

OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ

Serbest radikaller, besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüştürülmesi sırasında meydana gelen kararsız ve reaktif moleküllerdir. Serbest radikal hasarına karşı koymak üzere mevcut antioksidanlar kullanılabilecek durumda değilse, veya radikal oluşumu baş edilemeyecek kadar fazla ise, oksidan-antioksidan dengesi oksidanlar lehine bozulur ve **Oksidatif Stres** ortaya çıkar. Böylece yaşam için çok gerekli olan oksijen, aynı zamanda oksitleyici maddeler olan serbest radikalleri meydana getirerek çevredeki tüm makromoleküllere hasara verir. Başlıcaları lipitler, proteinler ve nükleik asitlerdir. Lipit peroksidasyonu lipit hidroperoksitleri ve aldehitlerin (örn. MDA), protein oksidasyonu protein karbonillerinin, DNA oksidasyonu da modifiye nükleotidlerin (örn. 8-OHdG) oluşumuna yol açar.

LİPİT PEROKSİTLERİ VE MALONDİALDEHİT

Oksidatif stres ve serbest radikaller özellikle lipitlerde hasara neden olur. Yağ asitlerinin oksidasyonu reaktif bir radikal tarafından yağ asitlerinin metilen gruplarından bir hidrojen atomunun koparılması ile başlar. Karbon merkezli radikal oluşması ve daha sonra moleküler oksijenin bağlanması ile lipit hidroperoksitleri meydana gelir. Lipit hidroperoksitleri, lipit peroksidasyonunun erken aşamasını oluşturur. Lipit hidroperoksitlerinin yıkımı ile ise biyoaktif aldehitler oluşur. Bunlardan başlıcaları malondialdehit (MDA) ve hidroksialkenaller (örn. 4-OH-nonenal)'dir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilir, ya da diffüze olarak diğer hücrelerde hasar yaratırlar. Aerobik bir ortamda gerek metabolizma reaksiyonları sırasında, gerekse dış etkenlere bağlı olarak meydana gelen oksijen kaynaklı radikaller, lipoproteinlerde ve hücre zarında bulunan lipitlerde (çoklu doymamış yağ asitleri, PUFA) oksidasyona neden olur. Lipit hidroperoksitleri ile nihai yıkım ürünü olan düşük molekül ağırlıklı MDA lipit peroksidasyonunun indeksi olarak kabul edilir. MDA'nın aldehit gruplarıyla ile tiyobarbitürik asit arasındaki reaksiyon sonucu oluşan renkli ürün 545 nm'de absorban verir. Lipit hidroperoksitleri asidik ortamda Fe⁺⁺ iyonunu, Fe⁺⁺⁺ iyonuna oksitler. Fe⁺⁺⁺ iyonunun *xylene orange* ile reaksiyona girerek oluşturduğu renk de 560 nm dalga boyunda okunur.

PROTEİN KARBONİLLERİ

Oksidatif stresin proteinlerde neden olduğu oksidasyon sonrası peroksit ve protein karbonilleri meydana gelir. Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme dereceleri amino asit içerikleri ile ilişkilidir. Doymamış bağlar ve -SH içeren moleküller ile triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi amino asitleri ihtiva eden proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenir. İmmüoglobulinler gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerde oksidasyon sonucu kükürt merkezli radikaller meydana gelir ve proteinin üç boyutlu yapısı bozularak normal fonksiyonunu yerine getiremez.

Polipeptit yapısında yer alan bazı amino asitlerin α -karbon atomlarından, reaktif oksijen molekülleri, özellikle de hidroksil radikali etkisiyle hidrojen atomunun koparılması sonucu karbon merkezli radikaller oluşur. İlerleyen reaksiyonlarda şu yapısal değişiklikler meydana gelir:

- Aromatik amino asitlerin nitratlaşması
- Tiyol grubunun oksidasyonu
- Karbonil türevlerine dönüşüm

Proteinlerde ikincil ve üçüncül yapının bozulması, proteolize yatkınlık, agregasyon ve fonksiyonlarda azalma hücrelerin zarar görmesini engeller. Oksidan maddelerin etkisiyle proteinlerde oluşan karbonil gruplarının 2,4- dinitrofenilhidrazin ile reaksiyonu sonrası oluşan 2,4-dinitrofenilhidrazon düzeyi kolorimetrik olarak saptanır.

DNA HASARI

DNA, reaktif oksijen molekülleri tarafından oksidatif hasara uğradığı zaman, hasar ürünü olarak modifiye nükleotidler (örn. 8-OH-dG) oluşur.

Bu ürün hücrelerden ve dokulardan elde edilen DNA materyallerinde, serumda ve idrarda ölçülebilen bir oksidatif stres belirtecidir. Serbest oksijen radikalleri, kanser oluşumunda bir aracı görevi görürler ve mutajenez, karsinogenez ve hücre ölümüne yol açan DNA zincir kırılmalarından sorumludurlar. Sitotoksiste, nükleik asit baz modifikasyonundan doğan kromozom değişikliklerine ve DNA bozukluklarına bağlıdır. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla reaksiyona girerek DNA yapısında değişikliklere yol açar. Aktif nötrofillerde oluşan hidrojen peroksit (H₂O₂), zarlardan geçip çekirdeğe ulaşır ve DNA hasarına, hatta ölüme yol açar. 8-OH-dG immünojenik yöntemle ölçülebilmektedir.

Oksidatif stres parametreleri ile ilgili ayrıntılı bilgi almak için info@oksante.com.tr adresine e-posta ile başvurabilirsiniz.

HİDROJEN PEROKSİT (H₂O₂)

Hidrojen peroksitin bir oksidatif stres belirteci olduğu uzun süreden beri bilinmektedir. Diyabette ve çeşitli malignansilerde yüksek miktarda reaktif oksijen radikallerinin meydana geldiği bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Kendisi dayanıklı bir bileşik olan H₂O₂, zararlı etkisini hidroksil radikaline dönüşerek yapmaktadır. GSH-Px ve katalaz, H₂O₂'in hızla yıkımını sağlayarak birikmesini önlerler. Özellikle idrar H₂O₂ düzeyi, uzun yıllardan beri Ferric ion Oxidation Xylenol orange (FOX) metodu ile tayin edilmektedir.

GLUTATYON VE ANTIÖKSİDAN ENZİMLER

Glutasyon (GSH VE GSSG)

Organizmanın bütün hücrelerinde bulunan ve hücrelerin protein yapısı dışındaki sülfidril grubu içeriğinin % 90 kadarını oluşturan glutasyon (GSH), zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli rollere sahiptir. GSH radikal kaynaklı hasara karşı koyarken antioksidan enzimlere substrat olarak görev yapar ve bir radikal tutucusu (scavenger) gibi davranır. Özellikle peroksidad ve redüktaz enzimlerinin aktiviteleri için son derece önemlidir. GSSG de indirgenmiş glutasyonun (GSH) yükseltgenmesiyle oluşur. Oksidatif stres sürecinde, GSH düzeyi azalırken, GSSG artar. Bu durumda biriken H₂O₂ ve organik hidroperoksitler glutasyon peroksidad ve redüktaz etkisiyle ortadan kaldırılırlar. Bu bileşiğin aktif bir şekilde hücre dışına çıkarılması GSH tükenmesine yol açmaktadır. GSH, hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini de engeller. Proteinlerdeki -SH gruplarının redükte halde kalmasını sağlar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. GSH tayininde metafosforik asitle deproteinize edilen örnekten alınan üst faz, fosfat tamponlu bir ortamda *orthophthalaldehyde* ile reaksiyona girer ve oluşan floresans okunur. GSSG tayininde ise sülfhidril (-SH) gruplarının oksidasyonunu önlemek için N-etilmaleimid ile işlem yapılır.

Glutasyon peroksidad (GSH-Px)

Tetramerik bir enzimdir. Sitolde bulunur, yapısında dört selenyum (Se) atomu yer alır. Hidrojen peroksit ile hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlar. Zar fosfolipitlerinden, fosfolipaz A2 tarafından salınan lipit hidroperoksitlere etki eder. Fagositik hücrelerde önemli bir fonksiyonu vardır. Solunum patlaması sırasında serbest radikal hasarı sonucu fagositikhücrelerin zarar görmesini engeller. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksit birikmesine ve hücre hasarına yol açar. GSH-Px, hem lipit peroksidadasyonunun başlamasını önler, hem de lipit peroksidadasyonu sonucu oluşan lipit hidroperoksitlerin metabolizmasını sağlar.

Glutasyon redüktaz (GSH-Red)

Bir flavoprotein olan glutasyon redüktaz, NADPH yardımıyla okside glutasyonun (GSSG), glutasyona indirgenmesini katalize eder. Glutasyonun indirgenmiş halde kalması bir çok antioksidan enzim aktivitesi için önemlidir. GSH-Px ve katalaz için büyük önem taşır, katalaz azaldığı zaman GSH bağımlı enzimler aktive olur. Ayrıca, Se düzeyindeki azalma GSH-Px ve glutasyon redüktaz düzeylerinde azalmaya neden olur. Glutasyon redüktaz eksikliği eritrositlerin H₂O₂'ye daha duyarlı hale gelmesine ve ozmotik frajilitede artışa yol açar.

Glutasyon transferaz (GSH-Tr)

Gerek organizmaya dışarıdan gelen, gerekse biyotransformasyon reaksiyonlarıyla oluşan zararlı bileşikler, ya etkili bir nükleofil olan glutasyon ile konjuge olur ya da GST tarafından katalizlenen bir dizi reaksiyonla suda çözünen merkaptürik asit türevlerine dönüşerek safra veya idrar yolu ile organizmadan uzaklaştırılırlar. Bir multienzim ailesi olan glutasyon transferazlar detoksifikasyon işleminden sorumludur. Alifatik heterosiklik radikaller, epoksitler ve birçok genotoksik ksenobiotiklerin GSH ile konjugasyonunu katalize ederler. Bu enzimler karsinojenik, polisiklik aromatik hidrokarbonları detoksifiye ederler, konjuge izotiyosiyanatları daha az reaktif ve suda çözülür ürünler haline getirirler. Ayrıca, başta araşidonik asit ve linoleik asit hidroperoksitler olmak üzere lipit hidroperoksitlere karşı selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar. Enzim aktivitesi substrat olarak kullanılan CDNB'nin GSH ile konjugasyonu sonucu oluşan ürünün dönüşüm hızı ölçülerek tayin edilir.

Katalaz

Peroksizomlarda ve sitozolde bulunan ve yapısında hem içeren bir protein olan katalaz, H₂O₂'in moleküler oksijen ve suya çevrilmesini katalizler. Katalaz metil hidroperoksit ve etil hidroperoksit gibi küçük moleküllerin indirgenmesini de sağlar, ancak büyük molekül ağırlıklı lipit hidroperoksitlere karşı etki göstermez.

Süperoksit dismutaz (SOD)

Aerobik tüm hücreler SOD içerirler. Hem sitozol, hem de mitokondrielerde bulunan bu enzim süperoksit radikallerini etkisizleştirerek, hücreleri süperoksit radikalının zararlı etkilerinden korur. Dokularda oksijen basıncının (pO₂) yükselmesi ile SOD aktivitesi artar. Enzim fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler olarak öldürülmesinde rol oynar ve granülosit fonksiyonu için önemlidir. İçeriğindeki metal iyonuna göre sitozolik dimerik Cu,Zn-SOD ve mitokondriyal tetramerik Mn-SOD olarak adlandırılır. Enzim aktivitesinin tayini, ksantin-ksantin oksidaz sisteminin oluşturduğu süperoksit radikallerinin *nitro blue tetrazolium (NBT)* iyonlarını indirgemesinin inhibisyonuna dayanmaktadır. Adı geçen radikallerin NBT'yi indirgemesi ile oluşan renkli formazan kompleksi spektrofotometrik olarak tayin edilir.

Oksidatif stres parametreleri ile ilgili ayrıntılı bilgi almak için info@oksante.com.tr adresine e-posta ile başvurabilirsiniz.