

Biyolojik sistemlerde elektron alıcı moleküller serbest radikaller olarak adlandırılırlar [1]. Serbest radikallerin aktif oksijen türevlerine de oksidanlar denir. Oksidanlar hedef moleküllerden elektron alma yetenekleri nedeniyle, bu hedef molekülün yapısını ve fonksiyonlarını değiştirerek hücre zarını, DNA, RNA gibi genetik materyali ve değişik enzimatik olayları etkileyerek hücre hasarlarına yol açtığı bilinmektedir. Bu oksidanlar canlı organizmalarda sitoplazmik, mitokondriyel ve ekstrasellüler formları olan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzim sistemleri ile seruloplazmin, transferrin, indirgenmiş glutatyon (GSH), askorbik asit (vitamin C) ve alfa-tokoferol gibi antioksidanlar tarafından yıkılırlar [2]. Serbest radikallerin hasar verme özelliklerinden dolayı diyabetes mellitus, iskemi reperfüzyon hasarı, kanser, yaşlanma, kas hastalıkları gibi birçok hastalığa yol açtığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Biyomembranlar ve hücre içi organeller membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin olması nedeniyle oksidanların saldırılarına duyarlıdır. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünlerinden olan malondialdehit (MDA), hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir [3].

Oksidatif stresin genel bir tanımı, prooksidan-antioksidan dengesinin prooksidan yönüne kayması sonucu potansiyel hücre hasarına yol açması durumudur [2]. Bununla birlikte, oksidatif stres durumunun ölçümü, düzeltme ve onarımı yapan kompleks endojen savunma sistemlerin olmasından dolayı zor olabilir. Oksidatif stres, serbest radikal üretiminin artışı ve antioksidan savunmanın azalması sonucu olabilir. Bu nedenle, oksidatif stres biyobelirteci olarak antioksidan tüketiminin araştırılması antioksidan miktarlarındaki azalış veya onların metabolitlerindeki artışın değerlendirilmesi ile olabilir [4].

### Oksidatif Stres Parametreleri

Oksidatif stres, genelde lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA; oksidatif DNA hasar göstergesi olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG); protein oksidasyonu; SOD, GPx, CAT, glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler; alfa-tokoferol, askorbik asit, glutatyon, ubikinon, sistein gibi antioksidanların ölçümü ile belirlenir. Oksidatif stres durumunu değerlendirmek için sıklıkla kullanılan belli başlı yöntemler Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Oksidatif stres biyobelirteçleri

	Parametreler
1. Radikallerin ölçümü	Elektron paramagnetik rezonans spektroskopisi (EPR)
2. Oksidatif hasar biyobelirteçlerinin ölçümü	a) Lipit peroksidasyon ürünlerinin belirlenmesi Malondialdehit (MDA) Aldehitler b) Protein hasarının belirlenmesi c) DNA hasarının belirlenmesi 8- hidroksi-2'-guanozin (8-OHdG)
3. Antioksidan savunma sisteminin ölçümü	a) Antioksidan enzimlerin değerlendirilmesi Süperoksit dismutaz (SOD) Glutatyon peroksidaz (GPx) Katalaz (CAT) Glutatyon-S-Transferaz (GST) Glutatyon redüktaz (GR) b) Total antioksidan aktivitenin belirlenmesi c) Düşük molekül ağırlıklı antioksidanların ölçümü (LMWA) Alfa-tokoferol Askorbik asit Glutatyon Melatonin
4. Enzim kofaktörlerinin ölçümü	Cu, Zn, Mn, Se, Fe elementleri

### Rat eritrosit ve dokularının analiz için hazırlanması

**Eritrosit hemolizati:** Eritrosit örneklerinde oksidatif stres parametrelerinin çalışılması amacıyla tripotasyum EDTA içeren tüplere yaklaşık 4-5 ml kan örneği alınır. Bunun için kan örnekleri hemen 4°C'de 4400 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Plazma kısmı polipropilen tüplere ayrılarak - 70°C'de analiz yapılıncaya kadar saklanır. Geride kalan şekilli elemanlar üzerine hacminin üç katı kadar % 0.9'luk NaCl çözümü ilave edilerek hafifçe ters yüz edilir ve 4°C'de 5 dakika santrifüj edilerek üstteki süpernatant atılır. Bu işlem iki defa daha tekrar edilir ve sonunda 1 ml eritrosit kısmından polip-

ropilen tüplere alınarak üzerine 4 ml soğuk distile su ilave edilip vortekslenerek hemolize edilir. Daha sonra elde edilen bu eritrosit hemolizatları - 70°C'de derin dondurucuda analiz yapıncaya kadar saklanır [5].

**Doku homojenatı:** Çeşitli doku örneklerinde (karaciğer, böbrek, kalp, beyin, testis, akciğer gibi) oksidatif stres parametrelerinin çalışılması için dokular önce homojenize edilir. Bunun için, doku örnekleri tartılıp 0.15 M KCl çözeltisi (%10, w/v) ile cam homojenizatörü veya teflon cam homojenizatörü içerisinde iyice ezilip homojenize edilir. Hazırlanan doku homojenatı - 70°C'de derin dondurucuda analiz yapıncaya kadar saklanır [6].

### Radikallerin ölçümü

#### Elektron paramagnetik rezonans spektroskopisi (EPR):

Elektron paramagnetik rezonans spektroskopisine, elektron spin rezonans spektroskopisi (ESR) de denilir. Bu yöntem en çok kullanılan doğrudan radikal ölçüm yöntemidir. Radikallerin bünyesinde bulunan manyetik enerji seviyesinin dışarıdan uygulanan bir manyetik alanla iki farklı enerji seviyesine ayrılması olayı üzerine kurulmuştur. Özel EPR cihazları mevcuttur. Bu yöntemin dezavantajı bir kaç saniye gibi kısa ömürlü olan radikallerin ölçüm işleminin zor olmasıdır ve bu yüzden sadece uzun ömürlü radikaller doğrudan analiz edilebilir. Bu dezavantajı yenmek için kısa ömürlü radikaller spin tuzağı denilen nitrozo veya nitron içeren bileşiklerle reaksiyona sokulup uzun ömürlü türevler oluşturulur ve analiz mümkün hale gelir [7,8].

### Oksidatif hasar biyobelirteçlerinin ölçümü

#### a) Lipit peroksidasyon ürünlerinin belirlenmesi

Klinik çalışmalarda doku, plazma ve üründe oksidasyon ürünlerinin ölçümü, in vivo lipit peroksidasyonu yansıtmada yapılmaktadır. Lipit peroksitler kararsız bileşikler olup hızlıca bozunma eğilimi gösterdiklerinden kısa zincirli alkanlar, aldehitler gibi çeşitli ürünlere dönüşebilirler. Dolayısı ile genelde tiyobarbitürik asit-reaktif maddeler (TBARS) ve sitotoksik aldehitlerin ölçümleri yapılmaktadır [9].

#### MDA düzeyi:

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA tayini, tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın reaksiyon vererek 532 nm dalga boyunda ölçülebilen renkli bir bileşik vermesi esasına dayanmaktadır. Tetrametoksipropan standart olarak kullanılır. Sonuçlar nmol/ml olarak tanımlanır. Bu yöntemde tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler ölçülür ve literatürlerde TBARS olarak yer almaktadır.

MDA daha sıklıkla spektrofotometrik olarak belirlenir. Bu yöntem basit ve pahalı olmayan bir metottur. Ancak TBA'nın sadece MDA ile değil diğer bileşiklerle (karbonhidratlar, pigmentler, amino asitler) de reaksiyona girme ihtimali olduğundan sonuçlarda önemli ölçüde değişkenlik söz konusu olabilmektedir. Diğer taraftan, kromatografik yaklaşım ölçümleri de mevcuttur. Daha çok floresan veya UV-vis deteksiyonlu yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) ile ölçümler yapılmaktadır. Ayrıca pentafluorofenilhidrazin ile MDA ve diğer aldehitlerin türevlendirilmesiyle ve gaz kromatografi-kütle spektrometre (GC-MS) [10,11] ile ayrıntılı biyolojik örneklerde iyi sonuçlar vermiştir. Alternatif bir yön-

tem olarak ta, 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile MDA'nın türevlendirilmesi ve pirazol ile hidrazon türevlerine dönüşümü, özellikle HPLC kullanarak seperasyonu yapılarak, MDA'nın spesifik tahminine olanak sağladığı tespit edilmiştir. Bu yaklaşım rat plazması ve idrarı gibi biyolojik örneklerde MDA düzeylerini belirlemede kullanılmaktadır [12].

### MDA düzeyini belirlemede sıklıkla kullanılan yöntemler;

**i. Eritrosit MDA Düzeyi:** Yöntem kısaca, 1:5 oranında dilüsyon yapılmış eritrosit hemolizatlarından 0,5 ml alınarak üzerine 0,5 ml fosfat tamponu, 0,5ml % 15'lik trikloroasetik asit solüsyonu ilave edilerek vortekslenir ve buz keseleri üzerinde 2 saat tutulur. 4°C'de 4400 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Sonra 1 ml süpernatant alınıp üzerine 75 µl 0.1 M EDTA ve 250 µl 0,05 N NaOH içerisinde hazırlanmış % 1'lik TBA solüsyonu ilave edilir, 15 saniye vortekslenir ve kaynayan su banyosunda 15 dakika tutulur. Absorbanslar 532 nm dalga boyunda köre karşı spektrofotometrede ölçülür [13].

**ii. Plazma ve Doku MDA Düzeyi:** Bu test, Ohkawa ve arkadaşları tarafından MDA düzeylerini belirlemede kullanılmıştır [14]. Yöntem kısaca, 50 µl sodyum dodesil sülfat (SDS, %8.1)'a 100 µl plazma veya doku homojenatı eklenir, vortekslenip oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir. 375 µl asetik asit (pH 3.5, 20%) ve 375 µl tiobarbitürik asit (0.6%) eklenir ve kaynar su banyosunda 60 dakika bekletilir. Örnekler oda sıcaklığında soğumaya bırakılır. 1.25 ml of bütanol:piridin (15:1) eklenir, vortekslenir ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. 750 µl organik pembe tabaka 532 nm'de ölçülür. Tiyobarbitürik asit ile MDA reaksiyonundan sonra reaksiyon ürünü 532 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilir. Sonuçlar plazma için nmol/ml, doku için ise nmol/g olarak tanımlanır.

**iii.MDA'nın HPLC analizi:** MDA düzeyleri yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) analizler ile de ölçümü yapılmaktadır. Bu teknik daha fazla zaman alıcıdır fakat daha hassas sonuçlar elde edilir. Bu yöntemde C18 kolon ve asetonitril ya da metanol gibi mobil faz kullanılır [15].

#### Aldehidler:

Bu ikincil lipid peroksidasyon ürünleri demir iyonları varlığında artar ve güçlü biyolojik etkileri vardır. MDA yanında asetaldehid, bütanal, propanal, hegzanal, heptanal ve 4-hidroksi-2,3-trans nonenal gibi aldehidler de insan plazmasında bulunmaktadır. 2-10 karbonlu aldehidler, 1,3-siklohegzandion ile reaksiyon vererek floresan özellik veren türevler oluşturur ve HPLC ile floresan dedektör kullanılarak analiz edilir. Yalnız analizde ortama otooksidasyonu engellemek için butilhidroksitoluen ve demir şelatörleri de katılması gerekir. Bundan başka aldehidler dinitrofenol hidrazin ile reaksiyon vererek sarı renk oluşturur ve HPLC de fotodiyod array UV dedektörle de ölçülebilmektedir [15, 16].

#### b) Protein hasarının belirlenmesi

Proteinler, membranların majör bileşeni olup reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından saldırı için hedefler. Çeşitli ROS arasında hidroksil radikali (OH.) alkoksil radikali (RO.) ve nitrojen reaktif radikalleri ağırlıklı olarak protein hasarına yol açarlar. Protein oksidasyon ürünleri genellikle aldehitler, keto bileşikler ve karbonillerdir. Kolay saptanabilen majör katım ürünlerinden biri olan

3-nitrorozoin, protein oksidatif hasarı için bir biyobelirteçtir. Bu katım ürünü peroksinitrit ve aminoasit tirozinli diğer nitrojen reaktif radikaller arasındaki etkileşim sonucu oluşur. Protein oksidasyonu sonucunda modifiye olmuş proteinler kendi fonksiyonlarındaki birçok değişimlere duyarlı hale gelirler. Bunlar kimyasal bölünmeler, inaktivasyon ve proteolitik degregasyondaki artışlardır [17].

Protein oksidasyonu genelde 2,4-dinitrofenil hidrazin ile protein karbonillerin spektrometrik olarak ölçümü ile belirlenmektedir [18].

### c) DNA hasarının belirlenmesi

Kararlı bir molekül olan DNA'da lipitler, karbohidratlar ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle çok düşük düzeylerde hasar görülebilir. Yeni doğan ratlarda dahi oksidatif baz modifikasyonunun (8-OHdG) olduğu gösterilmiştir. Reaktif oksijen türlerinin artması, antioksidan enzim düzeylerinin azalması ve DNA onarım mekanizmalarının yetersiz kalması durumunda oksidatif DNA hasarlarının artmasına neden olmaktadır. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme) meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanmalar söz konusu olabilir [19].

Oksidatif DNA hasar belirteci olarak sıklıkla baz hasarlarının analizi yapılmaktadır.  $\text{Cu}^{+2}$  iyonları DNA'da G-C'den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğu için oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz guanindir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8-OHdG olup oksidatif DNA hasarının belirteci olarak kabul edilir [19].

### 8- hidroksi-2'-guanozin (8-OHdG) düzeyi:

Deney hayvanlarının üründe DNA'nın major oksidasyon ürünü olarak 8-OHdG analizinin ilk bildirişi 1989 yılında olmuştur. Analiz metodolojisinde iki yaklaşım mevcuttur. 1. Doğrudan yaklaşım; fiziksel ve kimyasal metotlar kullanarak DNA lezyonun ayırmak ve DNA ekstraksiyonu ve hidrolizini yapmak, 2. Dolaylı yaklaşım; bütün DNA yapısının korunması ve lezyonların oluşumunun in situ izlenmesidir. İlk yaklaşımda, elektrokimyasal deteksiyonlu HPLC (HPLC-EC), GC-MS ile miktar tayinini yapılmıştır. İkinci yaklaşımda ise, genellikle düşük spesifik özellik gösteren antikorlar kullanılarak veya spesifik DNA onarım enzimlerinin kesim aktivitesi aracılığıyla ölçümler yapılır. Ayrıca, formamidoprimidin DNA N-glikosilaz enzimi kullanılarak, 8-OHdG iplik kırılmasına dönüştürülür ve iplik kırıklarının miktarı comet testi yöntemi ile değerlendirilmesi yapılır [20]. Shigenaga ve Ames, [1991] beyin, karaciğer, böbrek, kalp ve kasların nükleer DNA'sını izole edip 8-OHdG düzeyini elektrokimyasal deteksiyonlu HPLC ile belirlemişlerdir [21].

### Antioksidan savunma sisteminin ölçümü

#### a) Antioksidan enzimlerin değerlendirilmesi

##### Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi:

Bu yöntemde ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemiyle süperoksit radikali üretilmekte ve oluşan süperoksit radikali, I.N.T. (Iodonitrotetrazolium) ile reaksiyon vererek viyole renkli formazon boyası oluşturmakta ve bu renk şiddeti 505 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Ortamdaki CuZn-SOD aktivitesine bağlı olarak bu

reaksiyon önlenmekte ve % inhibisyon hesaplanmaktadır. CuZn-SOD aktivitesi kanda U/g Hb olarak tanımlanırken doku için U/g protein olarak ifade edilir [22].

Bu yöntemin uygulaması kısaca şöyle; eritrosit hemolizati veya doku homojenati 10mM fosfat tamponu (pH 7.00) ile dilüe edilir. 25 µl dilüsyonlu hemolizat veya homojenat, 50 mmol/L CAPS (3-(sikloheksilaminol)-1-propansülfonik asit) ve 0.094 mmol/L EDTA (pH 10.2) içeren bir tampon solüsyonunda 0.05 mmol/L ksantin sodyum ve 0.025 mmol/L 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium klorit (INT) içeren 850 µl substrat solüsyonu ile karıştırılır. 125µl ksantin oksidaz (80 U/ml) karışıma eklenerek absorbans artışı 505 nm'de 3 dakika izlenir.

##### Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi:

GPx aktivite tayin yönteminde,  $\text{H}_2\text{O}_2$  varlığında indirgenmiş glutasyonun (GSH) GPx tarafından okside glutatyona (GSSG) oksitlenir ve oksitlenen GSSG'nin glutasyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanılır. Kullanılan bu NADPH miktarı absorbansdaki azalış şeklinde 340 nm dalga boyunda izlenir. GPx aktivitesi kanda U/g Hb olarak tanımlanırken doku için U/g protein olarak ifade edilir [23].

Bu yöntemin yapılışı kısaca; 50 mmol/L TRIS tamponunda (pH 7.6) hazırlanan 1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 2 mmol/L indirgenmiş glutasyon, 0.2 mmol/L NADPH, 4 mmol/L sodyum azid ve 1000 U glutasyon redüktaz içeren bir karışımın 980 µl ile 20 µl eritrosit hemolizati veya doku homojenati karıştırılır ve 37°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılır. Reaksiyon, 8.8 mmol/L hidrojen peroksit eklenmesiyle başlatılır ve 3 dakika için 340 nm'de okunan absorbansların azalışı kaydedilir.

##### Katalaz (CAT) aktivitesi:

Aebi tarafından [1984] belirtilen metot ile 25°C'de eritrosit hemolizatında veya doku homojenatında ölçülerek burada substrat  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin dekompozisyon oranı, 30 saniye için 240 nm'de spektrofotometrik olarak izlenir. Aktivite kanda MU/g Hb olarak tanımlanırken doku için MU/g protein olarak ifade edilir [24].

##### Glutasyon-S-Transferaz (GST) aktivitesi:

Dokularda ölçümü substrat olarak 1-cloro-2,4- dinitro benzen (CDNB) kullanılarak 340 nm'de absorbans artışının izlenmesiyle yapılır [25].

##### Glutasyon Redüktaz (GR) aktivitesi:

Dokularda NADPH oksidasyon oranının ölçümü ile belirlenir [25].

### b) Total antioksidan aktivitenin belirlenmesi

Trolaks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) denilen bir yöntemle total antioksidan kapasite ölçülebilmektedir. Bu amaçla Vitamin E, β-karoten, flavonoidler, GSH, urat, bilirubin, transferrin, seruloplazmin, albumin, GPx, Se, SOD ve CAT seviyeleri değerlendirilmektedir. Yöntemin esası, serbest radikallerin 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin)-6-sülfonik asid ile reaksiyon vermesine dayanır. Oksijen radikali absorplama yeteneği de aynı total antioksidan kapasitenin tespiti için kullanılır, fakat burada floresan ölçümü kullanılmaktadır [15,26,27].

**c) Düşük molekül ağırlıklı antioksidanların ölçümü (LMWA)**

E vitamini tokoferol yapısında olup  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  olarak adlandırılan dört tokoferol karışımıdır. Alfa-tokoferol, doğal dağılımı en geniş ve biyolojik aktivitesi en fazla olanıdır. Antioksidan etkisi en fazla olan  $\alpha$ -tokoferol'dür. Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur.  $\alpha$ -Tokoferol etanol, karbon tetraklorür, dikuat, parasetamol, kalsiyum boşalması ve diğer uyarıcılarla oluşan hepatosit lipid peroksidasyonunu inhibe eder [28,29]. E vitamini, lipid peroksi radikallerini (LOO $\cdot$ ) yıkarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığından "zincir kırıcı" bir antioksidan olarak da bilinir. Sonuçta oluşan tokoferoksil radikali ( $\alpha$ -tokoferol-O $\cdot$ ) stabildir ve kendi kendine lipid peroksidasyon başlatmak için yeterince reaktif değildir. Bu oksidasyon ürünü glukuronik asitle konjugasyona uğrayarak safra yolu ile atılır [30].

Askorbik asit (vitamin C), suda çözünür bir antioksidandır ve bazı hayvanlarda sentezlenebilir. Birçok enzimin kofaktörüdür. C vitamini organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. O $_2$  $\cdot^-$  ve HO ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Semidehidroaskorbat da antioksidan etki gösterir. Tokoferoksil radikalının  $\alpha$ -tokoferole redüklenmesini sağlar. Askorbik asit düzeyinin düşük olması tüm kronik inflamatuvar hastalıklarda ve lipid peroksidasyonun arttığı durumlarda önemli rol oynar [17].

Glutasyon, düşük molekül ağırlıklı olup glutamik asit-sisteinglisin amino asitlerinden oluşmuş bir tripeptittir. Redükte ve okside olmak üzere iki formu vardır. Tüm memeli hücrelerinde yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Glutasyonun proteinlerin sülfidril (-SH) gruplarının redükte kalması ve okside edici moleküllere karşı koruyucu özellikleri içeren çeşitli hücresel fonksiyonları vardır. Ayrıca bazı enzimlerin kofaktörü olarak işlev görür. Biyokimyasal fonksiyonlarının yanı sıra doğrudan ROS temizleme işlevi vardır. Glutasyon hidroksil, alkoksil ve peroksil radikalleri (ROO $\cdot$ ) ile de etkileşime girebilir [17,31].

Melatonin, beyin epifizinden salgılanan bir hormon olup sirkadyan ritmin düzenlenmesine yardımcı olur. Güçlü bir antioksidandır ve çeşitli ROS temizleyebilir. İn vivo melatonin düzeyleri nisbeten düşüktür, ancak temizleyici aktivitesi açısından antioksidan aktivitesini açıklamak zordur. Muhtemelen dolaylı olarak hücrenin antioksidan aktivitesini değiştirebilir. Melatonin'in beyinde yüksek lokal konsantrasyonları ratlarda kafa travmasına karşı oldukça koruyucu etkisi gösterilmiştir [17].

Alfa-tokoferol, askorbik asit, glutasyon, ubikinon, ubikinol ve sistein gibi endojen antioksidanların ölçümü genelde HPLC ile yapılmaktadır [27]. Baker ve ark.'nın [1980] belirttikleri metoda göre, alfa-tokoferol düzeyi 2,2 dipridil ile reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renkli bileşiğin 520 nm'de ölçümü ile belirlenir [32]. Roe ve Kuether [1943] belirttikleri metoda göre ise 2,4 dinitrofenil hidrazin kullanılarak ölçümü yapılmaktadır [33].

**Enzim kofaktörlerinin ölçümü**

Bazı geçiş metal iyonları lipid peroksidasyon için önemli biyolojik mediyatörlerdir ve bazı antioksidan enzimler için ise kofaktörlerdir. Örneğin Fe $^{+2}$  ve Cu $^{+}$  Fenton reaksiyonu ile H $_2$ O $_2$  veya lipid hidroperoksitlerden HO meydana gelmesine aracılık ederler. Cu $^{+2}$ , Zn $^{+2}$  ve Mn $^{+2}$  elementleri SOD enzimi izoformlarının aktivitesi için, Se $^{+2}$  elementi ise GPx enzimi için kofaktörlerdir. Bu ne-

denle Cu, Zn, Mn, Se ve Fe elementlerinin atomik absorpsiyon spektrometresi (AAS) ile ölçümleri yapılarak oksidatif stres konusunda bir fikir edinmemize yardımcı olabilmektedir [34].

**Elementlerin analizi:**

Rat eritrosit hemolizati ve doku homojenatlarında element düzeylerinin belirlenmesinde sıklıkla AAS kullanılarak yapılır. Çinko, bakır ve demir düzeyleri ölçümünde alevli sistem ünitesi AAS kullanılır; mangan, selenyum düzeylerinin belirlenmesinde ise genelde grafit sistem ünitesi AAS kullanılır. Ölçümü yapılacak her bir element için standart çözeltiler hazırlanır. Kalibrasyon köru ve bütün standart çözeltiler % 0.2'lik nitrik asit (HNO $_3$  %65) ile hazırlanır. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon grafiğine göre örneklerdeki konsantrasyonlar hesaplanır. Bütün elementlerin analizinde, her örnek için ölçümler iki kez tekrar edilir. Çinko için 213.9 nm, bakır için 324.7 nm mangan için 279.5 nm selenyum için 196.0 ve demir için 372.0 dalgaboyları kullanılır. Sonuçlar eritrosit için  $\mu$ g/ml veya ng/ml, doku için ise  $\mu$ g/g veya ng/g olarak tanımlanır [35].

**Protein miktar tayini:**

Dokuların protein içeriği, standart olarak sıgır serum albumin kullanılarak Lowry ve ark.'nın [1951] metoduna göre ölçülür [36].

Sonuç olarak, oksidatif stres durumunu değerlendirmek için ratlarda yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılan metotlar özetlenmiştir. Günümüzde bu yöntemler yaygın bir şekilde kullanılmakta olup bunların uygulandığı çalışmalardan örnekler verecek olursak;

Liu ve ark., [2000] ratlarda kronik ve akut egzersizin beyin, kalp, kas gibi dokularda yol açtığı oksidatif stresi değerlendirmek amacı ile çeşitli oksidatif stres biyobelirteçleri olarak MDA, protein oksidasyonu, 8-OHdG, alfa-tokoferol, askorbik asit, glutasyon, ubikinon, ubikinol ve sistein ölçümlerini yapmışlardır [37]. Bu çalışmada, MDA ölçümü GC-MS ile endojen antioksidan düzeylerini ve 8-OHdG ölçümlerini ise HPLC ile yapmışlardır. Ay ve ark., [2007] hiperbarik oksijenin zamana bağlı etkisinin indüklediği oksidatif etkileri araştırmak için rat akciğer ve eritrositinde SOD, GPx ve lipid peroksidasyon düzeyini çalışmışlardır [38]. Yine Matsunami ve ark., [2010] diyabetli ratlarda hiperbarik oksijen tedavisinin oksidatif etkilerini araştırmak için eritrosit, karaciğer, pankreas ve beyinde SOD enzim aktivitesi ile lipid peroksidasyon çalışması yapmışlardır [39]. Srinivasan ve ark. [2006], izole ettikleri rat hepatositlerinin primer kültürlerini gama radyasyonuna maruz bırakarak oluşturdukları toksisite üzerine ferulik asitin (antikanser, antiapoptotik, antidiyabetik gibi farmakolojik özellikleri olan fitokimyasal bir madde) radyoprotektif etkilerini değerlendirmek için oksidatif stres parametrelerini kullanmışlardır [40]. Doğru-Abbasoğlu ve ark.'nın [2004] yaptıkları bir çalışmada karaciğer homojenatlarında lipid peroksit düzeylerini iki farklı yöntemle ölçmüşlerdir. Bu yöntemlerden biri lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA, diğeri ise ara ürün olan dien konjugat düzeyleri olup bu yöntemler sonucunda lipopolisakkarit uygulanan sirozlu ratlarda karaciğer hasarının arttığını tespit etmişlerdir [41]. Shanthakumari ve ark., [2004] 16 hafta boyunca 25 ppm/rat/gün dozunda içme suyu ile flor verilen ratlarda lipid peroksidasyonun arttığını, SOD, katalaz, GPx aktivitele-

rinde ve GSH konsantrasyonunda azalma gözlemlenmişlerdir. Sonuç olarak bu değişimlerin sebebinin ise serbest radikallerin artmış üretimine bağlanmıştır [42]. Yine bir diğer çalışmada, ozon'a maruz kalan ratların beyininde, lipid peroksidasyonun bir göstergesi olarak tiyobarbitürik asit oranında bir artış bulunmuştur [3].

#### Kaynaklar

1. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160;1-40.
2. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M TD, Mazur M, telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem cell Biol.* 2007, 39;44-84.
3. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg.* 2004, 15(1-2);91-96.
4. Blumberg J. Use of biomarkers of oxidative stress in research studies. *J Nutr.* 2004, 134;3188S-3189S.
5. Arsova-Sarafinowska Z, Eken A, Matevska N, Erdem O, Sayal A, Savaşer A, Banev S, Petrovski D, Dzinkova S, Georgiev V, Sikole A, Özgök Y, Suturkova L, Dimovski AJ, Aydın A. Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. *Clin Biochem.* 2009, 42;1228-1235.
6. Bolcal C, Yıldırım V, Doğançcı S, Sargın M, Aydın A, Eken A, Özal E, Kuralay E, Demirkılıç U, Tatar H. Protective effects of antioxidant medications on limb ischemia reperfusion injury. *J Surg Res.* 2007, 139;274-279.
7. Saran M, Bors W. Direct and indirect measurements of oxygen radicals. *Klin. Wochenschr.* 1991, 69;957-964.
8. Yagi K. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. *Adv Exp Med Biol.* 1994, 366;1-15.
9. Meagher EA, Fitzgerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med.* 2000, 28(12);1745-1750.
10. Yeo HC, Helbock HJ, Chyu DN, Ames BN. Assay of malondialdehyde in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem.* 1994, 220;391-396.
11. Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared with thiobarbituric acid. *Anal Biochem.* 1997, 245;161-166.
12. Mateos R, Lecomberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B.* 2005, 827;76-82.
13. Richard MJ, Arnaud J, Jurkovic, C, et al. Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron.* 1991, 57(1);10-15.
14. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animals and tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979, 95;351-358.
15. Armstrong D, Browne R. The Analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes, and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol.* 1994, 366;43-58.
16. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991, 91(3C);31S-38S.
17. Kohen R, and Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002, 30(6);620-650.
18. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994, 233;346-357.
19. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa J Med.* 2004, 35;159-169.
20. Valavanidis A, Vlachogianni J, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ sci Health C.* 2009, 27;120-139.
21. Shigenaga MK, Ames BN. Assay for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 1991, 10;211-216.
22. Fitzgerald SP, Campbell JJ, Lamont JV. The establishment of reference ranges for selenium. The selenoenzyme glutathione peroxidase and the metalloenzyme superoxide dismutase in blood fractions. The fifth international symposium on selenium biology and medicine. Tennessee, USA, 1992, pp20-23.
23. Pleban PA, Munyani A, Beachum J. Determination of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes. *Clin Chem.* 1982, 28;311-316.
24. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984, 105;121-126.
25. Nandhini ATA, Thirunavukkarasu V, Ravihandran MK, Anuradha CV. Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. *Singapore Med J.* 2005, 46(2);82-87.
26. Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin Chem.* 1995, 41;1135-1138.
27. Motchnik PA, Frei B, Ames BN. Measurement of antioxidants in human blood plasma. *Methods Enzymol.* 1994, 234;269-279.
28. Brent JA, Rumack HH. Role of free radicals in toxic hepatic injury. I. Free radical biochemistry. *Clin Tox.* 1993, 31;139-171.
29. Vinson J, Hsu C, Possanza C, Drack A, Pane D, Davis R, Klock C, Graser K, Wang X. Lipid peroxidation and diabetic complications: effect of antioxidant vitamins C

and E. *Adv Exp Med Biol.* 1994, 366;430-432.

30. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Basım, Yayım ve Dağıtım A.Ş., Konya, 1995.
31. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 2000, 62;649-671.
32. Baker H, Frank O, De Angelis B, Feingold S. Plasma tocopherol in man at various times after ingesting free or acetylated tocopherol. *Nutr Rep Int.* 1980, 21;531-536.
33. Roe JH, Kuether CA. Determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-DNPH derivative of dehydro ascorbic acid. *J Biol Chem.* 1943, 47;399-407.
34. Sugiyama M. Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. *Cell Biology and Toxicology.* 1994, 10;1-22.
35. Feuerstein M, Schlemmer G, Kraus B. The simultaneous GFAAS determination of various elements at ultratrace levels in ultrapure acids and photoresist stripper solutions. *Atomic Spectroscopy.* 1998, 19;1;1-5.
36. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin's phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193;265-275.
37. Liu J, Yeo HC, Övervik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chu DW, Brooks GA, Ames BN. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol.* 2000, 89;21-28.
38. Ay H, Topal T, Uysal B, Özler M, Öter Ş, Korkmaz A, Dündar K. Time-dependent course of hyperbaric oxygen-induced oxidative effects in rat lung and erythrocytes. *Clin and Exp Pharm and Phys.* 2007, 34;787-791.
39. Matsunami T, Sato Y, Sato T, Yukawa M. Antioxidant status and lipid peroxidation in diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Physiol Res.* 2010, 59;97-104.
40. Srinivasan M, Ram Sudheer A, Raveendran Pillai K, Raghu Kumar P, Sudhakaran PR, Menon VP. Influence of ferulic acid on  $\gamma$ -radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes. *Toxicology.* 2006, 228;249-258.
41. Doğru-Abbasoğlu S, Balkan J, Kanbağlı Ö, Çevikbaş U, Aykaç-Toker G, Uysal M. Aminoguanidin ve N-asetilsisteinin endotoksemik sirozlu sıçanlarda karaciğer hasarı, oksidatif ve nitrozatif stres üzerine etkisi. *Kocatepe Tıp Dergisi.* 2004, 5;Ek sayı;27-32.
42. Shanthakumari D, Srinivasalu S, Subramanian S. Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidation status in experimental rats. *Toxicology.* 2004, 204; 219-228.