Nedim Numan ÇAĞAN

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ
ANABİLİM DALI

DOKU SERBEST RADİKAL DÜZEYİNİN ÖLÇÜMÜ İÇİN KULLANILAN 2', 7' DİKLOROFLORESİN DİASETAT (DCFH-DA)' IN DOKU İÇERMEYEN *İN VİTRO* BİR ORTAMDA KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

NEDİM NUMAN ÇAĞAN

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2021

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ
ANABİLİM DALI

DOKU SERBEST RADİKAL DÜZEYİNİN ÖLÇÜMÜ İÇİN KULLANILAN 2', 7' DİKLOROFLORESİN DİASETAT (DCFH-DA)' IN DOKU İÇERMEYEN *İN VİTRO* BİR ORTAMDA KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

NEDİM NUMAN ÇAĞAN

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY

BURSA-2021

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "Doku serbest radikal düzeyininin ölçümü için kullanılan 2', 7' - diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) probunun doku içermeyen *in vitro* bir ortamda kullanılabilirliğinin araştırılması" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Nedim Numan Çağan
Tarih ve İmza

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Nedim Numan Çağan tarafından hazırlanan Doku serbest radikal düzeyininin ölçümü için kullanılan 2', 7'- diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) probunun doku içermeyen *in vitro* bir ortamda kullanılabilirliğinin araştırılması konulu Yüksek Lisans tezi ……/……/……günü, ……-…… saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	**İmza**
Tez Danışmanı		
Üye		
Üye		
Üye		
Üye		

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ……. tarih ve ……. sayılı toplantısında alınan …… numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

...../...../.....

Adı Soyadı: Nedim Numan Çağan

Anabilim Dalı: Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: Doku serbest radikal düzeyininin ölçümü için kullanılan 2', 7'-diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) probunun doku içermeyen *in vitro* bir ortamda kullanılabilirliğinin araştırılması

ÖZELLİKLER	**UYGUNDUR**	**UYGUN DEĞİLDİR**	**AÇIKLAMA**
Tezin Boyutları	❑	❑	
Dış Kapak Sayfası	❑	❑	
İç Kapak Sayfası	❑	❑	
Kabul Onay Sayfası	❑	❑	
Sayfa Düzeni	❑	❑	
İçindekiler Sayfası	❑	❑	
Yazı Karakteri	❑	❑	
Satır Aralıkları	❑	❑	
Başlıklar	❑	❑	
Sayfa Numaraları	❑	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	❑	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	❑	❑	
Kaynaklar	❑	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Gökhan Göktalay

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak
İç Kapak
ETİK BEYANI..... II
KABUL ONAY III
TEZ KONTROL VE BEYAN FORMU..... IV
İÇİNDEKİLER..... V
TÜRKÇE ÖZET VII
İNGİLİZCE ÖZET..... VIII
1.GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER..... 3
2.1. Serbest Radikaller..... 3
2.1.1. Tanımı ve Tarihçesi..... 3
2.1.2. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları 4
2.1.3. Serbest Radikal Çeşitleri..... 4
2.2. Bazı Serbest Radikallerin Özellikleri 5
2.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)..... 5
2.2.2. Hidroksil Radikali ($OH^{\bullet}$)..... 6
2.2.3. Peroksil Radikali ($ROO^{\cdot}$) 6
2.2.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)..... 7
2.2.5. Singlet Oksijen ($^1O_2$) 7
2.2.6. Ozon (O_3)..... 8
2.2.7. Hipokloröz Asit (HOCl)..... 8
2.2.8. Nitrik Oksit ($NO^{\cdot}$)..... 8
2.2.9. Peroksinitrit ($OONO^-$)..... 9
2.3. Serbest Radikal Kaynakları..... 9
2.3.1. Endojen Kaynaklar..... 10
2.3.2. Eksojen Kaynaklar..... 10
2.4. Serbest Radikallerin Moleküler Hedefleri 11
2.4.1. Lipitler..... 11
2.4.2. Proteinler..... 12
2.4.3. Karbonhidratlar..... 13
2.4.4. Nükleik Asitler..... 13
2.4.4.1. DNA 13
2.4.4.2. RNA 14
2.5. Serbest Radikallerin Patolojik ve Fizyolojik Etkileri 14
2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri (Antioksidanlar) 15
2.6.1. Endojen Antioksidanlar..... 16
2.6.2. Eksojen Antioksidanlar..... 17
2.7. Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler 17
2.8. Antioksidan Aktiviteyi Belirleyen Kimyasal Testler..... 18
2.8.1.Hidrojen Atomunun Transferine Dayalı Testler (HAT)..... 19
2.8.2. Tek Elektron Transferine Dayalı Testler (SET) 19

2.8.3. Karma Testler 19
2.8.3.1 DPPH Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi 19
2.9. Biyolojik Sistemlerde Serbest Radikallerin Tespit Yöntemleri 21
2.9.1. Kemilüminesans Türevi Yöntemler 21
2.9.2. Kromotografik Yöntemler 22
2.9.3. Spektrofotometri Yöntemleri 22
2.9.4. Elektrokimyasal Biyosensörler 23
2.9.5. Elektron Spin Rezonans (ESR) 24
2.9.6. Floresan Protein Bazlı Yöntemler 24
2.9.7. Florimetrik Yöntemler (Floresan Probları) 24
2.9.7.1 DCFH-DA (2', 7'- diklorofloresin diasetat) 26
2.10. Anabilim Dalımızda Yapılan Çalışmalar 28
3. GEREÇ ve YÖNTEM 29
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları 29
3.2. Deney Prosedürü 29
3.3. İstatistiksel Analizler 30
4. BULGULAR 31
4.1. Ortam Koşullarına Bağlı Deneysel Bulgular 31
4.1.1. Konsantrasyonun Etkisi 31
4.1.2. İnkübasyon Ortamının Etkisi 31
4.1.3. Krebs İçeriğinde Bulunan Maddelerin Etkisi 32
4.1.4. $NaHCO_3$ Konsantrasyonunun Etkisi 34
4.1.5. Bikarbonat Etkisi 34
4.1.6. İnkübasyon Ortamındaki Oksijenin Etkisi 35
4.1.7. pH Etkisi 36
4.1.8. İnkübasyon Süresinin Etkisi 37
4.1.9. Sıcaklığın Etkisi 38
4.2. Bazı Antioksidanların Floresans Şiddeti Üzerine Etkisine İlişkin Deneysel Bulgular 38
4.2.1. Bazı Antioksidanların Krebste Görülen Floresans Şiddeti Üzerine Etkisi 38
4.2.2. Bazı Antioksidanların $NaHCO_3$ Çözeltisinde Görülen Floresans Şiddeti Üzerine Etkisi 40
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 41
6. KAYNAKLAR 47
7. SİMGELER ve KISALTMALAR 54
8. TEŞEKKÜR 55
9. ÖZGEÇMİŞ 56

TÜRKÇE ÖZET

Serbest radikallerin kararsız, kısa ömürlü ve reaktif yapıları nedeniyle biyolojik ve biyolojik olmayan ortamlarda tespit edilmeleri çok zordur. Floresan probları yüksek duyarlılığı, hücre zarından geçebilmeleri ve veri eldesindeki kolaylıkları nedeniyle reaktif türlerin tespitine yönelik en çok tercih edilen yöntemlerden biridir.

Daha önce anabilim dalımızda sıçan kortikal dilimleri kullanılarak yapılan bir çalışmada 2', 7'- diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) floresan bileşiği kullanılarak inkübasyon ortamında reaktif oksijen türleri (ROT) düzeyi ölçülürken beklenmedik bir şekilde bu probun doku içermeyen *in vitro* fizyolojik ortamda da floresan yoğunluğunda önemli artışa neden olduğu gözlemlenmişti. Bu sonuçtan hareketle yaptığımız çalışmada floresan şiddetindeki artışın olası mekanizması ve ortam koşullarına (konsantrasyon, pH, sıcaklık, süre vb.) bağlılığı test edildi. Daha sonra bazı antioksidan bileşiklerin floresan yoğunluğundaki artış üzerine etkisine bakılarak yöntemin *in vitro* kullanılabilirliği test edildi.

Hidrojen peroksit konsantrasyonuna bağlı floresan şiddetindeki artışın yeniden gözlenmesi sonrası; ortam pH' sının, oksijenin, sıcaklığın, inkübasyon süresinin ve inkübasyon ortamındaki maddelerin floresan şiddetini nasıl etkilediği test edildi. Ortam pH' sının bazikliğe kayması yanında, inkbasyon süresinin, oksijen varlığının floresans şiddetini arttırdığı gözlenirken, fizyolojik Krebs kompozisyonunda bulunan sodyum bikarbonatın gözlenen etkiden sorumlu olduğu saptandı. Diğer taraftan, inkübasyon ortamına eklenen bazı antioksidan bileşiklerin floresan şiddeti üzerine etkisi araştırılarak, yöntemin doku içermeyen *in vitro* koşullarda uygulanabilirliği test edildi.

Sonuç olarak, çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular a) esas itibari ile intrasellüler ortamdaki reaktif oksijen türlerinin saptanması amacı ile kullanılan DCFH-DA' nın doku içermeyen bir ortamda da kullanılabileceğini, b) ancak bunun inkübasyon koşulları ile yakından etkilendiği, c) dolayısıyla deneysel koşullarının standardize edilmesinin önemli olduğunu işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Serbest radikal, antioksidan, floresan, 2', 7'- diklorofloresin diasetat

İNGİLİZCE ÖZET

Investigation of the usability of the 2 ', 7'- dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe used for the measurement of tissue free radical level in a tissue-free in vitro environment.

Free radicals are very difficult to detect in biological and non-biological environments due to their unstable, short-lived and reactive nature. Fluorescent probes are one of the most preferred methods for the detection of reactive species due to their high sensitivity, ability to pass through the cell membrane and ease of data acquisition.

In a previous study in our department using rat cortical slices, 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent compound was used to measure the level of reactive oxygen species (ROT) in the incubation medium, but unexpectedly, this probe also showed fluorescence in the tissue-free in vitro physiological environment. A significant increase in density was observed. Based on this result, the possible mechanism of the increase in fluorescence intensity and its dependence on ambient conditions (concentration, pH, temperature, time, etc.) were tested. Then, the in vitro usability of the method was tested by looking at the effect of some antioxidant compounds on the increase in fluorescence intensity.

After re-observing the increase in fluorescence intensity depending on the hydrogen peroxide concentration; It was tested how the ambient pH, oxygen, temperature, incubation time and the fluorescence intensity of the substances in the incubation medium affected. While it was observed that the pH of the environment shifted to basicity, the incubation time and the presence of oxygen increased the fluorescence intensity, it was determined that sodium bicarbonate in the physiological Krebs composition was responsible for the observed effect. On the other hand, the effect of some antioxidant compounds added to the incubation medium on the fluorescence intensity was investigated, and the applicability of the method in tissue-free in vitro conditions was tested.

In conclusion, the findings of our study a) DCFH-DA, which is mainly used for the detection of reactive oxygen species in the intracellular environment, can also be used in a tissue-free environment, b) but it is closely affected by the incubation conditions, c) therefore, the experimental conditions indicates the importance of standardization.

Key words: Free radical, antioxidant, fluorescent, 2', 7'- dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)

1. GİRİŞ

Serbest radikaller dış orbitallerinde bir ya da daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran; bu yüzden oldukça reaktif, kısa ömürlü, kararsız atom veya moleküllerdir (Phaniendra, Jestadi, & Periyasamy, 2015). Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri olmak üzere ikiye ayrılan serbest radikaller vücudumuzda çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Düşük konsantrasyonlarda serbest radikallerin yararlı etkilerinden bahsedilirken, vücutta antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı yüksek konsantrasyonlara ulaştıklarında oksidatif ve nitrozasif stres durumuna neden olarak biyomoleküllerde hasar oluştururlar. Bunun sonucunda da normal hücre döngüsünü bozarak hücre ölümüne neden olabilirler. Yapılan çok sayıda çalışmada serbest radikallerin değişen konsantrasyonlarda farklı roller üstlenebildiği hatta radikallerin türüne, üretim yerine, bozunma ve difüzyon gibi özelliklerine bağlı olarak hücrelerde farklı şekilde davranabildiği bildirilmiştir (Zhang, Dai, & Yuan, 2018). Dolayısıyla serbest radikallerin etkilerini anlayabilmek için bunların doğru konumlarının tespit edilmesi ve konsantrasyonlarınının güvenilir bir şekilde ölçülmesi çok önemlidir. Reaktif türlerin kısa ömürlü olması, birbirleriyle etkileşmesi ve biyolojik sistemlerde endojen antioksidanların varlığı göz önünde bulundurulduğunda bu hedeflere ulaşmak kolay değildir. Günümüzde birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı düşünülen serbest radikallere olan ilgi giderek arttığından hem *in vitro* hem de *in vivo* sistemlerde reaktif türlerin ölçümü ve lokalizasyonu için farklı yöntemler uygulanmakta ve halen geliştirilmektedir. Oksidasyona duyarlı floresan problarının kullanıldığı floresansa dayalı yöntemler bunlardan biridir. Yüksek hassasiyeti ve veri eldesindeki kolaylığı bu yöntemi üstün kılmaktadır. Sık kullanılan floresan problarından birisi 2', 7'- diklorofloresin diasetat (DCFH-DA)' dır. Floresan olmayan bu prob hücresel esterazlar varlığında yine floresan olmayan DCFH (2', 7'- diklorofloresin) ara ürününe dönüşür. DCFH ortamdaki reaktif türlerle reaksiyona girerek floresan bir bileşik olan DCF (2', 7'- diklorofloresein)' ye dönüşür ve bunun sonucunda açığa çıkan floresan şiddeti spektroflorometrik olarak ölçülebilir. Bu probun biyolojik olmayan ortamda esterazlar olmadan düşük

seviyelerde de olsa kendiliğinden floresans oluşturabilidiğine dair çalışmalar mevcuttur (Kalinich, Ramakrishnan, & Mcclain, 1997).

Anabilim dalımızda daha önce sıçan kortikal dilimleri kullanılarak yapılan çalışmalar sırasında DCFH-DA kullanılarak inkübasyon ortamında reaktif oksijen türleri düzeyi ölçülürken, beklenmedik bir şekilde DCFH-DA' nın dilimsiz fizyolojik ortamda da hidrojen peroksit varlığında floresan yoğunluğunda önemli artışa neden olduğu gözlenmiştir (Demircan, Gül, & Büyükuysal, 2014). Yaptığımız çalışma bu sonuçtan hareketle söz konusu inkübasyon ortamında esteraz bulunmamasına rağmen krebste gözlenen ve hidrojen peroksit ile indüklenen floresan şiddetindeki artışın mekanizmasının aydınlatılmasını, ortam koşullarının (Konsantrasyon, pH, sıcaklık, süre vb.) bu artış üzerine etkisini görmeyi amaçlamaktadır. Öte yandan bazı antioksidan bileşiklerin bu artış üzerine etkisine bakılıp; yöntemin antioksidan kapasite ölçüm yöntemi olarak DPPH radikal süpürme kapasitesi yöntemine kıyasla *in vitro* kullanılabilirliğinin test edilmesi çalışmanın amaçları arasında yer almaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

2.1.1. Tanımı ve Tarihçesi

Serbest radikaller, dış yörüngesinde bir ya da daha fazla ortaklanmamış (eşlenmemiş) elektron içeren yüksek enerjili atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır. Eşlenmemiş elektron serbest radikali kararsız, kısa ömürlü ve oldukça reaktif kılmaktadır. Serbest radikaller yüksek reaktiviteleri nedeniyle stabiliteye ulaşmak için diğer bileşiklerden elektronları ayırarak yine bir serbest radikal oluşumuna neden olurlar ve sonuçta canlı hücrelere zarar veren zincir bir reaksiyonu başlatırlar (Phaniendra ve ark., 2015).

Serbest radikal kimyasının tarihi yaklaşık yüz yıl öncesine dayanmaktadır. Bir İngiliz kimyager olan Fenton' un 1894 yılında demir sülfat ve hidrojen peroksitin tartarik asidin oksidasyonuna neden olduğuna dair keşfi bu yolda atılan ilk adımdır. Bu reaksiyon şu anda canlı hücrelerdeki en zararlı endojen serbest radikal olarak bilinen hidroksil radikallerinin meydana geldiği Fenton reaksiyonunun temelini oluşturmaktadır (Fenton, 1876).

Michigan Üniversitesi' nde Kimya Profesörü Moses Gomberg 1900 yılında ilk kez canlı sistemde organik bir serbest radikal olan trifenil metil radikalinin varlığını keşfetmiştir (Gomberg, 1900). Daha sonra 1954 yılında Gershman, oksijen toksisitesinin serbest radikal oluşturma kabiliyetine bağlı olduğu oksijen toksisitesinin serbest radikal teorisini ortaya atmış (Gerschman, Gilbert, Nye, Dwyer, & Fenn, 1954); aynı yıl, Commoner tarafından elektron paramanyetik rezonans (EPR) çalışmaları ile biyolojik materyallerde serbest radikallerin varlığını ortaya koyan ilk kanıtlar elde edilmiştir (Commoner, Townsend, & Pake, 1954).

1956 yılında Denham Harman, serbest radikallerin yaşlanma sürecinde merkezi bir rol oynadığını belirten yaşlanmanın serbest radikal teorisini ortaya koymuştur (Harman, 1956). 1969 yılında Mc Cord ve Fridovich süperoksit anyonuna karşı enzimatik bir savunma sistemi olan süperoksit dismutaz (SOD) enzimini keşfetmiştir (McCord, & Fridovich, 1969). 1971 yılında Loschen reaktif

oksijen türlerinin hücresel metabolik solunumda üretildiğini keşfetmiştir (Loschen, & Flohe, 1971). 1977 yılında, hidroksil radikalinin, guanilat siklaz enzimini aktive ederek ikinci haberci olan siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşumunu indüklediği bildirilmiştir (Mittal, & Murad, 1977). Daha sonra 1989 yılında Hallliwell ve Gutteridge, reaktif oksijen türlerinin (ROT) hem serbest radikal hem de radikal olmayan oksijen türevlerini içerdiğini bildirmiştir (Halliwell, & Gutteridge, 1989).

2.1.2. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları

Serbest radikaller, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak başlıca 3 (üç) mekanizma ile oluşmaktadır (Kumar, & Salam, 2018).

1- Homolitik ayrılma ile radikal oluşumu: Normal bir molekülün kovalent bağının molekülün her bir parçasında bir ortaklanmamış elektron kalacak şekilde homolitik bölünmesidir. Yüksek sıcaklık ve elektromanyetik dalgalar homolitik ayrılma ile radikal oluşturabilir.

$$X{:}Y \longrightarrow X^{\bullet} + Y^{\bullet}$$

2- Normal bir molekülden tek bir elektron kaybıyla radikal oluşumu

$$X \longrightarrow X^{\bullet +} + e^{-}$$

3- Normal bir moleküle bir elektron eklenmesiyle radikal oluşumu

$$X + e^{-} \longrightarrow X^{\bullet -}$$

2.1.3. Serbest Radikal Çeşitleri

Serbest radikaller, oksijenden türeyen reaktif oksijen türleri (ROT) (Tablo-1) ve nitrojenden türeyen reaktif nitrojen türleri (RNT) (Tablo-2) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Phaniendra ve ark., 2015). Her iki grupta gerçek radikaller ile birlikte kendisi radikal olmayan ancak radikal oluşumuna yol açan türleri içermektedir (López-Jaén, Codoñer-Franch, & Valls-Bellés, 2013).

Biyolojik sistemlerde metabolik reaksiyonlar sırasında üretilen en önemli radikaller serbest oksijen radikalleridir. Yaşam için vazgeçilmez bir element olan oksijenin kendisi de taşımış olduğu ortaklanmamış iki elektrondan dolayı biradikal (diradikal) olarak değerlendirilmektedir.

Tablo 1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Radikaller	Non-radikaller
Süperoksit, $O_2^{\cdot -}$	Hidrojen Peroksit, H_2O_2
Hidroksil, $OH^{\cdot}$	Singlet Oksijen, $^1O_2$
Alkoksil, $RO^{\cdot}$	Ozon, O_3
Peroksil, $ROO^{\cdot}$	Hipokloröz asit, HOCl
	Hipobromöz asit, HOBr

Tablo 2. Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)

Radikaller	Nonradikaller
Nitrik Oksit, $NO^{\cdot}$	Peroksinitrit, $ONOO^-$
Nitrojen dioksit, $NO_2^{\cdot}$	Nitrosil katyon, NO^+
	Nitroksil anyon, NO^-
	Dinitrojen trioksit, N_2O_3
	Dinitrojen tetraoksit, N_2O_4
	Nitröz asit, HNO_2
	Peroksinitröz asit, ONOOH
	Nitril klorid, NO_2Cl

2.2. Bazı Serbest Radikallerin Özellikleri

2.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)

Süperoksit radikali 3(üç) farklı yolla meydana gelebilir.

1) Ksantin oksidaz, lipooksijenaz, siklooksijenaz ve NADPH bağımlı oksidaz (Enzimatik),
2) Otooksidasyon

$$O_2 + Fe^{+2} \longrightarrow Fe^{+3} + O_2^{\cdot -}$$

3) Moleküler oksijene bir elektron ilavesiyle (Non-enzimatik),

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot -}$$

Süperoksit radikali *in vivo* olarak çoğunlukla hücrenin mitokondrisinde ATP üretimi sırasında elektron transport zincirinde (ETZ) meydana gelir. Biyomoleküllerle reaktivitesi düşüktür. Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$) ve düşük pH' da hidroperoksil (HO_2) olmak üzere iki formda bulunur. Fizyolojik pH' da en çok bulunan formu süperoksit radikalidir. Hidroperoksil formu süperoksit' e kıyasla hücre zarındaki çift fosfolipit tabakaya daha kolay girebilir (Phaniendra ve ark., 2015). İndirgeyici ve oksitleyici ajan olarak davranabilir.

Süperoksit radikali başka bir süperoksit radikaliyle reaksiyona girdiğinde; birinin oksijene oksitlendiği diğerinin ise hidrojen peroksite indirgendiği bir dismutasyon reaksiyonu meydana gelir (Halliwell, & Gutteridge, 2006).

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \text{ (Dismutasyon)}$$

2.2.2. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)

Hidroksil radikali, hidroksit iyonunun nötr formu olup; yarılanma ömrü (10^{-9} ms) en kısa ve en reaktif serbest radikaldir. (Liochev, & Fridovich, 1994; López-Jaén ve ark., 2013) Yüksek reaktivitesi nedeniyle DNA, protein, lipit ve karbonhidratlar dahil olmak üzere hem organik hem de inorganik moleküller ile reaksiyona girebilir ve hücrelere diğer reaktif oksijen türlerinden daha şiddetli zarar verebilir (Halliwell, 1987). Hidroksil radikali; Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu olmak üzere iki biyokimyasal reaksiyon sonucunda oluşabilir (Fenton, 1876; Haber, & Weiss, 1934). Hidrojen peroksit; ferritin, seruloplazmin gibi proteinlerle kompleks oluşturan metal iyonları (Fe^{+2}, Cu^{+}) ile reaksiyona girerek Fenton Reaksiyonu sonucunda hidroksil radikalini oluşturur. Ayrıca stres koşulları altında aşırı süperoksit radikali ferritinden demiri salar ve serbest kalan demir hidroksil radikali oluşturmak için Fenton reaksiyonuna katılır (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010). Süperoksit radikali ile hidrojen peroksit arasındaki Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda da hidroksil radikali oluşur.

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + OH^{\cdot} + OH^- \text{ (Fenton Reaksiyonu)}$$
$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^{\cdot} + OH^- \text{ (Haber-Weiss Reaksiyonu)}$$

2.2.3. Peroksil Radikali ($ROO^{\cdot}$)

Genellikle hidroperoksil radikali veya perhidroksil radikali olarak adlandırılan peroksil radikalleri çoğu hidrokarbonun oksidasyonu sırasında oluşan reaktif ara ürünlerdir. Süperoksitin protonlanması ile oluşan perhidroksil ($HOO^{\cdot}$) radikali en basit formudur (Fittschen, 2019; Liebert, 2002).

$$RH + OH \longrightarrow R + H_2O$$
$$R + O_2 \longrightarrow RO_2$$

2.2.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Kimyasal açıdan zayıf bir reaktif olan hidrojen peroksit; kendisi bir serbest radikal olmayıp, biyolojik membranlara kolayca nüfuz ederek hidroksil radikalinin oluşmasında aracı bir rol oynayan reaktif oksijen türüdür. Ayrıca tek başına yüksek seviyelerde (50 μM üzerinde) sitotoksik etki gösterebilir (Halliwell, Clement, & Long, 2000). Süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalize edilen bir dismutasyon reaksiyonu sonucunda (Cheeseman, & Slater, 1993) veya bir oksijen molekülünün iki elektron tarafından doğrudan indirgenmesi gibi çeşitli yollardan oluşabilir. Ayrıca bazı enzim reaksiyonlarının ve kimyasal otooksidasyon reaksiyonlarının bir ürünü olarakta meydana gelebilir. Hücre içinde genellikle peroksizomlarda oluşurlar (Ifeanyi, 2018; López-Jaén ve ark., 2013).

$$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$
$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

2.2.5. Singlet Oksijen ($^1O_2$)

Ortaklanmamış elektronu bulunmayan, yani radikal olmayan bir reaktif oksijen türüdür. Paralel spin durumlu ortaklanmamış (eşlenmemiş) iki elektron içeren moleküler oksijenin elektronik olarak uyarılması sonucunda elektronlarından birinin kendi spininin tersi yönünde orbitalle yer değiştirmesi sonucunda meydana gelir. Delta ve sigma olmak üzere iki formda bulunur. DNA hasarına ve doku hasarına neden olabilen oldukça güçlü bir oksitleyici ajandır (Kanovasky, 1989; Sies, & Menck, 1992). 5 (beş) farklı yolla meydana gelebilir.

1) Işığa bağımlı reaksiyonlarda fotosensitizasyon sonucu,
2) Nötrofillerin ve eozinofillerin aktivasyonu,
3) Lipooksijenaz, Dioksijenaz ve Laktoperoksidaz gibi enzimlerin aktivitesi sonucu,
4) Hidrojen peroksitin; Hipokloröz asit, Peroksinitrit, Nitrik oksit ile oksidasyonu sonucu, ($HOCl + H_2O_2 \longrightarrow {}^1O_2 + H_2O + Cl^-$)
5) Endoperoksitlerin ($NDPO_2$) termal dekompozisyonu sonucunda oluşabilir (Agnez-Lima ve ark., 2012; Phaniendra ve ark., 2015).

2.2.6. Ozon (O_3)

Serbest radikal olmamasına rağmen biyolojik etkisini, biyomoleküllerin oksidasyonu veya peroksidasyonu yoluyla direkt veya serbest radikal oluşumu ile gösterir (Kelly, Mudway, Krishna, & Holgate, 1995). Lipit peroksidasyonuna neden olabilir. Proteinlerde ve nükleik asitlerde bulunan amin, alkol, aldehit ve sülfidril gibi farklı fonksiyonel grupları oksitleyebilir. Ayrıca Kromozomal sapmalara neden olabilir (Fetner, 1962).

2.2.7. Hipokloröz Asit (HOCl)

Nötrofillerin granüllerinde bulunan myeloperoksidaz enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyon sonucu hidrojen peroksit ve klorürden meydana gelen güçlü bir oksidandır (Winterbourn, & Kettle, 2000). Hipokloröz asit, hem oksidasyon hem de klorlama reaksiyonlarına katılan oldukça reaktif bir türdür. Tiyol, tiyoeter, askorbat, ürat, piridin nükleotidleri ve triptofan gibi bileşikleri oksitleyebilir. En önemli klorlama reaksiyonunu kloramin oluşumu ile sonuçlanan amin grupları ile gerçekleştirir. Ayrıca klorohidrin oluşumu için kolesterol ve doymamış lipitleri klorlayabilir (Prütz, 1996; Winterbourn, Berg, Roitman, & Kuypers, 1992).

$$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{\text{myeloperoksidaz}} HOCl + OH^-$$

2.2.8. Nitrik Oksit ($NO^{\cdot}$)

Nitrik oksit, hücre içi ve hücreler arası biyolojik haberci olarak işlev gören, kısa yarılanma ömürüne sahip küçük bir gaz molekülüdür. Hem lipofilik hem de suda çözünebilen Nitrik oksit molekülü plazma membranına ve sitoplazmaya kolayca difüze olur. NADPH ve oksijene bağımlı reaksiyon sonucunda, L-argininin L- sitrüline oksidasyonunu katalize eden Nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından birçok hücrede yan ürün olarak meydan gelir (Andrew, & Mayer, 1999; Budani, & Tiboni, 2021). Yüksek konsantrasyonlarda oksijen ve süperoksit radikaliyle reaksiyona girebilir ve peroksinitril gibi güçlü bir oksidan ajan oluşturarak hücre hasarına neden olabilir (Beckman, & Koppenol, 1996).

$$\text{L-Arginine} + O_2 + \text{NADPH} \xrightarrow{\text{NOS}} \text{L-Citrulline} + NO^{\cdot} + NADP^+$$

Nitrik oksit radikalinin oluşumunda 3(üç) tip Nitrik oksit sentaz izoformu yer alır;

1) Nöronal NOS (nNOS),
2) Endotelyal NOS (eNOS)
3) İndüklenebilir NOS (iNOS)

Nitrik oksit; nörotransmisyon, gen transkripsiyonu ve mRNA translasyonu, ikincil mesajcı olarak guanilat siklaz ve protein kinazı uyararak vasküler tonusun düzenlenmesi, immün regulasyon, hücresel redoks regulasyonu gibi birçok biyolojik fonksiyona sahiptir (Förstermann, & Sessa, 2012). Ayrıca Nitrik oksit vasküler sistemde endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak tanımlanmış (Ignarro, Buga, Wood, Byrns, & Chandhuri, 1987) ve bu molekül 1992 yılında yılın molekülü olarak kabul edilmiştir (Koshland, 1992).

2.2.9. Peroksinitrit ($OONO^-$)

Nitrik oksitin süperoksit anyon ile reaksiyonu sonucunda oluşan, toksisitesi yüksek, kısa ömürlü, güçlü oksidan bir radikaldir (Beckman, & Koppenol, 1996; Radi, 2018). Peroksinitritin karbondioksit ile reaksiyonu sonucu da nitrozo perokso karboksilat ($ONOOCO_2^-$) veya peroksinitröz asit reaktifleri oluşur. Ayrıca Peroksinitritin dekompozisyonu sonucunda da nitrojen dioksit ve hidroksil radikali oluşur. Peroksinitritin biyolojik hedefleri arasında membranın yanı sıra sitozolik ve nükleer reseptörler bulunur. Lipitleri, proteinlerdeki metiyonin ve tirozini, DNA' yı oksitleyebilir (Szabó, Ischiropoulos, & Radi, 2007).

$$O_2^{\cdot -} + NO^{\cdot} \longrightarrow OONO^-$$

2.3. Serbest Radikal Kaynakları

Vücudun normal metabolizması sırasında hücrelerde ve çevremizde sürekli oluşan serbest radikaller endojen veya eksojen kaynaklardan meydana gelebilir.

2.3.1 Endojen Kaynaklar

-Mitokondri; Hücre içinde meydana gelen reaktif oksijen türlerinin çoğu mitokondride ATP üretimi sırasında elektron transport zinciri (ETZ) kaynaklıdır (Inoue ve ark., 2003). Ayrıca Monoamino oksidaz, alfa-ketoglutarat dehidrojenaz, gliserolfosfat dehidrojenaz ve ShcA protein ailesinin bir üyesi olan p66shc proteini de reaktif oksijen türlerinin oluşumuna katkı sağlayan diğer mitokondriyal bileşenlerdir (Starkov, 2008).

- Endoplazmik retikulum' da yer alan sitokrom p-450, sitokrom b5, diamin oksidaz ve tiol oksidaz enzimleri de serbest radikal oluşumuna neden olabilir.

- Prostaglandin sentezi; Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır.

- Otooksidasyon; Bazı biyolojik moleküllerin otooksidasyonu (adrenalin, fagositik hücreler, redükte riboflavib, $FMNH_2$, $FADH_2$, Sitokrom P-450) sırasında serbest radikaller oluşabilir.

- İmmun hücrelerin aktivasyonu, inflamasyon, mental stres, yoğun egzersiz, enfeksiyon, kanser, yaşlanma, iskemi (Phaniendra ve ark., 2015).

- Peroksizom; Peroksizomlarda yer alan enzimler (Tablo-3) katalitik reaksiyonları sırasında serbest radikal oluşumuna neden olabilir (Antonenkov, Grunau, Ohlmeier, & Hiltunen, 2010; Fransen, Nordgren, Wang, & Apanasets, 2012; Schrader, & Fahimi, 2006).

Tablo 3. Peroksizomlarda Radikal Oluşumuna Neden Olan Enzimler

Enzim	**Substrat**	**ROS**
Asetil CoA-oksidazlar	Yağ asitleri	H_2O_2
D – amino asit oksidaz	D-prolin	H_2O_2
L-alfa-hidroksiasit oksidaz	Glikolat	H_2O_2
Ürat oksidaz	Ürik asit	H_2O_2
D-aspartat oksidaz	D-aspartat	H_2O_2
Ksantin oksidaz	Ksantin	H_2O_2, $O_2^{\cdot -}$
Poliamin oksidaz	N-asetil spermidine	H_2O_2
Nitrik oksit sentaz (NOS2) (İndüklenebilir form)	L-arjinin	$NO^{\cdot}$

2.3.2. Eksojen Kaynaklar

Serbest radikal oluşumuna neden olan eksojen kaynaklardan bazıları; Hava ve su kirliliği, sigara dumanı, alkol, geçiş metalleri (Cd, Hg, Pb, As), ağır metaller

(Fe, Cu, Co, Cr), endüstriyel çözücüler, pestisitler, yiyecekler, yüksek sıcaklık, iyonize ve iyonize olmayan radyasyon (UV, gama), bazı ilaçlar (Halotan, Parasetamol, Bleomisin, Doksorubisin, Metronidazol, Etanol gibi), karbon tetraklorür (CCl_4)' dür (Kohen, & Nyska, 2002; Pham-Huy, Hua He, Pham-Huy, 2008).

2.4. Serbest Radikallerin Moleküler Hedefleri

Organizmada serbest radikal oluşumundaki artışa veya vücudun antioksidan savunma sistemindeki yetersizliğe bağlı olarak oksidatif stres ve nitrozatif stres durumu meydana gelebilir. Bu da bazı hücresel bileşenlerde (lipit, protein, karbonhidrat, DNA) hasara neden olarak birçok hücresel fonksiyonu bozabilir (Valko ve ark., 2006).

2.4.1. Lipitler

Membran lipitleri, özellikle fosfolipitlerin çoklu doymamış yağ asitleri serbest radikal hasarına karşı oldukça duyarlıdır. Genellikle lipit peroksidasyonu olarak adlandırılan lipitlere verilen hasar 3 (üç) aşamada gerçekleşir (Ayala, Muñoz, & Argüelles, 2014).

1) Başlatma

İlk aşama, lipitdeki (LH) bir metilen grubundan (CH_2) bir hidrojen atomunu ayırabilen bir serbest radikal saldırısı ile başlar. Metilen grubuna bitişik bir çift bağın varlığı, hidrojen ve karbon atomları arasındaki bağı zayıflatır, böylece hidrojen atomu molekülden kolayca ayrılarak karbon merkezli bir lipit radikali ($L^{\cdot}$) meydana gelir.

$$LH + SR \longrightarrow L^{\cdot}$$

2) İlerleme (yayılma)

Dayanıksız bir bileşik olan Lipit radikali ($L^{\cdot}$) moleküler oksijen ile reaksiyona girerek lipit peroksil ($LOO^{\cdot}$) radikallerini oluşturur. Lipit peroksil radikalleri de diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek tekrardan lipit

radikallerini oluştururlar ve bu sırada açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak kendileri de lipit peroksitlerine (LOOH) dönüşürler. Bu olay kendi kendini katalizleyen (otokatalitik) zincir reaksiyonlar şeklinde devam eder.

$$L^{\cdot} + O_2 \longrightarrow LOO^{\cdot}$$
$$LOO^{\cdot} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\cdot}$$

3) Sonlanma

Lipit peroksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan lipit peroksitleri de malondialdehit (MDA), 4- hidroksinonenal (4-HNE), propanal ve heksanal gibi aldehitlere dönüşür. MDA, lipit peroksidasyonunun en mutajenik ürünü iken 4-HNE en toksik üründür (Ayala ve ark., 2014).

Lipit peroksidasyonu; membran akışkanlığının azalması, membrana bağlı enzimlerin ve reseptörlerin inaktivasyonu, membran geçirgenliğinin bozulması gibi fonksiyon kayıplarına neden olabilir (Catalá, 2006).

2.4.2. Proteinler

Serbest radikaller proteinlerde bulunan amino asitleri oksitleyerek çapraz bağ oluşumuna neden olurlar. Bu durum da proteinlerde denatürasyona ve fonksiyon kaybına, enzim aktivitesinin kaybına, reseptörlerde ve taşıyıcı proteinlerde işlev kaybına neden olabilir. Proteinlerde serbest radikal hasarı aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Metiyonin ve sistein gibi doymamış bağ ve kükürt içeren amino asitler reaktif oksijen türleri tarafından oksidasyona daha duyarlı olup; disülfidlere ve metiyonin sülfoksite dönüştürülebilir. Ancak biyolojik sistemlerde, bu iki oksitlenmiş protein formu, sırasıyla disülfür redüktazlar ve metiyonin sülfoksit redüktazlar olmak üzere iki farklı enzim tarafından doğal formlarına geri dönüştürülebilir. Ayrıca sülfidril (SH) gruplarının kaybı, glikozilleme reaksiyonları, karbonil oluşumu, disülfit çapraz bağ oluşumu, nitrotirozin oluşumu gibi reaktif türler tarafından indüklenen çeşitli protein modifikasyonları mevcuttur (Butterfield ve ark., 1998). Proteinlerin serbest radikaller tarafından oksidatif modifikasyonu; ateroskleroz, alzheimer, amyotrofik lateral skleroz (ALS), kronik böbrek yetmezliği, kistik fibrozis, parkinson, diyabet, romatoid artrit, birçok kanser türü, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi bazı hastalıkların

patogenezinde rol oynamaktadır (Dalle-Donne, Giustarini, Milzani, Colombo, Rossi, & Milzani, 2003).

2.4.3. Karbonhidratlar

Serbest radikaller karbonhidratlar ile reaksiyona girerek ve karbon atomlarının birinden rastgele bir hidrojen atomu çıkararak karbon merkezli radikal oluşturabilirler. Oluşan bu radikal hyaluronik asit gibi önemli yapısal moleküllerde zincir kırılmalarına ve fonksiyon kaybına yol açabilir (Hollán, 1995).

Monosakkaritler ve disakkaritler reaktif oksijen türlerinin etkisine polisakkaritlere kıyasla daha dirençlidir. Karbonhidratlarda meydana gelen oksidatif hasar özellikle yapısal fonksiyonlara sahip polissakkaritler için önem arz etmektedir (Duan, & Kasper, 2011).

2.4.4. Nükleik Asitler

Serbest radikaller nükleik asitlere (DNA ve RNA) zarar vererek yapısal bozukluklara neden olabilirler.

2.4.4.1. DNA

DNA' da meydana gelebilecek oksidatif hasar, hücre döngüsünü etkileyerek mutasyona ve kansere yol açabilir (Hollán, 1995). Serbest radikallerin saldırısına karşı Mitokondriyal DNA, nükleer DNA' dan daha duyarlıdır. Hidroksil radikali; purin ve pirimidin bazları, deoksiriboz şeker omurgası gibi DNA bileşenleri ile doğrudan reaksiyona girebilir ve DNA' da tek ve çift sarmallı kırılmalar dahil baz modifikasyonuna ve protein-DNA çapraz bağlarının oluşumu gibi bir dizi değişime neden olabilir.

Hidroksil serbest radikalinin pirimidin bazlarına saldırısı ile timin glikol, urasil glikol, 5-hidroksideoksi üridin, 5-hidroksi deoksisitidin, hidantoin; purin bazlarına saldırısı ile 8-hidroksideoksi guanozin; 8-hidroksi deoksi adenozin; 2, 6-diamino- 4- hidroksi-5- formamido gibi modifiye bazlar meydana gelebilir. 5- formil urasil, sitozin glikol, 5,6- dihidrotironin, 5- hidroksi-6- hidro sitozin, 5-hidroksi-6- hidro urasil, urasil glikol ve alloksan da DNA bazlarının diğer serbest radikal kaynaklı modifiye bazlarıdır (Dizdaroglu, Jaruga, Birincioglu, &

Rodriguez, 2002). Guanin bazının hidroksil radikali ile oksidasyonu sonucunda oluşan 8- hidroksi-2- deoksiguanozine (8-OHdG), DNA replikasyonu sırasında GC-TA transversiyonlarına yol açar. 8- hidroksi deoksiguanozin, oksidatif DNA hasarının biyobelirteci olarak kabul edilir ve mutagenez, karsinojenez ve yaşlanmada önemli rol oynar. 8- OHdG seviyeleri mitokondriyal DNA' da nükleer DNA' dan daha yüksek olduğu bilinmektedir. Ayrıca reaktif nitrojen türlerinden peroksinitritte guanin ile reaksiyona girerek 8-nitroguanin ve 8-oksodeoksiguanozin gibi DNA lezyonları oluşturabilir (Floyd, 1990; Barja, 2000).

2.4.4.2. RNA

RNA; tek sarmallı yapıda olması, oksitlenmiş RNA için aktif bir onarım mekanizmasının olmaması, proteinler tarafından DNA' ya kıyasla daha az korunması ve özellikle sitoplazmik RNA' ların mitokondriye daha yakın olması nedeniyle DNA' ya kıyasla oksidatif hasara daha duyarlıdır. Azheimer, parkinson, ateroskleroz gibi çeşitli patalojik durumlarda artan 7,8- dihidro-8- okso- guanosin (8-oxoG) en çok bilinen RNA hasar ürünüdür (Phaniendra ve ark., 2015).

2.5. Serbest Radikallerin Patolojik ve Fizyolojik Etkileri

Serbest radikallerin birçok diyabet türü, nörodejeneratif hastalıklar (alzheimer, parkinson, multipl skleroz, ALS), kardiyovasküler hastalıklar (ateroskleroz, hipertansiyon), kanser (kolorektal, prostat, meme, akciğer, mesane kanserleri), katarakt, solunum rahatsızlıkları (astım), romatoid artrit, inflamasyon, yanık, iskemi, yaşlanma gibi birçok patolojik durumlarda ve süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir (Barber, & Harris, 1994).

Serbest radikallerin zararlı etkilerinin yanı sıra vücutta bazı fizyolojik süreçlerde de rol oynamaktadır. Bunlardan bazıları;

- Oksidatif fosforilasyon,
- Sitokrom P450 ile ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu,
- Hasarlı hücrelerin apoptozu,
- Mikroorganizmaların ve kanser hücrelerinin makrofajlar ve sitotoksik lenfositler tarafından öldürülmesi,

- NO inflamasyonun önemli etkilerine katılır,
- inflamasyon ve immünolojik fonksiyonlarda rol oynayan IL-2 TNF-alfa ve MHC Sınıf-I genleri gibi sitokin genlerinin kontrol transkripsiyonu,
- Fibroblast üzerinden yara iyileşmesi,
- Aktive fagositler ile mikrobiyal ölüm,
- Mukus sekresyonu,
- Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, hücre büyümesi, gelişmesi ve farklılaşması,
- Peroksinitrit ile zararlı hücrelerde (tümör hücresi, parazit, mantarlar, protozoa, helmintler ve mikobakteri) oksidatif hasar oluşumudur (Hollán, 1995).

2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri (Antioksidanlar)

Antioksidan terimi, oksidatif hasara karşı hedef molekülü koruyan herhangi bir maddedir (Rahman, 2007). Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu ve bunların neden olduğu hasarı önlemek için 4 (dört) farklı şekilde etki ederler;

1- Toplayıcı etki; reaktif türleri tutma veya onları daha az reaktif yeni bir moleküle çevirme (örn. antioksidan enzimler)
2- Bastırıcı etki; reaktif türlerle reaksiyona girerek ve onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya onları inaktif hale dönüştürme (örn. vitaminler)
3- Zincir Kırıcı etki; Reaktif türlerin neden olduğu zincir reaksiyonlarını kırıp fonksiyonlarını engelleme (örn. albumin)
4- Onarıcı etki; Reaktif türlerin meydana getirdiği hasarın onarılması

Organizmada serbest radikallerin oluşumu ve detoksifikasyonu arasındaki dengesizliğin neden olduğu oksidatif ve nitrozasif hasara karşı çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bu mekanizmalardan bazıları;

- Ortamdaki oksijen varlığının azaltılması
- Metal bağlama ve şelatlama
- Önemli bir serbest radikal kaynağı olan Mitokondrinin bütünlüğünün korunması

- Serbest radikal üretiminden sorumlu enzimlerin aktivitelerinin azaltılması (ksantin oksidaz, NADPH oksidaz)
- Serbest radikallerin temizlenmesi (örneğin, E vitamini, C vitamini, GSH, koenzim Q) ve serbest radikallerin ve radikal olmayan toksik ürünlerin detoksifikasyonu / ayrıştırılması (SOD, GPx, katalaz, vb.),
- Peroksitlerin bozulması/detoksifikasyonu,
- E vitamininin aktif bir biçimde tutulmasına yardımcı olan E vitamini geri dönüşüm sistemi (askorbik asit, tioredoksin redüktaz (TrxR), B1 ve B2 vitaminleri),
- Hasarlı moleküllerin tamiri (ısı şok proteinleri, DNA onarım enzimleri) veya kaldırılması (fosfolipazlar),
- Apoptozis,
- Redox sinyali, transkripisyon faktör (Nrf2) indüksiyonu,
- Vitajen aktivasyonu, antioksidan ve detoksifikasyon aktivitelerine sahip koruyucu moleküllerin sentezidir (Surai, Kochish, & Fisinin, 2017).

Antioksidanlar endojen veya eksojen kaynaklı olabilirler.

2.6.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik (Tablo 4) ve enzimatik olmayan (Tablo 5) antioksidanlar olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar.

Tablo 4. Enzimatik Antioksidanlar ve Temel Fonksiyonları

Enzimatik Antioksidanlar	
Süperoksit Dismutaz (SOD)	Süperoksit radikallerinin moleküler oksijen ve hidrojen peroksite dönüşümü
Katalaz (CAT)	Hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümü
Glutatyon Peroksidaz (GPx)	Hidrojenperoksit, organik hidroperoksitler ve lipit peroksitlerin detoksifikasyonu
Glutatyon-S-Transferazlar (GST)	Glutatyon ile konjugasyon yoluyla ksenobiyotiklerin ve elektrofillerin detoksifikasyonu
Glutatyon Redüktaz (GR)	Okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümü
Glutamat Sistein Ligaz (GCL)	Glutatyon sentezi
Tiyoredoksin Redüktaz (TrxR)	Antioksidan savunma ve redoks dengesini korumak
Peroksiredoksinler (PRDX)	Hidrojen peroksit ve alkil hidroperoksitlerin azaltılması
Glikoz 6-fosfat dehidrojenaz; 6 fosfoglukonat dehidrojenaz(G6PD6PGDH)	Antioksidan reaksiyonu besleyen kritik kofaktör olan NADPH' nin üretimi

Tablo 5. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar ve Temel Fonksiyonları

Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
Glutatyon	$O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$ ve H_2O_2 ile direkt reaksiyona girerek antioksidan etki gösterir.
Melatonin	$OH^{\cdot}$, H_2O_2, $^1O_2$, NO, $ONOO^-$ ve ONOOH türleri üzerine süpürücü etki gösterir.
Ürik asit	$OH^{\cdot}$, $^1O_2$, $O_2^{\cdot-}$, ONOO ve ONOOH etkisizleştirir ve geçiş metallerini şelatlar.
Bilirubin	$ROO^{\cdot}$ Radikalleri üzerine zincir kırıcı etki gösterir.
Albumin	HOCl, $OH^{\cdot}$ üzerine süpürücü etki gösterir.
Koenzim Q10	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 üzerine süpürücü etki gösterir, lipit peroksidasyonunu baskılar.
Alfa lipoik asit	$OH^{\cdot}$, HOCl, $ONOO^-$ ve $^1O_2$ üzerine süpürücü etki gösterir.

2.6.2. Eksojen Antioksidanlar

Vücutta üretilmeyen ancak besin ya da takviye yoluyla alınan eksojen antioksidanlar oksidatif strese karşı endojen antioksidanlara destek olurlar. Eksojen antioksidanlar fizyolojik dozlarda yararlı etkilere yol açarken, yüksek dozlarda prooksidan gibi davranarak zararlı etkilere neden olurlar (Bouayed, & Bohn, 2010).

Tablo 6. Eksojen Antioksidanlar

Eksojen Antioksidanlar	
Vitaminler	Vit C, Vit E
Mineraller	Çinko, Selenyum
Karotenoidler	B- karoten, likopen
Fenolik asitler	Klorojenik asitler, kafeik asit, gallik asit
Flavanoller	Kateşin
Flavonoller	Quercetin
Antosiyanidinler	Siyanidin
İzoflavonoidler	Genistein
Flavanonlar	Apigenin
Alkaloidler	Kafein
Fitoaleksinler	Resveratrol

2.7. Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesinde Kullanılan Analitik Yöntemler

Antioksidan kapasitenin değerlendirilmesine yönelik yöntemler; spektrometrik (Tablo 7), elektrokimyasal (Tablo 8) ve kromatografik (Tablo 9) olmak üzere 3 (üç) farklı kategoriye ayrılır.

Tablo 7. Spektrometrik Yöntemler

Antioksidan Kapasite Testi	Yöntemin Prensibi	Son Ürün Belirleme
ORAC	2, 2' azobis- 2- amidino propan (AAPH) ile indüklenen, antioksidanın peroksil radikalleri ile reaksiyonu	Floresan kaybı
HORAC	Cob (II) bazlı Fenton benzeri sistem tarafından üretilen OH radikallerini gidermek için gereken antioksidan kapasite	Floresan kaybı
TRAP	AAPH ayrışmasından üretilen luminol türevli radikalleri temizlemek için gereken antioksidan kapasite	Kemilüminesans söndürme
CUPRAC	Antioksidanlar tarafından Cu (II)'nin Cu (I)'ye indirgenmesi	Kolorimetri
FRAP	Fe(III) kompleksi ile antioksidan reaksiyonu	Kolorimetri
PFRAP	Antioksidanlar tarafından potasyum ferrisiyanürün indirgenmesi ve ardından potasyum ferrosiyanürün Fe^{+3} ile reaksiyonu	Kolorimetri
ABTS	Organik katyon radikali ile antioksidan reaksiyonu	Kolorimetri
DPPH	Organik bir radikal ile antioksidan reaksiyonu	Kolorimetri
Florimetrik Analiz	Farklı bir dalga boyundaki ışığı veya diğer elektromanyetik radyasyonu emen bir bileşik tarafından ışık emisyonu	Floresan uyarma/emisyon spektrumlarının kaydı

Tablo 8. Elektrokimyasal Yöntemler

Antioksidan Kapasite Testi	Yöntemin Prensibi	Son Ürün Belirleme
Voltametri	Bir çalışma elektrotunun yüzeyindeki bir bileşiğin uygulanan potansiyelde indirgenmesi veya oksidasyonu, elektrot yüzeyine yeni malzemenin taşınması ve bir akım üretilmesi ile sonuçlanır.	Katodik/anodik tepe akımının ölçümü
Amperometri	Çalışma elektrotunun potansiyeli, referans elektrota göre sabit bir değere ayarlanır.	Elektroaktif bir antioksidanın oksidasyonu/redüksiyonu ile üretilen akımın ölçümü
Biamperometri	Antioksidanın tersinir bir redoks çiftinin oksitlenmiş formuyla reaksiyonu	Küçük bir potansiyel farkı ile iki özdeş çalışma elektrotu arasında akan akımın ölçülmesi ve analiz edilen numune ve bir tersinir redoks çifti içeren bir çözeltiye daldırılması

Tablo 9. Kromatografik Yöntemler

Antioksidan Kapasite Testi	Yöntemin Prensibi	Son Ürün Belirleme
Gaz kromatografisi	Bir karışımdaki bileşiklerin ayrılması, bir sıvı sabit faz ile bir gaz mobil faz arasındaki yeniden bölümlemeye dayanmaktadır.	Alev iyonizasyonu veya termal iletkenlik tespiti
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)	Bir karışımdaki bileşiklerin ayrılması, bir katı sabit faz ile mobil fazın yüksek akış hızında ve basıncında farklı polaritelere sahip bir sıvı mobil faz arasındaki yeniden bölümlemeye dayanır.	UV-Vis (örn. diyot dizisi) algılama, florimetrik algılama, kütle spektrometrisi veya elektrokimyasal algılama

2.8. Antioksidan Aktiviteyi Belirleyen Kimyasal Testler

Reaksiyon mekanizmalarına göre; hidrojen atomu transferi (HAT) ve tek elektron transferi (SET) reaksiyonuna dayalı analiz yöntemleri olmak üzere 2 (iki)' ye ayrılır.

2.8.1. Hidrojen Atomunun Transferine Dayalı Testler (HAT)

HAT temelli yöntemler; bir antioksidanın, hidrojen bağışı ile serbest radikalleri söndürme konusundaki yeteneğini ölçer.

$$X^{\bullet} + AH \longrightarrow XH + A$$

Başlıca HAT 'e dayalı analiz yöntemleri;

1) Oksijen Radikal Absorpsiyon Kapasitesi (ORAC) Yöntemi
2) Hidroksil Radikal Antioksidan Kapasitesi (HORAC) Yöntemi
3) Toplam Peroksil Radikal Yakalama Antioksidan Parametresi (TRAP) Testi
4) Toplam Oksiradikal Süpürme Kapasitesi (TOSC) Yöntemi

2.8.2. Tek Elektron Transferine Dayalı Testler (SET)

SET temelli yöntemler; potansiyel bir antioksidanın, metaller, karboniller ve radikaller dahil olmak üzere herhangi bir bileşiği indirgemek için bir elektron transfer etme yeteneğini ölçer.

Başlıca SET analiz yöntemleri;

1) Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi
2) Ferrik iyonu (Fe^{+3}) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü
3) Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi

2.8.3. Karma Testler

Genellikle, sabit bir kromoforun (2, 20-azinobis-3-etilbenzthyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) ve 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) gibi) ortadan kaldırılması esasına dayanır. Burada HAT, ET ve proton-bağlı elektron transfer (PCET) mekanizmaları reaksiyon koşullarına (pH ve solvent gibi) bağlı olarak çeşitli oranlarda farklı roller oynayabilir.

Başlıca Karma yöntemler;

1) Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (ABTS/TEAC) ölçümü,
2) 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemidir.

2.8.3.1. DPPH Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), kararlı organik azot radikallerinden ($DPPH^{\cdot}$) oluşan ve ticari olarak elde edilebilen koyu menekşe renkli kristal bir tozdur. Bu bileşik 517 nm' de maksimum absorbans oluşturmaktadır (λ_{max} = 517

nm) (Bondet, Brand-Williams, & Berset, 1997). DPPH· 'in absorbansı reaksiyon koşulları (ışık, hava oksijeni, rutubet ve pH) ' na oldukça duyarlıdır. Radikal, farklı organik çözücüler içinde çözünür, ancak suda çözülmez. Genellikle metanol, etanol veya bunların sulu karışımlarında çözünür. Radikali daha kolay çözünür hale getirmek ve koagülasyonuna engel olmak için çözücünün su içeriği %60' ı geçmemelidir (Staško, Brezová, Biskupic, & Mišík, 2007).

Yöntem; antioksidanların DPPH· ' ye karşı indirgeme yeteneğinin elektron spin rezonansı (ESR) veya radikalin absorbansının azalması ölçümüne dayanmaktadır. DPPH· radikali bir hidrojen donörü (antioksidan) ile reaksiyona girdiğinde, menekşe renginin sarı renge doğru dönerek kaybolmasıyla birlikte indirgenmiş form meydana gelir ve renk bozulması antioksidan aktivitenin bir göstergesidir (Şekil 1). Yöntem ilk kez Blois tarafından 1958 yılında antioksidan içeriğin nicelleştirilmesi için önerilmiş (Blois, 1958); sonrasında fenol reaktifi olarak kullanılmıştır (Papariello, & Janish, 1966). Daha sonra 1995 yılında Brand-Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilerek ve birçok araştırmacı tarafından referans alınarak kullanılmıştır (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

Bu yöntem kullanılarak antioksidanlar için bildirilen antioksidan aktivite genellikle IC50 olarak belirtilir ve bu, başlangıç DPPH konsantrasyonunu %50 azaltmak için gerekli antioksidanın etkin konsantrasyonu olarak tanımlanır. Reaksiyon koşulları, DPPH· derişimi, inkübasyon süresi, reaksiyon çözücüsü antioksidanların IC50 değerleri üzerine etki etmektedir.

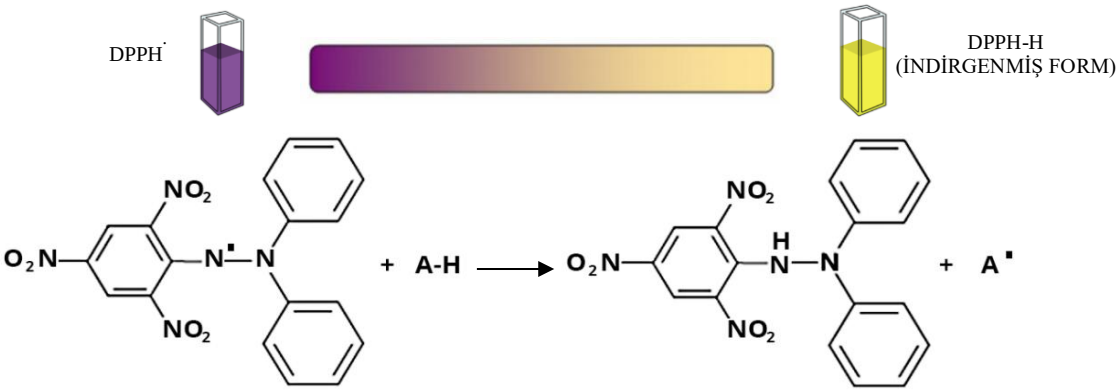
DPPH yönteminin avantajları (Munteanu, & Apetrei, 2021);

- Oda sıcaklığında uygulanabilmesi, böylece test edilen bileşiklerin termal bozunma riski ortadan kalkar
- Düşük maliyetli olması,
- Deney gerçekleştirme kolaylığı,
- Kolay tekrarlanabilir olması,

Yöntemin dezavantajları (Munteanu, & Apetrei, 2021);

- DPPH suda çözünmez. Bu nedenle test bileşeninin organik çözücülerde çözünmesi gerekir. Ayrıca organik çözücünün su içeriği de çok önemlidir. Bu da suda çözünebilen antioksidanların antioksidan kapasitelerinin değerlendirilmesinde önemli bir sınırlamadır.

- DPPH· 'in absorbansı ışık, hava oksijeni, rutubet ve pH' ya oldukça duyarlıdır.
- Yüksek absorbsiyona sahip test bileşikleri (örn. karotenoidler) DPPH' nin maksimum absorpsiyonuna müdahale edebilir.
- Küçük moleküller DPPH ile polimerlerden daha kolay reaksiyona girer. Bu yüzden antioksidan bileşiğin molekül yapısı ve molekül boyutu test sonucunu ve reaksiyon süresini değiştirebilir.



Şekil 1: DPPH· radikalinin yapısı ve antioksidan ile verdiği reaksiyon

2.9. Biyolojik Sistemlerde Serbest Radikallerin Tespit Yöntemleri

Serbest radikallerin farklı konsantrasyonlarda biyolojik sistemlerde farklı roller üstlendiği göz önünde bulundurulduğunda bunların tespiti ve seviyelerinin güvenilir bir şekilde ölçülmesi son derece önemlidir. Kararsız ve kısa ömürlü olmaları, yüksek reaktivite sahip olmaları ve endojen antioksidanların varlığı nedeniyle de özellikle biyolojik sistemde serbest radikallerin tespiti zordur. Hem biyolojik hem de biyolojik olmayan ortamlarda serbest radikallerin ve bunların reaktif ara ürünlerinin ölçümü ve lokalizasyonun tespiti için farklı yöntemler uygulanmaktadır (Prasad, Pospíšil, & Tada, 2019).

2.9.1. Kemilüminesans Türevi Yöntemler

Kemilüminesans analizi radikallere duyarlı kemilüminesans problar kullanılarak genellikle süperoksit radikalinin saptanmasında kullanılır. Reaktif türlerle kemilüminesans probun reaksiyonu sonucunda gözlenen foton oluşumunun izlenmesi esasına dayanır. Uyarıcı bir ışık kaynağı gerekmeden kemilüminesans

prob reaktif tür ile reaksiyona girerek fotometre veya sinilasyon sayacı tarafından yakalanan bir foton oluşturabilir. En yaygın kullanılan kemilüminesans problar; lucigenin, luminol ve L-012' dir. (Münzel, Afanas'ev, Kleschyov, & Harrison, 2002; Zhang ve ark., 2018)

2.9.2. Kromotografik Yöntemler

Reaktif türlerin ve bunların reaksiyon ürünlerinin ayrıştırılması ve tanımlanmasında kromatografi yöntemleri kullanılır. Yöntem; reaktif türün, kromatografi deneyleriyle (sıvı kromatografisi ve bunun kütle spektrometrisi ile kombinasyonu) saptanabilen kararlı bileşikler oluşturmak üzere belirli reaktiflerle reaksiyona girmesi esasına daynır. Serbest radikallerin stabilizasyonu için genellikle kullanılan reaktifler benzoik asit, salisilik asit ve DMSO'dur (Zhang ve ark., 2018). Birçok reaksiyon sisteminde ve dokularda özellikle hidroksil radikallerinin tespiti veya antioksidan aktivitenin ölçümü için HPLC' ye dayalı yöntemler kullanılmaktadır (Piszcz, Zurawski, & Glod, 2014).

2.9.3. Spektrofotometri Yöntemleri

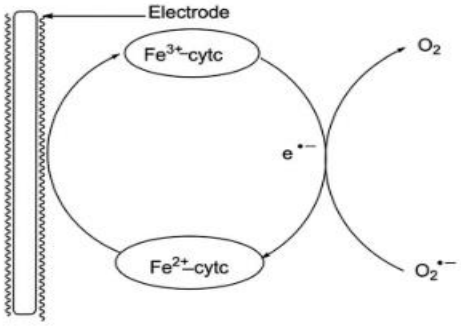
Spektrofotometri metotları reaktif türleri tespit etmek için uzun süredir kullanılan geleneksel yöntemlerden biridir. Reaktif türlerin spekroskopik problar ile reaksiyonu sonucunda oluşan absorbans değişikliği esasına dayanır. Substrat ve ürün arasındaki farklı dalga boylarındaki absorbans farkı serbest radikallerin nicelleştirilmesini mümkün kılmaktadır. (Prasad ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2018).

Tablo 10. Spektrofotometrik Problar ve Tespit Ettikleri Reaktif Türler

Sitokrom c	$O_2^{\cdot-}$
Nitroblue tetrazolium	$O_2^{\cdot-}$
Akotinaz inaktivasyonu	$O_2^{\cdot-}$
5-(3-Karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetoksiltiazolil)-3-(4-sülfofenil) tetrazolium (MTS)	$O_2^{\cdot-}$
4-Kloro-7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol (NBD-Cl)	$O_2^{\cdot-}$
Boronatlar	H_2O_2, $OONO^-$
Diaminobenzidin (DAB)	H_2O_2

2.9.4. Elektrokimyasal Biyosensörler

Süperoksit radikalinin hassas, seçici ve kararlı bir şekilde miktarının belirlenmesinde kullanılır. Altın bir tel üzerinde değişen sitokrom c ve poli (anilin (sülfonik asit)) katmanları tarafından oluşan elektrokimyasal biyosensörler kullanılır. (Şekil 2) Süperoksit radikali belirli proteinleri azaltırken, bu proteinler elektrot tarafından uygun bir potansiyelde yeniden oksitlenir; bu işlem sırasında da sensör tarafından yakalanabilen bir elektrik akımı sinyali üretilir ve sinyal gücü süperoksit konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu yöntemin dezavantajı, elektrotların yüzeyine kaplanabilen sınırlı protein türlerinin olmasıdır (Ganesana, Erlichman, & Andreescu, 2012)



Şekil 2: Süperoksit anyonu için bir elektrokimyasal sensörün şeması.

2.9.5. Elektron Spin Rezonans (ESR)

Eşleşmemiş elektrona sahip olmaları nedeniyle, serbest radikaller manyetik özellik gösterirler. Bu yüzden elektron paramanyetik rezonans (EPR) olarak da bilinen elektron spin rezonansı (ESR), seçicilik ve yüksek duyarlılık özellikleri nedeniyle serbest radikallerin doğrudan tanımlanmasına ve bunların katıldığı tepkimelerin dinamik olarak incelenmesini mümkün kılan bir analizdir. Bu yöntemin en önemli dezavantajı sulu ortam koşullarında düşük duyarlılık göstermesidir. Ancak bu sorun da reaktif türlerin daha yüksek stabiliteye sahip radikallere dönüşümünü sağlayan spin-tuzağı kullanılarak giderilmiştir. 2-metil-2-nitrosopropan (MNP), 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksid (DMPO), N-tert-butil-a-fenilnitron (PBN) gibi nitron ve nitrozo bileşikleri spin-tuzağı maddeleridir ve bu bileşiklerin reaktif türlerle reaksiyonu sonucunda nitroksil radikalleri meydana gelmektedir. ESR tekniğinin dezavantajı; bu yüntemde özel ve pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyulmasıdır (Bartosz, 2006).

2.9.6. Floresan Protein Bazlı Yöntemler

Floresan protein bazlı problar (oGFP, rxYFPs, HyPer, cpYFP ve rxRFP); floresan proteinler ve redoksa duyarlı proteinlerin kombinasyonu ile tasarlanmışlardır. Bu rekombinant proteinler hücre içine geçiş sağlayarak ve hücre altı organelleri hedef alarak belirli bölgelerin redoks durumlarının gerçek zamanlı ve dinamik tespitini sağlayabilir ve hedef organele göre tasarlanabilir. Ayrıca bu problar hücrelerde kalabilir ve hücresel radikallerin uzun süreli tespitini sağlayabilir (Dooley, Dore, Hanson, Jackson, Remington, Tsien, & Diego, 2004).

2.9.7. Florimetrik Yöntemler (Floresan Probları)

Oksidasyona duyarlı olan floresan probaları reaktif türler tarafından oksitlenmeden önce floresan özellik göstermezler. Reaktif türlerle reaksiyonları sonucunda floresan ürünlerin oluşumuna neden olurlar. Bunlardan hücre geçirgen olanlar, hücresel bölümlerin oksidatif durumunu yansıtmaya yardımcı olur ve uyarı altında radikal üretimi hakkında bilgi verirler. Floresan probları ve tespit ettikleri reaktif Türler Tablo 11' de gösterilmiştir.

Tablo 11. Floresan Probları ve Tespit Ettikleri Reaktif Türler

PROB	**ROT**
Dihidroethidium, HE	$O_2^{\cdot -}$
1,3-Difenilizobenzofuran (DPBF)	$O_2^{\cdot -}$, $^1O_2$
2- (2-Piridil) benzotiyazolin	$O_2^{\cdot -}$
2,7-Diklorodihidrofloresein (DCFH)	H_2O_2, $ROO^{\cdot}$, $OH^{\cdot}$
Skopoletin	H_2O_2
N-Asetil-3,7-dihidroksifenoksazin (Ampleks kırmızısı)	H_2O_2
Homovanillik asit (HVA)	H_2O_2
Dihidrorhodamin 123 (DHR)	H_2O_2
9,10-Dimetilantrasen (DMA)	$^1O_2$
9- [2- (3-Karboksi-9, 10-difenil) antril] -6-hidroksi-3H-ksanten-3-olanlar (DPAX'ler)	$^1O_2$
9- [2- (3-Karboksi-9, 10-dimetil) antril] -6-hidroksi-3H-ksanten-3-on (DMAX)	$^1O_2$
4- (9-Antriloksi) -2, 2, 6, 6-tetrametilpiperidin-1-oksil	$OH^{\cdot}$
1,3-Siklohekzanedion (CHD)	$OH^{\cdot}$
Sodyum tereftalat	$OH^{\cdot}$
Kumarin, kumarin-3-karboksilik asit (3-CCA) ve kumarin-3-karboksilik asidin (SECCA) N-süksinimidil esteri	$OH^{\cdot}$
2- [6- (4'-Hidroksi) fenoksi-3H-ksanten-3-on-9-il] benzoik asit (HPF) ve 2- [6- (4'-amino) fenoksi-3H-ksanten-3-on- 9-il] benzoik asit (APF)	$OH^{\cdot}$
Fluorescein (FL)	$OH^{\cdot}$
Cis-Parinaric asit (cis-PnA, (18: 14): 9, 11, 13, 15-cis-trans-trans-cis-oktadekaenoik asit)	$ROO^{\cdot}$
4,4-Difloro-5- (4-fenil-1,3-butadienil) -4-bora-3a, 4a-diaza-s-indasen-3-undekanoik asit (C11-BODIPY$^{581/591}$)	$ROO^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$, $OH^{\cdot}$
Lipofilik floresein türevleri	$ROO^{\cdot}$
Dipiridamol	$OH^{\cdot}$, $O_2^{\cdot -}$, $ROO^{\cdot}$
Difenil-1-pirenilfosfin (DPPP)	$ROO^{\cdot}$
2', 7'- diklorofloresin diasetat (DCFH-DA)	$ROO^{\cdot}$
β -Phycoerythrin / Fluorescein / 6-Karboksifloresein	$ROO^{\cdot}$

Yukarıda bahsedilen reaktif türlere ait tespit yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları Tablo 12' de özetlenmiştir.

Tablo 12. Serbest Radikal Tespit Yöntemlerininin Özellikleri

Prob	**Molekül**	**Avantaj**	**Dezavantaj**
Kemilüminesans Problar	$O_{2}^{\cdot -}$, $OH^{\cdot}$	Hücre geçirgen	Düşük seçicilik ve hassasiyet
Kromotografik Yöntemler	$OH^{\cdot}$	Hızlı, hassas	Ürünler komplek
Spektrofotometri Yöntemleri	$O_{2}^{\cdot -}$, H_2O_2	Hızlı, hassas ve tek ürün	Düşük özgüllük
Elektrokimyasal Biyosensörler	$O_{2}^{\cdot -}$	Hızlı, hassas	Hazırlanması karışık
Elektron Spin Rezonans	ROS, RNS	Özel, hassas	Pahalı
Floresan Protein	H_2O_2	Dinamik, hücre dostu	Reaksiyon yavaş, hassas değil
Floresansa Bağımlı Yöntemler	$O_{2}^{\cdot -}$, H_2O_2	Hücre geçirgen	Ürünler kompleks, Düşük özgüllük

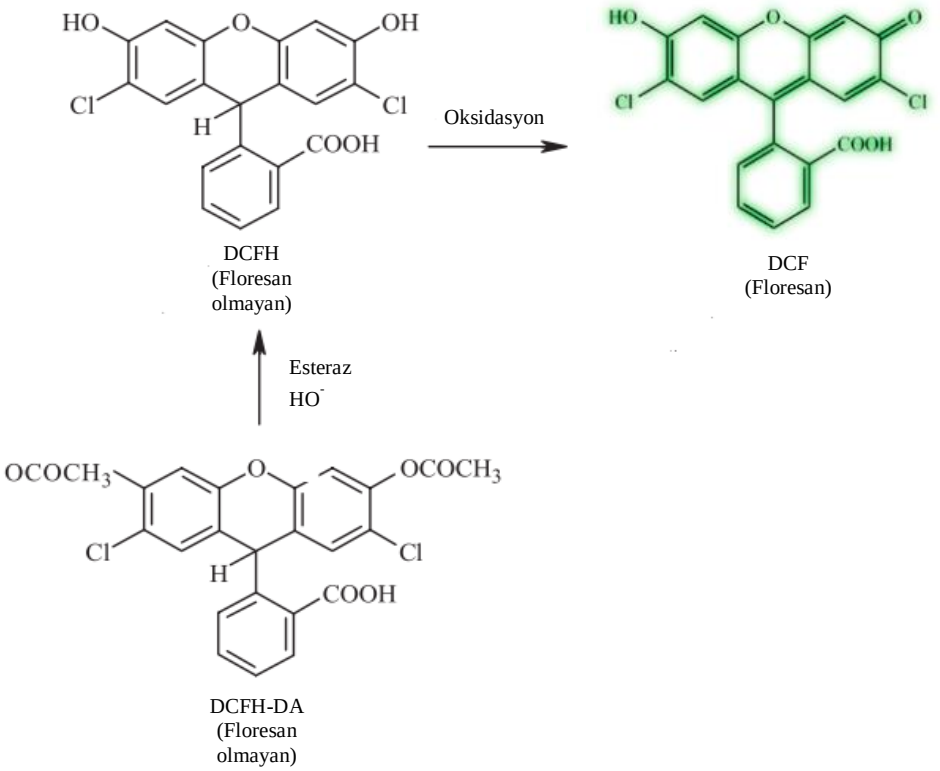
2.9.7.1 DCFH-DA (2', 7'- diklorofloresin diasetat)

İlk olarak Keston ve Brandt tarafından peroksidaz varlığında hidrojen peroksitin florometrik bir analiz yöntemi olarak tanımlanmıştır (Keston, & Brandt, 1965). Başlangıçta hidrojen peroksite özgü bir indikatör olduğu bilinse de sonradan $RO^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$, $NO^{\cdot}$, $ONOO^{-}$ gibi diğer ROT ve RNT' nin tespiti için de kullanılabildiği anlaşılmıştır. Hücre membranı boyunca yayılma kabiliyeti nedeniyle hücresel çalışmalarda kullanılabilen bu prob oksidasyona bağlı olarak genellikle hücre içi redoks durumlarının doğrudan ölçümü için kullanılır. DCFH-DA hücre membranından kolayca difüze olarak hücre içine geçer ve hücresel esterazlar floresan olmayan DCFH-DA' yı yine floresan olmayan bir bileşik olan DCFH' ye enzimatik olarak hidrolize eder (Deasetilasyon). Membrandan geçemediği için hücre içinde kalan bu ara ürün daha sonra ortamdaki reaktif türler tarafından oksitlenir ve floresan bileşik olan 2', 7'- diklorofloresein (DCF)' e dönüşür (Şekil 3) (Gomes, Fernandes, & Lima, 2005). Daha önce yapılan çalışmalarda DCF' nin neden olduğu floresan yoğunluğunun hücrelerdeki oksidatif stres seviyeleri ile ilişkili olduğunu kanıtlanmıştır. Ancak bu probun kullanımında bazı sınırlamalar vardır;

- DCFH, floresan ürün DCF' yi oluşturmak için hidrojen peroksit ile doğrudan reaksiyona girmez. Bu nedenle, DCF floresansı doğrudan bir hidrojen peroksit ölçüsü olarak kullanılamaz.
- Spesifik olmayan reaktif türler DCFH' yi DCF' ye oksitleyebilir. Bunlar; hidroksil radikalleri, hidrojen peroksitin peroksidaz veya

Hem ile reaksiyonu ile oluşan bileşikler, Miyeloperoksidaz / H_2O_2 / NO_2^- sistemden oluşan $NO_2^{\cdot}$, hipokloröz asit (HOCl), peroksinitrit ($ONOO^-$ / ONOOH) ayrışmasından oluşan reaktif türlerdir.

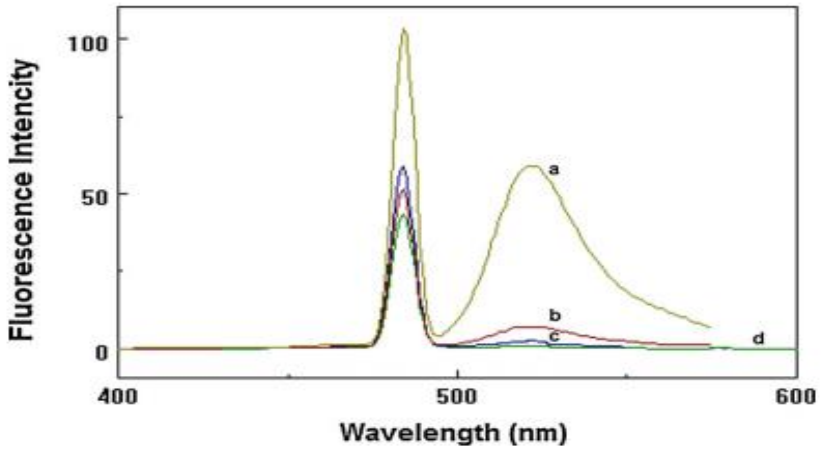
- -DCFH' nin oksidasyonu ile oluşan ara radikal, $DCF^{\bullet -}$, hızla süperoksit anyonu oluşturmak üzere oksijen ile reaksiyona girer. Meydana gelen süperoksit dismutasyon reaksiyonu sonucu hidrojen peroksit oluşturduğundan yapay bir floresan artışına neden olabilir.
- Hücrenin apoptozu sırasında mitokondriden sitozole salınan bir hem proteini olan Sitokrom c, DCFH' yi doğrudan veya dolaylı olarak peroksidaz tipi bir mekanizma yoluyla oksitleyerek DCF oluşturabilir. DCFH-DA ile yüklenen hücrelerin apoptozu sırasında meydana gelen DCF floresanındaki artış, sıklıkla artmış oksidan üretimi ile ilişkilendirilmiştir.
- -Redoks-aktif metaller (örneğin Fe^{+2}), oksijen veya hidrojen peroksit varlığında DCFH oksidasyonunu artırır (Kobilka, 2012).



Şekil 3: 2', 7'- diklorofloresin diasetat (DCFH-DA)' ın 2', 7'- diklorofloresin (DCFH)' e deesterifikasyonu ve 2', 7'- diklorofloresein (DCF)' e oksidasyon mekanizması

2.10. Anabilim Dalımızda Yapılan Çalışmalar

Daha önce sıçan kortikal dilimleri kullanılarak yapılan çalışmalar sırasında 2', 7'- diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) kullanılarak inkübasyon ortamında reaktif oksijen türleri düzeyi ölçülürken, beklenmedik bir şekilde DCFH-DA' nın dilimsiz fizyolojik ortamda da hidrojen peroksit ile indüklenen floresan yoğunluğunda önemli artışa neden olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4: Dilimsiz inkübasyon ortamında DCFH-DA'dan türetilen floresan yoğunluğunda H_2O_2 kaynaklı artışlar (Demircan ve ark., 2014).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları

Çalışmada inkübasyon ortamı olarak ilk olarak fizyolojik krebs çözeltisi kullanıldı. Kullanılan krebs çözeltisinin kompozisyonu şöyledir (mmol/L; NaCl 120; $CaCl_2$ 1,3; $MgSO_4$ 1,2; KCl 3,5; NaH_2PO4 1,2; $NaHCO_3$ 25 ve glukoz 10). Hazırlanan krebs % 95 O_2 ve % 5 CO_2 tüpü ile gazlandırılarak pH' sı 7,4 ' e ayarlanmıştır. Oksijenlendirilmemiş krebs kullanıldığında, bunun pH' sı HCl (0,1 M) ile 7,4'e ayarlanmıştır. Çalışmada ayrıca 0.1M NaH_2PO_4 ve 0.1M Na_2HPO_4 karışımından hazırlanan fosfat tamponu (pH 7,4) kullanılmıştır.

Ortamdaki reaktif türlerin tespiti için bir floresan bileşik olan 2',7'-diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) (Sigma, St. Louise, MO, USA) kullanılmıştır. 2', 7'- diklorofloresin diasetat bileşiği dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözündürülerek 1ml' lik 0,1 M' lik bir ana stok çözelti hazırlanmış ve stok çözeltiden 50 μl alınarak eppendorflarda karanlıkta -20 °C'de saklanmıştır. Daha sonra 50 μl' lik stok üzerinden 10^{-3} M' lık ve 1 ml' lik stok tüpler hazırlanarak yine karanlıkta -20 °C' de saklanmıştır. Her deney için stok DCFH-DA tüpü distile suda çözündürülerek sadece o günkü çalışma için kullanılmış ve yeniden dondurulmamıştır. DCFH-DA' nın ve antioksidanların ışıktan etkilenmesini en aza indirmek için, tüm deneysel prosedürler karanlıkta gerçekleştirilmiştir.

Her çalışmada %30 (a/h)' luk hidrojen peroksit stok çözeltisi üzerinden farklı konsantrasyonlarda hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi taze olarak günlük hazırlanmıştır. Tüm antioksidanlar (Sigma, St. Louise, MO, USA), çözünürlüklerine göre muhtelif çözücüler kullanılarak değişen konsantrasyonlarda kullanımdan hemen önce hazırlanmıştır.

3.2. Deney Prosedürü

Tipik bir inkübasyon ortamı 2 ml içinde 20 μl değişen konsantrasyonlarda (5, 10 ve 15 mM) hidrojen peroksit, 20 μl 10^{-3} M' lık DCFH-DA çözeltisi (final konsantrasyon 10 μM) içermektedir. İnkübasyon tüpleri su banyosunda 37 °C' de ve karanlıkta bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Her bir deney beş kez

tekrarlanmıştır (n=5). İnkübasyon sonunda floresan şiddeti Jasco FP-750 spektroflorometre (eksitasyon ve emisyon dalga boyu 488 ve 525 nm, sırasıyla) ile ölçülmüştür. İnkübasyon ortamında yapılan herhangi bir ekleme/çıkarma veya reaksiyon koşullarında yapılan değişiklikler bulgular kısmında yer alan şekil açıklamalarında belirtilmiştir.

Ortam koşullarına bağlı gözlemlenen bulgulardan sonra tipik inkübasyon ortamına 20 μl antioksidan eklenerek DCFH-DA' nın hidrojen peroksit ile inkübasyonu tekrarlanmış; hidrojen peroksit ile indüklenen floresan şiddeti üzerine bazı antioksidanların etkisine bakılmıştır. DCFH-DA' nın DCFH' ye deasetilasyonunun hafif alkali (pH 7,4) fizyolojik ortamda gerçekleşebileceği bilindiğinden antioksidanların ilavesi sonrasında ortam pH' sında herhangi bir değişim olup olmadığı yüksek hacimlerde hazırlanan krebs çözeltileri kullanılarak kontrol edilmiş, ancak antioksidan ilavelerinden sonra inkübasyon ortamı pH' sında anlamlı bir değişiklik olmadığı saptanmıştır.

3.3. İstatistiksel Analizler

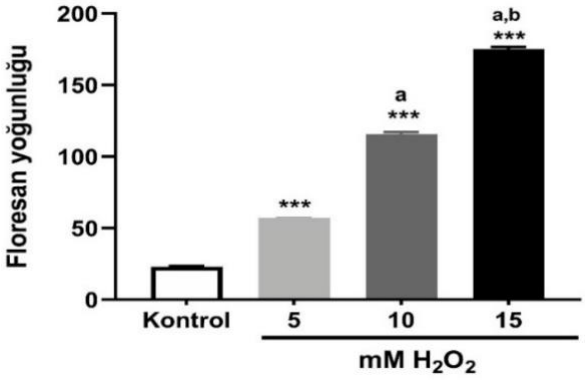
Çalışmamızda istatistiksel hesaplamalar GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde tek yönlü veya iki yönlü ANOVA kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Ortam Koşullarına Bağlı Deneysel Bulgular

4.1.1. Konsantrasyonun Etkisi

DCFH-DA floresan bileşiği kullanılarak ortamdaki serbest radikal düzeyi ölçülürken, krebs içinde daha önce beklenmedik bir şekilde gözlemlenen H_2O_2 ile indüklenen floresan yoğunluğundaki artışın gözlenmesine benzer bir çalışma yeniden tekrarlanmıştır (Demircan ve ark., 2014). 20 µl DCFH-DA (10 µM) ile 20 µl H_2O_2 ' nin artan konsantrasyonları (5, 10 ve 15 mM)' ndan oluşan reaksiyon karışımları 2 ml' lik fizyolojik Krebs ortamında (pH 7,4) 37 °C' de su banyosunda karanlıkta 1 saat süreyle inkübe edilerek inkübasyon sonunda floresan yoğunluğu ölçülmüş, daha önceden saptandığı gibi H_2O_2 konsantrasyonuna (5 mM, 10 mM ve 15 mM) bağlı olarak floresans şiddetinin arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4).

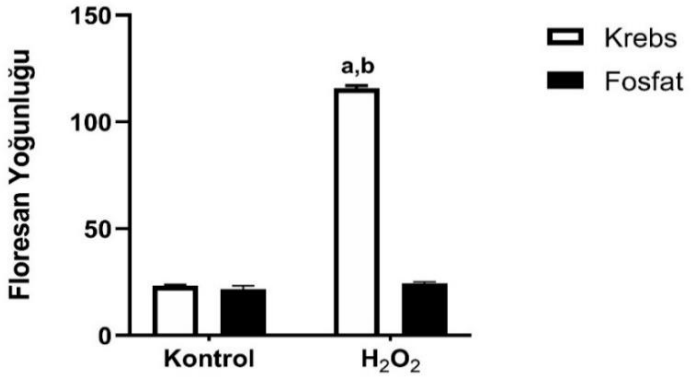


Şekil 5: H_2O_2 ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan yoğunluğunun H_2O_2 konsantrasyonu ile ilişkisi. DCFH-DA (10 µM) ile H_2O_2 ' nin artan konsantrasyonlarından (5, 10 ve 15 mM) oluşan reaksiyon karışımları 2 ml fizyolojik ortamda 37 °C' de su banyosunda ve karanlıkta 1 (bir) saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda örneklerin emisyon spektrumları 488 nm eksitasyon dalga boyunda alındı. (Şekil 5; *** $p<0,001$, kontrol grubuna; [a] $p<0,001$, 5 mm grubuna; [b] $p<0,001$, 10 mm grubuna göre anlamlı derecede farklı).

4.1.2. İnkübasyon Ortamının Etkisi

Çalışmanın bu kısmı; ortam pH' sını ve oksijenlendirilmesini sabit tutarak, kompozisyonu farklı bir inkübasyon ortamında DCFH-DA' nın H_2O_2 ile fizyolojik Krebs içinde gözlediğimiz reaksiyonu ne ölçüde gerçekleştirebileceğini saptamak amacıyla yapılmıştır. Bunun için, Krebs ile aynı pH değerine sahip ve Krebs gibi oksijenlendirilmiş fosfat tamponu (0,1 M; pH 7,4) kullanıldı. Şekil 6' da görüldüğü

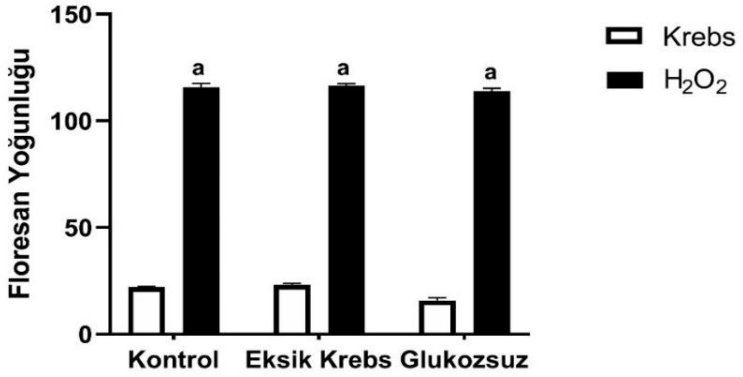
gibi, oksijenlenmiş ve pH' sı Krebs ile aynı olan fosfat tamponu içinde herhangi bir reaksiyonun gerçekleşmediği saptandı [two- way ANOVA, $F_{ortam}(1,4) = 2213$, $p < 0.0001$; $F_{H2O2}(1,4) = 4633$, $p < 0.0001$; $F_{ortam*H2O2}(1,4) = 1392$, $p < 0.0001$].



Şekil 6: H_2O_2 ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan yoğunluğunun inkübasyon ortamı ile ilişkisi. 20 µl DCFH-DA (10 µM) ile 20 µl H_2O_2 (10 mM)' den oluşan reaksiyon karışımları 2 ml fizyolojik ortam (oksijenlenmiş; pH: 7,4) ve fosfat tamponu (oksijenlenmiş; pH: 7,4) kullanılarak 37 °C' de su banyosunda karanlıkta 1 (bir) saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda bunların emisyon spektrumları 488 nm eksitasyon dalga boyunda alındı. (Şekil 6; [a] $p<0,001$, krebs kontrol grubuna; [b] $p<0,001$, fosfat H_2O_2 grubuna grubuna göre anlamlı derecede farklı)

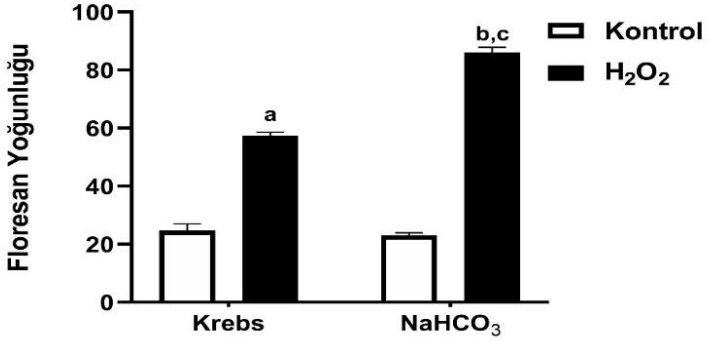
4.1.3. Krebs İçeriğinde Bulunan Maddelerin Etkisi

Şekil 6' da gösterilen bulgu, yukarıda belirtildiği gibi ortam pH'sı ve oksijenlendirilmesi benzer bile olsa fosfat tamponu içinde H_2O_2 ile DCFH-DA arasında bir reaksiyonun gerçekleşemediğini ifade etmektedir. Bu sonuç, Krebs yapısı içinde bulunan hangi madde veya maddelerin bu etkileşme için gerekli olduğu sorusunu gündeme getirmiştir. Bu amaçla önce $CaCl_2$, $MgSO_4$, KCl ve NaH_2PO4 içermeyen, ancak bunların yerine ekivalan miktarda NaCl eklenerek hazırlanan oksijenlendirilmiş krebs (pH 7,4) hazırlandı. Bu kompozisyondaki bir çözelti içinde hazırlanan reaksiyon karışımları ile normal Krebs içinde hazırlanan reaksiyon karışımlarında gözlenen ve H_2O_2 ile indüklenen floresan yoğunluğunda anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Şekil 7). Benzer şekilde, Krebs içinden glukozun çıkartılması da H_2O_2 ile indüklenen floresan yoğunluğunda anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 7).



Şekil 7: H_2O_2 ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan yoğunluğuna krebs kompozisyonunda bulunan maddelerin etkisi. 20 µl DCFH-DA (10 µM) ile 20 µl H_2O_2 (10 mM)' den oluşan reaksiyon karışımları 2 ml fizyolojik ortam (oksijenlenmiş; pH: 7,4), eksik Krebs ($CaCl_2$, $MgSO_4$, KCl ve NaH_2PO4 içermeyen; oksijenlenmiş; pH: 7,4) ve glukoz içermeyen krebs (oksijenlenmiş; pH: 7,4) kullanılarak 37 °C' de su banyosunda karanlıkta 1 (bir) saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda bunların emisyon spektrumları 488 nm eksitasyon dalga boyunda alındı. (Şekil 7; [a] p<0,001, kendi kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklı)

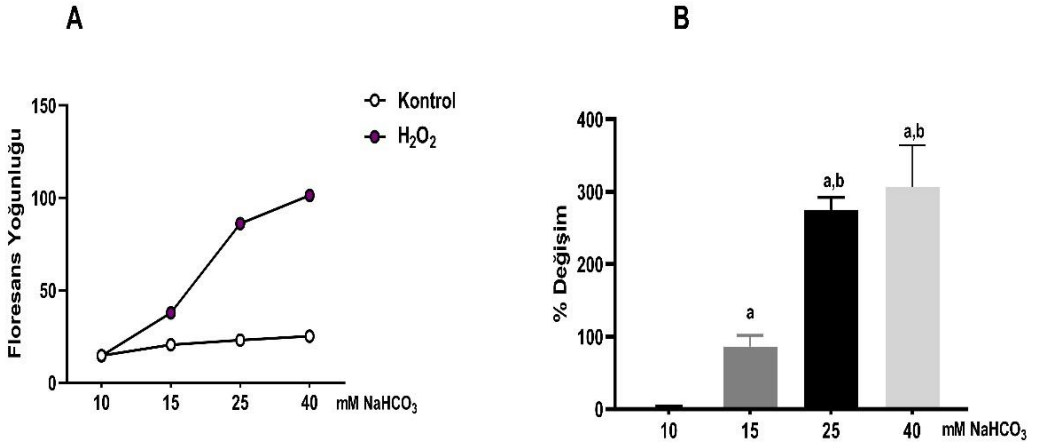
Son olarak gözlenen etkinin Krebs kompozisyonunda bulunan $NaHCO_3$' dan kaynaklanabileceği düşünülerek, 25mM' lık $NaHCO_3$ (oksijenlenmiş; pH 7,4) kullanılarak reaksiyon karışımları hazırlandı. İnkübasyon tüplerinin 37 °C' de karanlıkta 1 (bir) saatlik inkübasyonu sonrası Krebs içinde görülen etkiye benzer, hatta daha şiddetli H_2O_2 ile indüklenen floresan yoğunluğu saptandı [two- way ANOVA, $F_{ortam}(1,4) = 93,94$, $p < 0.0001$; $F_{H2O2}(1,4) = 1170$, $p < 0.0001$; $F_{ortam*H2O2}(1,4) = 46,95$, $p < 0.0001$] (Şekil 8).



Şekil 8: H_2O_2 ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan yoğunluğuna krebs kompozisyonunda bulunan $NaHCO_3$' ın etkisi. 20 µl DCFH-DA (10 µM) ile 20 µl H_2O_2 (5 mM)' den oluşan reaksiyon karışımları 2 ml krebs (oksijenlenmiş; pH: 7,4) ve 25 mM' lık $NaHCO_3$ (oksijenlenmiş; pH: 7,4) kullanılarak 37 °C' de su banyosunda karanlıkta 1 (bir) saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda bunların emisyon spektrumları 488 nm eksitasyon dalga boyunda alındı. (Şekil 8; [a] p<0,01, krebs kontrol grubuna; [b] p<0,001, NaHCO3 kontrol grubuna; [c] p<0,01 krebs H_2O_2 grubuna grubuna göre anlamlı derecede farklı)

4.1.4. $NaHCO_3$ Konsantrasyonunun Etkisi

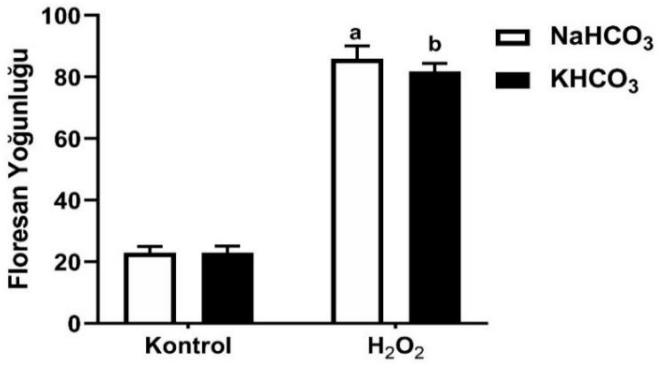
Yukarıdaki bulgu (Şekil 8), DCFH-DA ve H_2O_2 arasından gözlenen reaksiyon için ortamda bikarbonat iyonlarının gerekli olduğunu göstermektedir. Acaba gözlenen floresans yoğunluğu, ortamdaki bikarbonat konsantrasyonu ile ne kadar yakından ilişkilidir? Bu sorunun yanıtı artan konsantrasyonlarda $NaHCO_3$ kullanılarak test edildi. Şekil 9' da gösterildiği gibi ölçülen floresans yoğunluğunun $NaHCO_3$ konsantrasyonuna bağlı olarak artış gösterdiği saptandı [two- way ANOVA, $F_{konsantrasyon}$ (3,32) = 381,4, $p < 0.0001$; F_{H2O2} (3,32) = 584,1, $p < 0.0001$; $F_{konsantrasyon*H2O2}$ (1,32) = 1769, $p < 0.0001$] (Şekil 9).



Şekil 9: H_2O_2 ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan yoğunluğu üzerine $NaHCO_3$ konsantrasyonunun etkisi (Şeki 9A) ve yüzde değişimi (Şekil 9B). 20 μl DCFH-DA (10 μM) ile 20 μl H_2O_2 (5mM)' den oluşan reaksiyon karışımları 10mM, 15mM, 25mM ve 40mM' lık 2ml $NaHCO_3$ (oksijenlenmiş; pH: 7,4) çözeltisi kullanılarak 37 °C' de su banyosunda karanlıkta 1 (bir) saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda bunların emisyon spektrumları 488 nm eksitasyon dalga boyunda alındı. (Şekil 9B; [a] $p<0,001$, 10 mM $NaHCO_3$ grubuna; [b] $p<0,001$, 15 mM $NaHCO_3$ grubuna; [c] $p<0,001$ 25 mM $NaHCO_3$ grubuna göre anlamlı derecede farklı)

4.1.5. Bikarbonat Etkisi

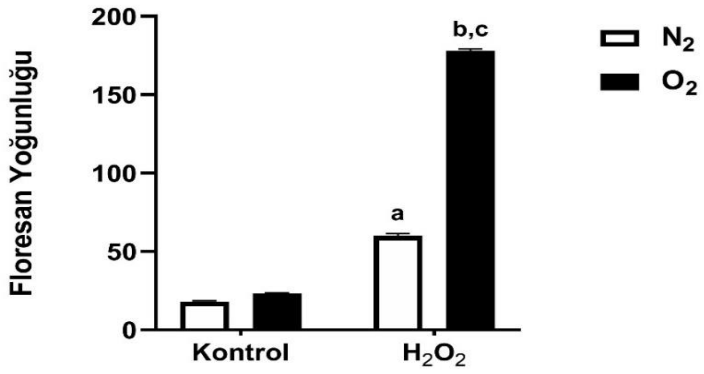
Şekil 8 ve Şekil 9, DCFH-DA ve H_2O_2 arasındaki reaksiyon için ortamda $NaHCO_3$ bulunması gerektiğini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Bu bulguyu bir adım daha desteklemek adına benzer çalışma $KHCO_3$ ve $NaHCO_3$ kullanılarak tekrar edildi. Şekil 10' da görüleceği gibi, 25 mM' lık $NaHCO_3$ çözeltisi ile gözlenen benzer bir etki, 25 mM' lık $KHCO_3$ ile de gözlendi [two- way ANOVA, F_{ortam}(1,16) = 2,7, $p=0.12$; F_{H2O2} (1,16) = 23,64, $p < 0.0001$; $F_{ortam*H2O2}$ (1,16) = 2,72, $p=0.12$].



Şekil 10: H_2O_2 ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan yoğunluğu üzerine bikarbonat (HCO_3^-) etkisi. 20 µl DCFH-DA (10 µM) ile 20 µl H_2O_2 (5 mM)' den oluşan reaksiyon karışımları 2 ml 25 mM' lık $NaHCO_3$ (oksijenlenmiş; pH: 7,4) ve 25 mM' lık $KHCO_3$ kullanılarak 37 °C' de su banyosunda karanlıkta 1 (bir) saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda bunların emisyon spektrumları 488 nm eksitasyon dalga boyunda alındı. (Şekil 10; [a]$p<0,001$, $NaHCO_3$ kontrol grubuna; [b] $p<0,001$, $KHCO_3$ kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklı)

4.1.6. İnkübasyon Ortamındaki Oksijenin Etkisi

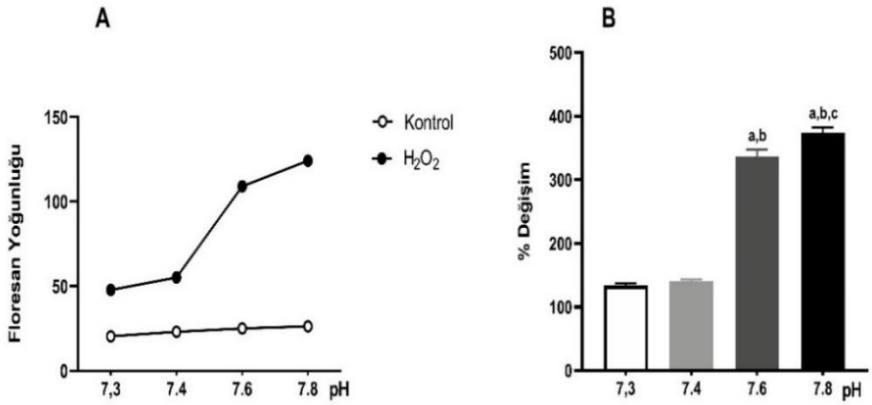
DCFH-DA' nın ve beyin dilimlerinin kullanıldığı ayrıca bu çalışmanın planlanmasına neden olan daha önceki bulgular (Demircan ve ark., 2014), oksijenlenmiş (% 95 O_2 ve % 5 CO_2) Krebste gözlenmişti. Bu nedenle çalışmanın bu kısmında H_2O_2 ile indüklenen floresan yoğunluğu üzerine ortamdaki oksijenin bir etkisinin olup olmadığına bakıldı. Bunun için oksijenlendirilmiş Krebs (pH 7,4) ve degaze edilerek azotlandılmış (% 95 N_2 ve % 5 CO_2) Krebs hazırlandı (pH 7,4). Şekil 11' de görüldüğü gibi, oksijen içeremeyen inkübasyon ortamında H_2O_2' nin neden olduğu floresans şiddetinin oksijenlenmiş ortamdan anlamlı olarak düşük olduğu saptandı [two- way ANOVA, $F_{gaz}(1,4) = 16746$, $p < 0.0001$; $F_{H2O2}(1,4) = 13076$, $p < 0.0001$; $F_{gaz*H2O2}(1,4) = 2607$, $p < 0.0001$].



Şekil 11: H_2O_2 ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan yoğunluğu üzerine oksijenin etkisi. 20 µl DCFH-DA (10 µM) ile 20 µl H_2O_2 (15Mm)' den oluşan reaksiyon karışımları 2 ml fizyolojik ortamda (oksijenlendirilmiş krebs ve degaze edilerek azotlandırılmış krebs) 37 °C' de su banyosunda karanlıkta 1 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda bunların emisyon spektrumları 488 nm eksitasyon dalga boyunda alındı. (Şekil 11; [a] $p<0,001$, N_2 kontrol grubuna; [b] $p<0,001$, O_2 kontrol grubuna; [c] $p<0,001$, N_2-H_2O_2 göre anlamlı derecede farklı)

4.1.7. pH Etkisi

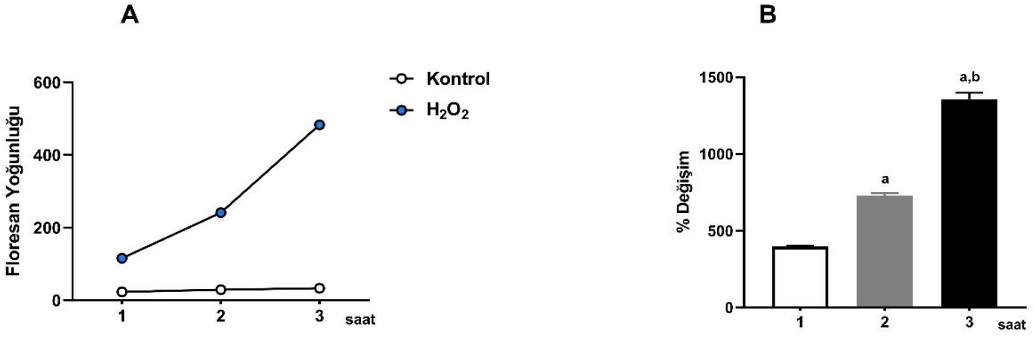
DCFH-DA kullanılarak fizyolojik ortamda (pH 7,4) gözlemlenen ve H_2O_2 ile indüklenen floresan yoğunluğu üzerine inkübasyon ortamı pH' sının etkisine bakıldı. Bu amaçla pH' ları farklı (7,8; 7,6; 7,45 ve 7,30) olacak şekilde Krebs çözeltileri hazırlandı. Kullanılan Krebsin pH'sı NaOH (0,1M) veya HCl (0.1M) kullanılarak istenen değerlere getirildi. Şekil 12' de görüldüğü gibi, ortam pH' sındaki artışa bağlı olarak floresan şiddetindeki artışın paralellik gösterdiği saptandı [two- way ANOVA, $F_{pH}(3,12) = 156$, $p < 0.0001$; $F_{H2O2}(1,4) = 1705$, $p < 0.0001$; $F_{pH*H2O2}(3,12) = 141$, $p < 0.0001$].



Şekil 12: H_2O_2 ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan yoğunluğu üzerine ortam pH' sının etkisi (Şekil 12A) ve yüzde değişimi (Şekil 12B). 20 µl DCFH-DA (10 µM) ile 20 µl H_2O_2 (5 mM)' den oluşan reaksiyon karışımları farklı pH değerlerine sahip 2 ml' lik fizyolojik ortamda 37 °C' de su banyosunda karanlıkta 1 (bir) saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda bunların emisyon spektrumları 488 nm eksitasyon dalga boyunda alındı. a, b, c, ve d spektrumları sırasıyla 7,8; 7,6; 7,45 ve 7,30 pH krebs içeren örneklere aittir (Şekil 12B; [a]p<0,001, 7,3 grubuna; [b] p<0,001, 7,4 grubuna; [c] p<0,001, 7,6 ' ya göre anlamlı derecede farklı).

4.1.8. İnkübasyon Süresinin Etkisi

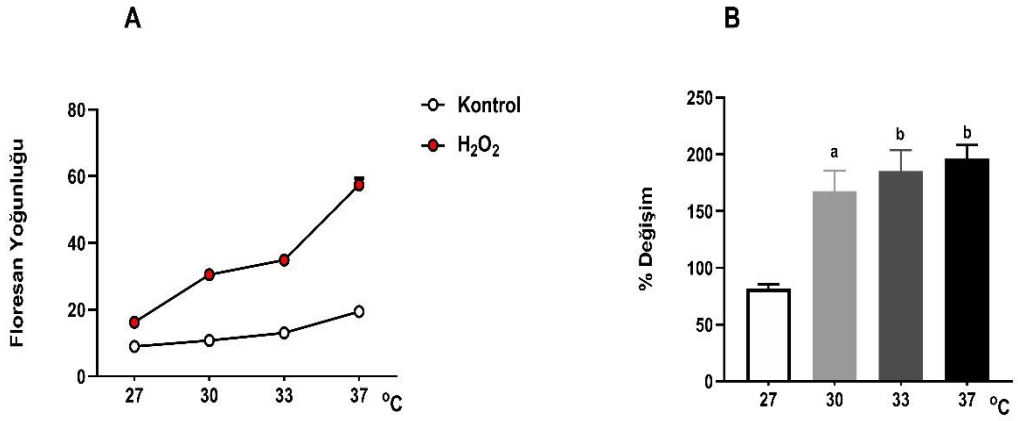
DCFH-DA kullanılarak fizyolojik ortamda (pH 7,4) 1 (bir) saatlik inkübasyon sonucunda gözlemlenen ve H_2O_2 ile indüklenen floresan yoğunluğu üzerine inkübasyon süresinin etkisine bakılmıştır. Bunun için hazırlanan reaksiyon karışımlarının 1, 2 ve 3 saatlik inkübasyon süresi sonundaki floresans yoğunlukları ölçüldü. Şekil 13' te görüldüğü gibi ölçülen floresans yoğunluğunun zamana bağlı olarak arttığı saptandı [two- way ANOVA, $F_{süre}(2,24) = 602,2$ p < 0.0001; $F_{H2O2}(2,24) = 667,1$ p < 0.0001; $F_{süre*H2O2}(2,24) = 3453$, p < 0.0001].



Şekil 13: H_2O_2 ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan yoğunluğu üzerine inkübasyon süresinin etkisi (Şekil 13A) ve yüzde değişimi (Şekil 13B). 20 µl DCFH-DA (10 µM) ile 20 µl H_2O_2 (10 mM)' den oluşan reaksiyon karışımları 2 ml fizyolojik ortamda (oksijenlenmiş) 37 °C' de su banyosunda karanlıkta 1, 2 ve 3 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda bunların emisyon spektrumları 488 nm eksitasyon dalga boyunda alındı. (Şekil 13B; [a] p<0,001, 1 saat grubuna; [b] p<0,001, 2 saat grubuna göre anlamlı derecede farklı)

4.1.9. Sıcaklığın Etkisi

Çalışmanın bu bölümümde inkübasyon ortamı sıcaklığının etkisi test edildi. Hazırlanan reaksiyon karışımları farklı sıcaklıklarda (27, 30, 33 ve 37 °C)' de 1 (bir) saat süreyle inkübe edildi. Şekil 14' de görüldüğü gibi sıcaklığa bağlı olarak floresan şiddetinin de arttığı saptandı [two- way ANOVA, $F_{sıcaklık}(3,32) = 76,33$, $p < 0.0001$; $F_{H2O2}(3,32) = 223,4$, $p < 0.0001$; $F_{sıcaklık*H2O2}(1,32) = 905,6$, $p < 0.0001$].



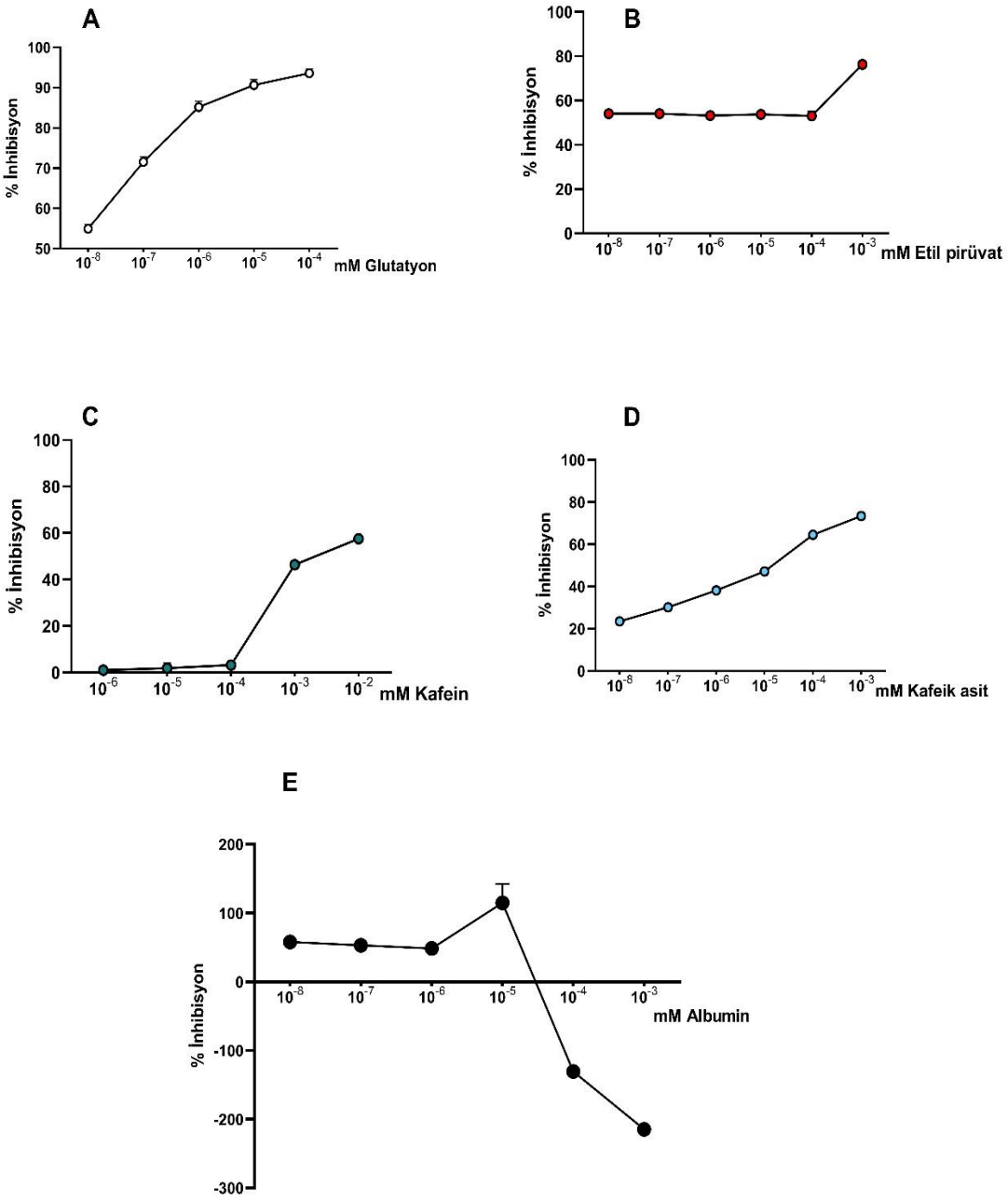
Şekil 14: H_2O_2 ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan yoğunluğu üzerine sıcaklığın etkisi (Şeki 14A) ve yüzde değişimi (Şekil 14B). 20 µl DCFH-DA (10 µM) ile 20 µl H_2O_2 (5 mM)' den oluşan reaksiyon karışımları 2 ml fizyolojik ortamda (oksijenlenmiş) 27, 30, 33 ve 37 °C' de su banyosunda karanlıkta 1 (bir) saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda bunların emisyon spektrumları 488 nm eksitasyon dalga boyunda alındı. (Şekil 14B; [a]$p<0,05$, 27 °C grubuna; [b] $p<0,001$, 27 °C grubuna grubuna göre anlamlı derecede farklı)

4.2. Bazı Antioksidanların Floresans Şiddeti Üzerine Etkisine İlişkin Deneysel Bulgular

4.2.1. Bazı Antioksidanların Krebste Görülen Floresans Şiddeti Üzerine Etkisi

DCFH-DA floresan bileşiği kullanılarak krebste gözlemlenen H_2O_2 (10 mM) kaynaklı floresan yoğunluğu üzerinde bazı antioksidanların etkinlikleri test edildi. Bunun için tipik reaksiyon karışımına 20 µl antioksidan çözeltisi eklendi ve standart inkübasyon uygulandı.

Glutatyon, etil pirüvat, kafein ve kafeik asit doza bağımlı bir şekilde H_2O_2 kaynaklı floresan yoğunluğunu önemli ölçüde azalttı (Şekil 15). Albumin belirli konsantrasyonlarda H_2O_2 kaynaklı floresan yoğunluğunu azaltırken, 10^{-5} ve üzeri konsantrasyonlarda floresan şiddetini artırdığı görüldü. (Şekil 15E).

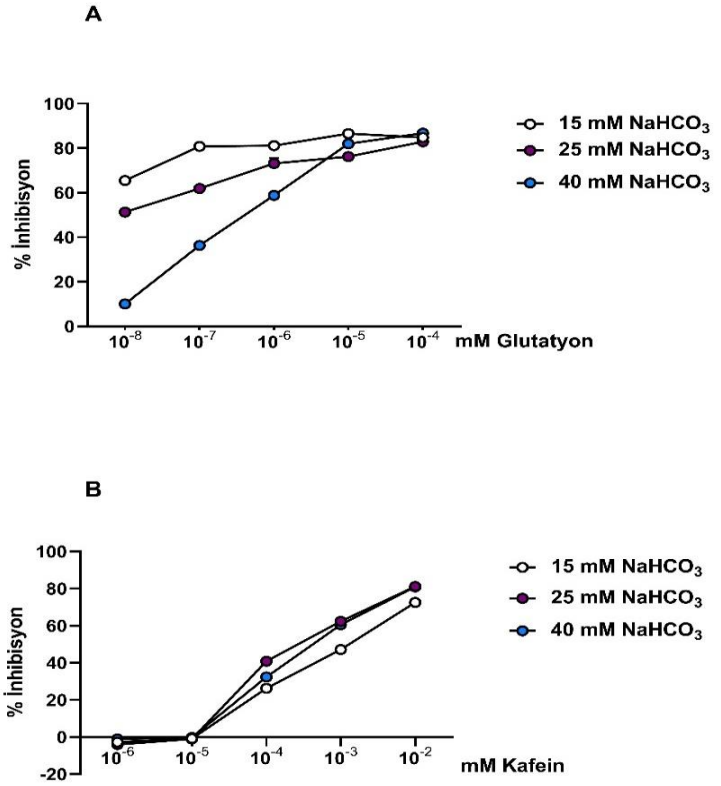


Şekil 15. Krebste H_2O_2 ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan şiddeti üzerine antioksidanların etkisi. 20 µl DCFH-DA (10 µM) ile 20 µl H_2O_2 (10mM)' den oluşan tipik reaksiyon karışımlarına inkübasyon başlangıcında değişen konsantrasyonlarda 20 µl glutatyon (A), etil pirüvat (B), kafein (C), kafeik asit (D), albümin (E) ilave edildi ve 37 °C' de su banyosunda karanlıkta 1 (bir) saat süreyle inkübasyon uygulandı. İnkübasyonun sonunda bunların emisyon spektrumları 488 nm eksitasyon dalga boyunda alındı.

4.2.2. Bazı Antioksidanların $NaHCO_3$ Çözeltisinde Görülen Floresan Şiddeti Üzerine Etkisi

DCFH-DA floresan bileşiği kullanılarak $NaHCO_3$ çözeltisinde gözlemlenen H_2O_2 (10 mM) kaynaklı floresan yoğunluğu üzerinde bazı antioksidanların etkileri test edildi. Bunun için 15 mM, 25 mM' ve 40 mM' lık $NaHCO_3$ çözeltileri ile hazırlanan reaksiyon karışımlarına 20 µl antioksidan (glutatyon ve kafein) çözeltisi eklendi ve standart inkübasyon uygulandı.

Krebste gözlenen etkiye benzer şekilde glutatyon ve kafein H_2O_2 kaynaklı floresan yoğunluğunu doza bağımlı olarak önemli ölçüde azalttı (Şekil 16).



Şekil 16. $NaHCO_3$ çözeltisinde H_2O_2 ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan şiddeti üzerine bazı antioksidan bileşiklerin inhibisyonu gözlemlendi. 20 µl DCFH-DA (10 µM) ile 20 µl H_2O_2 (10mM)' $NaHCO_3$den oluşan tipik reaksiyon karışımlarına inkübasyon başlangıcında değişen konsantrasyonlarda glutatyon (A) ve kafein (B) ilave edildi ve 37 °C' de su banyosunda karanlıkta 1 (bir) saat süreyle inkübasyon uygulandı. İnkübasyonun sonunda bunların emisyon spektrumları 488 nm eksitasyon dalga boyunda alındı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyolojik sistemlerde birçok fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynayan serbest radikaller dual etkileri olan moleküllerdir. Fizyolojik ortamlarda düşük konsantrasyonlarda yararlı etkiler gösterirken (örn. Hücrelerde mitoz ve profilerasyonun uyarılması gibi) (Zhang ve ark., 2018); yüksek konsantrasyonlarda ve özellikle de antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda oksidatif ve nitrozasif stres durumuna neden olarak hücre hasarı ve ölümüne neden olan patolojik olayları indüklerler ve biyomoleküllerde hasar oluştururlar (Phaniendra ve ark., 2015). Yapılan çalışmalar ile farklı yapıdaki serbest radikallerin konsantrasyonlarına bağlı olarak farklı roller üstlenebildiği, hatta radikallerin türüne, üretim yerine, bozunma ve difüzyon gibi özelliklerine bağlı olarak hücrelerde farklı şekilde davranabildiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2018). Bu nedenle serbest radikallerin kalitatif ve kantitaif analizlerinin doğru bir şekilde yapılması, fizyolojik ve patolojik olaylardaki rollerinin doğru bir şekilde ortaya konması ve patolojik etkilerine karşı etkin terapötik stratejilerin geliştirilmesi açısından son derece önemlidir. Ancak söz konusu radikallerin kısa ömürlü olmaları (örn. Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) yarılanma ömrü: 10^{-9} ms) (López-Jaén ve ark., 2013), birbirleri ile kolayca etkileşebilmeleri ve biyolojik sistemlerde içinde endojen antioksidanlar ile birlikte bulunmaları ölçümlerini olumsuz etkileyen başlıca faktörlerdir (Gomes ve ark., 2005)

Birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı düşünülen serbest radikallere olan ilginin giderek artmış olması, yerleşimlerinin, türlerinin ve miktarlarının doğru bir şekilde saptanması amacı ile *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerin geliştirilmesinin önünü açmıştır. Oksidasyona duyarlı floresan problarının kullanıldığı floresansa dayalı yöntemler bu amaçla sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Duyarlılıklarının yüksek ve uygulanabilirliklerinin kolay olması ve kısa sürede fazla sayıda veri elde edilmesine olanak sağlamaları söz konusu floresans moleküllerinin kullanımını arttıran başlıca faktörlerdir.

Bu çalışmaya konu olan DCFH-DA, biyolojik sistemlerde açığa çıkan reaktif oksijen türlerin miktarlarını saptamak amacı ile yaygın bir şekilde kullanılan bir moleküldür. Kendisi floresan özellik göstermez. Hücre içine kolayca geçerek burada esterazlar tarafından hidtolize edilerek DCFH' ya dönüşür. Hücre dışına çıkamayan bu parçalanma ürünü de floresans yayma özelliğinde değildir. Ancak DCFH, hücre içinde reaktif oksijen türleri tarafından oksitlenerek floreans yayma özelliğine sahip DCF' ye dönüşür. Reaktif oksijen radikallerinin miktarı ile yakın paralellik gösteren DCF' nin yaydığı floresans yoğunluğu farklı yöntemlerle (spektroflorometre gibi) ölçülerek, reaktif oksijen türlerinin miktarları saptanabilir.

Floresens yayma özelliğine sahip olmayan DCFH-DA, hücre/doku içeren biyolojik sistemlerde reaktif oksijen radikallerinin saptanması amacı ile kullanılan bir moleküldür. Yukarıda ifade edildiği gibi floresans özellik kazanması için hücre içi esterazlara gereksinim gösterir. Anabilim dalımızda sıçan kortikal beyin dilimlerinde reaktif oksijen radikallerinin miktarlarının DCFH-DA kullanılarak ölçüldüğü bir çalışmada, beklenmedik bir şekilde DCFH-DA' nın doku içermeyen fizyolojik ortamda hidrojen peroksit ile inkübe edildiğinde, ölçülen floreans yoğunluğunda bir artış meydana geldiği ve bu artışın hidrojen peroksit konsantrasyonu ile paralellik gösterdiği gözlenmişti (Demircan ve ark., 2014). Dolayısıyla bu çalışma gözlenen bu etkiyi karakterize etmek, DCHF-DA'nın doku içermeyen bir ortamda serbest oksijen radikallerinin saptanması amacı ile kullanılabilirliğini test etmek ve doku içeren fizyolojik bir ortamda kullanıldığında nelere dikkat edilmesini ortaya koymak amacı ile planlanmıştır.

Şekil 5' te verilen floresans spektrumları, Demircan ve arkadaşlarının (2014) gözlediği bulguların tekrarlanabilir nitelikte olduğunu işaret etmektedir. Doku içermeyen fizyolojik ortamdaki hangi faktör/faktörler hidrojen peroksitin neden olduğu bu etkide rol oynamaktadır? Çalışmanın sonraki bölümlerinde bu sorunun yanıtlarının ortaya konması amaçlanmıştır.

Demircan ve arkadaşlarının (2014) çalışmalarında kullandıkları fizyolojik ortam oksijenlendirilmiş Krebs çözeltisi (pH 7,4) olduğu için, bu çalışmada da aynı fizyolojik çözelti inkübasyon ortamı olarak kullanıldı. Materyal-metod kısmında belirtildiği gibi kullanılan Krebs, iyonik kompozisyonu ve pH'sı ekstrasellüler ortama benzeyen bir çözeltidir. Şekil 6' da pH' sı Krebs ile aynı

olan ve oksijenlendirilmiş fosfat tamponu kullanılarak elde edilen bulgular verilmiştir. Görüldüğü gibi bu özellikteki fosfat tamponu içinde DCHF-DA' nın hidrojen peroksit ile inkübasyonu floresans şiddetinde bir artışa neden olmadı. Bu bulgu Krebs kompozisyonunda bulunan bir madde veya maddelerin gözlenen etki için gerekli olduğunu işaret etmektedir.

Bulgular kısmında belirtildiği gibi Krebs içinde bulunan $MgSO_4$, KCl, $CaCl_2$, NaH_2PO_4 ve/veya glukozun çıkartılması ve bunların yerine ekivalan miktarda sodyum klorür ilavesi ile hazırlanan inkübasyon ortamı kullanıldığında (oksijenlendirilmiş ve pH'sı 7,4), hidrojen peroksidin indüklediği floresans şiddetinin değişmediği saptandı (Şekil 7). Aksine $NaHCO_3$ içermeyen oksijenlendirimiş ve pH'sı 7,4'e NaOH ile ayarlanmış inkübasyon ortamı içinde hidrojen perokside bağlı floresans şiddetinde bir artış saptanamaması, etkinin $NaHCO_3$'e bağlı olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 8). Aynı zamanda şekil 9' da görüldüğü gibi etki ortamdaki $NaHCO_3$ konsantrasyonu ile yakından ilişkilir; konsantrasyon artıkça (ancak pH sabit ve 7,4), hidrojen peroksidin indüklediği floresans yoğunluğu da artmaktadır. $NaHCO_3$ yerine aynı konsantrasyonda $KHCO_3$ kullanıldığında floresans şiddetindeki artışın değişmemesi (Şekil 10), gözlenen etki için ortamda HCO_3^- iyonları bulunması gerektiğini açık bir şekilde göstermektedir.

Hidrojen peroksidin doku içermeyen fizyolojik bir ortamda DCFH-DA ile inkübe edilmesi sonucu meydana gelen floresans yoğunluğundaki artışın HCO_3^- iyonlarına bağlı olduğu gösterildikten sonra, Krebs çözeltisi kullanılarak, etkiyi değiştirebilecek faktörlerin saptanması amaçlandı.

Demircan ve arkadaşlarının (2014) gözlediği ve bu çalışmada da benzer şekilde elde edilen bulgular (Şekil 5), oksijenlendirilerek pH' sı 7,4' e tamponlanmış Krebs içinde gözlenmişti. Dolayısıyla önce bu iki parametrenin olası etkisine bakıldı. Oksijen içermeyen Krebs kullanıldığında (degaze edilmiş su ile hazırlandı ve %95 N_2 + %5 O_2 karışımı ile gazlandırılarak pH'sı 7,4' e tamponlandı), hidrokjen peroksidin indüklediği floresans şiddetinin önemli ölçüde azaltığı saptandı (Şekil 11). Diğer taraftan etkinin pH' ya bağlı olduğu, özellikle pH' nın 7,4' ün üzerinde olduğu inkübasyon koşullarında ölçülen floresans yoğunluğunun da arttığı gözlendi (Şekil 12). İnkübasyon süresi

uzatıldığında veya inkübasyonun oda sıcaklığından daha yüksek koşullarda yapılması durumunda da ölçülen floresans şiddetlerinin arttığı saptandı (Şekil 13 ve Şekil 14).

Sonuç olarak;

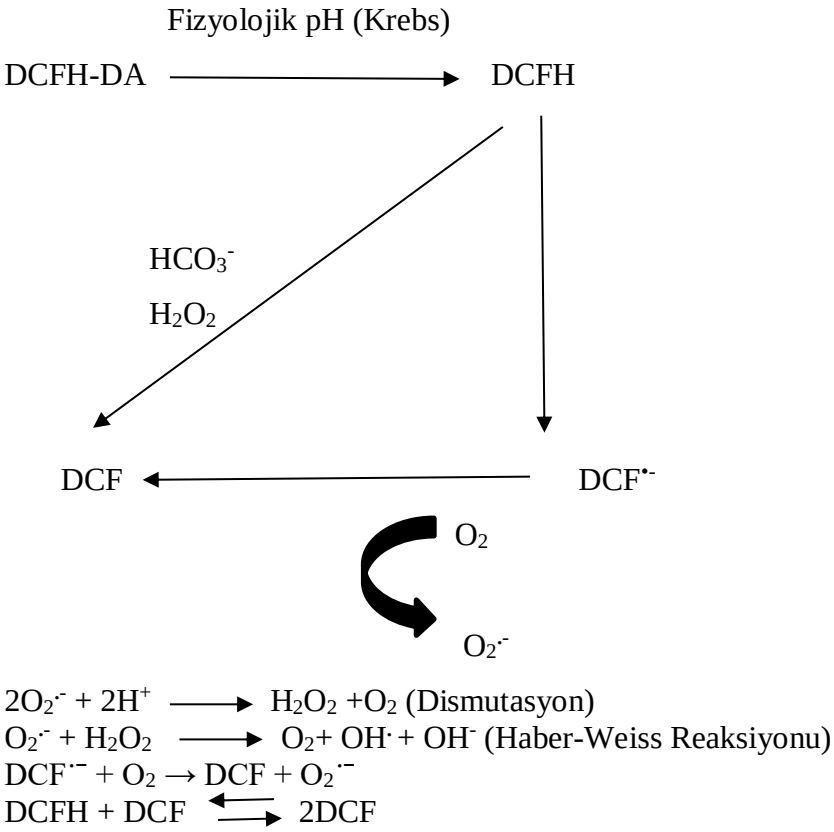
1) Doku içermeyen bir inkübasyon ortamında hidrojen peroksidin DCFH-DA ile reaksiyona girerek floresans artışına neden olabilmesi için inkübasyon ortamında mutlaka HCO_3^- iyonlarının ve O_2' nin bulunması gereklidir.

2) İnkübasyon süresinin uzatılması, pH'nın 7,4'ün üzerinde olması ve ortamın sıcaklığı gözlenen etkilerin büyüklüğünü etkileyen diğer deneysel parametrelerdir.

Konu ile ilgili yayınlara bakıldığında, DCFH-DA' nın, ortamda esterazlar olmasa bile, özellikle bazik pH' da spontan olarak DCFH' ye dönüşebildiği rapor edilmiştir (Kalinich ve ark., 1997)

Diğer taraftan bikarbonat iyonlarının, SOD1/H_2O2 /DCFH sisteminde, meydana gelen DCFH' nin DCF'ye oksidasyonunu da arttırdığı gösterilmiştir (Zhang, Joseph, Gurney, Becker, & Kalyanaraman, 2002).

Gözlenen etki açısından fizyolojik Krebs içinde çözünmüş halde bulunan oksijenin rolü nedir? Oksijenin ara serbest radikal $DCF^{\bullet-}$ ile reaksiyona girerek DCF ve $O_2^{\cdot-}$ radikalini meydana getirmesi olasıdır (Zhang ve ark., 2018). DCF'nin floresans yayması yanında, $O_2^{\cdot-}$ 'nin ortamdaki hidrojen iyonlarıyla dismutasyon reaksiyonuna girmesi sonucu hidrojen peroksit düzeyinde yapay bir artışa neden olması da olasıdır. Diğer taraftan, DCFH' nin hidrojen peroksit ile direkt reaksiyona girmediği bilinmektedir (Kobilka, 2012). Dolayısı ile DCFH' nin DCF' ye oksidasyonunun, hidrojen peroksitin ortamdaki süperoksit radikalleriyle vermiş olduğu Haber-Weiss Reaksiyonu ile oluşan hidroksil radikallerine bağlı olarak gerçekleşebilir (Şekil 15). Bu yöntemde oluşan DCF' nin kendisinin floresan şiddetine yol açması dışında DCFH' nin DCF' ye dönüşümünü indükleyen ve zincir reaksiyonu başlatan bir molekül gibi davrandığı da bildirilmiştir (Yu ve ark., 2021).



Şekil 15: Krebste ve bikarbonat çözeltisinde H_2O_2 ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan artışının olası mekanizması. DCFH-DA' nın DCF' ye dönüşümünde H_2O_2 ve HCO_3^- ' ın rolünün şematik gösterimi. Mekanizmaya ilişkin detaylar metin içinde verilmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçların önemi nedir? Yöntem *in vitro* koşullarda serbest radikallerin kalitatif ve kantitatif analizi için kullanılabilir mi? Belki de en önemlisi, DCFH-DA'nın biyolojik sistemlerde kullanılabilirliği ne kadar doğrudur veya yönetimin optimize edilmesi açısından nelere dikkat edilmesi gerekir?

Bulgular kısmında da görüleceği gibi bu çalışmada, hidrojen peroksit ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan şiddeti üzerine bazı antioksidan maddelerin etkileri hem fizyolojik Krebs, hem de $NaHCO_3$ çözeltisi içinde bakıldı. Glutatyon, kafein, albümin, kafeik asit ve etil piruvat gibi antioksidan özellik gösteren maddelerin belirli konsantrasyonlarda hidrojen peroksit ile indüklenen DCFH-DA kaynaklı floresan şiddetini azalttıkları gözlendi (Şekil 15). Bunlardan albüminin ilginç bir şekilde, belirli bir doza kadar floresan şiddetini azalttığı, ancak yüksek dozlarda floresan şiddetini daha da artırması gözlenlendi. Bu bulgu bazı

antioksidanların, özellikle yüksek konsantrasyonlarda prooksidan gibi davranabilecekleri gerçeğini akla getirmiştir (Wratten, Sereni, & Tetta, 2001)

Deney sonuçlarımız ve daha önce yapılan çalışmalar ışığında DCF oluşumuna bağlı floresan artışının tek bir yolakla gerçekleşmediği; bu yüzden yöntemin spesifik olarak ortamdaki hidrojen peroksit ya da diğer reaktif radikallerin kantitatif analizleri açısından güvenilir bir yöntem olmadığı, ancak ortamın oksidatif stres durumu hakkında genel bir bilgi verebileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan bu yöntemin, antioksidan kapasite ölçüm yöntemlerinden DPPH radikal süpürme kapasitesi yöntemi ile karşılaştırıldığında; özellikle suda çözünebilen antioksidan bileşiklerin test edilmesinde üstünlük sağlayabilir ve bunun bu anlamda araştırılması gerekir.

Daha önce de belirtildiği gibi DCFH-DA, hücre ve doku gibi biyolojik sistemlerde meydana gelen serbest oksijen radikallerinin kantitatif olarak saptanması amacı ile sıklıkla kullanılan bir probdur. Ancak bu çalışmadan elde edilen bulgular başta oksijenin varlığı ve ortam pH'sı olmak üzere birçok faktörün ölçülen floresans yoğunluğunu etkileyebileceğini göstermektedir. Bu nedenle biyolojik sistemlerin kullanıldığı çalışmalarda deneysel koşulların optimize edilmesi elde edilen sonuçların tutarlılığı açısından önemlidir.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen bulgular, DCFH-DA kullanılarak serbest radikallerin oluşma hızlarının veya ilaçların etkinliklerinin araştırılması amacı ile deney tasarlanırken;

1) DCFH-DA' nın deneysel koşullardan spontan olarak etkilenebileceği,

2) DCFH-DA' nın reaktif oksijen radikaleri ile etkileşmesi hidrojen peroksit ile sınırlı olmadığı için kalitatif değerlendirmeler açısından uygun olmadığı,

3) DCFH-DA kaynaklı floresans şiddetinin ortam koşulları yanında hücre içinde antioksidan özellik gösteren sistemler ile de etkilenebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

6. KAYNAKLAR

Agnez-Lima, L.F., Melo, J.T., Silva, A.E., Oliveira, A.H., Timoteo, A.R., Lima-Bessa, K.M. et al. (2012). DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutation Research,* 751(1), 15-28. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.12.005.

Andrew, P.J., Mayer, B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research,* 43(3), 521-31. https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00115-7

Antonenkov, V.D., Grunau, S., Ohlmeier, S., Hiltunen, J.K. (2010). Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxid Redox Signal,* 13(4), 525-537. https://doi.org/10.1089/ars.2009.2996

Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity,* 2014, 360438. https://doi.org/10.1155/2014/360438

Barber, D.A., Harris, S.R. (1994). Oxygen free radicals and antioxidants: A review. *American Pharmacy,* 34(9), 26-35. https://doi.org/10.1016/S0160-3450(15)30310-X

Barja, G. (2000). The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging (Milano),* 12(5), 342-55 https://doi.org/10.1007/BF03339859

Bartosz, G. (2006) Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clinica Chimica Acta,* 368(1-2), 53-76. https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.12.039

Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C., Thomas, M. (1983). Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol,* 130(4), 1910-1917

Beckman, J.S., Koppenol, W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol,* 271(5), 1424-37. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424

Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature,* 181, 1199-1200. https://doi.org/10.1038/1811199a0

Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 609-615. https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240

Bouayed, J., Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228-237. https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858

Brandt, R., Keston, A.S. (1965). Synthesis of diacetyldichlorofluorescin: a stable reagent for fluorometric analysis. *Analytical Biochemistry*, 11, 6-9. https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90035-7

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Budani, M.C., Tiboni, G.M. (2021). Novel insights on the role of nitric oxide in the ovary: A review of the literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), 980. https://doi.org/10.3390/ijerph18030980

Butterfield, D.A., Koppal, T., Howard, B., Subramaniam, R., Hall, N., Hensley, K., et al. (1998). Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone and vitamin E. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 448-62. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09924.x

Catalá, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. International Journal of *Biochemistry & Cell Biology*, 38(9), 1482-1495. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.02.010

Cheeseman, K.H., Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.*, 49(3), 481-93. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625

Commoner, B., Townsend, J., Pake G.E. (1954). Free Radicals İn Biological Materials. *Nature*, 174, 689-691. https://doi: 10.1038/174689a0

Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human disease. *Trends in Molecular Medicine*, 9(4), 169-176. https://doi.org/10.1016/s1471-4914(03)00031-5

Demircan, C., Gül, Z., Büyükuysal, R.L. (2014). High glutamate attenuates S100B and LDH outputs from rat cortical slices enhanced by either oxygen-glucose deprivation or menadione. *Neurochemical Research*, 39(7), 1232-1244. https://doi.org/10.1007/s11064-014-1301-7

Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1102–15. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00826-2.

Dooley, C.T., Dore, T.M., Hanson, G.T., Jackson, W.C., Remington, S.J., Tsien, R.Y. (2004). Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 22284-22293. https://doi.org/10.1074/jbc.M312847200

Duan, J., Kasper, D.L. (2011). Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen / nitrogen species. *Glycobiology*, 21(4), 401-9. https://doi.org/10.1093/glycob/cwq171

Fenton, H.J.H. (1876). Oxidation Of Tartaric Acid İn Presence Of İron. *Journal of the Chemical Society*, 65, 899-910. http://dx.doi.org/10.1039/ct8946500899

Fetner, R.H. (1962). Ozone induced chromosome breakage in human cell culture. *Nature*, 194, 793-4. https://doi.org/10.1038/194793a0

Fittschen, C. (2019). The reaction of peroxy radicals with OH radicals. *Chemical Physics Letters*, 725, 102-108. https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.04.002

Floyd, R.A. (1990). The role of 8-hydroxyguanosine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11(9), 1447-1450. https://doi.org/10.1093/carcin/11.9.1447

Förstermann, U., Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal* 33(7), 829-837. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304

Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., Apanasets, O. (2012). Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: İmplications for human disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(9), 1363-73. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.001

Ganesana, M., Erlichman, J.S., Andreescu, S. (2012). Real-time monitoring of superoxide accumulation and antioxidant activity in a brain slice model using an electrochemical cytochrome c biosensor. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(12), 2240-2249. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.540

Gerschman, R., Gilbert, D.L, Nye, S.W., Dwyer, P., Fenn, W.O. (1954). Oxygen Poisoning And X-İrradiation-A Mechanism İn Common. *Science* 119, 623-626. https://doi.org/10.1126/science.119.3097.623

Gomberg, M. (1900). An Instance Of Trıvalent Carbon. Triphenylmethyl. *J. Am Chem. Soc.*, 22(11), 757-771. https://doi.org/10.1021/ja02049a006

Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J.L.F.C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65(2–3), 45–80. https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003

Haber, F., Weiss, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc London (A)*, 147(861), 332-51. https://doi.org/10.1098/rspa.1934.0221

Halliwell, B., Clement, M.V., Long, L.H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 486(1), 10-13. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02197-9

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2006). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford 46. Sayfa

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1989.

Halliwell, B. (1987). Oxidants and human disease: some new concepts. *The FASEB Journal*, 1(5), 358-64. https://doi.org/10.1096/fasebj.1.5.2824268

Harman, D., (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298-300. https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298

Hollán, S. (1995). Free radicals in health and disease. *Haematologia*, 26(4), 177-189. https://doi.org/10.1097/00006205-199507000-00003

Ifeanyi, O.E. (2018). A Review on Free Radicals and Antioxidants. *International Journal of Current Research in Medical Sciences*, *4*(2), 123-133. https://doi.org/10.2174/1871526518666180628124323

Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chandhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(24), 9265-9. https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265

Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M. et al. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*, 10(23), 2495-505. https://doi.org/10.2174/0929867033456477

Kanovasky, J.R. (1989). Singlet oxygen production by biological systems. *Chemico-Biological Interactions*, 70(1-2), 1-28. https://doi.org/10.1016/0009-2797(89)90059-8

Karabulut, H., Gülay, M. Ş. (2016). Serbest Radikaller. *MAKÜ Saglık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 1(4), 50-59. http://edergi.mehmetakif.edu.tr/index.php/sabed/index

Kelly, F.J., Mudway, I., Krishna, M.T., Holgate, S.T. (1995). The free radical basis of air pollution: focus on ozone. *Respiratory Medicine*, 89(10), 647-656. https://doi.org/10.1016/0954-6111(95)90131-0

Keston, A.S., Brandt, R. (1965). The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Analytical Biochemistry*, 11(1), 1-5. https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90034-5

Kobilka, B. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Bone*, 23(1), 1-7. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030.

Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650. https://doi.org/10.1080/01926230290166724

Koshland, D.E. Jr (1992). The molecule of the year. *Science*, 258(5090), 1861. https://doi.org/10.1126/science.1470903

Kumar, V., Salam, A. (2018). A Review On Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Era'S Journal of Medical Research*, 5(1), 59-66. https://doi.org/10.24041/ejmr2018.63

Liebert, M.A. (2002). $HO_2^{\cdot}$: The Forgotten Radical. *Dna And Cell Biology*, 21(4), 251-257. https://doi.org/10.1089/104454902753759672

Liochev, S.I., Fridovich, I. (1994). The role of $O_2^{\cdot -}$ in the production of $HO^{\cdot}$: in vitro and in vivo. Free Radical Biology Medicine 16(1): 29-33. https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90239-9

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118-26. https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902

López-Jaén, A.B., Codoñer-Franch, P., Valls-Bellés, V. (2013) Free radicals: A review. Journal of Pediatric Biochemistry 3(3):115-121. https://doi.org/10.3233/JPB-130083

Loschen, G., Flohe, L., Chance, B. (1971). Respiratory chain linked H_2O_2 production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Letter* 18(2), 261-264. https://doi.org/10.1016/0014-5793(71)80459-3

McCord, J.M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase An enzymatic function for erythrocuprein (chemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-55. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5

Mittal, C.K., Murad, F. (1977). Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3', 5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(10), 4360-4. https://doi.org/10.1073/pnas.74.10.4360

Munteanu, I.G., Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. https://doi.org/10.3390/ijms22073380

Münzel, T., Afanas'ev, I.B., Kleschyov, A.L., Harrison, D.G. (2002). Detection of superoxide in Vascular tissue. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(11), 1761–1768. https://doi.org/10.1161/01.atv.0000034022.11764.ec

Papariello, G.J., Janish, M.A.M. (1966). Diphenylpicrylhydrazyl as an organic analytical reagent in the spectrophotometric analysis of phenols. *Anal. Chem.* 38, 211-214. https://doi.org/10.1021/ac60234a016

Pham-Huy, L.A., Hua, H., Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89-96.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26. https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0

Piszcz, P., ˙Zurawski, K., Glod, B.K. (2014). Application of HPLC to Study the Reaction of Free Radicals with Antioxidants and/or Toxins. *Journal ofChemistry*, 2014, 1-6. https://doi.org/10.1155/2014/385908

Prasad, A., Pospíšil, P., Tada, M. (2019). Editorial: Reactive oxygen species (ROS) detection methods in biological system. *Frontiers in Physiology*, 10, 1316. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01316

Prütz, W.A. (1996). Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 332(1), 110-20. https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0322

Radi, R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(23), 5839–5848. https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115

Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219-236.

Schrader, M., Fahimi, H.D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(12):1755-66. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.006

Sies, H., Menck, C.F. (1992). Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Research*, 275(3-6), 367–75. https://doi.org/10.1016/0921-8734(92)90039-r

Starkov, A.A. (2008). The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, 37-52. https://doi.org/10.1196/annals.1427.015

Staško, A., Brezová, V., Biskupi˘c, S., Mišík, V. (2007). The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. *Free Radical Research* 41(4), 379-390. https://doi.org/10.1080/10715760600930014.

Surai, P.F., Kochish, I.I., Fisinin, V.I. (2017). Antioxidant systems in poultry biology: Nutritional modulation of vitagenes. *European Poultry Science*, 81, 1612-9199. https://doi.org/10.1399/eps.2017.214

Szabó, C., Ischiropoulos, H., Radi, R. (2007). Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 6(8) 662-680. https://doi.org/10.1038/nrd2222

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009.

Yin, J., Xu, L, Porter, N.A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944-5972. https://doi.org/10.1021/cr200084z

Yu, D., Zha, Y., Zhong, Z., Ruan, Y., Li, Z., Sun, L., & Hou, S. (2021). Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: New insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *339*(January), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129878

Zhang, H., Joseph, J., Gurney, M., Becker, D., Kalyanaraman, B. (2002). Bicarbonate enhances peroxidase activity of Cu, Zn-superoxide dismutase: Role of carbonate anion radical and scavenging of carbonate anion radical by metalloporphyrin antioxidant enzyme mimetics. *Journal of Biological Chemistry* 277(2), 1013-1020. https://doi.org/10.1074/jbc.M108585200

Zhang, Y., Dai, M., Yuan, Z. (2018). Methods for the detection of reactive oxygen species. *Analytical Methods*, 10(38), 4625–4638. https://doi.org/10.1039/C8AY01339J

Winterbourn, C.C., Kettle, A.J. (2000). Biomarkers of myeloperoxidase- derived hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(5), 403-9. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00204-5

Winterbourn, C.C., van den Berg, J. J., Roitman, E., Kuypers, F.A. (1992). Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 296(2), 547-555. https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90609-Z

Wratten, M.L., Sereni, L., & Tetta, C. (2001). Oxidation of albumin is enhanced in the presence of uremic toxins. *Renal Failure*, 23(3-4), 563–571. https://doi.org/10.1081/JDI-100104738

Wright, J.S., Johnson, A.E.R., DiLabio, G.A. (2001). Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. J*ournal of the American Chemical Society*, 123(6) 1173–1183

7. SİMGELER VE KISATMALAR

DCF: 2', 7'- diklorofloresein
DCFH: 2', 7'- diklorofloresin
DCFH-DA: 2', 7'- diklorofloresin diasetat
DMSO: Dimetil sülfoksit
DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
H_2O_2: Hidrojen peroksit
HCO_3^-: Bikarbonat anyonu
mM: Milimolar
Ms: Milisaniye
$NaHCO_3$: Sodyum bikarbonat
$O_2^{\cdot -}$: Süperoksit radikali
O_2: Oksijen molekülü
$OH^{\cdot}$: Hidroksil radikali
RNT: Reaktif nitrojen türleri
ROT: Reaktif oksijen türleri
SOD: Süperoksit dismutaz
μM: Mikromolar

8. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince başta tüm bilgi, uygulama becerisi ve tecrübelerini benimle paylaşan; bu süreçte aşılmasını zor gördüğüm engellerde beni cesaretlendiren ve yoluma ışık tutan değerli danışmanım Prof. Dr. Gökhan Göktalay' a ve Prof. Dr. R. Levent Büyükuysal' a, yine bu süreçte gerek derslerde gerekse makale ve seminer sunumlarında çok değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşarak yoluma ışık tutan Anabilim Dalı öğretim üyleri; Prof. Dr. Sinan ÇAVUN, Prof. Dr. Vahide SAVCI, Prof. Dr. Mine Sibel GÜRÜN, Prof. Dr. Mehmet CANSEV ve Prof. Dr. M. Sertaç YILMAZ' a, Uzm. Kimyager Sami AYDIN' a, kıymetli zamanını bana ayırarak tez çalışmamın istatistiksel hesaplamalarında yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Zülfiye GÜL' e, desteklerini esirgemeyen anabilim dalındaki diğer tüm araştırma görevlileri, doktora ve yüksek lisans öğrencilerine, tanıdığım ilk günden beri güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen Anabilim dalı sekreteri Özlem KAYGISIZ'a, bu zorlu eğitim süresince bana destek olan Bursa Sosyal Güvenlik Kurumu Sağlık Sosyal Güvenlik Merkez Müdürü Ecz. Selman PINAR' a ve değerli mesai arkadaşlarıma, uzakta da olsalar varlıklarını her daim yanımda hissettiğim ve bu günlere gelmemi sağlayan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

9. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Erzincan' da doğmuştur. İlk, orta ve lise eğitimini Erzincan' da tamamlamıştır. 2015 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi' nden mezun olmuştur. 2015-2017 yılları arasında Trabzon Kanuni Eğitim ve Araştırma Hastanesi' nde çalışmıştır. 2017 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Yüksek Lisans Programına kabulünün ardından 1(bir) yıl süreyle kaydını dondurmuştur.

2018 yılında Bursa iline tayini sonrasında Bursa Sosyal Güvenlik İl Müdürlüğü Sağlık Sosyal Güvenlik Merkezi' nde çalışmaya başlayarak aynı zamanda yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.