *Biochemical Journal*, c.15, sy. 2, ss. 286, 1921.
- [3] G. Hunter ve B. A. Eagles, "GLUTATHIONE. A CRITICAL STUDY", *J. Biol. Chem.*, c. 72, sy. 1, ss. 147-166, 1927.
- [4] F. G. Hopkins, "ON GLUTATHIONE: A REINVESTIGATION", *J. Biol. Chem.*, c. 84, sy. 1, ss. 269-320, 1929.
- [5] S. C. Lu, "Glutathione synthesis", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, c. 1830, sy 5, ss. 3143-3153, 2013.
- [6] A. Meister, "Biosynthesis and Functions of Glutathione, an Essential Biofactor", *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, c. 38, sy. Special, ss. 1-6, 1992.
- [7] O. W. Griffith, "Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis", *Free Radic. Biol. Med.*, c. 27, sy. 9-10, ss. 922-935, 1999.
- [8] G. L. Newton' ve B. Javor, "γ-Glutamylcysteine and Thiosulfate Are the Major Low-Molecular- Weight Thiols in Halobacteria", *Journal of bacteriology*, c. 161, sy. 1, ss. 438-441, 1985.
- [9] A. H. Fairlamb, P. Blackburn, P. Ulrich, B. T. Chait, ve A. Cerami, "Trypanothione: A Novel Bis(glutathionyl)spermidine Cofactor for Glutathione Reductase in Trypanosomatids", *Science*, c. 227, sy. 4693, ss. 1485-1487, 1985.
- [10] H. Rennenberg, "Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants", *Phytochemistry*, c. 21, sy. 12, ss. 2771-2781, 1980.
- [11] N. Kaplowitz, T. Y. Aw, ve M. Ookhtens, "The Regulation of Hepatic Glutathione", *Annual review of pharmacology and toxicology*, c. 25, sy. 1, ss. 715-744, 1985.

- [12] Bertoni, Albertini, Facchini, Prata, ve Passerini, "Glutathione-Loaded Solid Lipid Microparticles as Innovative Delivery System for Oral Antioxidant Therapy", *Pharmaceutics*, c. 11, sy. 8, ss. 364, 2019.
- [13] N. Ballatori, S. M. Krance, S. Notenboom, S. Shi, K. Tieu, ve C. L. Hammond, "Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases", *Biological Chemistry*, c. 390, sy. 3, ss. 191-214, 2009.
- [14] C. Hwang, A. J. Sinskey, ve H. F. Lodish, "Oxidized Redox State of Glutathione in the Endoplasmic Reticulum", *Science*, c. 257, sy. 5076, ss. 1496-1502, 1992.
- [15] M. J. Meredith ve D. J. Reed, "Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte.", *J. Biol. Chem.*, c. 257, sy. 7, ss. 3747-3753, 1982.
- [16] L. Yuan ve N. Kaplowitz, "Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity", *Mol. Aspects Med.*, c. 30, sy. 1-2, ss. 29-41, 2009.
- [17] A. Meister, "Biosynthesis and Functions of Glutathione, an Essential Biofactor", *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, c. 38, sy. Special, ss. 1-6, 1992.
- [18] P. Ghezzi, "Review Regulation of protein function by glutathionylation", *Free Radic. Res.*, c. 39, sy. 6, ss. 573-580, 2005.
- [19] P. Ghezzi, "Protein glutathionylation in health and disease", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, c. 1830, sy. 5, ss. 3165-3172, 2013.
- [20] D. Giustarini, R. Rossi, A. Milzani, R. Colombo, ve I. Dalle-Donne, "S-Glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases", *J. Cell. Mol. Med.*, c. 8, sy. 2, ss. 201-212, 2004.
- [21] H. J. Forman, H. Zhang, ve A. Rinna, "Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis", *Mol. Aspects Med.*, c. 30, sy. 1-2, ss. 1-12, 2009,
- [22] Z. Huang, J. T. Pinto, H. Deng, ve J. P. Richie, "Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation", *Biochem. Pharmacol.*, c. 75, sy. 11, ss. 2234-2244, 2008.
- [23] K. Aoyama ve T. Nakaki, "Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1)", *Molecules*, c. 20, sy. 5, ss. 8742-8758, 2015.

- [24] C. Garcia-Ruiz ve J. C. Fernandez-Checa, “Mitochondrial glutathione: Hepatocellular survival–death switch”, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, c. 21, sy. s3, ss. S3-S6, 2006.
- [25] S. C. Lu, “Regulation of glutathione synthesis”, *Mol. Aspects Med.*, c. 30, sy. 1-2, ss. 42-59, 2009.
- [26] D. A. Butterfield ve B. Halliwell, “Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease”, *Nat. Rev. Neurosci.*, c. 20, sy. 3, ss. 148-160, 2019.
- [27] S. Reuter, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi, ve B. B. Aggarwal, “Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?”, *Free Radic. Biol. Med.*, c. 49, sy. 11, ss. 1603-1616, 2010.
- [28] D. M. Minich ve B. I. Brown, “A Review of Dietary (Phyto)Nutrients for Glutathione Support”, *Nutrients*, c. 11, sy. 9, s. 2073, 2019.
- [29] U. A. Meyer, “Overview of enzymes of drug metabolism”, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, c. 24, sy. 5, ss. 449-459, 1996.
- [30] B. Testa ve S. D. Krämer, “The biochemistry of drug metabolism—an introduction: part 1. principles and overview”, *Chem. Biodivers.*, c. 3, sy. 10, ss. 1053-1101, 2006.
- [31] A. Talevi, “The importance of bioactivation in computer-guided drug repositioning. Why the parent drug is not always enough”, *Curr. Top. Med. Chem.*, c. 16, sy. 19, ss. 2078-2087, 2016.
- [32] B. P. Tu ve J. S. Weissman, “Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences”, *J. Cell Biol.*, c. 164, sy. 3, ss. 341-346, 2004.
- [33] B. Testa, A. Pedretti, ve G. Vistoli, “Reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics”, *Drug Discov. Today*, c. 17, sy. 11-12, ss. 549-560, 2012.
- [34] O. A. Almazroo, M. K. Miah, ve R. Venkataramanan, “Drug Metabolism in the Liver”, *Clin. Liver Dis.*, c. 21, sy. 1, ss. 1-20, 2017.
- [35] F. Tietze, “Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of

- total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues”, *Anal. Biochem.*, c. 27, sy. 3, ss. 502-522, 1969.
- [36] O. W. Griffith, “Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine”, *Anal. Biochem.*, c. 106, sy. 1, ss. 207-212, 1980.
- [37] V. H. Cohn ve J. Lyle, “A fluorometric assay for glutathione”, *Anal. Biochem.*, c. 14, sy 3, ss. 434-440, 1966.
- [38] P. J. Hissin ve R. Hilf, “A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues”, *Anal. Biochem.*, c. 74, sy. 1, ss. 214-226, 1976.
- [39] F. J. Romero ve W. Mueller-Klieser, “Semiquantitative bioluminescent assay of glutathione”, *J. Biolumin. Chemilumin.*, c. 13, sy. 5, ss. 263-266, 1998.
- [40] G. Piccoli *vd.*, “Simultaneous high-performance capillary electrophoretic determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells in the femtomole range”, *J. Chromatogr. A*, c. 676, sy. 1, ss. 239-246, 1994.
- [41] W. Jin, W. Li, ve Q. Xu, “Quantitative determination of glutathione in single human erythrocytes by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection”, *Electrophoresis*, c. 21, sy. 4, ss. 774-779, 2000.
- [42] C. Carru, A. Zinellu, G. Mario Pes, G. Marongiu, B. Tadolini, ve L. Deiana, “Ultrarapid capillary electrophoresis method for the determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells”, *Electrophoresis*, c. 23, sy. 11, s. 1716, 2002.
- [43] J. Reeve, J. Kuhlenkamp, ve N. Kaplowitz, “Estimation of glutathione in rat liver by reversed-phase high-performance liquid chromatography: separation from cysteine and γ -glutamylcysteine”, *J. Chromatogr. A*, c. 194, sy. 3, ss. 424-428, 1980.
- [44] D. J. Reed, J. R. Babson, P. W. Beatty, A. E. Brodie, W. W. Ellis, ve D. W. Potter, “High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides”, *Anal. Biochem.*, c. 106, sy. 1, ss. 55-62, 1980.
- [45] A. E. Katrusiak, P. G. Paterson, H. Kamencic, A. Shoker, ve A. W. Lyon, “Pre-column derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl-glycine, homocysteine and glutathione in plasma and cell extracts”, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, c. 758, sy. 2, ss. 207-212, 2001.

- [46] T. Yoshida, "Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection", *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, c. 678, sy. 2, ss. 157-164, 1996.
- [47] S. C. Garcia *vd.*, "Quantification of reduced glutathione by HPLC-UV in erythrocytes of hemodialysis patients", *Biomed. Chromatogr.*, c. 22, sy. 5, ss. 460-468, 2008.
- [48] D. Giustarini, I. Dalle-Donne, R. Colombo, A. Milzani, ve R. Rossi, "An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood", *Free Radic. Biol. Med.*, c. 35, sy. 11, ss. 1365-1372, 2003.
- [49] E. Bald, G. Chwatko, R. Głowacki, ve K. Kuśmierek, "Analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection", *J. Chromatogr. A*, c. 1032, sy. 1-2, ss. 109-115, 2004.
- [50] E. Bald ve R. Głowacki, "Analysis of saliva for glutathione and metabolically related thiols by liquid chromatography with ultraviolet detection", *Amino Acids*, c. 28, ss. 431-433, 2005.
- [51] M. Liu *vd.*, "Preformulation studies of L -glutathione: physicochemical properties, degradation kinetics, and *in vitro* cytotoxicity investigations", *Drug Dev. Ind. Pharm.*, c. 46, sy. 5, ss. 717-731, 2020.
- [52] S. S. Vaidya ve P. M. Gerk, "Simultaneous determination of 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene, 2, 4-dinitrophenyl-S-glutathione and its metabolites for human placental disposition studies by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. B*, c. 859, sy. 1, ss. 94-102, 2007.
- [53] D. L. Rabenstein ve Rolf. Sætre, "Mercury-based electrochemical detector for liquid chromatography for the detection of glutathione and other sulfur-containing compounds", *Anal. Chem.*, c. 49, sy. 7, ss. 1036-1039, 1977.
- [54] D. L. Rabenstein ve R. Sætre, "Analysis for glutathione in blood by high-performance liquid chromatography.", *Clin. Chem.*, c. 24, sy 7, ss. 1140-1143, 1978.
- [55] S. M. Lunte ve P. T. Kissinger, "Detection of thiols and disulfides in liver samples using liquid chromatography/electrochemistry", *J. Liq. Chromatogr.*, c. 8, sy. 4, ss. 691-706, 1985.

- [56] J. P. Richie ve C. A. Lang, "The determination of glutathione, cyst(e)ine, and other thiols and disulfides in biological samples using high-performance liquid chromatography with dual electrochemical detection", *Anal. Biochem.*, c. 163, sy. 1, ss. 9-15, May. 1987.
- [57] Y. Hiraku, M. Murata, ve S. Kawanishi, "Determination of intracellular glutathione and thiols by high performance liquid chromatography with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopic assay", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, c. 1570, sy. 1, ss. 47-52, 2002.
- [58] P. R. C. Harvey, R. G. Ilson, ve S. M. Strasberg, "The simultaneous determination of oxidized and reduced glutathiones in liver tissue by ion pairing reverse phase high performance liquid chromatography with a coulometric electrochemical detector", *Clin. Chim. Acta*, c. 180, sy. 3, ss. 203-212, 1989.
- [59] R. C. Rose ve A. M. Bode, "Analysis of water-soluble antioxidants by high-pressure liquid chromatography", *Biochem. J.*, c. 306, sy. 1, ss. 101-105, 1995.
- [60] W. Zhang vd., "Determination of glutathione and glutathione disulfide in hepatocytes by liquid chromatography with an electrode modified with functionalized carbon nanotubes", *J. Chromatogr. B*, c. 818, sy. 2, ss. 227-232, 2005.
- [61] P. Monostori, G. Wittmann, E. Karg, ve S. Túri, "Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review", *J. Chromatogr. B*, c. 877, sy. 28, ss. 3331-3346, 2009.
- [62] A. Pastore, G. Federici, E. Bertini, ve F. Piemonte, "Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification", *Clin. Chim. Acta*, c. 333, sy. 1, ss. 19-39, Tem. 2003.
- [63] O. Demirkol, C. Adams, ve N. Ercal, "Biologically Important Thiols in Various Vegetables and Fruits", *J. Agric. Food Chem.*, c. 52, sy 26, ss. 8151-8154, 2004.
- [64] K. R. Manda, C. Adams, ve N. Ercal, "Biologically important thiols in aqueous extracts of spices and evaluation of their in vitro antioxidant properties", *Food Chem.*, c. 118, sy. 3, ss. 589-593, 2010.
- [65] B. A. Neuschwander-Tetri ve F. J. Roll, "Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorometric detection of the glutathione-orthophthalaldehyde adduct", *Anal. Biochem.*, c. 179, sy. 2, ss. 236-241, 1989.

- [66] E. M. Kosower, B. Pazhenchevsky, ve E. Hershkowitz, "ChemInform Abstract: 1,5-DIAZABICYCLO(3.3.0)OCTADIENEDIONES (9,10-DIOXABIMANES). STRONGLY FLUORESCENT SYN ISOMERS", *Chem. Informationsdienst*, c. 10, sy. 2, 1979.
- [67] H. Kamencic, A. Lyon, P. G. Paterson, ve B. H. J. Juurlink, "Monochlorobimane Fluorometric Method to Measure Tissue Glutathione", *Anal. Biochem.*, c. 286, sy. 1, ss. 35-37, 2000.
- [68] A. K. Sakhi, R. Blomhoff, ve T. E. Gundersen, "Simultaneous and trace determination of reduced and oxidized glutathione in minute plasma samples using dual mode fluorescence detection and column switching high performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, c. 1142, sy. 2, ss. 178-184, 2007.
- [69] Y. Iwasaki *vd.*, "Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples", *J. Chromatogr. B*, c. 877, sy. 28, ss. 3309-3317, 2009.
- [70] G. T. Wierzbicka, T. M. Hagen, ve D. P. Tones, "Glutathione in food", *J. Food Compos. Anal.*, c. 2, sy. 4, ss. 327-337, 1989.
- [71] M. He, K. Openo, M. McCullough, ve D. P. Jones, "Total Equivalent of Reactive Chemicals in 142 Human Food Items Is Highly Variable Within and Between Major Food Groups", *J. Nutr.*, c. 134, sy. 5, ss. 1114-1119, 2004.
- [72] W. J. Du Toit, K. Lisjak, M. Stander, ve D. Prevoo, "Using LC-MSMS To Assess Glutathione Levels in South African White Grape Juices and Wines Made with Different Levels of Oxygen", *J. Agric. Food Chem.*, c. 55, sy. 8, ss. 2765-2769, 2007.
- [73] J. Reinbold, M. Rychlik, S. Asam, H. Wieser, ve P. Koehler, "Concentrations of Total Glutathione and Cysteine in Wheat Flour as Affected by Sulfur Deficiency and Correlation to Quality Parameters", *J. Agric. Food Chem.*, c. 56, sy. 16, ss. 6844-6850, 2008.
- [74] Ö. A. Gümüsay, A. A. Borazan, N. Ercal, ve O. Demirkol, "Drying effects on the antioxidant properties of tomatoes and ginger", *Food Chem.*, c. 173, ss. 156-162, 2015.
- [75] O. Demirkol ve A. Cagri-Mehmetoglu, "Biologically important thiols in various organically and conventionally grown vegetables", *J Food Nutr Res*, c. 47, ss. 2, 2008.

- [76] A. Tsiasioti, A.-S. Zotou, ve P. D. Tzanavaras, “Single run analysis of glutathione and its disulfide in food samples by liquid chromatography coupled to on-line post-column derivatization”, *Food Chem.*, c. 361, s. 130-173, 2021.
- [77] Z. Qiang, O. Demirkol, N. Ercal, ve C. Adams, “Impact of Food Disinfection on Beneficial Biothiol Contents in Vegetables”, *J. Agric. Food Chem.*, c. 53, sy. 25, ss. 9830-9840, 2005.
- [78] A. Roland ve R. Schneider, “Development and validation of a high-throughput analysis of glutathione in grapes, musts and wines by Stable Isotope Dilution Assay and LC–MS/MS”, *Food Chem.*, c. 177, ss. 152-157, 2015.
- [79] D. Fracassetti, N. Lawrence, A. G. J. Tredoux, A. Tirelli, H. H. Nieuwoudt, ve W. J. Du Toit, “Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method”, *Food Chem.*, c. 128, sy. 4, ss. 1136-1142, 2011.
- [80] V. Webber, S. V. Dutra, F. R. Spinelli, Â. R. Marcon, G. J. Carnieli, ve R. Vanderlinde, “Effect of glutathione addition in sparkling wine”, *Food Chem.*, c. 159, ss. 391-398, 2014.
- [81] V. Webber, S. V. Dutra, F. R. Spinelli, G. J. Carnieli, A. Cardozo, ve R. Vanderlinde, “Effect of glutathione during bottle storage of sparkling wine”, *Food Chem.*, c. 216, ss. 254-259, 2017.
- [82] P. Kubalczyk ve E. Bald, “Analysis of orange juice for total cysteine and glutathione content by CZE with UV-absorption detection”, *Electrophoresis*, c. 30, sy. 13, ss. 2280-2283, 2009.
- [83] K. Kuśmierek ve E. Bald, “Reduced and total glutathione and cysteine profiles of citrus fruit juices using liquid chromatography”, *Food Chem.*, c. 106, sy. 1, ss. 340-344, 2008.
- [84] E.-C. Tsardaka, C. K. Zacharis, P. D. Tzanavaras, ve A. Zotou, “Determination of glutathione in baker’s yeast by capillary electrophoresis using methyl propiolate as derivatizing reagent”, *J. Chromatogr. A*, c. 1300, ss. 204-208, 2013.
- [85] N. N. Ferreira, L. M. B. Ferreira, V. M. O. Cardoso, F. I. Boni, A. L. R. Souza, ve M. P. D. Gremião, “Recent advances in smart hydrogels for biomedical applications: From self-assembly to functional approaches”, *Eur. Polym. J.*, c. 99, ss. 117-133, 2018.

- [86] A. P. Mathew, S. Uthaman, K.-H. Cho, C.-S. Cho, ve I.-K. Park, “Injectable hydrogels for delivering biotherapeutic molecules”, *Int. J. Biol. Macromol.*, c. 110, ss. 17-29, 2018.
- [87] R. Mavlyanova *vd.*, “Injectable hydrogels for targeted delivering of therapeutic molecules for tissue engineering and disease treatment”, *Polym. Adv. Technol.*, c. 31, sy. 2, ss. 192-203, 2020.
- [88] Z. Zhang, C. He, ve X. Chen, “Hydrogels based on pH-responsive reversible carbon–nitrogen double-bond linkages for biomedical applications”, *Mater. Chem. Front.*, c. 2, sy. 10, ss. 1765-1778, 2018.
- [89] Y. Chao, Q. Chen, ve Z. Liu, “Smart Injectable Hydrogels for Cancer Immunotherapy”, *Adv. Funct. Mater.*, c. 30, sy. 2, s. 1902785, 2020.
- [90] W. Hu, Z. Wang, Y. Xiao, S. Zhang, ve J. Wang, “Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels”, *Biomater. Sci.*, c. 7, sy. 3, ss. 843-855, 2019.
- [91] A. P. Mathew, S. Uthaman, K.-H. Cho, C.-S. Cho, ve I.-K. Park, “Injectable hydrogels for delivering biotherapeutic molecules”, *Int. J. Biol. Macromol.*, c. 110, ss. 17-29, 2018.
- [92] S. Yu, C. He, ve X. Chen, “Injectable Hydrogels as Unique Platforms for Local Chemotherapeutics-Based Combination Antitumor Therapy”, *Macromol. Biosci.*, c. 18, sy. 12, s. 1800240, 2018.
- [93] Z. Sun, C. Song, C. Wang, Y. Hu, ve J. Wu, “Hydrogel-Based Controlled Drug Delivery for Cancer Treatment: A Review”, *Mol. Pharm.*, c. 17, sy. 2, ss. 373-391, 2020.
- [94] F. Rizzo ve N. S. Kehr, “Recent Advances in Injectable Hydrogels for Controlled and Local Drug Delivery”, *Adv. Healthc. Mater.*, c. 10, sy. 1, s. 2001341, 2021.
- [95] F. Wang, J. Chen, J. Liu, ve H. Zeng, “Cancer theranostic platforms based on injectable polymer hydrogels”, *Biomater. Sci.*, c. 9, sy. 10, ss. 3543-3575, 2021.
- [96] C. Yan, A. Altunbas, T. Yucel, R. P. Nagarkar, J. P. Schneider, ve D. J. Pochan, “Injectable solid hydrogel: mechanism of shear-thinning and immediate recovery of injectable β -hairpin peptide hydrogels”, *Soft Matter*, c. 6, sy. 20, s. 5143, 2010.
- [97] H. Cao *vd.*, “Dual-loaded, long-term sustained drug releasing and thixotropic

- hydrogel for localized chemotherapy of cancer”, *Biomater. Sci.*, c. 7, sy. 7, ss. 2975-2985, 2019.
- [98] S. Uman, A. Dhand, ve J. A. Burdick, “Recent advances in shear-thinning and self-healing hydrogels for biomedical applications”, *J. Appl. Polym. Sci.*, c. 137, sy. 25, s. 48668, 2020.
- [99] J. L. Drury ve D. J. Mooney, “Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications”, *Biomaterials*, c. 24, sy. 24, ss. 4337-4351, 2003.
- [100] L. A. Fliervoet, J. F. Engbersen, R. M. Schiffelers, W. E. Hennink, ve T. Vermonden, “Polymers and hydrogels for local nucleic acid delivery”, *J. Mater. Chem. B*, c. 6, sy. 36, ss. 5651-5670, 2018.
- [101] A. M. Jonker, D. W. Löwik, ve J. C. Van Hest, “Peptide-and protein-based hydrogels”, *Chem. Mater.*, c. 24, sy. 5, ss. 759-773, 2012.
- [102] P. M. Kharkar, K. L. Kiick, ve A. M. Kloxin, “Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments”, *Chem Soc Rev*, c. 42, sy 17, ss. 7335-7372, 2013.
- [103] J. A. Rowley, G. Madlambayan, ve D. J. Mooney, “Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials”, *Biomaterials*, c. 20, sy. 1, ss. 45-53, 1999.
- [104] M. Stevens, “A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering”, *Biomaterials*, c. 25, sy. 5, ss. 887-894, 2004.
- [105] K. H. Bouhadir, K. Y. Lee, E. Alsberg, K. L. Damm, K. W. Anderson, ve D. J. Mooney, “Degradation of Partially Oxidized Alginate and Its Potential Application for Tissue Engineering”, *Biotechnol. Prog.*, c. 17, sy. 5, ss. 945-950, 2001.
- [106] H. J. Kong, E. Alsberg, D. Kaigler, K. Y. Lee, ve D. J. Mooney, “Controlling Degradation of Hydrogels via the Size of Crosslinked Junctions”, *Adv. Mater.*, c. 16, sy. 21, ss. 1917-1921, 2004.
- [107] A. Mero ve M. Campisi, “Hyaluronic Acid Bioconjugates for the Delivery of Bioactive Molecules”, *Polymers*, c. 6, sy. 2, ss. 346-369, 2014.
- [108] H. Tan, J. Wu, L. Lao, ve C. Gao, “Gelatin/chitosan/hyaluronan scaffold integrated with PLGA microspheres for cartilage tissue engineering”, *Acta Biomater.*, c. 5, sy. 1, ss. 328-337, 2009.

- [109] C. B. Highley, G. D. Prestwich, ve J. A. Burdick, “Recent advances in hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, c. 40, ss. 35-40, 2016.
- [110] H. Tan, L. Lao, J. Wu, Y. Gong, ve C. Gao, “Biomimetic modification of chitosan with covalently grafted lactose and blended heparin for improvement of *in vitro* cellular interaction”, *Polym. Adv. Technol.*, c. 19, sy. 1, ss. 15-23, 2008.
- [111] W.-C. Hsieh, C.-P. Chang, ve S.-M. Lin, “Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering”, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, c. 57, sy. 2, ss. 250-255, 2007.
- [112] F. Ahmadi, Z. Oveisi, S. M. Samani, ve Z. Amoozgar, “Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications”, *Chitosan Based Hydrogels*, c. 10, sy.1, ss. 1-16, 2015.
- [113] K. Liang, K. H. Bae, ve M. Kurisawa, “Recent advances in the design of injectable hydrogels for stem cell-based therapy”, *J. Mater. Chem. B*, c. 7, sy. 24, ss. 3775-3791, 2019.
- [114] B. J. Klotz, D. Gawlitta, A. J. W. P. Rosenberg, J. Malda, ve F. P. W. Melchels, “Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair”, *Trends Biotechnol.*, c. 34, sy. 5, ss. 394-407, 2016.
- [115] M. Liu vd., “Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering”, *Bone Res.*, c. 5, sy. 1, s. 17014, 2017.
- [116] E. Behraves, V. I. Sikavitsas, ve A. G. Mikos, “Quantification of ligand surface concentration of bulk-modified biomimetic hydrogels”, *Biomaterials*, c. 24, sy. 24, ss. 4365-4374, 2003.
- [117] A. A. D’souza ve R. Shegokar, “Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications”, *Expert Opin. Drug Deliv.*, c. 13, sy. 9, ss. 1257-1275, 2016.
- [118] G. D. Nicodemus, I. Villanueva, ve S. J. Bryant, “Mechanical stimulation of TMJ condylar chondrocytes encapsulated in PEG hydrogels”, *J. Biomed. Mater. Res. A*, c. 83A, sy. 2, ss. 323-331, 2007.
- [119] C. D. Brown, P. S. Stayton, ve A. S. Hoffman, “Semi-interpenetrating network of poly (ethylene glycol) and poly (D, L-lactide) for the controlled delivery of protein drugs”, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, c. 16, sy. 2, ss. 189-201, 2005.

- [120] F. Oppedisano *vd.*, “The Potential for Natural Antioxidant Supplementation in the Early Stages of Neurodegenerative Disorders”, *Int. J. Mol. Sci.*, c. 21, sy. 7, s. 2618, 2020.
- [121] K. Fosgerau ve T. Hoffmann, “Peptide therapeutics: current status and future directions”, *Drug Discov. Today*, c. 20, sy. 1, ss. 122-128, 2015.
- [122] A. Padhi, M. Sengupta, S. Sengupta, K. H. Roehm, ve A. Sonawane, “Antimicrobial peptides and proteins in mycobacterial therapy: Current status and future prospects”, *Tuberculosis*, c. 94, sy. 4, ss. 363-373, 2014.
- [123] T. Wei, S. S. Thakur, M. Liu, ve J. Wen, “Oral delivery of glutathione: antioxidant function, barriers and strategies”, *Acta Mater. Medica*, c. 1, sy. 2, 2022.
- [124] F. Karataş, A. Birişik, Z. Aydın, ve A. Kurtul, “Çiriş Otu’nda (*Asphodelus aestivus* L.) Suda Çözünen Bazı Bileşiklerin Araştırılması”, *Süleyman Demirel University Faculty of Arts and Science Journal of Science*, c. 6, sy. 1, ss. 35-39, 2011.
- [125] R. A. Winters, J. Zukowski, N. Ercal, R. H. Matthews, ve D. R. Spitz, “Analysis of glutathione, glutathione disulfide, cysteine, homocysteine, and other biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by n-(1-pyrenyl) maleimide”, *Anal. Biochem.*, c. 227, sy. 1, ss. 14-21, 1995.
- [126] Z. Ye, H. Lu, G. Chai, C. Wu, J. Chen, ve L. Lv, “Glycerol-modified poly (vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) self-healing hydrogel for artificial cartilage”, *Polym. Int.*, c. 72, sy. 1, ss. 27-38, 2023.
- [127] A. Bieberle-Hütter, A. C. Bronneberg, K. George, ve M. C. M. Van De Sanden, “Operando attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy for water splitting”, *J. Phys. Appl. Phys.*, c. 54, sy. 13, s. 133001, 2021.
- [128] S. Cai ve B. R. Singh, “Identification of b-turn and random coil amide III infrared bands for secondary structure estimation of proteins”, *Biophysical chemistry*, c. 80, sy. 1, ss. 7-20, 1999.
- [129] M. J. Farrell, R. J. Reaume, ve A. K. Pradhan, “Visual Detection of Denatured Glutathione Peptides: A Facile Method to Visibly Detect Heat Stressed Biomolecules”, *Sci. Rep.*, c. 7, sy. 1, s. 2604, 2017.
- [130] S. Naji-Tabasi, S. M. A. Razavi, ve H. Mehdiabbar, “Fabrication of basil seed gum nanoparticles as a novel oral delivery system of glutathione”, *Carbohydr. Polym.*, c.

157, ss. 1703-1713, 2017.

- [131] K. L. Borgsmiller, D. J. O'Connell, K. M. Klauenberg, P. M. Wilson, ve C. J. Stromberg, "Infrared and Raman Spectroscopy: A Discovery-Based Activity for the General Chemistry Curriculum", *J. Chem. Educ.*, c. 89, sy. 3, ss. 365-369, 2012.
- [132] E. Podstawka, Y. Ozaki, ve L. M. Proniewicz, "Part I: Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Investigation of Amino Acids and Their Homodipeptides Adsorbed on Colloidal Silver", *Appl. Spectrosc.*, c. 58, sy. 5, ss. 570-580, 2004.
- [133] J. Kuligowski, M. R. EL-Zahry, Á. Sánchez-Illana, G. Quintás, M. Vento, ve B. Lendl, "Surface enhanced Raman spectroscopic direct determination of low molecular weight biothiols in umbilical cord whole blood", *The Analyst*, c. 141, sy. 7, ss. 2165-2174, 2016.
- [134] H. Keramati, M. H. Saidi, ve M. Zabetian, "Stabilization of the Suspension of Zirconia Microparticle Using the Nanoparticle Halos Mechanism: Zeta Potential Effect", *J. Dispers. Sci. Technol.*, c. 37, sy. 1, ss. 6-13, 2016.
- [135] A. Ledin, "Measurements in situ of concentration and size distribution of colloidal matter in deep groundwaters by photon correlation spectroscopy", *Water Res.*, c. 28, sy. 7, ss. 1539-1545, 1994.
- [136] Y. Li vd., "Nanocellulose as green dispersant for two-dimensional energy materials", *Nano Energy*, c. 13, ss. 346-354, 2015.
- [137] M. Danaei vd., "Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems", *Pharmaceutics*, c. 10, sy. 2, s. 57, 2018.
- [138] S. M. Colegate ve R. J. Molyneux, Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination, Bioactive Nature Products, 2. baskı, New York, ABD: CRC press, 2007, böl. 2, ss.11-77.
- [139] J. J. Carlson ve S. K. Kawatra, "Factors Affecting Zeta Potential of Iron Oxides", *Miner. Process. Extr. Metall. Rev.*, c. 34, sy. 5, ss. 269-303, 2013.
- [140] Y. Jaguey-Hernández vd., "Thermoplastic biofilms obtained from an arabinoxylan-rich fraction from brewers' spent grain: physicochemical characterization and thermal analysis", *Biomass Convers. Biorefinery*, c. 13, sy. 15, ss. 14035-14047, 2023.

- [141] S. Yu, J. Liu, W. Zhu, Z.-T. Hu, T.-T. Lim, ve X. Yan, “Facile room-temperature synthesis of carboxylated graphene oxide-copper sulfide nanocomposite with high photodegradation and disinfection activities under solar light irradiation”, *Sci. Rep.*, c. 5, sy. 1, s. 16369, 2015.
- [142] R. Gilli, M. Kacuráková, M. Mathlouthi, L. Navarini, ve S. Paoletti, “FTIR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solution”, *Carbohydr. Res.*, c. 263, sy. 2, ss. 315-326, 1994.
- [143] P. Gill, T. T. Moghadam, ve B. Ranjbar, “Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience”, *Journal of biomolecular techniques*, c. 21, sy. 4, ss. 167, 2010.
- [144] S. Jagannathan, A. Shanmuga Sundaram, V. Kanchana, ve R. Rajesh, “Thermal Property Analysis and Characteristic Study of Ploy Ethylene Glycol with Diverse Molecular Weight for Thermal Energy Storage Material”, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, c. 988, sy. 1, ss. 012081, 2020.
- [145] A. M. Alanazi, G. A. E. Mostafa, ve A. A. Al-Badr, “Glutathione”, içinde *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, c. 40, ss. 43-158

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Fatmanur BOSTAN

Yabancı Dili : İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Doktora	Doğal ve Bitkisel Ürünler, Kozmetik Ürünler	Düzce Üniversitesi	2024
Y. Lisans	Biyoteknoloji	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	2020
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Erzurum Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Fen Bilimleri	Kiraz Anadolu Lisesi	2012

YAYINLAR

Diğer Yayınlar

Makale

Bostan, F., Surmeli, NB, “Cloning, expression, and characterization of a novel sericin-like protein”, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, c. 69, sy. 1, ss. 136-144, 2022

Kitap Bölümü

Kekeçoğlu, M., Başol C., **Bostan F.**, “Türkiye’de Bal Arılarının En Çok Tercih Ettiği Tıbbi Bitkiler,” *Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Fonksiyonel Kullanım Alanları, Ticareti ve Sürdürülebilirliği 1.baskı*, İstanbul, Türkiye: İksad Yayınevi, 2022, böl.15, ss. 415-445.

Üstün A., Saygılı, A., **Bostan, F.**, Şansaçar, M. “Türkiye’de GDO’lara Toplumsal Bakış,” *Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Biyogüvenlik*, 2.baskı, İstanbul, Türkiye: Pegem Akademi Yayıncılık, 2017, böl. 5, ss. 239-246.

Patent

“Biyoteknoloji, Sağlık, Kozmetik ve Biyomalzeme Uygulamaları için Serisin Benzeri Protein Tasarımı ve Rekombinant Üretimi”- tescil patent (28.06.2023)

Bilimsel Toplantıda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiri

Bostan F., Sürmeli N.B., “Cloning of Silk Protein Sericin-like Proteins for Recombinant Production in Bacteria as Building Blocks of Biomaterials" *24 th International Biomedical Science and Technology Symposium*’nda sunuldu, İzmir-Çeşme Türkiye, 17-20 Kasım 2019.

