

BÖLÜM 4

OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN DURUM

Dr. Öğr. Üyesi Hasan Basri SAVAŞ¹

OKSİDATİF STRES

Metabolizmanın çalışması sırasında sürekli olarak bir oksidatif stres oluşumu mevcuttur. Oksijenin rutin metabolik süreçlerde girdiği reaksiyonlar sonucu, radyasyona maruziyet, ilaçlar, ksenobiyotikler ve zararlı kimyasal maddelerin etkisi sonucu organizmada daimi biçimde serbest radikaller oluşur. Ortaya çıkan bütün serbest radikaller birleşerek oksidatif stresi oluştururlar. Oksidatif stres sitotoksik ve genotoksik etkilere sahiptir. Bu sebeple sürekli oluşan oksidatif stresin antioksidan sistem tarafından dengelenmesi, oksidatif stres bileşenlerinin etkisiz hale getirilmesi organizmanın yaşamını devam ettirmesi için gereklidir. Antioksidan sisteme ait birçok enzim ve enzim dışı yapılar oluşan çok sayıdaki serbest radikalleri etkisiz hale getirerek organizmada dengenin korunmasını ve yaşamın devamını mümkün kılarlar. Oksidatif stres artışı ve antioksidan sistemin bu durumu kompanse edememesi ile oksidatif hasar oluşur. Oksidatif hasarın oluşumu yüzden fazla hastalık etyolojisinde yer almaktadır. Kalp-damar sistemi hastalıkları, Diyabetes Mellitus, birçok kanser türü, nörolojik hastalıklar ve diğer birçok önemli hastalık oksidatif stres ve artışı ile ilişkilidir (1).

¹ Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Alanya, Antalya

Oksijenli solunum yapan canlılarda dışarıdan alınan oksijen birçok metabolik süreç ve reaksiyon sonucunda suya dönüşür. Bu dönüşüm sırasında aynı zamanda organizma için gerekli olan enerji sentezlenir. Solunumda kullanılan oksijenin % 2 ile 3 arasında bir miktarı suya dönüşmeyip oksijen kaynaklı radikalleri oluşturur. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali, iki elektron alarak indirgenmesi sonucu hidrojen peroksit oluşur. Üçüncü elektronun eklenmesi ile hidroksil radikali, dördüncü elektronun eklenmesi ile su oluşur. Süperoksit ve hidrojen peroksit radikalleri çok toksik olmamalarına rağmen, demirin katalitik etkisi ile kolaylıkla aşırı reaktif hidroksil radikale dönüşebilirler. Bu nedenle süperoksit ve hidrojen peroksit daha zararlı hale dönmeden, hemen enzimlerle metabolize edilmelidir. Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle lipid, protein ve nükleik asitlere zarar vererek hücre yapısını bozarlar.

Antioksidan sistem

Organizmada antioksidan sistem bileşeni olarak görev alan; Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon Transferaz (GST), Katalaz (CAT), Glutasyon Redüktaz gibi enzimler, vitaminler ve metal iyonlarını bağlayan çok sayıda proteinler de bulunur (2, 3).

TAS ve TOS ölçümü ve OSI hesabı

Oksidatif stres ve antioksidan durum göstergesi olan birçok parametre vardır. Bütün parametreleri aynı anda ölçmek ve değerlendirmek zor olduğundan genel durum göstergesi olabilecek laboratuvar parametresi arayışına girilmiştir. Geliştirilen metotlarla; Total Antioksidan Kapasite (TAK; TAS) ve Total Oksidan Kapasite (TOK; TOS) ölçümü mümkün olabilmektedir. Bu parametrelerin ölçüm doğruluğu ve geçerliliği gösterilmiş ve ticari kit üretimi aşamasına geçilmiştir. Ayrıca bu iki parametreden yola

çıkılarak oksidatif stres indeksi (osi) hesaplama yoluyla elde edilmektedir. OSI'nin önemi reaktif artışları devre dışı bırakarak, oksidatif ve stres ve antioksidan durumun genel dengesini iki yönlü biçimde göstermesidir.

TAS, TOS, OSI ÖLÇÜM METODU

TAS, TOS ve OSI ölçümü için serum ve homojenize dokular ısısına getirilerek çözdürülür. Çözdürülmüş homojenize doku örnekleri 10000 g'de +4 °C'de soğutmalı santrifüjde 10 dakika süreyle santrifüj edilir. Daha sonra doku homojenatlarının süpernatantlarında otoanalizör cihazda mikroprotein tayini yapılır. TAS ve TOS ölçümleri de santrifüj sonrası elde edilen süpernatandan çalışılır. Serumda ise çözülmüş ve oda ısısına getirilmiş örnekler önce vortekslenir ve yeterince karıştıktan sonra çalışılır.

Total Antioksidan Kapasite (TAS) ve Total Oksidan Kapasite (TOS) düzeyleri ticari kit kullanılarak modifiye Erel metodu ile aplikasyonu tamamlanmış otoanalizör cihazda veya manuel metotla spektrofotometrik olarak ölçülebilir.

TAS ve TOS değerleri; TAS için mmol Trolox Eq / L biriminde, TOS için $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Eq} / \text{L}$ biriminde sonuçlar verilir.

“OSI (Oksidatif Stres İndeksi) = TOS/TAS” formülü kullanılarak hesaplanır.

Total Antioksidan Kapasite (Total Antioxidant Status (TAS)) ölçülmesi:

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik metot sayesinde güçlü ve zararlı serbest radikallere karşı organizmanın güçlü serbest radikaller karşısındaki total antioksidan kapasitesi (Total Antioxidant Status: TAS) ölçülebilir. TAS ifadesine eşdeğer olarak; total antioxidant capacity (TAC), total antioxidant activity (TAA), total antioxidant power (TAOP), total antioxidant response (TAR) isimlendirilmeleri de kullanılmaktadır. Ölçüm yapılan

numunede bulunan antioksidan moleküller, koyu mavi-yeşil renkli ABTS (2-2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) çözeltisini, renksiz ABTS formuna doğru değiştirir. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğundaki değişim, numunede mevcut bulunan toplam antioksidan molekül miktarı ile ilişkilidir. Değişen renk yoğunluğuna göre absorbans değişimi 660 nm'de ölçülür. TAS ölçümü; geleneksel olarak Trolox Equivalent şeklinde isimlendirilen, E vitamini analogu olan, stabil bir antioksidan standart solusyonu tarafından kalibre edilir. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent / Litre olarak verilir (4).

Total Oksidan Kapasite (Total Oxidant Status (TOS)) ölçülmesi:

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntem ile organizmanın total oksidan kapasitesi (Total Oxidant Status: TOS) ölçülebilmektedir. TOS ifadesine eşdeğer olarak; total peroxide (TP), serum oxidation activity (SOA), reactive oxygen metabolites (ROM) isimlendirilmeleri de kullanılabilir. Oksidatif kapasitesi ölçülen numunede mevcut bulunan oksidanlar, ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyon oksitler. Asidik ortamda ferrik iyonlar, kromojen ile renkli bir kompleks meydana getirirler. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede mevcut bulunan toplam oksidan molekül miktarı ile ilişkilidir. Değişen renk durumuna göre absorbans değişimi 530 nm'de ölçülür. TOS ölçümü hidrojen peroksit ile kalibre edilir. Sonuçlar mikromolar hidrojen peroksit equivalent / Litre olarak verilir (5).

Oksidatif Stres İndeksi (Oxidative Stress Index (OSI)) hesaplanması:

Total Oksidan Seviye (TOS), Total Antioksidan Seviye (TAS)'ye bölünerek Oksidatif Stres İndeksi (OSI) hesaplanabilir. Oksidatif molekül artışına yanıt olarak antioksidan moleküllerin

artışının gerçekleşmesi, oksidatif hasar yönünden sadece TOS ölçümü değerlendirmesini yanıltıcı hale getirebilmektedir. TOS/TAS oranındaki değişimin karşılaştırılması sayesinde, oksidatif hasar için yanıltıcı olabilecek antioksidan reaktif yanıt devreden çıkarılarak, doğru bir karşılaştırma mümkün olmaktadır (6).

TAS, TOS ve OSI değerleri sayesinde organizmada birçok hastalığın etiyolojisinde rolü olduğu bilinen oksidan-antioksidan kapasite durumu hakkında bilgi sahibi olunabilmekte ve yorum yapılabilmektedir. Birçok bileşeni olan antioksidan sistemi ve oksidatif stresi genel değerlendirme imkanı vermesi TAS, TOS ölçümünün kullanışlı olmasını sağlar.

Malondialdehid (MDA) Ölçümü

Malondialdehid (MDA) lipidlerin peroksidasyon ürünüdür. Oksidatif stresin artışı ile orantılı olarak MDA düzeyi artar. Bu sebeple MDA düzeyi oksidatif stres göstergesi olarak kullanılır. Malondialdehid miktarı Draper ve Hadley'in metoduna göre spektrofotometrik yöntemle çalışılabilir. Bu yöntemde, MDA ile tiobarbitürik asit (TBA) reaksiyonunun meydana getirdiği renk oluşumu spektrofotometrik ölçümle değerlendirilmektedir (7).

Katalaz (CAT) Aktivite Ölçümü

Katalaz, peroksizomlarda bulunan, tetramerik bir hemoprotein enzimidir. Hidrojen peroksit radikalini oksijen ve suya parçalayarak etkisiz hale getiren reaksiyonu katalizler. Hidrojen peroksidi bu suretle etkisiz hale getirdiğinde antioksidan bir etkinlik göstermiş olur. Katalaz enziminin aktivitesi ölçüldüğü zaman antioksidan durum göstergesi olarak kullanılır. Organizmada antioksidan sistem bileşeni olarak katalaz haricinde görev alan; Superoksit dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon Transferaz (GST), Glutasyon Redüktaz gibi enzimler, vitaminler ve metal iyonlarını bağlayan çok sayıda proteinler de bulunur. (8).

Katalaz (CAT) aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışılabilir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) 240 nm'de maksimum absorpsiyon verir. Deney ortamına eklenen H_2O_2 , katalaz enzimi tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini ultraviyole spektrumunda absorpsiyon azalması şeklinde göstermektedir. Absorpsiyondaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantı göstermektedir (9).

İskemi Modifiye Albumin (IMA) ve Tiyol Dengesi

Oksidatif stres, hücre metabolizma sırasında oluşan hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin artışı (ROS) ile onları detoksifiye eden, antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır (10).

Mercaptain olarak da bilinen tioller karbon atomuna bağlı hidrojen ve sülfür atom bileşiklerini içeren organik bileşikler sınıfıdır (11). Plazma tiol havuzu başlıca albumin tiolleri, protein tiolleri, düşük moleküler ağırlıklı tiolleri içerir (12). Tioller oksidanlar aracılığıyla oksidasyon reaksiyonuna girebilirler ve disülfid bağları oluştururlar (13). Disülfid bağı kovalent bir bağıdır ve aynı zamanda SS bağı veya disülfid köprüsü olarak da adlandırılır. Oksidatif stres durumunda, Cys rezidüleri reversibl olarak, protein tiol grupları ve düşük moleküler ağırlıklı tiolleri arasında disülfid bağları oluştururlar. Disülfid bağları tekrar tiol gruplarına indirgenebilir ve böylece dinamik tiol disülfid dengesi devam eder (14).

Plazmada yüksek miktarda bulunan albümin molekülünün yapısı, iskemi varlığında kademeli olarak değişmektedir. Oksijen radikalleri oluştuğunda, albüminin N terminal ucu hasarlanır ve bu yeni oluşan molekül metallere bağlanma yetisini kaybederek, iskemi modifiye albümin olarak adlandırılır (15).

İskemi Modifiye Albumin ve tiyol dengesi; iskemi, antioksidan kapasite ve oksidatif stres değerlendirmesinde yol gösteren

yeni biyokimyasal belirteçlerdir. Bu belirteçler, biyokimya tüpüne (jelli) alınan kanın santrijüf edilmesi ile elde edilen serumdan çalışılmaktadır. Yeni olmaları sebebi ile özgün değerleri yüksektir. Birçok hastalık grubu için değerlendirilmekte ve henüz literatürde yeterli biçimde yer almamaktadır. Bu belirteçler ile yapılacak araştırmaların literatüre katkısı yüksek olacaktır.

İskemi Modifiye Albumin (IMA) ve Tiyol Dengesi Ölçüm Metodu

İskemi Modifiye Albumin (IMA) ve Tiyol Dengesi ölçümü için serumda yapılır. Serum elde etmek için jelli tüpe alınan kan örnekleri 10000 g'de +4 °C'de soğutmalı santrifüjde 10 dakika süreyle santrifüj edilir. Serumlar ependorf tüpleri içine alınarak kapakları kapatılıp - 80 C°de dondurulur. Daha sonra serumda protein tayini yapılır. Numuneler tamamlandıktan sonra zaman zaman serumlar önce çözünmüş ve oda ısısına getirilmiş olmalıdır. Daha sonra numuneler vortekslenir ve yeterince karıştıktan sonra çalışılır.

İskemi Modifiye Albumin (IMA) ve Tiyol Dengesi düzeyleri ticari kit kullanılarak aplikasyonu tamamlanmış otoanalizör cihazda veya manuel metotla spektrofotometrik olarak ölçülebilir.

Serum IMA Düzeyi Ölçümü

Serum IMA düzeyi albumin kobalt bağlanma testi prensibine dayanarak ölçülür. Ölçümler serumda yapılır. Serumlar yukarıdaki usulle elde edilir. Numunelerin hepsi toplandıktan sonra soğuk zincir içinde nakli yapılarak çözdürülür ve çalışılır. Serum IMA ölçümü için 95 µl hasta serumu, 5 µl kobalt klorid ile karıştırılıp 5 dakika süreyle inkübe edilir. İnkübasyon sırasında kobalt klorid konsantrasyonu 0,58 mmol/L olacak şekilde olmalıdır. İskemi sonucunda, kobaltın çok az bir kısmının albumine bağlandığı bilinmektedir. Albumine bağlanmayan kobaltı belir-

lemek için inkübasyondan sonra ölçüm küvetine 25 µl ditiyot-reitol (son konsantrasyonu 1.67 mmol/L) eklenerek karıştırılır ve bu şekilde ditiyotreitolonun, albumine bağlanmaması kobalt ile renkli kompleks oluşturması sağlanır. Oluşacak renkli kompleks 500 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. 5-180 U/mL aralığında 5 noktalı kalibrasyon eğrisi çizildikten sonra absorbans değerleri bu kalibrasyon eğrisinde değerlendirilir. Böylelikle kalibrasyon eğrisinden yola çıkılarak IMA düzeyleri hesaplanır (16, 17).

Tiyol Dengesi Ölçümü

Serum tiyol-disülfid dengesi yeni geliştirilen metotlarla manuel veya cihaza apliance halde otoanalizörde çalışılabilir. Ölçüm yöntemi daha önce tanımlanmış ve literatürde çok defa uygulanmış standart kolorimetrik bir yöntemdir. Kısaca, indirgenebilir disülfür bağları ilk olarak serbest fonksiyonel tiyol gruplarını oluşturmak üzere indirgenir. Kullanılmayan indirgeyici sodyum borohidrit tüketilecek ve formaldehit ile uzaklaştırılacak ve DTNB (5, 5-ditiybis-2-nitrobenzoik asit) ile reaksiyondan sonra indirgenmiş ve doğal tiyol gruplarını içeren tiyol gruplarının tümü belirlenir. Total tiyol ve nativ tiol arasındaki farkın yarısı dinamik disülfid miktarını verir. Doğal tiyol ve disülfür miktarları belirlendikten sonra total tiyol miktarı, nativ tiyol / total tiyol oranı, disülfür / total tiyol oranı ve disülfür / nativ tiyol oranı hesaplanır (18-21).

Glutatayon S- Transferaz (GST) Aktivitesi

Glutatayon S- Transferaz (GST) önemli antioksidan enzimlerden biridir. GST'lar endojen ve eksojen kaynaklı bazı bileşikler detoksifiye etmektedir. GST enzimlerinden GSTM sınıfı özellikle serbest radikallerin detoksifikasyonunda görevlidir. Çeşitli klinik durumlar ile GST aktivitesi arasında ilişkiler ku-

rulmuştur. M sınıfı genler oksidatif strese karşı koruyucudur ve azalan GSTM1 ekspresyonunun hipertansiyon ile bağlantılı olduğu ifade edilmiştir. Kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkmasında etkili olabileceği öne sürülen genetik değişimlerden birisi de son yıllarda sıkça araştırılan Glutatyon S-Transferaz (GST) ailesidir. GST ailesi pek çok genden oluşmuş olup insanlarda bunların 5 tanesi tanımlanmıştır. Özellikle kanser, kardiyolojik hastalıklar, dermatolojik hastalıklar ve çevresel bir ksenobiyo-tiğin etkisi ile oluşabileceği düşünülen hastalıklarda GST sıkça taranmıştır (22-25).

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD) önemli bir antioksidan enzimdir. Antioksidan durum göstergesi olarak sıklıkla SOD enzim aktivitesi ölçümü kullanılır. Süperoksit dismutaz, reaktif oksijen türlerini temizler. O_2 Serbest radikalini daha az oksidatif olan H_2O_2 ve oksijene (O_2) ayırır. Hidrojen peroksit ise CAT veya GPx ile H_2O ve O_2 şeklinde etkisiz hale getirilir. SOD aktivitesi ölçümü için temel prensip: ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle üretilen süperoksitin, nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esaslıdır. Bu şekilde ölçüm yapılabilir. Oluşan süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazan boyayı oluşumuna yol açar. SOD aktivitesi U/mL olarak ifade edilmektedir (26).

Paraoksonaz (PON1) ve Arilesteraz (ARE)

Paraoksonaz (PON1) enzimi esteraz bir enzimdir ve antioksidan yönü belirgindir. Glikoprotein yapısındadır. Aromatik karboksilik asit esterlerini hidroliz eder. Karaciğer tarafından sentez edilir. HDL'ye sıkıca bağlanır. LDL'nin oksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin birikimi sonrasında HDL'nin çeşitli enzimatik mekanizmalarla lipid peroksitlerini azalttığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Paraoksonaz aktivitesi değişkendir

ve çevresel faktörlerden etkilenir. Toplumlara göre farklılık göstermektedir. Paraoksonaz ve Arilesteraz (ARE), aynı gen tarafından kodlanan ve aktif merkezleri benzer olan esteraz grubundaki enzimlerdir. PON1'in polimorfik değişim gösterdiği bilinmektedir. Fakat ARE enzimi genetik polimorfik bir değişim göstermez. İki enzimin de doğal substratları farklı olmasına karşın PON1 enzimi aynı zamanda ARE'nin doğal substratı olan fenil asetatı hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir. PON1 ve ARE ortak olarak organofosfatları, aril ve alkil halojenürleri hidroliz edebilmektedirler. PON1 enzimi antioksidan bir enzimdir. Çünkü LDL'yi oksidasyondan koruyucu özelliği vardır. Hidrojen peroksit de dâhil olmak üzere diğer radikalleri nötralize etme kapasitesi mevcuttur. ARE'nin öncelikli önemi PON1'deki değişimlerden etkilenmeyen asıl proteinin göstergesi olmasıdır (27-32).

Bunların dışında antioksidan durum göstergesi olarak; glutatyon, glutatyon peroksidaz, myeloperoksidaz, ksantin oksidaz, A, C, E gibi vitaminler ölçülebilir. Oksidatif stres göstergesi olarak ise MDA'nın yanı sıra protein karbonil düzeyleri ölçülebilir.

GSH ve GSH-Px

Glutatyon hücre için en önemli antioksidan molekülüdür. Başta karaciğer olmak üzere dokularda yüksek miktarda bulunmaktadır. Glutatyon varlığında aminoasitler hücre membranından taşınabilir. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) önemli bir antioksidan enzim olarak hidrojen peroksit ve lipit peroksitleri üzerine etkilidir. Enzimin aktivite için selenyuma gereksinim duyan ve duymayan olmak üzere iki tipi vardır. Selenyum varlığında aktivite gösteren glutatyon peroksidaz formu hem hidrojen peroksit ve hem de lipit peroksitleri üzerine etkilidir. Oksidatif strese yol açan hidrojen peroksit ve lipit peroksitleri etkisiz hale getirilirken glutatyon peroksidaz okside forma dönüşür. Glutatyon redüktaz ise okside glutatyonu NADPH'a bağımlı biçimde tekrar

glutatyona indirger. Glutatyon ve glutatyon redüktaz düzeylerinin ölçümü sonucunda antioksidan kapasite ve etkinlik hakkında yorum yapılabilir.

GSH ve GSH-Px ölçümleri

GSH ve GSH-Px ölçümleri doku homojenatı, alyuvar hemolizati ve plazma numunelerinden yapılabilir. Lipit peroksidasyon düzeyleri Placer ve arkadaşlarının (1966) bildirdiği yönteme göre, indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri Sedalk ve Lindsay (1968) ve GSH-Px aktiviteleri Lawrence ve Burk'un bildirdiklere yönteme göre (1976), spektrofotometrik olarak yapılabilir. GSH, GSH-Px ve Lipit peroksidasyon sonuçları protein cinsinden verileceği için, büret yöntemine göre toplam protein düzeyleri belirlenir. Beta karoten, A, C ve E vitamin düzeyleri antioksidan aktivite gösteren ve ölçülebilen önemli vitaminlerdir (33-35).

GSH ölçümü

1. %10 trikloroasetik asit (TCA).
2. Tris tamponu (0,4M pH:8,9): 48,46 gram tris-hydroxymetil-aminomethan'ın hidroklorik asit (HCl) ile pH: 8,9 olacak şekilde 1 litrede çözülmesi ile hazırlanır.

Hücrede Ölçüm Metodu: 0,1 ml hücre homojenatı 0,4 ml TCA ile karıştırılır. 20 sn karıştırıcıda vorteksenir ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edilir. 0,1 ml süpernatant tüp içine alınır. Üzerine 0,9 ml distile su, 2,0 ml Tris tamponu ve 0,1 ml DTNB solüsyonu eklenir. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okunur.

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (Lawrence and Burk 1976) tarafından bildirilen yönteme göre spektrofotometrede belirlenmiş olur.

Hücre İçi ROS

Serbest radikaller kısa ömürlü ve kararsız bileşiklerdir. Kararlı yapıya ulaşmak ve dış orbitalindeki paylaşılmamış elektronu dengeli biçime dönüştürmek için çevrelerindeki moleküllerle etkileşime girme eğilimindedirler. Serbest radikallerin oluşumu çeşitli organizma içi ve dışı faktörlere bağlıdır. Oksijen aerobik canlılar için hayati öneme sahip iken organizmada toksik bir yapıya dönüşebilir. Oksijen molekülünün radikal olarak kabul edilen yapısında farklı orbitallerde bulunan iki tek elektron vardır. Organizmada hidroksil, hidrojen peroksit, alkoksil, ozon, süper oksit, nitrik oksit, hipoklorit asit gibi oksijen ve azot kaynaklı çok sayıda reaktif bileşik vardır.

Serbest radikal oluşumunda etkili birçok faktör vardır. Bunlar arasında özellikle **sigara (tütün maruziyeti)**, **çevre kirliliği ve radyasyon** maruziyetini çevresel faktörler içinde mutlaka saymak gerekir.

Serbest radikal artışı sonucunda hücre içinde reaktif oksijen türlerini oluşturan endojen faktörler olarak ise **düzensiz ağır egzersiz, sedanter yaşam, ağır stres, yaşlanma, doku hasarı, besin alımı ile ilgili patolojik durumların varlığı** sayılabilir. Besinlerin içeriğindeki yanlışlar ve yanlış beslenme stili de serbest radikal artışı sonucunda hücre içinde reaktif oksijen türlerini oluşturan durumlardır.

Beslenme kaynaklı serbest radikal oluşumunu arttıran durumlar olarak ise **fazla kalorili beslenme, öğün sıklığını çok arttıran beslenme modelleri, alınan proteinlerin bir kısmının bitkisel protein olmaması, sebze ve meyve miktarının diyetle azlığı, demir ve bakır içeren besinlerin gereğinden fazla alınması, doymuş/doymamış yağ asitleri arasındaki dengenin bozulması, doğal olmayan işlenmiş yağların tüketimi, alkol alımı** sayılabilir.

Hücrede ROS Ölçümü

Hücre içi ROS üretimi spektrofotometrik olarak yapılır. Rhodamine 123(Rh 123), DHR 123 hücreye kolayca nüfuz edebilen, florasan olmayan yüksüz bir moleküldür. 2'-DHR-123'ün RH123'e oksidasyonu ile H_2O_2 miktarı tayin edilmektedir. Bu oksidasyon sırasında lipit oksidasyonu ile oluşmuş hücre içerisinde serbest oksijen radikalleri miktarı ölçülebilmektedir. DHR-123'ün RH123'e oksidasyonu çok yüksek düzeyde florasan yayıcı bir olaydır. Floresan yayım durumu ile serbest oksijen radikali arasında pozitif bir ilişki vardır. RPMI-1640 besi ortamı ile tüm hücreler yıkandıktan sonra 10^3 olacak şekilde steril kuyucuklara eklenir. Böylelikle tüm gruplardaki hipokampal hücrelere hücre kültürü ortamında kontrol hariç 100 mikromolar hidrojen peroksit ilave edildikten sonra, 0,02 mM DHR123 ile 25 dakika $37^\circ C$ inkübe edilir. Sonra yayılan floresan 488 nm emisyon ve 543 nm eksitasyon (uyarım) dalga boylarında okunur. Aradaki absorbans farkı hesaplanır (Uguz et al. 2012; Ghazizadeh and Nazıroğlu. 2014). Değerler, kontrole kıyasla misli artış olarak verilir (36, 40).

Oksidatif Stres Artışı

Oksidatif stresin artışı antioksidan system tarafından kompanse edilemezse bu durumda çok sayıda hastalık ortaya çıkar. Oksidatif stres artışı ve serbest radikallerin etkisi sonucu başlıca aşağıdaki durumlar tetiklenir. Tetiklenen bu tablolar günümüzde başlıca ölüm nedenlerini oluşturmaktadırlar.

Yaşlanma, ateroskleroz, kanser, iskemi-reperfüzyon hasarı, otoimmün hastalıklar, kas hastalıkları, romatoid artrit, kan hastalıkları, karaciğer bozuklukları, inflamasyon, diyabetes mellitus.

SONUÇ

Sonuç olarak oksidatif stres sonucu hücre, doku ve organlarda oluşan oksidatif hasar organizmada rutin metabolik işlemler sırasında sürekli ortaya çıkan bir durumdur. Oksidatif hasarın, önlenmesi, dengede tutulması ve canlılığın devamı ancak antioksidan etkinlik ile mümkündür. Antioksidan sistemde görev alan ve oksidatif hasar ürünlerini etkisiz hale getiren çok sayıda yapı bulunmaktadır. Oksidatif hasar sonucu oluşan malondialdehid ve protein karbonil gibi oksidatif hasar ürünlerinin ölçümü oksidatif hasar göstergesi olarak kullanılmaktadır. Antioksidan sistem bileşeni olan katalaz gibi enzimlerin aktivitesinin ölçümü antioksidan durumun göstergesi olarak kullanılmaktadır. Oksidatif stres artışında reaktif olarak antioksidan aktivite artışı ile durum dengelenmeye çalışılacağından bu parametreler tek yönlü olarak değerlendirilmemelidir. İki yönlü olarak hem oksidatif stres düzeyini hem de antioksidan düzeyini gösteren parametrelere birlikte bakılmalıdır. Oksidatif stres/Antioksidan durum arasındaki dengenin bozulması sonucunda oluşan serbest radikallerin 100'den fazla ciddi hastalığa yol açtığı bilinmektedir. Sürekli olarak oksidatif stresi ve antioksidan durumu gösteren yeni parametrelerin ölçümü araştırılmaktadır. Araştırmacılar, çeşitli hastalıklarla Oksidatif stres/Antioksidan durum arasındaki denge arasındaki ilişkiyi araştırmaya devam etmektedir (33-43).

KAYNAKLAR

1. Halliwell B. Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Third ed. Oxford: Oxford Science Publications, 2000, p: 617-24.
2. Gürdöl F. Biyokimya. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, 2012, s: 548-50.
3. Young IS. Woodside JV. Antioxidant in health and disease. J Clin Pathol. 2001; 54(5): 356-61.
4. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem. 2004; 37(4): 277-85.

5. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005; 38(12): 1103-11.
6. Sırmatel Ö, Sert C, Sırmatel F, Selek Ş, Yokus B. Total antioxidant capacity, total oxidant status and oxidative stress index in the men exposed to 1.5 T static magnetic field. *Gen. Physiol. Biophys.* 2007; 26: 86-90.
7. Draper HH, Hadley M.: Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990;86:421-432.
8. Gürdöl F. *Biyokimya*. 2. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul. Sayfa: 548-50. 2012.
9. Aebi H. Catalase In: Bergmeyer U, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York and London Academic Press, 1974;pp.673-677.
10. H.E. Oğuzhan Özcan, Gökhan Çakırca, Zafer Yönden, Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri, *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 6(3) (2015) 6.
11. C.K. Sen, L. Packer, Thiol homeostasis and supplements in physical exercise, *The American Journal of Clinical Nutrition* 72(2) (2000) 653S-669S.
12. L. Turell, R. Radi, B. Alvarez, The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes, *Free Radical Biology and Medicine* 65 (2013) 244-253.
13. C.M. Cremers, U. Jakob, Oxidant sensing by reversible disulfide bond formation, *J Biol Chem* 288(37) (2013) 26489-96.
14. D.P. Jones, Y. Liang, Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo, *Free Radical Biology and Medicine* 47(10) (2009) 1329-1338.
15. A. Dominguez-Rodriguez, P. Abreu-Gonzalez, Current role of ischemia-modified albumin in routine clinical practice, *Biomarkers* 15(8) (2010) 655-662.
16. Gulpamuk B, Tekin K, Sonmez K, Inanc M, Neselioglu S, Erel O, Yilmazbas P. The significance of thiol/disulfide homeostasis and ischemia-modified albumin levels to assess the oxidative stress in patients with different stages of diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest.* 2018;78(1-2):136-142. doi: 10.1080/00365513.2017.1422540.
17. Tayyar AT, Kozalı S, Yıldırım GY, Karakus R, Yuksel IT, Erel O, Neselioglu S, Eroglu M. Role of ischemia-modified albumin in the evaluation of oxidative stress in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018 May 8:1-181. doi: 10.1080/14767058.2018.1474871.
18. Erel O, Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem.* 2014 Dec;47(18):326-32. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.09.026.
19. Tola EN, Köroğlu N, Ergin M, Oral HB, Turgut A, Erel Ö. The Role of Follicular Fluid Thiol/Disulphide Homeostasis in Polycystic Ovary Syndrome. *Balkan Med J.* 2018 doi: 10.4274/balkanmedj.2017.1140.

20. Köseoğlu H, Alışık M, Başaran M, Tayfur Yüreklı Ö, Solakoğlu T, Tahtacı M, Ersoy O, Erel Ö. Dynamic thiol/disulphide homeostasis in acute pancreatitis. *Turk J Gastroenterol.* 2018 May;29(3):348-353. doi: 10.5152/tjg.2018.17499.
21. Ozgunay SE, Ustundag Y, Karasu D, Uguz I, Erel O, Korfalı G, Kaya M. The Effect of Different Intraabdominal Pressures on Thiol/Disulfide Homeostasis in Children Who Underwent Ambulatory Laparoscopic Surgery: A Prospective Randomized Study. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 2018 May 9. doi: 10.1089/lap.2017.0714.
22. Aitman TJ, Critser JK, Cuppen E, et al. Progress and prospects in rat genetics: a community view. *Nat. Genet.* 2008;40:516-522.
23. McBride MW, Carr FJ, Graham D, et al. Microarray analysis of rat chromosome 2 congenic strains. *Hypertension* 2003;41:847-853.
24. McBride MW, Brosnan MJ, Mathers J, et al. Reduction of Gstm1 expression in the stroke-prone spontaneously hypertension rat contributes to increased oxidative stress. *Hypertension* 2005;45:786-792.
25. Yiğit A, Savaş HB. Glutathione S-Transferase Enzyme Gene Polymorphisms and Cardiovascular Diseases. *J Clin Anal Med J Clin Anal Med* 2016;7(5): 749-52. DOI: 10.4328/JCAM.4323.
26. Özdemir DS, Başpınar N, Akalın PP. Effects of ultrasound homogenisation on the activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and levels of lipid peroxide in liver homogenates. *Eurasian J Vet Sci,* 2015, 31, 1, 16-19. DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.201518472
27. Azarsız E, Sönmez EY. Paraoksonaz ve klinik önemi. *Türk Biyokimya Dergisi.* 2000; 25: 109-119.
28. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connely PW, Hegele RA. Paraoksonaz: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Cur Opin Lipid.* 1996; 69-76.
29. Mackness MI, Arrol SI, Mackness B, Durrington PN. Alloenzymes of paraoksonaz and effectiveness of high density lipoproteins in protecting low density lipoprotein against lipid peroxidation. *Lancet.* 1997; 349: 851-852.
30. Özdin M, Gürsu MF. Koroner kalp hastaları ile çeşitli risk faktörlerini taşıyan bireylerde paraoksonaz 1 ve arilesteraz aktiviteleri ile fenotiplerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Elaziğ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, 2003.
31. Li WF, Costa LG, Furlong CE. Serum paraoksonaz status: A majör factor in determining resistance to organophosphates. *J Toxicol Environ Health.* 1993; 40: 337-346.
32. Gürsu M.F, Özdin M. Sigara içenlerde serum paraoksonaz (PON1) aktiviteleri ile malondialdehit düzeylerinin araştırılması. *Fırat Tıp Dergisi.* 2002; 7: 732-737.

33. Canbolat MF, Savas HB, Gultekin F. Improved catalytic activity by catalase immobilization using α -cyclodextrin and electrospun PCL nanofibers. 2017. *J. Appl. Polym. Sci.* 2017, DOI: 10.1002/app.44404
34. Savaş HB, Yüksel Ö, Şanlıdere Aloğlu H, Öner Z, Demir Özer E, Gultekin F. Effects of food based yeast supplementation on oxidative stress in rats fed by high cholesterol diet. *Cell Membranes and Free Radical Research.* 5:3 2013; 252-255.
35. Türkkkan A, Savas HB, Yavuz B, Yiğit A, Uz E, Bayram NA, Kale B. The Prophyllactic Effects of *Viscum Album* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *North Clin Ist.* 2016;3(2):83-9. doi: 10.14744/nci.2016.22932. 2016.
36. Placer, Z.A., Cushman, L., Johnson, B.C. 1966. Estimation of products of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biological fluids. *Anal Biochem.* 16, 359-364.
37. Sedlak, J., Lindsay, R.H.C. 1968. Estimation of total, protein bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal Biochem.* 25, 192-205.
38. Lawrence, R.A., Burk, R.F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 71, 952-958.
39. Uguz AC, Cig B, Espino J, Bejarano I, Naziroglu M, Rodriguez AB, Pariente JA. 2012. 'Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells.' *J Pineal Res* 53(1):91-8.
40. Ghazizadeh V, Naziroğlu M. 2014. Electromagnetic radiation (Wi-Fi) and epilepsy induce calcium entry and apoptosis through activation of TRPV1 channel in hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Metab Brain Dis.* 29:787-799.
41. Gültekin F, Naziroğlu M, Savaş HB, Çiğ B. Calorie restriction protects against apoptosis, mitochondrial oxidative stress and increased calcium signaling through inhibition of TRPV1 channel in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Metab Brain Dis.* 2018 Oct;33(5):1761-1774. doi: 10.1007/s11011-018-0289-0.
42. Naziroğlu, M, Lückhoff A. 2008. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *Journal of the Neurological Sciences.* 15:270:152-158.
43. Savas HB, Gultekin F, Ciris İM. Positive effects of meal frequency and calorie restriction on antioxidant systems in rats. *North Clin Istanbul.* 2017;4(2):109-116. doi: 10.14744/nci.2017.21548.