

## Ölçüm Yöntemleri

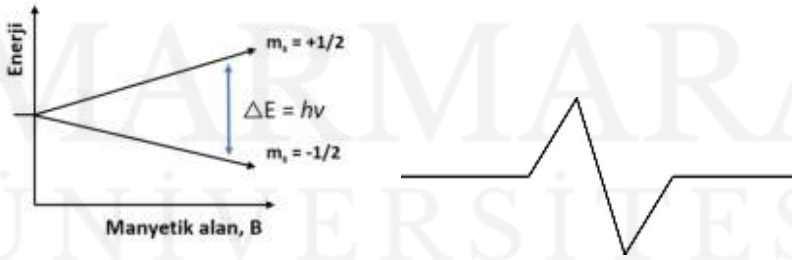
Ülkügül Güven\*  
A. Süha Yalçın\*

Serbest radikallerin hastalıkların patogenezindeki rollerinin aydınlatılmasıyla birlikte, bu bileşikleri ve katıldıkları reaksiyonları ölçen yöntemlere olan ilgi artmıştır. Serbest radikallerin doğrudan ölçümü zordur. Elektron spin rezonans veya elektron paramanyetik rezonans (ESR/EPR) spektroskopisi bu yapıları doğrudan tespit edebilen sınırlı yöntemlerden biridir. Ancak, araştırmacıların karşılaştığı en büyük sorun, serbest radikallerin aşırı derecede reaktif olması, buna bağlı olarak oluşum kaynaklarıyla hızlıca reaksiyona girmesi ve çok kısa ömürlü olmasıdır. Bu nedenlerle, pek çok araştırmacı serbest radikallerin doğrudan ölçümü yerine, hücresel bileşenlere (lipitler, proteinler ve DNA gibi) olan etkileri üzerinden serbest radikal reaksiyonlarını takip etmeyi tercih etmiştir. Bu amaçla geliştirilmiş çok sayıda yöntem vardır. Bu yöntemler ile dolaylı olarak serbest radikallerin başlattığı süreçler ve sonrasında oluşan son ürünlerin ölçümü gerçekleştirilir. Öte yandan, oksijenli yaşamla birlikte aerobik organizmalarda oksijen kaynaklı radikaller oluşmaya başlamıştır. Bununla hemen hemen eş zamanlı olarak da oluşan radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere, antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidan seviyelerindeki düşüşler oksidasyon ürünlerinin daha fazla oluşumuna ve oksidatif strese neden olmaktadır. Dolayısıyla, biyolojik materyallerde antioksidan savunma kapasitesinin ölçülmesi de oksidatif strese bağlı hasarın belirlenmesi açısından önemlidir. Antioksidanlar çeşitli yöntemlerle ölçülebilmektedir. Bu yöntemler arasında süperoksit dismutaz ve katalaz gibi reaktif türleri uzaklaştıran enzimlerin ve reaktif türlerin oluşumunu kontrol eden ajanların ölçümü bulunmaktadır. Bu bölümde serbest radikal ölçüm yöntemlerinden bazıları ele alınacaktır.

\* Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

## Elektron paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopisi

Elektron paramanyetik rezonans veya elektron spin rezonans (EPR/ESR) spektroskopisi, eşleşmemiş elektronları belirlemek için kullanılan bir yöntemdir.<sup>1</sup> En önemli özelliği, tahrip edici olmaması ve doğrudan ölçüm yapılabilmesidir. Yöntemin temelinde manyetik rezonans kavramı yatar. Sabit bir manyetik alanda manyetik momentlerin her biri birer mıknatıs gibi davranır ve elektronların sahip oldukları spin değerlerine göre mümkün olan enerji seviyelerine yarıma gözlenir. Her elektronun bir manyetik momenti ve bileşenlerinin  $m_s = +1/2$  ve  $m_s = -1/2$  olmak üzere bir spin kuantum numarası vardır. Manyetik bir alanda, serbest elektronlar manyetik alana paralel (düşük enerjili) veya anti-paralel (yüksek enerjili) dönüşleriyle dizilidir. Bir serbest radikal manyetik alana maruz bırakıldığında, kendisini bu alana paralel veya anti-paralel olarak hizalar. Böylece manyetik alanın gücüne göre değişkenlik gösteren iki farklı enerji seviyesi yaratılır. Manyetik alan içerisindeki elektron farklı bir elektromanyetik radyasyon (mikrodalga) ile uyarılıp yeterli enerji absorpladığı zaman düşük ve yüksek enerji durumları arasında bir geçiş meydana gelir. Bu geçiş için gerekli enerji ( $h\nu$ ) olarak ifade edilir. Bu şekilde elektromanyetik spektrumun mikrodalga bölgesinde bir EPR spektrumu elde edilir. EPR spektrumları absorpsiyon eğrisi olarak ya da bu eğrinin birinci türevi olarak çizilebilir (Şekil 1). EPR sinyalinin yoğunluğu serbest radikallerin konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğundan, serbest radikallerin hem nicel (kantitatif) hem de nitel (kalitatif) ölçümü mümkündür.



Şekil 1. Enerji diyagramı ile birinci türev spektrumu

EPR Spektroskopisi ölçüm sistemi dört ana bileşenden oluşmaktadır. Bunlar manyetik alan oluşmasını ve düzenlenmesini sağlayan bir mıknatıs, elektromanyetik radyasyon kaynağı ve mikrodalga gücünü kontrol etmek için gerekli detektör içeren bir mikrodalga destek sistemi, mikrodalga enerjilerinin yönetildiği

1 Spasojević, I. (2011). Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 48(3), 114-142.

ve örneklerin yerleştirildiği bir numune boşluğu, veri işleme ve görüntüleme sistemidir.



Şekil 2. EPR Spektroskopisi ölçüm sistemi<sup>2</sup>

Reaktif türler çok düşük konsantrasyonlarda bulunduğundan, bu moleküllerin saptanması oldukça zordur. Serbest radikallerin oda sıcaklığında bulunan çözeltilerde doğrudan belirlenmesi ancak “spin tuzaklama” veya “spin etiketleme” adı verilen teknikler ile gerçekleştirilebilir.<sup>3, 4</sup> Spin tuzaklama tekniği kısa ömürlü serbest radikallerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Temelde iki çeşit spin tuzağı vardır: Nitrone grubu içerenler, nitrose grubu içerenler. Spin tuzaklarının çoğu suda ve polar organik çözücülerde çözünür. Serbest radikalleri yakalayıp reaksiyona girdiklerinde karakteristik, aşırı ince yapı yarılmaları meydana getirirler. Bu durum radikallerin tanımlanmasına yardımcı olur. Spin tuzakları, kısa ömürlü ve kararsız olan bir serbest radikalden, daha uzun ömürlü ve kararlı bir radikal üretmektedir. Böylece, oluşan yeni radikal EPR spektroskopisi tarafından kolaylıkla tespit edilebilir. Nitrose spin tuzakları kısa ömürlü reaktif moleküller ile reaksiyona girdiklerinde hem daha kararlı hem de nispeten daha uzun ömürlü nitroksit radikallerini oluşturur. Nitrone spin tuzakları da benzer şekilde nitroksit radikallerini oluşturmaktadır.

Nitrose spin tuzaklarında, radikaller doğrudan azot tarafından tuzaklanırken, nitrone spin tuzaklarında radikaller azota komşu olan karbon tarafından tuzaklanır. Nitrose spin tuzakları ile

- 2 Wikipedia. (25.09.2022). *Electron paramagnetic resonance*. Retrieved 24.10.2022 from [https://en.wikipedia.org/wiki/Electron\\_paramagnetic\\_resonance](https://en.wikipedia.org/wiki/Electron_paramagnetic_resonance).
- 3 Haywood, R. (2013). Spin-Trapping: Theory and Applications. In G. C. K. Roberts (Ed.), *Encyclopedia of Biophysics* (pp. 2447-2453). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6\\_579](https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_579).
- 4 Torricella, F., Pierro, A., Mileo, E., Belle, V., & Bonucci, A. (2021). Nitroxide spin labels and EPR spectroscopy: A powerful association for protein dynamics studies. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, 1869(7), 140653.

tutulmuş radikaller EPR spektrumunu kolayca etkileyebilir. Nitron tuzaklarında ise hangi radikal tuzaklanırsa tuzaklansın, spektrumlar benzerlik gösterebilir. Nitrose bileşikleri nitrone bileşiklerinden daha az kararlı yapıda olan nitroksit radikallerini verirler. Özellikle oksijen merkezli radikaller tuzaklandığında oluşan bileşikler hücreler için toksiktir. Bu yüzden nitrone spin tutucuları tercih edilir. Yaygın olarak kullanılan örnekler 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksit (DMPO), alfa-fenil N-tersiyer-bütil nitrone (PBN) ve 5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-n-oksit DEPMPO'dur. Bunlar süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ) ve hidroksil ( $OH^{\bullet}$ ) radikallerinin doğrudan tayininde sıklıkla kullanılırlar. Ancak, DMPO spin tuzağının önemli bir dezavantajı vardır. DMPO ile reaksiyona giren  $O_2^{\bullet-}$  ve  $OH^{\bullet}$  radikallerinin hız sabitleri ve yarılanma süreleri birbirinden farklıdır. Bu iki radikalın konsantrasyonunun eşit olduğu bir çözeltinin içerisine DMPO spin tuzağı eklendiğinde, hidroksil radikali süperoksit radikalinden çok daha hızlı hapsolür. Süperoksit ile oluşan ürün (DMPO-OOH) kararsız bir radikaldir. DMPO spin tuzağının hidroksil radikali ile reaksiyonu sonrasında üretilen aynı ürün olan DMPO-OH bileşiğine ayrışır. Bu nedenle süperoksit radikalının tayininde yanlıgı söz konusu olabilmektedir. Bu potansiyel dezavantaj, fosforlanmış ve karboksillenmiş bir spin tuzağı olan DEPMPO'nun geliştirilmesi ile aşılmıştır. DEPMPO spin tuzağı ile daha kararlı ve hidroksil eklentilerine ayrışmayan radikaller oluşmaktadır.

Nitroksit serbest radikallerini kullanarak ortam hakkında bilgi sahibi olma yöntemine spin etiketleme (*spin labeling*) ve bu amaçla kullanılan radikallere de spin etiketi denmektedir. Spin etiketleri, farklı bir molekül ile bağlanabilme özelliği olan eşleşmemiş bir elektrona sahip ve kararlı nitroksit radikalleridir. Nitroksit radikalindeki eşleşmemiş elektronun manyetik rezonans sinyali EPR spektroskopisi ile tespit edilebilmektedir. Spin etiketlemesi özellikle proteinlerin ve biyolojik membranların araştırılmasında kullanılan önemli bir tekniktir. Spin etiketleri beş veya altı üyeli hibrid halkalardan meydana gelir. Yaygın olarak kullanılan spin etiketleri farklı R gruplarına sahip olan piperidinden türetilmiştir: 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloksi, 2,2,6,6-tetrametilpiperidin 1-oksil (TEMPO, R=H), 2,2,6,6,-tetrametil-4-piperidon-1-oksil (TEMPO, R=oxo), 4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin 1-oksil (TEMPOL, R=OH) ve 4-amino-2,2,6,6-tetrametil piperidin-1-oksil (4-amino-TEMPO, R=NH<sub>2</sub>). Diğer spin etiketleri olan 3 - karbamoil-2,2,5,5-tetra-metil-3-pirolin-1-iloksi (CTPO) ve (1-oksil-2,2,5,5-tetrametil-Δ<sup>3</sup>-pirolin-3 - metil) metansiyosülfonat ise yine farklı R gruplarına sahip prolidin yapısından türetilmiştir.

## Hidroksil radikali ölçüm yöntemleri

Canlı ortamlarda hidroksil radikal üretimi önemlidir ve bu amaçla kullanılacak yöntemlere çok ihtiyaç vardır. Aromatik hidroksilasyon yönteminde aromatik bir bileşik olan benzenin hidroksil radikali ile reaksiyona girmesi sonucunda önce hidroksisikloheksadienil oluşur.<sup>5</sup> Oluşan bu radikal önce dimerizasyona uğrar ve ardından H<sub>2</sub>O açığa çıkararak bifenile dönüşür. Alternatif olarak da bir fenol ve benzen karışımı vermek üzere orantısızlaştırma reaksiyonuna girebilir. Hidroksilasyon ürünlerinin belirlenmesinde gaz-sıvı kromatografisi ayırım sonrasında, ya bir elektron yakalama detektörü (ECD) ile veya kütle spektroskopisi (MS) ile birleştirilerek kullanılabilir. Ancak, bu yöntem ürünlerin uçucu bir materyale dönüştürülmesini gerektirdiğinden ürün kaybına neden olabilmektedir. Bu nedenle, hidroksilasyon ürünlerinin ölçümünde daha yaygın olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmaktadır. Biyolojik sistemlerde ise ölçüm için toksik olmayan bir aromatik belirtece ihtiyaç duyulur. Salisilat (2-hidroksibenzoat) ve fenilalanin bu amaçla kullanılan aromatik bileşiklerdir. Hidroksil radikalının salisilat üzerine saldırmasıyla, dekarboksilasyon ürünü olan katekol ile birlikte iki adet dihidroksillenmiş ürün (2,3 - ve 2,5-dihidroksibenzoat) üretilir. Salisilat için alternatif olan fenilalanin ise orto, meta ve para-tirozinleri vermek üzere hidroksillenmektedir.

Hidroksil radikalının ölçümünde kullanılan diğer yöntemler şunlardır:<sup>6</sup>

- **Benzoat floresansı:** Benzoatın hidroksil radikali ile reaksiyona girmesi sonucunda floresans veren 3 - ve 4-hidroksibenzoatlar oluşur.
- **Dimetilsülfoksit (DMSO) yöntemi:** Hidroksil radikalleri DMSO ile reaksiyona girdiğinde metan gazı ve formaldehit açığa çıkar. Bu ürünler gaz kromatografisi kullanılarak tayin edilebilir.
- **Kumarin floresansı:** Kumarin-3-karboksilik asitin hidroksillenmesi sonucunda floresan bir ürün oluşur. Bu molekül biyomoleküllere kovalent olarak bağlandığında, oluşan floresans değişiklikleri aracılığıyla çevresindeki hidroksil radikal üretimi ölçülebilmektedir.

5 Halliwell, B., Grootveld, M., & Gutteridge, J. M. (1988). Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biomedical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. *Methods of Biochemical Analysis*, 33, 59-90. <https://doi.org/10.1002/978.047.0110546.ch2>.

6 Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, USA.

- **Triptofan ile reaksiyon:** Triptofanın hidroksil radikali ile reaksiyonu karakteristik ürünler oluşturmaktadır. Triptofan singlet oksijen ile de reaksiyona girebilir, fakat bu reaksiyon sonucunda oluşan ürünler hidroksilasyon ürünlerinden ayrıdır.

## Süperoksit radikalinin ölçümü

Süperoksit radikali enerji metabolizması ile ilişkili oksidasyonlarda, bazı oksidazların aktiviteleri sırasında, flavoenzimler aracılığı ile ve indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucunda oluşur. Hücrelerin büyümesini, farklılaşmasını, yer değiştirmesini ve çoğalmasını düzenleyen önemli bir aracı moleküldür. Biyolojik önemi nedeniyle süperoksit radikalinin ölçümü için birçok yöntem geliştirilmiştir.<sup>7</sup>

- Hidroksilamin spin problemleri çok sayıda araştırmacı tarafından süperoksit ölçümünde başarıyla kullanılmıştır. Hidroksilamin spin problemlerinin süperoksit radikali ile reaksiyonu, spin yakalamadan iki kat daha hızlıdır ve oluşan nitroksitler spin eklentilerinden çok daha kararlıdır. Çok az miktarda siklik hidroksilamin spin problemleri eklenen hücrelerde bile güçlü EPR sinyalleri elde edilmiştir. Ayrıca dihidroetidyum (DHE) ve lusigenin gibi floresan problemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Hidroksilamin spin problemlerinin süperoksit ile oksidasyonu SOD ile tamamen bastırılabilir, SOD ile özgül olmayan oksidasyonların ayrılması sağlanabilir.<sup>8</sup>
- Süperoksit radikali, sitokrom c veya nitroblue tetrazolium (NBT) indirgeme kabiliyeti ile de ölçülebilir.



- Birçok madde sitokrom c'yi indirgeyebilme özelliğine sahiptir. Doku ekstraktlarında sitokrom c'yi indirgeyebilen askorbat ve GSH gibi bileşiklerin yanı sıra, enzimatik olarak da indirgeyen hücresel redüktazlar bulunur. Bu nedenle reaksiyonun  $\text{O}_2^{\bullet-}$  için özgüllüğünün, sitokrom c indirgenmesinin SOD ile inhibisyonunun derecesi belirlenerek gösterilmesi gereklidir.

7 Dasgupta, A., & Klein, K. (2014). Chapter 2 – Methods for Measuring Oxidative Stress in the Laboratory. In A. Dasgupta & K. Klein (Eds.), *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements* (pp. 19-40). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405872-9.00002-1>.

8 Scheinok, S., Leveque, P., Sonveaux, P., Driesschaert, B., & Gallez, B. (2018). Comparison of different methods for measuring the superoxide radical by EPR spectroscopy in buffer, cell lysates and cells. *Free Radical Research*, 52(10), 1182-1196.



hidrojen donörlerinin oluşturduğu floresan ürünlerdeki artış ile belirlenir. Spektrofotometrik ölçümlerde de aynı prensibi kullanan tetrametilbenzidin veya fenol kırmızısının oksidasyonu gerçekleşir.

- HRP yöntemiyle  $H_2O_2$  ölçümünde dikkat edilmesi gereken bazı hususlar vardır. Öncelikle bazı fenoller, tiyoller ve C vitamini dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik madde, HRP için substrat olarak işlev yapabilir. Reaksiyon karışımının HRP için substrat olabilecek, onunla rekabet edebilecek ve dışarıdan bir inhibisyona neden olabilecek bileşikleri içerip içermediği mutlaka kontrol edilmelidir. İkinci olarak, HRP ile substratın rekabetinde endojen katalaz kullanılabilir. Üçüncüsü, *scopoletin* ve homovanillik asitin bulunduğu ortamlarda floresan sinyallerin hücre ve doku bileşenleri tarafından söndürülmesi,  $H_2O_2$ 'in olduğundan fazla tahmin edilmesine yol açabilir. HRP bazlı analizler tipik olarak hücre dışı  $H_2O_2$  üretimini ölçmek için kullanılmaktadır, çünkü HRP hücrelere giremez.
- Hidrojen peroksit üretimindeki spesifikliği kontrol etmek için sıklıkla katalaz enzimi kullanılır. Hidrojen peroksitin katalaz-bağımlı metabolizmasında oluşan ara kompleks stabildir. Bu kompleksin kararlı durumu 660-640 nm'de çift dalga boyu spektrofotometrisi ile takip edilebilir. Katalazın bir peroksidaz gibi davranma yeteneği de vardır, katalaz  $H_2O_2$  kullanarak  $^{14}C$ -işaretli metanolü formaldehite oksitleyebilir. Aminotriazol tarafından katalazın inaktivasyonunun derecesi de hücrelerde ve organlarda  $H_2O_2$  üretimini hesaplamak için kullanılmaktadır.
- Hidrojen peroksit için histokimyasal boyama yöntemleri de geliştirilmiştir. Bunlar dokudaki peroksidazların  $H_2O_2$  varlığında DAB (3,3-diaminobenzidin) gibi substratları oksitleme yeteneğine dayanmaktadır. Hidrojen peroksitin varlığını tespit eden elektrotlar vardır, ancak biyolojik örneklerdeki indirgeyici ajanların varlığı nedeniyle nadiren kullanılmaktadır.
- Hidrojen peroksit için bazı protein belirteçleri geliştirilmiş olup bunlar hücrelerde  $H_2O_2$  üretim bölgelerini ve  $H_2O_2$ 'in nasıl yayıldığını görüntülemek için kullanılmaktadır.<sup>11</sup> Örneğin, HyPer,  $H_2O_2$ 'e özgü oxyR geni bazlı bir protein sensörüdür. Sarı bir floresan protein (cpYFP), *E. Coli*'de oxyR'nin  $H_2O_2$  algılayıcı bölgesine eklenir. Ortamda  $H_2O_2$

11 Lyublinskaya, O., & Antunes, F. (2019). Measuring intracellular concentration of hydrogen peroxide with the use of genetically encoded H2O2 biosensor HyPer. *Redox Biology* 24, 101200.

mevcut olduğunda, eksitasyon ve emisyon spektrumları OxyR'nin oksidasyonundan kaynaklı HyPer'de konformasyonel değişikliklere neden olur.<sup>12</sup> HyPer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için spesifik bir belirteçtir. Ancak floresansı pH'dan etkilenebilmektedir. Benzer bir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> belirteci maya kaynaklı tiyol peroksidaz olan Orp1'in roGFP2 ile birleştirilmesiyle üretilmiştir.

## Nitrik oksit ölçümü

Nitrik oksit renksiz ve toksik bir gazdır. Serbest radikal yapısındadır ve yarı ömrü 20-30 saniyedir. Birçok hastalıkla ilişkilendirildiğinden varlığının belirlenmesi ve miktarının tayin edilmesi önemlidir. Çok düşük miktarlarda oluşması ve hızlıca moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi dışında, sulu ortamda bir elektron transferi ile önce nitrosonyum katyonuna (NO<sup>+</sup>) sonra da nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) dönüşür.



Nitrik oksit N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oluşturmak üzere oksitlenebilir. Ayrıca ONOO<sup>-</sup> oluşturmak üzere O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ile reaksiyona girebilir. Bu reaktif azot türlerinin tümü, çeşitli şekillerde gerçekleştirilen NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ölçümlerine etki edebilir. Örneğin aerobik koşullar altında NO'nin oksidasyonu NO<sub>2</sub><sup>-</sup> oluştururken, ONOO<sup>-</sup> parçalanması nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) üretecektir. Bu yüzden biyolojik sistemlerde üretilen toplam NO miktarını belirlemek üzere hem NO<sub>2</sub><sup>-</sup> hem de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ölçümü yapılmalıdır.<sup>13</sup>

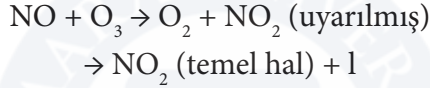
Nitrik oksitin doğrudan ya da dolaylı ölçümü için geliştirilen çok sayıda yöntem vardır. NO veya türevleri ile oluşturulan spin tuzakları, çeşitli boyalar, farklı metal kompleksleri ve ozonla reaksiyonu içeren tuzaklama yöntemleri önde gelen yöntemlerdendir.<sup>14</sup>

- **Hemoglobin oksidasyonu:** Bu yöntem, oksihemoglobin (HbO<sub>2</sub>) ile NO'nun reaksiyona girmesi ve sonrasında methemoglobin (metHb) ile nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) oluşmasına dayanır. Yöntemin doğruluğunu etkileyen birkaç kritik unsur vardır. İlk olarak, deney sonuçları hemoglobin konsantrasyonundaki değişimlerden etkilenebilir. İkincisi, metHb oluşumunun NO ile ilişkilendirilebilmesi için ortamda diğer oksidanların olmaması gerekir. Üçüncüsü, ölçüm sırasında ortamın pH'sı

- 
- 12 Chen, H., Xu, G., Zhao, Y., Tian, B., Lu, H., Yu, X., Xu, Z., Ying, N., Hu, S., & Hua, Y. (2008). A novel OxyR sensor and regulator of hydrogen peroxide stress with one cysteine residue in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS one*, 3(2), e1602.
  - 13 Hunter, R. A., Storm, W. L., Coneski, P. N., & Schoenfisch, M. H. (2013). Inaccuracies of nitric oxide measurement methods in biological media. *Analytical Chemistry*, 85(3), 1957-1963.
  - 14 Bryan, N. S., & Grisham, M. B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(5), 645-657.

sabit kalmalıdır. Çünkü metHb'nin absorpsiyon spektrumu pH'ya bağımlıdır, deney sonuçları pH dalgalanmalarından etkilenebilir.

- **Işık emisyonu:** Bu yöntem, NO'nun ozon (O<sub>3</sub>) ile reaksiyona girmesi sonucunda oluşan ve yayılan ışığın spektroskopik olarak incelenmesine dayanmaktadır. Yüksek derecede hassas dedektöre sahip NO analizörünün kullanıldığı bir direkt ölçüm yöntemidir. Hassas bir yöntem olmakla birlikte sadece gaz fazındaki NO ölçümleri için kullanılır. Yöntemde önce NO ile O<sub>3</sub> reaksiyona girer ve uyarılmış fazdaki azot dioksiti (NO<sub>2</sub>) oluşturur. Oluşan NO<sub>2</sub> temel hal fazına döndükçe ortama ışık yayılır.



- **Griess reaksiyonu:** Yöntemde NO oksidasyon ürünü olan nitrit, Griess reaktifleri olan sülfanilamit ve N-(1-naftil)-etilendiamin hidroklorür (NED) ile etkileşir. Oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak ölçülür. Yöntemin temeli asidik ortamda nitritin primer bir aromatik amin olan sülfanilamit ile diazotizasyonu ve NED ile mor renkli bir azo ürün oluşturması esasına dayanmaktadır. NO oksidasyon ürünlerinin toplamının ölçümü için NADH bağımlı nitrat redüktaz enzimi etkisiyle nitratın (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) indirgenmesi gereklidir.

## Peroksinitrit ölçümü

Reaktif azot türlerinden nitrik oksit ve peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) vücudun normal metabolik reaksiyonları sırasında çok az miktarlarda üretilir. NO ile süperoksit radikali bir araya geldiğinde hızlı bir reaksiyon sonucu ONOO<sup>-</sup> oluşur. Hem nitrik oksitin hem de süperoksitin arttığı ve özellikle SOD aktivitesinin düşük olduğu durumlarda, ONOO<sup>-</sup> belirgin olarak artar. Peroksinitritin proteinlere doğrudan zararlı etkileri vardır. Tirozin kalıntılarında nitro grubu ekleyerek 3-nitrotirozini oluşturur. Peroksinitritin dekompozisyonuyla azot dioksit ve hidroksil radikali oluşur. Oluşan tüm bu ürünler lipit peroksidasyonuna ve hücre hasarına yol açarlar.<sup>15</sup>

- **Dihidrorodamin oksidasyonu:** Hücreler ve dokular tarafından üretilen ONOO<sup>-</sup> birkaç farklı reaktif kullanılarak değerlendirilmektedir. Bunlardan biri dihidrorodamin-123'tür. Dihidrorodamin fagositer hücrelerde mitokondriye

15 Szabó, C., Ischiropoulos, H., & Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(8), 662-680.



## Singlet oksijen ölçümü

Singlet oksijen ( $^1O_2$ ), yapısında eşleşmemiş elektron bulundurmadığı için radikal yapısında değildir. Ancak yine de son derece reaktif bir molekülüdür. Delta ve sigma olmak üzere iki çeşidi vardır. Delta formu, sigma formuna göre daha uzun ömürlüdür. Singlet oksijen birkaç yolla oluşur: a) moleküler oksijenin ( $O_2$ ) elektronlarından birinin dışarıdan bir enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesiyle, b) süperoksit radikalının dismutasyonu, c) hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda. Singlet oksijen serbest radikal reaksiyonlarının başlatabildiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının bir ürünü de olabilir.

Biyolojik sistemlerde singlet oksijen tutucuları sıklıkla kullanılmaktadır.<sup>17</sup> Bunlardan başlıcaları 1,4-diazobisiklo-(2,2,2)-oktan (DABCO), difenilzobenzofuran, histidin ve bazı azid bileşikleridir. Singlet oksijenden floresan endoperoksit oluşturmak için kullanılan bir tuzak molekül 9,10-difenilamantrasen veya suda çözünür türevleridir. Endoperoksitlerin ayrışması singlet oksijen kaynağı da olabilir. Örneğin, 2,2,6,6-tetrametilpiperidin (TEMP) ve 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidon (TEMPD) gibi bazı spin tuzakları, singlet oksijen ile reaksiyona girince nitroksitlere dönüşür. Bunlar da  $^1O_2$  ölçümünde kullanılabilirler. Singlet oksijen için önemli bir başka ölçüm yöntemi singlet oksijen yeşil sensörüdür. Güçlü bir yeşil floresana sahip endoperoksit vermek üzere reaksiyona girer ve ticari olarak temin edilebilir. Ancak bu sensör singlet oksijen reaksiyon ürünlerinin oluşumuna neden olabileceğinden dikkatli kullanılmalıdır.

## Kemilüminesans ve floresans görüntüleme

Daha önce de belirtildiği gibi reaktif türlerin ölçümü için çok sayıda yöntem geliştirilmiş olmakla birlikte bunların doğrudan ve *in vivo* ölçümleri zordur. Hem kararsız hem de genellikle çok kısa ömürlü olan serbest radikaller EPR spektroskopisi ile tespit edilebilmektedir. Bu yöntemde alkoksil veya peroksil radikalleri gibi kısa ömürlü radikallerin ölçümünün düşük sıcaklıklarda yapılması gerekmektedir. Bu ise *in vivo* kullanımı sınırlayan bir durumdur. Reaktif türlerin indirekt ölçüm yöntemlerinden biri olan kemilüminesans sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Kemilüminesans vermek üzere yaygın olarak kullanılan belirteçlerden önde gelenler 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindion ve 3-aminoftalik hidrazid (luminol) ile

17 Fatima, K., Masood, N., & Luqman, S. (2016). Quenching of singlet oxygen by natural and synthetic antioxidants and assessment of electronic UV/Visible absorption spectra for alleviating or enhancing the efficacy of photodynamic therapy. *Biomedical Research and Therapy*, 3(2), 1-14.

N,N'-dimetil-9,9'-biakridinyum dinitrat (lusigenin) bileşikleridir. Bunlardan luminol hücre içinde  $H_2O_2$  varlığında deoksijenasyona uğrar, lusigenin ise hücre dışında süperoksit anyonu tarafından oksitlenir. Luminol nispeten daha iyi bir belirteçtir ve süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi farklı reaktif türler ile reaksiyona girer. Hem hücre içi hem de hücre dışı serbest radikalleri ölçebilir ve hızlı ölçüm yapılmasını sağlar. Son yıllarda kemilüminesans ölçümleri için yeni ve değişik problemler geliştirilmiştir.<sup>18</sup>

- Reaktif türleri görüntülemek üzere çeşitli yüksek çözünürlüklü floresan yöntemler de denenmiştir. Bunlardan en umut verici ikisi TP-FRIM (*Two Photon Fluorescence Ratio Imaging Microscopy*) ve TP-FLIM (*Two Photon Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) teknikleridir. Bu iki cihazın etkinliği ve kullanılan floresan boyalar sayesinde reaktif türlerin spesifik olarak hücre içi görüntülenmesi ve ölçümü mümkün olmuştur. TP-FRIM'de absorpsiyon veya emisyon spektrumu, bileşiğin redoks durumuna göre farklı duyarlılıktadır. Emisyon veya uyarma spektrumundaki bir dalga boyu aralığı, seçilen başka bir aralığa göre daha az duyarlı veya zıt yönde duyarlı olabilirken, TP-FLIM'de tek dalga boyu uzunluğunda uyarma ile belirtecin floresansının bozunma hızındaki farklılıkların ölçümü bileşiklerin redoks durumunun saptanmasına izin vermektedir.
- Floresans veren proteinler hücrel redoks durumunun görüntülenmesinde de kullanılmıştır. Bu proteinlerde iki amino asit kalıntısı disülfid bağı oluşturabilen sisteinle değiştirilmiştir. Redoks görüntüleme için kullanılan belirteçlere örnek olarak roGFPs (*redox oxidation-sensitive green fluorescent proteins*) ve cpYFP (*mt-circularly permutated yellow fluorescent protein*) ile  $H_2O_2$  ölçümünde kullanılan HyPer verilebilir.
- Mitokondriyal elektron taşınım sistemi hücrel reaktif oksijen türevi üretiminin ana yeridir. Buradaki redoks homeostazının sağlanmasında önemli bir rol oynayan süperoksitin görüntülenmesinde cpYFP kullanılmıştır. Yapılan kapsamlı *in vitro* karakterizasyon testlerinde, ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından üretilen süperoksit yanıt olarak cpYFP emisyonunda birkaç kat artış olduğu görülmüştür. Buna karşılık probun  $H_2O_2$ , HONO,  $Ca^{2+}$ , ATP, ADP, NAD(P)<sup>+</sup> ve NAD(P)H gibi birçok oksidan moleküle karşı duyarlı olmadığı

18 Maulucci, G., Bačić, G., Bridal, L., Schmidt, H. H., Tavitian, B., Viel, T., Utsumi, H., Yalçın, A. S., & De Spirito, M. (2016). Imaging reactive oxygen species-induced modifications in living systems. *Antioxidants and Redox Signaling*, 24(16), 939-958.

gösterilmiştir. Bir diğer belirteç HyPer bir prokaryotik  $H_2O_2$  sensörü olan OxyR'nin düzenleyici bir bölgesine bağlandığında sadece  $H_2O_2$  tarafından oksitlenebilir. Böylece nanomolar düzeydeki  $H_2O_2$  *in vitro* ortamda tespit edebilmektedir. HyPer hücrelerde eksprese edildiğinde, dışarıdan eklenen mikromolar  $H_2O_2$  veya büyüme faktörü uyarılarına yanıt olarak, hücre içi  $H_2O_2$  değişikliklerini belirleyebilmektedir. Hidrojen peroksitin değişen konsantrasyon aralığını ve reaksiyon kinetiğini gözlemek amacıyla HyPer mutantları da geliştirilmiştir. HyPer-2 dinamik konsantrasyon aralığını iki kat genişletmiştir. Ancak verdiği yanıt çok yavaştır. Son zamanlarda geliştirilen HyPer-3 sensörü, HyPer-2 ile karşılaştırıldığında daha hızlı oksidasyon azaltma kinetiği göstermiştir.

### Kemogenetik uygulamaları

Kemogenetik terimi rekombinant bir proteinin aktivitesinin hücre içinde dinamik olarak düzenlenebilmesini sağlayan, ya da bir proteinin spesifik biyokimyasal uyarısını (örneğin bir reseptör ligandı veya bir enzim substratı) kısıtlayan deneysel sistemleri tanımlamak için kullanılır. *In vivo* kemogenetik yaklaşımların birçok özelliği ışık kullanan genetik yöntemler ile ortaktır. Kemogenetik yöntemlerde hedef proteinin geri dönüşümlü modülasyonu ışık yerine bir kimyasal ajan aracılığı ile elde edilir. Hedef proteinin veya ligandının ya da her ikisinin birden, kimyasal veya genetik olarak tasarlanması gerekir. İlk kemogenetik yaklaşımlarda, endojen moleküller yerine spesifik sentetik ligandlara yanıt verebilecek şekilde modifiye edilmiş rekombinant reseptörler kullanılmıştır. Redoks sistemlere özgü kemogenetik yaklaşımlarda ise reseptörden ziyade enzimlerden yararlanılmaktadır.<sup>19</sup> Enzime dayalı redoks kemogenetiğine bir örnek olarak maya D-amino asit oksidazı (DAAO) verilebilir. Hücre içi  $H_2O_2$  üretimini incelemek için kullanılan DAAO'ya dayalı kemogenetik sistemde, enzim aracılığıyla D-amino asitlerin keto asitlere oksidasyonu katalizlenirken  $H_2O_2$  üretimi de takip edilmektedir.

### Canlı hücrelerde reaktif türlerin ölçümü

Başlangıçta  $H_2O_2$  için spesifik bir floresan belirteç olarak kullanılan 2,7-diklorodihidrofloresin'in (DCFH)  $HO^\bullet$ ,  $ROO^\bullet$ ,  $^\bullet NO$  ve  $ONOO^-$  gibi diğer reaktif türler tarafından da oksitlendiği gösterilmiştir. DCFH'nin diasetat formu (DCFH-DA) hücre zarında

19 Sorrentino, A., Eroglu, E., & Michel, T. (2020). Chapter 7 – In vivo applications of chemogenetics in redox (patho)biology. In H. Sies (Ed.), *Oxidative Stress* (pp. 97-112). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818606-0.00007-9>.



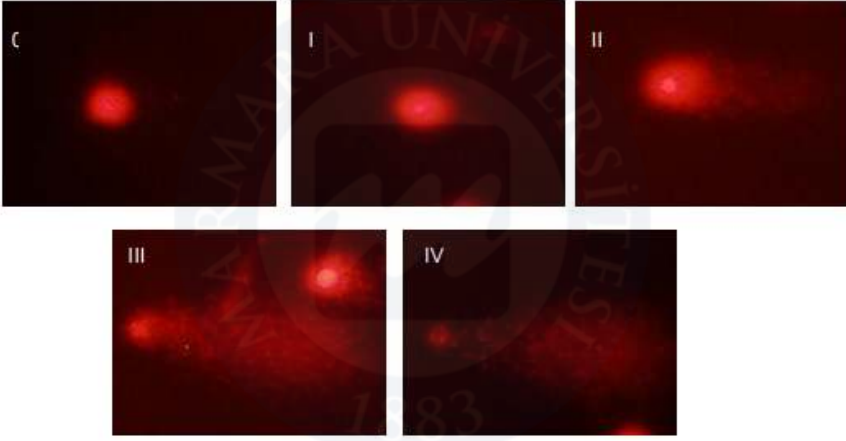
(8-OHdG) dir. DNA'da, OH<sup>•</sup>, CO<sub>3</sub><sup>•-</sup> ve bazı RO<sub>2</sub><sup>•</sup> radikalleri de dahil olmak üzere birçok reaktif tür tarafından oluşturulur. 8-OHdG kalıntıları vücuttaki enzimatik onarım sistemleri tarafından DNA'dan çıkarılabilir. Daha sonra kan dolaşımına geçer oradan da idrarla atılır. Bu nedenle, kanda veya idrardaki 8-OHdG seviyeleri, oksidatif DNA hasarının bir belirteci olarak ölçülebilir. Ölçümü sıklıkla bir elektrokimyasal dedektör (ECD) ile birleştirilmiş HPLC ile gerçekleşir. HPLC-ECD yöntemi, hassas bir yöntem olmasına rağmen maliyeti nedeniyle çok uygun değildir. Daha iyi bir yaklaşım sıvı veya gaz kromatografisine bağlı kütle spektrometresi yöntemleri ile birden fazla ürünü ölçmektir. Kütle spektrometrisi, çeşitli ürünleri ayırt etmenin yanı sıra, baz-baz ve baz-amino asit çapraz bağlantıları gibi diğer lezyonları da tespit edebilir. DNA hasarını ölçmek için kullanılan yöntemler arasında enzime bağlı immünosorban analizi (ELISA) ve immünohistokimyasal analizler yer alır.

DNA hasarını belirlemek için kullanılan diğer alternatif yöntemler şunlardır:

- **(<sup>3</sup>H) işaretli timidin katılması:** Hücreler, nükleer DNA'ya dahil edilen radyoaktif timidin ile inkübe edilir. Üretilen radyoaktif parçalar ölçülür. Sadece DNA öncülerini birleştirebilen hücreler için yararlı bir yöntemdir.
- **BrdU (5-bromo-2'-deoksiuridin) katılması:** Radyoaktif olmayan (<sup>3</sup>H) timidine alternatif bir yöntemdir. BrdU içeren antikolar DNA'ya karşı kullanılarak oluşan DNA fragmentleri tespit edilir.
- **Enzimatik etiketleme:** DNA iplikçiklerinin kırılmasıyla oluşan serbest OH grupları terminal deoksinükleotidil transferaz enzimi (TdT) gibi enzimlerin varlığında modifiye edilmiş nükleotidlerle işaretlenir. Eklenen bu modifiye edilmiş nükleotidler florimetrik olarak ya da antikor kullanılarak saptanır. Popüler bir yöntem olan bu teknik TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labelling) olarak adlandırılır.
- **Tek hücreli jel elektroforezi (Comet testi):** Hücre düzeyinde DNA hasarını saptamak ve miktarını belirlemek için uygulanan non-invaziv, hızlı ve hassas bir floresan mikroskop yöntemidir. Canlı dokulardan izole edilen çekirdek içindeki DNA, ince bir agaroz jel içine fikse edilir ve elektroforetik ortamda yürütülür. Çeşitli ajanlar tarafından hasarlanan DNA tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş, tek veya çift DNA zincirlerinde kırılmalar oluşmuş ise farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip kırılmış DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. DNA molekülleri ethidium bromür gibi DNA'ya spesifik boyalarla boyanıp floresan mikroskop altında incelendiğinde

hasarın derecesine göre dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluşturur.

- **Aldehit reaktif belirteç (ARP; N'-amino oksimetilkarbonilhidrazino-D-biyotin):** ARP, aldehit grupları ile hasarlı DNA'nın apuridik/apirimidinik (AP) bölgelerinin açık halka formlarıyla reaksiyona girer. ARP reaktifi ilave edildikten sonra AP bölgeleri, biyotin ile etiketlenir ve peroksidaz veya alkalın fosfataz konjugatları kullanılarak kolorimetrik saptama gerçekleştirilir.



Şekil 3. Tek hücre jel elektroforez yöntemi ile görüntülenen hasara uğramış DNA yapıları<sup>23</sup>

## Lipit peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu, hücre zarlarının fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA), lipit hidroperoksitleri (LOOH) oluşturmak üzere oksijen ile reaksiyona girdiği karmaşık bir süreçtir. Reaksiyon, bir hidrojen atomunun bir PUFA'dan reaktif bir serbest radikal tarafından koparılması, ardından ilerleyen reaksiyonların serbest radikal zincir mekanizması yoluyla gerçekleşir. Oluşan LOOH ve konjüge dienler daha sonra alkanal, alkenal, hidroksialkenal, malondialdehit (MDA) ve uçucu hidrokarbonlar gibi çok sayıda başka ürün oluşturmak üzere ayrışabilir. Lipit peroksidasyonunu ölçmek için çok sayıda analitik teknik geliştirilmiştir, ancak yöntemlerin hepsi *in vivo* koşulda geçerli değildir.<sup>24</sup>

23 Dikilitaş, M., & Koçyiğit, A. (2010). Canlılarda "tek hücre jel elektroforez" yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 14(2), 77-89.

24 Devasagayam, T. P., Bloor, K. K., & Ramasarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 40(5), 300-308.

- Lipit peroksidasyonunun başlangıç moleküler ürünleri LOOH'lerdir. Bunlar plazmada çeşitli tekniklerle ölçülebilir. LOOH'lerin prostaglandin endoperoksit sentazın aktivasyonu ile katalize edilen siklooksijenaz reaksiyonunu başlatma yeteneğine dayalı hassas ve spesifik bir analiz yönteminde bir oksijen elektrodu kullanılır. Plazma LOOH'ini ölçmek için bir başka hassas yöntem gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC/MS) ise LOOH'in trifenilfosfin ile hidroksi asitlere indirgenmesini içerir. LOOH'in bir hem bileşiği ile reaksiyonuna dayanan spektrofotometrik yöntemde ölçülen metilen mavidir. Ayrıca, belirli veya farklı LOOH sınıflarını ayırt edebilen çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan bir tanesi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile çeşitli hidroperoksitlerin lipit sınıfına göre ayrılmasına ve luminol veya izoluminol varlığında parçalanması sırasında üretilen kemilüminesansın ölçülmesine dayanır.
- LOOH, 234 nm civarında karakteristik UV emilimi olan bir konjuge dien yapısına sahiptir. Bu absorbansın ölçümü, saf lipit sistemlerinde ve deney hayvanlarından elde edilen doku çalışmalarında bir peroksidasyon indeksi olarak son derece yararlıdır. Biyolojik maddelerdeki konjuge dienleri ölçmede zorluklar vardır. Çünkü mevcut diğer maddelerin birçoğu (örneğin hem proteinleri gibi) UV'de güçlü bir şekilde emilerek yüksek bir kirlilik (*background*) oluşturur. Konjuge dienlerin kloroform/metanol gibi organik bir çözücü ile ekstre edilmesiyle kısmen ortadan kaldırılır. Nispeten düşük seviyelerde konjuge dienlerle ölçüm daha karmaşıktır. İkinci bir türev spektroskopi yöntemi, daha fazla hassasiyet sağlar, çünkü sıradan spektrumda görünen konjuge dien, daha kolay ölçülebilen keskin bir minimum tepe noktasına dönüşür.
- Tiyobarbitürik asit (TBA) testi biyolojik numunelerde lipit peroksidasyonunun ve serbest radikal aktivitesinin bir göstergesi olarak kullanılan en popüler ve en kolay yöntemdir. Bu yöntem TBA'nın lipit peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile reaksiyonuna dayanmaktadır. TBA testi ile ilişkili problemleri en aza indirmek için, MDA-TBA eklentisi HPLC ve GC-MS ile ölçülebilir, ancak bu zaman alıcıdır.
- Lipit peroksidasyonu sırasında çok sayıda farklı aldehid türevi üretilir. Bunlar biyolojik aktiviteleri ve hasara neden olma yetenekleri bakımından büyük farklılıklar gösterir. Aldehitler dinitrofenil hidrazin (DNPH) ile türetilir, farklı polariteye sahip olan çeşitli sınıfları (örn. alkanallar, hidroksialkenaller, alkenaller) ince tabaka kromatografisi (TLC) ile ayrıştırılır. Bu teknikler son derece zaman alıcıdır ve oldukça pahalıdır. Sitotoksisite açısından 4-hidroksinonenal (HNE) gibi

hidroksialkenaller lipit peroksidasyon sürecinin en önemli son ürünleridir. HNE, UV dedektörlü HPLC veya daha hassas bir yöntem olan GC-MS ile ölçülebilir.

Lipit peroksidasyonundan sonra çeşitli floresan ürünler de ortaya çıkabilir. MDA aminoiminopropen Schiff bazları gibi floresan yapıları üretmek için proteinlerdeki birincil amino gruplarını çapraz bağlar. Floresans veren aldehit-protein eklentileri aldehitlerin polimerizasyonu yoluyla da üretilebilir. Bir floresan bileşik olan lipofusin de lipitlerin oksidatif yıkımının son ürünüdür.

### Protein oksidasyonu

Proteinlerdeki oksidatif hasar, lipit peroksidasyonundan çok daha az incelenmiştir. Nedeni çok sayıda farklı protein hedefinin ve nispeten yüksek sayıda farklı amino asit kalıntısının olmasıdır. Serbest radikaller proteinlerin amino asit kalıntılarını kolaylıkla modifiye edebilir, çapraz bağlanmaya, konformasyonel değişikliklere ve fonksiyon kaybına yol açabilir. Oksidatif olarak hasar görmüş proteinlerin proteazlar tarafından hızla uzaklaştırılması da mümkündür. Proteinlerdeki oksidatif hasarın ölçümü için kullanılan yöntemlerden biri serbest radikallerin amino yan grupları ile reaksiyonundan kaynaklanan karbonil grubu ölçümüdür.<sup>25</sup> Dinitrofenilhidrazin (DNPH) protein karbonilleri ile reaksiyona girerek spektrofotometrik olarak analiz edilebilen dinitrofenilhidrazon ürünlerini oluşturur. Oksidatif olarak modifiye edilmiş proteinlerin karbonil içeriği, dinitrofenilhidrazin (DNPH) türevlerinin tayini ile ölçülebilir. Alternatif olarak, protein karbonilleri ELISA, 2D jel elektroforezi ve Western blot yöntemleri ile de tayin edilebilmektedir.<sup>26</sup>

### Antioksidan kapasite ölçüm yöntemleri

Organizmadaki antioksidan savunma sistemlerinin durumunu ve bazı koşullarda yetersizliğini araştırmak için biyolojik sıvılarda çeşitli antioksidanların aktivite veya konsantrasyonları ölçülmektedir. Ancak antioksidan sistemdeki değişiklikler her zaman oksidatif hasara işaret etmeyebilir; savunma mekanizmalarının reaktif türleri ortadan kaldırdığını ve sistemi koruduğunu da gösterebilir. Biyolojik sıvıların antioksidan kapasitesini ölçmek için bugüne kadar çok sayıda yöntem geliştirilmiştir.<sup>27</sup> Bu yöntemlerde, antioksidan aktivite

25 Reznick, A. Z., & Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, 233, 357-363. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33041-7).

26 Alomari, E., Bruno, S., Ronda, L., Paredi, G., Bettati, S., & Mozzarelli, A. (2018). Protein carbonylation detection methods: A comparison. *Data in Brief*, 19, 2215-2220. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.06.088>.

27 Albayrak, S., Sağdıç, O., & Aksoy, A. (2010). Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 26(4), 401-409.

reaksiyon kinetiği ile ilişkilendirilerek ölçülürken, antioksidan kapasite reaksiyon termodinamiği ile ölçülmektedir. Kullanılan yöntemler değişik kaynaklarda canlı dışı ve canlı içi, enzimsel ve enzimsel olmayan veya direkt ve indirekt olarak sınıflandırılmış olup en yaygın kabul gören sınıflandırma şekli hidrojen atomu transferi temelli ve elektron transferi temelli analiz yöntemleridir.<sup>28</sup> Hidrojen atomu transferi temelli yöntemlerin çoğu azo bileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmacı reaksiyonlardır. Elektron transferi temelli yöntemler ise antioksidanın oksidantı indirgenme yeteneğini renk değişimi ile ölçer. Genelde hidrojen atomu transferi temelli reaksiyonlar çözücü ve pH etkisinden kısmi olarak bağımsız ve çok kısa bir sürede gerçekleşir. Elektron transferi temelli reaksiyonlar ise çözücü ve pH'ya bağlı olarak daha yavaştır.

- **ORAC (Oksijen radikali absorbans kapasitesi) yöntemi:** Gıdaların ve diğer kimyasal maddelerin antioksidan gücünü ölçmek için kullanılacak bir analizdir. Bu yöntem, serbest radikal oluşumuna ve serbest radikal tutucularının varlığında floresans şiddetindeki azalmanın ölçülmesine dayanır. Hedef molekül olarak beta-fikoenon ya da floresen kullanılmaktadır. Bu yöntemde standart olarak suda çözünür E vitamini analogu olan Trolox kullanılır. ORAC değeri ne kadar yüksek olursa, örneğin antioksidan gücü o kadar fazla olmaktadır.
- **TRAP (toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametresi) yöntemi:** Bir vücut sıvısı, sıvıdaki bazı antioksidanlarla reaksiyona giren ve peroksil radikallerini oluşturan AAPH (2,2-azobis(2-amidopropan dihidroklorür)) ile inkübe edilir. Antioksidanlar tükendiğinde  $RO_2^{\bullet}$  radikalleri peroksidasyona neden olmak üzere lipitlere saldırır. Yöntem lipit peroksidasyonu esnasında oksijen tüketiminin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Peroksidasyonun başlamasından önceki gecikme süresini  $O_2$  tüketimi ile ölçer. Bilinen bir antioksidanla kalibre edilerek TRAP değeri elde edilir.
- **ABTS yöntemi:** Bu yöntemde mavi-yeşil bir kromofor olan ABTS (2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) kullanılır. Antioksidanlar ABTS'yi indirgeyerek rengin şiddetini azaltır.
- **DPPH yöntemi:** Yöntemde 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) molekülüne antioksidan tarafından bir proton transfer

28 Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 652-664.

edilir. Serbest elektronun molekül üzerinde delokalizasyonu sayesinde kararlı bir serbest radikal oluşur. Elektronun delokalizasyonu 517 nm'deki absorbansın ölçümüyle belirlenir. DPPH çözeltisi antioksidan içeren çözeltiyle karıştırıldığında mor rengin kaybı gözlenir.

- **FRAP (ferrik indirgeyici antioksidan güç) yöntemi:** Bu yöntem antioksidanların ferrik demiri indirgeme yeteneğini ölçer demirin ferröz formuna indirgenmesine dayanır. İndirgeme reaksiyonu 593 nm'de absorbans değişikliği ölçülerek belirlenir.
- **CUPRAC (Cu<sup>2+</sup> iyonu indirgeyici antioksidan kapasite):** Yöntemin temeli neokuproinin Cu<sup>2+</sup> ile oluşturduğu kompleksin 450 nm'de absorbans vermesine dayanmaktadır. Yöntemin en önemli özelliği hidrofilik antioksidanların yanında lipofilik antioksidanlara da uygulanabilmesidir.

MARMARA  
ÜNİVERSİTESİ