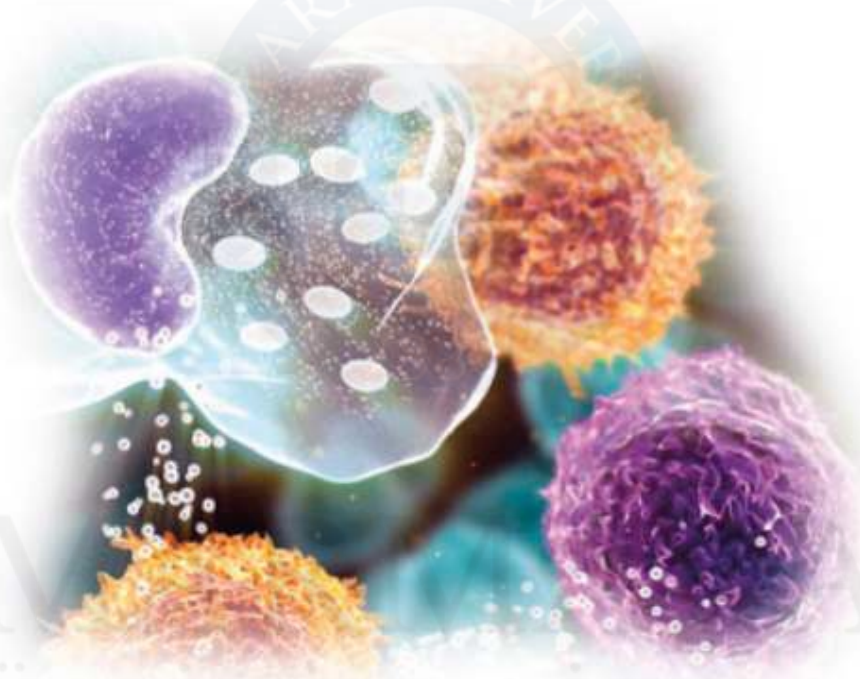
MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR



EDİTÖR
A. Süha Yalçın

EDİTÖR YARDIMCISI
Gökhan Biçim

YAZARLAR
Sema Eseryel - Nodira Alakbarova
Tülin Altınoluk - Ceren Avcılar
Ülkü Güven - Dyana Sarı
Nalan Sümeyra Korkmaz - Gökhan Biçim
A. Süha Yalçın

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR

Editör

A. Süha Yalçın

Editör Yardımcısı

Gökhan Biçim

Yazarlar

Sema Arslan Eseryel
Nodira Alakbarova
Ceren Avcılar
Tülin Altınoluk
Ülkügül Güven
Dyana Sarı
Nalan Sümeyra Korkmaz
Gökhan Biçim
A. Süha Yalçın

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Marmara Üniversitesi Yayınları: No. 891

SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR

Editör: Prof. Dr. A. Süha YALÇIN
Editör Yardımcısı: Öğr. Gör. Gökhan BİÇİM

Kapak Tasarım: Aleyna ATAÇ
Dizgi: Sevinç ZENGİN, Hakan TEMELOĞLU

Her hakkı saklıdır. © Marmara Üniversitesi Yayınevi, Aralık 2022
E-ISBN: 978-975-400-455-7

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Göztepe Kampüsü, Kadıköy 34722 İstanbul
Tel: +90 216 777 14 00
Fax: +90 216 777 14 01
E-Posta: yayinevi@marmara.edu.tr

Serbest radikaller ve antioksidanlar / editör A. Süha Yalçın; editör yardımcısı Gökhan Biçim ; yazarlar Sema Arslan Eseryel, Nodira Alakbarova, Ceren Avcılar, Tülin Altınoluk, Ülkügül Güven, Dyana Sarı, Nalan Sümeyra Korkmaz, Gökhan Biçim, A. Süha Yalçın.
İstanbul : Marmara Üniversitesi, 2022.
251 sayfa – (Marmara Üniversitesi Yayınları ; No. 891)
Bibliyografya ve indeks.
ISBN 978-975-400-455-7
1. -Free radicals (Chemistry) 2. Serbest radikaller (Kimya) 3. Antioksidanlar 4. Antioxidants
QD 471

Her hakkı saklıdır © Marmara Üniversitesi Yayınevi, 2022
Bu eserin tüm hakları Marmara Üniversitesi Yayınevi'ne aittir. Kaynak gösterilerek tanıtım amacıyla ve araştırma için yapılacak kısa alıntılar dışında, yayıncının yazılı izni olmaksızın hiçbir şekilde kopya edilemez, elektronik ve mekanik yolla çoğaltılıp, yayımlanamaz ve dağıtılamaz. Kitap içerisinde yer alan yazıların ve görsellerin her türlü sorumluluğu yazarlarına aittir.

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

KISALTMALAR / iv

ÖNSÖZ / ix

GİRİŞ VE KISA TARİHÇE / 1
Prof. Dr. A. Süha Yalçın

SERBEST RADİKAL KİMYASI / 8
Sema Arslan Eseryel / A. Süha Yalçın

OKSİDATİF STRES / 25
Nodira Alakbarova / A. Süha Yalçın

ANTİOKSİDANLAR / 38
Ceren Avcılar / A. Süha Yalçın

REAKTİF TÜRLERİN YARARLARI / 65
Tülin Altınoluk / A. Süha Yalçın

ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ / 93
Ülkügül Güven / A. Süha Yalçın

REAKTİF TÜRLERİN ZARARLI ETKİLERİ / 115
Dyana Sarı / A. Süha Yalçın

YAŞLANMA VE NÖROLOJİK HASTALIKLAR / 141
Nalan Sümeyra Korkmaz / A. Süha Yalçın

KANSER / 167
Dyana Sarı / A. Süha Yalçın

VİRAL ENFEKSİYONLAR / 184
Gökhan Biçim / A. Süha Yalçın

KAYNAKÇA / 196

DİZİN /221

Kısaltmalar

IL-4	İnterlökin-4
$^{\bullet}OH$	Hidroksil radikali
$^{1}O_{2}$	Singlet oksijen
8-OHdG	Hidroksi-2'-deoksiguanozin
A549	İnsan akciğer epitel hücresi
AAPH	2,2-azo bis 2-amidopropan dihidroklorür
ABTS	2,2-azino-bis (3-etilbenztiyazolin-6-sülfonik asit)
AH	Alzheimer hastalığı
AIDS	*Acquired Immune Deficiency Syndrome* / Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
Akt	Protein kinaz B
Al	Alüminyum
ALA	Alfa-lipoik asit
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
ALT	Alanin aminotransferaz
AP-1	*Activating protein-1* / Aktivator Protein-1
APP	Amiloid öncül proteinler
ARDS	*Acute Respiratory Distress Syndrome* / Akut Solunum Yetmezliği Sendromu
ARE	Antioksidan yanıt elemanları
ARP	N'-amino oksimetilkarbonilhidrazino-D-biyotin
As	Arsenik
ASK1	Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz
AsO_3^{3-}	Arsenit
AsO_4^{3-}	Arsenat
ATM	Serin teronin kinaz
Aβ	*Amiloid beta*
BMPO	3,4-dihidro-2-metil-1,1-dimetiletil ester-2H-pirol-2-karboksilik asit-1-oksit
BRCA1	Meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini
BRCA2	Meme kanseri tip 2 duyarlılık proteini
BrdU	5-bromo-2'-deoksiuridin
CAPE	Kafeik asit fenetil ester
CAT	Katalaz
Cdk	Siklin bağımlı protein kinazlar
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
CFTR	Kistik fibrozis transmembran proteini
Cl^{-}	Klorür
Cl_2	Klorin
Co	Kobalt
CoV	Koronavirüsü
COX	Siklooksijenaz
cpYFP	*mt-circularly permutated yellow fluorescent protein*
Cu	Bakır
CYP	Sitokrom P450 Enzimleri
CYP25	Sitokrom P450, Aile 25
CYP2E1	Sitokrom P450 2E1

DAAO	D-amino asit oksidazı
DAB	3,3-diaminobenzidin
DABCO	1,4-diazobisiklo-(2,2,2)-oktan
DAMP	Hasar ilişkili moleküler pattern
DCFH-DA	DCFH'nin diasetat formu
DCFH	2,7-diklorodihidrofloresein
DEPMPO	P-(3,4-dihidro-2-metil-1-oksido-2H-pirol-2-yl)-fosfonik asit, dietil ester
DHA	Dokosaheksaenoik asit
DHE	Dihidroetidyum
DHLA	Dihidrolipoik asit
DHR	Dihidrorodamin
DMPO	5,5-dimetil-pirolin N-oksittir
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNPH	Dinitrofenil hidrazin
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ER	Endoplazmik retikulum
ERK	Ekstrasellüler sinyal ile regüle olan kinaz
ESR/EPR	Elektron spin rezonans / Elektron paramanyetik rezonans
Fe	Demir
FOXO	Fox proteinleri
FRAP	Ferrik indirgeyici antioksidan güç
GLUT 2	Glukoz taşıyıcısı 2
GLUT	Glukoz taşıyıcısı
GPx	Glutatyon peroksidaz
GPx1	Glutatyon peroksidaz 1
GPx2	Glutatyon peroksidaz 2
GR	Glutatyon redüktaz
GRX	Glutaredoksin
GSH	Glutatyon
GSSG	Glutatyon disülfit
GST	Glutatyon S-transferazlar
GTP	Guanozin trifosfat
H_2O_2	Hidrojen peroksit
H_2S	Hidrojen sülfür
HBV	Hepatit B virüsü
HBx	Hepatit B virüs X protein
HCO_4^-	Peroksomonokarbonat
HCV	Hepatit C virüsü
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HE	Hidroetidin
HepG2	İnsan hepatoblastoma hücresi
HH	Huntington hastalığı
HIV	*Human Immunodeficiency Virus* / İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HMPV	İnsan metapneumovirüs
HNE	4-hidroksinonenal

HNO_2	Nitroz asit
HNO_3	Nitrik asit
HO	Hem oksijenaz
HOBr	Hipobromöz asit
HOCl	Hipokloröz asit
HP-I	Hidroperoksidaz I
HP-II	Hidroperoksidaz II
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPV	*Human Papillomavirus* / İnsan Papilloma Virüsü
HRP	*Horseradish peroxidase*
HRV	*Human Rhinovirus* / İnsan Rinovirüsü
hsCRP	Yüksek hassasiyetli C-reaktif proteini
I^-	İyodür
IBD	Inflamatuar bağırsak hastalığı
IFN-γ	İnterferon gama
IGF-1	İnsülin-benzeri büyüme faktörü 1
IgG	İmmunoglobülin G
IL-1	İnterlökin-1
IL-10	İnterlökin-10
IL-1ß	İnterlökin-1-beta
IL-2	İnterlökin-2
IREG1	Demir ayarlı taşıyıcı-1
IV	İnfluenza virüsü
iNOS	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
JEV	Japon ensefalit virüsü
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOOH	Lipit hidroperoksitleri
LOX	Lipoksijenaz
LTB4	Lökotrien B4
MAPK	Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein 1
MDA	Malondialdehit
MDM2	*Mouse Double Minute 2 homolog* / Fare çift minik 2 homoloğu
MERS virüsü	Ortadoğu Solunum Sendromu Virüsü
metHb	Methemoglobin
Mn	Mangan
MNP	2-Metil-2-nitrosopropan
MnSOD	Mangan süperoksit dismutaz
MPO	Miyeloperoksidaz
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidro piridin
mtDNA	Mitokondriyal DNA
mTOR	Memeli rapamisinin mekanik hedefi
N_2O_4	Diazot tetraoksit
Na_2SeO_3	Sodyum selenit
NAC	N-asetil sistein
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NED	N-(1-naftil)-etilendiamin hidroklorür
NET	Nötrofil ekstraselüler tuzak
NF-kB	Nükleer faktör kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO^-	Nitroksi anyonu
$NO^\bullet$	Nitrik oksit
NO^+	Nitrozil katyonu
$NO_2^\bullet$	Azot dioksit
NO_2^+	Nitronyum katyonu
NOB	Nitrozobenzen
$NOO^\bullet$	Azot dioksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NOX	NADPH oksidaz
Nrf1/Nrf2	*Nuclear respiratory factor 1/2*
NSL	Nöronal seroid lipofuksinoz
$O_2^{\bullet-}$	Süperoksit
O_3	Ozon
$OH^\bullet$	Hidroksil radikali
$ONOO^-$	Peroksinitrit
ONOOH	Peroksinitrik asit
ORAC	Oksijen radikali absorpsiyon kapasitesi
PAF	Trombosit aktive edici faktör
PAMP	Patojen ilişkili moleküler paternler
PBN	Alfa-fenil N-üçüncül-bütil nitron
PDGF	Trombosit türevi büyüme faktörü
PDI	Protein-disülfit izomeraz
PGC-1α	Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama koaktivatörü 1-alfa
PGK	Protein kinaz G
PH	Parkinson hastalığı
PHGPx	Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PKA	Protein kinaz A
PLA2	Fosfolipaz A2
POBN	C-(4-Piridin-N-oksit)-N-tert-butilnitron
PRR	Patern tanıma reseptörü
Prx	Peroksiredoksinler
PTEN	Fosfataz ve tensin homoloğu
PUFA	Çoklu doymamış yağ asidi
RES	Retiküloendotelyal sistem
rhCAT	Rekombinant insan katalaz
rNDP	Ribonükleotit difosfat redüktaz
RNR	Ribonükleotit redüktaz
$RO^\bullet$	Alkoksil radikali
roGFPs	*Redox oxidation-sensitive green fluorescent proteins*

RONO	Alkilperoksi nitrit
ROO•	Peroksi radikali
ROOH•	Hidroperoksil radikali
ROS	*Reactive oxygen species*
ROT	Reaktif oksijen türleri
RPE	Retina pigment epiteli
RS•	Tiyil radikali
RSO•	Sülfenil
RSO_2•	Tiyil peroksil
RSS:	Reaktif kükürt türleri
RSV	Solunum sinsitiyal virüsü
RT	Reaktif türler
SAM	S-adenozil-metiyonin
SARS virüsü	Ağır Akut Solunum Yolu Yetersizliği Sendromu
SARS-CoV-2	Ağır Akut Solunum Yolu Sendromu Koronavirüs 2
SCA	Yaşlı hücre antijeni
SIRT3	Mitokondriyal Sirtuin3
SN	Substantia nigra
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Süperoksit redüktazlar
SUVIMAX	*Supplementation en Vitamines et Mineraux Antioxydants*
T3	3,3,5-triiyodotironin
T4	Tiroksin
TAG	Triaçilgliserol
TBA	Tiyobarbitürik asit
TEMP	2,2,6,6-tetrametilpiperidin
TEMPD	2,2,6,6-tetrametil-4-piperidon
TLC	İnce tabaka kromatografisi
TLR	Toll-like reseptör
TMB	3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin
TNF-α	Tümör nekroz faktörü α
TNF	Tümör nekroz faktörü
TP-FLIM	*Two photon fluorescence lifetime imaging microscopy*
TP-FRIM	*Two photon fluorescence ratio imaging microscopy*
TPO	Tiroid peroksidaz
TRAP	Toplam (peroksil) radikal yakalama antioksidan parametresi
TRPM2	*Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 2*
TRX	Tiyoredoksin
Tyr-O•	Tirozil serbest radikali
UV	Ultraviyole
VCAM1	Hücreiçi adezyon molekülü-1
XO	Ksantin oksidaz
Zn	Çinko

Önsöz

Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans programında uzun yıllardır vermekte olduğum "Serbest Radikaller ve Antioksidanlar" dersinin ürünü olan bu kitap 2019-2020 ders yılında bu dersi alan öğrencilerin katkısıyla hazırlandı. Araya bütün dünyayı etkileyen COVID-19 pandemisi girdiği için kitabın son şeklini alması biraz zaman aldı. Bu süreçte öğrencilerin bir kısmı eğitimlerini tamamladı ve bölümümüzden ayrıldı. Kitabın yayımı için desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu ile Doç. Dr. Saime Batırel'e ve metnin tümünü titizlikle gözden geçirerek katkı ve önerilerini ileten Prof. Dr. Necla Toker'e içtenlikle teşekkür ediyorum.

Prof. Dr. A. Süha Yalçın
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Serbest radikal oluşumundaki artış ve/veya antioksidan sistemdeki yetersizlikten kaynaklanan oksidatif stres günümüzde birçok hastalığın etyopatogenezinde etkin bir rol oynamaktadır. Bu nedenle yoğun tartışma ve araştırmalara konu olmuş ve olmaya devam etmektedir. Prof.Dr. A.Süha Yalçın'ın editörlüğünde hazırlanan bu kitap serbest radikallerin kimyasal yapısı, hücre ve dokularda yol açtığı hasar ile bu hasara karşı korunma yöntemleri hakkında temel bilgileri içermektedir. Ayrıca serbest radikallerin bazı fizyolojik ve patolojik koşullardaki rolünü de ayrıntılı biçimde belirtmektedir. ''Serbest Radikaller ve Antioksidanlar" başlıklı bu kitabın konuyla ilgilenenlere ve genç araştırıcılara yararlı bir kaynak olacağı düşüncesindeyim. Yazarları bu alana yaptıkları katkı nedeniyle kutluyorum.

Prof.Dr. Müjdat Uysal
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Emekli Öğretim Üyesi

Giriş ve Kısa Tarihçe

A. Süha Yalçın*

Serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki etkileriyle ilgili ilk bilgiler 19. yüzyılın sonlarına doğru ortaya çıkmıştır. Bu alanın öncülerinden olan Fenton, 1876 yılında bazı oksitleyici ajanların varlığında Fe^{+2} iyonlarının çok güçlü ve sıra dışı bir özellikleri olduğunu bildirdi. Sonraki yıllarda bu gözlemlerini geliştirerek günümüzde Fenton ayıracı veya Fenton reaksiyonu olarak bilinen kavramı oluşturdu.[1] Haber ve Weiss 1934 yılında Fe^{+2}/H_2O_2 sisteminde serbest hidroksil radikallerinin etkili olduğunu gösterdiler.[2] Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları oksijen kaynaklı zararlı bileşiklerin temelini oluşturmaktadır.[3] Serbest radikallerin varlığının biyolojik sistemlerde varlığının gösterilmesi 1954 yılında mümkün olmuştur.[4] Fenton kimyası ve süperoksit radikalinin zararlı etkileriyle ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Bunlardan çığır açan birisi Fridovich tarafından süperoksit radikalini etkisizleştiren süperoksit dismütaz enziminin keşfidir.[5] Süperoksit dismütaz enziminin keşfinden sonra, serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki etkilerini inceleyen araştırmalar ikinci bir çağa girmiştir.

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

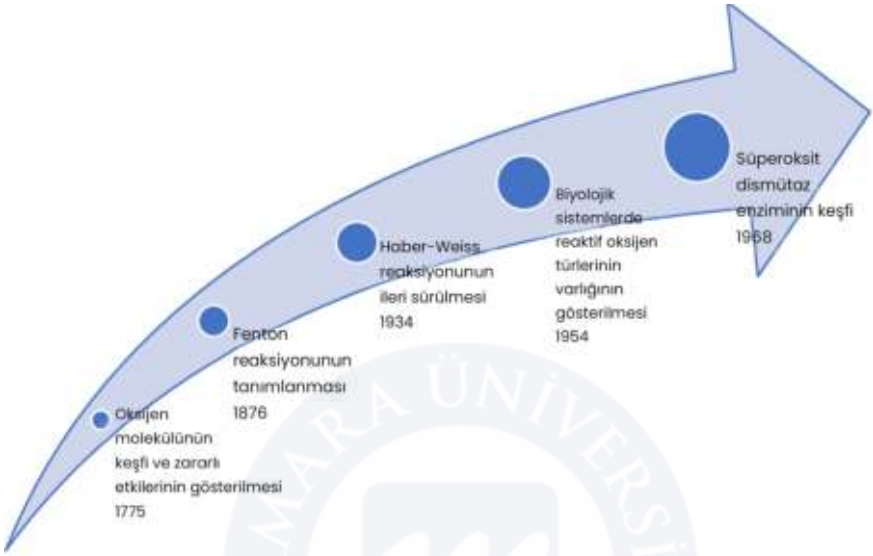
1 Wardman, P., & Candeias, L. P. (1996). Fenton Chemistry: An Introduction. *Radiation Research*, *145*(5), 523-531. https://doi.org/10.2307/3579270.

2 Haber, F., Weiss, J., & Pope, W. J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A – Mathematical and Physical Sciences*, *147*(861), 332-351. https://doi.org/10.1098/rspa.1934.0221.

3 Kehrer, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology, 149*(1), 43-50.

4 Commoner, B., Townsend, J., & Pake, G. E. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature, 174*(4432), 689-691.

5 McCord, J. (1988). 1. Fridovich, Superoxide dismutase: The first twenty years (1968-1988). *Free Radical Biology and Medicine*, *5*, 363-369.



Serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki etkileriyle ilgili araştırmaların ilk evresi

Öte yandan Harman 1956 yılında yaşlanmanın oksidatif hasarla ilişkisini ve serbest radikal teorisini öne sürdü. [6] Daha sonra 1972 yılında yaşlanmaya yol açan esas etkenin hücrede kusurlu mitokondrilerin artışı olduğunu bildirdi. [7] Buna rağmen serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki rolü ve önemi 1970'lerin başlarına kadar bilim çevrelerinde genel kabul görmemişti. Bunun başlıca nedeni radikallerin dayanıksız yapıları ve tespit edilmelerinin çok zor olmasıydı.



Denham Harman [8]

6 Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, *11*(3), 288-300.

7 Harman, D. (1972). The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society*, *20*(4), 145-147.

8 Science of Aging, *Denham Harman Proposes The Free Radical Theory Of Aging*. Retrieved 23.10.2022 from https://www.science-of-aging.com/timelines/harman-free-radical-theory.html.

Bu engel 1980'li yıllarda ESR/EPR spektroskopisi ile yapılan çalışmalar sayesinde aşıldı. [9] Bir başka önemli gelişme de floresan probların araştırmalarda kullanılması oldu. [10] Böylece serbest radikallerin hücre düzeyindeki etkileri ayrıntılı olarak incelenebildi ve hücrede lipitler, proteinler, nükleik asitler gibi pek çok yapıya zarar verdikleri gösterildi.



Serbest radikallerin şematik gösterimi [11]

Yine bu sayede 1980'li yıllarda "oksidatif stres" ve "reaktif oksijen türleri" gibi kavramlar geliştirildi, serbest radikallerin fizyolojik süreçlerde rol aldıkları anlaşıldı. [12] Redoks reaksiyonları çok çeşitli biyokimyasal süreçlerde önemli rol oynarlar. Serbest radikallerin ve reaktif türlerin yararlı etkileri üzerine çok sayıda çalışma yapılmış olup bu konular temelde redoks biyolojisi ile ilgilenen araştırıcıların ilgi alanını oluşturur. Hücresel redoks reaksiyonları antioksidanlar aracılığıyla dengede tutulmaya çalışılmaktadır. Dengede olmadıkları zaman ise birçok hastalık ortaya çıkmaktadır. [13]

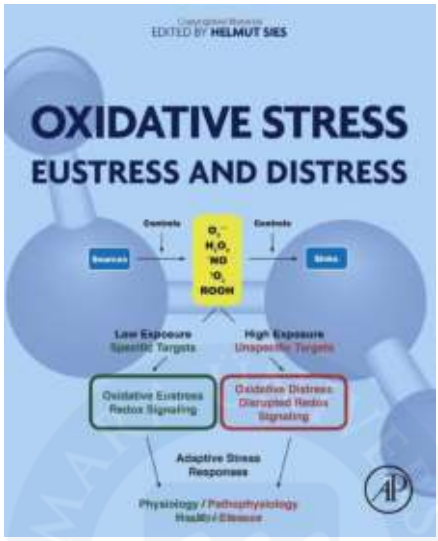
9 Kohno, M. (2010). Applications of electron spin resonance spectrometry for reactive oxygen species and reactive nitrogen species research. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 100.617.0036-100.617.0036.

10 Wardman, P. (2007). Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biology and Medicine*, *43*(7), 995-1022.

11 National Institute of Environmental Health Sciences (07.07.2021). *Electron paramagnetic resonance/electron spin resonance (EPR/ESR)*. Retrieved 23.10.2022 from https://www.niehs.nih.gov/research/resources/epresr/index.cfm.

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

13 Sies, H. (2019). Chapter 13 – Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. In G. Fink (Ed.), *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (pp. 153-163). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8.



Oksidatif Stres – Östres ve Distres [14]

Reaktif oksijen türlerinin hücredeki varlığı gösterilmesine karşın uzunca bir süre oluşum mekanizmaları hakkındaki bilgiler sınırlıydı. Ancak 1970'li yıllarda, mitokondriyal elektron taşıma zincirinde hidrojen peroksit oluştuğu gösterildi. Bir süre sonra da hidrojen peroksit oluşumunda esas öncül molekülün süperoksit radikali olduğu bildirildi. Aynı yıllarda fagositlerdeki solunum patlamasında da hidrojen peroksit oluştuğu düşünülmekteydi. Daha sonraları solunum patlaması olayından NADPH oksidaz (NOX) enziminin sorumlu olduğu ve burada da esas etkenin süperoksit radikali olduğu anlaşıldı. [15] Günümüzde NOX enzim sisteminin fagositer hücreler dışında hemen hemen tüm hücrelerde var olduğu ve sinyal ileti mekanizmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir. [16]

Serbest radikal araştırmaları ile ilgili çok önemli bir başka gelişme 1987 yılında nitrik oksit ile endotel kaynaklı gevşetici faktörün aynı molekül olduğunun saptanması olmuştur. [17] Öyle ki takip eden yıllarda bu molekülün kardiyovasküler sistemdeki düzenleyici etkilerini gösteren

14 Sies, H. (2009). *Oxidative stress eustress and distress*. Retrieved 23.10.2022 from https://www.elsevier.com/books/oxidative-stress/sies/978-0-12-818606-0.

15 Flohé, L. (2020). Looking back at the early stages of redox biology. *Antioxidants*, *9*(12), 1254.

16 Brown, D. Griendling. KK.(2009). NOX proteins in signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*, *47*, 1239-1253.

17 Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(24), 9265-9269.

araştırıcılara 1998 yılı Nobel Ödülü verilmiştir. [18] Günümüzde serbest radikallerin zararlı etkilerinin dışında süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif türlerin ikinci haberci olarak iş gördüğü ve sinyal ileti mekanizmaları yolu ile hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde etkili olduğu yaygın olarak kabul görmektedir. [19]

Ayrıca, nitrik oksitin süperoksit radikali ile reaksiyona girerek peroksinitrit molekülünü oluşturduğu ve onun da oksidasyona uğrayarak endotel hasarına yol açan hidroksil radikalin kaynağı olduğu da bilinmektedir. [20] Bu nedenle nitrik oksit molekülü hem zararlı hem de koruyucu etkilerinden dolayı Janus'un iki yüzüne benzetilmiştir. [21]



Janus'un İki Yüzü [22]

Serbest radikallerin hücrelerdeki zararlı etkileriyle ilgili olarak; uzun yıllar başlıca hasar göstergesi lipit peroksidasyonu olmuştur. [23] Antik çağlardan beri oksijen varlığında lipitlerin bozulduğu ve özellikle zeytinyağının depolanmasında acılaşmanın büyük problem oluşturduğu bilinmektedir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) oksidasyon

18 Smith, O. (1998). Nobel Prize for NO research. *Nature Medicine*, *4*(11), 1215.

19 Forman, H. J., Maiorino, M., & Ursini, F. (2010). Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*, *49*(5), 835-842.

20 Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., & Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(4), 1620-1624.

21 Snyder, S. H. (1993). Janus faces of nitric oxide. *Nature*, *364*(6438), 577-577.

22 Thefeeherytheory (30.11.2010). *Two faces of janus*. Retrieved 23.10.2022 from https://www.thefeeherytheory.com/two-faces-of-janus/.

23 Tappel, A. (1973). Lipid peroxidation damage to cell components. *Federation Proceedings*, 32, 1870-1874.

ürünlerini ve etkilerini araştıran pek çok çalışma yapılmış ve bu ürünlerin hücrede birçok zararlı etkisi olduğu gösterilmiştir. [24] Proteinlerle ilgili çalışmalar lipitlerden daha sonra gündeme gelmiş olmakla birlikte protein oksidasyonu üzerine de çok sayıda araştırma yapılmıştır. Biyolojik sistemlerin esas bileşenleri olmaları ve hücresel fonksiyonlardaki transport, sinyal iletisi ve şaperon aktivitesi gibi çeşitli rolleri nedeniyle proteinlerin oksidatif hasara uğramaları önemli sonuçlar doğurmaktadır. [25] Oksidatif protein hasarının ve protein oksidasyonunun yaşlanma sürecinde çeşitli hastalıkların gelişiminde başlıca etken olduğu da öne sürülmüştür. [26] DNA'daki oksidatif hasarın varlığı ise 1980'li yıllara kadar gösterilememişti. Frenkel ve arkadaşları 1981 yılında hem kimyasal yolla hem de radyasyonun etkisiyle oksidasyona uğratılan DNA hasarı sonrasında timidin glikolün oluştuğunu gösterdiler. [27] Bundan kısa bir süre sonra 8-hidroksi-2-deoksiguanozinin DNA hasarının başlıca göstergesi olduğu belirlendi. [28] Ancak sonraki yıllarda GC/MS yöntemi ile genomda çok sayıda DNA bazının değişime uğradığı ve hasar gördüğü de ortaya kondu. [29]

Oksijenin milyarlarca yıl önce atmosferde birikmesi ile birlikte ortaya çıkan aerobik yaşam, enerji üretiminde hücresel solunum sistemini gerekli kılmıştır. Ancak zaman içinde oksijenin yararları yanında zararlı etkileri olduğu ortaya çıkınca antioksidan moleküller gelişerek hücre bileşenlerini koruma işlevini üstlenmiştir. Antioksidanlarla ilgili ilk çalışmalar lipitlerin korunmasına yönelik idi. [30] Daha sonraki yıllarda proteinler ve nükleik asitler gibi diğer makromoleküllerin hasara karşı korunmasını sağlayan mekanizmalar aydınlatıldı. Ayrıca hasar

24 Ramana, K. V., Srivastava, S., & Singhal, S. S. (2017). Lipid peroxidation products in human health and disease 2016.. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 2163285. https://doi.org/10.1155/2017/2163285.

25 Chatgilialoglu, C., & Studer, A. (2012). *Encyclopedia of radicals in chemistry, biology, and materials* (Vol. 2). John Wiley & Sons Ltd.

26 Stadtman ER, L. R. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *899*, 191-208.

27 Frenkel, K., Goldstein, M. S., & Teebor, G. W. (1981). Identification of the cis-thymine glycol moiety in chemically oxidized and. gamma.-irradiated DNA by HPLC analysis. *Biochemistry*, *20*(26), 7566-7571.

28 Floyd, R. A., Watson, J. J., Wong, P. K., Altmiller, D. H., & Rickard, R. C. (1986). Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radical Research Communications*, *1*(3), 163-172.

29 Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal*, *17*(10), 1195-1214.

30 Jukes, T. H. (1992). Antioxidants, nutrition, and evolution. *Preventive Medicine*, *21*(2), 270-276.

gören moleküllerle ilgili tamir mekanizmaları da açıklığa kavuştu ve antioksidan savunma sisteminin parçası olarak kabul edildi. [31]

Antioksidanların *in vitro* sistemlerdeki etkileri tartışılmaz olmakla birlikte, çeşitli hastalıkların önlenmesinde kullanımları sınırlıdır ve elde edilen sonuçlar hem çelişkili olmuş hem de yetersiz kalmıştır. [32] Dışarıdan alınan antioksidanların hedef doku veya hücrelere ulaşana kadar etkilerini yitirmesi veya hedefe hiç ulaşamamaları bu durumun başlıca nedenleri olarak değerlendirilmektedir. Buna karşılık antioksidanları diyet yoluyla sebze ve meyveleri bol miktarda tüketerek alan bireylerde oksidatif hasarla ilişkilendirilen hastalıkların daha az görüldüğü bildirilmiştir. [33] Günümüzde kabul gören ve önerilen yaklaşım, hastalıkların önlenmesinde E vitamini ve C vitamini gibi antioksidanların tüketilmesi yerine, bireylerin kendi endojen savunmalarının uyarılması ve egzersiz vb. yollarla güçlendirilmesi şeklindedir. [34, 35]

31 Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life*, *50*(4-5), 279-289.

32 Hajhashemi, V., Vaseghi, G., Pourfarzam, M., & Abdollahi, A. (2010). Are antioxidants helpful for disease prevention? *Research in Pharmaceutical Sciences*, *5*(1), 1.

33 Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables–the millennium's health. *International Journal of Food Science & Technology*, *36*(7), 703-725.

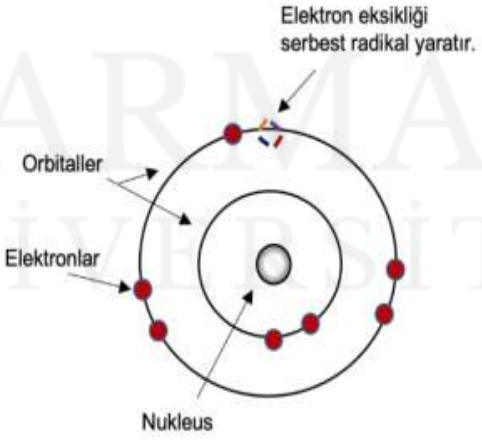
34 Egea, J., Fabregat, I., Frapart, Y. M., Ghezzi, P., Görlach, A., Kietzmann, T., Kubaichuk, K., Knaus, U. G., Lopez, M. G., & Olaso-Gonzalez, G. (2017). European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biology 13*, 94-162.

35 Tur, J. A., Jacob, C., Chaimbault, P., Tadayyon, M., Richling, E., Hermans, N., Nunes dos Santos, C., Diederich, M., Giblin, L., & Elhabiri, M. (2019). Personalized nutrition in ageing society: redox control of major-age related diseases through the NutRedOx Network (COST Action CA16112). *Free Radical Research*, *53*(sup1), 1163-1170.

Serbest Radikal Kimyası

Sema Arslan Eseryel*
A. Süha Yalçın*

Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron taşıyan, yüksek enerjili atom veya moleküllerdir. Yapılarındaki eşleşmemiş elektronların varlığı onları kararsız yapar ve diğer moleküllerle kolaylıkla reaksiyona girebilir hale getirir. Eşleşmiş elektronları olan atom veya moleküller ise kararlıdır, serbest radikaller gibi başka moleküllerle kolayca reaksiyonlara girmezler. Radikaller genellikle kısa ömürlüdür ve yapıları atomun üzerine bir nokta koyularak (•OH gibi) ifade edilir. Ancak moleküler oksijen gibi uzun ömürlü radikaller de mevcuttur. Serbest radikaller çeşitli kimyasal ve biyolojik süreçlerde yan ürün olarak oluşur. Önceleri zararlı etkileri üzerinde durulmuşken, son yıllarda metabolizmada önemli düzenleyici görevler üstlendikleri gösterilmiştir.



Şekil 1. Serbest radikal yapısı

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

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Serbest radikaller hem çevrede hem de hücrede sürekli olarak üretilir. Organizmadaki serbest radikaller endojen veya eksojen kaynaklardan oluşabilir. Hücresel metabolizmanın ürünleri olarak oluşan serbest radikaller hem yararlı hem de zararlı etki gösterebilir. Serbest radikallerin endojen yollardan oluşması üç farklı şekildedir. [1]

1. Homolitik bölünmeyle yani kovalent bağlı bir molekülün, her atomunun ortak elektronlardan bir tanesini alması yoluyla:

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

2. Bir moleküle, tek bir elektronun eklenmesiyle:

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

3. Heterolitik bölünmeyle yani bir molekülden tek bir elektronun kaybıyla:

$$X : Y \rightarrow X^{-} + Y^{+}$$

Her ne kadar serbest radikal denilince ilk akla gelenler oksijen kaynaklı olanlar olsa da, çok farklı atomların radikalleşmesi söz konusudur. Lipit peroksidasyonunun ara ürünleri karbon merkezli radikallerdir. Azot kaynaklı radikaller de çeşitli şekillerde, örneğin fenilhidrazin metabolizması sırasında oluşurlar. Geçiş metal iyonları da serbest radikal tanımına uyar. Radikal yapısında olanların dışında bir de radikale dönüşme potansiyeli olan moleküller mevcuttur. Bunlar reaktif türler olarak bilinir: Oksijen kaynaklı olanlar reaktif oksijen türleri (*reactive oxygen species*, ROS), azot kaynaklı olanlar reaktif azot türleri (*reactive nitrogen species*, RNS), kükürt kaynaklı olanlar reaktif kükürt türleri (*reactive sulfur species*, RSS) olarak adlandırılır (Tablo 1.1). Hücre içinde reaktif türlerin oluşumu birçok uyarının etkisiyle artar. Oluşan serbest radikaller lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklere etki ederler. Fizyolojik koşullarda hücrede sürekli oluşan reaktif türlere karşı koyan ve onlarla etkileşen antioksidanlar arasında bir denge mevcuttur. Bu dengenin reaktif türler lehine bozulması yani hücrede radikallerin birikmesi veya endojen savunma sistemlerinin yetersiz kalması halinde ise oksidatif stres olarak tanımlanan durum ortaya çıkar. [2]

---

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

2 Sies, H. (2019). Chapter 13 – Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. In G. Fink (Ed.), *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (pp. 153-163). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8.



Şekil 2. Reaktif türler, antioksidanlar ve oksidatif stres arasındaki ilişki [3]

Reaktif oksijen, azot ve kükürt türleri

Reaktif Oksijen Türleri	Süperoksit ($O_2^{\bullet -}$) Ozon (O_3) Singlet oksijen ($^1O_2$) Hidrojen peroksit (H_2O_2) Hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) Hipokloröz asit (HOCI) Hipobromöz asit (HOBr) Alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$) Peroksi radikali ($ROO^{\bullet}$) Hidroperoksil radikali ($ROOH^{\bullet}$)
Reaktif Azot Türleri	Nitrik oksit ($NO^{\bullet}$) Azot dioksit ($NOO^{\bullet}$) Peroksinitrit ($ONOO^-$) Nitroz asit (HNO_2) Nitrozil katyonu (NO^+) Nitroksi anyonu (NO^-) Nitröz asit (HNO_3) Diazot tetraoksit (N_2O_4) Peroksinitrik asit (ONOOH) Nitronyum katyonu (NO_2^+) Alkilperoksi nitrit (RONO)
Reaktif Kükürt Türleri	Tiyil radikali ($RS^{\bullet}$) Sülfenil ($RSO^{\bullet}$) Tiyil peroksil ($RSO_2^{\bullet}$)

3 Ogura, Y., Kitada, M., & Koya, D. (2021). Sirtuins and Renal Oxidative Stress. *Antioxidants*, *10*(8), 1198. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antiox10081198.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Serbest radikal kaynakları

Serbest radikallerin başlıca kaynağı mitokondriyal solunum zinciridir. [4] Aerobik solunum gerçekleşirken, elektronların teker teker moleküler oksijene aktarılması sırasında süperoksit radikali üretilir. Ayrıca inflamasyon durumunda, sitokinler serbest bırakıldığında uyarılan nötrofil ve makrofajlar serbest radikalleri üretmeye başlar. Serbest radikaller lipit peroksidasyonu sırasında ara ürün olarak veya mitokondriyal sitokrom oksidaz gibi bazı enzimlerin etkisiyle de oluşabilir. Düz kas hücrelerinde ve trombositlerde araşidonik asit metabolizması tarafından üretilebilir. Otooksidasyon reaksiyonları sırasında, NADPH oksidaz gibi enzimlerle veya endoplazmik retikulumda sitokrom P450 sisteminde meydana gelen elektron kaçaklarından serbest radikal oluşabilir. Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, aminoasit oksidaz gibi bazı enzimlerin katalitik döngüleri esnasında da serbest radikaller oluşur. [5]

- Tiyoller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler gibi oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında görev alabilen küçük moleküller, serbest radikal oluşturabilir.
- Nükleer membranlara ve endoplazmik retikulum bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklı serbest radikal üretimi olur.
- Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarında rol alan bakır, demir gibi geçiş metalleri, serbest radikal reaksiyonlarını katalizler. Plazma membranında yer alan lipooksijenaz, protein kinaz, siklooksijenaz, gibi enzimlerin aktivasyonu ile serbest kalan araşidonik asidin oksidasyonu sonucunda serbest radikaller oluşur.
- Aktive olmuş fagositer hücrelerde (nötrofil, makrofaj vb.) solunumsal patlama sırasında süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve hipokloröz asit gibi bir çok reaktif oksijen türleri oluşur.
- İskemi, travma ve yanık gibi oksidatif stres meydana getiren durumlar da serbest radikal kaynağıdır.

Serbest radikaller çoğu çevresel olan çok sayıda ekzojen kaynaktan da oluşur. Hava kirliliği, radyasyon, sigara dumanı,

4 Raha, S., & Robinson, B. H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences*, *25*(10), 502-508.

5 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.

solventler, aromatik hidrokarbonlar ve pestisitler gibi çevresel ajanlar stres kaynağıdır. Tüm bunlar katekolamin sentezini uyarır, katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal oluşumuna sebep olur. Aşağıda sıralanan dış etkenler de serbest radikal üretimine katkıda bulunabilir.

- UV ışınları, X-ışını, gamma ışınları, mikrodalga ışınları
- Organik maddelerin yakılması, orman yangınları, volkanik faaliyetler
- Benzen, karbonmonoksit, formaldehit, ozon ve toluen gibi hava kirleticiler
- Temizlik ürünleri, tutkal, boya, tiner, parfümler ve böcek ilaçları gibi kimyasallar
- Kloroform ve diğer trihalometanlar gibi su kirletici maddeler
- Alkol ve sigara kullanımı, sigara dumanı, egzoz dumanı

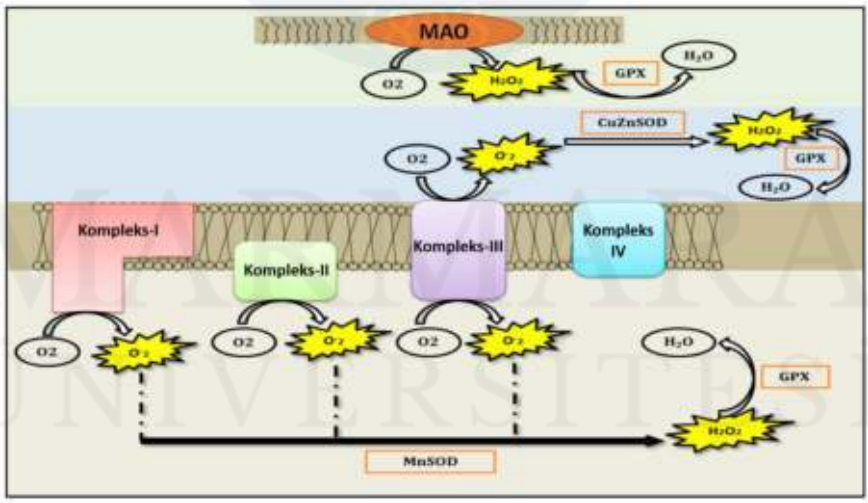
Oksijenli yaşam

Moleküler oksijen, dünyayı çevreleyen atmosferde yaklaşık 2.2 milyar yıl önce, siyanobakterilerin güneşten gelen enerjiyi kullanarak suyu parçalamasıyla ortaya çıkmıştır. Siyanobakteriler canlılıklarının devamı için suyu parçalayarak hidrojen atomlarını elde ettiler ve bunun yan ürünü olarak atmosfere O_2 salındı. Salınan O_2'nin çoğu bugün kayalarda ve cevherlerde bulunan metal oksit yataklarının oluşumu ile tüketildi. Bu tüketime rağmen atmosferde önemli miktarda O_2 birikimi olmuştur. Atmosferik oksijendeki artış, dünyadaki yaşam için oldukça avantajlıydı. Bu avantaj, stratosferde ozon (O_3) tabakasının oluşumuna yol açtı. Ayrıca dünyada en bol bulunan dördüncü element olan demir ortamlarını meydana çıkardı.

Ozon tabakasının ve atmosferdeki serbest oksijenin dünyaya gelen güneş ışınlarındaki yoğun ultraviyole (UV-C) radyasyonunu filtrelemesinin bir sonucu canlı organizmaların denizden ayrılarak kara yaşantısını keşfetmeleri olmuştur. Ancak atmosferde O_2 artışı sorun da yaratmıştır. Canlı organizmalar ilk ortaya çıktıklarında, atmosferdeki gazlar N_2 ve CO_2 idi. Bugün hala mevcut olan bu canlı grubunun (anaeroblar) oksijen varlığındaki büyümeleri genellikle yavaştır. Ayrıca, atmosferik seviyedeki oksijene maruz bırakıldıklarında ölürler. Buradan anlaşılacağı gibi atmosferdeki serbest O_2 miktarı arttıkça, bu türlerin birçoğunun ölmüş olması gerekirdi. Ancak öyle olmamıştır, canlı sistemlerin değişen çevreye ve koşullara adaptasyonu söz konusudur. Günümüzde de bulunan ve adaptif bir evrim gösteren anaerobların torunları, kendilerini O_2'nin bulunmadığı ortamlarla sınırlandırarak, yükselen atmosferik O_2 seviyelerinde hayatta kalmanın yolunu bulmuşlardır. Diğer organizmalar ise O_2 toksisitesine karşı koruma sağlamak için

antioksidanlar ile savunma geliştirmeye başlayarak farklı bir adaptif evrim yolunu seçmişlerdir.

Yaşamın biçimlenmesinde önemli kavşaklarından biri, prokaryot yaşamdan ökaryot hücreli yaşama geçiştir. Bunun devamında çok hücreli canlıların evrimi gerçekleşmiştir. Yeryüzündeki atmosferin oksijen açısından zenginleşmeye başlamasıyla birlikte, büyük anaerobik bakteriler hücresel solunum ürünlerini kullanmak için daha küçük aerobik bakterileri kullanmış olmalıdır. Bu şekilde küçük bir aerobik bakterinin büyük hücre tarafından korunmuş olması, her iki organizmanın bu durumdan yararlanmasını sağlamıştır. Bu simbiyotik ilişki sonucunda bugün mitokondri olarak bildiğimiz organeller oluşmuştur. Mitokondrinin başlıca görevi enerji üretimidir. Mitokondride yer alan solunum zinciri (elektron taşıma zinciri) hücre içindeki süperoksit radikallerinin en önemli kaynaklarındandır. [6] Solunum zincirindeki bir dizi protein kompleksi üzerinden aktarılan elektronlarla moleküler oksijen suya indirgenir Normal şartlar altında solunum zincirinde oksijen radikalleri açığa çıkmaz. Çünkü sitokrom oksidaza kadar olan tüm ara basamaklar kararlıdır. Ancak, fosforilasyon için gerekli substrat eksikliği olduğunda elektron kaçakları olur ve oksijen indirgenerek süperoksit radikalini oluşturur. Radikal oluşumunun nedeni NADH-KoQ redüktaz enziminden elektron sızıntısıdır.



Şekil 3. Mitokondriyal solunum zinciri ve oksidatif fosforilasyon [7]

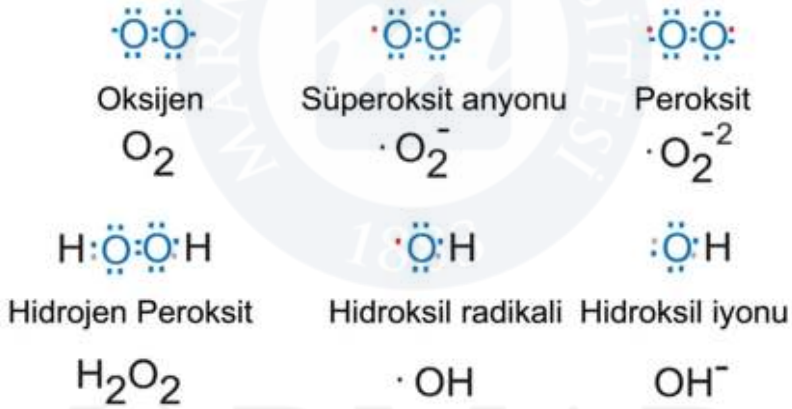
6 Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, *29*(3-4), 222-230. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8.

7 Al Shahrani, M., Heales, S., Hargreaves, I., & Orford, M. (2017). Oxidative Stress: Mechanistic Insights into Inherited Mitochondrial Disorders and Parkinson's Disease. *Journal of Clinical Medicine*, *6*(11), 100. https://www.mdpi.com/2077-0383/6/11/100.

Oksijen kaynaklı reaktif türler

Oda sıcaklığında oksijen moleküler oksijen olarak adlandırılan dioksijen (O_2) formundadır. Moleküler orbitallere yerleşmiş onaltı elektrona sahip olan moleküler oksijen bir biradikaldir. Oksijenin metabolizması sonucu oluşan çeşitli moleküller, canlı sistemlerde üretilen en önemli radikal sınıfını (*reactive oxygen species*, ROS) temsil etmektedir. [8, 9]

Moleküler oksijenin yapısına bir elektron eklenmesiyle, bu radikal süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot -}$) haline dönüşür. Süperoksit anyonu çeşitli metabolizma süreçlerinde veya fiziksel ışınlama ile oluşmaktadır. Birincil reaktif oksijen türü olarak kabul edilen süperoksit anyonu enzimlerin veya metal iyonlarının etkisiyle, ikincil reaktif oksijen türlerini üretmek üzere diğer moleküller ile etkileşime girer.



Şekil 4. Moleküler oksijen ve reaktif oksijen türleri

Serbest radikal reaksiyonları sonrasında açığa çıkan singlet oksijen ise bir serbest radikal değildir. Yapısında eşleşmemiş elektron yoktur, yine de reaktif oksijen türleri içerisinde yer alır ve birkaç farklı yoldan oluşabilir. Aerobik hücrelerde oksijenin kararlı duruma geçmek ve suya dönüşmek üzere bir elektron alarak indirgenmesiyle, süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet -}$) oluşur. Oksijenin potansiyel bir toksik madde sayılmasının asıl nedeninin bu dönüşüm olduğu ileri sürülmektedir. Endojen oksijen radikallerinin başlıca kaynağı olan süperoksit anyonu hem oksitleyici, hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Hidrojen peroksitin kaynağı olması ve geçiş metalleri

8 Auten, R. L., & Davis, J. M. (2009). Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatric Research*, *66*(2), 121-127.

9 Halliwell, B. (1984). Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, *62*, 71-77.

ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

iyonlarını indirgemesi nedeniyle de önemlidir. Nitrik oksitle reaksiyona girmesiyle, daha sonra azot dioksit (NO_2), nitronyum iyonu (NO_2^+), hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) gibi toksik ürünlere de dönüşebilen peroksinitriti ($ONOO^-$) oluşturur. Süperoksitin bir diğer önemli etkisi, indirgenmiş geçiş metallerinin geri dönüşümlü otooksidasyonu olarak bilinen, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyon ile ilişkilidir. Süperoksit anyonu mitokondriyal solunum zincirinini yanı sıra endoplazmik retikulumdan da elektron sızmasıyla oluşur. Bir başka süperoksit kaynağı fagositik hücrelerdeki solunumsal patlamadır. Nötrofillerde plazma membranının dış yüzünde yerleşmiş olan NADPH oksidaz enzimi, nötrofilin uyarılmasıyla birlikte oksijen molekülüne iki elektron aktararak iki molekül süperoksit oluşturur. Hücrelerde süperoksit üreten bir başka kaynak ksantin oksidazdır. Bu enzimin kataliziyle ksantinin ürik aside dönüşümü sırasında süperoksit oluşur

Reaktif türlerin kimyası

Reaktif türlerin termodinamik etkinliği ve aktivitelerinin değerlendirilmesinde kimyasal yapıları önemlidir. Termodinamik kimyasal reaksiyonların meydana gelme olasılığını gösterir. Enzimler sadece termodinamik olarak mümkün reaksiyonları hızlandırabilir. Klasik olarak serbest enerji değişimi (ΔG) negatif ise reaksiyon termodinamik açıdan mümkündür.

Serbest radikallerin ana kaynağı moleküler oksijendir. Organizmadaki pek çok oksitlenme reaksiyonu Fe, Cu gibi geçiş metallerini içeren enzimler vasıtasıyla ve moleküler oksijene tek elektron transferi ile meydana gelir. Yapısında eşleşmemiş elektronlar bulunduran moleküler oksijen, reaktif türlerin oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($O_2^{\bullet -}$), singlet oksijen ($^1O_2$) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) gibi reaktif oksijen türleri toksik etkilere yol açarlar.

Hidrojen peroksit, süperoksit veya moleküler oksijenin çevredeki moleküllerden bir veya iki elektron almasıyla oluşan peroksitin iki protonla (H^+) birleşmesi sonucunda meydana gelir.

$$O_2^{\bullet -} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

$$O_2^{\bullet -} + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksit üretimi dismutasyon yoluyla olur. Süperoksit dismutaz enziminın kataliziyle ya da spontan olarak gerçekleşen bu reaksiyonda, iki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturur.

$$2\ O_2^{\bullet -} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Hidrojen peroksitin kendisi serbest radikal değildir. Ancak serbest radikal oluşumunda önemli rol oynamaktadır, bu nedenle reaktif türlerin kapsamına girer. Fe^{+2}, Cu^{+} gibi geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu, süperoksit radikallerinin varlığında da Haber-Weiss reaksiyonu hidroksil radikalini ($OH^{\bullet}$) oluşturur. Hidroksil radikali en güçlü oksitleyici radikal olarak belirlenmiştir. DNA, proteinler, lipitler, amino asitler, metaller ve glukoz ile etkileşime girebilir.

$$H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} - + Fe^{+3} \text{ (Fenton reaksiyonu)}$$

$$O_2^{\bullet -} - + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} - + O_2 \text{ (Haber-Weiss reaksiyonu)}$$

Öte yandan, mitokondride enerji üretimi sırasında meydana gelen elektron kaçakları oksijenin süperoksit radikaline dönüşümüne neden olur. Süperoksit radikali oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesi dışında, geçiş metallerinin otooksidasyonuyla da meydana gelebilir. Süperoksit radikalinin reaktifliği yüksek derecede değildir ve direkt olarak zarar vermez. Bu radikalin asıl önemi, hem hidrojen peroksit kaynağı hem de geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.

$$Fe^{+2} + O_2 \rightarrow Fe^{+3} + O_2^{\bullet -}$$

$$Cu^{+} + O_2 \rightarrow Cu^{2+} + O_2^{\bullet -}$$

Reaktif türlerin kimyasını değerlendirmede sık kullanılan bir parametre indirgeme potansiyelidir. Redoks reaksiyonlarının yönünü ve olabilirliğini belirleyen indirgeme potansiyelleri, hangi bileşiklerin kendi kendine oksitlenebilir olduğunu tahmin etmeye yarar. Otooksidasyon, termodinamik olarak mümkün olsa bile, genellikle yavaştır. [10]

Periyodik tablodaki d-bloğu geçiş elementlerini içerir. Geçiş elementlerinin ilk sırasındaki metallerin atom ve/veya iyonlarında eşleşmemiş elektronlar bulunur. Bu nedenle, çinko dışında tümü serbest radikaldir. Geçiş metallerinin biyolojik etkilerinin çoğu, tek elektron kabul etme veya bağışlama yeteneği ile ilişkilidir. İndirgeme potansiyelleri de metale giden ligandlara bağlıdır. Bu nedenle değişik enzimlerde bulunabilir, aynı metalin farklı reaksiyonların katalizinde görev alırlar. [11]

Bazı geçiş metalleri ile üstlendikleri görevler şunlardır:

10 Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, *12*(10), 1161-1208.

11 Miller, D. M., Buettner, G. R., & Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, *8*(1), 95-108.

- Bakır (Cu): EC-SOD, Cu/Zn-SOD, sitokrom oksidaz, lizil oksidaz, dopamin hidroksilaz gibi enzimler için gereklidir.
- Çinko (Zn): RNA polimeraz, karbonik anhidraz, Cu/Zn-SOD, glioksalaz I ve çinko parmak yapısında bulunur.
- Krom (Cr): Glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynar.
- Manganez (Mn): MnSOD, arginaz, hidrolazlar ve karboksilaz enzimlerini aktive eder.
- Demir (Fe): Hemoglobin, miyoglobin, siklooksijenazlar, sitokromlar, hidroksilaz/oksidazlar, ribonükleotit redüktaz, akonitaz, süksinat dehidrojenaz ve katalaz için gereklidir.
- Kobalt (Co): B12 vitamini için gereklidir.

Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit (H_2O_2) reaktif olmayan bir oksijen türevi moleküldür. Yüksek seviyelerde birçok hücre tipi için toksik olmasına rağmen, sınırlı ve seçici reaktivitesi nedeniyle bir sinyal molekülü olarak da görev yapar. Hidrojen peroksit, suyla kolayca karışır ve *in vivo* olarak hücrelerin içinde ve arasında yayılabilir. Difüzyon hızlıdır, ancak tamamen serbest değildir ve membran lipit bileşiminden etkilenir. Genellikle, hücre zarlarını geçen H_2O_2 demir ve muhtemelen bakır iyonları ile reaksiyona girerek OH• gibi daha zararlı türleri oluşturur. Zayıf reaktivitesine rağmen sitotoksiktir, yüksek konsantrasyonda dezenfektan olarak kullanılır. Yara tedavisinde kullanılan balın antiseptik aktivitesi de kısmen H_2O_2 oluşumundan kaynaklanmaktadır. Askorbat, tiyoller ve bazı flavonoidler hücre kültürü ortamlarında oksitlenerek H_2O_2 üretebilir. Bu da hücre kültürü deneylerinde bazı yanlış yorumlara neden olabilir. Ayrıca hücreleri H_2O_2'ye maruz bırakmak NADPH oksidazları aktive ederek $O_2^{\bullet-}$ üretimini artırabilir. [12]

Hidroksil radikali

Organizmada hidroksil radikalleri çok farklı yollardan oluşmaktadır. [13] Ozondan, peroksinitritten, hidrojen peroksitin metal iyonları ile reaksiyona sokulmasıyla veya hidrojen peroksit

12 Abdollahi, M., & Hosseini, A. (2014). Hydrogen Peroxide. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (pp. 967-970). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00736-3.

13 Kehrer, J. P., Robertson, J. D., & Smith, C. V. (2010). 1.14 – Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (pp. 277-307). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

yapısındaki O – O bağının homolitik fisyonuyla hidroksil radikali üretilebilir. Başlıca hidroksil radikali kaynakları aşağıda sıralanmıştır.

- **İyonize radyasyon:** Canlı hücrelerin ana bileşeni sudur. Yüksek enerjili radyasyona maruz kalınması suyun homolitik fisyonuna ve $OH^{\bullet}$ üretimine neden olur. İyonlaştırıcı radyasyonun canlı organizmalara verdiği hasarın çoğundan $OH^{\bullet}$ sorumludur.
- **Hipokloröz asit :** Ferrosiyanit ve Fe^{2+} – sitrat gibi bazı demir şelatları ile reaksiyona girebilir. Aromatik bileşiklerin hidroksilasyonuna eden olur.
- **Ultrason:** Akustik kavitasyon adı verilen bir olay olan gaz kabarcıklarının oluşumuna, büyümesine ve çökmesine neden olur. Birkaç bin derecelik sıcaklık ve yüzlerce atmosfer basıncının bir araya geldiği sıcak noktalara çöker ve H_2O ile $H^{\bullet}$ ve $OH^{\bullet}$ arasındaki homolitik fisyona neden olur. Böbrek taşları, litotripsi teknikleriyle hızlı sonik darbeler kullanılarak yaratılan şok dalgası ile parçalanmaktadır. Ancak, yapılan çalışmalar bu sırada oksidatif hasarın ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir.
- **N-hidroksitiyopiridonlar**: Laboratuvarda OH• kaynağı olarak kullanılır. Aynı zamanda dikkate alınması gereken bir kükürt radikalini üretir.
- **Kinonlar ve yarı-kinonlar:** H_2O_2'den demir iyonları içeren redoks reaksiyonları ile $OH^{\bullet}$ üretebilir. Tetrakloro-1,4-benzokinonun metal iyonundan bağımsız reaksiyonlar ile $OH^{\bullet}$ üretebildiği gösterilmiştir. Bu reaksiyon bir peroksit ara ürününün oluşumunu içerir. $OH^{\bullet}$ serbest bırakmak için homolitik olarak bölünmektedir.
- **Karbonat ve bikarbonat:** Hidroksil radikalinin karbonat veya bikarbonat ile reaksiyonu karbonat radikallerini oluşturur. Bu nedenle, deneysel modellerde kullanılan reaksiyon karışımlarının CO_2/HCO_3^- içeriğine dikkat edilmelidir. Bu oksidatif hasarı etkilemede önemli bir parametredir.

$$CO_3^{2-} + OH^{\bullet} \rightarrow CO_3^{\bullet -} + OH^-$$

$$HCO_3^- + OH^{\bullet} \rightarrow H_2O + CO_3^{\bullet -}$$

Karbonat radikalleri yaklaşık 600 nm'deki ışığı absorplamaktadır. Reaksiyon karışımlarındaki seviyelerini bu yolla izlemek mümkün olmaktadır.

Süperoksit radikali

Süperoksit anyonu diğer reaktif türlere kıyasla çok daha az reaktiftir. [14] Sulu çözeltilerdeki çoğu biyolojik molekülle reaksiyona girmez. Bununla birlikte, NO• gibi radikaller ile bazı enzimlerdeki demir-sülfür kümeleriyle ve hidroksitirozin grubundan hidrojenin soyutlanmasıyla oluşan fenoksil radikalleriyle hızlıca reaksiyona girmektedir. Sulu çözeltilerdeki $O_2^{\bullet-}$'nin hızla kaybolması dismutasyon reaksiyonundan kaynaklanır. Dismutasyon, aynı türün hem oksitlendiği hem de azaltıldığı bir kimyasal reaksiyondur. Bu reaksiyonda, bir süperoksit O_2'ye oksitlenirken, diğeri H_2O_2'ye indirgenir.

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

$$HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet-} + H + \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Dismutasyon reaksiyonu fizyolojik koşullar altında $O_2^{\bullet-}$ protonlaması ve ardından $HO_2^{\bullet}$'nin başka bir $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyonu şeklinde devam eder. Asidik pH değerlerinde hızlıdır. Süperoksit radikali karmaşık bir reaksiyon mekanizması ile formazan üretmek üzere nitroblue tetrazolyumu (NBT) tüketir. Bu reaksiyon SOD analizinde kullanılır. Süperoksit organik çözücüler içinde çözündüğünde, kimyasal olarak suda olduğundan çok daha sert hale gelir. Bir baz ve bir indirgeyici ajan olarak hareket etme kabiliyeti artar. Örneğin, organik çözücülerde çözünmüş sülfür dioksit (SO_2) gazını azaltabilir, ancak sulu çözeltide bu etki yoktur. Ortamda protonlar mevcut değilse, dismutasyon önlenir ve $O_2^{\bullet-}$ uzun süre kalır ve başka bir moleküldeki pozitif yük merkezine saldıran bir nükleofil görevi görür. Böylece $O_2^{\bullet-}$ esterlere saldırarak alkolün yer değiştirmesine ve bir karboksilik asit oluşumuna yol açabilir. Organik ortamdaki süperoksit ise kloroform, tetraklorometan (CCl_4), heksaklorobenzen (C_6Cl_6) ve poliklorobifeniller gibi klorlanmış hidrokarbonlarla nükleofil olarak etkileşebilir.

Peroksil ve alkoksil radikalleri

Peroksil ($RO_2^{\bullet}$) ve alkoksil ($RO^{\bullet}$) radikalleri çok iyi oksitleyici ajanlardır. [15] Süperoksitin protonlanmış hali olan $HO_2^{\bullet}$, en basit peroksil radikali olarak kabul edilebilir. Peroksil radikalleri askorbat ve NADH'yi oksitler, O_2 varlığında $O_2^{\bullet-}$ oluşumuna yol açarlar.

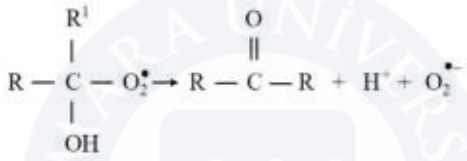
14 Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chemical Reviews*, *116*(5), 3029-3085.

15 Kehrer, J. P., Robertson, J. D., & Smith, C. V. (2010). 1.14 – Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (pp. 277-307). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7.

$$RO_2^{\bullet} + NADH \rightarrow RO_2H + NAD^{\bullet}$$

$$NAD^{\bullet} + O_2 \rightarrow NAD^{+} + O_2^{\bullet}$$

Alkoksil ve peroksil radikalleri, diğer moleküllerden $H^{\bullet}$ soyutlayabilir. Bu lipit peroksidasyonu yolağında önemli bir reaksiyondur. Bazı $RO_2^{\bullet}$ radikalleri $O_2^{\bullet -}$'i serbest bırakmak için parçalanır. Örneğin, glukoz $OH^{\bullet}$ ile reaksiyona girdiğinde altı farklı $RO_2^{\bullet}$ radikali oluşur. Çünkü mevcut altı karbon atomunun herhangi birinde $OH^{\bullet}$ ile soyutlama meydana gelebilir.



Peroksil radikalleri, singlet oksijen ($^1O_2$) üretmek üzere birbirleriyle reaksiyona girebilir. Aromatik alkoksil ve peroksil radikalleri alifatik olanlardan daha az reaktif olma eğilimindedir. Çünkü bunlarda elektronlar benzen halkasına delokalize durumdadır. Biyolojik sistemlerde üretilen tirozin fenoksil radikali (tirozil, TyrO), $O_2^{\bullet -}$ ile reaksiyona girebilmesine rağmen bitirozin vermek için çapraz bağlanır. Tirozil radikali ayrıca askorbatla veya sistein ve glutatyon (GSH) gibi tiyollerle reaksiyona girerek onları radikale dönüştürür.

$$Tyr\text{-}O^{\bullet} + R - SH \rightarrow Tyr\text{-}OH + RS^{\bullet} \qquad Tyr\text{-}O^{\bullet} + AscH \rightarrow Tyr\text{-}OH + Asc^{\bullet -}$$

Ayrıca, GSH eklentileri oluşturabilir. Tirozil radikalleri fotosentezde ve prostaglandin biyosentezinde de yaygın olarak kullanılır.

Karbon merkezli radikaller de $RO_2^{\bullet}$ radikalleri oluşturmak için O_2 ile hızla reaksiyona girerler. Organik peroksitlerin (ROOH) ayrışması ile hem $RO_2^{\bullet}$ hem de $RO^{\bullet}$ üretilir.

$$ROOH + Fe^{3+} \rightarrow RO_2^{\bullet} + Fe^{2+} + H^{+}$$

$$ROOH + Fe^{2+} \rightarrow RO^{\bullet} + OH^{-} + Fe^{3+}$$

Yukarıdaki reaksiyonlar demir iyonu ile uyarılan lipit peroksidasyonunda önemlidir. Protein peroksitleri de protein radikalleri vermek için metal iyonları tarafından ayrıştırılabilir. Lipit peroksitleri ayrıca $RO_2^{\bullet}$ oluşturmak üzere $HO_2^{\bullet}$ ile reaksiyona girebilir.

$$HO_2^{\bullet} + ROOH \rightarrow RO_2^{\bullet} + H_2O_2$$

Halojenlenmiş kinonların, hidroperoksitleri RO• radikallerine ayrıştırdığı bildirilmiştir. Azo başlatıcılardan 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorür (AAPH) ve 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitril) (AMVN) *in vivo* olarak RO_2• radikalleri üretmek için kullanılmaktadır. AAPH suda çözünürken, AMVN hidrofobiktir ve daha çok lipit fazında radikal üretmek için kullanılır.

Bu bileşikler, karbon merkezli radikaller (R) vermek üzere belirli bir oranda ayrışırlar. Daha sonra $RO_2^{\bullet}$ radikalleri vermek üzere O_2 ile hızla reaksiyona girerler.

$$R - N = N - R \rightarrow N_2 + 2R^{\bullet}$$

Karbon merkezli radikallerin kendileri, albüminin – SH grupları dahil olmak üzere bazı biyolojik moleküller ile de reaksiyona girebilir. Bu nedenle $RO_2^{\bullet}$'ye tam dönüşümlerini sağlamak için ortamda yeterli O_2 sağlanması önemlidir. [16]

Nitrik oksit

Nitrik oksit (NO) renksiz bir gazdır, suda orta derecede (20°C'de 2 mM'ye kadar, 37°C'de yaklaşık 1.6 mM), organik çözücülerde daha iyi çözünür. Bu nedenle $NO^{\bullet}$ membranları geçebilir ve hücreler arasında ve hücre içinde kolayca yayılabilir. Nitrik oksit bir serbest radikaldir ve kolayca dimerleşmeyen bir yapıya sahiptir. Nitrik oksitin reaktivitesi düşüktür, tiyoller de dahil olmak üzere çoğu biyolojik molekülle yavaş reaksiyona girer. Tiyollerden tiyonitritler (nitrosotiyoller) oluşturması için önce $ONOO^-$ veya N_2O_3 gibi daha yüksek bir azot oksit oluşturmalıdır.

Literatürdeki nitrik oksit ile ilgili bilgiler büyük ölçüde nitrik oksitin süperoksitle yaptığı reaksiyona ve oluşan peroksinitrit üzerine odaklanmıştır. Bu molekülün potansiyel zararlı etkileri arasında sitokrom oksidaz ve ribonükleotit redüktaz gibi enzimlerin inhibisyonu sayılabilir. Nitrik oksit çeşitli hem türleriyle de reaksiyona girer. Peroksitlerin varlığında bu yolla proteinlerin prooksidan özelliklerini azaltır.

Nitrik oksit, vücudun hemen hemen her yerinde önemli fizyolojik roller üstlenmiştir. [17] Etkilerinin çoğu guanilat siklaz enzimindeki Fe^{2+} gruplarına bağlanmasından kaynaklanır. Vasküler endotelyal hücrelerde sentezlenen $NO^{\bullet}$ hemen her yöne yayılır. Düz kas tabakasına ulaştığında guanilat siklaza bağlanır ve aktive olur. Böylece daha fazla cGMP yapılır, cGMP hücre içi serbest Ca^{2+} miktarını

16 Forbes, M. D. (2010). *Carbon-centered free radicals and radical cations: structure, reactivity, and dynamics* (Vol. 2). John Wiley & Sons.

17 Kelm, M. (1999). Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1411*(2-3), 273-289.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

azaltarak kasları gevşetir. Ayrıca damarları genişletir ve kan basıncını düşürür. Nitrik oksitin sinyal iletideki diğer rollerine, proteinlerdeki sistein kalıntılarının S-nitrozilasyonu aracılık eder. Aşırı üretimi hücre hasarına neden olabilir. Bu etki doğrudan olabilir veya N_2O_3 veya $ONOO^-$ gibi diğer reaktif azot türlerinden kaynaklanır.

Hayvanlarda NO sentezi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından katalizlenir. Üç tip NOS vardır. Nöronal NOS (nNOS) sinir sistemi dokularında tanımlanmıştır. İskelet kasında kasılmayı düzenlemeye yardımcı olduğu bilinir. Endotelyal NOS (eNOS) yapısal olarak endotel hücrelerinde eksprese edilir. Kan basıncının düzenlenmesi için gerekli nitrik oksiti sentezler. Vasküler endotelyumdan gelen nitrik oksit kan damarlarını rahatlatan endotel kaynaklı bir gevşeme faktörü olarak tanımlanmıştır. eNOS ve nNOS enzimleri, Ca^{2+} iyonlarını ve kalmodulin proteinlerini gerektirir. Genellikle inflamasyon bölgelerinde bulunan ve uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) adı verilen bir NOS da bulunur. Bu enzim ilk olarak endotoksinler veya bazı sitokinlerle etkileşen makrofajlar ile karaciğer hücrelerinde tanımlanmıştır. Kalmodulini sıkıca bağlar ve aktivitesi Ca^{2+}'dan bağımsızdır. Hızlı bir şekilde $NO^\bullet$ oluşumunu katalize eder ve normalden çok daha yüksek lokal konsantrasyonlar üretir. NOS enzimi için hız sınırlayıcı faktör O_2 konsantrasyonudur. Nitrit, *in vivo* koşulda önemli bir $NO^\bullet$ donörüdür.

$$RSNO \rightarrow RS^\bullet + NO$$

Nitrovazodilatörler adı verilen ilaçlar vazokonstriksiyonu anormal olan hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. Bu ilaçlar arasında organik nitrat ve nitritler, inorganik nitrozo bileşikleri ve nitrosotiyoller bulunur. Bu bileşikler laboratuvar deneylerinde $NO^\bullet$ donörü olarak kullanılmaktadır.

Peroksinitrit

Nitrik oksit reaktif oksijen türleriyle çeşitli şekillerde etkileşime girebilir. [18] Hidrojen peroksit ve $NO^\bullet$ bazı sistemlerde sinerjistik etki gösterir. Hücre tipine, kullanılan $NO^\bullet$ donörüne, reaktif türlerin konsantrasyonuna ve hücrelerin daha önceden bu moleküllere maruz kalıp kalmadığına bağlı olarak, birbirlerinin sitotoksisitesini artırabilir veya azaltabilir.

$$NO^\bullet + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^-$$

Bu reaksiyon, süperoksitin SOD ile reaksiyonundan daha büyük bir hız sabitine sahiptir. Süperoksit, hücre kültürü ortamında

18 Radi, R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(23), 5839-5848. https://doi.org/doi:10.1073/pnas.180.493.2115.

çeşitli mekanizmalarla üretilebilir. Bu durumda, eklenen $NO^{\bullet}$ donörlerinden $ONOO^{-}$ oluşur. Hücrelere, dokulara veya vücut sıvılarına peroksinitrit eklenmesi antioksidanların tükenmesine, lipitlerin oksidasyonuna ve nitrasyonuna, DNA iplikçiklerinin kırılmasına, DNA bazlarının nitrasyonu ve deaminasyonuna, proteinlerde aromatik amino asit kalıntılarının nitrasyonuna ve sisteinin oksidasyonuna neden olur.

Proteinlerde en çok rastlanan reaksiyon, tirozinin 3-nitrotirozine dönüştürülmesidir. Triptofan ve fenilalanin de nitratlanabilir. Hemoglobin ve diğer hem proteinleri de $ONOO^{-}$ ile hızla oksitlenir. Tirozin kalıntılarının nitrasyonu bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Nitrasyon genellikle enzim inaktivasyonuna ve sinyal iletim sistemleri ile etkileşime yol açar. Kısmi nitrasyon tirozin-OH grubunun pKa'sını 10'dan 7.5'e düşürerek, pH 7.4'te önemli miktarda iyonizasyona neden olur ve tirozini hidrofilik hale getirir. Tirozinlerin nitrasyonu bazı durumlarda tirozin kinazlarla olan fosforilasyonu engelleyebilir. Manganez içeren süperoksit dismutaz enzimi de nitrasyona duyarlıdır ve enzim inaktivasyonuna neden olur. Peroksinitritin diğer protein hedefleri arasında N-asetiltransferazlar, sitokromlar, glutatyon transferazlar, nörofilament proteinleri, siklooksijenazlar, prostasiklin sentaz ve albümin yer alır. Çeşitli dokularda ve azot oksitlere maruz kalan organizmalarda hangi proteinlerin nitratlandığını tanımlamak için proteomik teknikler kullanılmaktadır.

Kükürt kaynaklı radikaller

Kükürt yaşamsal bir elementtir. Hücrelerin büyümesinde ve işlevselliğinde önemli roller üstlenmiştir. Sistein ve metiyonin kükürt içeren iki amino asit olup pek çok proteinin bileşenlerindendir. Dünyamızda yaşamın gelişimiyle birlikte kükürt pek çok metabolik yolakta yer almıştır ve farklı oksidasyon hallerinde bulunur. Kükürt merkezli radikaller ve reaktif türler doğada ve hücrelerde çeşitli koruyucu görevlere sahiptir. Ancak bu bileşikler de diğer reaktif türler gibi yüksek konsantrasyonda hücresel bileşenlere zarar vermektedir. Tiyollerin antioksidan görevi gördüğü uzun süredir bilinmektedir. Son yıllarda hidrojen sülfürün de bir sinyal molekülü olduğuna dair kanıtlar ortaya çıkmıştır. [19, 20] Ancak, bu molekülün antioksidan özellik gösterebilmek için *in vivo* olarak yeterince yüksek seviyelere ulaşıp ulaşmadığı bilinmemektedir. Tiyoller serbest radikal de üretebilir. Tiyollerin karbon merkezli radikallerle, geçiş

19 Giles, G. I., Nasim, M. J., Ali, W., & Jacob, C. (2017). The reactive sulfur species concept: 15 years on. *Antioxidants*, *6*(2), 38.

20 Mishanina, T. V., Libiad, M., & Banerjee, R. (2015). Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nature Cell Biology*, *11*(7), 457-464.

metali iyonlarıyla veya oksijen radikalleriyle reaksiyona girmesiyle tiyil radikalleri oluşur.

$$RSH + OH^{\bullet} \rightarrow RS^{\bullet} + H_2O$$

$$RSH + RO_2^{\bullet} \rightarrow RS^{\bullet} + ROOH$$

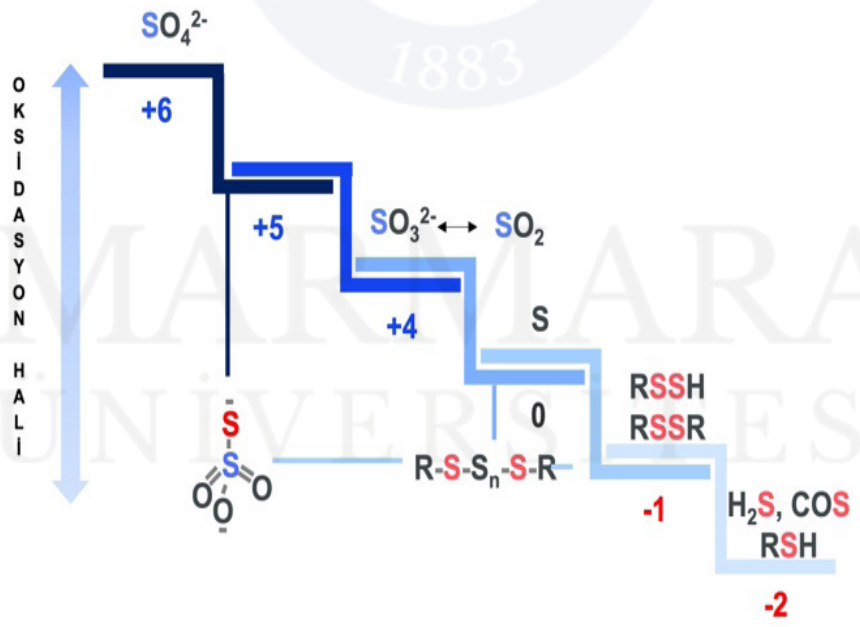
$$RSH + Fe^{3+} \rightarrow RS^{\bullet} + Fe^{2+} + H^{+}$$

$$RSH + Cu^{2+} \rightarrow RS^{\bullet} + Cu^{+} + H^{+}$$

Proteinlerdeki disülfit bağlarının homolitik fisyonu da radikal oluşturabilir.

$$\text{--sistein-S–S-sistein--} \rightarrow \text{--sistein-S}^{\bullet} + {}^{\bullet}\text{S-sistein—}$$

Tiyoller azot dioksit, tirozil radikalleri ve peroksinitrit ile reaksiyona girdiği zaman veya tiyollerin peroksidazlarla oksidasyonu sırasında da tiyil radikalleri oluşmaktadır.



Şekil 5. Biyolojik açıdan önemli kükürt türleri [21]

21 Bora, P., Chauhan, P., Pardeshi, K. A., & Chakrapani, H. (2018). Small molecule generators of biologically reactive sulfur species [10.1039/C8RA03658F]. *RSC Advances*, *8*(48), 27359-27374. https://doi.org/10.1039/C8RA03658F.

Oksidatif Stres

Nodira Alakbarova*
A. Süha Yalçın*

Oksijen kaynaklı serbest radikallerin çoğu, normal aerobik metabolizma sırasında veya radyasyon ve çevre kirliliğine maruz kalma gibi durumlarda düşük miktarlarda üretilir. Bunun sonucu olarak da hücrede antioksidan sistem tarafından sürekli düzeltilmesi gereken bir tahribat vardır. Reaktif türlerin miktarının ve etkisinin mevcut antioksidanlardan fazla olması oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres terimi yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak bu durumun tam olarak tanımlanması ve belirlenmesi zordur. Bu terim ilk kez 1991 yılında Helmut Sies tarafından kullanıldığında "prooksidan-antioksidan dengesinin prooksidanlar lehine bozukluğunun potansiyel hasara yol açması" olarak tanımlanmıştı. Sonraki yıllarda, Helmut Sies ve Dean Jones oksidatif stres tanımını geliştirdiler Buna göre oksidatif stres temelde oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizliktir. Oksidanlar lehine olan artış, redoks düzenlemenin bozulmasına ve sonuçta moleküler hasara neden olur. Yüksek seviyedeki oksidatif hasar sadece oksidatif stres yüzünden değil, onarım veya değiştirme sistemlerinin bozukluğundan da meydana gelebilir. [1]

Oksidatif stres olarak adlandırılan durumda reaktif türlerin miktarı ve etkisi ortamda mevcut antioksidanlardan fazladır. Aerob organizmalarda oksijen kaynaklı reaktif türlerin üretimi antioksidan savunma sistemi ile dengelenmeye çalışılmış olmasına karşın bu her zaman sağlanamaz. Bu nedenle de reaktif türlerden kaynaklanan sürekli bir hasar durumu mevcuttur. Antioksidan savunma sistemi reaktif türleri tamamen ortadan kaldırmak yerine onları belirli bir seviyede tutmayı ve kontrol etmeyi yeğlemektedir. Bunun nedenleri aşağıda sıralanmıştır:

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

1 Sies, H. (2019). Chapter 13 – Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. In G. Fink (Ed.), *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (pp. 153-163). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8.

- Aşırı miktarda antioksidan üretiminin enerji maliyeti vardır, onun yerine hasarlanmış molekülleri tamir etmek daha az enerji gerektirir.
- Bazı reaktif türlere karşı antioksidan savunma yetersiz kalabilmektedir. Örneğin, suyun homolitik fisyonu yoluyla sürekli bir •OH üretimi gerçekleşir. Bunu durdurmak neredeyse imkânsızdır. Onun yerine hasarın onarılması veya hasarlı moleküllerin değiştirilmesi tercih edilir.
- Reaktif türlerin *in vivo* düzenleyici rolü bir başka önemli faktördür. Son yıllarda, hücresel düzenlemede redoks dengesinin önemi ortaya konmuştur. Hücresel metabolizmanın düzenlenmesinde, fosforilasyon ve defosforilasyon aracılığı ile bazı transkripsiyon faktörlerinin ve enzimlerin görev aldığı da gayet iyi bilinmektedir. İki sistemin karşılıklı etkileşimi söz konusudur. Hücrenin redoks durumu fosforilasyonu etkilemekte ya da tam tersi gerçekleşmektedir.

Oksidatif stresin sonuçları

Oksidatif stresin hücresel sonuçları aşağıdakilerin herhangi birini veya birkaçını kapsayabilir. Bunlar incelenen hücreye ve dokuya, hasarın ciddiyetine ve oksidatif stresin zamanla oluşan şiddetine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir.

Proliferasyon: Birçok hücre hafif oksidatif strese çoğalarak tepki gösterir. Düşük seviyeli oksidatif stres, hücre kültürü ortamına H_20_2 veya 4-hidroksinonenal (HNE) gibi aldehitlerin eklenmesi gibi durumlarda çeşitli hücre türlerinin çoğalmasına sebep olur. Reaktif türlerin seviyesini azaltılması hücre çoğalmasını baskılayabilmektedir.

Adaptasyon: Genellikle hücreler ılımlı oksidatif strese dayanıklıdır. Antioksidan savunma sistemi hücre hasarını önlemek üzere devreye girer. Hücrenin oksidatif strese tepkisi hasara karşı tamamen koruma, hasara karşı belirli derecede koruma, aşırı koruma gibi birkaç şekilde olur. Aşırı korumadan sonraki tepki hücrenin yüksek seviyedeki oksidatif strese direnç göstermesidir.

Göç ve yapışma: Hücre hareketi ve hücrelerin ekstrasellüler matrikse yapışması embriyonik gelişim için gereklidir. Yaralanma ve iltihaplanmaya yanıt olarak gelişen doku yenilenmesinde de göç ve hareket vardır. Reaktif türlerin adezyon moleküllerinin seviyelerini düzenlemede rol oynadığı ve malignant hücrelerin metastazını desteklediği bilinmektedir.

Hücre yaralanması: Yaralanma, kimyasal veya fiziksel uyarının ya da geçici olarak hücrenin homeostazının değişmesi sonucu olabilir. Oksidatif hasar tersine çevrilebilirse hücre ölümüne yol açmaz, hatta

bir süre sonra hücre normal haline geri dönebilir. Ilımlı oksidatif stres seviyeleri hücre proliferasyonunu durdurma eğilimindedir. Geçici olarak hücre döngüsü kontrol noktalarını tetikler.

Hücre yaşlanması: Yüksek seviyedeki reaktif türler tarafından uyarılmış hücrelerde kalıcı bir bölünmeme durumu ortaya çıkabilir. Örneğin, insan fibroblastlarının 100-300 μM H_2O_2'e maruz bırakıldığında yaşlanmış bir fenotip geliştirdiği ve hücre döngüsünü engelleyen protein seviyelerinin arttığı gösterilmiştir.

Hücre ölümü: Hücre yaralandıktan sonra, oksidatif hasarlı molekülleri tamir ederek veya değiştirerek ve oksidatif hasara dayanıklık göstererek hayatta kalabilir. Ancak oksidatif hasar, özellikle DNA'da ise hücre ölüm mekanizmaları harekete geçerek apoptoz veya nekroz yolu ile ölümü tetikleyebilir. [2]

Oksidatif stres ve iyonlar

Reaktif türler iyon hareketlerini çeşitli yollarla etkileyebilir:

- Redoks düzenleme yolu ile iyon kanalı olarak görev yapan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonuna neden olabilir.
- Redoks düzenlemeyle bir iyon kanalının açılması, hücresel iyon dengesizliğine ya da membran potansiyelindeki ikincil değişikliklere sebep olabilir.
- Esansiyel tiyol gruplarının glutatyon (GSH) ile ve nitrozilleme ile değişmesi veya tirozin kalıntılarının nitratlama yoluyla oksitlenmesi ve indirgenmesi gibi değişiklikler gerçekleşebilir. Bu değişikliklerden bazıları iyon kanalı proteinlerinin yıkımına yol açabilir.
- **Na^+/K^+-ATPaz:** Oksidatif stres, hücre içi ve hücre dışı sıvı arasındaki iyon dengesini koruyan proteinlere zarar verebilir. Plazma zarındaki Na^+/K^+-ATPaz enzimi (sodyum pompası olarak da adlandırılır) ATP'nin hidrolizinden oluşan enerjiyi kullanarak 3 K^+ iyonunu hücre içine alırken ve 2 Na^+iyonunu hücre dışına çıkarır. Böylece hücre içinde K^+, hücre dışında da Na^+ konsantrasyonunun yüksek tutulması sağlanır. Bu enzim katalitik aktivite için gerekli olan ancak oksidatif saldırıya duyarlı – SH grupları içermektedir. Reaktif türlerden $^{\bullet}OH$ ve GSH bu gruplar üzerinde değişiklik yaparak pompa aktivitesini azaltabilir. Ayrıca, hem K^+ hem de Na^+ kanalları reaktif türlerden ve lipit peroksidasyonu ürünü olan aldehitlerden etkilenir.

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

Kalsiyum iyonları: Genelde hücre içi serbest Ca^{2+} konsantrasyonu düşük buna karşılık total Ca^{2+} konsantrasyonu çok daha yüksektir. Ca^{2+} büyük ölçüde mitokondride ve endoplazmik retikulum içinde tutulmaktadır. Serbest Ca^{2+} seviyelerindeki geçici değişimler hücre proliferasyonu ve nörotransmitterlerin salınması gibi birçok fizyolojik süreci kontrol eder. Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu çeşitli sistemlerin uyumlu çalışması ile korunmaktadır. Ancak, oksidatif stres Ca^{2+} metabolizmasını düzensizleştirerek hücre içi serbest Ca^{2+} seviyesinin artışına neden olur. Kalsiyum iyonlarının miktarındaki değişiklikler düşük seviyedeki oksidatif stresin pro-proliferatif etkileriyle ve yüksek seviyelerdeki sitotoksisiteyle yakından ilişkilidir. Reaktif türler, plazma membranında ve endoplazmik retikülumda bulunan Ca^{2+} akış sistemlerini bozabilir, transmembran kanallardaki – SH gruplarının oksidasyonuna ve nitrozilasyonuna neden olabilir. Ayrıca, oksidatif stres sonucunda membran potansiyelinin azalması ve plazma zarında bulunan voltaj-kapılı kanalların açılması söz konusudur. Artan Ca^{2+} seviyeleri fosfolipaz A_2 enzimini aktive eder. Bu enzim, membran fosfolipitlerini parçalar, lökotrienleri ve prostaglandinleri üretmek üzere araşidonik asidi serbestleştirir. Serbest yağ asitlerinin ve eikozanoidlerin üretimi Ca^{2+} seviyeleri yükseldiği zaman artmaktadır. Bu durum membran organizasyonunu bozan lipit hidroliz ürünlerinin birikmesine yol açar. Kalsiyum iyonlarının artışı Ca^{2+} bağımlı-endonükleazları aktive ederek nükleusta DNA fragmentasyonuna neden olur. Bu olay apoptoz açısından çok önemlidir. Transglutaminaz ailesinden transglutaminaz-2 enzimi de Ca^{2+} tarafından aktive edilir. Bunun sonucunda proteinlerdeki bazı lizin ve glutamin kalıntıları birleşerek çözünmez agregatlar oluşturur. [3]

Hücre ölümü

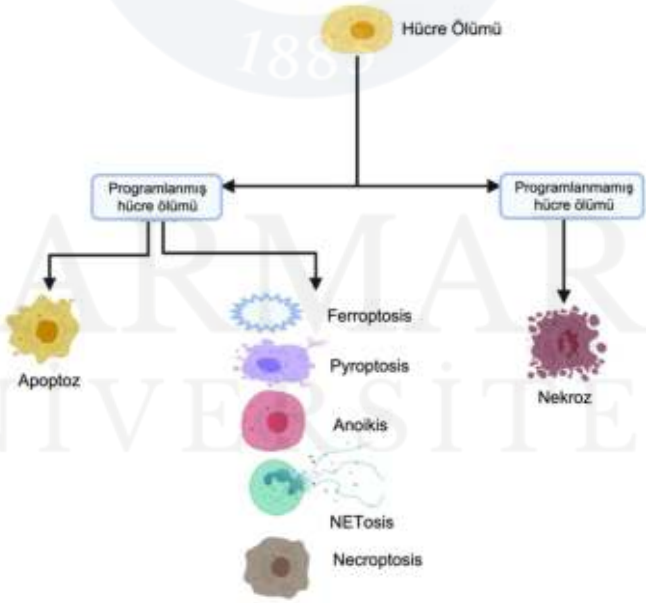
Aşırı oksidatif stres hücrelerin ölümü ile sonuçlanır. [4] Ölüm birbiriyle örtüşen birkaç farklı mekanizmadan kaynaklanabilir. Bunlar çeşitli yöntemlerle ölçülerek, hangisinin hücre ölümüne sebep olduğu aydınlatılmaya çalışılır. Hücre ölümünün çoğunlukla iki temel mekanizma sonucunda olduğu gözlenir: Apoptoz ve nekroz. Ancak sıklıkla ölüm her iki yolağın özelliklerine sahip mekanizmalarla gerçekleşir (Şekil 1). Nekroptoz, programlanmış hücre nekrozu veya düzenlenmiş nekroz olarak anılan bir olaydır. Burada genellikle çeşitli sinyal ileti yolakları, özellikle de reseptörler ile etkileşen protein kinazlar aracılığıyla apoptoza karışan bazı

3 Ermak, G., & Davies, K. J. (2002). Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Molecular Immunology*, *38*(10), 713-721.

4 Battistelli, M., Malatesta, M., & Meschini, S. (2016). Oxidative Stress to Promote Cell Death or Survival. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 2054650. https://doi.org/10.1155/2016/2054650.

proteinler inaktive edilir. Ferroptoz serbest demir iyonları ve reaktif türlerin varlığında gerçekleşen ve apoptotik olmayan hücre ölümüdür**.** Piroptoz (Yunanca gökten düşen ateş) hücre ölümü mekanizması nekrozun bazı özelliklerine sahip olan ve HIV enfeksiyonu sonrası lenfosit ölümüne katkı yapan bir süreçtir. Embriyonik gelişimde programlanmış hücre yaşlanması ile hücre ölümü önemlidir.

Nekroz ve apoptoz oksidatif strese bağlı olarak veya daha birçok nedenle gelişir. Memeli hücrelerinde H_2O_2'in mM seviyeleri nekroza neden olurken, çok daha düşük konsantrasyondaki H_2O_2 apoptotik hücre ölümünü başlatmaktadır. İyon kanallarının H_2O_2 ile aktivasyonu ve hücre içi Ca^{2+} artışı, hücre ölüm mekanizmalarının hangisinin seçileceğinin belirlenmesinde önemlidir. Nekroz ile hücre ölümünde hücre organellerinin şişmesi, mitokondriyal bütünlüğün kaybı, peroksizomal ve lizozomal membranların yanı sıra plazma membranının yapısının tamamen bozulması ve hücresel içeriğin dışarıya çıkması söz konusudur. Bu süreçte antioksidan enzimler ile çevredeki hücreleri olumsuz etkileyebilecek özellikteki hem, demir ve bakır gibi prooksidanlar salınır. Ayrıca aktifleşen kalpain ve peroksiredoksinler gibi bazı bileşenler enflamasyona yol açabilir.



Şekil 1. Hücre ölüm mekanizmaları [5]

5 Deshpande, R., & Zou, C. (2020). Pseudomonas Aeruginosa Induced Cell Death in Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(15), 5356. https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5356.

Apoptoz çevredeki hücrelere etkisi olmayan bir hücre ölüm şeklidir. Burada hücre kendi intihar mekanizmasını aktive eder ve sonrasında hücre içeriğini sindirerek dışarıya atmaksızın yok eder. Apoptozda en erken görülen değişiklikler, hücre yoğunlaşması, kondensasyon ve kromatin parçalanmasıdır. Bu durum genellikle DNA çift sarmal yapısının bozulması ile ilişkilidir. Diğer değişiklikler hücre iskelet yapısının bozulması, nükleer parçalanma ve nihayetinde tüm hücre içeriğinin zar yapısı bozulmaksızın organel parçalarını içeren apoptotik cisimlere dönüşümüdür. Apoptotik cisimler makrofajlar tarafından fagosite edilir, bu süreç efferositoz (Latince cesedin mezarlığa taşınması) olarak adlandırılır. Fagositlerin yüzeyindeki reseptörler apoptotik hücreleri "beni ye" sinyalleri yardımı ile tanır. Bu sinyallerden biri olan fosfotidilserinin reseptörlere bağlanması, makrofajlar tarafından proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltırken anti-inflamatuvar moleküllerin üretimini arttırır.

Oksidatif stres apoptozun sebebi olabilir: Pro-apoptotik faktörlerin salgılanmasına yol açan mitokondriyal permeabilite geçiş poru oluşumunu indükler. Bir diğer mekanizma ise aşırı miktarda GSH tüketimidir. Apoptoz sürecinde oksidatif ajanlara maruz kalan proteinlerin – SH grupları reaktif türler tarafından inaktive edilebilir. Reaktif türlerin yüksek seviyeleri apoptozu geciktirebilir veya durdurabilir. Genellikle hücre ölümü nekroptoza geçerek devam eder.

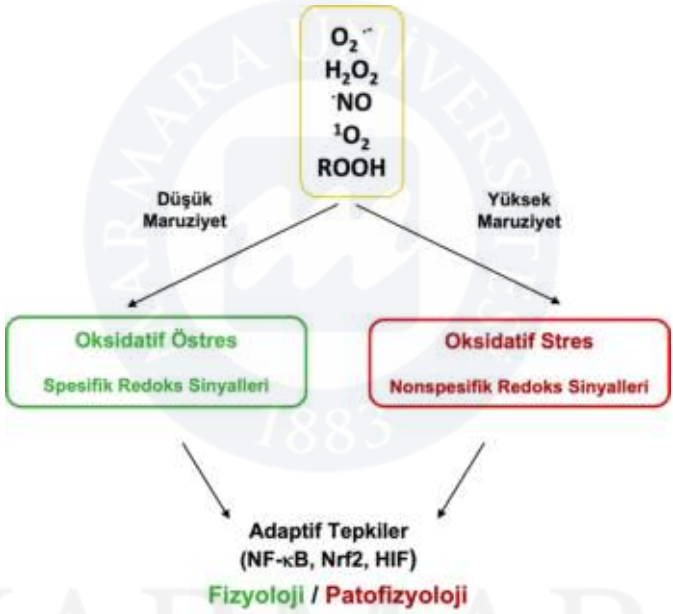
Redoks düzenleme

Redoks reaksiyonları hücre içi ve hücreler arası sinyal iletisinde, hücrenin hormon ve büyüme faktörlerine cevabında, mitokondri ve diğer organeller arası haberleşmede ve strese karşı organ ve dokulardaki yanıtların düzenlenmesinde kilit rol oynar. [6] İyon kanalları, p53, kaspaz, akonitaz gibi bazı proteinler direkt olarak redoks dengesiyle düzenlenmektedir. Diğer bazı proteinlerin sinyalleri ise redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri kullanılarak gen transkripsiyonu üzerinden kontrol edilir. Hücrede en az iki tür redoks düzenleme mekanizması vardır. Birincisi – SH gruplarının yükseltgenmesi ve indirgenmesidir. Glutatyon ile etkileşme ve nitrozilleme başlıca modifikasyonlardır. Diğer redoks düzenleme mekanizması ise Fe-S kümelerinde bulunan demir iyonlarının indirgenmesi ve yükseltgenmesiyle gerçekleşir.

Memeli hücrelerinin en önemli özelliklerinden biri otokrin, parakrin ve endokrin sinyallere yanıt vermeleridir. Bir sinyal molekülü reseptörüne bağlandığında, hücredeki çoğalma, farklılaşma, hareket, metabolizma ve hücresel davranış gibi çeşitli olayların

6 Forman, H. J., Ursini, F., & Maiorino, M. (2014). An overview of mechanisms of redox signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *73*, 2-9.

düzenlenmesinde görevli bir dizi hücre içi yanıtı başlatır. Hücreye dışarıdan gelen sinyaller hücre içindeki çeşitli moleküller aracılığıyla çekirdeğe kadar iletilir. Böylece gelen sinyale bağlı olarak bazı genlerin transkripsiyonunda ve hücre içi moleküllerin davranışında değişiklikler olur. Protein kinaz ve protein fosfatazlar sinyal iletisinin başlıca bileşenleridir. Reaktif türlerin etkisi genellikle fosforilasyonu artırmak ve defosforilasyonu inhibe etmek şeklindedir. Ayrıca belirli konsantrasyon aralığında sinyal ileti yolaklarının bileşenleri üzerinde doğrudan etkileri vardır. Ancak yüksek miktarlarda üretildikleri zaman patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Reaktif türler, oksidatif stres ve redoks sinyalleri arasındaki ilişki [7]

Elektron taşıma zincirinin bazı bileşenleri mitokondriyal DNA tarafından kodlanmakla birlikte mitokondri için gerekli olan genlerin çoğu nükleer DNA'da bulunur. Bundan dolayı nükleer ve mitokondriyal gen ekspresyonunu hem normal durumda hem de stres durumunda koordine edilmelidir. Örneğin, PGC-1α çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktive ederek mitokondriyal biyogenezi indükler. Bu faktörlerin en önemli iki tanesi olan Nrf1 ve Nrf2 mitokondriyal proteinlere ilişkin nükleer genlerin ekspresyonunu kontrol eder. Ancak, esansiyel –SH gruplarının oksidasyonundan dolayı Nrf2'nin DNA'ya bağlanması reaktif türler tarafından inhibe edilir.

7 Sies, H. (2020). Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants*, *9*(9), 852. https://www.mdpi.com/2076-3921/9/9/852.

Transkripsiyon faktörü AP-1 hücre içi redoks durumunu algılar. AP-1'in DNA'ya bağlanması redoks sisteminin kontrolü altındadır. Oksidasyon AP-1'in DNA' ya bağlanmasını azaltır. Stres tepkisinde yer alan çoklu genlerin ekspresyonu, hücre büyümesi ve farklılaşması bazı sitokinler ile büyüme faktörüne yanıt olarak AP-1 tarafından regüle edilir.

Antioksidan yanıt elemanları (ARE), Nrf1 ve Nrf2'nin bağlanabileceği DNA üzerinde yer alan dizilerdir. Nrf2'nin ARE'lere bağlanması bazı transkripsiyon genlerinin ekspresyonunu arttırır. Bunlar ksenobiyotik metabolizmasıyla ilgili enzimlerden NAD(P)H kinon oksiredüktaz, GST, UDP-glukuronil transferazlar ile CYP2A5, P-glikoprotein ve çoklu ilaç direnciyle ilişkili diğer proteinlerdir. Ek olarak, Nrf2 aktivasyonu HO-1 kodlayan genlerin ekspresyonunu ve GPx2, Prx1, tiyoredoksin, γ-GCS gibi antioksidan savunma seviyelerini arttırır. Bu değişiklikler ksenobiyotik metabolizmasında artışa neden olur ve hücrenin oksidatif strese karşı daha dayanıklı olmasını sağlar.

Sitokinler ve hormonlar

Redoks düzenleme sistemlerinin çoğu hücre içindedir. Çok hücreli organizmalarda hücreler arası haberleşmede nitrik oksitin oynadığı rol uzunca bir süredir bilinmektedir. Diğer reaktif türlerin hücreler arası haberleşmedeki rolleri için de yeni kanıtlar ve bilgiler elde edilmektedir. Hücreler strese maruz kaldıkları zaman reaktif türleri salgılayarak çevreye mesaj gönderebilir. Bununla ilgili en iyi örnek apoptoz sürecidir. Apoptotik hücredeki oksitlenmiş lipitler çevredeki diğer komşu hücreleri etkileyebilir. Hücreler arası haberleşme hücre-hücre teması ile meydana gelir. Reaktif türlerden H_2O_2 yakın mesafede olan veya bitişik hücrelerde enflamasyonu tetikleyebilir. Oksidatif stres ise H_2O_2, indirgenmiş/yükseltgenmiş glutatyon (GSH/GSSG) veya tiyoredoksin değişimi gibi yollarla çevreye bilgi aktarımını sağlar. Ancak farklı organlarda yerleşik olan hücreler arasındaki haberleşmede, reaktif türler kısa yarı ömürleri nedeniyle doğrudan aracılık edemez. Bu tür mesajlar hormonlar yardımı ile verilir. İnsülin, tiroid hormonları, adrenalin, östrojen ve testesteron gibi hormonlar kana salındıktan sonra farklı hücrelerde çeşitli hücre içi sinyal yolaklarının yardımı ile etki gösterir. Diğer bir sinyal mekanizması sitokinler tarafından sağlanır. Sitokinler, hayvan ve bitki hücrelerinde üretilen, hücrelerin birbirleriyle iletişimini sağlayan bir grup protein ve peptidlerdir. Organizmadaki varlıkları genellikle geçicidir ve kesinlikle kontrol altındadır. Sitokinler normal büyümede, enflamasyon gelişiminde, yaralanma zamanı, doku onarımı ve yenilenmesi gibi süreçlerde kilit rol oynar. Bazı sitokinler pro-enflamatuar, bazıları da anti-enflamatuardır.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Pro-enflamatuar sitokinler oksidatif strese yanıt olarak sentezlenir ve hedef hücrelerde etki gösterir. Örneğin, hücrede NF-kB aktif olduğu zaman bazı sitokinler üretilir. Anti-enflamatuar sitokinler ise oksidatif stresi ve ROS üretimini azaltır.

Hücresel hedefler

Antioksidan savunma sistemlerine rağmen vücutta açığa çıkan serbest radikaller makromoleküllerde hasara sebep olabilir. Hasar gören moleküllerden DNA'nın yapısındaki nükleotitler değişime uğrayarak bulundukları hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine yol açabilir. Bazı reaktif türler DNA yapısında direkt hasar oluşturmanın yanında sinyal iletimi üzerinden etki ederek hücre proliferasyonu, yaşlanma ve hücre ölümüne neden olur. DNA yapısındaki direkt hasar, purin ya da pirimidin bazları ile 2-deoksiriboz üzerinde oluşur. İndirekt olarak ise Ca^{2+} bağımlı endonükleazların aktivasyonu yoluyla hasar meydana gelebilir. Fizyolojik pH koşullarında fosfat gruplarının varlığı nedeniyle DNA negatif yüklüdür. Bundan dolayı da Na^{+} ve K^{+} gibi katyonların yanı sıra Fe^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının DNA'ya bağlanma affinitesi yüksektir. Oksidatif stres demir ve bakır iyonlarının serbestleşmesine neden olur. Bu süreçte [Fe-S] proteinleri ile bakır içeren proteinler DNA'ya bağlanarak molekülü H_2O_2 saldırısı için hedef haline getirir. DNA ayrıca lipit peroksidasyonunun ve glikooksidasyonun son ürünleri ile de modifiye olabilir. Riboz ve 2-deoksiriboz yapısı $OH^{\bullet}$ radikali tarafından parçalanır, karbon merkezli radikaller oluşturarak O_2 varlığında hızla şeker peroksil radikallerine dönüşür. Böylece çeşitli reaksiyonlara giren karbonil ürünleri oluşur. Bazı amino asitler özellikle de histidin, H_2O_2 tarafından oluşturulan DNA hasarını arttırır. UV ışınları da DNA'da hızla hasar oluşturur. Bu etkilerde H_2O_2'den $OH^{\bullet}$ radikali üretimi ve pirimidinlerin çapraz kovalent bağlanmasıyla oluşan siklobutan pirimidin dimerleri önemlidir. Ayrıca in vitro olarak hücre kültürü ortamlarına H_2O_2 eklenmesi, DNA zincirinin kopmasına ve baz modifikasyonunda artışa neden olmaktadır. DNA diziliminde oluşan değişimlere mutasyon adı verilir. DNA'da oksidatif stres ya da başka türlü oluşan hasar sonrası tamir tamamlanana kadar DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi durdurulur. RNA'nın oksidatif modifikasyonu protein sentezinde azalmaya ve sentez

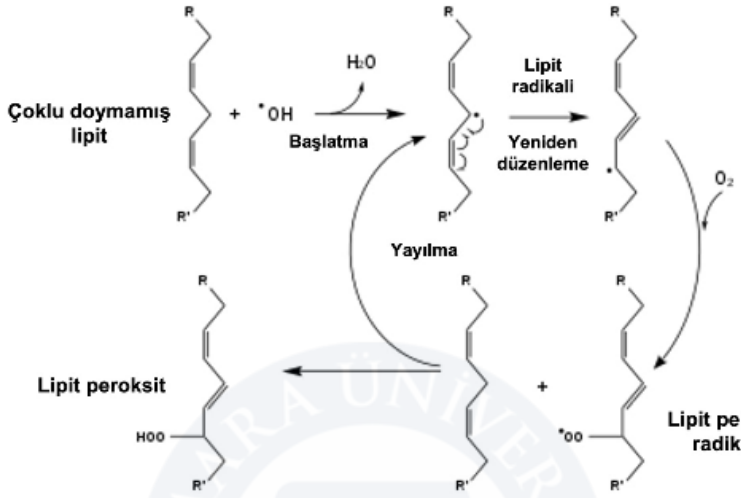
sürecinde bazı hataların oluşmasına neden olur. Bu durum hücre ölümü ile sonuçlanabilir. [8, 9]

Lipitler bütün biyolojik moleküller içerisinde serbest radikallere karşı en hassas olan ve onlardan en çok etkilenen yapılardır. Lipit peroksidasyonu (Şekil 3) yıllar önce A.L. Tappel tarafından tanımlanan bir biçimde yapısında çoklu doymamış yağ asitlerini (*polyunsaturated fatty acids, PUFA*) bulunan lipitlerin oksidatif bozulmasıdır. [10] Yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturur. Ayrıca reaktif oksijen türleri diğer bileşiklerden olduğu gibi lipitlerden de elektron koparark lipit radikallerini oluşturur. Bu durum yeni radikaller üreterek zincir reaksiyonlara neden olduğu için çok zararlıdır. Meydana gelen hasar geri dönüşümsüzdür. Örneğin mitokondri membranındaki lipitlerin peroksidasyonu yaşlanmaya bağlı bazı hastalıklar oluşturur. Travmatik beyin hasarındaki sekeller ve apoptoz sırasında membrandan sitoktom c ayrılması da lipitlerin oksidasyonuyla ilişkili süreçlerdir. Lipit peroksitleri vücut sıcaklığında kararlıdır, ancak demir iyonu varlığında bileşenlere ayrılırlar. Demir ve bazı demir şelatları lipit peroksitleri ile reaksiyona girerek O-O bağlarını kırar ve alkoksil radikalini üretirler. Bakır iyonu da peroksit parçalanmasının güçlü bir aktifleştiricisi olarak bilinir. Özellikle de LDL'nin peroksidasyonunda etkilidir. Lipit peroksidasyonu membran akışkanlığını azaltır. Lipit çift tabakanın iki yarısı arasında fosfolipitlerin değiş tokuşu kolaylaşır ve asimetri bozulur. Membran proteinlerinin çapraz bağlanmaları lateral ve rotasyonel hareketleri azaltır. Proteinlerin inaktivasyonu ile reseptör ve enzim fonksiyonlarını kaybetmeleri kolaylaşır. Oksidatif stres sonucunda hücre içinde Ca^{2+} iyonu artması, fosfolipaz A_2'yi aktive ederek araşidonik asitin serbestleşmesine neden olur. Endoplazmik retikulum ve Golgi membranında lipit peroksidasyonu sonucu oluşan hasar, protein katlanması, glikozillenme ve protein eksportu gibi bazı hücresel yeteneklerin azalmasına neden olur. Membran lipitlerinde ve lipoproteinlerde bulunan kolesterol halkasının veya kolesteroldeki ester bağının da oksitlenmesi mümkündür.

8 Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal*, *17*(10), 1195-1214.

9 Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A., & Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology 25*, 101084. https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084.

10 Tappel, A., & Zalkin, H. (1960). Inhibition of lipid peroxidation in microsomes by vitamin E. *Nature*, *185*(4705), 35-35.



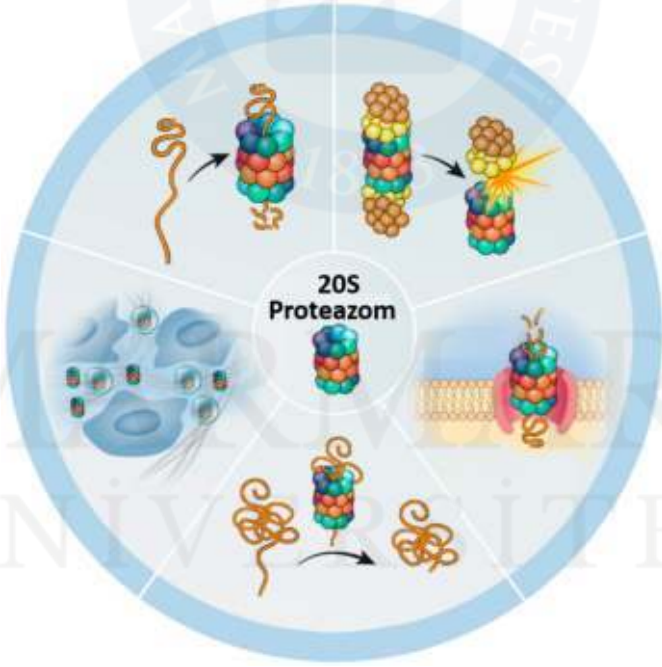
Şekil 3. Lipit peroksidasyonunun aşamaları

Proteinlerin oksidatif hasarı ile üstlendikleri reseptör, enzim, antikor, sinyal iletisi, transport ve yapısal fonksiyonlar etkilenir. [11] Herhangi bir proteinde meydana gelen hasar, etkileştiği diğer protein ve biyomoleküllerde ikincil hasarlar oluşturabilir. Ca^{2+} iyonlarının artması kalpainler, nükleazlar ve lipazlar gibi enzimleri aktive eder. Öte yandan, oksitlenmiş veya aldehitlerle modifikasyona uğramış olan proteinler bağışıklık sistemi tarafından yabancı olarak tanınır. Bunun sonucu olarak organizmadaki otoimmün reaksiyonlar artabilir. Protein hasarı, bazı radikallerin direkt etkisiyle (örneğin $OH^{\bullet}$) veya HOCl, ONOOH gibi radikal olmayan moleküllerden ya da lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden (MDA ve HNE gibi) kaynaklanabilir. Proteinler glikasyon veya glikoksidasyondan etkilenerek de hasarlanabilir. Artmış protein hasarı ise kanser, sarkopeni, otoimmün bozukluklar gibi bazı hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Tirozin kalıntıları üzerine ONOOH, NO_2, HOCl, HOBr ve NO_2Cl gibi çeşitli reaktif türlerin saldırısı kalıcı hasarlar oluşturabilir. Proteinlerdeki peptit bağları da saldırıya maruz kalabilir. Fizyolojik seviyelerdeki H_2O_2, NO ve O_2 proteinler üzerinde çok az etkilidir. Ancak, H_2O_2 kolay oksitlenebilen – SH gruplarını etkileyebilir. Protein peroksitleri –SH grubu içeren enzimlerde hasar oluştururken metiyonin oksidasyondan dolayı inhibe olan proteinleri tekrar aktifleyebilir.

11 Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal*, *473*(7), 805-825.

Otofaji evrimsel olarak korunmuş bir katabolik süreç olup otofagozom olarak adlandırılan çift zarlı vezikül içinde gerçekleşir. Otofaji protein sentezi ve organel dönüşümü gibi homeostatik fonksiyonlar için çok önemlidir. Hücrelerin bulunduğu ortamdan gerekli besini alamaması durumunda ortaya çıkarak hücrenin varlığını sürdürmesini sağlar. Ayrıca patojenler ile enfeksiyon, hipoksi gibi olaylardan ya da reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan hücresel stres ile tetiklenebilir. [12]

Oksidatif hasarlı proteinleri proteazom adı verilen yapılar uzaklaştırır (Şekil 4). Bu yapının çekirdeğini oluşturan 20S proteazomdur. Silindirik yapısı her biri 7 tane protein altbirim içeren 4 tane halkadan oluşmuştur. Silindirik yapının 3 deliği bulunur. Merkezdeki delik proteolitik bölgeleri içerir, diğer ikisi kontrol fonksiyonuna sahiptir. Yaşlanmayla birlikte proteazom aktivitesi de azalmaktadır.



Şekil 4. Proteazom yapısı [13]

12 Majeski, A. E., & Dice, J. F. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36*(12), 2435-2444.

13 Kumar Deshmukh, F., Yaffe, D., Olshina, M. A., Ben-Nissan, G., & Sharon, M. (2019). The contribution of the 20S proteasome to proteostasis. *Biomolecules*, *9*(5), 190. https://www.mdpi.com/2218-273X/9/5/190.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Bir başka proteolitik sistem olan Lon proteaz ise mitokondriyal ve peroksizomal proteinlerin kalite kontrol sistemidir. Lon proteaz sistemi ATP tarafından uyarılır. Bu sistem mitokondride oksitlenen proteinlerden akonitazı, peroksizomlarda ise katalazı parçalamaktadır. Lon proteaz seviyesi strese tepki olarak artar.

Reaktif türler tarafından karbonhidratlar da hasara uğratılabilir.[14] Örneğin monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Bir okzoaldehit olan glioksal, DNA ve RNA arasında çapraz bağ oluşturma özelliğinden dolayı antimitotik etkilidir. Süperoksit radikalinin ve hidrojen peroksitin *in vitro* koşulda hiyalüronik asidi parçaladıkları da gösterilmiştir.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

14 Morelli, R., Russo-Volpe, S., Bruno, N., & Lo Scalzo, R. (2003). Fenton-dependent damage to carbohydrates: free radical scavenging activity of some simple sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(25), 7418-7425.

Antioksidanlar

Ceren Avcılar*
A. Süha Yalçın*

Oksijenli yaşamla birlikte aerobik organizmalarda oksijen kaynaklı radikaller oluşmaya başlamış, bununla hemen hemen eş zamanlı olarak oluşan radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere antioksidan savunma mekanizmaları gelişmiştir. En basit anlatımla antioksidanlar serbest radikallere elektron aktararak onları etkisizleştiren moleküllerdir. Hücrelerde serbest radikaller ile antioksidanların düzeyleri arasında hassas bir denge vardır. Dengenin korunamadığı durumlarda hücre hasarına kadar giden çeşitli patolojik durumlar ortaya çıkar. Antioksidan kavramı yaygın olarak kullanılmakla birlikte antioksidan tanımı ve antioksidanların sınıflandırılması farklı şekillerde yapılabilir. İlk belirlenen etkileri zar yapısındaki lipitlerin peroksidasyona karşı korunması olduğundan, önceleri antioksidanlar lipit peroksidasyonunu engelleyen yapılar olarak tanımlanmıştır. [1, 2]

Günümüzde antioksidan etkiler ve tanımları çok çeşitlidir:

- Gıda teknolojisi uzmanları antioksidanı lipit peroksidasyonunun iyi bir baskılayıcısı olarak tanımlarken, endüstriyel olarak kauçuk, plastik ve boya üretiminde, polimerizasyonun kontrolünde, yağları bozunmaya karşı korumada veya şeffaf plastiklerin UV ışığa karşı korunmasında etkili olan yapılar da antioksidan olarak bilinir.
- Canlı organizmalarda ve *in vivo* koşullarda reaktif türlere karşı koyan birçok antioksidan etki devreye girer. Antioksidanların önemi hangi serbest radikalin veya reaktif türün hangi miktarda, ne zaman, nasıl ve nerede üretildiğine ve zarar verebileceği hedefe bağlı olarak değişmektedir. Örneğin, insan vücut sıvıları ozon (O_3) veya azot dioksit ($NO_2^{\bullet}$) molekülüne

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

1 Aziz, M. A., Diab, A. S., & Mohammed, A. A. (2019). Antioxidant categories and mode of action. In *Antioxidants*. IntechOpen London, UK.

2 Yalçın, A. S. (1998). Antioksidanlar. *Klinik gelişim*, *11*(342-346).

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

maruz kaldığında ürat koruyucu bir antioksidandır. Buna karşılık aynı ürat molekülü hipokloröz asitin (HOCl) plazmada verdiği zarara karşı çok az koruma sağlar.

- Reaktif tür kaynağının farklılığına ve hedef moleküllerin hangileri olduğuna bağlı olarak antioksidan etkinin değişmesi söz konusudur. Sonuç olarak, kabul gören ve öne çıkan tanım şöyledir: Antioksidanlar reaktif türlere karşı koyan ve onların hedefi olan moleküller üzerindeki etkilerini önemli ölçüde geciktiren veya önleyen maddelerdir.
- Son yıllarda antioksidan etkinin kapsamı hasar gören moleküllerin tamir mekanizmalarını içerecek şekilde genişletilmiştir. Antioksidan savunmanın düzeyi ve içeriği dokudan dokuya, hücre tipine (belirli bir dokuda aynı tipte hücreden hücreye) ve farklı hücre altı organellere göre değişkenlik gösterir. Hatta günün saatine göre de değişebilir. Hücre dışı sıvılar, hücre içi ortamdan farklı koruyucu mekanizmalara sahiptir.
- Antioksidan savunma genetik polimorfizmlerden de etkilenebilir. Ayrıca organizmanın yüksek seviyede reaktif türlere ve sitokinlere maruz kalmasından sonra da antioksidan savunmada artış olur. Egzersiz, antioksidan savunma mekanizmalarının seviyesini yükseltir.

Sınıflandırma

Antioksidanlar çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir.

1. Etki mekanizmalarına göre: enzimler ve enzim olmayanlar. Antioksidan enzimler zararlı oksidasyon ürünlerini önce hidrojen peroksite daha sonra suya dönüştürür. Bu reaksiyonlarda kofaktör olarak çeşitli metaller, örneğin bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn), selenyum (Se) ve demir (Fe) kullanılır. Bitkisel polifenoller, karotenoidler ve glutatyon ile C vitamini ve E vitamini, enzim olmayan antioksidanlardır. Bunlar serbest radikal zincir reaksiyonlarını engellerler.

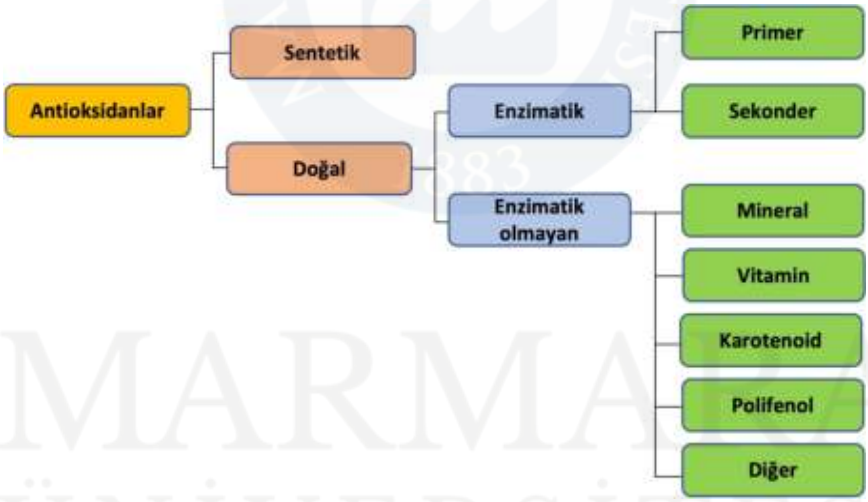
2. Çözünürlüklerine göre: suda çözünen ve lipitlerde çözünenler. C vitamini sitoplazmada ve diğer hücresel sıvılarda bulunan bir suda çözünür antioksidandır.

3. Boyutlarına göre: küçük moleküller ve büyük moleküller. Küçük moleküller reaktif türleri süpürücü etki gösterir ve etkisizleştirirler. BU gruptaki moleküllerden başlıcaları C ve E vitaminleri, karotenoidler ve glutatyondur. Büyük moleküller arasında SOD, CAT ve GPx gibi enzimler ile albumin gibi

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

radikalleri tutan ve diğer proteinlere saldırıları engelleyen proteinler yer alır.

4. Antioksidanlar doğal ve sentetik antioksidanlar olarak da gruplanabilir. Antioksidan etkili mineraller (örneğin selenyum, bakır, demir, çinko ve mangan) antioksidan enzimlerin kofaktörü olarak görev yaparlar. Antioksidan vitaminlerden B, C ve E vitaminleri birçok vücut fonksiyonunun yerine getirlmesinde önemlidir. Doğal antioksidanların pek çoğu fenolik yapılardır. Bunlar zincir-kırıcı antioksidanlar olarak etki yaparak radikalleri daha kararlı yapılara dönüştürür. Fitokimyasallar olarak bilinen bu moleküllerden başlıcaları flavonoidler, kateşinler, karotenoidler, likopen, kurkumin ve türevleridir. Sentetik antioksidanlar ise radikalleri tutan ve zincirleme reaksiyonlarını durduran fenolik yapıda bileşiklerdir. Başlıca örnekler butillenmiş hidroksianisol (BHA), butillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG), metal şelatlayıcı bir ajan olan EDTA'dır.



Şekil 1. Antioksidanların sınıflandırması

Süperoksit radikalinin etkisizleştirilmesi

Süperoksit radikali çeşitli yollarla hücre hasarına yol açabilir. Öncelikle, kendisini ortadan kaldıran antioksidan enzimlerin aktivitesini azaltabilir. Hidrofobik bir yapı olan hücre zarının iç kısmında üretilen $O_2^{\bullet -}$ reaktiftir ve çevresindeki yapılara zarar verir. Protonlanmış hali ($HO_2^{\bullet}$), daha da reaktiftir ve yağ asitlerinin peroksidasyonunu başlatabilir. Yüksüz olan $HO_2^{\bullet}$, membranı kolay bir şekilde geçer. Bu nedenle membrana yakın yerlerde oluşan $HO_2^{\bullet}$ ile membran içinde oluşan $O_2^{\bullet -}$ kolayca hasara neden

olabilir. Süperoksit radikalinin zarar verdiği bazı proteinlere örnek olarak, 6-fosfoglukonat dehidrataz, akonitaz, fumaraz gibi enzimler verilebilir. Krebs döngüsü, enerji metabolizması ve amino asitlerin sentezi ile ilgili reaksiyonlar $O_2^{\bullet-}$'nin zarar verdiği başlıca olaylardır. Süperoksit, pentoz fosfat yolunda önemli bir enzim olan transketolaz ile de etkileşime girebilir. Aktif bölgesindeki ara ürünü oksitleyerek enzimi inhibe eder. Bir başka hedef, DNA öncüllerini sağlayan ribonükleotit redüktazdır. Bu enzim, aktif bölgesindeki tirozin radikalini söndürebilen NO ve $O_2^{\bullet-}$ gibi radikaller tarafından inaktive edilir. Süperoksit direkt hasara neden olmasının yanı sıra diğer reaktif türleri üreterek de hücrelere zarar verebilir. Örneğin, spontan veya süperoksit dismütaz (SOD) katalizli dismutasyonu H_2O_2 üretir. Hidrojen peroksitin fizyolojik seviyelerdeki reaktivitesi azdır. Daha sitotoksik bir tür fizyolojik koşullar altında bir dizi zararlı türü üreten peroksinitrit ($ONOO^-$)'tir.

Süperoksit dismütaz

Hücredeki başlıca detoksifikasyon enzimidir. Reaktif oksijen türlerine karşı koyan en güçlü antioksidan moleküldür ve birinci basamak savunma sisteminin bileşeni olarak hareket eder. [3] Süperoksit dismütaz (SOD), iki süperoksit anyonunun ($O_2^{\bullet-}$) reaksiyona girmesini ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ile moleküler oksijene (O_2) ayrışmasını katalizler.

$$2O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Böylece potansiyel olarak zararlı bir molekül olan süperoksiti daha az tehlikeli hale getirir. Enzim aktivitesi için gerekli kofaktör olan metal iyonunun tipine bağlı olarak çeşitli formları vardır. SOD'a bağlı olan metal iyonları demir (Fe), çinko (Zn), bakır (Cu) ve manganezdir (Mn).

- Fe-SOD: prokaryotlarda ve bazı bitkilerin kloroplastlarında yaygın olarak bulunur.
- Mn-SOD: prokaryotlarda ve ökaryotlarda mitokondride bulunur.
- Cu/Zn-SOD: ökaryotlarda baskındır, sitozolle birlikte peroksizomlarda da bulunur.

SOD mimetikleri, doğal enzimi taklit eden sentetik bileşiklerdir. Bunlar düşük molekül ağırlıklı katalitik antioksidanlardır. Oksidatif stresden kaynaklanan hastalıkların tedavisi için önemli bir seçenek sunan bu moleküller boyutlarının küçük olması ve uzun yarı ömürleri nedeniyle ilgi görmektedir.

3 Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(24), 9265-9269.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Süperoksit redüktaz

Süperoksit redüktazlar (SOR), süperoksit radikalini hidrojen peroksite dönüştürebilen ve yapılarında kofaktör olarak hem grubu yerine demir içeren proteinlerdir. [4] SOD'un yapısında farklı metaller yer alabilirken, süperoksit redüktaz sadece demir içerir. Katalizlenen reaksiyonun ilk aşamasında yükseltgenmiş olan SOR daha sonra bir hücresel elektron vericisi ile yeniden indirgenir. Enzimin katalizlediği genel reaksiyon şöyledir:

$$O_2^{\bullet -} + 2H^+ + X_{red} \rightarrow H_2O_2 + X_{oks}$$

SOR sadece radikal miktarını azaltırken, SOD hem radikali okside eder hem de radikal miktarını azaltır. Bu nedenle, SOD'dan farklı olarak, SOR aracılığıyla H_2O_2 oluşurken O_2 üretimi gerçekleşmez. Bu durum anaeroblar için bariz bir avantaj sağlamaktadır. Ancak bu enzimlerin katalitik verimlilikleri SOD'lardan daha azdır. SOR'ların tek-Fe içeren ve iki-Fe içeren iki ana sınıfı vardır. Enzimin aktivitesi için gerekli elektron donörleri NADH veya NADPH'dir. Genomik çalışmalar, SOR'ların tüm anaerobik bakterilerde mevcut olabileceğini düşündürmektedir.

Hidrojen peroksitin etkisizleştirilmesi

Hidrojen peroksit ortamdan iki farklı enzim aktivitesi aracılığıyla uzaklaştırılır. Bunlardan peroksidazlar hidrojen peroksiti başka bir sübstratı oksitlemek için kullanırlar. Başlıca örnekler glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri ve peroksiredoksinlerdir, ancak başkaları da vardır. Katalazlar ise hidrojen peroksitin doğrudan moleküler oksijene ayrışmasını katalize ederler. [5]

$$SH_2 + H_2O_2 \rightarrow S + 2H_2O$$

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Katalaz

Katalaz, hidrojen peroksiti suya ve moleküler oksijene çevirerek oksidatif stresi önemli ölçüde azaltan bir antioksidan enzimdir. Hemen hemen tüm aerobik organizmalarda bulunur. Katalaz eksikliğinin veya bozukluğunun birçok hastalığın patogenezi ile ilişkili olduğu varsayılmaktadır. [6]

Karaciğer katalazı aktif merkezinde Fe^{+3}-hem bulunduran dört alt birimden oluşmuş bir enzimdir (Şekil 2). Her alt birim kendisine

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

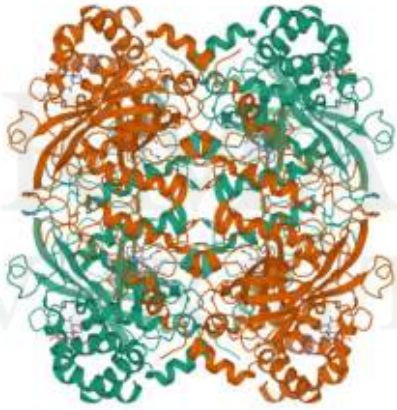
5 Gaetani, G. F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A. M., & Kirkman, H. N. (1989). Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, *73*(1), 334–339.

6 Góth, L., Rass, P., & Páy, A. (2004). Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis*, *8*(3), 141-149.

MANİSA CELÂL BAYAR ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

bağlı bir NADPH molekülüne sahiptir. Katalazda bulunan hem grubu yüzeyin en az 20 Å altına gömülüdür ve buraya sadece hidrofobik kalıntılarla kaplı bir kanal tarafından erişilebilir. Hem grubunun dar kanallarla yüzeye bağlanan ve apolar ceplere gömülmesi H_2O_2 dışındaki moleküllerin buraya erişmesini önlemektedir.

E. coli'de iki farklı katalaz enzimi vardır. [7] Bunlardan biri hidroperoksidaz II (HP-II) olarak bilinir. Bu enzim KatE geni tarafından kodlanır, bir tetramerdir ve alt birim başına bir NADPH içermeyen hem grubu vardır. Diğer enzim olan ve KatG geni tarafından kodlanan hidroperoksidaz I (HP-I) hem katalaz hem de peroksidaz aktiviteleri olan bir tetramerdir. HP-I birçok bakteride mevcuttur. Bu enzim iki fonksiyonlu bir katalaz-peroksidazdır. Hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında bulunur. Ortama H_2O_2 ilave edildiğinde HP-I seviyeleri artar. Buna karşılık H_2O_2 HP-II'yi indüklemez. *Pseudomonas aeruginosa*'da üç farklı katalaz vardır (Kat A, Kat B, Kat E), ancak katalaz-peroksidaz yoktur. Katalaz aktivitesi eritrositler haricinde, büyük ölçüde peroksizomlarda mevcuttur. Peroksizomlar katalaz dışında H_2O_2 üreten birkaç başka enzimi de içerir. Bunlar glikolat oksidaz, ürat oksidaz ve yağ asitlerinin oksidasyonunda yer alan flavoprotein dehidrogenazlardır.



Şekil 2. Katalaz enziminin yapısı [8]

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

8 RCSB Protein Data Bank. (01.11.2017). *The NADPH binding site on beef liver catalase*. https://www.rcsb.org/structure/8cat.

Katalaz tıpkı SOD gibi bir dismutasyon reaksiyonunu katalizlemektedir. Ancak burada H_2O_2'lerden biri H_2O'ya indirgenirken diğeri O_2'ye oksitlenir.

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Katalaz aktivitesi iki aşamada gerçekleşir. Birinci aşamada bir hidrojen peroksit molekülünün indirgenmesiyle ara bileşik B-1 oluşur. İkinci hidrojen peroksit molekülü, enzimi yeniden oluşturmak için bir oksijen ve su molekülü üreten bir indirgeyici ajan olarak işlev görür.

$$CAT\text{-}Fe^{+3} + H_2O_2 \rightarrow B\text{-}1 + H_2O$$

$$B\text{-}1 + H_2O_2 \rightarrow CAT - Fe^{+3} + H_2O + O_2$$

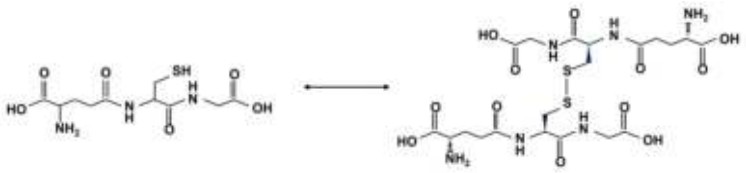
Katalaz azid, siyanür, peroksinitrit gibi bileşikler tarafından inhibe edilebilir. Ancak bu inhibitörler nonspesifiktir. İnhibitörler arasında en kullanışlı olanı katalazı *in vivo* olarak da inhibe eden aminotriazoldür.

Glutatyon ve glutatyonla ilişkili antioksidan enzimler

Glutatyon (GSH) γ-glutamil-sisteinil-glisin yapısında bir tripeptittir. [9] Pek çok prokaryotik ve ökaryotik hücrede yüksek miktarlarda (mM konsantrasyon aralığında) bulunur. İlk kez 1888'de J. de Rey-Pailhade tarafından keşfedilen glutatyon, bir vitamin gibi hareket ederek çok sayıda hücre fonksiyonunun yerine getirilmesinde rol oynar. [10] Hücreler arası iletişimin sürdürülmesi, -SH gruplarının oksitlenmesinin ve çapraz bağlanmasının önlenmesi ve askorbat metabolizmasındaki indirgeyici gücü bunlardan bazılarıdır. Glutatyonun indirgenmiş ve yükseltgenmiş şekilleri vardır. İndirgenmiş glutatyon etkili bir radyokoruyucudur. İndirgenmiş-yükseltgenmiş glutatyon çifti (GSH/GSSG) pek çok hücrenin redoks durumuna katkıda bulunur. Hücrelerdeki [GSH]/[GSSG] oranı, oksidatif stresin ve hücre redoks homeostazının önemli bir belirtecidir.

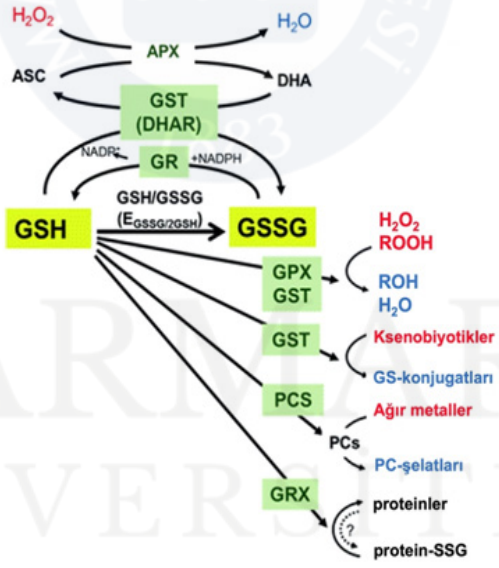
9 Gad, S. C. (2014). Glutathione. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (pp. 751). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00850-2.

10 Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(1-2), 1-12.



Şekil 3. İndirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) glutatyon molekülleri

Özellikle karaciğerde hücre içi GSH seviyeleri yüksektir. GSH indirgeme özellikleri ile bağlantılı olarak, doğrudan veya enzimatik kataliz yoluyla etki eden bir elektrofilik antioksidandır. Glutatyon, protein katlanmasında ve insülin gibi bazı kükürtlü proteinlerin yapımında da önemli rol oynar. Ayrıca Cu/Zn-SOD enzimine bakır sağlar, çeşitli enzimlerin kofaktörüdür.[11] Başlıcaları glutatyon peroksidaz, glutatyon transferaz, glikoksalaz ile lökotrien sentezinde yer alan enzimlerdir (Şekil 4).



Şekil 4. Glutatyon ile ilişkili enzimlerin katıldığı metabolik olaylar [11] [12]

11 Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. Annual Review of Biochemistry, 52(1), 711-760.

12 Csiszár, J., Horváth, E., Bela, K., & Gallé, Á. (2016). Glutathione-Related Enzyme System: Glutathione Reductase (GR), Glutathione Transferases (GSTs) and Glutathione Peroxidases (GPXs). In D. K. Gupta, J. M. Palma, & F. J. Corpas (Eds.), *Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses* (pp. 137-158). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44081-1_7.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Glutatyonun antioksidan etkileri şöyle sıralanabilir:

- Hidroksil radikallerini, diğer oksijen merkezli radikalleri ve 4-hidroksinonenal gibi lipit peroksidasyonu ürünlerinin radikal merkezlerini doğrudan baskılar.
- Hidrojen peroksitin ve diğer lipit hidroperoksitlerinin etkisizleştirilmesini sağlayan GSH peroksidaz (GPx) enziminin substratıdır. Bu sırada oluşan GSSG, NADPH gerektiren bir enzim olan GSH redüktaz tarafından tekrar GSH'ye indirgenir.
- Ksenobiyotiklerin ve elektrofilik bileşiklerin GSH ile konjugasyonu GSH transferazlar (GST) aracılığıyla gerçekleşir. Oluşan konjugatlar, γ-glutamiltransferaz enziminin sübstratıdır ve merkaptürik asit yolağıyla vücuttan dışarı atılırlar.

Mayaların ve daha yüksek bitkilerin GSSG'yi sitoplazmadan ayrı olarak vakuollerde depoladığı bildirilmiştir. [13] Normalde hücrelerde GSH/GSSG oranı yüksek tutulur. Bunu sağlayan mekanizma glutatyon redüktaz tarafından katalizlenen reaksiyon ile GSSG'nin hızla GSH'ye dönüşümüdür.

Glutatyon redüktaz

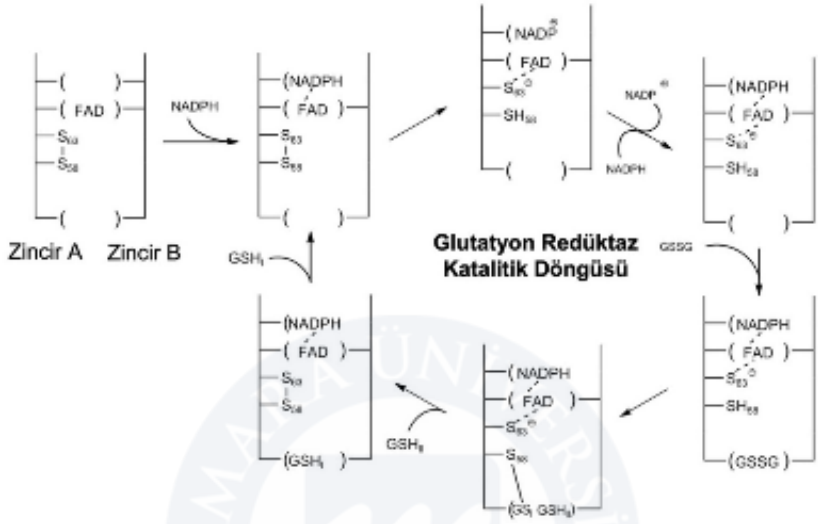
Prokaryot ve ökaryot hücrelerde bulunan NADPH'ye bağlı bir oksidoredüktazdır. Glutatyon redüktaz glutatyon disülfitin (GSSG, yükseltgenmiş glutatyon) glutatyona (GSH, indirgenmiş glutatyon) indirgenmesini katalizler. [14]

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

Glutatyon redüktaz her birinin aktif bölgesinde bir FAD bulunan iki alt birimden oluşmuştur ve homodimerik bir flavoproteindir. Reaksiyon sırasında enzim NADPH'nın elektronlarını aktif bölgedeki bir disülfit köprüsüne geçirir. Bu şekilde oluşturulan iki – SH grubu daha sonra GSSG ile etkileşime girer ve GSH'ye indirgeyerek proteindeki disülfiti yeniden düzenler.

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

14 Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, *95*, 27-42.



Şekil 5. Glutatyon redüktazın etki mekanizması

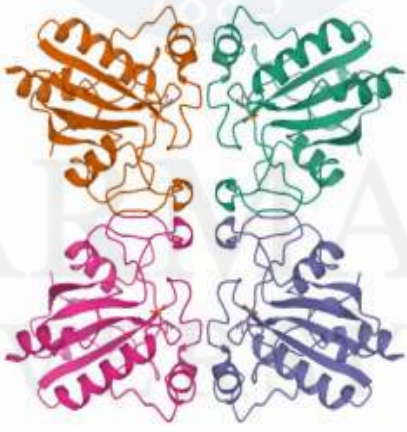
Glutatyon redüktaz enzim aktivitesi için gerekli olan NADPH birkaç mekanizma ile sağlanır. Başlıca kaynak pentoz fosfat yoludur. Bir başka NADPH kaynağı, özellikle mitokondride ve bir dereceye kadar da sitozolde bulunan ve serbest radikal kaynaklı hasarın hedefi de olabilen $NADP^+$ bağımlı izositrat dehidrojenazdır. Nikotinamid nükleotid transhidrojenaz enzimi mitokondride NADPH sağlanmasında önemlidir. Bir diğer kaynak da NAD^+ veya $NADP^+$'nin indirgenmesiyle malatın CO_2 ve piruvata dönüşümünü katalize eden malik enzimdir.

Glutatyon peroksidaz

Glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi ilk olarak 1957'de keşfedilmiştir. Hayvansal dokularda yaygın olarak mevcuttur, bitkilerde ve bakterilerde daha az görülür. Glutatyon peroksidaz bir hidrojen donörü olan GSH için spesifiktir ve merkaptosüksinat, merkaptopropiyonilglisin gibi tiyoller tarafından inhibe edilebilir. Enzim GSH oksidasyonu yolu ile H_2O_2'yi H_2O'ya indirger, H_2O_2 dışındaki peroksitlere de etki edebilir. İkinci durumda peroksit grubu bir alkole indirgenir.

$$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$$
$$ROOH + 2GSH \rightarrow GSSG + 2ROH$$

Glutatyon peroksidaz enzim ailesinde birkaç tür GPx vardır. [15] Bunlardan birincisi, genellikle GPx1 olarak adlandırılan ve ilk keşfedilen enzimdir. Esas olarak hücrelerin sitozolünde ve bir dereceye kadar nükleus, mitokondri ve peroksizomlarda bulunur. Kan plazması da düşük seviyede, bir glikoprotein olan PGPx içerir. Bu enzim GPx3 olarak adlandırılır. Esas olarak böbrekten kaynaklanır ve süt, seminal sıvı, amniyotik sıvı, gözün sulu kısmı ve akciğeri kaplayan sıvı gibi diğer hücre dışı sıvılarda da bulunur. Gastrointestinal sistemi kaplayan hücrelerde bir başka GPx türü bulunur. Bağırsak glutatyon peroksidazı GPx2 olarak adlandırılır. Gıda kaynaklı lipitlerin peroksitleri ile bağırsakta lipit peroksidasyonu ile üretilen peroksitleri metabolize etmeye yarar. İnsan karaciğerinde ise ailenin dördüncü üyesi olan GPx4 ile GPx2 bulunur. Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PHGPx) olarak da adlandırılan GPx4, sadece H_2O_2 ve sentetik organik peroksitleri değil, aynı zamanda esterleştirilen yağ asidi ve kolesterol hidroperoksitlerini de azaltarak etki yapar. GPx1 ve GPx2 kolesterol hidroperoksitlerine etki etmez, GPx3 ise bunları sadece yavaşça hidrolize edebilir. Genel olarak, dokulardaki GPx4 aktivitesi GPx1'den daha düşüktür. Testis yüksek miktarda GPx4 bulundurması ile bir istisnadır. Buradaki enzim, sperm başındaki protein tiyol gruplarının oksidasyonunu katalize eder ve spermin olgunlaşmasında önemli bir rol oynar. [16]



Şekil 6. Glutatyon peroksidaz enzimi (GPx1) [17]

15 Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family–an evolutionary overview. *FASEB Journal*, *275*(15), 3959-3970.

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

17 RCSB Protein Data Bank. (29.11.2017). *The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution*. Retrieved 23.10.2022 from https://www.rcsb.org/structure/1gp1.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

GPx1, GPx2 ve GPx3'te dört protein alt birimi yer alır (Şekil 6). Bunların her birinin aktif bölgesinde birer selenyum atomu bulunur. GPx4 ise yine selenyum içeren bir monomerdir. Selenyum, periyodik tablonun VI. grubundaki bir elementtir. Yer kabuğunda kükürtten yaklaşık bin kat daha az Se bulunur ve kimyası kükürte benzerdir. Selenyumun varlığı pKa'yı düşürerek (–SH için 8.3, –SeH için 5.2) ve iyonlaşmayı destekler. Selenosistein, GPx genlerinde bir durdurma kodonu olan TGA olarak kodlanır. Hayvanların beslenmesinde selenosistein sağlamak için Se önemlidir. Selenyumun birçok başka metabolik görevi vardır. [18] Tiyoredoksin redüktaz ve metiyonin sülfoksit redüktaz enzimlerinin bir bileşenidir. Tiroid hormonlarının biyosentezinde, tiroksini (T4) biyolojik olarak daha aktif olan 3,3,5-triiyodotironine (T3) dönüştüren iyodotironin-5-deiyodinaz enziminin aktivitesi için gereklidir. Selenyum *in vivo* olarak başka yapılarda da bulunur. İnsanların ve diğer hayvanların plazmasında karaciğer tarafından üretilen bir glikoselenoprotein olan selenoprotein P üzerinde molekül başına on selenosistein vardır. Bu protein testis ve beyin gibi dokulara Se taşıyıcısı olarak hareket eder. Ayrıca elektron vericisi olarak davrandığı ve tiyoredoksin ile GPx gibi fosfolipid hidroperoksitlerini azaltan antioksidan özelliğe sahip olduğu ileri sürülmüştür. Birçok dokuda bulunan ve bir hücre içi protein olan selenoprotein W de bazı hücre kültür sistemlerinde antioksidan özellik göstermektedir. Ancak *in vivo* olarak bu şekilde hareket edip etmediği belirsizdir. GPx aktivitesine sahip ancak selenyum içermeyen başka enzimler de keşfedilmiştir. Bunlar bitkilerde ve bakterilerde hayvanlardan daha yaygındır. Selenyum eksikliği hayvanlarda beyaz kas hastalığı, kas kaybı, kalp hastalığı ve kısırlık gibi çeşitli hastalıklara neden olur. Selenyumun insan diyetindeki önemi bir dejeneratif kalp hastalığı olan Keshan hastalığı keşfedildikten sonra tam olarak anlaşılmıştır. Semptomlar kalbin zayıflaması ve genişlemesi ile kalp ritmi bozukluklarını içermekte ve şiddetli vakalarda kalbin durmasıyla sonuçlanmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, Keshan hastalığı insidansının Se eksikliği ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Hem Keshan hastalığı hem de hayvan hastalıkları, düşük dozlarda sodyum selenit (Na_2SeO_3) ile önlenebilir. Kuzey Çin, Kuzey Kore ve Doğu Sibirya'daki çocuklarda görülen engelli bir eklem hastalığı olan Kashin-Beck hastalığında da Se eksikliği görülmüştür. Hastalığın erken evrelerinde sodyum selenit ve α-tokoferol uygulanması faydalıdır.

18 Wrobel, J. K., Power, R., & Toborek, M. (2016). Biological activity of selenium: Revisited. *IUBMB life*, *68*(2), 97-105.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Glutatyon transferazlar

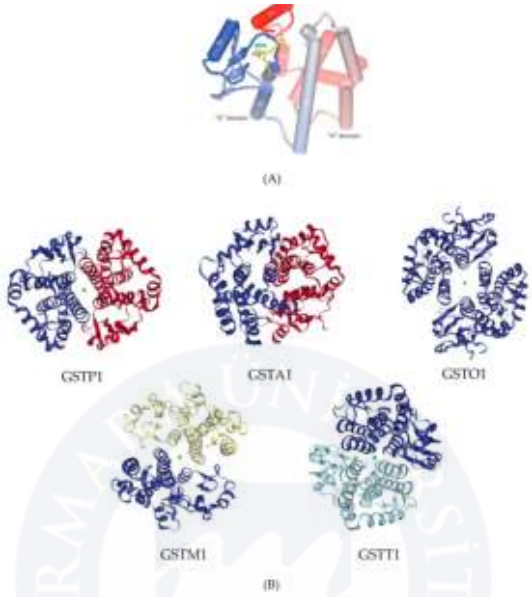
Glutatyon S-transferazlar (GST) elektrofilik bileşikler ile GSH arasındaki konjugasyonu sağlayan enzim ailesidir. [19] Hayvanlarda ve bitkilerde çok yaygın dağılım gösterirler ve genellikle hücrenin sitozol fraksiyonunda bulunurlar. Bu enzimlerin üç ana işlevi vardır: 1. Detoksifikasyondaki rolleri konjugasyon ve indirgeme özelliği ile ilişkilidir. 2. Hücre içi taşıyıcı protein olarak rolleri vardır. 3. Organa özgü toksisite oluşumuna katkı yaparlar. Aralarında antibiyotikler, vazodilatörler, analjezik ve antikanser ilaçlar ile herbisit, insektisit ve karsinojenlerin bulunduğu pek çok yabancı bileşiğin etkisizleştirilmesinde ilk aşama GSH ile konjugasyondur. [20] Bu reaksiyonlar GST kataliziyle gerçekleşir. GSH konjugatları merkaptürik asit oluşumuyla vücuttan dışarı atılır.

$$RX + GSH \rightarrow RSG + HX$$

GST enzim ailesi çok sayıda izoenzimi içerir. Farklı monomerlerin değişik kombinasyonlarından oluşan bu enzimler dimerik yapıdadır (Şekil 7). Uzun yıllar bu enzimlerin isimlendirmesi konjuge olan substratın tipine bağlı olarak yapılmıştır. Bu enzimler tarafından metabolize edilen bileşikler arasında kloroform, adriyamisin, organik nitratlar, bromobenzen, aflatoksin, naftalin ve parasetamol da yer alır. Enzim aktivitesi yaygın olarak kullanılan 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ile glutatyonun oluşturduğu ürünün spektrofotometrik olarak ölçümü ile belirlenmektedir. GST izoenzimlerinden biri GSH peroksidaz aktivitesi göstermekte ve organik hidroperoksitleri etkisizleştirmektedir. Bu enzim yapısında selenyum içermez.

19 Flanagan, J., & Jowsey, I. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *45*, 51-88.

20 Orhan, H., & Şahin, G. (1995). Glutatyon S-Transferazların Klinik ve Toksikolojik Önemi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 15*(5), 303-315.



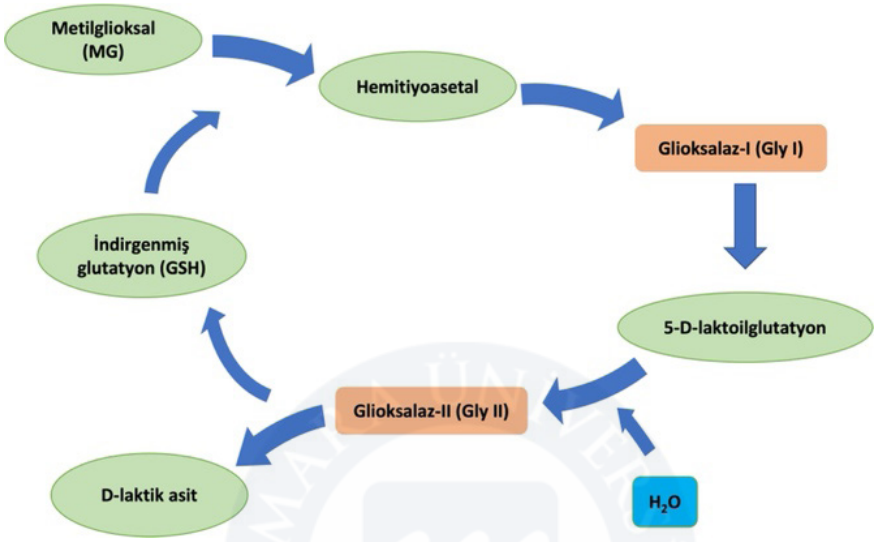
Şekil 7. Glutatyon S-transferazlar [21]

Glioksalaz

Metilglioksal (CH_3COCHO) lipit peroksidasyonu sırasında oluşan bir reaktif karbon bileşiğidir. Ayrıca, enzimatik olmayan reaksiyonlarla, glikoliz ara maddeleri gliseraldehid 3-fosfat ve dihidroksiaseton fosfattan ve sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) aracılığı ile asetondan da oluşabilir. Balda ve birçok başka gıdada da bulunur. İleri glikasyon son ürünlerinin üretilmesinde aracıdır, sistein, arginin ve lizin kalıntılarına kovalent bağlanır, DNA ve proteinlerle hızlı reaksiyona girer. Bu nedenle hızlı bir şekilde uzaklaştırılması önemlidir. [22] Metilglioksal ve glutatyonun enzimatik olmayan yolla oluşturdukları kompleks, glioksalaz 1 tarafından S-laktoilglutatyon haline oksitlenir. Daha sonra S-laktoilglutatyon, glioksalaz 2 tarafından D-laktata hidrolize edilir. Böylece GSH yeniden üretilir (Şekil 8). Glioksalaz 1 ve glioksalaz 2 enzimleri pek çok canlıda bulunur.

21 Pljesa-Ercegovac, M., Savic-Radojevic, A., Matic, M., Coric, V., Djukic, T., Radic, T., & Simic, T. (2018). Glutathione Transferases: Potential Targets to Overcome Chemoresistance in Solid Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(12), 3785. https://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/3785.

22 Sousa Silva, M., Gomes, R. A., Ferreira, A. E., Ponces Freire, A., & Cordeiro, C. (2013). The glyoxalase pathway: the first hundred years… and beyond. *Biochemical Journal*, *453*(1), 1-15.



Şekil 8. Glioksalaz yolağı

Protein disülfit izomeraz

Yeni sentezlenen proteinlerin katlanmasına yardımcı olmak için hücrede şaperon adı verilen proteinler bulunur. Bu sırada disülfit köprülerini doğru sistein kalıntıları arasında oluşturmak önemlidir ve polipeptit zincirinde en uygun konumlardaki – SH grupları birleşmelidir. Protein-disülfit izomeraz (PDI), aktif bölgesindeki disülfitlerle ve redoks değişimi yolu ile yeni disülfit köprülerinin oluşumunu ve aynı zamanda yanlış olanların yeniden düzenlenmesini katalizleyen, H_2O_2 üreten ve protein-SH oksidasyonuna katkıda bulunabilen bir flavoenzimdir. [23] Enzim daha sonra endoplazmik retikulum oksidoredüktaz (ERO) veya GSSG redüktaz enzimleri tarafından yeniden oksitlenir.

Peroksiredoksinler

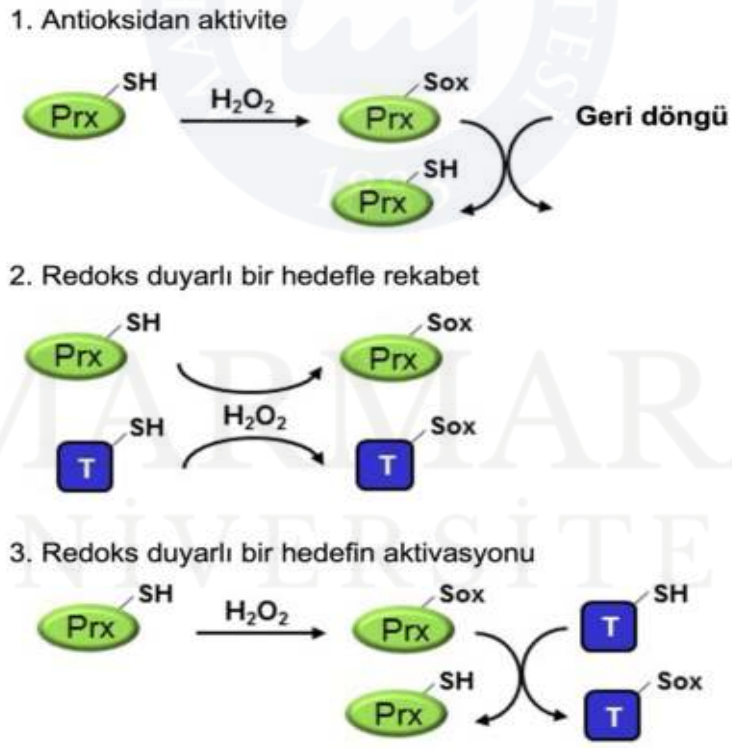
Peroksiredoksinler (Prx) sinyal iletimine aracılık eden ve sitokin kaynaklı peroksit seviyelerini kontrol eden bir antioksidan enzim ailesidir. [24] Peroksiredoksinler hücrede yüksek miktarda bulunurlar. *E. coli*'de en çok bulunan on protein arasında yer alırlar, eritrositlerde ikinci veya üçüncüdürler. Diğer memeli hücrelerinde çözünür proteinin %0.1-0.8'ini oluştururlar. Bu enzimler hem fosforilasyonla

23 Ali Khan, H., & Mutus, B. (2014). Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. *Frontiers in Chemistry*, *2*, 70.

24 Wood, Z. A., Schröder, E., Harris, J. R., & Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, *28*(1), 32-40.

hem de redoks ve oligomerizasyon durumlarındaki değişikliklerle düzenlenir. Peroksiredoksinler homodimer yapıdadır, prostetik grup içermezler. Aktif bölgelerindeki sistein kalıntılarına göre en az üç sınıf peroksiredoksin vardır. Bunlar tipik 2-cys (en yaygın), atipik 2-cys ve 1-cys peroksiredoksindir. Peroksidaz aktivitesi yoluyla hücrelerdeki koruyucu antioksidan rollerini oynar ve hidrojen peroksiti, peroksinitriti ve organik hidroperoksitleri (ROOH) detoksifiye ederler.

Son zamanlarda, Prx ailesi üyelerine bir dizi hücresel rol de atfedilmiştir. Bunlar arasında hücre proliferasyonuna, hücre farklılaşmasına ve apoptoza yol açan sinyalleşme basamaklarına aracılık etmek ve sitokin kaynaklı hidrojen peroksit seviyelerinin modülasyonu yer almaktadır. Peroksidaz aktiviteleri glutatyon peroksidazın ve katalazınkine benzemektedir.



Şekil 9. Peroksiredoksinlerin etki mekanizması [25]

25 Christine, C. W., & and Alexander, V. P. (2016). Kinetic approaches to measuring peroxiredoxin reactivity. *Molecules and Cells*, *39*(1), 26-30. https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2325.

NADH oksidazlar

Hem bitki hem de hayvan hücrelerinin plazma membranına özgü, siyanüre dayanıklı ve hormona duyarlı enzimler olan NADH oksidazlar çeşitli rollere sahiptir. *Enterococcus faecium* gibi birçok bakteri NADH'yi oksitleyen ve oksijen molekülünü bazen H_2O'ya bazen H_2O_2'ye indirgeyen flavoprotein yapıdaki bu enzimleri içerir. Plazma zarının hormona duyarlı NADH oksidazı ise bir peroksidaz değildir. Elektronların NADH'den plazma membranındaki oksijene transferini sağlamak için bir terminal oksidaz işlevi görmektedir. [26]

Hem ve hemoproteinler

Tüm aerob organizmalarda demir ve bakır iyonları çok önemli rollere sahiptir. Solunumda, O_2 taşınmasında, NO oluşumunda ve antioksidan savunmada yer alan çeşitli proteinlerin kofaktörü olarak görev yaparlar. Ancak aynı zamanda potansiyel tehlikeye sahiptirler ve prooksidanlardır. Serbest metal iyonlarının yanısıra hem ve bazı hemoproteinler de oksidatif hasarı teşvik edebilir. Yetişkin bir erkek vücudu, çoğu hemoglobinde olmak üzere yaklaşık 4.5 g demir içerir. Karaciğer (çoğu ferritin içinde yaklaşık 1 g), iskelet kası (çoğu miyoglobin içinde 300 mg) ve makrofajlar (toplam 600 mg) önemli demir depolarıdır. Diyetten günde 1 ila 2 mg demir absorplanırken aynı miktar da kaybedilir. Kadınlarda menstrüasyon nedeniyle kan kaybı olduğundan daha az demir vardır. Plazma demir döngüsü yaklaşık 35 mg/gün olup, vücutta demir içeriğini düzenlemek için etkili mekanizmalar mevcuttur. En hafif demir metabolizması bozuklukları bile, her ikisi de zararlı olan eksikliğe veya aşırı yüklenmeye yol açar. Dünyada 500 milyondan fazla kişide demir eksikliği vardır. Birkaç milyon kişide de aşırı demir yükü olduğu tahmin edilmektedir. Demir vücuttan ter, dışkı, idrar ve özellikle kadınlarda adet kanaması nedeniyle kan yoluyla ve az miktarda da akciğerler tarafından mukus bileşiminde atılır. Gıdalardaki demir en kararlı oksidasyon durumu olan Fe^{+3} durumundadır. Mide özsuyunda bulunan askorbat ve hidroklorik asit gibi Fe^{+}'ü indirgeyen ajanlar, demir emilimini kolaylaştırır. Demir alımını birçok diyet bileşeni etkiler. Örneğin, tahıllarda, kabuklu yemişlerde ve baklagillerde bulunan inozitolheksafosfat demiri şelatlar ve emilimini yavaşlatır. Hemdeki demir ise farklı bir yoldan emilir. [27] Bağırsakta hemoproteinlerin proteoliziyle salınan hem geri alınırken,

26 Moore, K. J., Sheedy, F. J., & Fisher, E. A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature Reviews Immunology*, *13*(10), 709-721. https://doi.org/10.1038/nri3520.

27 Larsen, R., Gouveia, Z., Soares, M. P., & Gozzelino, R. (2012). Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. *Frontiers in Pharmacology*, *3*, 77.

mukoza hücrelerinde hem oksijenazın etkisiyle hemin içerdiği demir çıkarılır. Diyetle alınan hem demirinin önemli bir miktarı, hem yapısında olmayan demirden daha çok absorplanır ve demir bağlayıcı ajanlardan etkilenmez. Demir daha sonra bağırsak mukozasından kana salınır, ancak bir miktarı da mukozal hücreler içinde ferritin olarak depolanır. Demirin serozal salımı, demir ayarlı taşıyıcı-1 geni tarafından kodlanan protein ferroportini içerir.

Bağırsaktan plazmaya demir çıkışı, bakır içeren bir protein olan hephaestin tarafından kolaylaştırılır. Bakır eksikliğinin demir alımını bozduğu bilinmektedir. [28] Bakır iyonları, bazen demir iyonlarından da daha etkili olan güçlü bir oksidatif hasar katalizörüdür. Bakır iyonları askorbatın oksidasyonuna, oksidatif DNA hasarına ve LDL'nin peroksidasyonuna neden olur. Bu nedenle organizma bakır iyonlarını dikkatli bir şekilde ele almalı, çoğunu veya tamamını proteine sıkıca bağlı halde tutmalıdır. Bakır içeren proteinler arasında SOD1, EC-SOD ve sitokrom oksidaz bulunur. Sadece aşırı bakır miktarı değil, aynı zamanda bakır yokluğu da oksidatif stresi arttırabilir. Bakır yokluğu SOD ve sitokrom oksidaz aktivitelerini azaltarak mitokondriyal $O_2^{\bullet}$ – üretimine neden olur. Yetişkin bir insan yaklaşık 80 mg bakır içerir. Hem diyetteki bakırdan, hem de geri dönüştürülmüş yani karaciğer tarafından safraya salınan bakırdan günde yaklaşık 1 mg kadarı emilir. Bakır emilimi esas olarak duodenumdandır. Bağırsak mukozal hücrelerine giren tüm bakır kana girmez, bir miktarı depolanır veya kaybedilir. Geri kalanı ise a2-makroglobulin ve albümine bağlı halde kana girer. Albüminde bakır için yüksek afiniteli bir bağlanma yeri ile bir dizi daha zayıf bağlanma yeri vardır.

Hemoglobin ve miyoglobin sırasıyla eritrositlerde ve kas dokusunda bulunan proteinlerdir. Her ikisi de $O_2^{\bullet}$ – ve Fe^{+3} proteini oluşturmak için yavaşça oksidasyona uğrar. Hem merkezine kolayca nüfuz eden H_2O_2 ile karşılaştıklarında hasar ortaya çıkabilir. Hemoglobin veya miyoglobin aşırı miktarda peroksitlere maruz kaldığında, Fe^{2+} iyonları oksitlenir ve protein parçalanır. Hem ve demir iyonları serbest kalınca hem halkası açılır. Açığa çıkan hem ve demir lipit peroksidasyonunu uyarabilir. Ayrıca demir iyonları varlığında $OH^{\bullet}$ oluşabilir. [29]

Hem oksijenaz (HO) hemen hemen tüm türlerde bulunan bir enzimdir. [30] Hemin biliverdine parçalanmasını katalize ederek demir

28 Arredondo, M., & Nunez, M. (2005). Iron and copper metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, *26*, 313-327.

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

30 Chau, L.-Y. (2015). Heme oxygenase-1: emerging target of cancer therapy. *Journal of Biomedical Science*, *22*(1), 1-7.

iyonlarını ve karbon monoksiti serbest bırakır. Biliverdin, sitozoldeki biliverdin redüktaz enzimi tarafından bilirubine dönüştürülür. Hem oksijenazın üç izoformu karakterize edilmiştir. Bunlardan birincisi çeşitli dokularda, çoğunlukla da ER'de bulunan temel izoformdur (HO-2). Karotiste O_2 algılamasına katılır, hemi parçalar ve K^+ kanallarını açık tutacak olan CO'i oluşturur. Hipokside ise CO oluşumu yavaşlar, K^+ kanalları kapanır ve solunum hızını artıran bir alarm sinyali tetiklenir.

Hem oksijenazın bir diğer izoformu olan HO-1 bir ısı şoku proteini olan Hsp32 ile aynı proteindir. Bu protein stres ile indüklenebilir. Çeşitli hücre tiplerinde serbest hem, bazı metal iyonları, hipoksi, H_2O_2, ısı şoku ve seçilmiş sitokinler gibi uyaranlarla miktarı artar. HO-1 yaşlanmış olan eritrositlerin işlenmesi ve hemin parçalanması için gereklidir. Karaciğerin Kupffer hücrelerinde, kemik iliğinde ve dalakta yüksek seviyelerde bulunur. Hem oksijenaz enzimleri bir taraftan potansiyel bir antioksidan olan bilirubini ve prooksidan olan demir iyonlarını üretirken, prooksidan olan hemi de uzaklaştırır. Bu çelişkili rolleri nedeniyle antioksidan olarak sınıflandırılmaları tartışmalıdır. [31]

Küçük molekül yapısındaki antioksidanlar

Bazı küçük moleküllerin antioksidan olarak önemli olduğu düşünülmektedir. Bunların bir kısmı, örneğin GSH, vücutta *in vivo* olarak yapılırken diğerleri diyetten elde edilir.

Bilirubin

Bilirubin hemoglobin yıkım ürünlerinden biridir. Yıkım ürünlerinden biliverdin mavi yeşil, bilirubin ise parlak sarı renktedir. Doku yaralanması sürecinde, kırmızımsı kahverengi çürük rengi ekstravasküler hemoglobinden kaynaklanır. Doku iyileştikçe de bu renk yeşilimsi sarıya değişir. Memelilerde üretilen bilirubinin %80'i yaşlı eritrositlerden kaynaklanır. Dalak, karaciğer ve kemik iliğindeki retiküloendotelyal sistem hücrelerinde, eritrositlerin yıkımı sırasında hemoglobin hem oksijenaz (HO) aracılığıyla katabolize olmaktadır. Bilirubin miyoglobin, katalaz ve sitokromlar gibi diğer hemoproteinlerin parçalanmasıyla da oluşabilir. Yetişkinlerde günlük olarak 270 mg civarında bilirubin üretilir. Fizyolojik pH'da suda çözünmeyen bilirubin, dolaşımda albümine sıkıca bağlıdır. Bu bağlanma bilirubini karaciğere yönlendirir. Böylece ekstrahepatik dokuların, özellikle beyin gibi lipit bakımından zengin olanların bilirubin alımı önlenir. Albümin-bilirubin kompleksi ayrıştıktan

31 Ayer, A., Zarjou, A., Agarwal, A., & Stocker, R. (2016). Heme oxygenases in cardiovascular health and disease. *Physiological Reviews*, *96*(4), 1449-1508.

sonra, bilirubin bir taşıyıcı protein aracılığıyla hepatosite girer ve sitozolik proteinlerden ligandine (GST) bağlanır. Daha sonra bilirubin glukuronik asit ile konjügasyona uğrar. Böylece suda çözünür olan ve safrayla atılan monoglukuronidler ve diglukuronidler oluşur. Konjugasyonun yetersiz ve bozulmuş olduğu prematüre bebeklerde yenidoğan sarılığı görülür. Bilirubinin önemli bir antioksidan olduğuna dair ilk bilgiler, hücre kültüründe koruyucu etkilerini gösteren deneylere dayanmaktadır. Daha sonraları hayvanlarda yapılan pek çok çalışmada serum bilirubin düzeylerinin koroner kalp ve solunum yolu hastalıkları yanısıra aterosklerotik vasküler hastalık ve inme riskiyle de ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte kandaki yüksek bilirubin seviyelerinin beyin ve diğer dokular için toksik olduğu da bilinmektedir. [32]

Alfa-keto asitler

Başta piruvat, glioksalat ve α-ketoglutarat olmak üzere birçok keto asit, H_2O_2 ile nonenzimatik olarak reaksiyona girer. Bu moleküller *in vitro* olarak mM seviyelerde hücre kültürü ortamına eklendiklerinde ortamdaki H_2O_2, HOCl ve ONOOH temizlenmektedir. Alfa-keto asitlerin *in vivo* olarak da antioksidan işlev gördüğü düşünülmektedir. [33]

Melatonin

Epifiz bezinin çok yönlü işlevi olan bir salgısıdır. Yapılan pek çok çalışmada, melatoninin serbest radikal temizleyici bir antioksidan ve önemli bir immünomodülatör olduğu gösterilmiştir. Melatoninin radikal temizleme yeteneğinin elektron aktarımı yoluyla olduğu düşünülmektedir. Melatonin SOD, GPx, GSH redüktaz ve katalaz gibi bir dizi antioksidan enzimi uyarır. Glutatyon sentezindeki hız kısıtlayıcı enzim olan γ-glutamilsistein sentaz üzerinden de hücre içi GSH seviyelerini arttırır. Melatonin ayrıca nitrik oksit sentaz, ksantin oksidaz ve lipooksijenaz gibi prooksidan enzimleri inhibe etmektedir. Hücre zarını stabilize ettiğine ve zar yapısındaki bileşenlerin oksidatif hasara karşı direnmesine yardımcı olduğuna dair kanıtlar vardır. [34]

---

32 Sedlak, T. W., Saleh, M., Higginson, D. S., Paul, B. D., Juluri, K. R., & Snyder, S. H. (2009). Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(13), 5171-5176. https://doi.org/doi:10.1073/pnas.081.313.2106.

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

34 Kurutas, E. B. (2015). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal*, *15*(1), 1-22.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Alfa-lipoik asit

Alfa-lipoik asit (ALA) metal şelatlama ve anti-glikasyon yeteneklerine sahip kükürt içeren bir doğal bileşiktir. Sadece suda veya yağda çözünen birçok antioksidanın aksine hem lipit fazında hem de sulu fazda aktif olan bir moleküldür. Doğrudan serbest radikalleri etkisizleştirir, demir ve bakır gibi geçiş metal iyonlarını şelatlar, sitozolde GSH ve C vitamini seviyelerini arttırır. ALA kolayca sindirilir ve emilir. Pek çok dokuda NADH veya NADPH tarafından hızla dihidrolipoik aside (DHLA) dönüştürülür. ALA ile karşılaştırıldığında, DHLA'nın daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. DHLA serbest radikalleri nötralize ederken, GSH ve E vitamininden daha güçlü bir antioksidan olan C vitamininin rejenerasyonunu da sağlamaktadır. [35] Ekzojen ALA tedavisinin nörodejeneratif bozukluklarda terapötik potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir.

Koenzim Q

Bir serbest radikal olan ubisemikinon aracılığıyla mitokondriyal elektron taşınmasında gerekli bir moleküldür. Hücre zarlarında ve lipoprotein yapısında bulunur. Antioksidan olarak etkinliği, hem başlangıç hem de ilerleme aşamasında lipit peroksidasyonuna engel olmasından kaynaklanır. Protein oksidasyonuna ve DNA oksidasyonuna karşı koruyucu etkisi de bilinmektedir. Lipitlerdeki çözünürlüğü ve membranlardaki dağılımı açısından varlığı büyük önem taşımaktadır. [36]

Diyet kaynaklı antioksidanlar

Askorbik asit (C vitamini)

Suda çözünür yapıda, beyaz kristalli bir katı maddedir. Birincil antioksidan etkisini E vitamini ve karotenoidlerle birlikte yürütmektedir. [37] Bu bileşikler, hem antioksidan enzimlerle beraber hem de tek başlarına etkilidir. C vitamini membran yapısında bulunan E vitamini ile iş birliği yapar, α-tokoferol radikallerinden α-tokoferolü rejenere ederek hücrenin indirgenmiş glutatyon

35 Packer, L., Witt, E. H., & Tritschler, H. J. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*, *19*(2), 227-250.

36 Bentinger, M., Brismar, K., & Dallner, G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, *7 Supplement*, S41-50. https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.02.006.

37 Bendich, A., Machlin, L., Scandurra, O., Burton, G., & Wayner, D. (1986). The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*, *2*(2), 419-444.

seviyelerini yükseltir. Bu etkisiyle proteinlerdeki tiyol gruplarının oksidasyona karşı korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Elektron bağışlama ve kolayca rejenere olma kabiliyeti nedeniyle, *in vivo* olarak çok etkili bir antioksidandır. Ayrıca indirgeyici madde özelliği ile hidroksil, peroksil ve süperoksit radikallerinin yanı sıra peroksinitrit, nitroksit radikalleri, tekli oksijen ve hipoklorit gibi reaktif türleri de etkili bir şekilde nötralize eder. Bütün bu etkileriyle fagositler, göz, beyin, mide ve sperm gibi yüksek miktarda serbest radikal stresine maruz kalan dokulara doğrudan antioksidan koruma sağlar. [38] Çoğu hayvanın aksine insanlarda C vitamini endojen olarak sentezlenemez. C vitamini biyosentezinde önemli bir enzim olan gulonolakton oksidaz enzimini kodlayan gendeki bir dizi inaktive edici mutasyon sonrasında, insanlar bu molekülü sentez yeteneğini kaybetmiştir. Bu mutasyonların yaklaşık 40 milyon yıl önce meydana geldiği tahmin edilmektedir. Aşırı C vitamini eksikliği damarlarda kırılganlık, bağ dokusunun hasarı, yorgunluk ve ölümle sonuçlanan ağır bir tabloya neden olur. Polar bir bileşik olduğundan, C vitamini basit difüzyonla hücre zarından geçemez. Hücre içine ve dışına geçişi glukoz taşıyıcıları (GLUT) ile sodyum ve C vitamini taşıyıcıları gibi farklı membran proteinlerinin aracılık ettiği, kolaylaştırılmış difüzyon ve aktif taşıma gibi spesifik mekanizmalar tarafından kontrol edilir. [39] C vitamininin toplam vücut içeriği 300-2000 mg arasında değişmektedir. Hücrelerde ve dokularda C vitamini seviyeleri milimolar konsantrasyondadır. Lökositlerde, gözlerde, adrenal bez, hipofiz bezi ve beyinde oldukça yüksek düzeylerde iken, eritrositlerde, plazmada ve diğer hücre dışı sıvılarda nispeten düşük düzeylerde, çoğu kez mikromolar konsantrasyondadır.

Alfa-tokoferol (E Vitamini)

Yağda çözünen bir vitamin olan E vitamininin iki şekli (tokoferoller ve tokotrienoller) ve bunların herbirinin α, β, γ ve δ olmak üzere dört analogu vardır. [40] Hayvanlarda en etkili şekil, önceleri d-α-tokoferol olarak adlandırılan RRR-α-tokoferoldür. Tokoferoller (α, β, γ ve δ) bir kromanol halkasına ve bir fitol kuyruğuna sahiptir. Halka üzerindeki metil gruplarının sayısı ve pozisyonu farklılık gösterir. Bitkisel yağlar genellikle bir tokoferol karışımı içerir. Soya, mısır, ceviz ve kolza tohumu yağlarında α-tokoferolden daha fazla γ-tokoferol vardır.

38 Jacob, R. A., & Sotoudeh, G. (2002). Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutrition in Clinical Care*, *5*(2), 66-74.

39 Li, Y., & Schellhorn, H. E. (2007). New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *Journal of Nutrition*, *137*(10), 2171-2184.

40 Jain, P., Singh, I., Surana, S. J., & Shirkhedkar, A. A. (2022). Chapter 6 – Tocopherols and tocotrienols: the essential vitamin E. In C. B. B. Cazarin, J. L. Bicas, G. M. Pastore, & M. R. Marostica Junior (Eds.), *Bioactive Food Components Activity in Mechanistic Approach* (pp. 139-154). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823569-0.00009-6.

Badem ve ayçiçek yağı çoğunlukla α-tokoferol içerir. Palmiye yağı ise tokotrienoller açısından zengindir.

Tokoferoller, peroksil radikalleri ile çoklu doymamış yağ asitlerinden daha hızlı reaksiyona girer, lipit peroksidasyonunun zincirleme işleyişini kırarlar. Tokoferollerin en etkili olanı α-tokoferoldür. Nispeten kararlı bir tokoferoksil radikali oluşturmak için hızlı bir şekilde peroksil radikali ile reaksiyona girer. Yapısındaki fazladan elektron ile ilişkili yük, kromanol halkası boyunca dağıtılır. Bu rezonans etkisiyle de radikal stabilize olur, daha sonra farklı şekillerde reaksiyona girer. Sulu fazda askorbat, indirgenmiş GSH veya ürat gibi başka bir zincir kırıcı antioksidan aracılığı ile α-tokoferol yeniden oluşturulabilir. Başka bir seçenek, iki α-tokoferoksil radikalinin kararlı bir dimer oluşturmak için birleşmesi veya radikal tokoferol kinon oluşturmak için tamamen oksitlenmesidir.

E vitamini antioksidan rolüne ek olarak, membranları stabilize eden yapısal bir role sahiptir. [41] İnsanlarda E vitamini eksikliği nadirdir. Ancak eksikliği hemolize neden olabileceği gibi, abetalipoproteinemide ortaya çıkan periferik nöropatiye de katkıda bulunabilir. Hücre zarında ve lipoprotein yapısında E vitamininin temel antioksidan fonksiyonu, peroksil radikallerini hapsetmek ve lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu kırmaktır. E vitamini lipitlerce zengin bir ortamda karbon merkezli radikallerin ilk oluşumunu engellemez. Ancak ikincil radikallerin oluşumunu en aza indirir. Diyetteki E vitamini kaynakları arasında buğday tohumu, bitkisel yağlar ve bunları içeren gıdalar ile yağlı tohumlardan özellikle badem ve fındık, çeşitli tahıllar ve yeşil yapraklı sebzeler bulunur.

Karotenoidler

Karatenoidler ilk kez 1831'de havuçtan izole edilen ve bitkilerde yaygın olan bir grup renkli pigmenttir. [42] Genellikle renkleri sarı, kırmızı veya turuncudur. Akvaryum balıklarında, somonda, ıstakozlarda, kuşların tüylerinde, bazı bakterilerde ve mantarlarda da karotenoidler bulunur. Kuşlar cinsel süsleme amacıyla kendilerini renklendirmek için sıklıkla karotenoidleri kullanırlar. Yüzlerce farklı karotenoid tanımlanmıştır.

İnsanda karotenoidler daha çok yağ dokusunda ve karaciğerde bulunur. [43] En yüksek konsantrasyon yumurtalık korpus luteumunda

41 Galli, F., Azzi, A., Birringer, M., Cook-Mills, J. M., Eggersdorfer, M., Frank, J., Cruciani, G., Lorkowski, S., & Özer, N. K. (2017). Vitamin E: Emerging aspects and new directions. *Free Radical Biology and Medicine*, *102*, 16-36.

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

43 Johnson, E. J. (2002). The role of carotenoids in human health. *Nutrition in Clinical Care*, *5*(2), 56-65.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

ve adrenal bezdedir. Doku ve plazma karotenoid seviyeleri diyete göre değişkenlik gösterir. Plazma seviyeleri genellikle mikromolar aralıktadır (likopen: 0.5–1.0 μM; β-karoten: 0.2-0.6 μM; α-karoten: 0.05-0.1 μM; lutein: 0.3 μM). Gastrointestinal kanaldan emilen diyet kaynaklı karotenoidlerin miktarları hangi gıdaların yenildiğine ve gıdanın nasıl işlendiğine bağlıdır.

Karotenoid emilimi için bir miktar diyet yağı gereklidir. Çiğ domates likopen açısından zengindir, ancak çok az emilir. Buna karşılık pişmiş domateslerden veya domates salçasından daha fazla likopen alınır. Emilimde kişiden kişiye önemli ölçüde farklılık vardır. Karotenoidlerin insanlardaki en önemli rolü retinol adı verilen yağda çözünen A vitamininin öncüsü olmasıdır. A vitamini, hücre büyümesi ve farklılaşması için gereklidir. A vitamini eksikliği dünyadaki körlüğün önemli bir nedenidir. Bitkilerden zengin bir diyetle beslenen insanlarda, başlıca A vitamini kaynağı karotenoidlerdir. Diyetteki β-karotenin %35-88 kadarı on iki parmak bağırsağında emilir. Duodenum mukozal hücrelerinde bir β-karoten molekülü monooksijenaz enzimi etkisi ile iki retinal molekülüne ayrılır. Retinal daha sonra retinole indirgenir. Bu enzim ayrıca retinol üretmek için birkaç karotenoid üzerinde de etkilidir. Vücut retinol ile doyduğunda enzimin seviyeleri düşer. Böylece yüksek dozda β-karoten alınması halinde bile A vitamini birikmesi önlenir. Karotenoidler dolaşıma şilomikronların yapısında girer. Hem lipoprotein lipaz içeren şilomikronlardan hem de diğer lipoproteinlerden dokulara dağılır. Karaciğer başta olmak üzere bazı dokular β-karoteni retinole dönüştürebilir. Bitkilerde, karotenoidler önemli bir antioksidandır. Hem singlet O_2'i söndürmeye hem de fotosentez sırasında oluşumunu azaltmaya yardımcı olur. Porfiria hastalarında β-karoten uygulaması ışığa bağlı cilt hasarına karşı koruyucu etki yapar. Güneş ışığı derideki likopeni tüketir. Bu karotenoidin UV hasarına karşı koruyucu rolü ile ilişkilidir. Tüm karotenoidler arasında en iyi singlet O_2 söndürücü olan likopendir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda, β-karotenin düşük O_2 seviyelerinde lipit peroksidasyonunu inhibe ederken, yüksek konsantrasyonda bu etkiyi göstermediği bulunmuştur. Ayrıca, β-karotenin LDL'yi peroksidasyona karşı korumadığı da bildirilmiştir.

Flavonoidler ve diğer fenolik bileşikler

Flavonoidler insan diyetinin ayrılmaz bir parçasıdır. [44] Bitkilerde yaprak, çiçek ve meyvelerde mavi, kırmızı ve turuncu renginin parlak tonlarına katkı yaparlar. Çeşitli sebze ve meyvelerin yanı

44 Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, *5,* e47.

sıra tohumlarda, kabuklu yemişlerde, tahıllarda, baharatlarda ve farklı tıbbi bitkilerde yer alır, ayrıca kırmızı şarap, çay ve bira gibi içeceklerde bulunurlar. Fenilalanin ve tirozin ile malonattan sentezlenen flavonoidlerdeki fenolik piran halkalarından oluşmuş benzo-γ-piron türevlerine, metabolizmaları sırasında hidroksil grupları ilave edilir, metillenir, sülfatlanır veya glukuronidatlanır. Temel flavonoid yapısı, A, B ve C olarak etiketlenmiş üç halkadaki (C6-C3-C6) 15 karbon atomundan oluşan flavan çekirdeğidir. Flavonoidler C halkasının oksidasyon ve yerleşim şekli bakımından farklılık gösterir, birçok sınıfları vardır. Başlıcaları flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, flavonoller, flavanonoller, flavan-3-oller ve antosiyanidinlerdir. Diğer flavonoid sınıfları biflavonlar, kalkonlar, auronlar ve kumarinlerdir. Hidrolize edilebilir tanenler, proantosiyanidinler, flavan-3-ol oligomerleri, kaffeat ve lignanlar ise bitki fenolleridir. Bunlar genellikle ayrı olarak sınıflandırılırlar. Fenol, bir benzen halkasına bağlı bir – OH grubu içeren bir bileşiktir. Monofenoller bir – OH grubuna, difenoller iki ve polifenoller ikiden fazla – OH grubuna sahiptir. Bitkiler, tokoferoller ve tokotrienoller (monofenoller) de dahil çok çeşitli fenolleri içerir. Hemen hemen tüm fenoller, antioksidan aktivite sergiler ve genellikle zincir reaksiyonunu durduran peroksil radikal temizleyicileri gibi davranarak lipit peroksidasyonunu inhibe ederler. Ek olarak, fenoller $OH^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet}$, N_2O_3, ONOOH ve HOCl gibi diğer RT'leri temizler. Bazı fenoller, çoğunlukla di – ve polifenoller, $O_2^{\bullet -}$ ile reaksiyona girebilir. İnsan diyeti fenol bakımından zengindir. Örneğin soya fasulyesi tokoferolleri, genistein ve daidzein gibi izoflavonları ve kafeik asidi içerir. Taksifolin fıstıklarda görülür. Resveratrol çeşitli bitkilerde ve şarapta düşük seviyelerde bulunur, üzümlerde mantarlar için toksik bir savunma ajanı olarak üretilir. Kurkumin, *Curcuma longa* bitkisinin köklerinden elde edilen köri baharatına sarı rengini verir. Susam tohumu yağı sesamol içerir. Başka birkaç bitkide kafeik asit esterleri bulunur. *Camellia sinensis* bitkisinin yapraklarından hazırlanan bir içecek olan çay, pek çok insanın diyetinde önemli bir fenol kaynağıdır. Yeşil çay *in vitro* antioksidan aktivitesinin çoğuna katkıda bulunan kateşinler açısından zengindir. Siyah çayda kateşinler daha az yer alır. Buna karşılık, siyah çay kateşinlere ek olarak teaflavinler ve tearubiginler adı verilen karmaşık polimerleri içerir. Bunlar, yaprakların çay üretimi için hazırlanması sırasında kateşinlerin oksidasyonu ile oluşur. Kateşin, epikateşin ve epigallokateşin gallat kırmızı şarabın antioksidan aktivitesine önemli katkıda bulunur. [45]

45 Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, *63*(7), 1035-1042.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Flavonoidlerin ve diğer polifenollerin anti-inflamatuvar, antikanser, anti-iskemik ve anti-trombotik ajanlar olarak terapötik kullanımına yönelik önemli derecede ilgi vardır. Baldırıkara otu ağacı, *Ginkgo biloba* ekstraktı, binlerce yıldır 'hafızayı geliştirmek' için kullanılmıştır. Kampo ilaçları Japonya'da gelenekseldir. Meyan bitkisinin (*Glycyrrhiza glabra*) köklerinden elde edilen glisirizin dahil, birden fazla bileşiğin özütünü ve karmaşık bir fenol karışımı ile diğer bileşikleri içerirler. Arı kovanının yapımında kullanılan ve reçineli bir madde olan propolis özleri bitkisel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Propolis kafeik asit fenetil ester (CAPE) gibi birçok fenolik bileşiği içerir. Çin tıbbında yaygın olarak kullanılan *Polygonum capsidatum* resveratrol bakımından zengindir. Ancak, bu tür ürünlerin sadece doğal oldukları için tüketimlerinin güvenli olduğu varsayılmamalıdır. Bitkiler tarafından üretilen zararlı ajanlar arasında siyanür ve aflatoksin gibi zehirler de bulunur. *Larrea divaricata*'dan izole edilen ve güçlü bir lipooksijenaz inhibitörü olan nordihidroguairetik asit, olumsuz toksikolojik raporlar nedeniyle artık gıda koruyucu olarak kullanılmamaktadır. Güçlü antioksidan aktivitesine dayanılarak izole edilen *Cratoxylum cochinchinense* ekstresinin sitotoksik olduğu ortaya çıkmıştır. Öte yandan, kurkumin uygulamasının transgenik fare modelinde Alzheimer hastalığına bağlı oksidatif hasarı ve beyin patolojisini azalttığı bildirilmiştir. Flavonoidlerin ve flavonoid açısından zengin gıdaların nöroprotektif etkilerini gösteren çok sayıda yayın vardır. Bununla birlikte, kan beyin bariyerini geçerek, insan beynine girebilecek flavonoid miktarları çok düşük olacağı için bu etkilerin yalnızca antioksidan aktiviteden kaynaklandığı düşünülmemelidir. Bu bileşikler daha çok kolonun bakteriyel kompozisyonunu etkileyerek veya vasküler fonksiyonu ve dolayısıyla beyine kan akışını iyileştirerek etki edebilirler.

Sağlıklı kişiler söz konusu olduğunda antioksidanların yüksek doz takviyelerini tüketmenin çok az veya hiç faydası yoktur. Yüksek miktarda β-karoten alımı diğer karotenoidlerin vücut düzeylerini etkileyebilir ve düşürebilir. Aynı şekilde tokoferollerin yüksek dozları alfa-tokoferol düzeyini etkileyebilir. Buna karşılık, meyve ve sebzelerin düzenli tüketimi ve periyodik olarak deniz mahsülleri ile balık yemek, çok fazla kırmızı etten kaçınmak, obeziteden kaçınmak ve orta derecede egzersiz yapmak oksidatif hasarı aza indirmenin etkili yolları olabilir. Ayrıca sigara ve diğer tütün mamullerinden uzak durulması da önemlidir. Ancak tütün bağımlısı olan kişiler için, diyet tavsiyelerinin tümü özellikle de meyve ve sebze tüketimi önemlidir. Sigara içenler yüksek doz β-karoten ve α-tokoferolden kaçınmalı, buna karşılık diğer kişilerden fazla C ve B vitamini almalıdır. Ilımlı bir şekilde alkol tüketimi, özellikle de şarap

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

ek fayda sağlayabilir. Yine de kötü beslenen kişilerde, özellikle yüksek miktarda yağlı besinler ve az miktarda meyve ve sebze içeren diyetle birleştiğinde, çok fazla alkol kesinlikle zararlıdır. Multivitamin ve mineral haplarını her gün almaya değer mi sorusuna yönelik olarak yapılan "Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP)" ve "Supplementation en Vitamines et Mineraux Antioxydants (SUVIMAX)" çalışmaları yüksek dozda takviyeye ihtiyaç olmadığını ortaya koymuştur. [46, 47]

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

46 Salonen, J., Nyyssönen, K., Salonen, R., Lakka, H. M., Kaikkonen, J., Porkkala-Sarataho, E., Voutilainen, S., Lakka, T., Rissanen, T., & Leskinen, L. (2000). Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine*, *248*(5), 377-386.

47 Hercberg, S., Preziosi, P., Galan, P., Faure, H., Arnaud, J., Duport, N., Malvy, D., Roussel, A.-M., Briancon, S., & Favier, A. (1999). "The SU. VI. MAX Study": a primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers. *Food and Chemical Toxicology*, *37*(9-10), 925-930.

Reaktif Türlerin Yararları

Tülin Altınoluk*
A. Süha Yalçın**

Son yıllardaki pek çok araştırmadan elde edilen sonuçlar, reaktif türlerin biyolojik sistemlerde ikili rol oynadığını düşündürmektedir. Bu çalışmalarda reaktif türlerin aerobik metabolizmanın zararlı ürünleri olmalarının yanı sıra, birçok biyolojik sürecin yürütülmesinde gerekli oldukları ortaya konmuştur. [1] Böylece pek çok hastalık sürecinde rolleri olduğu gayet iyi bilinen bu moleküllerin, aynı zamanda çeşitli yararlı etkilere öncülük ve aracılık ettikleri gösterilmiş olmaktadır. Bu bağlamda, hücrelerde reaktif türlerin bazal düzeyini korumanın önemi özellikle vurgulanmaktadır. Reaktif türlerden her birinin kendine özgü olarak sergilediği ve hem farklı konsantrasyon aralığında hem de farklı yerlerde ortaya çıkardığı moleküler düzeydeki etkiler organizma için yaşamsal öneme sahiptir.

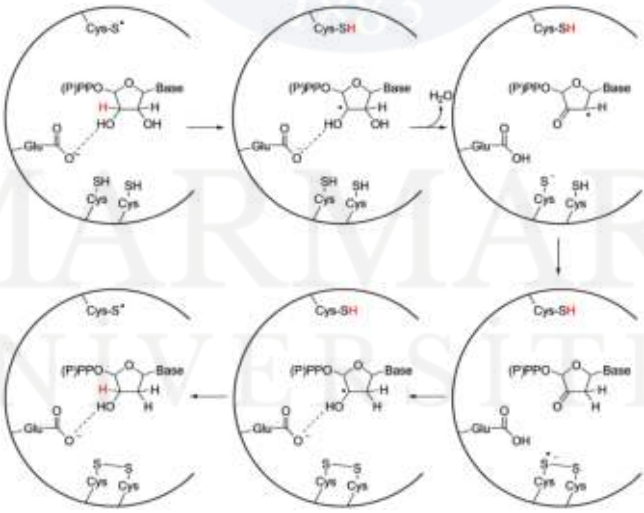
Öte yandan, reaktif türlerin aşırı üretimi ile kullanımları arasında kurulan denge, hücre içi redoks süreçlerinin sağlıklı bir şekilde yürümesini sağlamaktadır. Oksidatif stres durumu reaktif türlerin miktarının vücudun idare edebileceği seviyeyi aştığı durumlarda oluşurken, seviyeler çok düşük olduğunda antioksidanlar lehinee indirgeyici stresler de meydana gelebilmektedir. Bu durumun kanserden kardiyomiyopatiye kadar çeşitli patolojilerle ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Bu bölümde reaktif türlerin çeşitli sistemlerdeki yararlı etkileri ele alınmış, ayrıca reaktif türlerin aşırı olmasıyla başa çıkılmasını sağlayan doğal antioksidan savunma mekanizmalarına örnekler verilmiştir.

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

1 Egea, J., Fabregat, I., Frapart, Y. M., Ghezzi, P., Görlach, A., Kietzmann, T., Kubaichuk, K., Knaus, U. G., Lopez, M. G., & Olaso-Gonzalez, G. (2017). European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biology 13*, 94-162.

Radikallerin enzim katalizine katkısı

Bazı enzimler katalizledikleri reaksiyonlarda sübstratlardaki hidrojen atomlarını uzaklaştırmak için serbest radikalleri aracı olarak kullanmaktadır. Ancak bu tür enzimlerin kendilerine zarar vermemeleri için radikalleri kontrollü olarak oluşturmaları ve kullanmaları gereklidir. Örnek olarak ribonükleotitlerin deoksiribonükleotitlere dönüşmesini katalizleyen enzimlerden ribonükleotit redüktaz (RNR) enzimi gösterilebilir. [2] Bu enzim iki alt-birimden oluşmuştur ve katalizlediği reaksiyon aynı zamanda DNA sentezinin hız sınırlayıcı basamağıdır. Düzenleyici bölgelerini içeren büyük alt-birimi (R1)'dir. Küçük alt-birim olan R2'de ise bir demir merkeziyle tirozil serbest radikali (Tyr-O$^{\bullet}$) bulunur (Şekil 1). Bu enzimin inhibitörü olan hidroksiüre, DNA sentezini ve hücre çoğalmasını baskılamaktadır. Hidroksiüre hem kanserde hem de orak hücre anemisinin tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Molekül etkisini Tyr-O$^{\bullet}$ radikali üzerinden yapmaktadır. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) ile nitrik oksit (NO$^{\bullet}$) enzimi etkisiz hale getirmektedir. Tirozil radikallerinin $O_2^{\bullet -}$ ile reaksiyonu birkaç ürün oluşturabilirken, NO$^{\bullet}$ ile bir nitrozo-tirozin türü oluşur. Peroksinitrit ($ONOO^-$) de tirozil radikalini uzaklaştırarak etki gösterir. Organizmada serbest radikallerin katalizde aracı olarak görev aldığı daha pek çok enzimsel reaksiyon vardır.



Şekil 1. Ribonükleotit redüktazın etki mekanizması [3]

2 Cotruvo Jr, J. A., & Stubbe, J. (2011). Class I ribonucleotide reductases: metallocofactor assembly and repair in vitro and in vivo. *Annual Review of Biochemistry*, *80*, 733-767.

3 Lundin, D., Berggren, G., Logan, D. T., & Sjöberg, B.-M. (2015). The Origin and Evolution of Ribonucleotide Reduction. *Life*, *5*(1), 604-636. https://www.mdpi.com/2075-1729/5/1/604.

ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Fagositoz

Patojenlere karşı savunma, tüm organizmalarda hayatta kalabilmek için gereklidir. İnsanlarda bağışıklık birbiriyle etkileşim halinde olan iki sistem şeklinde oluşmuştur. Birincisi doğuştan gelen bağışıklıktır. [4] Bu sistem lipopolisakkaritleri ve patojenler tarafından eksprese edilen yapıları tanır, istilacılara anında ve çok güçlü bir savunma yanıtı verir. Bu yapılar patojen ilişkili moleküler paternler (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP) olarak bilinir.

Diğer sistem olan edinilmiş bağışıklık sonradan kazanılan bağışıklıktır. Patojenlerin eksprese ettiği antijenleri lenfositlerin tanıması ve sonrasında antikor tepkileri vermesine dayanır. Edinilmiş bağışıklık ile immünolojik hafıza oluşur ve böylece patojen tekrar ortaya çıkarsa çok daha hızlı bir tepki verilebilir. Enfeksiyonlarda veya hücrelere zarar veren herhangi bir yaralanma sonrasında, hasar ilişkili moleküler paternler (*damage associated molecular pattern*, DAMP) olarak adlandırılan tehlike sinyalleri serbest bırakılır. [5] Örnek olarak fosfatidilkolin ve fosfatidilserin kaynaklı lipit oksidasyon ürünleri, 4-hidroksinonenal (HNE) veya malondialdehit (MDA) ile modifiye edilmiş proteinlerle mitokondriyal protein ve DNA parçacıkları verilebilir. DAMP'ler ısı şok proteinleri, sodyum ürat ve kolesterol kristalleri, peroksiredoksinler gibi konakçı hücrenin normal molekülleri de olabilir. DAMP'ler ve PAMP'ler, belirli hücrelerdeki patern tanıma reseptörlerine (*pattern recognition receptor*, PRR) bağlanır. Bu reseptörler arasında, *toll-like* reseptörler (TLR) ve *Nod-like* reseptörler bulunur. PRR aktivasyonu, inflamazomlar olarak adlandırılan büyük multi-protein yapıların toplanmasına yol açar. Bu toplanma daha sonra IL-1β ve IL-18 sitokinlerinin üretimine neden olur. Sitokinler ayrıca, patojene karşı doğuştan gelen bağışıklığın ve edinilmiş bağışıklık tepkilerinin yanında inflamasyon sürecinin düzenlenmesine de yardımcı olur. Makrofajlar, dendritik hücreler ve epitel hücreleri gibi bekçi hücreler konak savunmasının ön saflarında yer alırlar. Bu hücreler DAMP'lere ve PAMP'lere maruz kaldıkları zaman, doku hasarı bölgesindeki inflamasyonun fark edilmesine aracılık eder. Kendileri mikroorganizmaları öldürebilmesine karşın, makrofajlar çoğu zaman problemle tek başlarına baş edemezler. Bekçi hücreler aktive edildiğinde, inflamazomları biraraya getirir. Yine bu hücreler tarafından, başta sitokinler ve kemokinler olmak üzere çok sayıda inflamatuvar aracısı, eikozanoidler, reaktif türler ve proteinazlar da salgılanır. [6]

---

4 Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, *22*(2), 240-273.

5 Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. *Immune Network*, *18*(4).

6 Narasaraju, T. A., Jin, N., Narendranath, C. R., Chen, Z., Gou, D., & Liu, L. (2003). Protein nitration in rat lungs during hyperoxia exposure: a possible

Fagositlerin öldürme mekanizması, reaktif türlerin yararlı etkilerine verilen örneklerdendir. Normalde dolaşımdaki nötrofiller damar duvarına geçici olarak ve gevşek bir şekilde yapışırken inflamasyonla karşılaşıldığında nötrofiller endotele sıkıca yapışır. Yalancı ayak formlarını endotel duvarına kenetler ve endotel hücreleri arasındaki boşluklardan sıyrılarak inflamasyon alanına ulaşırlar. Nötrofillerin göçünü aktive eden, bu bölgede oluşan kemotaktik faktörlerdir. Bu faktörler arasında N-formil-peptitler gibi bakteri ürünleri (DAMP'ler) ve konaktan türeyen kompleman aktivasyon ürünleri, lökotrien B4 (LTB_4), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve kemokinler yer alır. [7]

Zebra balığı modelinde yapılan çalışmalar, hidrojen peroksitin nötrofillerin yaralanan doku bölgesine göçünde anahtar bir rol oynadığını göstermiştir. Hidrojen peroksit, Lyn olarak bilinen bir nötrofil kinaz tarafından tanınır. Lyn daha sonra kendi kendini fosforile ederek göç yönünü tayin eder. Reaktif türlerin insan nötrofillerindeki kemotaksisi benzer kinazlar aracılığıyla gerçekleşir. Burada hidrojen peroksit nötrofil göçünün tek aracı molekülü değildir, ancak aşırı miktarlarda hidrojen peroksit üretildiğinde nötrofil fonksiyonu bozulabilir.

İnflamasyonun bir sonraki aşamasında, monositler dolaşımı terk ederek inflamasyon bölgesine girer. Bu hücrelerin mobilitesi nötrofillerden daha azdır. Ancak inflamasyon alanına girdiklerinde makrofajlara farklılaşır, çevredeki sitokinlere ve diğer faktörlere bağlı olarak M1 veya M2 fenotiplerini geliştirebilirler. M1 makrofajların, proinflamatuvar sitokinleri (örneğin TNF-α, IL-12 ve IL-23) üretme yetenekleriyle birlikte güçlü mikrobisidal kapasiteleri vardır. M2 makrofajlar ise daha az reaktif tür veya sitokin üretir, dokunun yeniden şekillenmesine ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesine katılır. Bu hücrelerin ürettiği IL-10 gibi sitokinler, daha çok anti-inflamatuvar özellikte olup bağışıklığı düzenleme eğilimindedir. [8] Özetle, makrofajlar inflamasyonun başlangıcında pro-inflamatuvar etki yaparken, çözülme fazında inflamasyon önleyici hale gelirler. Reaktif türler ise inflamasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Makrofajlar fagositozla sadece mikroorganizmaları değil, gerektiğinde eritrositler ve apoptotik nötrofiller gibi konağın kendi

---

role of myeloperoxidase. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, *285*(5), L1037-L1045.

7 Cho, H.-Y., Van Houten, B., Wang, X., Miller-DeGraff, L., Fostel, J., Gladwell, W., Perrow, L., Panduri, V., Kobzik, L., & Yamamoto, M. (2012). Targeted deletion of nrf2 impairs lung development and oxidant injury in neonatal mice. *Antioxidants and Redox Signaling*, *17*(8), 1066-1082.

8 Joyce-Brady, M., & Hiratake, J. (2011). Inhibiting glutathione metabolism in lung lining fluid as a strategy to augment antioxidant defense. *Current Enzyme Inhibition*, *7*(2), 71-78. https://doi.org/10.2174/157.340.811796575308.

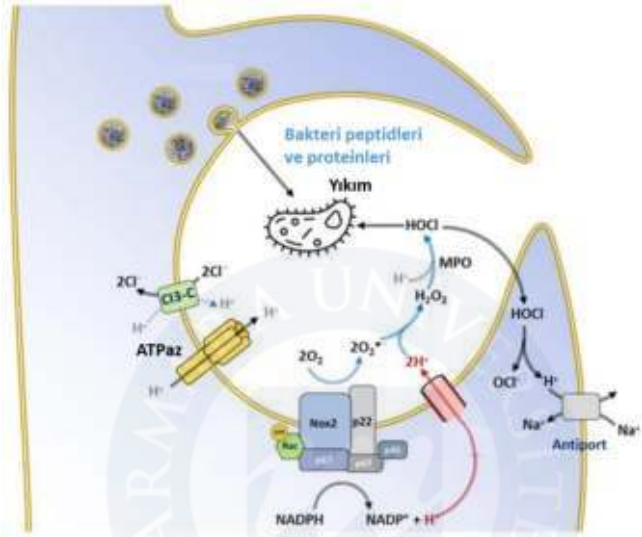
ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

hücrelerini de temizler. Ayrıca önemli miktarda çözünmeyen maddeyi alarak, aylarca veya yıllarca saklayabilirler. Makrofajlar tarafından çok fazla eritrosit alınması, heme ve/veya demire bağlı oksidatif hasarı azaltabilir. [9]

Nötrofillerde ATP üretimi glikolize dayanır. Bu yüzden istirahat halinde çok az O_2 tüketilir. Oksidatif fosforilasyona az ihtiyaç duymaları sayesinde, nötrofiller hipoksik bölgelerde antibakteriyel etki gösterirler. Buna karşılık, makrofajlar daha fazla mitokondriye sahiptir. Oksidatif fosforilasyonu görece daha fazla kullanır ve bu nedenle daha fazla O_2 tüketirler. Fagositozun başlangıcında; dört fagosit tipinin tümünde birden, O_2 alımında oksidatif patlama olarak adlandırılan olayla ilişkili olarak ve istirahat halindeki tüketimin 10-20 katı kadar olabilen belirgin bir artış görülür. Bu olay için oksidatif patlama doğru bir isimlendirme olmayabilir. Çünkü O_2 alımı, artmış mitokondriyal solunuma bağlı değildir ve mitokondriyal elektron taşınması inhibitörleri tarafından önlenemez. Oksijen alımı arttıkça, pentoz fosfat yolunun aktivasyonundaki artış nedeniyle, fagositlerin glukoz tüketimi de artar. Oksidatif patlama forbol miristat asetat, alüminyum florür, doymamış yağ asitleri ve konkanavalin A tarafından tetiklenir. Fagositler, düşük seviyelerde bir uyarana maruz kalmadan önce, bu olaya hazırlanabilir. Hazır hale gelen hücreler, artık daha gelişmiş adezyon molekülleri ve reseptörlere sahip olacakları için, ikinci bir uyarana maruz kaldığında daha kuvvetli bir oksidatif patlama yanıtı verir. Oksidatif patlama sırasındaki oksijen alımı, plazma zarının başlangıçta yabancı cisme temas eden ve daha sonra fagositik vakuol oluşturan bölümündeki bir enzim kompleksinin aktivasyonundan kaynaklanır. Aktive edilen bu enzim kompleksi, NADPH'yi $NADP^+$'ye okside ederek ortama $2O_2$ ile $O_2^{\bullet-}$ indirgemek için kullanılan iki elektron salar (Şekil 2). NADPH oksidazın aktivasyonu, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ ve rac2 gibi normalde istirahat halindeki nötrofillerin sitozolünde bulunan birkaç proteini gerektirir. Bu proteinler membrana yerleşir ve p47'nin fosforilasyonu yardımıyla aktif kompleks oluşmasına yardımcı olurlar. Hücreler endotelden geçerken rac2 aktivitesinin modülasyonu ile nötrofil $O_2^{\bullet-}$ üretimi baskılanır. Aktif kompleks oluştuktan sonra ise elektron taşıma sistemi çalışmaya başlar. İnsan nötrofillerinde aktive oksidaz kompleksindeki oksijenin K_m değeri, vücut sıvılarındaki oksijen konsantrasyonları aralığındadır. Bu nedenle, üretilen $O_2^{\bullet-}$ miktarı ortamın oksijen konsantrasyonundan etkilenir. Nötrofiller oksidatif patlama sayesinde birçok anaerob bakteri suşunu öldürebilir. Nötrofil

9 Koike, K., Kondo, Y., Sekiya, M., Sato, Y., Tobino, K., Iwakami, S.-i., Goto, S., Takahashi, K., Maruyama, N., & Seyama, K. (2010). Complete lack of vitamin C intake generates pulmonary emphysema in senescence marker protein-30 knockout mice. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, *298*(6), L784-L792.

düşük O_2 ortamında karşılaştığı türleri oksijene bağımlı olmayan bir öldürme mekanizmasıyla ortamdan temizler. [10]



Şekil 2. Solunum patlaması ve bileşenleri [11]

Nötrofillerin granüler bileşenlerinin çoğu, bakterisidal aktiviteye sahip oldukları için, granüllerini fagositik keselerin içine boşaltarak bakterileri öldürebilir. Defensin ve katelisidin peptitleri bakterilerin hücre membranındaki kanalları açarak antibakteriyel etki gösterir. Ayrıca birçok antimikrobiyal peptit ve protein, nötrofil kemotaksisinin uyarılması, apoptozun engellenmesi ve sitokin üretiminin aktivasyonu gibi immünomodülatör etkilere sahiptir. Laktoferrinin, bakterilerin büyümesi için gerekli olan demiri bağlayarak, birkaç bakteri suşunu doğrudan öldürdüğü bildirilmiştir. [12] Elastaz ve katepsin G de bakterileri öldürmeye yardımcı olurlar. Öte yandan, proteinaz inhibitörlerinin ortama eklenmesinin fagositlerin bakterileri öldürmesini azaltabileceği bilinmektedir. Bununla birlikte, anaerobik koşullar altında nötrofillerin diğer bakteri suşlarını öldürmesi çok az olmaktadır. Son

10 Zhao, T., & Bokoch, G. M. (2005). Critical role of proline-rich tyrosine kinase 2 in reversion of the adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils. *Journal of Immunology*, *174*(12), 8049-8055.

11 Vermot, A., Petit-Härtlein, I., Smith, S. M. E., & Fieschi, F. (2021). NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants*, *10*(6), 890. https://www.mdpi.com/2076-3921/10/6/890.

12 Francis, N., Wong, S. H., Hampson, P., Wang, K., Young, S. P., Deigner, H. P., Salmon, M., Scheel-Toellner, D., & Lord, J. M. (2011). Lactoferrin inhibits neutrophil apoptosis via blockade of proximal apoptotic signaling events. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1813*(10), 1822-1826.

olarak, fagositozun normal olduğu, ancak oksidatif patlamanın ciddi derecede azaldığı kalıtsal durumlara verilen ortak bir terim olan kronik granülomatöz hastalıktan muzdarip hastalardan elde edilen bilgiler, bazı bakterilerin öldürülmesi için $O_2^{\bullet-}$ üretiminin gerekli olduğunu göstermektedir. [13] Oksijenin sulu çözelti içindeki sınırlı reaktivitesi ve membranı geçme yetersizliği dikkate alındığında, kendisinin mikroorganizmaları öldürmesi mümkün değildir. Bu nedenle, birçok mikroorganizma, enzimatik olmayan yollarla oluşan $O_2^{\bullet-}$'ten meydana gelen H_2O_2 vasıtasıyla öldürülür. Hidrojen peroksit, $O_2^{\bullet-}$ 'ten farklı olarak, bakteriyel zarfları geçebilir. Böylece, doğrudan hasara neden olarak ve/veya $OH^{\bullet}$ oluşturarak bakteriler için toksik etki yaratabilir. Bakterilerin hücre içi demir içeriğinin arttırılması onları H_2O_2'e duyarlı hale getirmektedir. [14] Hidrojen peroksitin bakterileri öldürmesi sırasında, çoğu zaman hücre içinde $OH^{\bullet}$ oluşur. Bununla birlikte, hücre dışındaki $OH^{\bullet}$ patojene zarar veremeyeceği için fagozomdaki bakterileri öldürmesi mümkün değildir. Nötrofil kaynaklı $O_2^{\bullet-}$ ile H_2O_2 bir miktar demir varlığında $OH^{\bullet}$ oluşturmak üzere reaksiyona girebilir. Bu sırada, aktive olan nötrofillerin fagositik vakuolüne laktoferrin salgılanır. Nötrofillerin laktoferrin sekresyonu, inflamasyon bölgelerindeki demir iyonlarını bağlayarak, demire bağımlı $OH^{\bullet}$ oluşumunu en aza indirmeye yardımcı olur. Ayrıca, nötrofillerin apoptoza sürüklenmesini de geciktirebilir. Sıçan, fare ve diğer hayvanların nötrofil ve makrofajlarında nitrik oksit çok kolay üretilmektedir. Mikromolar seviyelerdeki nitrik oksit belirli bakterileri ve parazitik protozoaları, hem doğrudan solunum zinciri fonksiyonlarını inhibe ederek, hem de dolaylı olarak $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyona girerek öldürebilir. Bu etkisini demir-kükürt proteinlerine zarar veren peroksinitriti ($ONOO^-$) üreterek gösterebilir. Gerçekten de, iNOS'a sahip olmayan farelerin bazı patojenlere karşı daha hassas olduğu bildirilmiştir.

Mikrobisidal ajanlara katkı

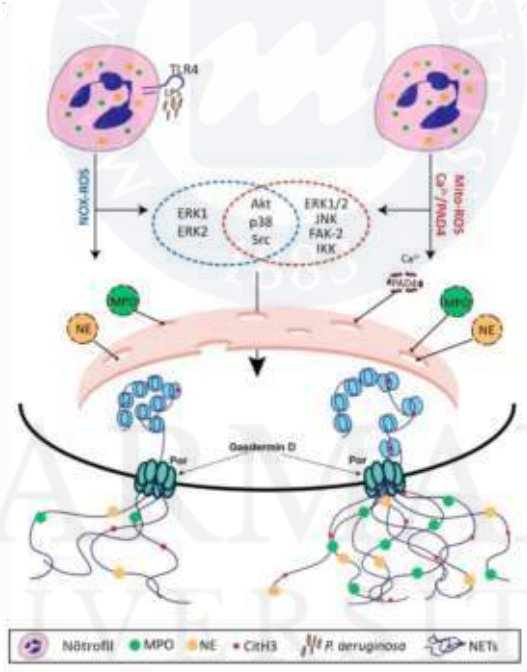
Nötrofil elastaz ve/veya katepsin G defekti olan fareler, nötrofillerinde $O_2^{\bullet-}$ üretimi normal olmasına rağmen bazı bakteri türlerini öldüremez. İnsan nötrofilleri, *S. Pneumoniae* bakterisini öldürmek için reaktif türler yerine bu proteinazları kullanır. [15] Elastaz enzimi nötrofil ekstraselüler tuzak (NET) oluşumunda da rol oynar.

13 Loffredo, L., Carnevale, R., Sanguigni, V., Plebani, A., Rossi, P., Pignata, C., De Mattia, D., Finocchi, A., Martire, B., & Pietrogrande, M. C. (2013). Does NADPH oxidase deficiency cause artery dilatation in humans? In: Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA.

14 Repine, J., Fox, R. B., & Berger, E. (1981). Hydrogen peroxide kills Staphylococcus aureus by reacting with staphylococcal iron to form hydroxyl radical. *Journal of Biological Chemistry*, *256*(14), 7094-7096.

15 Liu, F.-C., Chuang, Y.-H., Tsai, Y.-F., & Yu, H.-P. (2014). Role of neutrophil extracellular traps following injury. *Shock*, *41*(6), 491-498.

Bununla birlikte, süperoksit radikali hidrojen iyonlarını tüketerek ortamın pH değerini yükseltir ve katyonik granüllerde proteinazların etkisini kolaylaştırır. Bu mekanizmada, reaktif türlerin doğrudan etkisi olmamakla birlikte, proteinazların çalışması için uygun ortam yaratılmaktadır. Yapılan çalışmalar, oksidatif patlamanın işlevinin sadece proteinazların çalışması için uygun koşullar yaratmakla sınırlı kalmadığını, fagositlerin bazı organizmaları öldürürken reaktif türleri (H_2O_2, HOCl ve bazen $ONOO^-$ veya bakteriyel $OH^•$) kullandıklarını göstermiştir. Antioksidan savunması yetersiz olan mikroorganizmalar ise fagositler tarafından yok edilmeye daha yatkındır. Bu bilgiler reaktif türlerin fagositozdaki önemine işaret etmekle birlikte, öldürme mekanizması türler arası farklılık da gösterebilir. Ayrıca fagositin karşılaştığı her bir mikroorganizma için de mekanizma farklı olabilir. Örneğin, insan nötrofilleri farelerdeki nötrofillerden daha fazla antibakteriyel protein içermektedir. [16]



Şekil 3. Nötrofil ekstraselüler tuzak oluşumu [17]

Fagositik vakuol nötrofilin sitoplazmasındaki diğer granüllerle birleştiğinde buradan miyeloperoksidaz (MPO) gibi bir dizi enzim

16 Arnhold, J., & Flemmig, J. (2010). Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *500*(1), 92-106.

17 Ravindran, M., Khan, M. A., & Palaniyar, N. (2019). Neutrophil extracellular trap formation: physiology, pathology, and pharmacology. *Biomolecules*, *9*(8), 365. https://www.mdpi.com/2218-273X/9/8/365.

ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

salgılanır. Miyeloperoksidaz nötrofillerdeki toplam proteinin %2-5'ini; fagositik vakuol içindeki proteinlerin ise %25'ini oluşturur. Bu spesifik olmayan peroksidaz aktivitesine sahip, ürat ve salisilat dahil olmak üzere çok çeşitli substratları oksitleyebilen ve katyonik hem içeriği olan bir enzimdir. Her biri ~60 ve 15 kD moleküler ağırlıklara sahip dört alt birimi vardır. *In vitro* koşullarda ve H_2O_2 ve klorür (Cl^-) veya iyodür (I^-) iyonlarının varlığında, birçok bakteri ve mantarı öldürür. Fagosit sitoplazmasında ve hücre dışı sıvılarda klorür iyonu iyodürden çok bulunduğundan, enzimin aktivitesini klorürü hipokloröz asit (HOCl)'e oksitleyerek gösterdiği düşünülmektedir. [18]

Nötrofiller aktive olduğunda, ürettikleri H_2O_2'in yaklaşık %30'u MPO tarafından HOCl yapmak üzere kullanılır. Ancak, NET bir yandan trombositleri aktive ederek kanın pıhtılaşmasını sağlarken aynı yolla endotel hücrelerine de zarar verebilir. Bu sırada serbest bırakılan MPO nitrik oksiti tüketir, tirozin rezidülerini nitratlar ve hücre dışında HOCl oluşturmak üzere H_2O_2 ve Cl – ile reaksiyona girer. Bu süreçte, HOCl'e ek olarak ortama$ONOO^-$ veya kloraminlerin eklenmesi α_1-antiproteinaz ile α_2-makroglobulini inaktive eder ve proteolitik etkiyi arttırır. [19] Alveolar sıvıda yüksek seviyelerde bulunan GSH ve askorbat gibi antioksidanlar ise $ONOO^-$ ve HOCl'i temizleyerek, α_1-antiproteinaza verilen hasarı azaltır.

Hücre içi sinyal iletisi

Redoks düzenleme mekanizmaları vücudun uygun sinyalizasyon süreçlerini sürdürmesi için yaşamsal öneme sahiptir. Bu reaksiyonlar, proteinlerdeki sistein kalıntıları ile etkileşime giren reaktif türleri içerir. Bu süreçte hücre döngüsünün ve programlanmış hücre ölümünün düzgün bir şekilde düzenlenmesini sağlamak üzere harekete geçen, hücre proliferasyonuyla ve apoptozla ilgili yolaklarda reaktif türlerle etkileşime giren pek çok kinaz da yer alır. Örneğin, mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK), apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1'i (ASK1) uyarır. ASK1 de JNK ve p38 transkripsiyon faktörlerini düzenler. Bu şekilde, reaktif türler ile aktive edilen cGMP'ye bağımlı protein kinaz G (PKG) ve protein kinaz A (PKA) aracılığıyla apoptoz uyarılmaktadır. [20]

---

18 Parker, A., Cuddihy, S. L., Son, T. G., Vissers, M. C., & Winterbourn, C. C. (2011). Roles of superoxide and myeloperoxidase in ascorbate oxidation in stimulated neutrophils and H2O2-treated HL60 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*(7), 1399-1405.

19 Vandivier, R. W., Fadok, V. A., Hoffmann, P. R., Bratton, D. L., Penvari, C., Brown, K. K., Brain, J. D., Accurso, F. J., & Henson, P. M. (2002). Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *Journal of Clinical Investigation*, *109*(5), 661-670.

20 Patel, R., Rinker, L., Peng, J., & Chilian, W. M. (2018). Reactive oxygen species:

Sinyal iletiminde inflamasyon bölgelerinden salınan reaktif türler önemli görevlere sahiptir. Örneğin matriks metallo-proteinazlarının aktivitesini artırabilirler. Ayrıca sitokinler aracılığıyla veya doğrudan doku rejenerasyonunu sağlayan fibroblast proliferasyonunu da uyarabilirler. Reaktif türlerden biri olan H_2O_2 sadece fagosit alımını etkilemez, aynı zamanda P-selektin, ICAM-1, PECAM-1 ve VCAM-1 gibi adezyon moleküllerinin seviyelerini artırarak endotele yapışmalarını da kolaylaştırır. Reaktif türler veya onların aracılığıyla meydana gelen sitokinler genellikle NF-κB'nin dahil olduğu yolak üzerinden mekanizmaya katılır. Düşük seviyelerdeki $NO^{\bullet}$ ise NF-κB aktivasyonunu baskılayarak, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltır ve fagosit yapışmasını önleyebilir. [21]

Özetle, inflamasyon bölgelerinde proteinazları, katyonik proteinleri, sitokinleri, reaktif türleri ve diğer faktörleri üreten tüm hücre tiplerinin dinamik ve karmaşık birlikteliği söz konusudur. Bununla birlikte, normal bir akut inflamatuvar yanıt sırasında reaktif türlerin doku hasarına katkısı oldukça sınırlıdır.

Pro – ve anti-inflamatuvar etki

Kronik inflamasyon ve buna bağlı hastalıkların gelişimi arasındaki bağlantıda MPO ön plandadır. Katyonik bir protein olan MPO, nötrofil alımını kolaylaştırır ve inflamasyon bölgelerinde nötrofillerin apoptozunu geciktirir. Ayrıca, damar duvarlarındaki ve bazal membranlardaki endotel hücrelerinin glikozaminoglikanları içeren anyonik bölgelerine de kolayca bağlanır. Buralarda nitrik oksiti tüketebilir, hücre dışı matriks glikoproteinleri gibi proteinleri oksitleyebilir, klorlayabilir, nitratlayabilir ve lipit peroksidasyonunu başlatabilir. [22] MPO'ya veya nötrofil granül proteinlerine karşı geliştirilen antikorlar, özellikle damarlarda ve böbrekte kronik inflamasyona yol açmaktadır. Kronik granülomatöz hastalarında veya NADPH oksidaz defekti olan farelerde ortaya çıkan inflamasyonun seyrinin düzensiz ve kronik olması, reaktif türlerin inflamasyonun kronik seyrini azaltmada önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. [23]

Patojenleri vücuttan temizleyen ve organizmanın üreme çağından önce enfeksiyondan ölmesini engelleyen, sağlam bir bağışıklık sisteminin varlığı evrimsel açıdan önemlidir. Evrim,

---

The good and the bad. *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells*, *7*.

21 Boueiz, A., & Hassoun, P. M. (2009). Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvascular Research*, *77*(1), 26-34.

22 Zhang, R., Brennan, M.-L., Shen, Z., MacPherson, J. C., Schmitt, D., Molenda, C. E., & Hazen, S. L. (2002). Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(48), 46116-46122.

23 Nussbaum, C., Klinke, A., Adam, M., Baldus, S., & Sperandio, M. (2013). Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, *18*(6), 692-713.

ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

genellikle organizmaya yararlı olan süreçleri koruduğu için, reaktif türlerin üretimi patojenlere karşı savunmada doğal bir mekanizma haline gelmiştir. Ancak, bu moleküllerin aşırı miktarlarda üretimi kanser gibi pek çok hastalığa yol açabilir. Bununla birlikte, evrim mekanizmasının işleyişi açısından, üreme çağından sonra reaktif türlerin kansere neden olması türün geleceğine herhangi bir zarar vermez.

NADPH oksidazlar

Yakın zamana kadar, sadece fagositlerin reaktif türleri ürettiği ve bu moleküllerin diğer hücreler tarafından salınımının organizmaya zarar verebilecek bir yaralanmaya veya toksin maruziyetine bir yanıt olduğu düşünülüyordu. Günümüzde, $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 üreten NADPH oksidaz enzim sistemlerinin, damar duvarı ve solunum yolu dahil olmak üzere birçok organ ve dokuda yaygın olarak bulunduğu biliniyor. Bu sistem tarafından reaktif türlerin üretimi, genellikle fagosit oksidazdan farklı şekilde düzenlenir ve farklı uyaranlar tarafından aktifleştirilir. NADPH oksidazların katalitik alt birimlerini (yani $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 üreten kısım) tanımlamak için genellikle NOX terimi kullanılır. Örneğin, $gp91^{phox}$ NOX2 olarak adlandırılır. Sistem tarafından üretilen $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 önemli fizyolojik roller üstlenirken vücutta zararlara da yol açabilir. Bu durumu kontrol etmek için bazı NADPH oksidaz inhibitörleri geliştirilmiştir. NADPH oksidaz ailesi (NOX1-NOX5 ve DUOX1 ve DUOX2) en az yedi katalitik alt birim içerir. NOX1-NOX3 $O_2^{\bullet-}$ üretirken, NOX4'ün çoğunlukla H_2O_2 ürettiği bildirilmiştir. [24]

Gastrointestinal kanalda bulunan DUOX2 mukozal bağışıklık ve homeostazda görev alır. Bağırsakta ve solunum yollarında oldukça düşük seviyelerde ürettiği reaktif türler, doğrudan anti-bakteriyel olmaktan ziyade bakterilerden korunma mekanizmalarını (örneğin bakterilerin mukozaya yerleşmesini önleyerek) aktive etmeye yardımcıdır. Solunum sistemimiz de vücutta pek çok farklı işlevi yerine getiren NOX enzimlerine sahiptir. Bu ezimlere müdahale etmek grip gibi viral enfeksiyonlara olan bağışıklık direncini zayıflatabilir. [25]

Tiroid hormonlarının sentezinde, tiroglobulindeki tirozin kalıntılarının iyotlanması ve iyodotironinlerin oluşumu gerekir. Her iki işlem de tiroid epitel hücrelerinin apikal zarında bulunan tiroid peroksidaz (TPO) enzimi tarafından katalize edilir. TPO'nun

24 Panday, A., Sahoo, M. K., Osorio, D., & Batra, S. (2015). NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular and Molecular Immunology*, *12*(1), 5-23.

25 Lassègue, B., San Martín, A., & Griendling, K. K. (2012). Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circulation Research*, *110*(10), 1364-1390.

ihtiyaç duyduğu H_2O_2 de DUOX enzimleri tarafından üretilir. Bununla birlikte, tiroid bezinin aşırı H_2O_2 üretiminden korunması da gereklidir. Peroksiredoksinler ve GPx enzimleri buradaki *in vivo* dengenin kurulmasına yardımcı olur. Böylece, TPO ve DUOX2'nin birlikteliği sayesinde hücrenin geri kalan alanına H_2O_2 difüzyonu en aza indirilir. [26]

Damar duvarındaki tüm hücre tipleri (endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve fibroblastlar) $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 salgılayabilir. Endotel hücreleri, mitokondri ve eNOS gibi farklı kaynaklardan hücre dışına reaktif türleri salar. Endotel hücre yüzeylerine bağlanabilen ksantin oksidaz da $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 üretir. Buradaki $O_2^{\bullet-}$ üretiminin fizyolojik önemi belirsiz olmakla birlikte, $O_2^{\bullet-}$ ve $NO^{\bullet}$ normal vazoregülasyon mekanizmasının bir parçası olarak birbirlerinin etkilerini antagonize etmektedir. Fibroblastlar ve düz kas hücreleri, reaktif türlere cevap olarak proliferasyon yoluyla damar duvarının hipertrofisine neden olur. TGF-β da fibroblast proliferasyonunu hızlandırır ve düz kas hücresinin proliferasyonunu uyarır. Her iki mekanizmada da NOX1'den türeyen reaktif türler rol oynamaktadır. Farelerde yapılan çalışmalar, NADPH oksidaz enzimleri ile üretilen $O_2^{\bullet-}$'nin, doku yaralanmasını takiben VEGF öncülüğünde meydana gelen anjiyogeneze katkıda bulunduğunu göstermiştir. Anjiyogenezde reaktif türlerin belirli bir miktarda oluşumu gerekmekle birlikte, diğer tüm sistemlerde olduğu gibi reaktif türlerin fazlası anjiyogenezi de inhibe eder.

Reaktif türler yalnızca redoks homeostazında değil, etkili bir bağışıklık sisteminden anjiyogeneze kadar pek çok vücut fonksiyonunda gereklidir. Bununla birlikte, homeostazdaki dengesizlik her zaman kötü şekilde sonuçlanmaz. Vücutta kanama gibi bir akut travma meydana geldiğinde, renin-anjiotensin sistemi devreye girer ve anjiyotensin II, güçlü bir vazokonstrüksiyon yanıtına neden olarak kan kaybından dolayı azalan kan basıncının artmasına yardımcı olur. Anjiyotensin II etkisini düz kas hücrelerindeki NADPH oksidazı aktive ederek ve $O_2^{\bullet-}$ üretimini arttırarak gerçekleştirir. Aynı anda kandaki NO miktarında da bir azalma vardır, çünkü NOX gibi NO temizleyicileri aktif olarak devrededir. Böylece, $O_2^{\bullet-}$ seviyelerinin artışına karşın NO'in azalması vazodilatasyonu en aza indirir. Bu sayede trombositler vasıtasıyla pıhtılaşma süreci çok daha etkin şekilde yürütülebilir. Bu süreç, redoks homeostazının

26 De Deken, X., Corvilain, B., Dumont, J. E., & Miot, F. (2014). Roles of DUOX-mediated hydrogen peroxide in metabolism, host defense, and signaling. *Antioxidants and Redox Signaling*, *20*(17), 2776-2793.

reaktif türlerin üretimi yönüne doğru kaydırılması yoluyla vücudun karşılaştığı tehlikeleri nasıl atlattığının güzel bir örneğidir. [27, 28]

Gastrointestinal sistem

Gastrointestinal sistemde esas olarak besinlerin sindirim ve emilimi gerçekleşir. Bu sistem aynı zamanda, bağışıklık sistemi aracılığıyla, endotoksinler gibi bakteriyel ürünlerin vücuttan uzaklaştırılmasından sorumludur. Bu süreçte besin kaynaklı bazı toksinlere de (örneğin, karsinojenler, oksidan ürünler, etanol gibi prooksidanlar, peroksitlenmiş yağlardan kaynaklanan aldehitler) sürekli maruz kalınır. Hayvansal kökenli pişmiş gıdalarda F2-izoprostanlar, lipid hidroperoksitleri, kolesterolün oksidasyon ürünleri, proteinler ve DNA ile Maillard reaksiyonu ürünleri bulunur. Ayrıca fitoprostanlar ve fitosteroller gibi bitkisel kaynaklı lipitlerin oksidasyon ürünleri de sindirime katılabilir. Ancak, gastrointestinal kanalda ortadan kaldırıldıkları ve kana ulaşamadıkları için, diyetteki lipit ve protein oksidasyon ürünlerinin sistemik toksisitesi çok düşüktür. Buna karşılık, gastrointestinal sistem kanalını kaplayan hücreler aldehitler, lipit peroksitleri ve kolesterolün oksidasyon ürünleri (örneğin, pişmiş et ve balık kaynaklı) gibi ajanlara yoğun bir şekilde maruz kalır. Ayrıca gastrointestinal yolun diğer hücreleri tarafından (örn. kolonik epitelde $O_2^{\bullet -}$ üreten NADPH oksidaz enzimleri) ortama reaktif türler salınır.[29, 30]

Ağız, yemek borusu ve midenin maruz kaldığı reaktif tür kaynaklarından bazıları şunlardır:

- Gıdalardan gelen demir, bakır iyonları ve askorbat, özellikle midede $OH^{\bullet}$ oluşumunu başlatabilir ve lipitlerin oksidasyonunu katalizleyebilir. Bu süreçte diyet kaynaklı bakır iyonları askorbattan $OH^{\bullet}$ ile diğer reaktif türleri üretebilir.
- Gıdalardaki nitritin gastrik asit etkisi ile nitröz asite dönüştürülmesi sonrasında DNA deaminasyon türleri oluşur.
- Bazı içeceklerde, özellikle kahvede, yüksek konsantrasyonda hidrojen peroksit (> 100 μM) bulunur. Ağızdaki bakteriler tarafından da hidrojen peroksit üretimi gerçekleştirilir.

27 Yang, Y., Bazhin, A. V., Werner, J., & Karakhanova, S. (2013). Reactive oxygen species in the immune system. *International Reviews of Immunology*, *32*(3), 249-270.

28 Nathan, C., & Cunningham-Bussel, A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews Immunology*, *13*(5), 349-361.

29 Halliwell, B., Zhao, K., & Whiteman, M. (2000). The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radical Research*, *33*(6), 819-830.

30 Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2011). Redox biology of the intestine. *Free Radical Research*, *45*(11-12), 1245-1266.

- Diyette yüksek oranda okside olabilen hidroksihidrokinon gibi proksidan fenolik bileşikler bulunur.

Yukarıda sıralanan kaynaklara ve radikal saldırılarına karşı savunma mekanizmaları gelişmiştir:

- Lipitler başta olmak üzere, oksitlenmiş molekül içeriği yüksek olan yiyeceklerin tatlarını kokuşmuş olarak algılar ve yemeyi reddederiz.
- GastrointestinaI kanalı kaplayan mukus tabakası kolondaki bakteri florasını düzenlemeye yardımcı olarak ortamdaki $OH^{\bullet}$ gibi reaktif türleri önemli oranda temizler.
- Diğer dokularda olduğu gibi, gastrointestinaI kanalın hücrelerinde de DNA onarım enzimleri, oksitlenmiş proteinleri ortadan kaldıran proteazom sistemi ile metiyonin sülfoksit redüktaz, SOD, katalaz, peroksiredoksin, GST ve GPx gibi enzimler bulunur.
- İnce bağırsağın ve kolonun SOD ve GPx aktiviteleri hücre dışındadır. Böylece reaktif türlerin detoksifikasyonu besinlerin hücreye girmesinden önce gerçekleştirilebilir.
- Gastrointestinal kanal hücreleri içindeki GPx, lipitlerdeki peroksitlerin çoğunu kana emilmeden önce ortadan kaldırabilir. Bağırsak dokusu, peroksitleri ve sitotoksik aldehitleri metabolize edebilen GST açısından oldukça zengindir.
- Nrf2 sistemi yoluyla, sülforafan dahil olmak üzere birçok diyet bileşeni gastrointestinal kanaldaki antioksidan savunma sistemi bileşenlerinin (GST, GPx vd.) aktivitesini artırabilir.

Bağırsak epitel bariyeri, mikrobiyotayı oluşturan mikroorganizmalar ile birlikte, birbirine bağlı bir ekosistem olarak düşünülebilir. Konak ve mikrobiyota sürekli iletişim halindedir. Kimyasal sinyaller (O_2, H_2O_2, pH, ATP, laktat) ile defensinler, antimikrobiyal peptitler, lizozom, IgA, immün mediyatörler sitokinler ve besin kaynaklı bazı bileşikler bu iki yönlü iletişimi etkilemekte ve yönetmektedir. Stabilitesi ve difüzyon kapasitesinden dolayı, H_2O_2 de bu iletişime katkı yapar. Ancak ortamdaki etkinliği tükürük içine salınan peroksidazlar ve katalazın etkisiyle hızla kaybolur. Tükürükteki peroksidaz ile tiyosiyanat oksidasyon ürünlerinin üretimi önemli bir antibakteriyel mekanizma olarak kabul edilir.

Öte yandan, yediğimiz ve içtiğimiz gıdalardaki bileşenler sadece prooksidan değildir. Besinler aracılığıyla gastrointestinal sisteme antioksidanlar da sunulur. Bunlardan bazıları iyi emilir, emilmemiş olanlar gastrointestinal sistemin hücre dışı ortamında antioksidan koruyucu etki yapar. Örneğin, besinlerdeki flavonoidler ve diğer

bazı fenolikler reaktif türler ile etkin bir şekilde savaşır. Kırmızı et tüketiminin idrarda ve plazmada malondialdehit seviyelerini artırdığı, buna karşılık kırmızı şarap veya kahve gibi polifenollerce zengin içeceklerin bu seviyeleri düşürdüğü gösterilmiştir. [31]

Eritrositler

İnsanda en fazla sayıda bulunan hücrelerin başında eritrositler gelmektedir. Birincil işlevleri O_2 ve CO_2'in akciğerler ve dokular arasında taşınması olan bu hücreler etkili bir antioksidan savunma sistemi ile donatılmıştır. Söz konusu antioksidan sistem, sadece eritrositlere değil aynı zamanda vücuttaki tüm doku ve organlara da koruyuculuk yapar ve serbest radikal temizleyici olarak çalışır.

Eritrositler, mitokondri içermediklerinden moleküler oksijeni kullanarak ATP üretemez. Olgun eritrositlerde ATP üretiminin tek kaynağı anaerobik glikolizdir. Normal şartlar altında, eritrositlerde glukozun yaklaşık %90'ının glikoliz yoluyla ATP üretmek için kullanıldığı, geri kalan %10'unun ise NADPH üretimi sağlayan heksoz monofosfat yoluna yönlendirildiği bilinmektedir. Bu alternatif yol, öncelikle hemoglobini korumak ve okside glutatyonu indirgemek amacıyla kullanılır. İnsanda eritrositlerin ortalama ömrü 120 ± 20 gündür. Eritrositler yaşamı boyunca, çok sayıda stresli duruma maruz kalmaktadır. Akciğerlerden dakikada bir kez, böbrek medullasından ise bir saat içinde çok kez geçer ve kendilerinden daha küçük çapı olan kılcal damarlarda sıkışarak ilerlerler. Bu nedenle, eritrositlerin yapısal bütünlükleri sürekli baskı altındadır.

Yapılan çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışma, eritrositlerin normal işleyişi için gerekli pek çok parametrenin oksidatif stresden olumsuz etkilendiğini göstermiştir. Özellikle membrana bağlı reseptörlerin ve enzimlerin inaktivasyonu, iyonik parametrelerdeki değişiklikler, proteinlerin ve lipitlerin oksidasyonundaki artışlar önem taşır. Eritrositlerdeki herhangi bir anormallik yaşamsal sonuçları olan etki yaratabilir. Eritrositlerde sitoplazmanın üçte birini yoğun bir şekilde paketlenmiş olan hemoglobin oluşturur. Eritrosit kuru ağırlığının yaklaşık %90'ı hemoglobindir. Hemoglobinin beta zincirlerindeki tiyol grupları sitoplazmanın total tiyol havuzuna önemli katkıda bulunur. Eritrositler akciğerlerde kılcal damarlardan geçerken, hemoglobinin dört hem grubuna da O_2 bağlanır. Deoksihemoglobinde hemdeki demir Fe^{2+} durumundadır, O_2 bağlandığında bazı elektronlar yer değiştirir. Etkili bir antioksidan sistemin varlığına rağmen, hemoglobinin demiri sürekli olarak yüksek miktarda oksijene maruz kalmaktadır. Oksidasyon sonucu hemoglobin met-hemoglobine

31 Gorelik, S., Kanner, J., Schurr, D., & Kohen, R. (2013). A rational approach to prevent postprandial modification of LDL by dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods*, *5*(1), 163-169.

ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

(metHb) dönüştüğünde artık oksijen bağlayamaz veya taşıyamaz. Eritrosit içindeki metHb seviyesi normal şartlar altında, toplam hemoglobinin %1'inden daha az seviyede tutulur. Bununla birlikte, yüksek stres koşullarında bu oran artmaktadır. Eritrositlerin karşı karşıya oldıkları tüm zorlayıcı koşullara rağmen membran yapılarını sağlam tutmaları ve korumaları gerekir.

Dolaşımdaki eritrositlerin karşılaştığı bazı problemler: [32]

- Oksihemoglobinin yaklaşık %3-4'ü her gün oksidasyona uğrar, tamamının oksidasyonu 33-34 günde tamamlanır. Bu sürecin sonunda eritrosit O_2 taşıyamayacak hale gelir.
- Eritrositler PUFA bakımından zengin bir zar içindedir ve prooksidan hem proteinini ve ona bağlı O_2'i taşırlar.
- Küçük kapiller damarlarda fiziksel stres altındadırlar. Buralarda zarda meydana gelen deformasyon, lipit peroksidasyonunun etkilerini artırabilir.
- Eritrositlerin oksidasyona uğramış protein ve lipitleri yenileyecek sentezleme yetenekleri yoktur. Mitokondrisi bulunmadığı için iyon taşınmasında, GSH sentezinde ve özellikle de
- Na^+/K^+-ATPaz enzimi için gerekli olan ATP'yi üretmek üzere glikoliz yolunu kullanır. Dolayısıyla, eritrositlerde mitokondriyal $O_2^{\bullet -}/H_2O_2$ üretimi yoktur.
- Yaşla birlikte, eritrositlerdeki GSH seviyeleri azalır ve sitoplazma ortamı daha okside hale gelir.

Eritrositlerde antioksidan enzimlerin yanı sıra enzimatik olmayan antioksidanlar da bulunur. Başlıcaları askorbik asit, α-tokoferol, GSH ve diğer tiyol gruplarıdır. Bunlardan α-tokoferol, eritrosit membranlarında bulunan PUFA'yı peroksidasyona karşı korumak üzere güçlü bir peroksil radikal temizleyici olarak çalışır. Oksidatif stres içeren birçok hastalık durumunda α-tokoferol seviyesi azalmıştır.

Hemen hemen tüm hücrelerde oksidanlara karşı primer korumayı GSH sağlar. Eritrositlerde GSH'nin temel rolü, hemoglobini yüksek konsantrasyonda ve doğal formunda tutmaktır. Eritrositlerde membran bütünlüğünün bozulmasındaki başlıca neden olan lipit peroksidasyonunun ve membran tiyol gruplarının korunmasında da yine GSH önemli rol oynar. Oksidatif strese karşı korunmadaki doğrudan rolünün yanı sıra, GSH bir dizi koruyucu enzim için

32 Reeder, B. J. (2010). The redox activity of hemoglobins: from physiologic functions to pathologic mechanisms. *Antioxidants and Redox Signaling*, *13*(7), 1087-1123.

kofaktör görevi görür. GSH peroksidaz, GSH redüktaz ve GSH-S-transferazlar bunların başında gelir. Oksidatif koşullarda membran hasarı meydana geldiğinde, GSH geri dönüşümlü olarak GSSG'ye oksitlenir ve eritrosit zarından geçerek dışarı çıkar. Bu mekanizma, oksidatif stres durumundaki azalmış GSH seviyelerinin nedenidir.

Mitokondrisi bulunmadığından eritrositlerde Mn-SOD yerine bol miktarda Cu/Zn-SOD vardır. Cu/Zn-SOD enziminin kataliziyle süperoksit H_2O_2'ye dönüşür. Oluşan H_2O_2 de katalaz ve GPx1 ile ortamdan uzaklaştırılır. Eritrositler, kanda üretilen hücre dışı H_2O_2 ve $O_2^{\bullet-}$ için atık deposu olarak işlev görür. Başka bir deyişle eritrositler kanın temel antioksidanıdır. Süperoksit, bir anyon kanalı aracılığıyla eritrosit zarlarını kolayca geçer. Bu kanal, bant 3 proteinidir ve hem hücre iskeletini zara sabitler hem de bir iyon taşıyıcı olarak rol oynar. Benzer anyon değiştirme proteinleri, akciğerler de dahil olmak üzere çeşitli dokularda bulunur.[33]

Sağlıklı bireylerin eritrositleri kolay kolay lipit peroksidasyonuna maruz kalmaz. Talasemisi ve orak hücreli anemisi olan hastaların eritrositlerinde lipit peroksidasyonu artışı bildirilmiştir. Orak hücreli anemide, β-zincirinin altıncı pozisyonundaki glutamat kalıntısının yerini valin almıştır. Bu mutant proteine O_2 bağlanabilir, ancak deoksi formu kararsızdır ve eritrositte çökelme eğilimi gösterir. Sonuçta orak şekilli hücreler oluşur. Orak hücrelerin tıkadığı kılcal damarlarda meydana gelen iskemi ve reperfüzyon süreci ise ortamdaki reaktif türlerin üretimini arttırır. Hücreler kolayca hemoliz olarak yıkım için işaretlenir ve anemiye yol açarlar. Hastalardaki artmış plazma ksantin oksidaz aktivitesi, önce $O_2^{\bullet-}$ ve sonra $ONOO^-$ üretimine yol açarak durumu daha da kötüleştirir. Orak hücreli eritrositlerde GSH seviyeleri normalin altındadır. Diketogulonat gibi askorbat oksidasyon ürünlerinin birikimi gözlenir. Orak hücreli anemide GSH sentezinin, tüketimindeki artışa yanıtı olarak arttığı bulunmuştur.[34]

Eritrositlerde oksidasyona uğramış hemoglobin ve diğer anormal proteinler, 20S proteazom sistemi vasıtasıyla yıkıma uğratılır. Ancak, çok fazla demir iyonu salınacak olursa bu çözüm yolu bir probleme dönüşebilir. Eritrositlerde oksitlenerek hasar görmüş yani oksitlenmiş veya glikozillenmiş membran proteinlerini yıkıma uğratabilen bir enzim olan okside protein hidrolaz enziminin fizyolojik fonksiyonları henüz tam olarak bilinmemektedir. Yaşlanmış ve hasara uğramış eritrositler dolaşımdan retiküloendotelyal sistem (RES) aracılığıyla

33 Nozik-Grayck, E., Huang, Y.-C. T., Carraway, M. S., & Piantadosi, C. A. (2003). Bicarbonate-dependent superoxide release and pulmonary artery tone. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, *285*(6), H2327-H2335.

34 Reid, M., Badaloo, A., Forrester, T., & Jahoor, F. (2006). In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in adults with sickle cell disease. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, *291*(1), E73-E79.

temizlenir. Bu hücrelerin yüzeyinde beliren yaşlı hücre antijeni (*senescent cell antigen*-SCA), immünoglobulin G'ye bağlanır. Daha sonra bu yapı karaciğerdeki Kupffer hücreleri ve dalaktaki makrofajların çöpçü reseptörleri vasıtasıyla tanınır. Hemoglobin içindeki demir ise geri dönüştürülerek tekrar kullanıma sunulur.

Göz

Kornea yüksek miktarda O_2'e maruz kalır. Mercekteki uzun ömürlü proteinler zamanla yaşlanır ve ayrıca her zaman için çok fazla ışıktan zarar görme riski vardır. Gözle ilgili olarak, bebeklerde görülen prematüre retinopatisinden, yaşlılıkta görülen patolojilere kadar çeşitli sorunlar ortaya çıkabilir. Bunlardan başlıcaları maküler dejenerasyon ve merceğin opaklığıyla karakterize olan katarakttır. İkisi birlikte yetişkinlerdeki körlük vakalarının çoğunu oluşturur.

Gözün yaşadığı problemler, akciğerlerin ve eritrositlerin karşılaştıklarının hem benzeri hem de bileşimidir. Bu problemler şöyle sıralanabilir: [35]

- Kornea, atmosferdeki O_2'e, hava kirliliğine ve çeşitli irritanlara maruz kalır.
- Yüksek miktardaki ışığa aşırı maruziyet, mercekteki proteinlerin oksidasyonuna ve çapraz bağlanmalara yol açabilir.
- Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) camsı cismin hiyalüronik asit içeriğini depolimerize ederek viskoziteyi azaltabilir.
- Mercekteki epitel hücreleri, H_2O_2, lipit peroksitleri ve kolesterol oksidasyon ürünleri tarafından kolayca hasara uğratılır. Bunun sonucunda DNA ipliklerinin kırılması ve Na^+/K^+-ATPaz gibi iyon kanallarında anormallikler ortaya çıkar.
- Retina hem nörotransmisyon hem de görmeyle ilgili moleküllerin sentezi için gerekli enerjiyi üretebilmek üzere yüksek oranda O_2 alır. Burada 40-60 mmHg olan pO_2, pek çok vücut dokusundan daha yüksektir. Bu nedenle, kısa süreli iskemi bile geri dönüşü olmayan görme hasarına yol açabilir. Bununla birlikte, yüksek oranda O_2 alımı reaktif türlerin yüksek oranda üretimi demektir. Memeli retinasında yüksek miktarda bulunan nöroglobin, O_2 seviyesinin düşmesi durumunda tekrar yeterli düzeye çıkaracak olan tedarikçi moleküldür.

35 Shoham, A., Hadziahmetovic, M., Dunaief, J. L., Mydlarski, M. B., & Schipper, H. M. (2008). Oxidative stress in diseases of the human cornea. *Free Radical Biology and Medicine*, *45*(8), 1047-1055.

ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Retina hücre zarlarındaki lipitler ve koniler yüksek oranda PUFA, özellikle de dokosaheksaenoik asit (DHA) içerdiklerinden peroksidasyona karşı hassastır.

Gözün makula bölgesi çevresinde retinanın bozulmasıyla karakterize bir hastalık olan, yaşa bağlı makula dejenerasyonu yaşlılıkta kalıcı körlüğün önde gelen nedenidir. Bu hastalar başlangıçta, oksitlenme reaksiyonları gösteren protein ve lipitlerin sub-retinal birikintiler oluşturduğu *drusen* tanısı alır. İlerlemiş makula dejenerasyonunda da makula kaybının olduğu kuru form veya koroiddeki kan damarlarının aşırı büyüyerek retinaya penetre olduğu ıslak form görülür.

Oksidatif stres, inflamasyon ile yakından ilişkili olduğu için, retina pigment epitelinin oksidatif stres kaynaklı ve esas olarak nekroza bağlı gelişen hücre ölümünün, inflamatuvar bir gen olan HMGB1 ekspresyonunu indüklediği bildirilmiştir. Ayrıca, makrofajlar ve sağlıklı RPE hücrelerindeki oksidatif strese maruz kalarak ölen hücreler aracılığıyla inflamatuvar bir sitokin olan TNF-α yapımı da uyarılır. Bununla birlikte, TNF-y, IL-1β veya IFN-y gibi proinflamatuvar sitokinler, RPE hücrelerinde hem hücre içinde hem de hücre dışında serbest radikal üretimini indükler. Bu sitokinlerin glokom, yaşa bağlı maküler dejenerasyon, diyabetik retinopati veya retinal ven tıkanıklığı olan hastaların gözünde de üretildiği gösterilmiştir. Gözün sıkça maruz kaldığı bir eksojen reaktif tür kaynağı sigara dumanıdır. Sigara dumanındaki hidrokinon, işlenmiş gıdalarda, plastik kaplarda ve atmosferi kirleten diğer ajanlarda bulunan bir oksidandır.

Göz merceğine kan damarı girmez. Dolayısıyla besin ve O_2 ihtiyaçları difüzyonla giderilir. Mercek içi O_2 seviyeleri düşük olup çekirdekte 9-10 mmHg olarak ölçülmüştür. Bu da, singlet O_2 oluşumunu ve oksidatif hasarı en aza indirmeye yarar. [36] Ayrıca, yüksek ışık yoğunluğu altında irisin hızlı daralma refleksi retinanın korunmasına yardımcı olur. Korneada da kan damarları bulunmaz. Ancak dış yüzeyi askorbat, ürat, müsin ve pek çok proteini içeren gözyaşı sıvısında tam anlamıyla yıkanır. Korneal kristalin olarak adlandırılan aldehit dehidrojenaz tip 3A1 proteini, lipit peroksidasyonunun son ürünleri ve aldehitleri azaltma göreviyle birlikte önemli miktarda UV ışığı emer. [37] Göz, herhangi bir tahrişe maruz kaldığında, rahatsız edici ajanı yıkamak ve antioksidan kaynaklarını yenilemek için gözyaşı

36 Beebe, D. C., Holekamp, N. M., & Shui, Y.-B. (2010). Oxidative damage and the prevention of age-related cataracts. *Ophthalmic Research*, *44*(3), 155-165.

37 Chen, Y., Thompson, D. C., Koppaka, V., Jester, J. V., & Vasiliou, V. (2013). Ocular aldehyde dehydrogenases: protection against ultraviolet damage and maintenance of transparency for vision. *Progress in Retinal and Eye Research*, *33*, 28-39.

sekresyonu artar. İnsandaki gözyaşı salgısı, demire bağımlı serbest radikal reaksiyonlarını güçlü bir şekilde inhibe eder. Gözyaşı üreten lakrimal bezlerin etkinliği yaşlanmaya bağlı olarak azalırken oksidatif hasar seviyesi de artar. Kornea epitel hücreleri çeşitli antioksidanları (örn. askorbat, GSH, SOD ve H_2O_2 uzaklaştırıcı enzimler) içerir. Peroksiredoksinler ve katalaz, gözün tüm bölgelerinde bulunur. Ancak diğer hücrelerde olduğu gibi yüksek seviyelerdeki hidrojen peroksit oküler peroksiredoksinlerin inaktivasyonuna sebep olabilir. Aldehit ve lipit peroksit metabolizmasına olan katkıları belirsiz olan GSH S-transferaz enzimleri gözde mevcuttur. Ferritinin demir iyonu sekestrasyonundaki rolüne ek olarak, DNA'nın UV hasarından korunmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir. [38] Pek çok memelinin merceğinde GSH konsantrasyonu, çekirdekte düşük olmasına rağmen, mercek epitelinde karaciğerdeki değerler kadar yüksektir. GSH bir yandan kristalinlerin tiyol gruplarını korurken, aynı zamanda opak kümelenmeler oluşturarak birikmelerini de önler. Süperoksit dismutaz enzimi çoğunluk Cu/Zn-SOD olmak üzere tüm göz dokularında bulunur. Ancak özellikle retina pigment epitelinde yüksek miktarda mitokondriyal Mn-SOD vardır. Askorbat sadece gözyaşı sıvısında değil, aynı zamanda mercekte, korneada ve retina pigment epitelinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Bunlardan kornea epitel hücreleri en yüksek askorbat seviyesine sahiptir. Antioksidan alımıyla kandaki antioksidan seviyelerini katarakt veya maküler dejenerasyon insidansı ile ilişkilendiren çalışmalarda, yüksek askorbat, lutein veya zeaksantin alımının her iki hastalıkta da riski azalttığı öne sürülmektedir. Bununla birlikte, sonuçlarda C ve E vitaminini etkileyen polimorfizmlerin dikkate alınmamış olması nedeniyle, bulguların tartışmalı olduğu bildirilmiştir.

Deri ve yaşlanma

Deri, vücudun iç ortamını su kaybından ve patojenlerden, kimyasal ve fiziksel stres ile UV ışınları gibi zararlı ajanlardan korumak için bir bariyer görevi gören kompleks bir organdır. Deride iki büyük tabaka olan dermis ve epidermis ile bunların altında adipositler açısından zengin olan hipodermis bulunur. Epidermisin, dermisle buluştuğu yerde bölünebilen hücreler olan keratinositler yer alır. Bu hücreler epidermisten yukarı doğru göç eder ve kornifikasyon olarak adlandırılan keratinizasyon süreciyle farklılaşır. Epidermisin en üst tabakası olan *stratum corneum* ise keratin ve lipitler açısından zengin bir matrikse gömülü bir bariyer oluşturur. Keratin, disülfit köprüleri bakımından zengin bir proteindir. Dermatofitler olarak bilinen ve çeşitli deri hastalıklarına neden olan mantarlar tarafından hasara

38 Sacca, S. C., Roszkowska, A. M., & Izzotti, A. (2013). Environmental light and endogenous antioxidants as the main determinants of non-cancer ocular diseases. *Mutation Research*, *752*(2), 153-171.

uğratılır. Bir nedenle cildin yaralanmasını halinde keratinositler hücre çoğalmasının düzenlenmesinde rol oynayan NADPH oksidaz etkisiyle düşük seviyelerde $O_2^{\bullet -}$ üretebilir. NADPH oksidazlar ayrıca derideki fibroblastlarda ve melanositlerde de bulunur. [39]

Reaktif türler deri hücrelerinde sürekli düşük seviyelerde oluşur ve paradoksal şekilde buradaki yararlı etkilere öncülük eder. Oksitlenmiş lipitler ile proteinler cilt yüzeyinde değişikliklere neden olurken, UV ışınlarının etkisi ile üretilen reaktif türler cildin yumuşaklığını korumak ve mantar enfeksiyonlarının gelişmesini önlemek üzere oksitlenmiş lipit hidroperoksit seviyelerini arttırır. Ayrıca, reaktif türler melanositler üzerinde hem pigmentasyonu hem de depigmentasyonu artıran paradoksal etki gösterir. Nitrik oksit ise kan akımı, saç büyümesi ve yara iyileşmesinin düzenlenmesi gibi önemli süreçlerde rol alır. Kan damarlarında nitrik oksit sentezinden sorumlu enzim eNOS iken, keratinositlerde ve melanositlerde nNOS ve inflamasyon sırasında iNOS enzimleri görev alır. Nitrik oksit ayrıca derinin UV'ye maruz kalması sırasında enzimatik olmayan yollarla da üretilebilir. [40]

Derinin karşılaştığı temel problemler aşağıdaki gibidir:

- Akciğer ve kornea gibi, deri de doğrudan atmosferik O_2'e maruz kalır. Stratum corneum alt tabakalara O_2 difüzyonunu bir dereceye kadar engeller.
- Deri ısı değişiminde rol oynar ve ısıyı uzaklaştırmak için vazodilatasyon ile ısıyı korumak için yapılan vazokonstrüksiyon işlemleri sırasında normalden çok fazla veya çok az oksijene maruz kalabilir.
- Öte yandan deri çeşitli kaynaklardan gelen çok sayıda kimyasalla da savaşmak zorundadır. Bunlar hava kirliliği, deodorantlardaki terlemeyi önleyici kimyasallar ve alüminyum tuzları, güneş kremleri, losyonlar, kozmetikler, sabunlar, duş jelleri, şampuanlar, yağlardaki deri üzerine uygulanan kimyasallar, organik peroksitleri içeren endüstriyel kimyasallar, klor, çözünmüş metal iyonları gibi suyla taşınan toksinler ve ter içinde bulunan kimyasallardır.

Deri singlet O_2, $OH^{\bullet}$, H_2O_2 ve diğer reaktif türlerden kaynaklanan foto-oksidatif hasarla sürekli karşılaşır. Bazı kozmetiklerde, oral

39 Stanley, A., Hynes, A., Brakebusch, C., & Quondamatteo, F. (2012). Rho GTPases and Nox dependent ROS production in skin. Is there a connection? *Histology and Histopathology*, *27*(11), 1395-1406. https://doi.org/10.14670/hh-27.1395.

40 Suschek, C. V., Opländer, C., & van Faassen, E. E. (2010). Non-enzymatic NO production in human skin: effect of UVA on cutaneous NO stores. *Nitric Oxide*, *22*(2), 120-135.

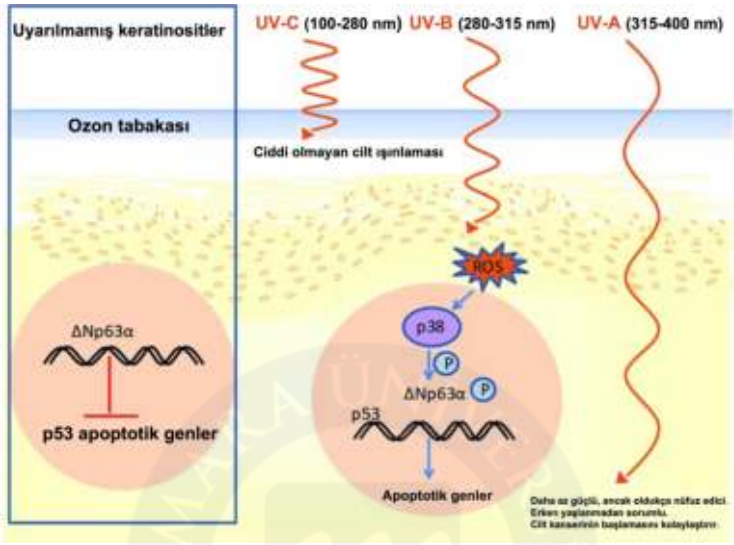
yolla alınan sakinleştirici fenotiyazinler gibi deriye ulaşan ilaçlarda ve florokinolon, tetrasiklin gibi antibiyotiklerde fotosensitizanlar olarak adlandırılan maddeler bulunur. Dövmelerde kullanılan çeşitli boyalar da cilde zarar verebilecek fotosensitizanları içerir.

Derinin karşılaştığı en büyük problem ışığa, özellikle de UV ışınına maruz kalmaktır. Güneş ışınlarına maruziyet insanlarda cilt yaşlanmasının en önemli sebeplerindendir. Ayrıca cilt kanserlerinin başlıca risk faktörüdür. Foto-yaşlanmaya ciltte kırışıklık ve elastikiyet kaybı, deri dayanıklılığında azalma, protein oksidasyon ürünlerinin birikimi, lipitlerin oksidasyonu ve yara iyileşmesinin gecikmesi eşlik eder.

Güneş ışınlarındaki UV-A (320-400 nm) ve UV-B (290-320 nm) ışınları yeryüzüne ulaşırken, daha zararlı olan UV-C (100-290 nm) ozon tabakası tarafından filtrelenir. Bu tabakanın hasara uğraması sonucu daha fazla UV-B dünyaya ulaşır ve balıklar, amfibiler ve karasal organizmalar üzerindeki foto-kimyasal hasarı arttırır. Cilde ulaşan UV-B ışınının %10'u dermise geçmek için epidermise penetre olabilir. UV-A ile eşit derecede maruz kalındığı durumda, UV-B cilde daha çok zarar verir. Ancak, UV-A'nın daha derinlere nüfuzu ve güneş ışığındaki miktarının çok fazla olması, maruz kalınan hasara önemli katkı sağlar. UV ışınları, X-ışınlarının ve gama ışınlarının aksine, su moleküllerini parçalamak için yeterli enerjiye sahip değildir. Bununla birlikte, ortamda H_2O_2 mevcut ise, UV-B ışınları $OH^{\bullet}$ oluşumuna neden olarak doğrudan DNA'ya zarar verebilir. UV-A ise DNA'ya çok az zarar verir, ancak DNA'daki 8-OH-dG seviyesini arttırabilir. Ultraviyole ışınları ayrıca ciltteki lipitlerin oksidasyonuna neden olur ve daha sonra da peroksitlerden akrolein ve HNE gibi aldehitlerin üretilmesi yoluyla DNA'ya zarar verip foto-yaşlanmayı hızlandırabilir. Bütün bu mekanizmaların yol açtığı DNA hasarı, UV kaynaklı kanserlere de neden olmaktadır. DNA onarım kusurları olan insanlar genellikle cilt kanserine daha yatkındır. Tümör baskılayıcı gen p53 mutasyonları cilt kanseri gelişiminde önemlidir. [41] Bu moleküldeki çift gen mutasyonlarının, iç organlara göre ciltte çok daha yaygın olması güneş ışınlarının rolünü ortaya koymaktadır. UV-A veya UV-B, cilt hücrelerinde çok çeşitli transkripsiyon faktörlerinin (örn. AP-1 ve NF-κB) aktivasyonuna yol açabilir. Böylece sitokin ve iNOS seviyeleri artar, $NO^{\bullet}$ üretimi ve $ONOO^{-}$ oluşumu gerçekleşir. [42]

41 Bulteau, A.-L., Moreau, M., Nizard, C., & Friguet, B. (2002). Impairment of proteasome function upon UVA-and UVB-irradiation of human keratinocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, *32*(11), 1157-1170.

42 Suschek, C. V., Opländer, C., & van Faassen, E. E. (2010). Non-enzymatic NO production in human skin: effect of UVA on cutaneous NO stores. *Nitric Oxide*, *22*(2), 120-135.



Şekil 4. UV A-B-C ışınlarının deri üzerine etkileri [43]

Ozona maruz kalmak, stratum corneumdaki proteinlerin ve lipidlerin oksidasyonuna neden olurken, aşırı $NO^{\bullet}_2$ üretimi de bunları nitratlayabilir. Stratum corneumdaki sisteinden zengin proteinler ve diğer antioksidanlar, bir dereceye kadar bu toksik gazları engelleyebilir. Bu şekilde daha derinde yer alan cilt hücreleri korunabilir, ancak bu süreçte proteinler zarar görür. Sigara kullanımı da oksidatif hasar ile matriks metallo-proteinazların aktivasyonunu hızlandırarak cilt yaşlanmasını artırır. Kollajen ve diğer proteinlerin glikasyonu da cilde zarar verebilir.

Cilt yaşlanması UV-B'nin neden olduğu oksidatif stres aracılığıyla başlar. Bağışıklık hücreleri iNOS, IL-6, IL-1β ve TNF-α gibi inflamatuvar sitokinleri üretir. Cildin UV radyasyonuna maruz kalmasını takiben, buradaki bağışıklık hücreleri inflamatuvar sitokinleri serbestleştirerek kronik inflamasyon sürecini başlatır. Aşırı ROS seviyeleri MAPK-sinyal yolunu aktive eder, bu kaskat inflamatuvar proteinlerin AP-1 ve NFκB aracılı ekspresyonunu tetikleyerek inflamasyonu daha da indükler ve sonuç kanser gelişimine kadar ilerleyebilir. Etkili bir topikal antioksidan kullanımı, UV ile indüklenen serbest radikal oluşumunu azaltarak cildin foto-yaşlanmasını önleyebilir ya da geciktirebilir. Derideki antioksidan sistem yaşlanma, foto-yaşlanma, inflamasyon, yara iyileşmesi, tümör oluşumu gibi pek çok süreçte rol alır. İnsan derisindeki antioksidanlar birbirinden bağımsız olmakla birlikte iş birliği halinde çalışırlar. Askorbik asit, tokoferoller ve polifenoller gibi

43 Costanzo, A., Fausti, F., Spallone, G., Moretti, F., Narcisi, A., & Botti, E. (2015). Programmed cell death in the skin. *International Journal of Developmental Biology*, *59*(1-2-3), 73-78.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

bilinen antioksidanlarla tedavi organizmanın direncini artırır, cildin yaşlanmasını ve inflamasyon gelişimini önler. Deri hasarı sırasında reaktif türlerin seviyelerinin yükselmesinin temel nedeni, istilacı mikroorganizmaların uzaklaştırılması ve imhası için ve/veya hasarlı doku yapılarının ortamdan temizlenmesi sırasında gerçekleşen reaksiyonlardır.

UV ışınlarına karşı en iyi çözüm onlardan korunmaktır. Ancak, kullanılan güneş kremlerinin bazı bileşenleri (örn. titanyum dioksit), $^1O_2$ ve $OH^\bullet$ üretebilir. Tokoferoller, C vitamininin askorbil palmitat gibi hidrofobik esterleri ve flavonoidler kremlere koruyucu madde olarak eklenmekle birlikte, bunların cildin derinlerine nüfuz etme yetenekleri sınırlıdır. Bu yüzden diyetle alınan antioksidanlar daha etkili olabilir. Güneş ışınları UV-A, UV-B ve görünür aralıklar arasında değişen geniş bir absorbans spektrumuna sahip olan melanin sentezini indükler. Melanin epidermiste ve saç foliküllerinde bulunan melanositlerde yapılır, daha sonra keratinositlere ve saça aktarılır. Başlıca iki melanin tipi vardır: Ömelanin, elips şeklindeki melanozomlarda yapılır ve siyah, kahverengi saç ve deri renginden sorumludur. Feomelanin, küre şeklindeki melanozomlarda yapılır ve sarı, kırmızı saç ve deri renginden sorumludur. Melanin tiplerinden ömelanin foto-hasara karşı koruyucudur, ancak bu koruyuculuk feomelanin için her zaman geçerli değildir. Keratinositlerde ve fibroblastlarda yüksek seviyelerde GSH, SOD, GPx, katalaz, glikoksalazlar ve peroksiredoksinler gibi antioksidan enzimler ile α-tokoferol ve askorbat bulunur. Deride ayrıca DNA onarım enzimleri ve proteazom sistemi gibi çeşitli onarım mekanizmaları vardır. [44]

Cildin kesiklere, sıyrıklara ve yanıklara maruz kalmasıyla birlikte hücre ölümü gerçekleşirken aynı zamanda eritrositlerin parçalanması sonucu çevreye hem ve demir salınır. Böylece yara çevresinde prooksidan bir ortam oluşur. Bu durum yalnızca kötü sonuçlar doğurmaz. Oluşan $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 gibi reaktif ürünler yara iyileşmesinde önemli rol oynar. Öncelikle aktif fagositler inflamasyonu hafifletmek için reaktif türleri üretir. İkincil olarak da ortamda biriken hem, olaya fagositlerin katılımında yardımcı olur. Yaralanmadan sonra kanın pıhtılaşma süreci başlar ve $O_2^{\bullet-}$ ile H_2O_2 içeren trombositler ortama toplanır. Pıhtılaşma sırasında salınan trombin, vasküler endoteldeki NADPH oksidaz aktivitesini artırabilir. Reaktif türler ayrıca keratinosit ve fibroblast proliferasyonunu da teşvik eder; keratinositlerdeki VEGF üretimini artırarak iyileşmeye yardımcı

44 Bulteau, A.-L., Moreau, M., Nizard, C., & Friguet, B. (2002). Impairment of proteasome function upon UVA-and UVB-irradiation of human keratinocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, *32*(11), 1157-1170.

olabilir. [45] Yaralanma sonrası iyileşme sürecinde antioksidanların rolü yeni ve ileri araştırmalarla aydınlatılması gereken konulardandır. Örneğin, diyabetik farelerde yara iyileşmesi daha yavaş olmasına rağmen, eNOS veya MnSOD kodlayan genlerle yapılan tedavi iyileşmeyi hızlandırmaktadır. Bu durum, vücuttaki $NO^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$ oranının ne derece önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. [46]

İskelet kası ve egzersiz

İskelet kası plastisite yeteneği olan ve egzersiz, antrenman gibi uyaranlara ileri derecede yanıt verebilen bir dokudur. Dayanıklılık antrenmanı sırasında tekrarlanan kas kasılmaları mitokondriyal biyogenezde aktivasyon, lif tipinde transformasyon ve anjiyogenez gibi çeşitli fenotipik ve fizyolojik değişikliklere öncülük eder. Bütün bu değişimler kasın aerobik metabolizmasını etkiler ve yorgunluğa karşı direncini arttırır.

Sedanter farelerde, damar endotelinde NADPH oksidaza bağımlı $O_2^{\bullet-}$ üretiminin ve buna bağlı olarak da vasküler disfonksiyonun arttığı bulunmuştur. Bununla birlikte, kasları yeterince kullanmamaya bağlı gelişen kas atrofisinin sonuçları daha dramatiktir. Fiziksel hareketlerin kısıtlanmasıyla meydana gelen kas yıkımına artmış protein karbonil bileşikleri, nükleik asitlerde oksidatif hasar ve $OH^{\bullet}$ üretimi eşlik eder. Oksidatif hasar insanlarda da kasları kullanmamaya bağlı atrofilerde ve ileri yaşlardaki kas yıkımında (sarkopeni) rol oynar. Kas liflerinde farklı uyaranlarla aktive olan birkaç serbest radikal üretim merkezi tanımlanmıştır. Bunlar arasında mitokondriler, NOX'lar, fosfolipaz A_2, ksantin oksidaz ve lipooksijenaz bulunur. Uzun yıllar boyunca mitokondriler hücrede reaktif türlerin ana üretim merkezi (%1-4) olarak kabul edilmesine rağmen, güncel veriler mitokondrideki üretimin çok daha az (%0.15) olduğunu göstermektedir. Reaktif türlerin kas hücresinin mitokondri iç zarındaki solunum zincirinden kaynaklanan elektron sızıntısıyla üretildiği düşünülmektedir. [47]

NADPH oksidazlar: NOX ailesi üyelerinin hem istirahatte hem de kasılma aktivitesi sırasında iskelet kasındaki süperoksit radikali üretimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Üretilen reaktif türler,

45 Sen, C. K., & Roy, S. (2008). Redox signals in wound healing. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1780*(11), 1348-1361.

46 Luo, J.-D., Wang, Y.-Y., Fu, W.-L., Wu, J., & Chen, A. F. (2004). Gene therapy of endothelial nitric oxide synthase and manganese superoxide dismutase restores delayed wound healing in type 1 diabetic mice. *Circulation*, *110*(16), 2484-2493.

47 Nikolaidis, M. G., Kyparos, A., Spanou, C., Paschalis, V., Theodorou, A. A., & Vrabas, I. S. (2012). Redox biology of exercise: an integrative and comparative consideration of some overlooked issues. *The Journal of Experimental Biology*, *215*(10), 1615-1625.

ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

hücre içi Ca^{2+} salımına yol açan ryanodin reseptörlerini aktive eder. Yakın zamanda, insülinin NOX aktivasyonu yoluyla serbest radikal oluşumunu indüklediği ve bunun nozitol trifosfat reseptörlerinin aracılık ettiği hücre içi Ca^{2+} artışı için gerekli olduğu bildirilmiştir.

Ksantin oksidaz: İskelet kasındaki ksantin oksidaz (XO) hem sitozolde hem de kaslarla yakın ilişkide olan endotel hücrelerinde bulunur. Kas kasılmasıyla artan XO aktivitesi lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu, kas hasarı ve ödeme yol açar. Çok miktarda ATP'nin tüketildiği yoğun egzersiz sırasında hipoksantin ve ksantin seviyeleri yükselir. Üretilen reaktif türler, PGC-1α yoluyla egzersize bağlı mitokondriyal biyogenezin düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

Fosfolipaz A_2: Fosfolipaz A_2 (PLA2) ailesi enzimleri, kas kasılması sırasında hücre içi ve hücre dışı serbest radikal artışına katkıda bulunur. İnsan iskelet kasının Ca^{2+} duyarlı veya duyarlı olmayan yaklaşık 15 farklı PLA2 izoformu içerdiği bilinmektedir. Ca^{2+} duyarlı olmayan enzimler istirahat sırasında, Ca^{2+} duyarlı enzimler ise kasılma sırasında serbest radikal üretir.

Egzersiz ciddi ölçüde kas hasarına neden olur. [48] Daha önceleri 1980'li yıllarda yapılan preliminer çalışmalarda, aşırı fiziksel aktivitenin mitokondriyal solunumu hasara uğrattığı, sarkoplazmik retikulumun yapısal bütünlüğünü bozduğu, lipit peroksidasyonunu artırdığı bildirilmişti. Güncel araştırmalarda ise, düzenli yapılan dayanıklılık antrenmanının iskelet kasında GPx, glutatyon redüktaz, katalaz ve SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarak oksidatif hasara karşı koruma sağladığı anlaşılmıştır. [49] İnsanlarda, özellikle sedanter bireylerde, şiddetli ve uzun süreli egzersiz kas hasarına neden olur ve miyoglobin, kreatin kinaz gibi kas enzimlerini dolaşıma salar. Maraton koşusu gibi uzun süreli yorucu egzersiz dolaşımdaki nötrofillerin sayısını arttırır. IL-1, IL-6, TNF-α ve CRP seviyelerinde artışa yol açarak inflamasyonun akut yanıtına neden olur. [50] İskelet kası, orta şiddette yapılan egzersize hızlıca adapte olabilme yeteneğine sahiptir. Kas kasılmasıyla meydana gelen sıcaklık artışı, ısı şoku tepkisini tetikleyerek SOD, GPx1 ve katalaz seviyelerini yükseltebilir. Orta şiddette ve düzenli yapılan egzersizin bir başka önemli yararı antioksidan enzimlerin

48 Steinbacher, P., & Eckl, P. (2015). Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules*, *5*(2), 356-377.

49 Witt, E. H., Reznick, A. Z., Viguie, C. A., Starke-Reed, P., & Packer, L. (1992). Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *Journal of Nutrition*, *122*(3 Suppl), 766-773. https://doi.org/10.1093/jn/122.suppl_3.766.

50 Smith, J., Telford, R., Mason, I., & Weidemann, M. (1990). Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. *International Journal of Sports Medicine*, *11*(03), 179-187.

ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

ve eNOS üzerinden NO sentezinin uyarılması ve bu yolla yaşlılarda vasküler yapıları korunmasıdır. [51]

Egzersiz sonrası oksidatif hasar belirteçlerinin seviyelerinde gözlenen önemli farkların nedeni deneklerde uygulanan egzersiz yoğunluğunun ve çeşidinin farklı olmasıdır. Ayrıca kaslarda meydana gelen oksidatif hasar her zaman plazmaya yansımayabilir. Uzun süreli şiddetli egzersiz plazma hacmini değiştirir. Plazmada antioksidanların veya oksidatif hasar belirteçlerinin değişimini değerlendirirken bu durum dikkate alınmalıdır. Ayrıca, yaşlılar oksidatif hasara daha yatkındır.

İskelet kasının serbest radikallere maruziyeti, egzersizin süresine ve bireyin aktivite düzeyine bağlı olarak, yararlı veya zararlı etkilere sebep olabilir. Yorgunluk seviyesine ulaşmamış bir kasta, düşük seviyedeki serbest radikal üretimi kas kuvveti üretmek için gereklidir. Yoğun egzersiz sonrası güçlü bir şekilde artan serbest radikal üretimi, egzersiz düzenli olarak yapıldığı takdirde kas hücrelerinin adaptasyonuna yol açar. Sedanter kişilerde ise tek seferde yapılan şiddetli akut egzersizin oksidatif hasara neden olduğu kesin olarak bilinmektedir. Buna karşılık düzenli egzersiz yapan kişilerde oksidatif strese karşı gelişen adaptasyon sonucu zararlı etkiler gözlenmez.

Serbest radikaller kasılma kinetiği üzerindeki etkilerinin yanı sıra çeşitli sinyal yollarını da düzenler. Kronik oksidatif stres ise, protein yıkımı ve kas atrofisinin şiddetlenmesine neden olabilir. Aşırı radikal üretimi NF-κB ve FoxO yolağının sürekli aktivasyonuna neden olarak kasa spesifik E3 ubikitin ligaz sisteminden atrogin-1 ve MuRF-1'i aktive eder. [52] Kas aktivitesi hem serbest radikalleri hem de mitokondriyal MnSOD, sitozolik Cu/Zn-SOD, GPX, CAT, GSH gibi antioksidanların savunma gücünü arttırır. Egzersiz sırasında veya sonrasında artan serbest radikallerin metabolizması sonrasında önemli miktarda GSH, GSSG'ye oksitlenir. Daha sonra, hücre içi bileşenlerin hasar görmesini önlemek için GSSG, GSH redüktaz aracılığıyla GSH'ye indirgenir. GSH redüktaz aktivasyonu GSH/GSSG oranını sabit tutarak homeostazı sağlar. Antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve GPX, egzersiz sırasında üretilen serbest radikallere karşı birincil savunmadır. [53] Antioksidan enzim seviyeleri

51 Gleeson, M., Bishop, N. C., Stensel, D. J., Lindley, M. R., Mastana, S. S., & Nimmo, M. A. (2011). The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews Immunology*, *11*(9), 607-615.

52 Dodd, S. L., Gagnon, B. J., Senf, S. M., Hain, B. A., & Judge, A. R. (2010). Ros-mediated activation of NF-κB and Foxo during muscle disuse. *Muscle Nerve*, *41*(1), 110-113.

53 Radak, Z., Asano, K., Inoue, M., Kizaki, T., Oh-Ishi, S., Suzuki, K., Taniguchi, N., & Ohno, H. (1995). Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *Journal of Applied Physiology*, *79*(1), 129-135.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

kas lifi tiplerine göre önemli ölçüde değişir. Tip I kas liflerindeki antioksidan enzimlerin aktivitesi Tip IIA ve Tip IIB liflerinden daha yüksektir. Egzersize adaptasyon sürecinde, antioksidan enzim seviyelerinde ve antioksidan aktivitede bir artış olduğu bulunmuştur. Tek sefer yapılan akut egzersiz sonrasında bile iskelet kasındaki SOD aktivitesinin arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Cu/Zn-SOD enzim aktivitesi üç gün içinde yavaş yavaş istirahatteki başlangıç seviyelerine dönerken, Mn-SOD aktivitesi ve protein içeriği egzersiz sonrası dönemde de artmaya devam eder.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

Ölçüm Yöntemleri

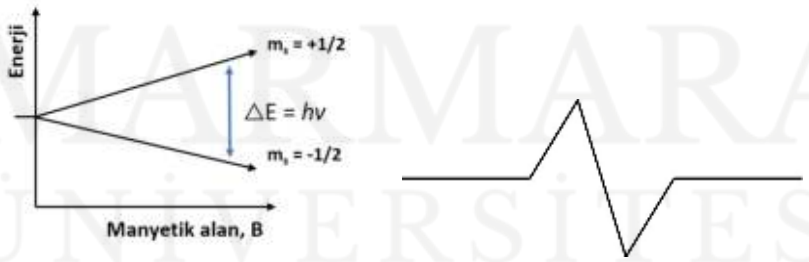
Ülkügül Güven*
A. Süha Yalçın*

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

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

Elektron paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopisi

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



Şekil 1. Enerji diyagramı ile birinci türev spektrumu

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

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

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



Şekil 2. EPR Spektroskopisi ölçüm sistemi [2]

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

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

2 Wikipedia. (25.09.2022). *Electron paramagnetic resonance*. Retrieved 24.10.2022 from https://en.wikipedia.org/wiki/Electron_paramagnetic_resonance.

3 Haywood, R. (2013). Spin-Trapping: Theory and Applications. In G. C. K. Roberts (Ed.), *Encyclopedia of Biophysics* (pp. 2447-2453). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_579.

4 Torricella, F., Pierro, A., Mileo, E., Belle, V., & Bonucci, A. (2021). Nitroxide spin labels and EPR spectroscopy: A powerful association for protein dynamics studies. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, *1869*(7), 140653.

ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

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

Nitroksit serbest radikallerini kullanarak ortam hakkında bilgi sahibi olma yöntemine spin etiketleme (*spin labeling*) ve bu amaçla kullanılan radikallere de spin etiketi denmektedir. Spin etiketleri, farklı bir molekül ile bağlanabilme özelliği olan eşleşmemiş bir elektrona sahip ve kararlı nitroksit radikalleridir. Nitroksit radikalindeki eşleşmemiş elektronun manyetik rezonans sinyali EPR spektroskopisi ile tespit edilebilmektedir. Spin etiketlemesi özellikle proteinlerin ve biyolojik membranların araştırılmasında kullanılan önemli bir tekniktir. Spin etiketleri beş veya altı üyeli hibrid halkalardan meydana gelir. Yaygın olarak kullanılan spin etiketleri farklı R gruplarına sahip olan piperidinden türetilmiştir: 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloksi, 2,2,6,6-tetrametilpiperidin 1-oksil (TEMPO, R=H), 2,2,6,6,-tetrametil-4-piperidon-1-oksil (TEMPON, R=oxo), 4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin 1-oksil (TEMPOL, R=OH) ve 4-amino-2,2,6 6-tetrametil piperidin-1-oksil (4-amino-TEMPO, R=NH2). Diğer spin etiketleri olan 3 – karbamoil-2,2,5,5-tetra-metil-3-pirolin-1-iloksil (CTPO) ve (1-oksil-2,2,5,5-tetrametil-Δ3-pirolin-3 – metil) metansiyosülfonat ise yine farklı R gruplarına sahip prolidin yapısından türetilmiştir.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Hidroksil radikali ölçüm yöntemleri

Canlı ortamlarda hidroksil radikal üretimi önemlidir ve bu amaçla kullanılabilecek yöntemlere çok ihtiyaç vardır. Aromatik hidroksilasyon yönteminde aromatik bir bileşik olan benzenin hidroksil radikali ile reaksiyona girmesi sonucunda önce hidroksisikloheksadienil oluşur. [5] Oluşan bu radikal önce dimerizasyona uğrar ve ardından H_2O açığa çıkararak bifenile dönüşür. Alternatif olarak da bir fenol ve benzen karışımı vermek üzere orantısızlaştırma reaksiyonuna girebilir. Hidroksilasyon ürünlerinin belirlenmesinde gaz-sıvı kromatografisi ayırım sonrasında, ya bir elektron yakalama detektörü (ECD) ile veya kütle spektroskopisi (MS) ile birleştirilerek kullanılabilir. Ancak, bu yöntem ürünlerin uçucu bir materyale dönüştürülmesini gerektirdiğinden ürün kaybına neden olabilmektedir. Bu nedenle, hidroksilasyon ürünlerinin ölçümünde daha yaygın olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmaktadır. Biyolojik sistemlerde ise ölçüm için toksik olmayan bir aromatik belirtece ihtiyaç duyulur. Salisilat (2-hidroksibenzoat) ve fenilalanin bu amaçla kullanılan aromatik bileşiklerdir. Hidroksil radikalinin salisilat üzerine saldırmasıyla, dekarboksilasyon ürünü olan katekol ile birlikte iki adet dihidroksillenmiş ürün (2,3 – ve 2,5-dihidroksibenzoat) üretilir. Salisilat için alternatif olan fenilalanin ise orto, meta ve para-tirozinleri vermek üzere hidroksillenmektedir.

Hidroksil radikalinin ölçümünde kullanılan diğer yöntemler şunlardır: [6]

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

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

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

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

Süperoksit radikalinin ölçümü

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

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

$$\text{Sit } c - Fe^{+3} + O_2^{\bullet -} \rightarrow O_2 + \text{Sit } c - Fe^{+2}$$

- Birçok madde sitokrom c'yi indirgeyebilme özelliğine sahiptir. Doku ekstraktlarında sitokrom c'yi indirgeyebilen askorbat ve GSH gibi bileşiklerin yanı sıra, enzimatik olarak da indirgeyen hücresel redüktazlar bulunur. Bu nedenle reaksiyonun $O_2^{\bullet -}$ için özgüllüğünün, sitokrom c indirgenmesinin SOD ile inhibisyonunun derecesi belirlenerek gösterilmesi gereklidir.

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

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

- İndirgenmiş sitokrom c daha sonra sitokrom oksidazlar, peroksidazlar, H_2O_2 ve $ONOO^-$ gibi birçok oksidan ile yeniden yükselgenebilir. Bu şekilde yeniden oksidasyonu sitokrom c indirgenme oranlarını azaltarak $O_2^{\bullet -}$ oluşumunu etkiler. Ancak ortama enzim inhibitörlerinin veya radikal temizleyicilerinin (örneğin H_2O_2 için katalaz ve $ONOO^-$ için ürat) ilavesiyle bu durum engellenebilir.
- Sitozolde ve mitokondride bulunan bir enzim olan akonitaz, sitratın izositrata dönüşümünü katalize etmektedir. Süperoksit radikali $[4Fe–4S]^{2+}$ akonitaz kümesindeki demiri geri dönüşümlü olarak ayırır ve enzim aktivitesini inhibe eder. Akonitaz enziminin inhibisyonunu temel alan ölçüm yöntemi biyolojik etkileri göstermek açısından önemlidir.
- Dokuda süperoksit radikalini saptamak için histokimyasal yöntemler de kullanılabilir. Örneğin, tetrazolyum tuzları ile perfüzyon, formazan çökelmesine yol açarak dokudaki süperoksit üretim bölgelerinin mikroskopik olarak gözlenmesini sağlar. Bir diğer yöntemde diaminobenzidin (DAB) çözünmeyen bir ürüne oksitlenerek süperoksit radikali saptanabilir. Bunun için önce doku veya organ DAB ve Mn^{2+} iyonları ile perfüze edilir. Ortamdaki süperoksitin etkisiyle Mn^{2+} oksitlenir. Bu arada oluşan Mn^{3+} de DAB'i okside eder. [9]

Hidrojen peroksit ölçümü

Hidrojen peroksitin ölçümü için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. [10] Ancak ölçüm yöntemlerinin biyolojik sistemlerde yararlı olabilmesi için yeterli duyarlılıkta olması gerekir. Çünkü aktifleştirilmiş fagositler hariç hücrelerde ve organellerde üretilen H_2O_2 miktarı nMol konsantrasyon aralığındadır.

- Hidrojen peroksitin saptanması için yaygın olarak kullanılan yöntemlerde bayır turbu peroksidazı (*horseradish peroxidase,* HRP) kullanılır. Bu reaksiyonlarda H_2O_2 varlığında kullanılan hidrojen donörleri oksitlenir. Hidrojen peroksit miktarı, skopoletin veya resorufin gibi başlangıçta floresans veren belirteçlerin floresansındaki azalmanın takibiyle ya da diasetil diklorofluoresin, p-hidroksifenilasetat, homovanillik asit (3-metoksi-4-hidroksifenilasetik asit), N-asetil-3,7 dihidroksi fenoksazin gibi önceden floresan olmayan

9 Steinbeck, M., Khan, A., Appel Jr, W., & Karnovsky, M. (1993). The DAB-Mn++ cytochemical method revisited: validation of specificity for superoxide. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *41*(11), 1659-1667.

10 Rhee, S. G., Chang, T.-S., Jeong, W., & Kang, D. (2010). Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Molecular Cell*, *29*(6), 539-549.

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

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

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

mevcut olduğunda, eksitasyon ve emisyon spektrumları oxyR'nin oksidasyonundan kaynaklı HyPer'de konformasyonel değişikliklere neden olur. [12] HyPer H_2O_2 için spesifik bir belirteçtir. Ancak floresansı pH'dan etkilenebilmektedir. Benzer bir H_2O_2 belirteci maya kaynaklı tiyol peroksidaz olan Orp1'in roGFP2 ile birleştirilmesiyle üretilmiştir.

Nitrik oksit ölçümü

Nitrik oksit renksiz ve toksik bir gazdır. Serbest radikal yapısındadır ve yarı ömrü 20-30 saniyedir. Birçok hastalıkla ilişkilendirildiğinden varlığının belirlenmesi ve miktarının tayin edilmesi önemlidir. Çok düşük miktarlarda oluşması ve hızlıca moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi dışında, sulu ortamda bir elektron transferi ile önce nitrosonyum katyonuna (NO^+) sonra da nitrite (NO_2^-) dönüşür.

$$NO \rightarrow NO^+ \rightarrow HONO \rightarrow NO_2^-$$

Nitrik oksit N_2O_3 oluşturmak üzere oksitlenebilir. Ayrıca $ONOO^-$ oluşturmak üzere $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyona girebilir. Bu reaktif azot türlerinin tümü, çeşitli şekillerde gerçekleştirilen NO_2^- ölçümlerine etki edebilir. Örneğin aerobik koşullar altında NO'in oksidasyonuyla NO_2^- oluştururken, $ONOO^-$ parçalanması nitrat (NO_3^-) üretecektir. Bu yüzden biyolojik sistemlerde üretilen toplam NO miktarını belirlemek üzere hem NO_2^- hem de NO_3^- ölçümü yapılmalıdır. [13]

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

- **Hemoglobin oksidasyonu:** Bu yöntem, oksihemoglobin (HbO_2) ile NO'nun reaksiyona girmesi ve sonrasında methemoglobin (metHb) ile nitrat (NO_3^-) oluşmasına dayanır. Yöntemin doğruluğunu etkileyen birkaç kritik unsur vardır. İlk olarak, deney sonuçları hemoglobin konsantrasyonundaki değişimlerden etkilenebilir. İkincisi, metHb oluşumunun NO ile ilişkilendirilebilmesi için ortamda diğer oksidanların olmaması gerekir. Üçüncüsü, ölçüm sırasında ortamın pH'sı

12 Chen, H., Xu, G., Zhao, Y., Tian, B., Lu, H., Yu, X., Xu, Z., Ying, N., Hu, S., & Hua, Y. (2008). A novel OxyR sensor and regulator of hydrogen peroxide stress with one cysteine residue in Deinococcus radiodurans. *PloS one*, *3*(2), e1602.

13 Hunter, R. A., Storm, W. L., Coneski, P. N., & Schoenfisch, M. H. (2013). Inaccuracies of nitric oxide measurement methods in biological media. *Analytical Chemistry*, *85*(3), 1957-1963.

14 Bryan, N. S., & Grisham, M. B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, *43*(5), 645-657.

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

- **Işık emisyonu:** Bu yöntem, NO'nun ozon (O_3) ile reaksiyona girmesi sonucunda oluşan ve yayılan ışığın spektroskopik olarak incelenmesine dayanmaktadır. Yüksek derecede hassas dedektöre sahip NO analizörünün kullanıldığı bir direkt ölçüm yöntemidir. Hassas bir yöntem olmakla birlikte sadece gaz fazındaki NO ölçümleri için kullanılır. Yöntemde önce NO ile O_3 reaksiyona girer ve uyarılmış fazdaki azot dioksiti (NO_2) oluşturur. Oluşan NO_2 temel hal fazına döndükçe ortama ışık yayılır.

$$NO + O_3 \rightarrow O_2 + NO_2 \text{ (uyarılmış)}$$
$$\rightarrow NO_2 \text{ (temel hal)} + l$$

- **Griess reaksiyonu:** Yöntemde NO oksidasyon ürünü olan nitrit, Griess reaktifleri olan sülfanilamit ve N-(1-naftil)-etilendiamin hidroklorür (NED) ile etkileşir. Oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak ölçülür. Yöntemin temeli asidik ortamda nitritin primer bir aromatik amin olan sülfanilamit ile diazotizasyonu ve NED ile mor renkli bir azo ürün oluşturması esasına dayanmaktadır. NO oksidasyon ürünlerinin toplamının ölçümü için NADH bağımlı nitrat redüktaz enzimi etkisiyle nitratın (NO_3^-) nitrite (NO_2^-) indirgenmesi gereklidir.

Peroksinitrit ölçümü

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

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

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

yerleşir ve bir uyarı sonrasında oksidasyona uğrayarak oksijen radikalleri ve peroksinitritle reaksiyona girer, daha sonra güçlü floresan özellikteki rodamine indirgenir. Rodaminin 488 nm'de yaydığı floresan ışık da akım sitometresiyle ölçülebilir. Dihidrorodaminin oksidasyonu metal iyonları gerektirmez ve $OH^{\bullet}$ temizleyicileri tarafından inhibe edilmez. Ancak $ONOO^-$ ile reaksiyona giren bikarbonat (HCO_3) ile inhibe edilebilir.

- **Protein nitrasyonu:** Peroksinitrit tirozin, triptofan ve fenilalanin gibi aromatik bileşiklerin nitrasyonuna yol açar. Nitrasyonu Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, HRP gibi enzimler ile bazı geçiş metal iyonları hızlandırır. Proteinlerin tirozin kalıntıları da 3-nitrotirozin verecek şekilde nitratlanmaktadır. Son yıllarda, reaktif azot türleri aracılı vasküler hasar için proteinlerdeki 3-nitrotirozin türevlerinin ölçümü önemli bir belirteç olarak öne çıkmıştır. Tirozin peroksinitrit ile doğrudan reaksiyona girmez, önce tirozil radikallerine oksitlenir. Daha sonra tirozil radikalleri $NO_2^{\bullet}$ ile reaksiyona girer. Tirozin nitrasyonu spektrofotometrik yöntemle ölçülmektedir. Ölçüm için LC-MS, GC-MS veya HPLC cihazları da kullanılabilir. [16]

Reaktif halojen türleri

Reaktif halojen türlerinden hipokloröz asit (HOCl) güçlü bir oksitleyici ve klorlayıcıdır. HOCl ölçümü için çeşitli yöntemler vardır. Fagositik vakuollerdeki ölçümler için yeşil floresan proteinin (GFP) söndürülmesine dayanan bir yöntem kullanılır. Bunun yanı sıra HOCl tarafından taurinin kloramine dönüştürülmesine dayanan bir yöntem de tanımlanmıştır. Kloramin katalizör olarak görev yapan iyodür (I^-) varlığında, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) temelli bir kromojene oksitlenerek ölçülür. Hipobromöz asit (HOBr) de taurin ile reaksiyona girer ve açığa çıkan bromamin TMB'yi oksitleyebilir. Ancak bu oksidasyonda I^- gerekmez, bu şekilde HOCl ve HOBr üretimleri birbirinden ayrılabilmektedir. Dihidrorodamin yönteminde ise, ortamda I^- mevcut ise taurin kloraminler tarafından rodamine oksitlenir. Protein yapısındaki tirozinin HOCl'e maruz bırakılması 3-klorotirozin ve 3,5-diklorotirozin gibi belirteçlerin üretimine yol açar. Ayrıca, nitril klorür (NO_2Cl) tirozine klor ekler. Nitratlanmış ve klorlanmış ürünlerin HPLC veya LC/MS ile eşzamanlı ölçümleri, $ONOO^-$ (nitrasyon), HOCl (klorlama) ve NO_2Cl'nin (hem nitrasyon hem klorlama) etkilerini ayırt etmede yararlı olmaktadır.

16 Batthyány, C., Bartesaghi, S., Mastrogiovanni, M., Lima, A., Demicheli, V., & Radi, R. (2017). Tyrosine-nitrated proteins: proteomic and bioanalytical aspects. *Antioxidants and Redox Signaling*, *26*(7), 313-328.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Singlet oksijen ölçümü

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

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

Kemilüminesans ve floresans görüntüleme

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

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

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

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

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

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

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

Kemogenetik uygulamaları

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

Canlı hücrelerde reaktif türlerin ölçümü

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

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

difüzyon kabiliyeti sayesinde hücre kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılır. [20] DCFH-DA hücre içi esterazlar tarafından enzimatik olarak DCFH'ye hidrolize edilir. DCFH-DA hücrelere girer ve çoğunlukla sitozolde birikir.

- Dihidrorodamin $OH^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet}$, $CO_3^{\bullet-}$ gibi bazı reaktif türleri tespit etmek için kullanılır. Ancak $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ve $NO^{\bullet}$ radikallerine zayıf cevap verir. HOCl tespitinde DCFH-DA'dan daha iyidir. Çeşitli reaktif türler, yaklaşık 500 nm'de dihidrorodamini uyarır ve yaklaşık 536 nm'de yüksek floresans veren rodamine dönüştürür. Fizyolojik pH'larda, rodamin bir lipofilik katyondur ve mitokondride birikme eğilimindedir. Yüksek seviyelerdeki rodamin, mitokondriyal singlet O_2 oluşumunu duyarlı hale getirebilir.
- Dihidroetidyum (DHE) güçlü bir kırmızı floresans oluşturur ve $O_2^{\bullet-}$ için bir belirteç olarak kullanılır. Ancak $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyonu oldukça yavaştır. Ayrıca diğer bazı reaktif oksijen türleri ve hemoproteinler DHE'yi oksitleyebilir. Hücrelerde DHE oksidasyonunun ana ürünü, 2-hidroksietidyuma çok benzer spektroskopik özellikler sergileyen etidyumdur.

Oksidatif stres ölçüm yöntemleri

Sağlıklı hücrelerde serbest radikaller antioksidanlarla dengelenirken çeşitli nedenlerle reaktif türlerin artması ve antioksidan sistemin yetersiz kalması oksidatif stresi meydana getirmektedir. Oksidatif stres altında hasara uğrayan makromoleküllerin analizi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. [21]

DNA hasarı

DNA serbest radikaller tarafından kolaylıkla hasara uğratılabilir. Reaktif türlerin DNA'ya saldırması, iplikçik kopması, deoksiriboz hasarı, pürin ve pirimidinlerin modifikasyonu, DNA-protein çapraz bağlantıları ve kümelenmiş lezyonlara neden olabilir. DNA hasarını ölçmek için çeşitli yöntemler mevcuttur. [22] DNA'daki oksidatif modifikasyonlardan başlıcası deoksiguanozin kalıntılarının hidroksilasyonu ile üretilen 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin

20 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*, 129878.

21 Palmieri, B., & Sblendorio, V. (2007). Oxidative stress tests: overview on reliability and use. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *11*(6), 383-399.

22 Guetens, G., Boeck, G. D., Highley, M., van Oosterom, A. T., & de Bruijn, E. A. (2002). Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, *39*(4-5), 331-457.

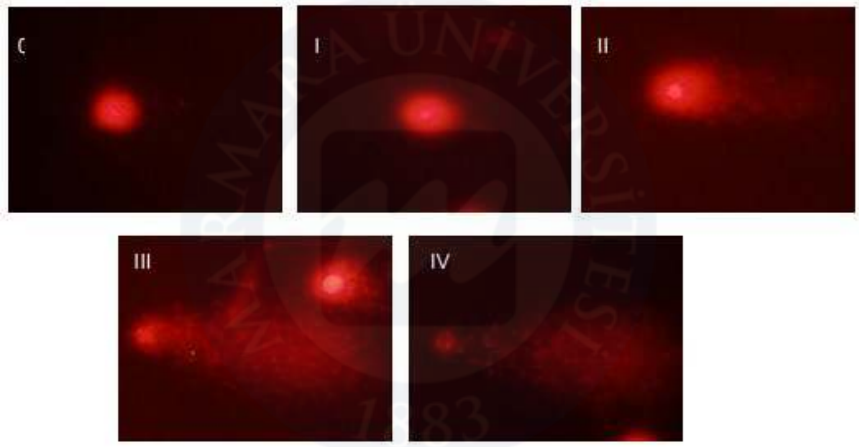
(8-OHdG) dir. DNA'da, $OH^{\bullet}$, $CO_3^{\bullet -}$ ve bazı $RO_2^{\bullet}$ radikalleri de dahil olmak üzere birçok reaktif tür tarafından oluşturulur. 8-OHdG kalıntıları vücuttaki enzimatik onarım sistemleri tarafından DNA'dan çıkarılabilir. Daha sonra kan dolaşımına geçer oradan da idrarla atılır. Bu nedenle, kanda veya idrardaki 8-OHdG seviyeleri, oksidatif DNA hasarının bir belirteci olarak ölçülebilir. Ölçümü sıklıkla bir elektrokimyasal dedektör (ECD) ile birleştirilmiş HPLC ile gerçekleşir. HPLC-ECD yöntemi, hassas bir yöntem olmasına rağmen maliyeti nedeniyle çok uygun değildir. Daha iyi bir yaklaşım sıvı veya gaz kromatografisine bağlı kütle spektrometresi yöntemleri ile birden fazla ürünü ölçmektir. Kütle spektrometrisi, çeşitli ürünleri ayırt etmenin yanı sıra, baz-baz ve baz-amino asit çapraz bağlantıları gibi diğer lezyonları da tespit edebilir. DNA hasarını ölçmek için kullanılan yöntemler arasında enzime bağlı immünosorban analizi (ELISA) ve immünohistokimyasal analizler yer alır.

DNA hasarını belirlemek için kullanılan diğer alternatif yöntemler şunlardır:

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

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

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



Şekil 3. Tek hücre jel elektroforez yöntemi ile görüntülenen hasara uğramış DNA yapıları [23]

Lipit peroksidasyonu

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

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

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

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

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

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

Protein oksidasyonu

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

Antioksidan kapasite ölçüm yöntemleri

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

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

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

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

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

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

- **ORAC (Oksijen radikali absorbans kapasitesi) yöntemi:** Gıdaların ve diğer kimyasal maddelerin antioksidan gücünü ölçmek için kullanılabilecek bir analizdir. Bu yöntem, serbest radikal oluşumuna ve serbest radikal tutucularının varlığında floresans şiddetindeki azalmanın ölçülmesine dayanır. Hedef molekül olarak beta-fikoeritrin ya da floresein kullanılmaktadır. Bu yöntemde standart olarak suda çözünür E vitamin analoğu olan Trolox kullanılır. ORAC değeri ne kadar yüksek olursa, örneğin antioksidan gücü o kadar fazla olmaktadır.

- **TRAP (toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametresi) yöntemi:** Bir vücut sıvısı, sıvıdaki bazı antioksidanlarla reaksiyona giren ve peroksil radikallerini oluşturan AAPH (2,2-azo bis 2-amidopropan dihidroklorür) ile inkübe edilir. Antioksidanlar tükendiğinde $RO_2^{\bullet}$ radikalleri peroksidasyona neden olmak üzere lipitlere saldırır. Yöntem lipit peroksidasyonu esnasında oksijen tüketiminin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Peroksidasyonun başlamasından önceki gecikme süresini O_2 tüketimi ile ölçer. Bilinen bir antioksidanla kalibre edilerek TRAP değeri elde edilir.

- **ABTS yöntemi:** Bu yöntemde mavi-yeşil bir kromofor olan ABTS (2,2-azino-bis(3-etilbenztiyazolin-6-sülfonik asit)) kullanılır. Antioksidanlar ABTS'yi indirgeyerek rengin şiddetini azaltır.

- **DPPH yöntemi:** Yöntemde 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) molekülüne antioksidan tarafından bir proton transfer

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

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

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

- **FRAP (ferrik indirgeyici antioksidan güç) yöntemi:** Bu yöntem antioksidanların ferrik demiri indirgeme yeteneğini ölçer demirin ferröz formuna indirgenmesine dayanır. İndirgeme reaksiyonu 593 nm'de absorbans değişikliği ölçülerek belirlenir.

- **CUPRAC (Cu^{2+} iyonu indirgeyici antioksidan kapasite):** Yöntemin temeli neokuproinin Cu^{2+} ile oluşturduğu kompleksin 450 nm'de absorbans vermesine dayanmaktadır. Yöntemin en önemli özelliği hidrofilik antioksidanların yanında lipofilik antioksidanlara da uygulanabilmesidir.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

Reaktif Türlerin Zararlı Etkileri

Dyana Sarı*
A. Süha Yalçın*

Bilindiği gibi toksikoloji vücut dışından gelen maddelerin neden olduğu zararları ve kimyasalların organizma ile etkileşimlerini inceleyen bir bilim dalıdır. Günümüzde canlılar birçok zararlı etkiye maruz kalır. Bu etkiler çevresel olabileceği gibi çeşitli davranışsal faktörlere (örn. ilaçlar, sigara tüketimi, yeme alışkanlıkları) bağlı olabilir. Ekzojen (dış kaynaklı) maddeler kadar endojen (iç kaynaklı) maddelerin de vücudu zarara uğratması söz konusudur. Yapılan pek çok çalışmada serbest radikallerin ve reaktif türlerin varlıkları gösterilmiş olmakla birlikte, bunlardan yalnızca birkaç türün zararlı (toksik) etkileri olduğu görülmüştür. Bu bölümde serbest radikallerin ve reaktif türlerin zararlı etkilerini incelemeden önce ksenobiyotik metabolizması ve toksikoloji ile ilgili genel bilgileri gözden geçirilecektir.

Ksenobiyotik terimi vücuda dışarıdan gelen her tür maddeyi kapsamaktadır. Ksenobiyotik metabolizması substrat aralığı çok geniş olan bir dizi enzim tarafından gerçekleştirilir. [1] Bu reaksiyonlar sonucunda ksenobiyotiklerin türevleri oluşur. Daha sonra oluşan suda çözünürlükleri artmış ürünlerin safra ve idrar yoluyla vücuttan atılmaları sağlanır. Ksenobiyotik metabolizması temelde iki aşamada gerçekleşir. İlk olarak Faz 1 reaksiyonları ile ksenobiyotikler suda çözünürlükleri yüksek ve daha polar olan ara ürünlere çevrilir. Bu işlem büyük ölçüde sitokrom P450 enzimleri (CYP) aracılığı ile yapılır. Faz 2 reaksiyonları ise konjugasyon reaksiyonları ile metilasyon ve asetilasyon gibi aşamaları içerir. Genetik varyasyonlar ksenobiyotik metabolizmasında görev yapan enzimlerin aktivitelerinde değişikliklere yol açabilir. Özellikle CYP enzimlerinin genetik varyasyonları birçok sağlık sorununa neden

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

1 Štefanac, T., Grgas, D., & Landeka Dragičević, T. (2021). Xenobiotics—Division and Methods of Detection: A Review. *Journal of Xenobiotics*, *11*(4), 130-141. https://www.mdpi.com/2039-4713/11/4/9.

olur. Belirli bir ilacı metabolize eden enzimdeki yapısal değişiklik veya miktar değişimi sonrasında organizmanın ilacı metabolize etme performansı etkilenebilir. Bu durum toksisiteye ya da ilacın etki yapmaksızın vücuttan dışarı atılmasına neden olabilir. Ksenobiyotik metabolizmasında temel organ karaciğerdir.

Reaktif türler ve toksisite

Reaktif türlerin pek çok toksinin etki mekanizmasına aracılık ettiği düşünülmektedir. Reaktif türlerin toksisiteye katkısı çeşitli şekillerdedir. Toksininin kendisi reaktif bir tür olabileceği gibi bazen de metabolize edildiğinde reaktif bir türe çevrilir. Ayrıca toksin redoks çevrim reaksiyonlarına katılabilir. Antioksidan savunma mekanizmaları etkilenebilir. Bunun dışında toksin reaktif türlerin endojen oluşumunu tetikleyebilir. Bazı toksinler veya onların metabolitleri biyomoleküllere bağlanarak işlevlerini bozabilir. Son olarak toksinlerin metabolizması inflamasyonu tetikleyebilir, nekroza ve reaktif türlerin oluşumuna neden olabilir. Sonuçta toksinlerin hücreyi zarara uğratması sadece reaktif türlerin etkisi ile olmaz. Verdikleri zarar sonrasında da reaktif tür oluşumu ve oksidatif stres ortaya çıkabilir. [2]

- **Karbon tetraklorür ve halojenlenmiş hidrokarbonlar:** Karbon tetraklorür renksiz bir sıvıdır. Endüstride organik çözücü olarak kullanılır. Ancak zararlı etkilerinden dolayı birçok ülkede kullanımı yasaktır. Karbon tetraklorür hepatotoksisiteye neden olur, tüm olumsuz etkileri reaktif oksijen türleri ile ilişkilidir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda toksik etkisinin CYP enzimleri aracılığıyla metabolizması sırasında oluşan radikaller ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Triklorometil radikali ($CCl^{\bullet}_{3}$) makromoleküllere kovalent olarak bağlanarak membranda lipit peroksidasyonunu başlatır. Karbon tetraklorür metabolizması sonucu oluşan bir diğer radikal olan triklorometilperoksil ($CCl_3O^{\bullet}_{2}$) radikali de yüksek reaktiviteye sahiptir. Araşidonik asit, linoleik asit gibi lipitlerle ve proteinlerin triptofan kalıntıları ile etkileşerek hücreyi zarara uğratır. Sonuç olarak, tüm bu süreçte lipit peroksidasyonunda artış, bazı enzim aktivitelerinde bozukluklar ve CYP sisteminde aksaklıklar ortaya çıkmaktadır. [3] Öte yandan, kloroform da toksik etkisini CYP enzimleri ile reaksiyonu sonucu oluşan $CCl^{\bullet}_{3}$ aracılığı ile gösterir. Halojenlenmiş hidrokarbonlar arasında

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

3 Kadiiska, M., Gladen, B., Baird, D., Germolec, D., Graham, L., Parker, C., Nyska, A., Wachsman, J., Ames, B., & Basu, S. (2005). Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl4 poisoning? *Free Radical Biology and Medicine*, *38*(6), 698-710.

1,2-dibromoetan, haloetan, trikloroetilen, perkloroetilen, bromobenzen ve vinil klorür gibi moleküller yer alır. Bu moleküllerin çeşitli zararlı etkileri vardır. Bromobenzenin CYP enzimleri aracılığı ile metabolizması sonucu oluşan epoksit glutatyonla tepkimeye girerek antioksidan savunma mekanizmasını tehlikeye sokar. Ayrıca, bromobenzenin proteinlerin tiyol grupları ile tepkimeye girmesi çeşitli fonksiyon bozukluklarına yol açabilir. Pentaklorofenol, herbisit ve pestisit olarak kullanılan bir moleküldür. Ana metaboliti olan tetraklorohidrokinon DNA ile etkileşime girerek mutasyonlara ve yapı değişikliğine neden olur. Bir fungusit olan hekzaklorobenzen hem biyosentezine katılır ve bir porfiri çeşidi olan porfiria cutanea tarda ile karaciğer hasarını tetikler. [4]

- **Redoks çevrimi**: Tekrar eden indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarıdır ve reaktif oksijen türlerini yaratır. Tarımsal amaçla kullanılan herbisitler bitkilere, bakterilere ve hayvanlara redoks çevrimi yolu ile zarar vermektedir. Bitkisel korumada yaygın olarak kullanılan parakuat ve dikuat ise insanlar dahil olmak üzere birçok hayvan için toksiktir. İnsanda parakuattan en çok etkilenen organ akciğerdir. Bununla birlikte diğer organlar özellikle de böbrekler etkilenebilir. Parakuatın akciğer üzerine olan etkisi akciğerde oksijen miktarının fazla olması ve akciğer hücrelerinin parakuatı biriktirme kapasitesi nedeniyledir. NADPH-CYP450 redüktaz sistemi parakuatı metabolize ederek parakuat radikaline indirger. İndirgenen parakuat radikali de oksijen ile reaksiyona girerek süperoksit radikalini oluşturur. Parakuatın diğer organlara olan etkisi de redoks çevrimi üzerinden gerçekleşmektedir. Burada NADPH-CYP450 redüktaz, flavoproteinler, glutatyon redüktaz gibi enzimler ana rollere sahiptir. Parakuatın bir başka özelliği nörotoksik olmasıdır. Oksidatif protein hasarı, lipit peroksidasyonu, Fenton reaksiyonları ve oksidatif DNA hasarı gibi olaylar parakuatın toksik etkisine katkı sağlarlar. [5]

- **Kinonlar:** Kinonların toksik etkileri en az iki farklı yoldan olmaktadır. Glutatyonla ve proteinlerin –SH grupları ile reaksiyona girerler. Bu tür konjugasyonlar GSH havuzunu azaltacağı için antioksidan sistemleri sıkıntıya sokar. Kinonların NADPH-CYP450 redüktaz gibi enzimlerle redoks

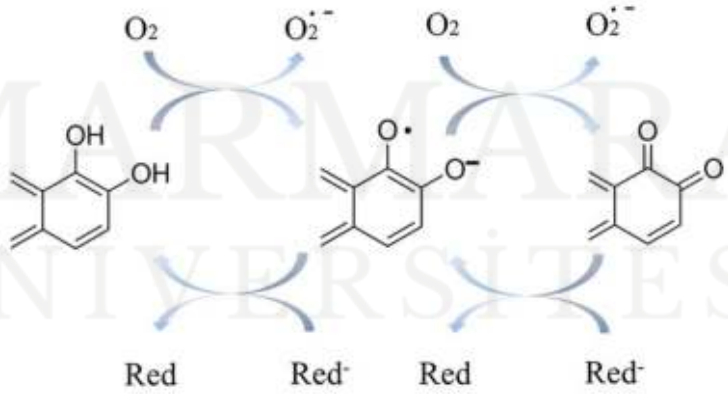
4 Basu, S. (2003). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology*, *189*(1-2), 113-127.

5 Morán, J. M., Ortiz-Ortiz, M. A., Ruiz-Mesa, L. M., & Fuentes, J. M. (2010). Nitric oxide in paraquat-mediated toxicity: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *24*(6), 402-409.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

çevrimine girmesi de çeşitli radikallerin oluşumuna neden olabilir. Kinonlar çeşitli amaçlarla kullanılır. Antibiyotik olarak yaygın kullanımları vardır. Sigara dumanında ve kemoterapi ilaçlarında bulunurlar. Süperoksit radikali ile difenoller ve kinonlar denge halindedir. [6] Dengenin durumuna ve indirgenme potansiyeline bağlı olarak, kinonlar ve difenoller süperoksit toplayıcısı veya üreticisi olabilir (Şekil 1). Örneğin, plumbajin ile menadion redoks çevrimine uğrar ve süperoksit üretirler. Bu sırada oluşan semikinon hücreyi birçok zarara uğratabilir. [7]

Semikinonlar hidrojen peroksit ile reaksiyona girip çok az hidroksil radikali oluşturur. Ayrıca semikinon-aracılı Fenton reaksiyonu olarak bilinen reaksiyonlar ile de hidroksil radikali oluşur. Difenoller geçiş metallerini de indirgeyebilir. Redoks çevrimi sonucunda oluşan semikinon radikali, çeşitli fonksiyon bozukluklarına neden olur. Örneğin, bir kinon metaboliti olan menadion oksihemoglobin ile etkileşerek semikinon radikalini oluşturur. Semikinon hemoglobinin oksidasyonuna ve çökmesine neden olarak hemoliz yaratır. Aynı zamanda süperoksit radikali oluşturarak ve hemoglobine bağlanarak eritrositlerde fonksiyon bozukluğuna neden olur. Menadion karaciğerde GSH havuzunu azaltırken $O_2^{\bullet -}$ ve H_2O_2 oluşumunu da artırır. Bu durum membranın kabarcıklanması ve hücre için toksik olan Ca^{+2} miktarının artmasıyla sonuçlanır. Karaciğerde DNA hasarını tetiklediğine dair bulgular da mevcuttur. Bu etkisini oksidatif stres üzerinden gerçekleştirmediği düşünülmektedir.



Şekil 1. Kinonların katıldığı redoks çevrimi yoluyla süperoksit radikali oluşumu

6 Li, Y., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., & Trush, M. A. (1996). Role of Cu/Zn-superoxide dismutase in xenobiotic activation. I. Chemical reactions involved in the Cu/Zn-superoxide dismutase-accelerated oxidation of the benzene metabolite 1, 4-hydroquinone. *Molecular Pharmacology*, *49*(3), 404-411.

7 Winterbourn, C. C., French, J. K., & Claridge, R. (1979). The reaction of menadione with haemoglobin. Mechanism and effect of superoxide dismutase. *Biochemical Journal*, *179*(3), 665-673.

Kinonların bir elektron ile indirgenip semikinon oluşturması ve redoks çevrimini uyarmasının yanı sıra bazı enzimler aracılığıyla etkisizleştirilmesi de söz konusudur. [8, 9] NADH ve NADPH varlığında iki elektronla indirgenerek daha az zararlı hidrokinonları oluştururlar. Bu enzimlerin en önemlisi kinon redüktazdır. Kinon redüktaz, koenzim Q'nun indirgenmiş formda kalmasını sağlar ve $O_2^{\bullet -}$ oluşumunu azaltır. Böylelikle kinonun diğer enzim sistemleri aracılığı ile semikinona indirgenmesini engeller. Kinon redüktaz ksenobiyotik metabolizmasındaki Faz 2 reaksiyon enzimleri arasında yer alır. Menadionun vücuttan atılmasında önemli rolü vardır. Bazı endojen moleküllerin, örneğin östrojenin metabolizması sonucu oluşan metabolitlerden de kinon veya semikinon türevleri oluşabilir. Buna ek olarak difenol yapısındaki moleküllerden dopamin, adrenalin, L-DOPA ve noradrenalinin oksidasyonu sonucu da kinon ve semikinon yapısında metabolitler oluşur. Bu metabolitler proteinlerle etkileşime girerek protein yıkımına ve GSH havuzunun boşalmasına neden olur. Parkinson hastalarının beyinlerinde bu tarz reaksiyonların görüldüğü bilinmektedir. Ek olarak nörotransmitterlerin oksidasyonunda geçiş elementlerinin yadsınamayacak bir rolü vardır. [10]

- **Nitro grupları ve azo bileşikler:** Nitro grupları içeren birçok ilaç siklooksijenaz inhibitörü veya vazodilatör olarak kullanılmaktadır. Fakat bunların yüksek dozları toksiktir. Antibakteriyel bir ilaç olan nitrofurantoin idrar yolu enfeksiyonlarını engeller. Ancak bu ilacın akciğer hasarına da neden olduğu bilinmektedir. İlaç akciğerde NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi ile indirgendikten sonra oluşan nitro radikal tekrar oksidasyona uğrayarak süperoksit radikalini oluşturur. Azo bileşikler genelde ilaç, gıda ve kozmetik ürünleri olarak kullanılırlar. Gıdalarla alınan azo bileşikler sindirim sırasında bağırsak florası tarafından hızlı bir şekilde parçalanır ve indirgenir. Daha sonra hücrelerde NADPH-sitokrom P450 redüktaz, ksantin oksidaz ve diğer enzimlerle azo anyon serbest radikalleri oluşur. Bunlar süperoksit oluşumuna ve oksidatif hasara neden olabilir. [11]

8 Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., & Monks, T. J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, *13*(3), 135-160.

9 McGregor, D. (2007). Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties. *Critical Reviews in Toxicology*, *37*(10), 887-914.

10 Fischer-Nielsen, A., Corcoran, G. B., Poulsen, H. E., Kamendulis, L. M., & Loft, S. (1995). Menadione-induced DNA fragmentation without 8-oxo-2'-deoxyguanosine formation in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, *49*(10), 1469-1474.

11 Hukkanen, J., Pelkonen, O., Hakkola, J., & Raunio, H. (2002). Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in

- **Alloksan:** Diyabetojenik ilaçlardan biri olan alloksan redoks çevrimi toksinlerindendir. Bu madde pankreasın Langerhans adacıklarındaki β-hücrelerinin dejenerasyonuna neden olur. Pankreas insülin üretemez ve diyabet tablosu ortaya çıkar. Alloksan çift elektronlu indirgenmeye uğradığında, sitotoksik bir pirimidin olan dialürik asit oluşur. Dialürik asit kararlı bir bileşik değildir ve tekrar alloksana okside olmak üzere elektronlarını vererek $O_2^{\bullet-}$ radikalini oluşturur. Bu reaksiyon geçiş metalleri varlığında hız kazanır ve $OH^{\bullet}$ radikalinin oluşumuna neden olur. Alloksanın proteinler ile etkileşimde olduğu da bilinmektedir, redoks çevrimine uğrayarak proteinlerin –SH gruplarını oksitler. Alloksan hücrelere glukoz taşıyıcısı GLUT2 aracılığı ile girer. [12]

Alkol metabolizması

Pek çok insan alkollü içecekleri ve alkol içeren meyveleri tüketerek etanole maruz kalır. Ayrıca bağırsak mikrobiyotası tarafından bazı moleküllerin etanole çevrimi de gerçekleşir. Etanol suda çözünebilen bir organik maddedir. [13] Kan beyin bariyerinden ve hücre membranından kolayca geçebilir. Etanolün önemli bir kısmı karaciğerde metabolize edilir. Burada etanol önce alkol dehidrogenaz enzimi ile asetaldehite dönüştürülür. Daha sonra asetaldehit aldehit dehidrogenaz tarafından daha az toksik bir madde olan asetata çevrilir. Etanol mikrozomal CYP2E1 enzimleri ile de metabolize edilir. Aşırı alkol tüketimi, mitokondri ve sitozolde NAD+/NADH oranını düşürür. Bu oranın düşmesi ile süperoksit radikallerinin oluşumu tetiklenir. Bu durum karaciğerde anormal yağ birikimine de neden olur. Kronik alkol tüketiminden dolayı ortaya çıkan alkolik yağlı karaciğer hastalığının patofizyolojisinde oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve endoplazmik retikulum (ER) stresi etkilidir. [14] TNF-α da önemli bir role sahiptir. Alkolik yağlı karaciğer hastalığının ilerleyen safhalarında hastalarda siroz ve hepatosellüler karsinoma gelişir. Etanolün milimolar düzeyleri hayvanlarda toksik etki yaratmaz. Hatta az miktarları kardiovasküler hastalıklar

human lung. *Critical Reviews in Toxicology*, *32*(5), 391-411.

12 de la Paz, M. P., Philen, R. M., Gerr, F., Letz, R., Ferrari Arroyo, M. J., Vela, L., Izquierdo, M., Arribas, C. M., Borda, I. A., Ramos, A., Mora, C., Matesanz, G., Roldán, M. T., & Pareja, J. (2003). Neurologic outcomes of toxic oil syndrome patients 18 years after the epidemic. *Environmental Health Perspectives*, *111*(10), 1326-1334. https://doi.org/10.1289/ehp.111.124.1614.

13 Hernández-Tobías, A., Julián-Sánchez, A., Piña, E., & Riveros-Rosas, H. (2011). Natural alcohol exposure: is ethanol the main substrate for alcohol dehydrogenases in animals? *Chemico-Biological Interactions*, *191*(1-3), 14-25.

14 Katsumata, K., Katsumata, Y., & Ozawa, T. (1994). Acute and chronic effect of ethanol on the occurrence of alloxan diabetes in rats. *Hormone and Metabolic Research*, *26*(04), 166-168.

açısından yararlı bile sayılabilir. [15] Yararlı etkileri plazmada artmış HDL ile fibrinojen miktarlarındaki azalma ve endotel hücrelerinde üretilen $NO^{\bullet}$ miktarında artış şeklindedir. Ancak, sık alınan yüksek miktarda alkol karaciğer başta olmak üzere birçok organa zarar verebilir. [16] Yüksek miktarda alkol alımı, memelilerin plazma ve karaciğerlerinde lipit peroksidasyonuna neden olur. Birçok dokuda özellikle de karaciğerde ve beyinde GSH düzeylerinin düşmesiyle birlikte oksidatif stres tetiklenir. Aşırı alkol alımı metiyonin metabolizmasını da etkilemektedir. Metiyonin sistein üretiminden, nörotransmitter üretimine kadar çok önemli işlevlere sahip bir amino asittir. Alkol metiyoninin S-adenozil-metiyonin (SAM)'e dönüşümünü yavaşlatır. Nörotransmitterlerin üretimi için gerekli olan SAM miktarı azalır ve sistein üretimi durur. Bu durum GSH düzeylerinin azalmasına neden olarak oksidatif stresi indükler. Etanolün CYP2E1 enzimi ile metabolizması sonucunda hidroksietil radikalleri oluşur. Bu radikaller proteinlere bağlanarak onları etkisiz hale getirir. CYP2E1 enziminin diğer P450 izoformlarına göre ortama daha fazla hidrojen peroksit ve süperoksit radikali sızdırdığı gösterilmiştir. Ayrıca CYP2E1 ekspresyonu yüksek olan hücrelerde oksidatif hasarın daha fazla olduğu bilinmektedir. Etanolün metaboliti asetaldehit de proteinlerin –SH ve NH_2 grupları, albümin ve GSH ile etkileşime girer. Bu etkileşimlerden bazıları immün cevabı tetikleyebilir. [17] Sonuçta aşırı alkol tüketimi farklı yolaklar üzerinden GSH düzeylerinde ciddi düşüşlere ve artmış oksidatif hasara neden olur.

Diğer toksinler

Parasetamol: Ağrı kesici etki gösteren bir ilaçtır. Aspirin ve COX-1 inhibitörlerinin aksine mideyi rahatsız etmez. Önerilen dozlarda kullanımı zararsız iken, doz aşımında karaciğerde ve böbreklerde hasar meydana getirmektedir. Metabolizması sulfasyon ve glukuronidasyon gibi konjugasyonları içerir. Ayrıca, bazı CYP enzimleri özellikle de CYP2E1 için iyi bir substrattır. Parasetamol aşırı dozlarda alındığında hücrenin sulfatasyon ve glukuronidasyon kapasitesi aşılır, metabolizmasında CYP yolağı baskın hale gelir. Reaktif bir ürünü olan kinonimin glutatyona ve proteinlerin –SH gruplarına bağlanabilir. Kinoniminin GSH ile konjugasyonu ve ardından merkaptürik asit oluşturması parasetamolün detoksifikasyonuna da

15 Nova, E., Baccan, G., Veses, A., Zapatera, B., & Marcos, A. (2012). Potential health benefits of moderate alcohol consumption: current perspectives in research. *Proceedings of the Nutrition Society*, *71*(2), 307-315.

16 Seitz, H. K., & Stickel, F. (2007). Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, *7*(8), 599-612.

17 Chen, S. Y. (2012). Analysis of Nrf2-mediated transcriptional induction of antioxidant response in early embryos. *Methods in Molecular Biology*, *889*, 277-290. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-867-2_17.

yardımcı olmaktadır. Öte yandan, parasetamolün fazlası çok miktarda kinonimin oluşumuna ve GSH düzeylerinin azalmasına yol açarak, kinoniminin çeşitli proteinler ve enzimlerin yanı sıra Ca^{2+}-ATPaza ve mitokondriyal proteinlere saldırmasına neden olur. Sonuçta hücre içi kalsiyum miktarları artar ve süreç hepatosit ölümüne kadar ilerler. Ayrıca, GSH düzeylerindeki azalma serbest radikallerin oluşumuna, ikincil olarak lipit peroksidasyonuna, doku hasarına ve ileri immün cevaplara neden olur. [18]

Naftalin: Kapalı formülü $C_{10}H_8$ olan bir aromatik hidrokarbondur. Çevre kirliliği yaratır ve karsinojeniktir. Naftalin akciğerlerde Clara hücrelerini hedefler. Bunun başlıca nedeni Clara hücrelerinin CYP2F enzimlerini çokça bulundurmasıdır. CYP2F enzimleri naftalinin reaktif metabolitlere çevrilmesini sağlar. Bunlar arasında epoksitler, dioller, kinonlar ve redoks çevrimi ürünleri yer alır. Kinonların GSH ile konjugasyonu sonucunda GSH düzeylerinde azalma meydana gelir. Bu da kinonların protein –SH gruplarına saldırmasına ve proteinlerde fonksiyon kaybına neden olur. [19]

Klorin gazı: Klorin (Cl_2) zehirli bir gazdır. Endüstriyel bir kimyasal ve su dezenfektanı olarak oldukça yaygın kullanımı olan bir moleküldür. Gereğinden fazla klorin alınırsa akciğerlerde hasara neden olabilir. Klorinin kendisi direkt olarak oksitlenir ve son derece reaktiftir. Solunum borusunu tahriş eden hipokloröz asidi oluşturur. Askorbat ve GSH gibi antioksidanların klorinin toksik etkilerini azalttığı gösterilmiştir. Bu moleküller klorin ile direkt olarak etkileşime girerler. [20]

Hava kirliliği

Soluduğumuz havada yer alan pek çok molekül vücuda alınıp metabolize edildikten sonra oluşan metabolitler aracılığıyla toksik etki yaratabilir. [21] Bu bölümde havada bulunan çeşitli moleküllerin serbest radikal hasarı ile ilişkisine örnekler verilmiştir.

---

18 McGill, M. R., Sharpe, M. R., Williams, C. D., Taha, M., Curry, S. C., & Jaeschke, H. (2012). The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(4), 1574-1583. https://doi.org/10.1172/jci59755.

19 Hukkanen, J., Pelkonen, O., Hakkola, J., & Raunio, H. (2002). Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Critical Reviews in Toxicology*, *32*(5), 391-411.

20 Squadrito, G. L., Postlethwait, E. M., & Matalon, S. (2010). Elucidating mechanisms of chlorine toxicity: reaction kinetics, thermodynamics, and physiological implications. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, *299*(3), L289-L300.

21 Cross, C. E., Vasu, V. T., Lim, Y., & Gohil, K. (2006). Combating oxidative stress at respiratory tract biosurfaces: challenges yet to be resolved, a commentary on" Vitamin supplementation does not protect against symptoms in ozone-responsive subjects". *Free Radical Biology and Medicine*, *40*(10), 1693-1697.

- **Ozon (O_3):** Ozon atmosferde yüksek miktarlarda bulunur ve UV ışıklarını süzen başlıca moleküldür. Ayrıca atmosferde antioksidan etki gösterir. Bu yararlı etkilerinin yanında gözlere, deriye ve solunum borusuna zarar veren bir moleküldür. Lipitlere çift bağlar ekler ve ozonoidleri yaratır, bu ozonoidler daha sonra sitotoksik aldehitlere dönüşür. Proteinlere saldırıp $^1O_2$ ve $OH^\bullet$ üretebilir. Ozonun başlıca hedefleri derideki lipitler ve proteinler ile solunum borusundaki proteinlerdir. Ozon proteinlerin nitrasyonunu da artırır. Vücut içine alınan ozonun çoğunu solunum borusunda yer alan yapılar absorbe etmektedir. Bu yapıların sahip olduğu sıvılar da fazla miktarda askorbik asit, GSH ve ürat içerir. Bu moleküller ozon toplayıcıları olarak davranıp ozonu etkisiz hale getirir. Astım vakalarında ve özellikle diyetle alınan antioksidanların yetersiz olduğu durumlarda, ozon olumsuz etki yapar ve mevcut durumu daha da kötüleştirir. [22, 23]
- **Azot dioksit ($NO_2^\bullet$):** Azot dioksit kahverengi renkli, toksik ve tahriş edici bir gazdır. Tirozin nitrasyonunun, $ONOO^-$ ve miyeloperoksidaz varlığında oluşan ara ürünüdür. Organik materyallerin yanması sürecinde de azot, oksijen molekülü ile etkileşime girerek oksitlenir. Ayrıca, nitrik oksitin oksijen ve ozon ile reaksiyonu sonucunda üretilebilir. Atmosferde yeterli düzeylerde O_3 ve $NO_2^\bullet$ bulunduğunda, bu iki molekül bir araya gelerek nitrat radikalini ($NO_3^\bullet$) oluşturur. Nitrat radikali güçlü bir oksitleyici olmanın yanı sıra hedef molekülleri nitratlama kapasitesine sahiptir. Azot dioksit, $NO^\bullet$ gibi bir serbest radikaldir ve paylaşılmamış bir elektrona sahiptir. Bu paylaşılmamış elektron, oksijen ve azot atomları arasında delokalize durumdadır. Azot dioksit suda çözündüğünde güçlü bir asit olan nitrik asidi verir. Nitrik asit solunum borusunu tahriş eder, atmosferde bulunduğunda asit yağmurları ile canlılara zarar verir. Azot dioksitin suda çözünmesinden ortaya çıkan bir diğer ürün, zayıf asit kategorisinde yer alan nitröz asittir. Nitröz asit, DNA yapısındaki bazların deaminasyonuna ve nitrozamin oluşumuna neden olur. Mutajenik bir ajan gibi davranır. Azot dioksitin kendisi de proteinleri nitratlayarak lipit peroksidasyonunun başlamasına neden olmaktadır. [24]

22 Coleman, B. K., Destaillats, H., Hodgson, A. T., & Nazaroff, W. W. (2008). Ozone consumption and volatile byproduct formation from surface reactions with aircraft cabin materials and clothing fabrics. *Atmospheric Environment 42*(4), 642-654. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.10.001.

23 Wisthaler, A., & Weschler, C. J. (2010). Reactions of ozone with human skin lipids: sources of carbonyls, dicarbonyls, and hydroxycarbonyls in indoor air. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(15), 6568-6575.

24 Franze, T., Weller, M. G., Niessner, R., & Pöschl, U. (2005). Protein nitration by polluted air. *Environmental Science & Technology*, *39*(6), 1673-1678. https://doi.org/10.1021/es0488737.

- **Sigara dumanı:** Sigara tüketimi pek çok hastalığa zemin hazırlayan kötü bir davranıştır. Amfizem, bronşit, maküler dejenerasyon, pnömoni, ateroskleroz, akciğer kanseri ve diğer kanser türleri gibi hastalıklara neden olur. Ayrıca, vasküler endotele hasar verir, trombosit birikimini kolaylaştırarak damarda tıkanıklığına zemin hazırlar ve vazokonstrüksiyona neden olur. Sigara dumanı toksik maddelerin bir araya gelerek oluşturduğu bir karışımdır. Bu karışımın içinde serbest radikaller, serbest radikal oluşturabilen ve GSH düzeylerini düşüren ajanlar ve diğer toksik ajanlar bulunur. [25] Sigara dumanı, partiküller ve gaz fazı olarak ikiye ayrılabilir. Gaz fazı vücuttaki oksitleyici tepkimeleri arttırırken, partiküller zayıf indirgeyicidir. Sigara dumanında bulunan ajanlardan biri de redoks dönüşümlerine giren semikinondur. Semikinonun kinon ve hidrokinonlarla etkileşimi sonucu $O_2^{\bullet -}$ ve H_2O_2 oluşur. Bu reaktif oksijen türleri Fenton reaksiyonları ile $OH^{\bullet}$ radikaline dönüşürler. Sigara dumanı içinde kadmiyum, demir, aluminyum gibi birçok metal yer alır. Sigara içenlerin akciğerlerinde demir artmıştır.

Metaller

Metallerin oksidatif hasara katkısı olduğu düşünülmekle birlikte, bunun bir neden mi yoksa sonuç mu olduğu tartışmalıdır. [26] Kurşun, kobalt, civa, molibden, alüminyum, selenyum ve arsenik gibi metallerin toksisitesine reaktif oksijen türlerinin katkı yaptığı düşünülmektedir. Yüksek miktarda metal iyonuna maruz kalan hücrelerde lipit peroksidasyonunun arttığı gözlenmiştir. Bunun artmış reaktif oksijen türleri üretimi ya da GSH azalması sonucu ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir.

- **Arsenik (As)**: Periyodik tablonun 5. grubunda yer alan arseniğin iki temel oksidasyon durumu vardır: As(III) ve As(V). Toprakta, tatlı sularda ve yeraltı sularında bulunan, yani çevrede yaygın dağılımı olan bir elementtir. Arsenik ölümcüldür. Bu özelliğinden dolayı tarih boyunca kemirgenlerle mücadelede ve hükümdar ailelerdeki aile arası çatışmalarda kullanılmış bir zehirdir. Ayrıca karsinojeniktir ve ppm dozları bile ateroskleroza neden olmaktadır. Hücreler tarafından arsenat (AsO_4^{-3}) şeklinde alındığında sinyal iletiminde hatalara neden olur. İndirgenmiş hali olan arsenit (AsO_3^{3-}) ise daha reaktiftir. Arsenit hücresel proteinlerde –NH

25 Bartalis, J., Zhao, Y.-L., Flora, J. W., Paine III, J. B., & Wooten, J. B. (2009). Carbon-centered radicals in cigarette smoke: acyl and alkylaminocarbonyl radicals. *Analytical Chemistry*, *81*(2), 631-641.

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

gruplarına bağlanır, GSH ile etkileşir ve Nrf2/Keap1 sistemini aktifleştirebilir. Arsenit ayrıca DNA onarım ve metilasyon mekanizmaları ile etkileşime girer, tümörojenik etki gösterir. Yapılan çalışmalar arsenik uygulanmış örneklerde oksidatif hasarın arttığını göstermiştir. [27] Bu etki azalmış GSH düzeyleri ile alakalı olabileceği gibi, mitokondride artmış reaktif oksijen türleri üretiminin ve artmış NADPH oksidaz aktivitesinin bir sonucu olabilir. Arsenitin arsenata yükseltgenmesi hidrojen peroksit ve hidroksil radikalinin oluşmasına neden olur.

- **Kurşun (Pb):** Mavi-gümüş renkli bir elementtir. Atom numarası 82'dir. Doğada kütle numaraları 208, 206, 207 ve 204 olmak üzere 4 izotopu vardır. Kurşun atomunda eşleşmemiş 4 elektron olmasına rağmen, bileşiklerinde +4 yerine +2 değerlik alır. Çünkü kalan son 2 elektron kolayca iyonize olabilir. İnsanlar eksoz dumanı, akümülatörler, kurşun-asit içeren bataryalar gibi birçok farklı yoldan kurşuna maruz kalabilir. İçme suları ve yemeklerin kontaminasyonu da söz konusudur. Ayrıca kurşun içeren koruyucu giysiler radyasyona karşı savunmada kullanılmaktadır. Aşırı kurşun alımı hipertansiyona ve nörotoksisiteye neden olur. [28] Kırmızı kan hücrelerinin, immün sistemin ve böbreklerin de içinde olduğu birçok sisteme hasar verir. Etki mekanizmaları ve zararları arasında NMDA reseptörlerinin ve δ-ALA dehidratazın inhibisyonu, oksihemoglobinin methemoglobine yükseltgenmesi, protein –SH grupları ile etkileşme, GSH düzeylerinde azalma ve Ca^{2+} homeostazını değiştirmek yer almaktadır.
- **Alüminyum (Al):** Yer kabuğunda en fazla bulunan metallerdendir. Bu nedenle insanlar sıkça alüminyuma maruz kalırlar. Yemek kaplarında, el aletlerinde, kavanozlarda, isli besinlerde, içme sularında yer alır, bazı aşılarda ve yapı malzemelerinde kullanılır. Sabit bir oksidasyon sayısına sahiptir. Sulu çözeltilerde hidratlanmış ($Al(H_2O)_6^{3+}$) durumdadır. Nefes yolu ile alındığında duyusal nöronlar kanalıyla beyine geçtiği belirlenmiştir. Ancak beyindeki etkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Bazı organik asitler vasıtası ile gastrointestinal sistem içine alımının arttığı da bildirilmiştir. Absorbe edilmiş Al^{3+} transferrine bağlanır, transferrin reseptörü ile hücre içine girer ve ferritin içinde

27 Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology*, *31*(2), 95-107. https://doi.org/10.1002/jat.1649.

28 Bakulski, K. M., Rozek, L. S., Dolinoy, D. C., Paulson, H. L., & Hu, H. (2012). Alzheimer's disease and environmental exposure to lead: the epidemiologic evidence and potential role of epigenetics. *Current Alzheimer Research*, *9*(5), 563-573. https://doi.org/10.2174/156.720.512800617991.

depolanır. Alüminyumun potansiyel toksisitesi uzun yıllar boyunca kabul görmemiştir. Fakat yıllar sonra böbrek hastalarına uygulanan diyaliz sonrası nörolojik bir sendrom olan diyaliz ensefalopatisi oluştuğu görülmüştür. [29] Bu sendromun oluşmasındaki ana etken kontamine olmuş diyaliz sıvıları nedeniyle beyinde fazla miktarda Al birikimidir. Alüminyumun Ca^{2+} alım mekanizmaları ile etkileştiği ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ile dihidropterin redüktaz enzimlerinin inaktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Bir diğer etkisi serbest radikal reaksiyonları ile bağlantılıdır. Al^{3+} iyonunun ortamda bulunması eritrositlerde, miyelinde, LDL'de, sinaptozomlarda, mikrozomlarda ve lipozomlarda peroksidasyon hızını artırmaktadır.

- **Çinko (Zn):** Çinko pek çok enzimin aktivitesinde, transkripsiyon faktörlerinde ve immün sistem fonksiyonlarında gerekli olan bir elementtir. Bazı koşullar altında antioksidan özellikler de sergiler. Çinko eksikliği olan hayvanlarda yapılan çalışmalar oksidatif hasarın varlığını göstermiştir. Gereğinden fazla çinko alımı toksik etki yapar ve fazlası nöronlara hasar verir. [30]

Antibiyotikler

Antibiyotikler canlı organizmalar tarafından savunma amacıyla üretilen moleküllerdir. Bakteri, fungus ve diğer mikroorganizmaları öldürmek için kullanılırlar. Antibiyotikler bir yandan oksidatif hasarın hedefi olabilirken, oksidatif hasara da neden olabilir. Bazı antibiyotikler antioksidan özelliklere sahiptir. Çeşitli antibiyotik grupları vardır. Polien antifungal antibiyotikler fungal hücrelerin membranlarında bulunan ergosterole bağlanıp hücre membranının geçirgenliğini arttırırlar. Çoklu doymamış yapıları onları oksitlenmeye açık konuma getirir ve peroksitlerin, alkoksil, peroksil radikallerinin ve sitotoksik aldehitlerin oluşmasına neden olur. Bu tür antibiyotiklerin etkisi oksidasyon ürünleri aracılığıyla ortaya çıkmaktadır. Örneğin mikonazol ergosterol sentezini inhibe ederek oksidatif stres oluşturur ve fungusların ölümüne yol açar. Tetrasiklinler bakterilere karşı kullanılan antibiyotiklerdir. Bakterilerde ribozom fonksiyonlarını inhibe ederler. Tetrasiklinler 02 üretimini arttırırlar. Bu nedenle kinolon antibiyotikleri olarak isimlendirilirler. Tetrasiklinler demir ve bakır iyonları ile çökelti

29 Alfrey, A. C., LeGendre, G. R., & Kaehny, W. D. (1976). The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *New England Journal of Medicine*, *294*(4), 184-188. https://doi.org/10.1056/nejm197.601.222940402.

30 Rogalska, J., Brzóska, M. M., Roszczenko, A., & Moniuszko-Jakoniuk, J. (2009). Enhanced zinc consumption prevents cadmium-induced alterations in lipid metabolism in male rats. *Chemico-Biological Interactions*, *177*(2), 142-152. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.09.011.

oluşturur. Bu durumun sonucu olarak ortamdaki hidrojen peroksit hidroksil radikaline dönüşür. Diğer taraftan tetrasiklinler HOCl ve ONOOH toplayıcısıdır. Kinon yapısındaki antibiyotikler redoks çevrimine girerek süperoksit radikallerini, semikinonları ve hidrojen peroksiti oluşturabilir. [31]

Stres

Stres hali birçok insanda sorunlara yol açar. Kronik stresin merkezi sinir sisteminde, endokrin sistemde ve bağışıklık sisteminde çeşitli fonksiyon bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir. [32] Stresin etkisiyle artmış $NO^{\bullet}$ üretimi, mitokondriyal disfonksiyon, süperoksit radikali ile hidrojen peroksit oluşumu ve dopamin ile tetrahidrobiopterinin artışı ve oksidasyonu gibi reaktif türlerle ilgili pek çok mekanizma harekete geçer. Stresli zamanlarda düzeyleri artan glukokortikoidlerin çeşitli deney sistemlerine uygulanmasıyla bu değişimlerin çoğu gözlenmiştir. Stresli ve depresyona sahip hastaların idrar ve serumlarında 8-OH-dG düzeyinde artış vardır. Glioksalaz aktivitesi ile GSH düzeylerindeki değişimlerin de depresyon, anksiyete ve stresle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Stresli ve depresyon halinde olan bir insanın yaşam stili ve yeme alışkanlıkları oksidatif hasarın düzeyini etkilemektedir. Ancak stresin reaktif türler ile ilişkisinin sağlam bir temele dayandırılması için yeni bulgulara ihtiyaç vardır. [33]

İyonlaştırıcı radyasyon

Herhangi bir fotonun enerjisi, radikal yapıda olmayan bir molekülden bir elektron koparmak için gerekli enerjiden fazla olduğunda, hedef molekülden bir elektron kopar ve geriye radikal bir katyon kalır. Görünür bölge ve UV aralığındaki radyasyonlar moleküllerin iyonizasyonu için gerekli enerjiye sahip değildir, ancak gama ışınları, X ışınları, yüksek enerjili elektronlar ve nötronlar bu işlevi yerine getirebilir. Tüm bunlar iyonlaştırıcı radyasyon olarak adlandırılır. İyonlaştırıcı radyasyon yaşayan bir organizmanın

31 Koker, E. B., Bilski, P. J., Motten, A. G., Zhao, B., Chignell, C. F., & He, Y. Y. (2010). Real-time visualization of photochemically induced fluorescence of 8-halogenated quinolones: lomefloxacin, clinafloxacin and Bay3118 in live human HaCaT keratinocytes. *Photochemistry and Photobiology*, *86*(4), 792-797. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00741.x.

32 Mariotti, A. (2015). The effects of chronic stress on health: new insights into the molecular mechanisms of brain-body communication. *Future Science OA*, *1*(3), Fso23. https://doi.org/10.4155/fso.15.21.

33 Vollert, C., Zagaar, M., Hovatta, I., Taneja, M., Vu, A., Dao, A., Levine, A., Alkadhi, K., & Salim, S. (2011). Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. *Behavioural Brain Research*, *224*(2), 233-240. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.05.010.

içine girdiğinde, iyonlaştırıcı etkisi ile moleküllerin yapılarını ve fonksiyonlarını etkileyerek birçok hasara neden olabilir. [34]

Reaktif türlerin hastalıklarla ilişkisi

Yapılan çalışmalar serbest radikallerin ve reaktif türlerin birçok hastalığın patogenezinde rol sahibi olduğunu göstermiştir. Günümüzde, aralarında kistik fibrozis, kardiyomiyopati, bağırsak iskemisi, AIDS gibi hastalıkların da bulunduğu 200 farklı hastalıkta reaktif türlerin ve serbest radikallerin rolü olduğu kanıtlanmıştır. [35, 36] Etiyolojisinde reaktif türlerin bulunmadığı bir hastalık yok denecek kadar azdır. Oksidatif stres, hasara uğrayan dokuda DAMP'ların salınımı ile çağrılan ve aktifleşen fagositlerin aktivitesi, mitokondride elektron taşınım zincirinden elektron kaçaklarının artması ve antioksidan düzeylerindeki azalmayla doğru orantılı olarak ortaya çıkar. Herhangi bir nedenle (cerrahi müdahale, sıcaklık, travma, toksinler, enfeksiyonlar, radyasyon) gelişen doku hasarında da oksidatif stres artar. Bu durum tüm hastalıklarda görülen bir patofizyolojik koşul olarak önümüze çıkmaktadır. Oksidatif stres hastalıklarda önemli bir etkendir. Kanser gibi bazı hastalıklar oksidatif stresin varlığı ile ortaya çıkar. Birçok hastalıkta ise oksidatif stres bir sonuçtur ve hastalığa neden olan etken değildir. [37] Doku hasarı prostaglandinler, sitokinler, lökotrienler gibi mediyatörlerin hücrelerden salınmasına neden olur. Hastalığın nedeni olmayan, fakat bir sonuç olarak ortaya çıkan reaktif türler hastalık patolojisinde herhangi bir etkiye sahip midir sorusunun cevabı hastalıktan hastalığa, hastadan hastaya ve hastalığın fazlarına göre değişkenlik gösterir. Bazı durumlarda oksidatif stresin varlığı, hastalığın patolojisinde yarar sağlayabilir. Oluşan reaktif türler aracılığı ile antioksidan sistem aktive olarak, tamir mekanizmaları ve inflamasyonun düzenlenmesi yolu ile dokulardaki oksidatif stresi ortadan kaldırıp hastayı korumaya alabilir. Böylelikle doku hasarının sonucu olarak ortaya çıkan oksidatif stres hastalığın patogenezine

34 O'Neill, P., & Wardman, P. (2009). Radiation chemistry comes before radiation biology. *International Journal of Radiation Biology*, *85*(1), 9-25. https://doi.org/10.1080/095.530.00802640401.

35 Casas, A. I., Dao, V. T., Daiber, A., Maghzal, G. J., Di Lisa, F., Kaludercic, N., Leach, S., Cuadrado, A., Jaquet, V., Seredenina, T., Krause, K. H., López, M. G., Stocker, R., Ghezzi, P., & Schmidt, H. H. (2015). Reactive Oxygen-Related Diseases: Therapeutic Targets and Emerging Clinical Indications. *Antioxidants and Redox Signaling*, *23*(14), 1171-1185. https://doi.org/10.1089/ars.2015.6433.

36 Bardaweel, S. K., Gul, M., Alzweiri, M., Ishaqat, A., HA, A. L., & Bashatwah, R. M. (2018). Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. *Eurasian Journal of Medicine*, *50*(3), 193-201. https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2018.17397.

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

katkıda bulunmaz. Hücreler oksidatif strese poliferasyon artışı, savunma mekanizmalarında artış, transkripsiyon faktörlerinde artış, nekrotik hücre ölümü, apoptozis ve yaşlanma süreçleri gibi farklı mekanizmalar ile yanıt verir.

Ateroskleroz

Kardiyovasküler hastalıklar dünya genelinde ölümlerin ana nedenidir. Damar duvarında lokal kalınlaşmalar ile karakterize bir hastalık olan ateroskleroz damarların *tunica intima* katmanında gelişir. Erken safhalarında köpük hücre oluşumları görülür. Lipit yüklü olan bu hücreler genelde makrofajlardan ve düz kas hücrelerinden kaynaklanır. Damar duvarlarında bu köpük hücreler ve plaklar tıkanıklığa neden olur. Bu yapılar kalpte, beyinde ve vücudun çeşitli bölgelerinde kan akışını engelleyerek kalp sıkışması, kalp krizi gibi sorunlara yol açar. Ateroskleroz birçok faktör tarafından tetiklenen bir hastalıktır. Başlıcaları yüksek plazma LDL düzeyi, sigara tüketimi, diyabet, hipertansiyondur. Tüm bu faktörler oksidatif stres ve endotel dokunun fonksiyon kaybı ile ilişkilidir. [38] Ateroskleroza neden olan olaylardan biri de inflamasyondur. Aterosklerozun erken safhasında damar duvarlarında fagositlerin aktivitesi artar ve oluşan inflamasyon tromboza neden olur. Bu nedenle ateroskleroz damar duvarlarında oluşan bir kronik inflamasyon hastalık olarak da nitelendirilir. Nitekim C reaktif protein pro-aterosklerotik bir molekül olarak değerlendirilmektedir. [39]

Aterosklerozda lipit metabolizması önemli bir role sahiptir. Yağ tüketimi yüksek olan toplumlarda ateroskleroz çok erken dönemde ve insan yaşamının başlarında gelişebilir. Yağ metabolizmasında önemli rollere sahip düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) kolesterol bakımından çok zengindirler. LDL dokuların kolesterol ihtiyaçlarını karşılayan yapıdır, ancak aynı zamanda ateroskleroza neden olan moleküllerin başında gelir. Örneğin, ailesel hiperkolesterolemide LDL reseptörlerinde hasar söz konusudur. Bu bireylerin kan LDL düzeyleri çok yüksektir ve ateroskleroz çok hızlı gelişir. LDL miktarlarının neden olduğu yüksek kolesterol düzeyleri endotelde VCAM-1 miktarını artırır. Endotele lenfositlerin ve monositlerin tutunması kolaylaşır. Bu da inflamasyona neden olur. Ayrıca kolesterol kristalleri DAMP gibi etki gösterir. Lipit metabolizmasında varolan diğer bazı hasarlar da ateroskleroza neden olur. Örneğin ApoE protein hasarları kanda lipoprotein miktarlarının artışına yol açar.

38 Victor, V. M., Rocha, M., Solá, E., Bañuls, C., Garcia-Malpartida, K., & Hernández-Mijares, A. (2009). Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(26), 2988-3002. https://doi.org/10.2174/138.161.209789058093.

39 Singh, S. K., Suresh, M. V., Voleti, B., & Agrawal, A. (2008). The connection between C-reactive protein and atherosclerosis. *Annals of Medicine*, *40*(2), 110-120. https://doi.org/10.1080/078.538.90701749225.

ApoE proteinleri periferden geri dönen şilomikron ve lipoprotein kalıntılarının karaciğere giriş kapısı olarak düşünülebilir. Tüm bunların yanında yaşam stili ve beslenme alışkanlıkları ateroskleroz oluşumunda çok yüksek bir etkiye sahiptir. Fiziksel inaktivite, yüksek fruktoz alımı, yağ alımı, sigara tüketimi, fermente gıda tüketimi gibi etkenler hastalığın oluşmasında belirleyicidir.

- Ateroskleroz süreci vasküler endotel doku fonksiyonunun bozulması ile başlar. Vasküler endotel doku hasarı, damar duvarının enfeksiyonu, doğuştan gelen toksinler, ksenobiyotikler (sigara dumanı), normal metabolitlerin yüksek plazma düzeyleri, karbonhidrattan ve yağdan zengince beslenmenin neden olduğu oksidatif stres gibi nedenlerden dolayı hızlanabilir. Endotel dokusunun hasarı, LDL ile adezyon moleküllerinin damar duvarına geçişlerinin artmasına neden olur. Böylelikle damar duvarında inflamasyon gibi ateroskleroza yol açan faaliyetler baş gösterir ve ateroskleroz patogenezi tetiklenir. Oluşan endotel doku hasarından sonra LDL damar duvarına girer ve oksidasyona uğrar. Makrofajlar, normal yani okside olmamış LDL molekülleri için reseptörlere sahiptir. [40] Fakat okside olmuş LDL başka reseptörler ile tanınır. Bu reseptörler çöpçü (*scavenger*) reseptörler olarak bilinir. Okside LDL'nin makrofajlar tarafından alımı makrofaj hücresinin sitoplazmasında lipit birikimine neden olur ve sonrasında köpük hücre oluşumu gerçekleşir. Okside LDL, aterosklerotik etkilerini adezyon moleküllerinin ve NADPH oksidaz aktivitesinin artışı, NF-kB2 geninin uyarılması ve endotel doku bütünlüğünün bozulmasıyla gösterir. [41]
- Aktive olan monositler $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 ve $NO^{\bullet}$ üretirler. Damar duvarlarında reaktif türlerin bir diğer kaynağı mitokondriyal enzimlerdir. Özellikle miyeloperoksidaz ve ksantin oksidaz damar duvarlarına kolayca bağlanır ve aterosklerotik lezyonlarda yer alır. Reaktif türler direkt olarak LDL partiküllerini oksitlemezler, hatta $NO^{\bullet}$ peroksil radikallerini etkisiz hale getirerek anti-aterojenik etki yapar. Fakat $O_2^{\bullet -}$ ve H_2O_2 farklı yollardan ateroskleroz başlangıcında ve gelişiminde rol alabilir. ONOOH kolaylıkla LDL partiküllerini oksitler. Diğer reaktif azot türleri de fibrinojeni nitrilleyerek tromboz oluşumuna katkıda bulunur. MPO tirozin nitrillenmesini katalizler, HOCl üretir. Ayrıca antioksidan düzeylerini düşürür

40 Moore, K. J., Sheedy, F. J., & Fisher, E. A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature Reviews Immunology*, *13*(10), 709-721. https://doi.org/10.1038/nri3520.

41 Goyal, T., Mitra, S., Khaidakov, M., Wang, X., Singla, S., Ding, Z., Liu, S., & Mehta, J. L. (2012). Current Concepts of the Role of Oxidized LDL Receptors in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*. https://doi.org/10.1007/s11883.012.0228-1.

ve direkt olarak LDL yapısındaki apoprotein B moleküllerini oksitler. [42]

- LDL'nin oksitlenme mekanizmasında metal iyonları da yer alır. Makrofajlar, vasküler endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve lenfositlerin, demir ve bakır gibi metal iyonları ile inkübe edilmesinin oksitlenmiş LDL moleküllerini oluşturduğu gözlenmiştir. Metal iyonlarının $OH^{\bullet}$ üretimini hızlandırarak lipitlerin oksidasyonunu artırdıkları düşünülmektedir. Lipoksijenaz (LOX) enzimi de LDL'deki yağ asitlerinin yan zincirlerini oksitler. Peroksitlerin LOX ile radikallere ayrışması daha ileri oksitlenmelere zemin hazırlar. LOX enziminin susturulduğu çalışmalarda aterosklerozun azaldığı gözlenmiştir. Ateroskleroz lezyonlarından alınan örnekler incelendiğinde, birçok oksidatif, kloratif ve nitrozatif belirteçlerin varlığı gözlenmiştir. [43]
- Bilindiği gibi HDL-kolesterol 'iyi kolesterol' olarak adlandırılır. HDL molekülleri ters kolesterol taşınımı ile periferdeki hücrelerden kolesterolü alarak karaciğere taşırlar. Bu fonksiyonları onlara anti-aterojenik özellik kazandırır. HDL'nin anti-aterojenik etkileri sadece ters kolesterol taşınımı ile sınırlı değildir. Aynı zamanda LDL'den peroksitleri uzaklaştırarak anti-inflamatuvar etki gösterir. Bazı çalışmalarda okside LDL moleküllerinin HDL ile inkübe edilmesinin sitotoksik etkilerini azalttığı görülmüş, peroksitlenmiş lipit molekülleri LDL'den HDL'ye geçmiştir. Ancak HDL molekülleri de reaktif türler tarafından oksitlenebilir. Böylece vücut için iyi sayılan bir molekül hastalık sürecine katkıda bulunabilmektedir. [44]

Sonuç olarak ateroskleroz birçok faktör ve mekanizmanın karışık ilişkileri ile ortaya çıkan ve gelişen bir hastalıktır. Reaktif türlerin ve oksidatif stresin hastalığın patogenezinde önemli rollere sahip olduğu ve kilit faaliyetlerde bulunduğu kesindir. Önümüzdeki yıllarda yapılacak yeni araştırmalarla bu kompleks hastalığın mekanizması daha da aydınlatılacaktır.

Obezite

Dünya sağlık örgütü obeziteyi insan sağlığını tehlikeye atacak şekilde anormal yağ birikimi olarak tanımlar. Obezite birçok metabolik hastalık ve sendrom riskini oluşturabilecek bir durumdur.

42 Levitan, I., Volkov, S., & Subbaiah, P. V. (2010). Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxidants and Redox Signaling*, *13*(1), 39-75. https://doi.org/10.1089/ars.2009.2733.

43 Yoshida, H., & Kisugi, R. (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta*, *411*(23-24), 1875-1882. https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.038.

44 Navab, M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., & Fogelman, A. M. (2011). HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nature Reviews Cardiology*, *8*(4), 222-232. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.222.

Kardiyovasküler hastalıklar, tip 2 diabet ve bazı kanser biçimleri obeziteyle ilişkili hastalıklar arasında sayılabilir. Obezite artmış lipit ve protein oksidatif hasarı ile karakterizedir. [45] Adipoz dokuda artmış lipit ve protein hasarlarının glutatyon transferaz enzim aktivitesindeki azalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu durum lipit peroksidasyon sürecindeki ana ürünlerden HNE ve diğer aldehitlerin temizlenmesini zorlaştırır. Obez hastalarda adipoz dokuda HNE miktarları yüksektir ve HNE molekülü adipositlerde yağ birikimini indüklemektedir. [46] Oksidatif stresin oluşumunda obez insanların yeme davranışları çok önemlidir. Kötü diyet oksidatif strese neden olabilir. Hayvanlarda yüksek yağ içerikli diyetler oksidatif strese bağlı olarak karaciğere ve diğer organlara hasar verir ve ateroskleroz oluşumunu arttırır. İnsanlarda da yağdan zengin diyet, vasküler endotel dokuda fonksiyon bozukluğuna, mitokondriyal hidrojen peroksit üretiminin artışına ve kas dokusu proteinlerinin karbonillenmesine neden olur. [47, 48] Adipoz dokunun pro-inflamatuvar sitokinleri üreten bir endokrin organ olduğu da bilinmektedir. Buradan IL-1β, IL-6, MCP-1 ve TNF-α gibi bir dizi molekül salgılanır. Sitokinlerin salınımı ile reaktif oksijen türlerinin oluşumu arasında ilişki vardır. Reaktif oksijen türleri obezite için her zaman kötü değildir. Adipoz doku leptin hormonunu salgılar. Leptin hipotalamusta iştahı baskılayan bir moleküldür. Leptinin hipotalamus üzerindeki etkisinin reaktif oksijen türleri üretimi yolu ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Obez bireylerde genelde leptin direnci mevcuttur, reaktif oksijen türleri yeterli miktarda üretilmediğinden leptin doğal etki mekanizmasını gerçekleştirerek iştahı baskılayamaz. [49]

45 Nikolic, D., Katsiki, N., Montalto, G., Isenovic, E. R., Mikhailidis, D. P., & Rizzo, M. (2013). Lipoprotein subfractions in metabolic syndrome and obesity: clinical significance and therapeutic approaches. *Nutrients*, *5*(3), 928-948. https://doi.org/10.3390/nu5030928.

46 Mattson, M. P. (2009). Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Experimental Gerontology*, *44*(10), 625-633. https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.07.003.

47 Nair, D., Ramesh, V., & Gozal, D. (2012). Adverse cognitive effects of high-fat diet in a murine model of sleep apnea are mediated by NADPH oxidase activity. *Neuroscience*, *227*, 361-369. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.068.

48 Samocha-Bonet, D., Campbell, L. V., Mori, T. A., Croft, K. D., Greenfield, J. R., Turner, N., & Heilbronn, L. K. (2012). Overfeeding reduces insulin sensitivity and increases oxidative stress, without altering markers of mitochondrial content and function in humans. *PloS one*, *7*(5), e36320. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036320.

49 Dali-Youcef, N., Mecili, M., Ricci, R., & Andrès, E. (2013). Metabolic inflammation: connecting obesity and insulin resistance. *Annals of Medicine*, *45*(3), 242-253. https://doi.org/10.3109/07853.890.2012.705015.

Diyabet

Şeker hastalığı (*diabetes mellitus*) yüksek kan glukozu ve idrarda glukoz varlığıyla karakterizedir. Diyabet, insülin eksikliği veya insülinin etki mekanizmasındaki defektler nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanmadığı, sürekli tıbbi bakım gerektiren bir kronik hastalıktır. Metabolizmanın düzenlenmesinde insülin sinyal ileti yolağı çok önemlidir. İnsülinin metabolizmayı düzenleyici etkisi reaktif oksijen türlerini de içerir. [50] İnsülinin temel görevlerinden biri adipositlerin ve kas hücrelerinin glukoz alımlarını kolaylaştırarak kan şeker düzeylerini düşürmektir. Kontrol altına alınmayan diyabet vakalarında mikrovasküler hastalıklar, ateroskleroz, böbrek yetmezliği, periferik sinir sisteminde hasar, katarakt gibi sorunlar ortaya çıkar.

Diyabetin en yaygın şekli olan tip 2 diyabette plazma insülin düzeyleri normal veya yüksektir. Fakat dokuların insüline olan yanıtlarında azalma mevcuttur, bu durum insülin direnci olarak bilinir. İnsülin direncinin birçok nedeni olabilir. Kas ve adipoz dokularında insülin direnci nedeniyle insüline yanıt hiç yokken, karaciğerin insüline karşı yanıtı çok azdır. Karaciğer insüline rağmen glukoz üretimine devam eder. Bu durum zaten yüksek olan kan glukoz düzeylerini daha da artırır. Pankreasın Langerhans adacıklarındaki β-hücreleri yüksek kan glukozunu tespit eder ve daha fazla insülin yapımını sağlar. Fakat sonunda β-hücrelerinde yorgunluk ve ölüm tetiklenir. Ölümlerin bir nedeni hiperglisemiden kaynaklanan oksidatif strestir. Bazı diyabetojenik ilaçların da β-hücrelerinde oksidatif strese katkıda bulunduğu bilinmektedir. Obez olmayan-diyabetik fareler ile yapılan bir çalışmada, reaktif oksijen türlerinin diyabet oluşumuna katkısı açıkça gösterilmiştir. Bu hayvanların β-hücrelerinde otoimmün bir atak ile birlikte saldırıda bulunan fagositler tarafından reaktif türlerin oluşturulduğu gözlenmiştir. Tip 1 diyabet hastalığı ise bir kronik otoimmun hastalıktır. Reaktif türlerin bu hastalığın patogenezindeki rolleri tam olarak bilinmemekle birlikte, bu hastalarda da artmış oksidatif stres bulunmaktadır. [51] Diyabetik hastalarda plazma F2-isoPG, okside-LDL, lipit peroksitleri ve protein karbonil düzeyleri yüksektir. Ayrıca birçok hastada DNA oksidasyon ürünleri de yüksek olarak saptanmıştır. Oksidatif stresin olası kaynaklarından biri glukozun içeriye alınamaması sonucu dokularda yağ oksidasyonunun tercih edilmesidir. Peroksizomlarda

50 Besse-Patin, A., & Estall, J. L. (2014). An Intimate Relationship between ROS and Insulin Signalling: Implications for Antioxidant Treatment of Fatty Liver Disease. *International Journal of Cell Biology*, *2014*, 519153. https://doi.org/10.1155/2014/519153.

51 Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins, J. B., 3rd. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *17*(1), 24-38. https://doi.org/10.1002/jbt.10058.

artmış lipit oksidasyonu hidrojen peroksit oluşumuna neden olur. Ayrıca yağdan zengin beslenme sonucu mitokondrilerde süperoksit radikali oluşumu artar. Hipergliseminin oksidatif stresle ilişkisini araştıran çalışmalarda, birçok farklı hücrenin yüksek glukoz ile inkübasyonu sonrasında reaktif türlerin üretimi artmış, mitokondri fonksiyonlarında bozukluklar ve süperoksit kaçağı gözlenmiştir. Aşırı miktardaki glukozdan dolayı çok fazla NAD^+ molekülünün NADH'ye indirgenmesiyle mitokondri elektron taşıma zincirinin kapasitesinin zorlanması ve elektron kaçaklarının meydana gelmesi söz konusudur.

İskemi ve reperfüzyon

Kan akışının durması ve dokuların kanın sağladığı oksijenden mahrum kalması sonucu oluşan iskemi doku hasarına neden olur. Dünyadaki ana ölüm nedenlerinden biridir. [52] İskemi sebeplerinin başında ateroksklerotik lezyonların oluşumu, trombozun tetiklenmesi ve yaşamsal damarların tıkanması gelmektedir. Ayrıca, kan akışındaki azalma dokularda metabolik atıkların birikimine yol açmaktadır. Dokuların iskemiye dayanıklılığı farklılık gösterir. Dokular oksijen eksikliğine birkaç farklı şekilde yanıt verebilir. Erken dönemde, iskemiye uğrayan hücreler glikojen yıkımını uyararak oksijensiz solunum ile ATP düzeylerini yüksek tutmaya çalışırlar. Sonuç olarak asidoz oluşur. İskemi uzun süreli olduğunda ise ATP düzeyleri düşer ve AMP düzeyleri yükselir. Hücrenin iyon dengesi bozulur, AMP parçalanır ve hipoksantin birikir. Sonrasında, hücre içi kalsiyum düzeyleri yükselir ve yükselen kalsiyum proteinazları, fosfolipazları ve nitrik oksit sentazları aktive eder. Ayrıca, oksijen siklooksijenaz ve nitrik oksit sentaz enzimlerinin substratı olduğundan NO sentezi bloke durumdadır. İskemi süresi dokuda hasar oluşturacak kadar uzun değil ise, reperfüzyon yolu ile oksijen ve besinler tekrardan dokuya verilir. Reperfüzyon yararlı olmakla birlikte, oksijenin tekrar sağlanması süperoksit ve hidroksil radikalleri oluşturarak dokuya farklı açıdan zarar verebilir. [53]

- İnce bağırsak iskemisi insanlarda öldürme oranı yüksek bir hadisedir. Kan akışının bağırsaklara ulaşamaması septik şoka, tromboza ve bağırsağın gerilmesine sebebiyet verir. Beyinden sonra iskemiye en hassas organ bağırsaklardır. İskemi

52 Wang, F., Yu, Y., Mubarik, S., Zhang, Y., Liu, X., Cheng, Y., Yu, C., & Cao, J. (2021). Global Burden of Ischemic Heart Disease and Attributable Risk Factors, 1990-2017: A Secondary Analysis Based on the Global Burden of Disease Study 2017. *Clinical Epidemiology*, *13*, 859-870. https://doi.org/10.2147/clep.S317787.

53 Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *298*, 229-317. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394309-5.00006-7.

buradaki hücrelere kolaylıkla zarar verebilir. Bağırsak mukus tabakasını bozar, vililere hasar verir. Ayrıca bakterilerin ve endotoksinlerin kana girişine izin verir. [54]

- Kalp kası türüne bağlı olarak 60-90 dakika arası iskemiye dayanabilir. Bazen kalp krizi hiperglisemi ile ilişkilidir. Hiperglisemi ise reaktif oksijen türü üretiminin potansiyel kaynağıdır. Kardiyak iskemisinin araştırılması için yapılan deneysel çalışmalarda, iskemi sonrası reperfüzyonun oluşturduğu etkilerin hayvanın türüne, yaşına ve deney protokolüne göre farklılıklar gösterdiği gözlenmiştir. İskemi sonrası kalp kasında mitokondriyal hasarlar oluşur, elektron kaçakları ile CYP enzimlerinden kaynaklanan radikal oluşumu gözlenebilir. Bunun yanında oksijen yokluğunda biriken hipoksantin de reaktif türlerin oluşumuna neden olarak dokuyu daha ileri hasara uğratabilir. [55]
- Retina her zaman oksijene ihtiyaç duyar, oksijen düzeylerindeki herhangi bir düşüşe çok duyarlıdır. Hayvanlarda iskemik bir retinaya reperfüzyon uygulandığında reaktif oksijen türü üretimi gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu üretimin NADPH oksidaz aktivitesi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Bu enzim bir tür göz hasarı olan glokomun tedavi edilmesinde hedef olarak belirlenebilir. Ayrıca, NOX2 defektli farelerde reperfüzyon sonrası oluşan hasarın daha az olduğu gösterilmiştir.
- Uyku apnesi uyku esnasında hava yollarının tıkanması sonucu hipoksi oluşmasıdır. Birçok insan uyku apnesi ile karşı karşıya kalır. Uyku apnesinden dolayı insanların ani gece ölümleri yaşadıkları bilinmektedir. Uyku apnesinin tek kötü tarafı verimli uyku deneyiminin bozulması değildir. Hipoksi sonrası insanlar uyanır ve tekrar nefes alırsa oksijen basıncında artış gerçekleşir. Uyku apnesi hipertansiyona, kalp krizine, inmeye ve nöronal ölüme sebebiyet verebilir. Bütün bu süreçlerde reaktif oksijen türleri yer alabilir. Uyku apnesine neden olan yüksek tansiyon ve obezitenin oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir. [56] Uyku apnesi yaşayan fakat obez olmayan hastalarda da oksidatif stres düzeyleri

54 Arsalani-Zadeh, R., Ullah, S., Khan, S., & MacFie, J. (2011). Oxidative stress in laparoscopic versus open abdominal surgery: a systematic review. *Journal of Surgical Research*, *169*(1), e59-68. https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.01.038.

55 Su, H., Ji, L., Xing, W., Zhang, W., Zhou, H., Qian, X., Wang, X., Gao, F., Sun, X., & Zhang, H. (2013). Acute hyperglycaemia enhances oxidative stress and aggravates myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of thioredoxin-interacting protein. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *17*(1), 181-191. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01661.x.

56 Lavie, L. (2015). Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia—revisited—the bad ugly and good: implications to the heart and brain. *Sleep Medicine Reviews*, *20*, 27-45. https://doi.org/10.1016/j.smrv.2014.07.003.

artmış bulunmuştur. Bu gözlem uyku apnesinin kendi başına oksidatif hasar oluşturduğunu öngören bakış açısıyla uygunluk göstermektedir.

Organ nakli

Organların korunması aşaması ile nakil operasyonunun kendisi organ naklinde gözlenen reperfüzyon hasarının başlıca nedenleri arasındadır. Organ koruma sıvıları nakledilecek organları korumak üzere içine çeşitli koruyucu bileşenlerin eklendiği sıvılardır. Organ koruma sıvılarına ozmotik dengeyi korumak ve hücrelerin şişmesini engellemek için ozmotik bir ajan olan mentinol ile etkili bir antioksidan olan GSH eklenmektedir. [57] Organ naklini takiben reperfüzyon gerçekleştiğinde, organdaki ölmüş ya da hasarlı hücreler dolaşıma bazı toksinleri salarlar. Bu da inflamasyona neden olur. Ayrıca nakledilmiş dokuya immün cevap yaratılabilir. İmmün cevap şiddetli ise doku vücut tarafından reddedilir ve fagositozlar aracılığı ile reaktif türler üretilir. Yeni nakledilen kalplerde konağın immün yanıtının katkısıyla ateroskleroz geliştiği, buna karşılık kalp nakli olan hastalara antioksidan verildiğinde aterosklerozda düşüş olduğu gözlenmiştir. Böbrekler ise iskemiye sadece otuz dakika dayanabilmektedir. Hipoksik koşullarda böbreklerde fonksiyon bozukluğu yaşanır. Nakledilecek böbreklerin SOD ile ön işlem görmesinin, nakil sonrası reperfüzyonun yarattığı hasarlarda azalmaya neden olduğu ve böbrek fonksiyonlarını daha kısa sürede gerçekleştirmeye katkı yaptığı gözlenmiştir. Böbrek nakillerinde de nakledilen böbrek konağın bağışıklık sistemi tarafından saldırıya uğrayabilir, reaktif türlerin oluşumu ve transplantın reddi gerçekleşebilir. Septik ve hemorajik şok yanı sıra karaciğer nakillerinde karaciğer iskemisi de sıklıkla görülen bir durumdur. Karaciğerin soğuk korunma koşulları altında muhafaza edilmesi, endotel hücrelerini ve hepatositleri hasara açık hale getirir. Bunun nedenleri arasında demir havuzunda azalma ve reperfüzyonla birlikte hızlanmış reaktif oksijen türü üretiminin yol açtığı hasar da yer alır. Karaciğer nakli olan hastalarda GSH düzeylerinin düşük olduğu ve idrarda F2-IsoPG atılımının arttığı bulunmuştur. Reperfüze olmuş karaciğerde oksidatif stres kaynakları olarak hasarlı mitokondrilerden fazla miktarda $O_2^{\bullet -}$ salınması, nötrofillerin çağrılması ve aktive olması, sitokrom P450 enzimlerinden $O_2^{\bullet -}/H_2O_2$ üretimi ve Kupffer hücrelerinin aktive olması sayılabilir. [58] Pankreas nakillerinde görülen iskemi ve reperfüzyon hasarlarında da reaktif

57 Evans, P. J., Tredger, J. M., Dunne, J. B., & Halliwell, B. (1996). Catalytic metal ions and the loss of reduced glutathione from University of Wisconsin preservation solution. *Transplantation*, *62*(8), 1046-1049. https://doi.org/10.1097/00007.890.199610270-00002.

58 Czubkowski, P., Socha, P., & Pawlowska, J. (2011). Oxidative stress in liver transplant recipients. *Annals of Transplantation*, *16*(1), 99-108.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

oksijen türü üretiminin arttığı görülmüştür. Akciğer naklinde, donörden alınıp konağa takılana kadar geçen sürede iskemi gelişir. İskemiden sonraki reperfüzyon $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 üretiminin artmasına neden olur. Bu artış NADPH oksidaz enziminin aktivitesindeki artış ile birlikte gerçekleşir. Artmış $O_2^{\bullet-}$ $NO^{\bullet}$ üretimini düşürürken $ONOO^-$ üretimini artırır. Akciğer naklinde karşı karşıya kalınan en büyük problem inflamasyon, nötrofil infiltrasyonu, enfeksiyon ve fibrozisdir. Fibrozis obliteratif bronşiyolite neden olarak akciğerin fonksiyonlarını yerine getirmesine engel olur. Akciğer naklinden sonra ölümlerin çoğu bundan dolayıdır. Obliteratif bronşiyolit patolojisinde demir birikimi ile $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 oluşumu büyük rol oynar. Akciğer nakli gerçekleşen hastalarda antioksidan düzeylerinin düşük olduğu bildirilmiştir. Antioksidan düzeylerindeki düşüşün reaktif türlerin artışı ve inflamasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Akut solunum yetmezliği sendromu (ARDS) akciğerlerde alveol kılcal bariyer fonksiyonunun bozulması ile ortaya çıkan pulmoner ödemin O_2 alımına gösterdiği direnç olarak tanımlanır. ARDS hastalığında akciğerlerde nötrofiller ve nötrofillerin sentezlediği ürünler, adezyon molekülleri, makrofaj kaynaklı sitokinler ile diğer fagositik hücreler ve aktive kompleman sistemi yüksek miktarlarda bulunur. Birçok araştırıcı fagositler tarafından üretilen reaktif türlerin akciğer hasarında etkili olduğunu ileri sürmektedir. ARDS hastalarında makrofajlar DAMP ve PAMP yanıtı oluşturarak reaktif türlerin yapımını tetikler ve dokuya nötrofillerin çağrılmasına neden olur. Bu hastalığın patolojisinde mitokondri ve ksantin oksidaz aktivitelerinden kaynaklı reaktif türler de mevcuttur. [59] ARDS vakalarında oksidatif hasarın yarattığı hasar mevcut olmasına karşın, oksidatif strese yönelik çalışmalar bu hastalığın tedavisinde hayal kırıklığı yaratmıştır. ARDS hastalarının plazmasında hücresel $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 üretimini artıran TNF-α düzeyleri yüksek bulunmuştur.

Kistik fibrozis

Beyaz ırkta yaygın görülen bir genetik hastalıktır. Yedinci kromozomda bulunan ve protein kodlayan bir gende meydana gelen anormallikler sonrası ortaya çıkar. Bu gende iki bine yakın mutasyon tespit edilmiştir. En çok görülen mutasyon, gendeki 3 bazın delesyonu sonucu proteinin 508. fenilalanin kalıntısında ortaya çıkar. Bu mutasyon sonucunda yanlış katlanmış proteinler oluşur, bu proteinler plazma membranındaki fonksiyonlarını yerine getirmeksizin endoplazmik retikulumda kalır ve endoplazmik retikulum stresine neden olurlar. Etkilenen protein olan iletkenlik

59 Kellner, M., Noonepalle, S., Lu, Q., Srivastava, A., Zemskov, E., & Black, S. M. (2017). ROS Signaling in the Pathogenesis of Acute Lung Injury (ALI) and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *967*, 105-137. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2_8.

düzenleyici kistik fibrozis transmembran proteini (CFTR), ATP hidrolizi ile Cl^-, HCO_3^-, tiyosiyanat gibi anyonların ve GSH moleküllerinin taşınmasından sorumludur. Kistik fibroziste bu proteindeki defektten dolayı elektrolitlerin ve suyun epitel dokular arasında taşınımında sorunlar vardır. Kistik fibrozis hastalarında plazma β-karoten düzeyleri de düşüktür. Karotenoidler vücut için önemli antioksidanlardandır. Bu molekülün miktarının ölçülmesi ve oksidasyon derecesinin belirlenmesi önemli bir tanı aracıdır. Kistik fibrozisdeki oksidatif stresin önlenmesinde antioksidan tedavi önerilmektedir. [60]

Otoimmün hastalıklar

Akut inflamasyon cevabı tehlikeli patojenlerin vücuttan elimine edilmesinde yaşamsal öneme sahiptir. Normalde inflamasyon kendi kendini sınırlayan bir sistemdir, ancak anormal bir durumdan dolayı uzamış şiddetli inflamasyon cevapları dokulara hasar verir. Sürekli inflamasyon astım, kanser, Alzheimer hastalığı ve iskemi-reperfüzyona zemin hazırlar. Otoimmün hastalıklarda artmış fagosit ve lenfosit aktiviteleri vardır. Örneğin, Tip 1 diyabette lenfositlerin otoantikor üretmeleri insülin üreten hücrelerin ölmesine neden olur. Lenfositlerin ve nötrofillerin artmış aktiviteleri sonucunda pankreasta oksidatif stres meydana gelir. Reaktif oksijen türleri ve otoimmün hastalıklar arasındaki ilişki uzunca bir süredir dikkat çekmektedir, ancak reaktif türlerin oluşumunun artması ve oksidatif stres doku hasarlarında etkileri olduğunu kanıtlamaz. Hatta reaktif türler zaman zaman inflamasyonu baskılayıcı etki yapar. Bu nedenle antioksidan tedavilerin yararları tartışmalıdır, bazı durumlarda zararlı etkileri olabilir. [61] Hayvan modellerine SOD takviyesi yapıldığında ve diğer antioksidanlar uygulandığında akut ve kronik inflamasyonda düşüş tespit edilmiştir.

- Romatoid artrit eklemlerde bulunan kronik bir inflamasyon durumudur. El ve ayakları simetrik tutan eklemlerde inflamasyon mevcuttur. Bu durum sadece küçük eklemlerle sınırlı kalmayıp inflamasyon daha büyük eklemlerde de gerçekleşebilir. Hastalıkta T ve B lenfositleri önemli rol oynar ve vücudun kendi yapılarına karşı antikor üreterek otoimmün cevabı tetikler. Romatoid artrit hastalarında IgG otoantikorları yüksek düzeylerdedir. Ayrıca IgG reaktif türler

60 Galli, F., Battistoni, A., Gambari, R., Pompella, A., Bragonzi, A., Pilolli, F., Iuliano, L., Piroddi, M., Dechecchi, M. C., & Cabrini, G. (2012). Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1822*(5), 690-713. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.012.

61 Maccarrone, M., & Brüne, B. (2009). Redox regulation in acute and chronic inflammation. *Cell Death & Differentiation*, *16*(8), 1184-1186. https://doi.org/10.1038/cdd.2009.65.

tarafından hasara uğratılır ve saldırı hedefi oluşturabilecek yeni antijenler ortaya çıkar. Reaktif türler diğer hastalıklarda olduğu gibi romatoid artritin patolojisinde de hem iyi hem de kötü rollere sahip olabilir. [62] Reaktif türlerin proteinlere zarar vermeleri, yeni antijenler oluşturmaları ve inflamasyonu tetiklemeleri kötü etkilerine örnek olarak verilir. İyi yanları ise inflamasyonu baskılayıp hastalığın daha fazla ilerlemesini engellemek ve vücudun kendi yapılarına karşı olan otoimmün atakları azaltmaktır. Romatoid artrit tedavisinde siklooksijenaz inhibitörleri kullanılır. Ek olarak lenfosit poliferasyonunu kontrol eden metotreksat hastalığın tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Kortikosteroidler de inflamasyonu baskıladıkları için hastalığın tedavisinde tercih edilen ajanlar arasındadır. Reaktif türlerin toplanmasını ve etkisiz hale getirilmesini sağlayan diğer ilaçlar da hastalığın patogenezini durducu etki gösterirler.

- İnflamatuar bağırsak hastalığı (*Inflammatory bowel disease*, IBD), Crohn hastalığı ve ülseratif kolit doku hasarlanmalarında reaktif türler rol sahibidir. [63] Doku hasarı ve uzamış inflamasyon süreci, nötrofil, monosit ve lenfositlerin çağrılması ve aktivasyonunu, inflamazom oluşumunu, sitokinler, eikosanoitler, proteinazlar ve reaktif türlerin fazla miktarda üretimini içerir. Hastalığın patogenezinde epitel hücrelerde ve fagositlerde NF-kB aktivasyonu artmıştır. Deneysel modellerden ve hastalardan alınan örneklerle yapılan immunositokimyasal çalışmalar nitrotirozin moleküllerinin varlığını kanıtlamıştır. Ancak artmış $NO^{\bullet}$ üretimi tam da kötü olarak algılanmamalıdır. Çünkü artmış $NO^{\bullet}$ üretimi inflamasyon bölgesine fagosit çağrılmasını ve adezyon moleküllerinin sentezini azaltıcı etki yapmaktadır. GPx1 ve GPx2 defekti bulunan transgenik farelerle yapılan bir çalışmada, potansiyel inflamasyon ve kanserin doğal olarak ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. IBD hastalarında GSH düzeyleri düşük iken F2-IsoPG plazma düzeyleri yüksektir. Ülseratif kolitli bireylerde kanser riskinin yüksek olmasının reaktif türlerin DNA hasarına yol açmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. [64] IBD

62 Halliwell, B. (1995). Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Annals of Rheumatic Diseases*, *54*(6), 505-510. https://doi.org/10.1136/ard.54.6.505.

63 Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2011). Redox biology of the intestine. *Free Radical Research*, *45*(11-12), 1245-1266.

64 Mangerich, A., Dedon, P. C., Fox, J. G., Tannenbaum, S. R., & Wogan, G. N. (2013). Chemistry meets biology in colitis-associated carcinogenesis. *Free Radical Research*, *47*(11), 958-986. https://doi.org/10.3109/10715.762.2013.83

tedavisinde kullanılan ilaçlardan biri olan sülfasalazinin aktif şekli, $OH^{\bullet}$, ONOOH ve HOCl gibi moleküllerin güçlü tutucularından olan 5-aminosalisilattır. Yapılan *in vivo* çalışmalar bu molekülün NF-kB yolağını inaktive ettiğini göstermiştir. Fakat metabolizması sonrasında oluşan oksidatif ürünlerin proteinlere saldırılarda bulunarak hasara neden olduğu da bilinmektedir.

- Çölyak hastalığı da ince bağırsakta meydana gelen otoimmün bir hastalıktır. Bu hastalıkta diyetle alınan gluten gibi proteinlere karşı otoimmün ataklar gerçekleşir. İnflamasyon reaktif oksijen türlerinin artmasına, antioksidan düzeylerinin azalmasına ve idrarda 8-OH-dG artışına neden olur. Günümüzde bu hastalığa karşı farkındalık artmıştır. Birçok insanın sindirim sisteminin glutene duyarlı olduğu bir gerçektir. Yapılan hayvan deneyleri ve biyopsi sonuçları ile elde edilen bilgilerin toplumu gluten içermeyen ürün tüketimine yönelttiği dikkat çekmektedir. [65]

- Pankreasta meydana gelen inflamasyona bağlı bir hastalık olan pankreatit, yoğun ağrıların yanında pankreas dokusunun bozulmasına neden olur. Pankreatit iskemi, yoğun alkol tüketimi ve hemorajik şok gibi etkenlerden dolayı ortaya çıkar. Pankreatitin patogenezinde sitokin üretimi ile NF-kB aktivitesi, adezyon molekülleri ve iNOS rol alır. Reaktif türler de tabloya önemli derecede katkıda bulunur. [66] Askorbat, selenyum, β-karoten, α-tokoferol ve metiyonin içeren antioksidan karışımın verilmesi ile kronik pankreatite sahip hastalarda ağrıda önemli derecede azalma olduğu gösterilmiştir. [67]

2239.

65 Ferretti, G., Bacchetti, T., Masciangelo, S., & Saturni, L. (2012). Celiac disease, inflammation and oxidative damage: a nutrigenetic approach. *Nutrients*, *4*(4), 243-257. https://doi.org/10.3390/nu4040243.

66 Shi, C., Andersson, R., Zhao, X., & Wang, X. (2005). Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. *Pancreatology*, *5*(4-5), 492-500. https://doi.org/10.1159/000087063.

67 Pezzilli, R. (2012). Antioxidants for intractable pain in chronic pancreatitis patients. Is the end of the story? *Journal of the Pancreas*, *13*(4), 461-463. https://doi.org/10.6092/1590-8577/979.

Yaşlanma ve Nörolojik Hastalıklar

Nalan Sümeyra Korkmaz*
A. Süha Yalçın*

Yaşlanma, canlının fizyolojik fonksiyonlarındaki azalma ve aşırı moleküler oksidasyona bağlı olarak metabolik ürünlerin birikmesi ile gelişen karmaşık ve çok değişkenli bir süreçtir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından, fizyolojik olarak her canlıda görülen bu sürecin başlangıç yaşı 60 olarak belirlenmiştir. Yaşlılıkta organizmanın biyolojik fonksiyonunda geri dönüşümsüz bir azalma meydana gelir. Fizyolojik fonksiyonlarda meydana gelen azalma ve çevresel stres, hastalıklara olan hassasiyeti de artırır. Memelilerde temel belirtiler hareketlilikte kısıtlanma, derinin elastikiyetinde ve bağışıklık yanıtında azalma ile hastalık ve ölüm riskinin artmasıdır. Biyolojik yaşlanmanın hızı ve biçimi, yaşam tarzı alışkanlıkları, çevresel koşullardaki farklılık ve bu koşullara yanıt olarak gelişen biyokimyasal, metabolik ve immünolojik süreçler tarafından belirlenir. Yaşlılık moleküler düzeyde serbest radikal oluşumu, DNA hasarı ve DNA tamir enzimlerinin artışı ile de ilişkilidir. [1, 2]

Yaşlanma mekanizmaları

Yaşlanma hücre içinde zararlı değişikliklerin ortaya çıkması ve birikmesi olarak tanımlanır. Bu değişikliklerden ön planda olanlar oksidatif stres, onkogen ekspresyonunun artışı ve telomerlerin kısalmasıdır. [3] Oksidatif stres yaşlılığa neden olan çeşitli sinyal yollarını ve DNA hasar yanıtını aktifleştirir. Yaşlı hücrelerin sürece etkileri şöyledir:

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

1 Gladyshev, V. N. (2014). The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! *Antioxidants and Redox Signaling*, *20*(4), 727-731. https://doi.org/10.1089/ars.2013.5228.

2 Barja, G. (2004). Free radicals and aging. *Trends in Neurosciences*, *27*(10), 595-600. https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.07.005.

3 Saretzki, G., & Von Zglinicki, T. (2002). Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *959*, 24-29. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02079.x.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

- Yaşlanmış hücrelerin birikmesi, hücrelerin kendi kendini yenileyebilme özelliğini azaltarak doku fonksiyonunun azalmasına neden olur.

- Parçalayıcı enzim seviyelerinin, epitel büyüme faktörlerinin ve inflamatuvar sitokinlerin artması doku fonksiyonuna ve yapısına zarar verir.

- Reaktif türlerin (RT) aşırı artması, antioksidan savunma sistemlerinin fonksiyonlarının bozulması ve DNA onarımında azalma sonucunda DNA hasarı ortaya çıkar.

Telomerler: Ökaryotik hücrelerdeki kromozomların uçlarında bulunan DNA parçalarına telomer denir. Telomerler telomeraz enzimi tarafından üretilirler ve insanlarda altı adet bazın (TTAGGG) çoklu tekrarından oluşan DNA dizileri şeklindedir. Telomerler sayesinde kromozomların fiziksel yapıları korunur ve genomik stabilite sağlanır. Telomerlerin uzunluğu her hücre bölünmesinde kısalır ve belli bir kısalmadan sonra da hücre bölünmesini sağlayamayacak hale gelir. Böylelikle hücreler yaşlılık sürecine girer. Kromozomal bölünmelerde telomerlerden 200 civarında baz çifti kaybolmaktadır. Telomerler olmasaydı her replikasyonda DNA kaybı olurdu. Laboratuvar ortamında insan fetüs fibroblast hücreleri kültürlendiğinde en fazla 50 kez bölündüğü gözlenmiştir. Buna Hayflick limiti adı verilir. Hücreler bu sınıra ulaştığında mitojen reseptörlerine sahip olmalarına rağmen mitojenlere yanıt vermezler. Yaşlanmış insan hücreleri incelendiğinde telomer uzunluklarının yaklaşık yarısının kısalmış ve oksitlenmiş olduğu, ubikitinleşmiş proteinlerin biriktiği ve proteazom aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Bu nedenle, yaşlanma sürecinde gelişen telomer kısalmasının hücrelerin çoğalma potansiyelleri için bir "moleküler saat" olduğu öne sürülmüştür. Telomerlerin uzunluklarını ve onların kısalmasını etkileyen genler yaşlanma sürecini hücresel düzeyde etkiler. Hücrelere düşük oranda hidrojen peroksit uygulandığında telomer kısalması hızlanır. Bunun sonucu olarak replikatif ömür uzunluğu da azalır. Oksidatif hasarın telomer kısalmasına etkisi uç replikasyon probleminin tek başına etkisinden daha fazladır. Hücresel yaşlanma ile telomer kısalması arasındaki oran antioksidan savunma ve oksidatif stres arasındaki dengeyle ilişkilendirilmiştir. Yaşlanma sürecinde reaktif oksijen türleri (ROT) yapımı aşırı artmaktadır. Bunların DNA, protein ve lipitlere zarar vermeleri sonucunda da DNA hasarı, hücre bölünmesinin durması, kontrolsüz çoğalma ve lipit peroksidasyonu ile hücre membran yapısının zarar görmesi gibi etkiler ortaya çıkar. Antioksidan moleküller ve enzimler aracılığıyla bu zararlı etkilere

karşı korunma sağlanır. Yaşla beraber antioksidan enzimlerinin sentezinin azalması da oksidatif stres ve hasarı artırmaktadır. [4]

Yaşlanma teorileri

Yaşlanma süreci moleküler seviyeden organ sistemlerinin fonksiyonel seviyelerine kadar geniş bir alanda meydana gelen değişiklikleri kapsar. Önce moleküler düzeydeki mekanizmalarda ortaya çıkan değişiklikler, hücresel değişikliklere yol açabilir ve böylece yaşamın devamı için evrimsel sonuçlar ortaya çıkar. Yaşlanma karmaşık bir süreç olduğundan tek bir mekanizma ile açıklanamaz. Yaşlanmayı açıklayan teoriler üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar genetik, nöro-endokrin ve hasar-birikim teorileridir. Ayrıca bu teorilerdeki tüm mekanizmalar birbirleriyle ilişkilidir. [5]

Serbest radikal teorisi: Denham Harman tarafından 1956 yılında öne sürülen serbest radikal teorisi çok uzun yıllardır yaşlanmanın ana teorisi olarak kabul edilmektedir. [6] Bu teoriye göre, hücrede yaşla beraber serbest radikallerin birikmesi biyomoleküllere zarar vererek hücrelerin ve organizmaların yaşlanmasına kadar ilerleyen patolojik bozuklukların oluşmasına neden olur. Oksidatif metabolizma sonucu üretilen serbest radikaller hücrelerde DNA, protein ve lipit yapılarına zarar vermektedir. Böylelikle doku ve organlarda serbest radikallerden kaynaklanan oksidatif hasar birikimi yaşlanmayla sonuçlanır. Harman'ın hipotezi, serbest radikal miktarının yaşlı hücrelerde ve organizmalarda fazla olduğunu gösteren birçok çalışmayla doğrulanmıştır. Harman ve diğer bilim insanları sonraki çalışmalarında serbest radikallerin üretildiği ve aynı zamanda hasarın gerçekleştiği lokasyon olan mitokondri üzerine yoğunlaştılar. Mitokondri DNA'sında oluşan hasarın, fonksiyon bozukluğuna neden olarak tüm hücreyi etkilediğini öngören mitokondri yaşlanma teorisini önerdiler. Günümüzde reaktif türlerin bir kısmının serbest radikal olmadığı bilinmektedir. Harman'ın teorisi "reaktif türlerin yaşlanma teorisi" ya da "yaşlanmanın oksidatif hasar teorisi" şeklinde yeniden isimlendirilmelidir. Antioksidan savunma sistemi reaktif türleri her zaman tamamen ortadan kaldırmaz. DNA, protein ve lipitlerde görülen oksidatif hasar, yaşlanma süreciyle ilişkili birçok hastalığı tetikler. Lipit peroksidasyonuna neden olan reaktif türler hücre zarının geçirgenliğini etkileyerek hücrede birçok

4 Peng, C., Wang, X., Chen, J., Jiao, R., Wang, L., Li, Y. M., Zuo, Y., Liu, Y., Lei, L., Ma, K. Y., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2014). Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *BioMed Research International*, *2014*, 831841. https://doi.org/10.1155/2014/831841.

5 Jin, K. (2010). Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease*, *1*(2), 72-74. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21132086.

6 Wickens, A. P. (2001). Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology*, *128*(3), 379-391. https://doi.org/10.1016/s0034-5687(01)00313-9.

fonksiyonun bozulmasına yol açarlar. Çoklu doymamış yağ asitleri hücre zarlarının ana bileşenlerindendir ve serbest radikallere karşı savunmasızdır. DNA'da oluşan hasarlar DNA zincirinin kopması, baz hidroksilasyonu, bazların kesilip çıkarılması ve çapraz bağlanma gibi değişikliklerdir. DNA hasarının artışı sonrasında hücrelerde apoptoz oluşmazsa mutajenez ve ardından transformasyon ortaya çıkar. Öte yandan, aromatik amino asitler ile sistein ve disülfit bağları serbest radikallerin etkisine karşı hassastır. Bu durum protein yapısının zarar görmesine ve enzim aktivitelerinin bozulmasına neden olabilir. Vücutta serbest radikallerin bu tehlikeli etkilerini engellemeye yardımcı enzim yapısında doğal antioksidanlar bulunmaktadır. Süperoksit anyonlarını temizleyen süperoksit dismutaz (SOD) enzimi bunlardan biridir. [7] Transgenik Drosophila sinekleri üzerindeki çalışmalar, SOD eksprese eden bu sineklerin ömrünün arttığını ve enzimin yaşlanmayı geciktirmek için yeterli olduğunu göstermiştir. Benzer sonuçlar, C. elegans ile yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar bu kısa ömürlü canlıların uzun ömürlü olmasını engellerken, memeliler gibi daha uzun ömürlü canlılarda durum biraz daha farklıdır. Kemirgenlerde SOD'un aşırı ekspresyonu yaşam süresini değiştirmez. Farelerde diyet kaynaklı antioksidanların etkisiyle oksitlenmiş moleküllerin azaldığı ancak yaşam sürelerinin uzamadığı gözlenmiştir. Buna karşılık SOD mutasyonlarına sahip olan bireyler erken ölmektedir.

Ölümcül hata: Yaşlanmayla birlikte gen transkripsiyonunda ve protein sentezinde meydana gelen hataların artışıyla birlikte anormal yapılı proteinlerin birikmesi esasına dayanmaktadır. Bu hataların artması ve fonksiyonu olmayan proteinlerin birikmesi hücre ölümünü tetikler. Yaşlı hücrelerden fonksiyonsuz veya aktivitesi azalmış enzimler izole edilmiştir. Ancak, fonksiyonu olmayan bu proteinlerin yaşlı hayvan dokularında biriktiğini gösteren yeterli kanıt yoktur. Yaşlanma ile birlikte transkripsiyon veya translasyon basamaklarının azaldığına dair bilgiler de sınırlıdır.

Hücresel yaşlanma teorisi: Sayıları artan yaşlı hücreler, dokularda yaşlanmaya neden olmaktadır. Yaşlanmanın temelinde telomerlerin kısalması (replikatif yaşlanma) veya hücre stresi (hücresel yaşlanma) yatar. Replikatif yaşlanmada, telomer kayıplarından dolayı hücreler mitotik uyaranlara karşı yanıt veremez duruma gelmiştir. Yaşlanan kök hücreler de dokuların rejeneratif özelliğini etkiler. Hücre replikatif kapasitesine ulaşmadan strese maruz kaldığında, hücresel yaşlanma süreci başlar. DNA hasarı, onkogenlerin ekspresyonundan dolayı oluşan güçlü mitojenik sinyaller, heterokromatin yapısında

7 Warner, H. R. (1994). Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *17*(3), 249-258. https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90080-9.

oluşan değişiklikler gibi çeşitli stres faktörlerine yanıt olarak stres kaynaklı yaşlanma (*stress-induced senescence*) meydana gelir.

Çapraz bağlanma teorisi: Johan Bjorksten tarafından 1942 yılında önerilen bu teoriye göre çapraz bağlı proteinlerin birikmesi, hücrelere ve dokulara zarar vermektedir. DNA'daki ve proteinlerdeki rastgele çapraz bağlar bu moleküllerin fonksiyonlarını etkilemektedir. Meydana gelen hasara karşı genetik kontrol mekanizmaları yeterli yanıt oluşturmazsa, organizmada yaşlanma meydana gelir. Genetik kontrolü sağlayabilen genlere "uzun yaşam genleri" denir. Yaşlanma sürecinin genlerle olan ilişkisini gösteren çalışmalar daha çok nematodlar üzerinde yapılmıştır. Proteinlerin ya da diğer moleküllerin glikasyonu ile oluşan ileri glikasyon son ürünleri (*advanced glycation end-products, AGE*) de hücre işlevselliğinin zarar görmesine yol açar.

Nöroendokrin teori: Nöroendokrin sistemin fonksiyonunda azalma ve hormonlarda meydana gelen değişiklikler, yaşa bağlı fizyolojik farklılıklara neden olur. Hipotalamus-hipofiz-adrenal aksının gelişimdeki ve yaşlanmadaki etkileri bu teoriyi destekler. Kadınlarda üretkenlik dönemi sonrasında bu aksın fonksiyonu azalmaktadır. Hipotalamusta azalmalar olursa, hipofizin işlevselliği etkilenir ve endokrin hücrelerin fonksiyonlarındaki değişiklikler yaşlanmayla ilişkili hastalıklara yatkınlık koşullarını oluşturabilir. Örneğin, menopoz dönemindeki steroid kaybı osteoropoza zemin hazırlamaktadır.

İnflamasyon hipotezi: Bu hipoteze göre, yaşlanma süreci ile beraber NF-κB ve AP-1 aktiviteleri artmaktadır. Bu durum dokularda hasar oluşturan reaktif türlerin yanı sıra sitokinlerde ve prostaglandinlerde artışa neden olmaktadır.

Zar hipotezi: Zarda meydana gelen hasar ile atıkların eliminasyonu, protein sentezi ve sitoplazmadaki su miktarı azalır, ayrıca çeşitli enzimlerin aktivitesi düşer. Plazma zarında meydana gelen değişiklikler, kısmen $OH^{\cdot}$ radikalinin sebep olduğu moleküler hasarla ilişkilidir.

Hiperfonksiyon teorisi: Yaşamın başlangıcında, daha hızlı gelişmek ve çoğalmak için biyomoleküllerin sentezi hızlıdır. Hiperfonksiyon teorisine göre, otofajiyi azaltan ve protein sentezini artıran mTOR sinyal yolu, hiperplaziyi ve hipertrofiyi destekler. Kalori kısıtlaması olduğunda TOR sinyali azalmaktadır. Tip II diyabet, arteriyoskleroz ve hipertrofik kardiyomiyopati gibi yaşlanma ile ilişkili hastalıklarda TOR'un aşırı aktivitesi gözlenmektedir.

Somatik mutasyon teorisi: Somatik mutasyon teorisi, somatik hücrelerin genetik yapısında mutasyonlar sonucu hücrelerin fonksiyonlarında azalma olduğunu ifade eder. DNA'da oluşan hasarlar sürekli olarak görülmekte ve bu hasarların çoğu onarılmaktadır.

Ancak, DNA onarım mekanizmaları hasarları düzeltemedikleri zaman birikim başlar. Mutasyonların artışı, organların işlevselliğinin azalmasına neden olur. Örneğin mitokondri DNA'sında oluşan hasar, mitokondriyal fonksiyonun bozulmasına yol açar.

Yaşlanma ve beslenme

Sağlıklı ve kaliteli bir yaşam için tüm besin öğelerinin (karbonhidrat, protein, yağ, mineraller, vitaminler ve su) yeterli düzeyde alınması gerekmektedir. [8] Besinlerle alınan organik ve inorganik maddeler metabolizmanın ihtiyacı olan enerjiyi sağlar. Besin alımının yetersiz beslenmeye neden olmadan azaltılması kalori kısıtlaması olarak tanımlanır ve yaşam süresi üzerinde önemli etkisi vardır. Bu beslenme tipinde temel mineral ve vitaminlerin alımı devam ettirilirken, daha az kalorili yemekler yenir. Kalori kısıtlaması ile solucanlar, böcekler, fareler, sıçanlar ve inekler gibi birçok canlı türünde yaşam süresi artmıştır. [9] Laboratuvar koşullarındaki bir fare ortalama 28 ay yaşarken, standart kalori alımının yarısı veya dörtte biri ile beslenme farelerin ömürlerini ortalama olarak 33 veya 47 aya kadar uzatmaktadır. Kalori kısıtlaması yaşlanma ile beraber görülen bağışıklık sistemindeki ve beyinin işlevselliğindeki azalmayı da yavaşlatır. Kanser hastalığını geciktirebilir ve fiziksel aktiviteyi artırır. Ayrıca, üremeyi de azaltır. APP-transgenik farelerde Alzheimer hastalığı ile ilişkili bir enzim olan α-sekretaz aktivitesini artırarak amiloid plak oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Dünyada birçok bireyin hareket azlığı ve aşırı besin tüketmesi çok önemli bir sağlık sorunu olan obeziteye neden olur. Obezite birçok hastalığın sürecini etkileyerek yaşam süresini azaltır ve oksidatif strese neden olur. Deneysel hayvan modeli çalışmaları, kaloriden zengin beslenmenin örneğin yüksek yağlı beslenmenin oksidatif hasarı artırdığını göstermektedir.

Kalori kısıtlamasının yaşam süresi üzerindeki etkileri ilk olarak 1935 yılında McCay ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Sonrasında maya hücrelerinde ve *C. elegans*, Drosophila gibi canlılarda yapılan birçok çalışma bu görüşü doğrulamıştır. Kalori kısıtlaması uygulanan canlıların reaktif oksijen türlerini daha az miktarda üretmeleri, yaşam süresinde meydana gelen artış ile yaşlanmanın serbest radikal teorisi arasındaki ilişkiliyi doğrular niteliktedir. Kalori kısıtlaması metabolik hızdaki azalmayla birlikte mitokondriyal solunumu da azaltır. Sonuç olarak reaktif oksijen

8 Front-matter. (2016). In M. Malavolta & E. Mocchegiani (Eds.), *Molecular Basis of Nutrition and Aging* (pp. i-iii). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801816-3.00052-2.

9 Hwangbo, D. S., Lee, H. Y., Abozaid, L. S., & Min, K. J. (2020). Mechanisms of Lifespan Regulation by Calorie Restriction and Intermittent Fasting in Model Organisms. *Nutrients*, *12*(4). https://doi.org/10.3390/nu12041194.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

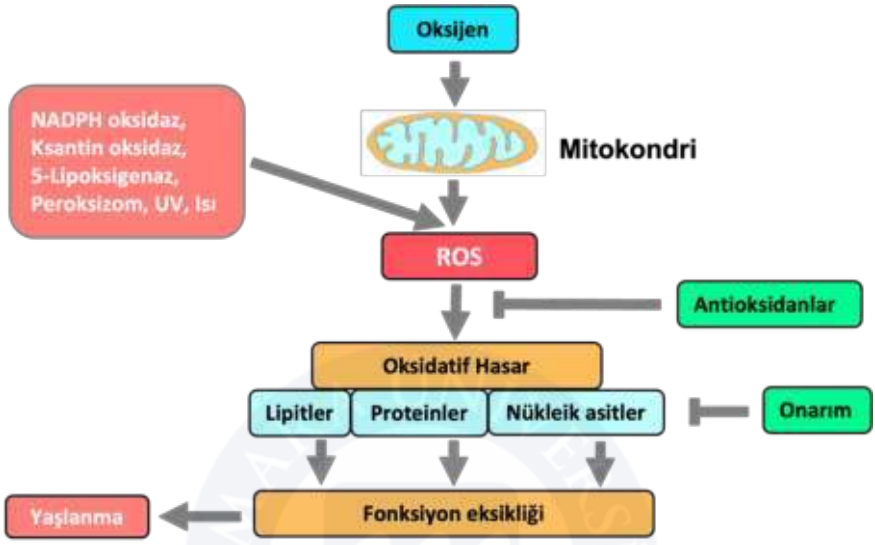
türlerinin daha az miktarlarda üretilmesi sağlanır. *S. cerevisiae* ile yapılan çalışmalar da kalori kısıtlamasının etki mekanizması hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Tomurcuklanan bir maya türü olan *S. cerevisiae* 20-25 bölünmeden sonra yaşlanır. Beslenme ortamında glukoz miktarı fazla olduğu zaman maya hızla tomurcuklanmakta ancak daha sonra yaşlanmaktadır. Glukoz miktarı azaltıldığında ise tomurcuklanma yavaşlar, stres direnç mekanizmalarının düzenlenmesi artar ve yaşam süresi uzar. Üreme ise yavaşlar ya da durur. Ökaryotlarda yaygın bulunan bir serin/treonin kinaz olan mTOR da kalori kısıtlaması üzerinde etkilidir. mTOR'un görevlerinden biri amino asitlerin varlığında lipit ve protein miktarlarıyla hücre büyümesini kontrol etmektir. Kalori alımı fazla olduğu zaman mTOR hücre bölünmesini ve hücre büyümesini destekleyen sinyal yolaklarını aktive etmektedir. Besin alımı yetersiz olduğu zaman ise mTOR aktivitesi düşüktür, protein döngüsü artar, hücre bölünmesi ve büyümesi azalır.

Oksidatif stres ve yaşlanma

Normal metabolizma sırasında oluşan reaktif türler, antioksidan savunma sistemi tarafından kontrol edilip tamamen ortadan kaldırılmadığı taktirde DNA, protein ve lipitlerde oksidatif hasar oluşur. Yaşlanma ile beraber biriken oksidatif hasar ürünleri diyabet, kalp-damar hastalıkları, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi birçok hastalıkla ilişkilidir. [10] Antioksidan savunma sistemindeki değişikliklerle reaktif türlerin üretiminin canlının yaşam süresine etkileri şu şekildedir:

- Reaktif türler hücre için önemli moleküllerde oksidatif hasara yol açarak hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olur.
- Apoptoz artabilir, doku yenilenme özelliğinin bozulmasıyla birlikte yaşlanan hücrelerde doku hasarının oluşması hızlanır.
- İnsulin yolağının aktifleşmesi gibi hücre için uygun olmayan sinyaller üretilebilir.
- İnflamasyon inhibe edilebilir veya artırılabilir.
- Yaşlanma ile ilişkili hastalık süreçleri hızlanabilir.

10 Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, *13*, 757-772. https://doi.org/10.2147/CIA.S158513.



Şekil 1. Reaktif türler, oksidatif hasar ve yaşlanma süreci [11]

Oksijen kullanımı, metabolik hız ve yaşam süresi arasındaki ilişki serbest radikal yaşlanma teorisi ile açıklanabilir. Kullanılan O_2'nin belli bir kısmı reaktif türleri oluşturduğuna göre, birim doku kütlesi başına daha çok O_2 kullanıldığında oluşum da artacaktır. Sineklerde uçuşun önlenmesi ile mitokondriyal proteinlerdeki oksidatif hasarın azaldığı belirtilmiştir. İnsan fibroblast hücreleri ile yapılan araştırmalarda, düşük oksijen miktarlarında büyümeye bırakılan hücrelerin yaşam süreleri uzun bulunmuştur. Yüksek oksijen miktarlarına sahip ortamda büyütülen hücrelerde ise yaşam süresi azalmış, telomer kısalması hızlanmıştır.

Ökaryotik hücrelerde reaktif türlerin başlıca kaynağı olarak mitokondri belirlenmiştir, çünkü burada elektron transportu ve oksidatif fosforilasyon gerçekleşir. Yüksek organizmalarda mitokondri yaşlanma sürecine önemli derecede katkıda bulunur. Mitokondrilerde üretilen radikaller endojen ve ekzojen antioksidanlar tarafından etkisizleştirilir. Ancak, antioksidan mekanizmalarda azalma olduğu zaman nükleik asitler, proteinler ve lipitler zarar görür. Oksidatif hasar sonucu zarar görmüş molekülleri onaran çeşitli onarım mekanizmaları da mevcuttur. Bazen bu mekanizmalar yeterli olmamaktadır. Biyomoleküllerde oluşan oksidatif hasarın, fonksiyonel kayıplara neden olarak yaşlanmaya ve ölüme yol açtığı düşünülmektedir.

11 Selman, C., Blount, J. D., Nussey, D. H., & Speakman, J. R. (2012). Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? *Trends in ecology & evolution*, *27*(10), 570-577.

Yaşlanma ile beraber elektron taşıma zincirinde daha çok $O_2^{\bullet-}$ üretildiği birçok araştırmada gösterilmiştir. Bu durum NAD^+/NADH oranını değiştirerek, sirtuin aktivitesinin azalmasına neden olabilir veya nükleer genlerin transkripsiyonunu etkileyebilir. Bazı dokularda yaşlanma ile birlikte monoamin oksidaz gibi mitokondriyal H_2O_2 üreten enzimler artabilir. Bir monoamin oksidaz inhibitörü olan deprenil uygulandığında, sıçanların yaşam süresinin uzadığı ve beyinde CuZn-SOD enzim düzeylerinin arttığı belirtilmiştir. Mitokondriyal DNA (mtDNA) oksidasyonunun nükleer DNA'ya kıyasla daha fazla olduğu ve yaşlanmayla beraber mtDNA'daki 8-OH-dG miktarının arttığı birçok çalışmada görülmüştür. [12] Yaşlanma sürecinde mtDNA'da nokta veya çıkarma mutasyonları birikir. Ancak bu mutasyonlar oksidatif hasardan dolayı oluşmaz. Farelerde yapılan araştırmalar, mtDNA'da oluşan kusurların yaşlanma özelliklerini gösteren fenotipi oluşturabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Farelerde mtDNA'nın onarımını sağlayan DNA polimeraz enzimi mutasyona uğratıldığı zaman, mtDNA mutasyonlarının birikmesiyle saç dökülmesi, subkutan yağın azalması, osteoporoz, doğurganlığın azalması, omurganın eğriliği, yaşam süresinin azalması ve kök hücrelerin işlevselliğinin bozulması gibi hızlandırılmış yaşlanmanın bazı özellikleri gözlenmektedir. Hayvanlara zorunlu egzersiz yaptırılması sonrasında, mitokondriyal biyogenezin artışı ve mtDNA mutasyonlarının azalması gözlenmiş ve yaşlanma belirtileri azalmıştır. Bu çalışma modelinde mtDNA'da oksidatif hasar düzeylerinin artmadığı, ama oksidatif stresin kök hücrenin işlevsel bozukluğuna ve kardiyomiyopatiye katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmüştür. Mikroskop görüntüleri ve diğer verilere göre yaşlı dokularda mitokondri kötüleşmiş durumdadır. Yaşlı insanlarda yapılan görüntüleme sonuçları da bazı organlarda (örneğin beyin) mitokondriyal metabolizmanın ileri yaşla birlikte azaldığını göstermiştir. Yaşlı hayvanlarda aynı dokudaki mitokondrilerin solunum seviyeleri ve oksidatif hasar düzeyleri aynı olmayabilir. Bu duruma örnek olarak yaşlı sıçanların kalpleriyle yapılan bir çalışma verilebilir. Kalbin miyofibrilleri arasında bulunan mitokondrilerde, kompleks III ve IV aktiviteleri bozulmuş ve $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$ üretimi artmış ama plazma zarının altında bulunan mitokondrilerin etkilenmediği görülmüştür.

Yaşla birlikte mitokondriyal ROS üretiminin arttığı ve bunun hastalıklarla ilişkisi pek çok yayında gösterilmiştir. [13] Drosophila ile

12 Chocron, E. S., Munkácsy, E., & Pickering, A. M. (2019). Cause or casualty: The role of mitochondrial DNA in aging and age-associated disease. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*, *1865*(2), 285-297. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.035.

13 Giorgi, C., Marchi, S., Simoes, I. C. M., Ren, Z., Morciano, G., Perrone, M., Patalas-Krawczyk, P., Borchard, S., Jędrak, P., Pierzynowska, K., Szymański, J., Wang, D. Q., Portincasa, P., Węgrzyn, G., Zischka, H., Dobrzyn, P., Bonora, M.,

yapılan çalışmalar da yaşla birlikte mitokondriyal H_2O_2 miktarındaki artışı desteklemektedir. Yaşlanma ile birlikte ksantin oksidaz, ürat oksidaz, monoamin oksidaz, miyeloperoksidaz ve NADPH oksidaz gibi bazı enzimlerin doku seviyelerinde yükselmeler olabilir. Kardiyovasküler sistem $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$ üretiminin yaşa bağlı arttığı bir bölgedir. Yaşlanma ile ilişkili hipertansiyon, kardiyak disfonksiyon ve vasküler sertleşme gibi durumlarda da $O_2^{\bullet-}$ üretiminin artması rol oynamaktadır. Yaşlılarda endotel işlev bozukluğu çok daha fazla görülür. Yapılan çalışmalarda, yaşlı hayvanların ve insanların damarlarının daha çok $O_2^{\bullet-}$ oluşturduğu ve NO biyoyararlılığının azaldığı belirtilmiştir. ROT miktarındaki artış dışında, hücre dışı SOD (EC-SOD) aktivitesindeki azalış da yaşlanmayı tetikleyebilir. Yapılan bir çalışmada oral olarak verilen antioksidanlar, yaşlı bireylerin akış aracılı vazodilatasyonunu iyileştirirken, aynı tedavi genç bireylere uygulandığı zaman iyileştirici etki gözlenmemiştir. Bu durum ROT üretiminin gençlerde daha iyi kontrol edildiğini düşündürmüştür.

Yaşlanma ile beraber mitokondrilerde $O_2^{\bullet-}$ artışı gözlenen bir başka bölge iskelet kasıdır. Özellikle az hareket eden insanların kas proteinlerinde oksidatif hasar artar. Bilindiği üzere, düzenli egzersiz kasların ve damar fonksiyonlarının korunması için önemlidir. Biyobelirteçler ile yapılan ölçümler sayesinde, insan ve hayvan dokularında oksidatif hasarın yaşla birlikte arttığı bilinmektedir. Sıçanlar ile yapılan bir çalışmada, yaşlıların gençlere kıyasla daha çok pentan ve etan gazı soludukları ve buna ek olarak karaciğer, plazma ve böbrek F2-IsoPG seviyelerinin yüksek olduğu bildirilmiştir. İnsanlarda beyin omurilik sıvısındaki F2-IsoPG seviyelerinin de yaş ilerledikçe arttığı belirlenmiştir.

Yaşlı sıçan ve farelerin karaciğer, beyin ve kalplerinde nitratlanmış protein seviyeleri artar. Protein karbonil miktarı da yaşlı fibroblast hücrelerinde artmıştır. Progeria ya da Werner sendromuna sahip kişilerden alınan ve kültürlenen fibroblast hücrelerinde, protein karbonil miktarı dikkat çekici biçimde yüksek bulunmuştur. [14] Öte yandan, yaşlı kemirgenlerin karaciğer, kalp, beyin, böbrek ve kas DNA'sında 8-OH-dG miktarları artmıştır. Yaşlanan fare dokuları ile yapılan çalışmalarda 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin/guanozin gibi diğer DNA hasar ürünlerinde de artış olduğunu bildirmiştir. Yapılan çalışmalar proteinlerde ve DNA'da oluşan hasarların

Duszynski, J., Rimessi, A., . . . Wieckowski, M. R. (2018). Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *340*, 209-344. https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.006.

14 Viteri, G., Chung, Y. W., & Stadtman, E. R. (2010). Effect of progerin on the accumulation of oxidized proteins in fibroblasts from Hutchinson Gilford progeria patients. *Mechanisms of Ageing and Development*, *131*(1), 2-8. https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.11.006.

kümülatif olduğunu göstermektedir. Yaşlanma ile beraber lipidlerin oksidasyonunun da arttığı belirtilmiştir. Hücre zarlarının lipit içeriği ROS hedefi olmalarını kolaylaştırır. Post-mitotik hücrelerdeki lipitlerin dönüşüm hızı mitotik hücrelere kıyasla daha düşük olduğu için lipid peroksidasyonu post-mitotik hücrelerde daha fazladır. Malondialdehit ve diğer lipid peroksidasyon ürünlerinin miktarları, beyin ve iskelet kası hücreleri gibi mitotik sonrası hücrelerde yaşlanma ile beraber artmaktadır.

Yaşlanmayla birlikte oksidatif hasarın onarım mekanizmalarından otofajinin yaşlı dokulardaki etkinliği azalmaktadır. [15] Çeşitli hayvanların deri, beyin, kas, akciğer, karaciğer ve kalp gibi dokularındaki proteazom aktivitesi yaşlanma ile birlikte düşük bulunmuştur. Proteazom aktivitesinde meydana gelen bu azalma çeşitli mekanizmalarla açıklanmaktadır. Proteazomal proteinlerin kodlanmasını sağlayan genlerin transkripsiyonunun azalması, proteazom alt birimlerindeki oksidatif hasar artışı ve Nrf2 aktivitesinde azalma bu mekanizmalar arasındadır. Nrf2 tarafından düzenlenen genlerin ürünlerinden bazıları 26S proteazomun alt birimleridir. Otofaji ve proteazom aktivitesi üzerinde yaşa bağlı oluşan bu değişikliklerin kalori kısıtlaması ile baskılandığı bildirilmiştir. PARP-1 dahil olmak üzere DNA onarım enzim aktivitelerinin uzun yaşam süresi üzerinde pozitif bir etkisi olduğu iddia edilmiştir. Yaşlı hayvanların retina ve beyin gibi dokularında, DNA'yı onaran bu enzimlerin bazılarının azaldığı belirtilmektedir. Kalori kısıtlamasının ise onarım enzimlerinin azalmasına engel olduğu görülmüştür.

Yaşlanma ve reaktif türler ilişkisini anlayabilmek için kullanılan yaklaşımlardan biri, antioksidan savunmaları genetik olarak manipüle etmek ve canlıda oluşturduğu etkileri incelemektir. [16] Böyle bir çalışmada *C. elegans* daf-2 mutantlarının yaşam süresinin uzatılmasında antioksidan enzimlerin etkili olduğu iddia edilmiştir. Cu/Zn-SOD içermeyen farelerde osteoporoz, kas atrofisi, işitme kaybı, cilt incelmesi, katarakt gibi yaşla ilişkili birçok patoloji görülmekte ve yaşam süresi kısalmaktadır. Ancak kalori kısıtlaması ile yaşam süresi uzatılabilmiştir. Bununla beraber Cu/Zn-SOD'u çok fazla eksprese edebilen kemirgenlerin daha uzun yaşam süresine sahip olmadıklarını da belirtmek gerekir. Cu/Zn-SOD mutasyonları insanlarda amiyotrofik lateral skleroz (ALS) hastalığına neden olmaktadır. Bu mutasyona sahip olan transgenik farelerde bcl-2 proteini çok fazla

15 Martinez-Lopez, N., Athonvarangkul, D., & Singh, R. (2015). Autophagy and aging. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *847*, 73-87. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2404-2_3.

16 Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & D'Arca, D. (2016). ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 3565.127.3565127. https://doi.org/10.1155/2016/3565127.

eksprese edildiğinde mutasyonların neden olduğu nöron ölümü engellenebilmiştir. Mn-SOD geninin fare fibroblastlarında spesifik olarak silinmesi sonucu osteoporoz, cilt atrofisi ve kas kaybı gibi erken yaşlanmanın belirtileri yanı sıra yaşam süresi de azalmıştır. Farelerin tüm dokuları Mn-SOD içermediği zaman ise, inceleme için yeterince yaşayamadan ölüm gerçekleşmiştir. Öte yandan, diğer bir deney grubunda Mn-SOD defekti için heterozigot olan laboratuvar koşullarındaki fareler, GPx1 aktiviteleri eksik olsa da çekirdek ve mitokondri DNA'sında artmış 8-OH-dG, kanser geliştirme riskinde artış ve mitokondri işlevselliğinin bozulmasına rağmen normal yaşam süresine sahip olmuştur.

Oksidatif hasar ile ilgili çalışmalarda hızla yaşlanan bazı kemirgen türleri tercih edilmektedir. Bu türlere örnek olarak SAM faresi ile Rusya'da yetiştirilen OXYS sıçanı verilebilir. [17, 18] Bu hayvanların özellikleri hızlı yaşlanmaları ve yaşam sürelerinin kısalığıdır. OXYS sıçanları ve SAM fareleri ile yapılan çalışmalarda, DNA ve RNA ile α-enolaz gibi bazı proteinlerde ve lipitlerde oksidatif hasarın çok fazla olduğu ve doku OGG1 aktivitelerinin azaldığı belirtilmiştir. Lipoik asit gibi antioksidanların uygulanması bu canlılarda oksidatif hasarı azaltmıştır. Kalori kısıtlaması burada da ömrü uzatan etkiye sahiptir. Fakat bu canlıların gerçekten hızlı yaşlanma sürecine mi sahip oldukları, yoksa hastalıklı mı oldukları henüz bilinmemektedir. Karasineklerde uçma eylemi ile birlikte kasların içerdiği lipofuksin miktarı artmaktadır. Daha çok hareket eden sineklerin yaşam süresi az olmaktadır. Yüz yaşını aşkın insanlarda büyük motor nöronlarının sitoplazmasında %70 oranında ileri yaş pigmentleri bulunmaktadır. Lipofuksin pigmentinin renk değişimi kırmızı, sarı ve koyu kahverengi şeklinde ilerler. Hücre içerisinde tek zarla çevrelenmiş 1-5 μm çapında granüller halindedir. Bu granüllerin miktarı ve büyüklüğü yaşa bağlı olarak değişmektedir. Lipofuksin içerisinde kolesterol, trigliserit ve fosfolipit gibi çeşitli lipitler vardır. Bu granüller bakır, demir ve çinko gibi metal iyonlarını da barındırır. Lipofuksin hasarlı mitokondrilerle lizozomal ve otofaji katabolizması sonucu oluşan diğer istenmeyen hücre içeriklerinin son ürünü olarak bilinmektedir. Lizozomlarda bir hasar oluşursa lipofuksine bağlı durumdaki lipitler ve metal iyonları kaçabilir ve oksidatif hücre hasarına neden olabilir. [19] Telomer yıpranması, genomik instabilite,

17 Takeda, T. (2009). Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochemical Research*, *34*(4), 639-659. https://doi.org/10.1007/s11064.009.9922-y.

18 Stefanova, N. A., Kozhevnikova, O. S., Vitovtov, A. O., Maksimova, K. Y., Logvinov, S. V., Rudnitskaya, E. A., Korbolina, E. E., Muraleva, N. A., & Kolosova, N. G. (2014). Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease. *Cell Cycle*, *13*(6), 898-909. https://doi.org/10.4161/cc.28255.

19 Carmona-Gutierrez, D., Hughes, A. L., Madeo, F., & Ruckenstuhl, C. (2016).

mitokondriyal disfonksiyon, epigenetik değişiklikler, hücresel yaşlanma, proteostaz kaybı, düzensiz besin algılaması, kök hücre tükenmesi ve değişen hücreler arası iletişim gibi yaşlanmanın ayırt edici göstergeleri ve süreçlerinde, reaktif türlerin hem aktif yer aldığı hem de bu süreçlere katkıda bulunduğu bildirilmiştir.

Yaşlanma ve antioksidanlar

Birçok hastalıkta oksidatif hasar gözlenmiştir. Bazı hastalıklarda oksidatif hasar doku hasarına da neden olur. Belirli yerlerdeki oksidatif hasarın azaltılması için antioksidanların terapötik uygulamaları faydalı olabilir. Dokulardaki antioksidan kapasitenin korunmuş olması, travma ve hastalık sonrası oluşan hasarlara karşı korunmada etkilidir. Örneğin, beyindeki antioksidan seviyeleri yüksekse inme sonrası hastalarda görülen doku hasarı daha az olmaktadır. [20]

İnsan ya da diğer memelilerin dokularında yaşlanma ile beraber antioksidan savunmada bariz bir azalma yoktur, hatta artışlar bildirilmiştir. [21] E vitamini buna örnek olarak verilebilir. Sıçan dokularında ve eritrositlerde yaşlanma ile beraber çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarı artar. Ayrıca yaşlanan bazı hayvan dokularında SOD aktivitelerinin arttığı bildirilmiştir. Bununla beraber bölgesel olarak önemli farklılıklar görülebilmektedir. Örneğin hücre dışı SOD aktivitesinde yaşlanma ile gelişen azalma vasküler sistemde bozukluklara yol açabilmektedir. Yaşlı Drosophila, *C. elegans* ve kemirgenlerin dokularında yapılan birçok çalışmada, özellikle mitokondride GSH/GSSG oranlarının daha düşük olduğunu bildirilmiştir. GSH miktarındaki bu azalma artan tiyol tüketimine veya GSH sentaz aktivitesinde azalmaya bağlanmakla birlikte, Nrf2 aktivasyonunun da kısmi olarak bozulmuş olmasıyla ilişkilidir. Yaşlı insanlarda da GSH seviyelerinin azaldığı ve GSH/GSSG oranlarının düştüğü belirtilmiştir. Yaşlı insanlara glisin ve sistein verilmesi sonrası GSH üretimi ve kırmızı kan hücrelerindeki GSH miktarı artırılabilir. Sigara dumanına maruz bırakılan yaşlı farelerde, akciğer sıvısında GSH miktarları yeterince korunamamış ve oksidatif hasar ile akciğer iltihabı meydana gelmiştir.

The crucial impact of lysosomes in aging and longevity. *Ageing Research Reviews*, *32*, 2-12. https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.04.009.

20 Cherubini, A., Polidori, M. C., Bregnocchi, M., Pezzuto, S., Cecchetti, R., Ingegni, T., di Iorio, A., Senin, U., & Mecocci, P. (2000). Antioxidant profile and early outcome in stroke patients. *Stroke*, *31*(10), 2295-2300. https://doi.org/10.1161/01.str.31.10.2295.

21 Kozakiewicz, M., Kornatowski, M., Krzywińska, O., & Kędziora-Kornatowska, K. (2019). Changes in the blood antioxidant defense of advanced age people. *Clinical Interventions in Aging*, *14*, 763-771. https://doi.org/10.2147/cia.S201250.

Antioksidanların yaşlanma karşıtı rollerini belirleyebilmek için, antioksidanların farklı organizmaların yaşam süresi üzerindeki etkileri incelenmiştir. [22] Bu çalışmalarda GSH, N-asetilsistein gibi tiyol bileşikleri ile α-tokoferol gibi zincir kırıcı yağda çözünür antioksidanlar ve askorbat, SOD mimetikleri gibi bileşikler kullanılmıştır. Bazı araştırma sonuçları, α-tokoferolün *C. elegans* ve Drosophila yaşam süresini uzattığını göstermiştir. Askorbat ile yapılan çalışmalarda ise, çeşitli organizmaların yaşam süresi üzerinde azaltıcı, artırıcı veya etkisiz olmak üzere farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Koenzim Q ile beslendiğinde *C. elegans* yaşam süresinde artış gözlenmiştir. Buna karşılık kemirgenlere uygulanan askorbat, koenzim Q, lipoik asit gibi antioksidanların yaşam süresi üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır. Ayrıca hayvanlara aşırı derecede antioksidan verilmesi durumunda bir düzenleme mekanizması devreye girmekte, antioksidan kapasitenin değişmeden kalabilmesini sağlamak için antioksidan alımı ve sentezi baskılanmaktadır. Dişi sıçanlarla yapılan bir çalışmada, BHT açısından zengin beslenme karaciğerdeki α-tokoferol içeriğini azaltmıştır. Farelere lipoik asit verildiğinde, şaperonların kodlanmasını sağlayan genlerin ekspresyonu azalırken, koenzim Q verilmesi prx5 kodlayan genlerin ekspresyonunu azaltmıştır. Yaşlı sıçanlarda N-asetilkarnitin ve lipoik asit bileşiminin DNA'da 8-OH-dG miktarını azalttığı ve zihinsel işlevi geliştirdiği bildirilirken, bu kombinasyon yaşlı Beagle cinsi köpeklerde etkili olmamıştır. Mitokondri odaklı antioksidanlardan biri olan SkQ1'in yaşam üzerinde etkisi olduğu da iddia edilmiştir. SkQ1 ile yapılan çalışmalardan birinde, kötü ortamlarda yaşatılan farelerin enfeksiyon riskinden dolayı ölme oranları oldukça yüksekken, SkQ1'in yaşlılığa bağlı bağışıklık sistemindeki düşüşü etkileyerek enfeksiyon kaynaklı ölümleri azalttığı bildirilmiştir.

Oksidatif stres ve nörolojik hastalıklar

Nöronların ileri derecede değişime uğradığı veya öldüğü nörodejeneratif hastalıklarda çeşitli semptomlar vardır. Oksidatif hasarın etkilediği beyin bölgelerinde protein hasarı, DNA baz oksidasyonu ve lipit peroksidasyonu son ürünlerinde artış gözlenir. [23] Nörotoksinler veya mutant SOD gibi anormal proteinler tarafından mitokondriye verilen hasar, ATP üretim sürecini bozabilir. Aşırı

22 Maulik, N., McFadden, D., Otani, H., Thirunavukkarasu, M., & Parinandi, N. L. (2013). Antioxidants in Longevity and Medicine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2013*, 820679. https://doi.org/10.1155/2013/820679.

23 Lyras, L., Cairns, N. J., Jenner, A., Jenner, P., & Halliwell, B. (1997). An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *68*(5), 2061-2069. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.680.52061.x.

miktardaki ROS üretimi oksidatif strese neden olarak DNA, RNA ve proteinlerde hasar oluşturur. [24] Proteazom sistemi nitratlanmış ve oksitlenmiş proteinlerin yıkımını sağlar. Proteazomda meydana gelen bir bozukluk da anormal proteinlerin birikmesine neden olarak oksidatif stres oluşturur. Gen mutasyonları sonucu oluşan anormal proteinlerin artması ile proteazoma fazla yük binebilir. Beyin proteazom aktivitesi yaşlanma ile beraber azalma gösterdiği için, bu durum yaşlı bireylerin nöronlarını daha da korunmasız hale getirmektedir. [25] Reaktif türleri üreten moleküller de nörodejenerasyona sebep olabilir. Reaktif türler mitokondriye zarar verebilir, proteazom aktivasyonunu engelleyebilir ve Ca^{2+} iyonunun artışına neden olabilir. Nörodejeneratif hastalıklarda demirin rolü sınırlıdır. [26] Çoğunlukla kabul edilen görüş, demirin dokularda birikmesinin geç bir aşama olduğu ve önemli olmadığı şeklindedir. Bununla beraber, subaraknoid kanama patolojileri ve seruloplazmin eksikliği hem ve demir iyonlarının nöronal hasara sebep olma ihtimalini de düşündürmektedir. Seruloplazmin eksikliği olan farelerde Parkinson hastalığına benzer bir bozukluk geliştiği bildirilmiştir. Ferritinin kodlanmasını sağlayan genin doğuştan mutasyonu da nöroferritinopati eşliğinde beyinde demirin çok fazla birikmesi ile ilişkilendirilmiştir. Yaşlanma ile beraber beynin pek çok bölgesinde demir, bakır ve diğer metaller ile β-amiloid ve α-sinüklein gibi proteinlerin biriktiği bilinmektedir.

Parkinson hastalığı

Parkinson hastalığı ilk olarak 1817 yılında James Parkinson tarafından 'titreyen felç' tabiriyle tanımlandı. Nörolojik hastalıklar arasında Alzheimer'dan sonra en çok görülen hastalıktır. Hastalık 50 yaşından önce nadiren görülür, ileri yaşlarda çoğunlukla el ve ayaklarda ritmik titreme şeklinde belirti verir. Hastalık ilerledikçe birey hareketlerini kontrol etmede zorlanmaya başlar. Hareketin kısıtlandığı durumda, harekete başlayabilme ve hareket edebilme fonksiyonu yavaşlar, titreme daha belirgin hale gelir ve kaslarda sertlik oluşur. Beyin sapının üst kısmında substantia nigranın pars kompakta bölgesindeki dopamin salgılayan nöronların ölümü gerçekleşir. Parkinson hastalığında, *locus coeruleus* kısmındaki

24 Gemma, C., Vila, J., Bachstetter, A., & Bickford, P. C. (2007). Frontiers in Neuroscience Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention. In D. R. Riddle (Ed.), *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*. CRC Press/Taylor & Francis Copyright © 2007, Taylor & Francis Group, LLC.

25 Keller, J. N., Gee, J., & Ding, Q. (2002). The proteasome in brain aging. *Ageing Research Reviews*, *1*(2), 279-293. https://doi.org/10.1016/s1568-1637(01)00006-x.

26 Berg, D., & Youdim, M. B. (2006). Role of iron in neurodegenerative disorders. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, *17*(1), 5-17. https://doi.org/10.1097/01.rmr.000.024.5461.90406.ad.

hücrelerin de ölmesi noradrenalin düzeylerinin azalmasına neden olmaktadır.

Substantia nigra ve beyinin diğer bölgelerindeki nöronlarda Lewy cisimciklerinin yer alması bu hastalıkla ilişkilidir. [27] Lewy cisimciklerinin varlığı demansta ve Alzheimer hastalığında da görülür, yalnızca Parkinson hastalığına özgü olmayan bir durumdur. Bu cisimcikler beyinde özellikle presinaptik sinir uçlarında çokça bulunan α-sinuklein proteinlerini içermektedir. Lewy cisimciklerinin birikimi sinir hücrelerinin bağlantılarına zarar vererek, dopamin gibi nörotransmitterlerin alışverişine engel olurlar. Burada ayrıca ubikitin ve nörofilamentler gibi diğer proteinler de mevcuttur. Parkinson ile ilişkilendirilen α-sinuklein mutasyonları agregasyonun ve oksidasyonun artmasına, dopamin aktivasyonunun azalmasına neden olmaktadır. α-sinuklein sıkça oksitlenir, fosforillenir ve nitratlanır. Yapısında dört adet tirozin ve metiyonin kalıntısı vardır ve bunlar $ONOO^-$'a maruz kaldığında hemen nitratlanır. Nöron ölümünün ardından oksitlenmiş α-sinuklein varlığı mikroglialarda NADPH oksidaz aktivasyonunu artırarak reaktif türlerin aşırı üretimine neden olur. [28] Parkinson hastalığı semptomlarının açığa çıkması için, substantia nigra bölgesinde fonksiyonun bozulmasını sağlayacak kadar hücrenin ölmesi gerekmektedir. Anormal, hasarlı ve istenmeyen proteinlerin ubikitin molekülleri ile etiketlenerek 26S proteazom kompleksi sayesinde ATP'ye bağımlı yıkım süreci gerçekleşir. Daha sonra proteoliz işlemi ve ardından ubikitin moleküllerinin geri dönüşümü vardır. Ubikitin-proteazom sistemindeki kusurlar Parkinson hastalığına neden olmaktadır. UCHL-1 proteini beyinde çokça bulunan proteinlerden biridir. Ubikitin-proteazom döngüsünün devamı için ubikitinleri serbestleştirerek geri kazandırır. Parkinson hastalığı için önemli bir bölge olan substantia nigrada proteazom ve UCHL1 aktivitelerinin düşük olduğu görülmüştür. Sonuçta, oksitlenmiş veya nitratlanmış α-sinüklein proteazom tarafından daha az katabolize edilmektedir. [29]

Substantia nigranın striatuma gönderdiği sinir liflerinin terminalleri dopamin nöratransmitterini salgılar. Striatal nöronlar

27 Wakabayashi, K., Tanji, K., Mori, F., & Takahashi, H. (2007). The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology*, *27*(5), 494-506. https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2007.00803.x.

28 Cristóvão, A. C., Guhathakurta, S., Bok, E., Je, G., Yoo, S. D., Choi, D. H., & Kim, Y. S. (2012). NADPH oxidase 1 mediates α-synucleinopathy in Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, *32*(42), 14465-14477. https://doi.org/10.1523/jneurosci.2246-12.2012.

29 Zondler, L., Kostka, M., Garidel, P., Heinzelmann, U., Hengerer, B., Mayer, B., Weishaupt, J. H., Gillardon, F., & Danzer, K. M. (2017). Proteasome impairment by α-synuclein. *PloS one*, *12*(9), e0184040. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184040.

ise gelen mesajın kortekse aktarımını sağlayarak hareketi kontrol etmeye yardımcı olurlar. Nöron hücrelerinin ölmesi dopamin miktarının azalması yani haberleşmenin azalması demektir. Hastalara tedavi için dopamin verilemez, çünkü kan-beyin bariyerini geçememektedir. Ancak dopaminin öncülü olan L-DOPA beyinde dopamine dönüştürülebilir. Dopaminin aşırı metabolize edilmesi ise zarar verebilecek seviyede H_2O_2 oluşturarak çok daha fazla nöronun ölmesine neden olabilir. [30]

Parkinson hastalığı için başka tedavi yöntemleri de vardır. MAO-B inhibitörü olan deprenil, dopaminin korunmasında ve H_2O_2 üretiminin azalmasında etkilidir. Deney hayvanlarına uzun süre deprenil uygulandığı zaman, SN bölgesinde ve kısmen beynin diğer kısımlarında CuZnSOD seviyelerinin arttığı görülmüştür. Deprenilin, nöronları bazı toksinlerin zararlı etkilerine karşı koruma ve nöronal GSH miktarlarının artması gibi etkileri de vardır. Parkinson hastalığı için bir diğer tedavi yaklaşımı dopamin reseptörlerini doğrudan uyarabilen moleküller kullanmaktır. Bunlara örnek olarak pramipeksol, pergolid, bromokriptin ve ropinirol verilebilir.

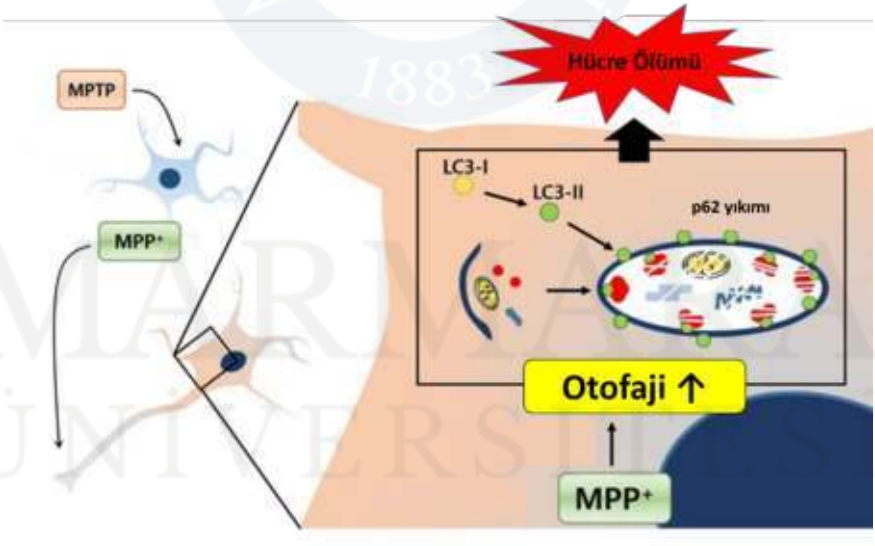
Kaliforniya'da 1980'li yıllarda birçok genç hastada Parkinson hastalığının belirtileri görülmüş, yapılan incelemelerde hastaların ortak özelliğinin sentetik uyuşturucu kullanmak olduğu belirlenmiştir. Daha sonra, bu durumun eroninin 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidro piridin (MPTP) ile kontamine olması sonucu ortaya çıktığı anlaşılmış ve bu bilgi Parkinson hastalığının nedenleri hakkında önemli ipucu elde edilmesini sağlamıştır. MPTP, oksidatif fosforilasyonda önemli bir role sahip olan Kompleks I'i inhibe eder. [31] MPTP ile birlikte rotenon, parakuat, 6-hidroksidopamin gibi bileşikler dopaminerjik sistemin nörodejenerasyonunu indükleyebilmektedir. Böylece nörotoksinlerin ve diğer toksik ajanların SN bölgesindeki nöronlara zarar vererek hastalığı tetikleyebileceği anlaşılmıştır. Nörotoksinlerin ROT oluşturmada da etkisi vardır. Lipofilik bir yapıya sahip olan MPTP uygulandıktan hemen sonra kan beyin bariyerini geçebilmektedir. Astrositlere girerek orada monoamin oksidaz tarafından oksitlenir. Oluşan MPP^+ hücre dışı matrikse atılır ve dopamin taşıyıcısı tarafından yüksek affiniteli bir substrat olarak tanınır. Substantia nigra nöronları tarafından alınan MPP^+ toksik etki göstererek burada elektron taşıma zincirindeki Kompleks

30 Meiser, J., Weindl, D., & Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*, *11*(1), 34. https://doi.org/10.1186/1478-811x-11-34.

31 Richardson, J. R., Caudle, W. M., Guillot, T. S., Watson, J. L., Nakamaru-Ogiso, E., Seo, B. B., Sherer, T. B., Greenamyre, J. T., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., & Miller, G. W. (2007). Obligatory role for complex I inhibition in the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicological Sciences*, *95*(1), 196-204. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl133.

I'i inhibe eder, ATP üretiminin azalmasına ve serbest radikallerin oluşmasına neden olur.

Parkinson hastalarının düşük proteazom aktivitesine sahip olmasının yanında, bu hastalığa sahip bireylerden alınan substantia nigra dokusu incelendiğinde normal bireylere göre yüksek oksidatif hasar, azalmış GSH, artmış demir ve mitokondri fonksiyon kusuru görülmüştür. Kompleks I aktivitesindeki azalmalar substantia nigra bölgesinde görülürken, beynin diğer bölgelerinde gözlenmemiştir. Alfa-sinükleinin mitokondri üzerindeki etkilerine gelince, sitozole girip çekirdeğe ilerlemesi bir mitokondriyal nükleaz çeşidi olan endonükleaz G'nin salınmasına neden olarak apoptoza yol açabilir. Parkinson hastalığında mitokondri ile ilişkili önemli noktalardan biri erken başlangıçlı şeklinin PINK1 proteinini kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanabilmesidir. [32] PINK1 proteini bir serin/treonin kinazdır. Nöron hücrelerinin apoptoza karşı koymasını sağlamaktadır. PINK1 proteininin bir diğer görevi, parkin molekülünü fosforile ederek aktivasyonunu sağlamaktır. Parkin mitokondriyal proteinlerin ubikitinlenmesinde görev almaktadır.



Şekil 2. Beyinde MPTP metabolizması [33]

32 Imai, Y. (2020). PINK1-Parkin signaling in Parkinson's disease: Lessons from Drosophila. *Neuroscience Research*, *159*, 40-46. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neures.2020.01.016.

33 Bae, W.-Y., Choi, J.-S., & Jeong, J.-W. (2018). The Neuroprotective Effects of Cinnamic Aldehyde in an MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2), 551. https://www.mdpi.com/1422-0067/19/2/551.

Ubikitin-proteazom mekanizması bozuklukları ve sporadik Parkinson hastalığında UCHL1 aktivasyonunun azalması, bu hastalığın protein dönüşümünü sağlayamamanın sonucu olabileceğini göstermektedir. [34] UCHL1'e sahip olmayan farelerde ilerlemiş nörodejenerasyon, yüksek oksidatif hasar ve protein agregatlarının varlığı görülmüştür. Parkinson hastalığındaki bir diğer önemli protein DJ-1'dir. [35] Bu proteinin oluşmasını sağlayan genin yapısındaki mutasyon otozomal Parkinson hastalığına neden olmaktadır. DJ-1 proteini antioksidan özellik taşıması yanında GSH üretimini artırma ve Nrf2 mekanizmasını aktifleştirme gibi fonksiyonlara sahiptir. Oksidatif stres arttığı zaman DJ-1 oksitlenerek mitokondriye taşınır. Parkinson hastalığında anormal yapılı DJ-1 proteinlerinin substantia nigrada biriktiği ve oksitlenmiş miktarlarının arttığı bildirilmiştir.

Alzheimer hastalığı

Alzheimer hastalığında (öğrenme ve hafıza ile ilişkili olan hipokampusta ve bazal ön beyinde sinaptik hasarlar sonucu büyük nöron kayıpları meydana gelir. Alzheimer hastalığının ilk patolojik özellikleri nörofibriller yumakların ve yaşlılık plaklarının oluşmasıdır. [36] Etkilenen nöronların içindeki fibröz kütleler, yumaklar olarak adlandırılır. Bu yumakların içerdiği proteinlerden biri Tau proteinidir. Aksonlar mitokondri ve nörotransmitter keseciklerine sahiptir. Bu şekilde yüklü aksonlar Tau yardımı ile anterograd veya retrograd taşıma yapabilir ve nöronal şekilleri bozulmadan korunabilir. Tau mikrotübüllerin birleşmesine de yardımcı olur. Kromozom 14 üzerindeki PSEN1 genindeki bir mutasyon Tau proteininin hiperfosforilasyonuna neden olmaktadır. Bu hiperfosforilasyon ile mikrotübüllerin yapısı bozulur ve nörofibriller yumaklar oluşur (Şekil 3). Ayrıca,

34 Maraganore, D. M., Lesnick, T. G., Elbaz, A., Chartier-Harlin, M. C., Gasser, T., Krüger, R., Hattori, N., Mellick, G. D., Quattrone, A., Satoh, J., Toda, T., Wang, J., Ioannidis, J. P., de Andrade, M., & Rocca, W. A. (2004). UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Annals of Neurology*, *55*(4), 512-521. https://doi.org/10.1002/ana.20017.

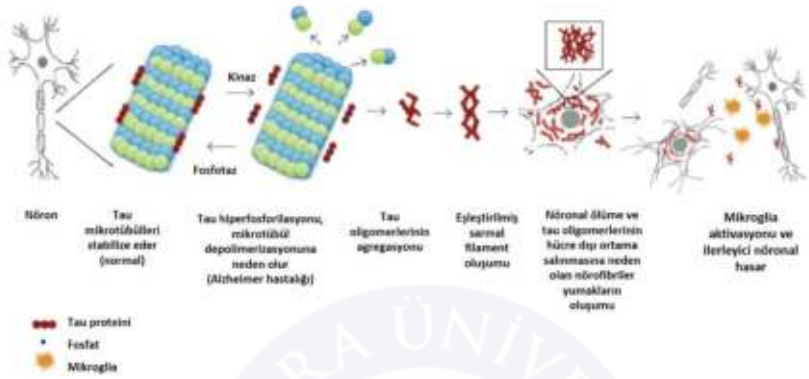
35 Lev, N., Roncevic, D., Ickowicz, D., Melamed, E., & Offen, D. (2006). Role of DJ-1 in Parkinson's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, *29*(3), 215-225. https://doi.org/10.1385/jmn:29:3:215.

36 Goedert, M., Sisodia, S. S., & Price, D. L. (1991). Neurofibrillary tangles and β-amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology*, *1*(3), 441-447. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0959-4388(91)90067-H .

demir metabolizması için gerekli olan tau protein miktarının azalmasıyla Parkinson ve Alzheimer Hastalığı ile ilgili beyin bölgelerinde demir birikebilir. Öte yandan beta-tabaka konformasyonuna sahip β-amiloid peptidler (Aβ) hücre dışında ve hücrenin etrafında birikerek şişmiş aksonlar, glia ve nörit bölgelerini meydana getirir. [37] Bu plaklar çoğunlukla serebral korteks, hipokampus ve amigdala bölgelerinde oluşur. PSEN1 genindeki mutasyonlar amiloid öncül proteininin (*Amyloid precursor protein*, APP) yanlış yerlerden bölünmesine neden olmaktadır. Bu proteinlerin parçalanması sonucunda β-amiloid (Aβ) peptitler oluşmaktadır. APP proteinleri birçok hücre yapısında bulunan transmembran proteinlerdir. Hücrenin içinde bulunan kısa C terminali ile hücrenin dışında bulunan uzun N terminalini içerirler. İnsanlarda 21. kromozom üzerindeki genin transkripsiyonu ile üretilen APP695 nöron hücrelerinde yaygın olarak bulunan bir türdür. Nöronlardaki görevleri beyin gelişimi sırasında büyümeyi ve uyarıcı nörotransmitterlere yanıtları kolaylaştırmaktır. Normalde APP proteininin oluşumundaki proteolitik işlem α-sekretaz enzimi ile N-terminal ucunun uzaklaştırılması ve zarda diğer kısmın kalması ile gerçekleşir. Bunun yanında β ve γ-sekretaz enzimleri de Aβ oluşumunu sağlamaktadır. Mitokondri fonksiyonundaki bazı bozukluklar β-sekretaz enziminin miktarını artırabilir. Laboratuvar ortamında sentezlenen Aβ peptitlerinin başlangıçta suda çözünebilir olduğu ve nöronlar için toksik olmadığı, ama daha sonrada kümelenmeleri sonucu hücre için toksik hale gelebildikleri bildirilmiştir. APP proteinlerinden A*β* oluşumu nöronların ölümü ile sonuçlanabilir. Kolesterolün de APP proteininin bölünmesi ile bağlantısı bulunmaktadır. Kolesterol fazlalığı beyinde oluşacak oksidatif hasarı destekleyebilir. Bu nedenle, statinlerle kolesterol sentezinin inhibisyonunun β ve γ-sekretaz enzimlerinin aktivasyonunu azaltacağı ve Aβ oluşumunu baskılayarak Alzheimer hastalığını engelleyebileceği düşünülmektedir. [38]

37 Murphy, M. P., & LeVine, H., 3rd. (2010). Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*, *19*(1), 311-323. https://doi.org/10.3233/jad-2010-1221.

38 Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R., & Wong, P. C. (2009). The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *Journal of Neuroscience*, *29*(41), 12787-12794. https://doi.org/10.1523/jneurosci.3657-09.2009.



Şekil 3. Alzheimer hastalığının Tau proteiniyle ilişkisi [39]

Genetik etkenler Alzheimer hastalığının gelişiminde önemlidir. Bazı mutasyonlar hastalığın erken başlamasını ve hızlıca ilerleme göstermesini sağlar. Bunların aileden gelen kalıtsal geçmişi vardır. APP proteininin kodlanmasını sağlayan kromozom 21 üzerindeki ilgili gende mutasyon olması sonucu Aβ üretimi artabilir. Transgenik fareler ile yapılan bir çalışmada, mutant APP proteinlerinden birisinin aşırı ekspresyonuna sahip bireylerin doğduklarında normal iken sonraki aylarda beyinlerinde amiloid plaklarının varlığı ve davranış değişiklikleri gözlemlenmiştir. Down sendromlu kişilerde kromozom 21'in üç kopyasının bulunması erken yaşlarda AH hastalığının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Parkinson hastalığına benzer şekilde, Alzheimer hastalığında da oksidatif hasarın artışı ile anormal proteinlerin kümelenmesi, demir artışı, nöroenflamasyon ve mitokondri fonksiyonunda bozulma görülür. Aβ kümelenmesi ile oluşan yapılar sinapslara da zarar vermektedir. Nörotoksik olan bu moleküllerden en etkili olanı Aβ1-42 molekülüdür. Hastalıkta amiloid β birikimi damar duvarlarında endotel fonksiyon bozukluğuna neden olabilir. [40] Bu durum NADPH oksidaz aktivitesinde artış ve $ONOO^-$ üretimi yoluyla kan akışını bozarak demansı hızlandırabilir. Alzheimer hastalığında görülen oksidatif protein hasarı, nöronal fonksiyon için önemli olan bazı enzimlerin yanı sıra protein döngüsünde, eksitotoksisitenin kontrolünde, enerji metabolizmasında ve K^+ iyonlarının taşınmasında da etkisini göstermektedir. Yapılan proteomiks çalışmalarında UCHL2,

39 Mokhtar, S. H., Bakhuraysah, M. M., Cram, D. S., & Petratos, S. (2013). The Beta-Amyloid Protein of Alzheimer's Disease: Communication Breakdown by Modifying the Neuronal Cytoskeleton. *International Journal of Alzheimer's Disease*, *2013*, 910502. https://doi.org/10.1155/2013/910502.

40 Koizumi, K., Wang, G., & Park, L. (2016). Endothelial Dysfunction and Amyloid-β-Induced Neurovascular Alterations. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *36*(2), 155-165. https://doi.org/10.1007/s10571.015.0256-9.

CuZn-SOD, glutamin sentaz, kreatin kinaz, α-enolaz ve gliseraldehit-3-fosfat gibi oksitlenmiş proteinler belirlenmiştir. Ayrıca β-aktin, trioz fosfat izomeraz ve α-enolaz gibi bazı proteinler de nitratlanmıştır. Belirli mRNA'ların 8-OH-dG içermesi mRNA oksidasyonundaki seçiciliği göstermektedir. Transgenik hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda, oksidatif hasarın önemli ve erken gerçekleşen bir olay olduğu gözlenmiştir.

Amyotrofik lateral skleroz

Amyotrofik lateral skleroz (ALS) omurilik ve beyindeki motor nöronların dejenere olduğu bir hastalıktır. Motor nöronların fonksiyon bozukluklarına glial hücrelerin proliferasyonu ile nörofilament farklılıklarının eşlik ettiği hastalığın ismindeki "amyotrofik" kelimesi kas kaybını ifade etmektedir. Hastalık kaslarda ağrı hissedilmeksizin kasların zayıflaması ve elastikiyetinin bozulması ile başlayıp atrofiye yol açarken, ilerleyen dönemde yutma ve konuşmada zorluklarla devam eder. Hasta bireyler iskelet kasları ile beraber bulbar kaslar ve solunum kaslarını da içeren ilerleyici felç geliştirir. ALS hastalığının %5-10'u genetik kaynaklı, %90-95'i ise sporadiktir. Genetik kaynaklı aileden geçen ALS hastalığı otozomal resesif veya otozomal dominanttır. Sporadik ALS hastalığı erkeklerde kadınlara kıyasla iki kat daha fazla görülür. Hastalık genellikle elli yaşından sonra görülmektedir. Ailesel kaynaklı gelişen ALS hastalığı daha erken yaşlarda görülmektedir ve cinsiyetlerin risk durumu eşittir.

Ailesel ALS hastalığı farklı mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Hastalığa neden olan 124 adet farklı SOD1 mutasyonu belirlenmiştir. [41] SOD1 geninin ekspresyonu sonucu önemli bir antioksidan enzim olan Cu/Zn-SOD oluşur. Cu/Zn-SOD, süperoksit radikalinden hidrojen peroksit ve oksijen molekülü oluşmasını sağlar, böylelikle çevresindeki süperoksit miktarını azaltır. Otozomal dominant kalıtıma sahip ALS hastalarının %10-20'sinde Cu/Zn-SOD'un kodlanmasını sağlayan kromozom 21 üzerindeki gende mutasyon bulunmaktadır. Bu gendeki mutasyonlardan dolayı metallerin bağlanma bölgelerindeki ya da yakınlarındaki amino asit kalıntıları değişir. Bu şekilde mutant genden oluşan proteinlerin aktivitelerinde azalma görülmektedir. Transgenik farelerle yapılan çalışmalar, ALS hastalığının SOD aktivitesinin azalmasından değil, oluşan mutant Cu/Zn-SOD polipeptidinin kendisinin motor nöronlar için toksik olması sonucu geliştiğini bildirmektedir. Yapılan çalışmalar mutant Cu/Zn-SOD moleküllerinin kümelenme

41 Berdyński, M., Miszta, P., Safranow, K., Andersen, P. M., Morita, M., Filipek, S., Żekanowski, C., & Kuźma-Kozakiewicz, M. (2022). SOD1 mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis analysis of variant severity. *Scientific Reports*, *12*(1), 103. https://doi.org/10.1038/s41598.021.03891-8.

eğiliminde olduklarını ve fibril yapılar oluşturarak toksik etki yapabileceğini göstermiştir. Cu/Zn-SOD enziminin hücre içerisindeki yerleşimi sitozol dışında ve mitokondriyal zarlar arası alandadır. Böylelikle toksik protein mitokondriyal disfonksiyona yol açabilir. Transgenik fare modellerinde mitokondriyal dejenerasyon belirgin olmakla beraber, ALS hastalığının semptomlardan önce de görüldüğü bildirilmektedir. Motor nöronlar çok uzun olmaları nedeniyle çok fazla miktarda Cu/Zn-SOD içerir. Anormal yapılı SOD'lar nörofilamentlere bağlanabilir. Böylelikle nörofilament proteinlerinde nitrasyon ve oksidatif hasar oluşur. [42] ALS hastalığına sahip bireylerin omuriliğinde glikoksidasyon ürünleri ile protein karbonilleri, 3-nitrotirozin ve DNA'da 8-OH-dG miktarları artmaktadır. SOD-1 mutantına sahip farelerde omurilikte belirlenen nitratlanmış proteinlerden bazıları aktin, ATP sentaz ve enolaz enzimidir. Nitrasyonun hastalığın belirtileri oluşmadan gerçekleştiği gözlemlenmiştir. İncelenen oksitlenmiş proteinlerin UCHL1 ve Cu/Zn-SOD içeriyor olması ubikitin-proteazom döngüsü ile olan bağlantıyı belirtir. Sağlıklı motor nöronlarda NOS miktarları yüksek değilken hasar gördüklerinde iNOS oluşabilmektedir. Nitratlı Hsp90 molekülünün motor nöronlar için toksik olabileceği iddia edilmiştir. Ek olarak hastalığa sahip kişilerin omuriliğinde demir, çinko ve COX 2 miktarlarında yükselme görülmektedir. ALS hastalığının tedavi yöntemlerini geliştirebilmek için insan SOD enzimini aşırı eksprese eden mutant farelerin kullanımı çok yaygındır. Tedavide kullanılan riluzol ilacının presinaptik uçlarda glutamat salınımının inhibisyonunu sağlayarak farelerin ömrünü uzattığı görülmüştür. ALS tedavisinde kullanılan bu ilaç, ALS hastalarının yaşam sürelerini uzatmaktadır.

Friedreich ataksisi

Friedreich ataksisi mitokondride demir metabolizmasında görev alan frataksin proteininin oluşumunu sağlayan 9. kromozom üzerindeki bir genin mutasyonları nedeniyle oluşmaktadır. [43] Hastalık genellikle 15 yaşından sonra başlamaktadır. Genin sahip olduğu bu mutasyon intron-1 bölgesindeki trinükleotid tekrar dizisinin genişlemesidir. Bu durum genin transkripsiyonunu azaltıcı etki gösterir. Frataksin miktarlarının az olması, kompleks I, II, III, IV'de ve akonitazda Fe/S kümelerinin oluşmasını önlemektedir. Frataksin proteinin kalpte yüksek miktarlarda bulunması nedeniyle bu hastalığa

42 Barber, S. C., Mead, R. J., & Shaw, P. J. (2006). Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1762*(11-12), 1051-1067. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.03.008.

43 Marmolino, D. (2011). Friedreich's ataxia: past, present and future. *Brain Research Reviews*, *67*(1-2), 311-330. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2011.04.001.

sahip bireylerin ölümü kalp ile ilişkili problemlerden kaynaklanır. İnhibe SOD sinyallerinden kaynaklanan sürekli oksidatif hasarın, mitokondri eksikliğine bağlı olarak kardiyak ve nöronal hücrelerin ölmesine yol açtığı bildirilmiştir. Yapılan araştırmalar Friedreich ataksisinde kullanılan bir antioksidan molekül olan idebenonun sınırlı terapötik fayda sağladığını ve burada oksidatif hasardaki rolünün etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bazı çalışmalarda bu ilacın yüksek 8-OH-dG miktarlarını azalttığı bildirilmiştir. Koenzim Q ve α-tokoferol kombinasyonlarının da hasta bireylere yardımcı olduğu belirtilmiştir.

Huntington hastalığı

Huntington hastalığı otozomal dominant, kalıtsal bir hastalıktır. Genellikle 30 yaşından önce görülmeyen ve ilerleyici bir nörodejeneratif hastalık olan Huntington hastalığı başlamasından sonra 20 yıl ya da daha uzun süreler devam eder. Hastalarda psikiyatrik bozukluklar, istemsiz seğirmeler, demans ve hareketlerde kontrolsüzlük gibi semptomlar görülür. Hastalık huntingtin proteinini oluşturan kromozom 4 üzerindeki bir gendeki hatadan kaynaklanır. Huntingtin proteininin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte otofaji seviyelerinin kontrolünde, sistein sentezinin düzenlenmesinde ve bir nörotrofik faktör olan BDNF'nin mikrotübüllerde taşınmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Sağlıklı gende ortalama olarak 19 kez CAG trinükleotidi tekrar eder ve protein oluşumunda N-terminal kısmına yakın bir bölgede glutamin kalıntısını kodlarken, Huntington hastalığında tekrarlama sıklığı ortalama 43 gibi çok daha yüksektir. Daha çok glutamin kodlanır ve poliglutamin yapıları oluşur. Hastalığa da ilgili gende tekrar uzunluğunun 40 veya daha fazla olması sebep olur. Hatalı huntingtin proteini yapısında çok fazla glutamin tekrarlarının olması nedeniyle toksiktir. Toksisitenin nedeni olarak, hatalı huntingtin proteinin kümelenerek ubikitin ve proteazom bileşenlerini içeren inklüzyon cisimleri oluşturma eğilimi yüzünden proteazomun fonksiyonunun bozulabilecek olması belirtilmektedir. [44] Hastalarda otofaji metabolizmasının da iyi çalışmadığı belirtilmiştir. Mutant huntingtin proteinine sahip hücrelere ve farelere trehaloz şekerinin verilmesiyle mutant proteinlerin birikiminin ve toksisitenin azaldığı bildirilmiştir. Huntington hastalığına oksidatif hasarın katkısı olup olmadığını anlayabilmek için yapılan incelemelerde, striatal nöronların DNA›sında 8-OH-dG miktarının, NOX2 aktivitesinin ve beyin omurilik sıvısı F2-IsoP seviyelerinin arttığı görülmüştür.

44 Ortega, Z., & Lucas, J. J. (2014). Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *7*, 77. https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00077.

Transgenik fare modelleri ile yapılan çalışmalarda da mitokondri fonksiyonunun bozulması, artmış 8-OH-dG miktarları, nitrotirozin oluşması ve lipit peroksidasyonunun artışı bildirilmiştir. Huntington hastalığına sahip bireylerin ve transgenik farelerin beyin dokuları ile yapılan redoks proteomiks uygulamasında enerji metabolizmasında görevi olan α-enolaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz ve akonitaz gibi proteinlerde oksidatif hasar tespit edilmiştir. [45] Hasta bireylerde yapılan postmortem çalışmalarda, mutant huntingtin proteininin mitokondrilere yerleştiği ve onlara zarar vermesi sonucu akonitaz ve kompleks II, III aktivitelerinde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Kompleks II'nin inhibe olması reaktif türlerin üretimini artırır. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, striatum ve korteksde NADPH oksidaz aktivitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Lipoik asit, NADPH oksidaz inhibitörü, kreatin, sisteamin, koenzim Q ve minosiklin uygulamalarının motor faaliyetleri artırdığı ve nöronların ölümünü yavaşlattığı bildirilmiştir.

Nöronal seroid lipofuksinozlar

Nöronal seroid lipofuksinozlar otozomal resesif hastalıklardır. Dejeneratif olan bu hastalıklar ilerleyici veya ölümcüldür. Hastalık önce beyin ve retinanın etkilenmesinden dolayı demans, görme kaybı ve nöbet semptomları ile başlar. Semptomların görüldüğü zamana göre hastalığın ismi infantil nöronal seroid lipofuksinoz, juvenil nöronal seroid lipofuksinoz ve yetişkin nöronal seroid lipofuksinoz olarak değişmektedir. Nöronal seroid lipofuksinoz hastalığına çoklu gen mutasyonlarının oluşması ve lizozomal fonksiyonu etkilemesi sebep olur. Beyin korteks ve serebellumunda yaş pigmenti olan lipofuksin benzeri floresan pigmentlerinin birikimi görülmektedir. Lizozomlardan oluşturulan depolama gövdelerinin içinde pigmentler bulunmaktadır. İnfantil dışındaki diğer nöronal seroid lipofuksinoz türlerinde, depolama gövdelerinin içerisindeki protein yapıların çoğu altbirim c'dir. Bu yapı mitokondriyal ATP sentazın hidrofobik bir bileşenidir. Nöronal seroid lipofuksinoz hastalığında anormal lizozomların birikmesinin otofajiden gelen proteinleri parçalama fonksiyonunda zorlanmalarından dolayı oluştuğu düşünülmektedir. [46]

45 Perluigi, M., Poon, H. F., Maragos, W., Pierce, W. M., Klein, J. B., Calabrese, V., Cini, C., De Marco, C., & Butterfield, D. A. (2005). Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease. *Molecular & Cellular Proteomics*, *4*(12), 1849-1861. https://doi.org/10.1074/mcp.M500090-MCP200.

46 Wei, H., Kim, S. J., Zhang, Z., Tsai, P. C., Wisniewski, K. E., & Mukherjee, A. B. (2008). ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. *Human Molecular Genetics*, *17*(4),

Merkezi sinir sistemindeki pek çok bozukluğun oksidatif hasar ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir.[47] Bunlardan bazıları ve ilişkili metabolik süreçler aşağıda yer almaktadır. Tüm bu hastalıklarda görülen oksidatif hasar belirtileri, hastalığın mekanizmasından, tedavi amaçlı kullanılan ilaçlardan veya psikolojinin neden olduğu beslenme ve yaşam tarzı değişiklikleri gibi farklı nedenlerden kaynaklanabilir.

- Kronik yorgunluk sendromu: X'e bağlı adrenolökodistrofi hatalı taşıyıcıdan dolayı peroksizomların uzun zincirli yağ asitlerini oksitleyemediği bir hastalıktır.
- Zellweger sendromunda peroksizomlar doğru bir şekilde birleşemez.
- Niemann-Pick C1 hastalığı kolesterolün hücre içi taşınmasını sağlayan proteinleri etkileyen mutasyonları barındırır. Bu hastalıkta lizozomlarda kolesterol ve oksidasyon ürünleri birikmektedir.
- Rett sendromu sinaptik plastisitenin düzenleyicilerinden metil-CpG bağlayıcı protein-2'nin kodlanmasını sağlayan gendeki mutasyonlarla oluşur. Hastalığın erken dönemlerinde plazmada adrenik asidin oksidasyon ürünlerinin miktarı oldukça fazladır. Bu durum hastalıkta lipit peroksidasyonunun etkili olduğunu gösterir. Epilepsi hastalığında da geçirilen nöbetlerin eksitotoksisite içermesi GSH miktarının azalması ve oksidatif hasarın artmasına neden olur.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

469-477. https://doi.org/10.1093/hmg/ddm324.

47 Salim, S. (2017). Oxidative Stress and the Central Nervous System. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *360*(1), 201-205. https://doi.org/10.1124/jpet.116.237503.

Kanser

Dyana Sarı*
A. Süha Yalçın*

Çok hücreli organizmalarda birçok hücre mitojenik sinyaller alır. Hücre bölünme sürecini başlatan bu sinyaller arasında trombosit türevi büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin-benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), fibroblast büyüme faktörü (FGH), IL-2, IL-3 sayılabilir. PDGF, FGF, EGF, IGF-1 gibi büyüme faktörlerinin etki ettikleri hücre aralığı geniş olmasına rağmen bazı büyüme faktörleri daha seçicidir. Herhangi bir hücre, yüzeyinde büyüme faktörü ile kompleks oluşturabilecek ve hücre içi sinyal mekanizmalarını aktifleştirebilecek reseptöre sahip ise büyüme faktörlerine yanıt verir. Bu yanıtla birlikte gen ekspresyonları ile reaktif türlerin oluşum mekanizmalarında değişiklikler oluşur. Böylece hücre bölünmeye başlar. Hücre bölünmesini teşvik edici faktörlerin yanında bölünmeyi TGF-β gibi inhibe edici moleküller de vardır. Yetişkin insanlarda nöronlar hücre bölünmesine uğramazken, hepatositler yılda bir kez, ince bağırsak epitel hücreleri günde bir-iki kez, ince bağırsağın iç yüzeyindeki hücreler ise sürekli bölünürler. Her hücre çeşidinin bölünme hızı ve frekansı farklıdır.

Hücre döngüsü ve hücre bölünmesi

Hücre bölünmesi mitoz ve interfaz olarak iki faza ayrılır, interfaz da kendi içinde 3 faza sahiptir. Bu süreçte genetik olarak birbirinin ve donör hücrenin aynısı olan iki hücre üretebilmek için DNA kendini eşlemelidir. DNA replikasyonu hücre döngüsünün S fazında gerçekleşir. İnterfazın G1 ve G2 fazları ise hücreye mitoz bölünmeye geçmek için zaman tanıyan fazlardır. Bu fazlarda biyomoleküllerin sayıları artar ve bölünme için gerekli bileşenler oluşturulur. Özellikle G2 fazında DNA hasarlarının tespiti yapılır ve eğer DNA'da hasar var ise bu hasarın giderilmesi sağlanır. G1 fazındaki hücreler herhangi bir mitojenik sinyal almayıp, DNA replikasyon komutu almazlarsa hücre G0 fazına geçebilir. G0 fazı hücrelerin dinlenme ve durağan fazı olarak bilinir. İnterfazdan sonra yeterli miktarda DNA'ya ve biyomoleküllere sahip olan hücre mitoz fazına geçerek ikiye ayrılır ve birbiriyle eş iki hücre oluşur. Hücre döngüsünün kontrolü için birçok protein gereklidir. Bunlardan en yaygın olanlar siklin-bağımlı

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

protein kinazlardır (cdk). [1] Cdk proteinlerinin hedefi olan proteinleri fosforilleme aktiviteleri de çok önemli diğer bir protein ailesi olan siklinler tarafından düzenlenir. Farklı siklin ve cdk proteinleri hücre döngüsünün farklı noktalarında kompleks oluşturur ve aktive olurlar. Ubikitin ve proteazomlar ise siklinlerin etkisiz hale getirilmesinde görev alırlar. Hücre döngüsünün farklı fazlarında kontrol noktaları bulunur. Kontrol noktaları, hücrenin diğer bölünme fazına geçmeden önce DNA replikasyonunun tamamen bittiğini ve DNA'da hasar olmadığını kontrol ederler. Örneğin hayvan hücrelerinde G1 fazında ana kontrol noktası bulunur. G1 kontrol noktasında DNA'da hasar var ise hücrenin S fazına geçmesi engellenir. S fazında da DNA genomunda hasar tespit edilirse hücre kendisi bölünmeyi durdurur. Diğer bir kontrol noktası ise G2 fazında bulunur. Bu kontrol noktası ise DNA replikasyonu bitmemişse ve DNA'da hasar onarılmamış ise hücrenin mitozis fazına geçişine izin vermez. Sonuç olarak kontrol noktaları DNA replikasyonunu durdurabilir ve DNA hasarı var ise onarılmasını emredebilir. Amaçları hasarsız genoma sahip hücrelerin oluşmasını sağlamaktır. Kontrol noktalarında siklin/cdk komplekslerine ek olarak başka proteinler de bulunur. Örneğin G1 kontrol noktasında ATM ve ATR proteinleri bulunur. ATM proteinleri DNA'da bulunan çift zincir kırıklarını belirler, ATR ise UV radyasyonu ve eşlenmemiş DNA ile aktif olur. İki proteinin aktive olması ile kontrol noktası kinazları aktive edilir ve bu kinazlar p53 proteinini fosforilleyerek aktifleştirir. p53 proteini G2 kontrol noktasında da bulunur. p53 proteini fosforillendiğinde p21 geninin üretimini artıran bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapar ve p21 siklin/cdk kompleksine bağlanarak kompleksi inaktif tutar. İnaktifleşen kompleks DNA sentezi için gerekli enzimlerin ekspresyonlarını gerçekleştiren E2F'yi aktifleştiremez ve DNA sentezi başlatılamaz. Böylece hücre G1 fazında tutulur. Hücrelerin G1 fazından S fazına geçişleri ayrıca besin yetersizliği ya da oksidatif stres varlığı ile engellenebilir. Oksidatif stres, genelde reaktif türlerin DNA'a hasar vermeleri sonucu açığa çıkar ve FOXO trankripsiyon faktörünün de içinde bulunduğu bir süreci kapsar. Besin az ise veya oksidatif stres varsa FOXO trankripsiyon faktörleri çekirdekte birikir ve sitotoksik, pro-apoptotik faktörlerin artmasına neden olur. [2]

1 Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J. M., Manning, G., Morgan, D. O., Tsai, L. H., & Wolgemuth, D. J. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nature Cell Biology*, *11*(11), 1275-1276. https://doi.org/10.1038/ncb1109-1275.

2 Storz, P. (2011). Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, *14*(4), 593-605. https://doi.org/10.1089/ars.2010.3405.

Tümörler

İnsan vücudunda yaklaşık $3x10^{13}$ hücre bulunmaktadır ve yaşamı boyunca yaklaşık 10^{16} hücre bölünmesi geçirir. İnsanda hücre bölünme sürecinde DNA polimeraz hatalarından dolayı her genin bölünmesinde yaklaşık 10^{6} mutasyon gerçekleştiği saptanmıştır. Oluşan bu mutasyonların tespiti her genin insanın ömrü boyunca yaklaşık 10^{10} mutasyona uğradığını gösterir. Bu nedenle genlerde oluşan mutasyonun, genomda oluşan hasarın onarılması veya elimine edilmesi biyolojik yapıların fonksiyonlarını yerlerine getirmeleri için hayati önem taşır. Tümörler kontrolsüz hücre bölünmesi sonucu oluşan anormal doku kütleleridir. Bu tarz doku kütlelerinde büyüme hızı çok yüksektir, normal doku ile koordinasyon mevcut değildir ve hücre içi ortak çalışmalar bozulmuştur. Tümörlerin en önemli sınıflandırılması benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olarak yapılır. [3] Benign tümörler ortaya çıkış noktalarında sabit kalırlar, metastaz yetenekleri yoktur. Öldürme oranları çok azdır, iyi huylu tümörler olarak bilinirler. Fakat çıkış noktaları hayati bir yapı üzerinde ise ölümlere neden olabilirler. Malign tümörler ise kansere neden olan tümör tipidir. Malign tümörler benign tümörlerin aksine vücudun farklı bölgelerine yayılabilirler. Metastaz yetenekleri gelişmiştir. Kan dolaşımı veya lenfatik sistemle tümörün orijinal bölgesinden başka vücut bölgelerine giderek ikincil tümörlerin (metastaz) farklı bölgelerde oluşmasını sağlarlar. Metastaz hızları ve büyüme hızları tümörden tümöre farklılık gösterir. Kanserler tömörün hangi dokudan türediğine göre isimlendirilir. Örneğin epitel dokulardan yükselen tümörlerin neden olduğu kansere karsinoma denirken, tümör kas veya bağ dokudan yükselmişse sarkoma adını alır. Kanserli bölgelerdeki malignant dönüşüm hücre metabolizmasında değişikliklere de neden olur. Glikoliz hızı, laktat üretimi, NADPH sentezi artar. Pentoz fosfat yolağı aracılığı ile NADPH sentezinin artması, artmış olan hücre bölünmesine yetecek kadar DNA sentezi için ya da hücrenin oksidatif stres ile başa çıkması için gereklidir.

Karsinogenezin safhaları

Normal hücrelerin malignant hücrelere dönüşmesine karsinogenez denir, karsinogeneze neden olan ajanlar da karsinojen olarak isimlendirilir. Karsinogenenez, kompleks ve birçok basamağa sahip bir süreçtir. Bu süreç içinde öncelikle DNA hasarına sahip anormal bir hücre oluşur ve bu hücre seri mutasyonlar, yüksek bölünme hızı ve frekansı, gen ekspresyonlarındaki farklılık gibi yollarla doku içindeki sayısını çoğaltır. Malignant hücre oluşumunu etkileyen faktörler genetik ve çevresel faktörlerdir. [4] Örneğin

3 Weinberg, R. (2014). The biology of cancer Second edition. *Garland-Norton*.

4 Curtin, N. J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*, *12*(12), 801-817. https://doi.org/10.1038/nrc3399.

meme kanseri oluşumu BRCA1 ve BRCA2 genlerinde bulunan mutasyonlar ile gerçekleşir. Kanser oluşumunda yaşam tarzı da belirleyicidir. Obezite, sigara kullanımı, yağ oranı yüksek diyet alışkanlıkları kanser oluşum riskini artırırken, sebze içeriği yüksek olan diyetler bazı kanserlerin oluşum riskini düşürür. Malignant hücre oluşumunu etkileyen faktörler arasında tümörün ortaya çıktığı hücrenin metabolizması, transkripsiyon faktörleri ve çevresinde bulunan hücrelerin tipleri de yer alır. Karsinogenezin başlaması bir karsinojenin DNA ile etkileşimi sonucu oluşan DNA değişiklikleri ile tetiklenir. Kanser başlangıcından korunmanın etkin yolları olarak karsinojen alımını azaltmak, Faz1/Faz2 enzimlerinin aktivitelerini artırarak karsinojenleri detoksifiye etmek, DNA onarımını artırmak, hücrenin apoptoz yolaklarını aktifleştirmek sayılabilir. Karsinojenezin başlaması için hücrede mutasyonun olması yeterli değildir. Bu mutasyonun hücrede korunması, yani en az bir kez replikasyona uğraması ve oluşan hücrede de bu mutasyonun sabit kalması gerekir. Yani geri çevrilemez DNA değişikliği gereklidir. Mutasyonun sabit kalmasından sonra hücre çoğalması bölünen bir hücrede normal olarak devam ederken, çoğalma mutasyona sahip ilk hücre tarafından da uyarılabilir. İnsanlarda görülen birçok kanser karsinoma tipindedir. Çünkü epitel hücrelerin bölünme hızı çok yüksektir ve karsinojenlere maruz kalarak kanser oluşumunu başlatırlar. Başlama safhasını genelde tümör promotörlerinin aktiviteleri takip eder. Tümör promotörleri genetik alterasyona sahip ilk hücrenin fenotipinin ekspresyonlarını artırır. Ayrıca başlangıç hücresinde, hücre çoğalmasını artırırken apoptoz seviyelerini azaltırlar. Birçok karsinojenin yüksek dozları hem başlatıcı hem de promotör olarak sayılabilir. Fakat bir karsinojenin dozu kanser oluşumu başlatacak kadar fazla değil ise bu moleküller tümör promotörleri olarak adlandırılır. [5] Tümör promotörlerinin aktiviteleri sonucu başlatıcı hücrede meydana gelen DNA değişiklikleri, hücre farklılaşmasını ve büyümesini düzenleyen genlerin ekspresyon farklılıkları ile meydana gelir. Promotörün hücreden uzaklaştırılması genelde dokunun eski haline dönmesi ile sonuçlanır, ancak hala ilk başlatıcı hücre dokuda bulunmaktadır. İlerleme safhası DNA'da ek hasarların oluşmasını kapsar. Oluşan DNA hasarları hücrelere avantaj sağlarsa daha hızlı bir şekilde büyür ve tümör oluşumu hızlanır. DNA'da olan değişiklikler hücreyi ek mutasyonlara açık hale getirir ve yeni mutasyonlar oluşmaya devam eder. Oluşan mutasyonlar tümörü daha agresif bir biçime sokabilir. DNA'sında birçok hasar bulunan hücre artık epitel hücre membranını yıkabilecek bir mutasyona sahip olabilir. Artık oluşan tümör membran ile kaplı değildir ve anjiyogenez başlar. Anjiyogenez hücrenin çevresinde bulunan damarların tümör

5 Boyland, E. (1985). Tumour initiators, promoters, and complete carcinogens. *British Journal of Industrial Medicine*, *42*(10), 716-718. https://doi.org/10.1136/oem.42.10.716.

tarafından kullanılmaya başlanmalarıdır. Böylece tümör hızlı şekilde büyümesi için gerekli besin ve oksijen kaynağına sahip olur. Artık tümör tespit edilecek kadar büyük bir doku kütlesi haline gelmiştir. Anjiyogenez safhasından sonra tümör komşu hücreleri işgal etmeye başlar. Tümörlü dokudan çıkan hücreler kan dolaşımına katılabilir. Malignant hücreler kan dolaşımını kullanarak vücudun diğer kısımlarına ulaşabilir ve farklı bölgelerde tümör oluşumuna neden olabilir. Bu süreç metastaz olarak isimlendirilir ve tümörü ölümcül yapan en önemli özelliğidir. [6] Metastaz sonucu oluşan sekonder tümörler aynı şekilde vücudun farklı noktalarına giderek farklı tümör kolonileri kurabilir.

Genler ve kanser

Kanser oluşumunda birçok gendeki değişiklikler önemli rol oynar. Kanserle ilişkisi olan genler arasında onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve kararlılık genleri olarak sayılabilir. [7] Onkogenler ilk olarak tümöre neden olan virüslerde bulunmuştur. Daha sonra onkogenlerin konakçı hayvanlarda bulunan ve büyümeyi düzenleyici proteinleri kodlayan proto-onkogen ismi verilen genlerden türedikleri anlaşılmıştır. Proto-onkogenler hücre büyümesi ile ilişkili genlerdir. Bunlar büyüme faktörlerini ve reseptörlerini, büyüme sinyalini reseptörden çekirdeğe taşıyan molekülleri, hücre döngüsünü kontrol eden diğer proteinleri veya programlı hücre ölümü olan apoptozu kontrol eden proteinleri kodlarlar. N-ras ve bcl-2 proto-onkogenlere örnek olarak verilebilir, bcl-2 apoptoz baskılayan bir gendir. Onkogenler proto-onkogenlerin aktifleşmiş halleridir. Proto-onkogenlerin aktivasyonu genin transkripsiyona uğrayan bölgesinde (*exon*) meydana gelen mutasyon ve kromozomal düzenlemeler ile gerçekleşebilir. Böylece birçok hatalı ürün meydana gelir. Örneğin bir onkogen olan erbB EGF reseptör geninin mutasyona uğramış halidir. Bu gen hücreye sürekli sinyal yollar. İnsan kanserlerinde sıkça görülen bir diğer mutasyonda RAS geninde meydana gelen mutasyondur. Bu gende ortaya çıkan nokta mutasyonu GTP hidrolizini inhibe eder. GTP'nin hidrolize olamaması GTP bağımlı protein konformasyonunun sürekli aktif olmasına neden olur. Böyle bir mutasyon sonucu değişikliğe uğramış ve aktive olmuş proto-onkogenler, artık hücreye sürekli bölünme komutu veren ya da hücre ölümünü azaltıcı etkilere sahip olan, sonuç olarak kontrolsüz biçimde hücre kütlesinin artmasını sağlayan onkogenlere dönüşür. Tümör baskılayıcı genler normalde hücre bölünmesini kısıtlayan genleri

6 Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 28. https://doi.org/10.1038/s41392.020.0134-x.

7 Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *New England Journal of Medicine*, *358*(5), 502-511. https://doi.org/10.1056/NEJMra072367.

kodlar. Bu genlerden birinde veya daha fazlasında meydana gelen mutasyonlar tümör oluşumuna yol açabilir. Hasarlı tümör baskılayıcı genlerden kaynaklanan kontrolsüz büyüme, onkogenlerdeki mutasyonlardan kaynaklananların aksine genetik olarak çekiniktir. Ancak bir kromozom çiftinin her ikisinde mutasyon varsa tümör oluşur. En önemli tümör baskılayıcı gen p53'tür. [8] p53 geni insan kanser vakalarının çoğunda mutasyona uğramış biçimde bulunur. [9] p53 proteini bir transkripsiyon faktörüdür ve DNA zincirlerindeki hasarları tespit edebilir. DNA hasarını bulduğunda hücre döngüsünü durdurur ve hasarın düzeltilmesini sağlar, bu nedenle "genom koruyucusu" olarak anılır. UV radyasyonu, iyonlaştırıcı radyasyon, DNA'ya zarar veren reaktif türler, DNA modifiye edici ajanlar gibi farklı nedenlerden dolayı DNA hasarı oluşabilir. Eğer p53 proteini hasarın yüksek miktarda olduğunu algılarsa apoptoz indüklenir ve bax gibi pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonları artar. Böylece hücrenin hasarlı DNA'ya sahip olması engellenir. Normal hücrelerde p53 düzeyleri düşüktür. Sürekli olarak sentezlenir ama hızlı bir şekilde de parçalanır. p53 degradasyonu MDM2 proteini tarafından gerçekleştirilir. MDM2 p53'nin transkripsiyon faktörü olarak işlev yapmasını engeller ve proteazomlar tarafından parçalanmasını kolaylaştırır. DNA'da hasar var ya da onkogenik bir sinyal mevcut ise p53'ün stabilizasyonu sağlanır. Stabilizasyon ATM kinazların aktiviteleri ve ARF'nin etkileriyle sağlanır. Örneğin ATM kinaz bir onkojenik sinyal varlığında p53'ü fosforilleyerek MDM2'nin işlev yapmasını engeller. Aktif p53 geni, siklin bağımlı kinazların inhibitörü olan p21 proteinini, hücre bölünmesini durduran Gadd45 proteinini ve MDM2 proteinini kodlayan genlerin ifadesini düzenler. Böylece p53 kendi hücreiçi düzeylerini de kontrol eder. Diğer bir tümör baskılayıcı gen PTEN'dir. Çoğu kanser vakalarında PTEN genlerinde mutasyonlara rastlanmıştır. Kararlılık genleri DNA'nın değişikliklere uğramasını engellemeye ve onu "normal" tutmaya çalışan gen ailesidir. Bu genler DNA'da bulunan hasarları onarıp hücre bölünmesinin ve kromozomal ayrılmanın düzgün bir şekilde yapılmasını sağlar. Kararlılık genlerinde meydana gelen herhangi bir fonksiyon bozukluğu ya da mutasyon diğer genlerde mutasyon riskinin artmasına neden olur. Kararlılık genlerinde bulunan bir hata onkogenlerin oluşmasını ve tümör baskılayıcı genlerin aktivitelerinin kaybı ile sonuçlanır. Kararlılık genlerinde meydana gelen herhangi bir inaktivasyon kromozomal kayıplara ve farklı düzenlemelere yol açabilir. Bazı durumlarda üreme hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerde, proto-onkogenlerde ve kararlılık genlerinde oluşan

8 Efeyan, A., & Serrano, M. (2007). p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*, *6*(9), 1006-1010. https://doi.org/10.4161/cc.6.9.4211.

9 Muller, P. A., & Vousden, K. H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology*, *15*(1), 2-8. https://doi.org/10.1038/ncb2641.

mutasyonlar meydana gelir. Böylece oluşan yeni dölün kanser riski çok yüksek olur. Fakat yine de her durumda kanser oluşacağına dair kesin bir şey söylenemez.

Reaktif türlerin karsinogenez ile ilişkisi

Reaktif türler kanserin başlangıcında rol sahibi olabilir ve karsinogenezin tüm aşamalarına katılabilir. DNA hasarı ile p53 aktivitesini artırır, apoptoza neden olur ya da baskılayabilirler. Ayrıca FOXO'ları aktifleştirebilir, fagositleri çağırabilirler. Yapılan bir çalışmada fare fibroblastlarına yeterli miktarda reaktif türler verildiğinde malignant dönüşümün oluştuğu gözlemlenmiştir. Buna karşılık çok fazla reaktif tür hücre bölünmesini durdurup apoptozu tetikleyebilir. Bu durumda hemen akla gelen soru reaktif türler kanser oluşumu üzerinde iyi etkiye mi sahiptir sorusudur. Sorunun cevaplanması için antioksidan savunma sisteminin incelenmesi gereklidir. Bu alanda yapılan çalışmalarda antioksidan savunma sistem enzimlerinde defektler bulunduğunda kanser oluşma riskinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bunun başlıca nedeni antioksidan savunma enzimlerinin DNA'da oluşan hasarların düzeltilmesindeki rolleridir. p53 proteinin aktivitesi reaktif oksijen türleri ile yakından ilişkilidir.

Bu ilişkiye yönelik örnekler şöyle sıralanabilir: Birinci olarak hücrede bulunan normal düzeylerdeki p53, antioksidan savunma sistemlerinde görevli enzimleri kodlayan genleri uyarır ve SOD, GPx1, katalaz gibi enzimlerin hücrede sentezini artırır. İkinci olarak reaktif oksijen türleri DNA hasarına neden olarak p53 aktivitesini artırırlar. Üçüncü olarak ise yüksek miktarda p53 reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olur. Oluşan reaktif oksijen türleri de p53'ün pro-apoptotik ve sitostatik etkilerine katkıda bulunur. Öte yandan p53'nün kendisi oksidatif hasara uğrayabilir. İnsan p53 proteini 10 sistein kalıntısına sahiptir ve aktivite için bunlardan bazılarının Zn^{2+} bağlamaları gerekir. p53'ün oksidasyonu transkripsiyon faktörü olarak işlev yapmasını engeller. Agresif beyin kanserlerinde p53 proteininin oksidasyona ve nitrasyona uğradığı belirlenmiştir. Sonuç olarak p53 ve reaktif oksijen türleri arasında çok bağlantılı karmaşık bir ilişki vardır. [10]

İyonlaştırıcı radyasyonun kansere neden olduğu uzun zamandır bilinmekte ve kabul görmektedir. Radyasyon nedeni ile oluşan karsinogenez süreci proto-onkogenlerin aktivasyonunu, kararlılık genlerinin ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunu içerir. Radyasyonun neden olduğu DNA hasarlarından bazıları, enerjinin

10 Liu, B., Chen, Y., & St Clair, D. K. (2008). ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radical Biology and Medicine*, *44*(8), 1529-1535. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.011.

direkt olarak DNA tarafından absorpsiyonunun yanında OH• radikali aracılığı ile de gerçekleşir. OH• radikali karsinogenezin değişik safhalarında yer alır. DNA'ya saldırarak mutajenik purin, pirimidin ve deoksiriboz oksidasyon ürünlerini oluşturur. Araştırmalar insan kanser vakalarının yaş ile birlikte arttığını göstermektedir. Yapılan gözlemlerde yaşam boyunca maruz kalınan reaktif oksijen türlerinin saldırısı sonrası karsinojenlerin türemesi ve yaşa bağlı kanser riskinin artması arasında bir korelasyonun varlığı bildirilmiştir. [11]

İnsan ve hayvan kaynaklı tümörleri inceleyen birçok çalışmada DNA'da artmış 8-OH-dG hasarı olduğu gösterilmiştir. [12, 13] Çalışmalardan bazıları artmış malignant durum ve yüksek ölüm oranları ile yüksek 8-OH-dG düzeylerinin bağlantılı olduğunu bildirmiş, bazı vakalarda kütle spektrometresi ile oksidatif DNA hasarlarının OH• radikali tarafından oluşturulduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca tümörlerin prooksidan durumda olduğu ve artmış mitokondriyal süperoksit üretimi ile NADPH oksidaz aktivitesinin reaktif oksijen türlerinin kaynağı olduğu düşünülmektedir. Tümörlerin oluşturduğu reaktif oksijen türlerinin genetik kararlılığı bozmaya yönelik katkıları vardır. NADPH oksidazların kanserden kansere çeşitlilik gösterdiklerine ve süreç içinde yer aldıklarına inanılmaktadır. Tümörlerde reaktif oksijen türlerinin oluşmasına ve DNA oksidatif hasarının artmasına neden olan bir diğer kaynak prolin oksidazdır. Prolin oksidaz mitokondriyal bir enzimdir ve hidrojen peroksit üreterek genomdaki oksidatif hasarların artmasına katkıda bulunabilir. Malignant dokularda artmış olan oksidatif DNA hasarının düzeltilmesi için hücrenin DNA tamir mekanizmaları yeterli değildir. Bu nedenle genom oluşabilecek ileri hasarlara karşı açık hale gelir. Tamir mekanizmaları çok yoğun bir şekilde varolan hasar üzerine çalışmaktadır.

Bunların yanı sıra oksitlenmiş lipitlerin ve proteinlerin spesifik kanser çeşitlerinde artmış olduğu ve karsinogeneze katkı yaptığı kabul edilmektedir. Sonuç olarak reaktif türler, doğrudan veya dolaylı yollardan DNA'nın oksidatif hasarına neden olabilir.

DNA hasarı oluşturabilen diğer bir mekanizma da reaktif oksijen türlerinin gen ekspresyonlarında değişikliklere neden olmasıdır. DNA'da bulunan oksidatif hasar metilasyonu azaltır. Herhangi bir gen metilasyona uğramadığı zaman eksprese edilmeye devam

11 Totter, J. R. (1980). Spontaneous Cancer and Its Possible Relationship to Oxygen Metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *77*(4), 1763-1767. http://www.jstor.org/stable/8535.

12 Halliwell, B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochemical Journal*, *401*(1), 1-11. https://doi.org/10.1042/bj20061131.

13 Kim, Y. J., Kim, E. H., & Hahm, K. B. (2012). Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: challenges and opportunities. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *27*(6), 1004-1010. https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2012.07108.x.

eder. Oksitlenmiş guanin nükleotitlerinin metilasyon düzeylerini düşürerek uygun olmayan gen ekspresyonlarına neden olduğu bilinmektedir. Bazı çalışmalar hidrojen peroksitin gen metilasyonunu teşvik edici etkide bulunduğunu göstermiştir. Artmış metilasyon antioksidan enzimleri, tümör baskılayıcı genleri ve tamir edici mekanizmaları etkileyerek bazı genlerin sessiz kalmasına neden olabilir. Reaktif oksijen türlerinin epigenetik modifikasyonlara olan etkileri tam olarak açığa kavuşmamıştır. [14] Fakat yapılan çalışmalarda gen ekspresyonlarını organizmanın lehine ya da aleyhine değiştirebilecekleri bildirilmiştir. Hücrelerarası iletişim malignant hücrelerde düşük düzeylerdedir. Bu durum genetik bozukluğa sahip olan hücrenin kontrol dışı çoğalmasına ve koloni oluşturmasına hizmet eder.

Bazı tümör hücreleri reaktif oksijen türlerini kullanarak apoptozu baskılar. Reaktif oksijen türlerinin bu etkisi kaspaz aktivitesinin azalması ve hücre içi pH değişimi iledir. Bunların yanında reaktif oksijen türleri tümör baskılayıcı gen olan PTEN2'yi inhibe edip Akt yolağını uyararak hücrenin hayatta kalmasını sağlamaktadır. Bu etkilerin sonucunda genetik materyalinde hasar bulunan hücre çoğalmaya ve hasarlı DNA'yı gelecek nesillere aktarmaya devam eder. Kanser vakalarının çoğunda, malignant hücrelerde ve tümörlerde artmış oksidatif stresin varlığı rapor edilmiştir. Artmış oksidatif stres, genetik hasarın değiştirmediği antioksidan savunma tarafından artmış reaktif tür oluşumunun dengelenemesi, antioksidan savunmada azalmanın yanında değişmemiş reaktif tür oluşumunun varlığı, oluşan oksidatif hasarın tamir edici mekanizmalar ile yeterince düzeltilememesi veya yukarıda sıralanan maddelerin herhangi bir kombinasyonu sonucu ortaya çıkabilir. Birçok araştırmacı kanser hücrelerinin apoptozu baskılamak, hücre çoğalmasını, metastazı ve anjiyogenezi hızlandırmak ve genetik kararsızlığı uyarmak için reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırdığını ileri sürmektedir. [15, 16]

Karsinojenler

Yaşam için çok büyük öneme sahip oksijen direkt olarak bir karsinojen değildir. Fakat reaktif oksijen türlerine metabolize edildiğinde karsinojen özellik kazanır. Bu durum birçok molekül

14 Min, J. Y., Lim, S. O., & Jung, G. (2010). Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. *FEBS Letters*, *584*(11), 2427-2432. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.048.

15 Luo, L., Kaur Kumar, J., & Clément, M. V. (2012). Redox control of cytosolic Akt phosphorylation in PTEN null cells. *Free Radical Biology and Medicine*, *53*(9), 1697-1707. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.566.

16 Wang, Y., Qi, H., Liu, Y., Duan, C., Liu, X., Xia, T., Chen, D., Piao, H.-L., & Liu, H.-X. (2021). The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. *Theranostics*, *11*(10), 4839-4857. https://doi.org/10.7150/thno.56747.

için geçerlidir. Normalde karsinojen olmayan fakat metabolize edildiklerinde malignant dönüşüme neden olan birçok molekül bulunur. Birçok insan yapımı veya doğal olarak bulunan madde karsinojenik olarak tanımlanabilir. Bunlar arasında arsenik, benzen, asbestos yer alır. Kuzey Amerika'da ve Avrupa'da her üç kanser vakasından biri sigara veya diğer tütün ürünleri içinde bulunan karsinojenlere maruz kalınması sonucu ortaya çıkmaktadır. Benzopiren gibi bazı karsinojenler tamamen karsinojeniktir. Bunlar hem karsinogenezi başlatabilir hem de karsinogenez için promotör sayılabilir. Başka karsinojenler ise malignant dönüşümü sadece bir promotörün varlığında başlatabilirler. Tamamen karsinojen olan moleküllerin miktarları kanser oluşumu için yetersiz kalırsa da bunlar bir promotör varlığında kanser oluşumunu başlatabilmektedir. Karsinojenin biyolojik etkileri doza, hayvanın türüne, cinsiyete ve karsinojenin vücuda nasıl alındığına göre değişkenlik gösterir.

Birçok karsinojen etkisini DNA hasarına neden olarak gösterir. Oluşan karsinojen-DNA ürünü mutasyonlara neden olur. Mutasyonlar proto-onkogenleri aktive edebilir, tümör baskılayıcı genleri inaktive edebilir ve genetik materyalin kararsızlığına neden olabilir. Örneğin, N-metil-N-nitrozoguadinler direkt olarak DNA yapısındaki guaninleri metilleyerek modifiye eder. Birçok karsinojen ise etkilerini göstermek için aktif metabolitlerine çevrilmek zorundadır. Bu tür moleküllere pro-karsinojen denir ve aktif metabolitlerine çevrilmeleri birkaç basamaklı işlemler aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu süreçlerde birçok enzim görev alır. CYP'lerin ve faz II enzimlerinin karsinojen metabolizmasında önemli rolleri vardır. Örneğin, 2-asetilaminoflorin CYP'ler tarafından N-hidroksillenmiş ürünlere çevrilir. N-OH ürünleri de birkaç reaksiyona uğrayarak reaktif nitronyum iyonlarına dönüşebilir, DNA'daki guanin kalıntıları ile etkileşime girerek DNA hasarını ortaya çıkarır. Böylece başlangıçta karsinojen olmayan bir molekül CYP ve diğer enzimlerin aktiviteleri ile karsinojen bir moleküle dönüşüp malignant dönüşüme neden olabilir.

Bazı durumlarda DNA'ya saldırıda bulunan ajan karsinojenden türeyen bir reaktif türdür. Reaktif oksijen türleri yüksek dozda östrojen uygulamasının neden olduğu karsinogeneze katkıda bulunur. Östrojen CYP enzimleri ile 2-hidroksi ve 4-hidroksikatekol türevlerine çevrilir. [17] Bu moleküller hızlı bir şekilde metabolize edilmezlerse metal iyonları varlığında oksidasyona uğrarlar ya da oksidaz enzimlerinin aracılığı ile semikinon ve kinon üretimi için kullanılırlar. Sonuç olarak oluşan moleküller DNA bazlarına özellikle

17 Okoh, V., Deoraj, A., & Roy, D. (2011). Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signalings contribute to breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1815*(1), 115-133. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.10.005.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

de adenin ve guanine bağlanabilir. DNA türevleri oldukça kararsızdır ve depurinasyona neden olurlar.

Reaktif türler diğer karsinojenlerin neden olduğu DNA hasarını da artırabilir. Öncelikle reaktif türler detoksifikasyonda görev alan enzim aktivitelerinde ve enzim miktarlarında farklılıklara neden olabilir. İkinci olarak siklooksijenazlar, MPO'lar ve laktoperoksidazlar reaktif tür oluşturmak üzere pro-karsinojen molekülleri oksitleyebilir. [18] Bu reaksiyonların kanser gelişimine olan katkıları tam olarak aydınlığa kavuşturulamamış olmasına rağmen, karsinojenler ve reaktif türler arasında bir ilişki olduğu yadsınamaz bir gerçektir.

Karsinojenlerin neden olduğu DNA hasarlarının hepsi reaktif türleri içermez. Reaktif türler özellikle peroksizom proliferatörlerinin eylemlerinde rol oynar. [19] Peroksizom proliferatörlerinin aktiviteleri ile hücre içinde reaktif türlerin üretimi artabilir. Kemirgenlere verilen peroksizom proliferatörlerinin kanser oluşma riskini artırdığı gözlenmiştir.

Kemoterapi ve reaktif türler

Kemoterapi veya radyoterapi uygulamalarında normal hücrelere verilen zararı minimum düzeyde tutarak malignant hücreler öldürülmeye çalışılır. Fakat bu uygulamalar hasarlı dokular ve ölmekte olan kanserli hücreler tarafından DAMP'ların salınmasına neden olarak inflamasyonu tetikler. Bazı durumlarda inflamasyonun tetiklenmesi ilacın anti-kanser etkisi için gerekli ve yararlı iken bazı durumlarda tümörün büyümesine neden olur ve uygulamayı başarısız kılar. Kemoterapide kullanılan ajanların farklı sınıfları vardır. [20] Kemoterapi ajanlarının bir kısmı DNA'yı modifikasyona uğratarak, hücre bölünmesinde görev alan enzim ve proteinleri etkileyerek veya DNA replikasyon mekanizmalarıyla etkileşime girerek etki gösterirler. Kemoterapötik ajanların neden olduğu DNA hasarı ya da replikasyonun durdurulması p53 proteinini aktive eder, poliferasyonu durdurur. Böylece kontrolsüz hücre bölünmesi de durur ve kanserin ilerlemesinin önlenmesi amaçlanır.

Bazı antikanser ilaçları ise metabolik reaksiyonlar ile etkileşime girer. Örneğin, metotreksat dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder ve DNA replikasyonu için gerekli timin biyosentezi de dahil

18 van der Veen, B. S., de Winther, M. P., & Heeringa, P. (2009). Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, *11*(11), 2899-2937. https://doi.org/10.1089/ars.2009.2538.

19 Liou, G. Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, *44*(5), 479-496. https://doi.org/10.3109/107.157.61003667554.

20 Huang, C. Y., Ju, D. T., Chang, C. F., Muralidhar Reddy, P., & Velmurugan, B. K. (2017). A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. *Biomedicine (Taipei)*, *7*(4), 23. https://doi.org/10.1051/bmdcn/201.707.0423.

olmak üzere birçok biyosentetik reaksiyonda gerekli olan metil gruplarının taşınmasını önler. DNA replikasyonu için gerekli substratların hücre içi konsantrasyonunu düşürerek DNA sentezini inhibe eder ve etkisini bu şekilde gösterir. Yine bir kemoterapötik ajan olan 5-florourasil ise bir timin analoğudur. DNA sentezini timidilat sentazı inhibe ederek önler. Diğer bir antikanser ajan tamoksifendir. Tamoksifen bir hormon antagonistidir ve hormona bağlı büyümeyi inhibe eder. Günümüzde bu tür antikanser etkiye sahip birçok molekül tanımlanmış olup bunlar kanser vakalarının tedavisinde tek başına, birçok başka molekülle birlikte veya ışın uygulamaları ile kombine edilerek kullanılır.

Reaktif türler anti-kanser moleküllerinin etki mekanizmasında ve/veya yan etkilerinde aracı olan moleküllerdir. Örneğin, bir antikanser molekül olan cisplatin ile tedavi görmüş hastaların idrarlarında yüksek miktarda 8-OH-dG bulunmuştur. Sonuç olarak, oksidatif stres kemoterapötik ajanların etki mekanizmasında bir araç olabildiği gibi, aynı zamanda bu ajanların yan etkilerine aracı olabilir. Bu da ilaca göre farklılık gösteren bir durumdur. [21]

Kanser sürecinde antioksidanların etkisi

Reaktif türler kanser için kötü sayılabilecek moleküllerse antioksidanların anti-kanser etkilerinin olması beklenmelidir. Bu noktadan hareketle hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalar antioksidanların reaktif oksijen türlerinin toplayıcısı (*scavenger*) olabileceğini ve kanser oluşum riskini azaltabileceğini göstermiştir. İnsanlarda yapılan bazı klinik çalışmalarda da antioksidan takviyelerinin kanser hastalığının gerilemesine yardımcı olduğu görülmüştür. Fakat çalışmaların çok azı antioksidan takviyelerinin oksidatif hasarı azalttığını kanıtlamıştır. Bu nedenle antioksidan takviyelerinden ziyade sebze ve meyve ağırlıklı diyetin ve egzersizin kanser riskini düşüreceğine ve antioksidan takviyelerinden daha etkili olduğuna inanılmaktadır.

Yüksek düzeylerde bulunan reaktif oksijen türleri hücresel makromoleküllere oksidatif hasar verebilir. Bu makromoleküllerin arasında hücre faaliyetlerinin kontrolü için çok önemli olan DNA'da bulunur. Reaktif oksijen türleri genomik kararsızlığı teşvik ettikleri için onkogenik olarak değerlendirilir. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu DNA hasarının büyük bir kısmı guanin nükletotidinin modifikasyonunu içerir. Modifikasyon guanin nükleotidinin timin nükleotidine trans dönüşümüne neden olur. Yapılan çalışmalarda oksidatif stresin yarattığı bu tarz mutasyonların kanser oluşturan

21 Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., & Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Experimental & Molecular Medicine*, *52*(2), 192-203. https://doi.org/10.1038/s12276.020.0384-2.

ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

mutasyon risklerini artırabileceğini ve onkogenlerin aktivasyonuna ya da tümör baskılayıcı genlerin kaybına neden olabileceğini göstermiştir. [22]

Reaktif oksijen türleri, mutajen gibi davranarak kanser başlangıcını ve gelişimini kolaylaştırmalarının yanı sıra sinyal ileti molekülleri olarak kanser hücrelerinin çoğalmasını, hayatta kalmalarını ve metastaz durumlarını da desteklerler. Örneğin, H_2O_2 en kararlı ve membrandan geçebilen reaktif oksijen türüdür. Sahip olduğu bu özellikler H_2O_2'i hücresel iletişimde potansiyel ikincil mesajcı olarak konumlandırır. Bu molekül pro-tümörojenik sinyal kaskadlarının aktivasyonu ve sürdürülebilirliği açısından hayati önem taşır. Tümörlerin ortak özellikleri arasında onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin kaybı, tümörün mikroortamına üst düzey adaptasyon yetenekleri ile NADPH oksidaz ve mitokondri tarafından üretilen H_2O_2 üretiminde artış bulunur. Yukarıda da belirtildiği şekilde tümör gelişimi için önemli olan sinyal ileti yolaklarına katılan H_2O_2'in fazlası ise Fenton reaksiyonlarına katılarak $OH^{\bullet}$ radikalleri oluşturabilir. Oluşan $OH^{\bullet}$ radikali de lipit peroksidasyonu reaksiyonlarına neden olarak hücrede sitotoksik lipit hidroperoksit konsantrasyonunu artırır. Bu nedenle kanser hücreleri antioksidan kapasitelerini yüksek tutmak zorundadır. Glutatyon ve glutatyon peroksidazın da içinde bulunduğu antioksidan savunma mekanizmaları lipit peroksitleri temizlerler. Böylece kanser hücresinde lipit peroksitlerinin hücre içi konsantrasyonu sınırlı tutulur. Yıllardır tartışılan reaktif oksijen türleri eğer tümör oluşumunu destekliyorsa antioksidan tedaviler nasıl kanser riskini artırır sorusu kanser hücrelerinin redoks homeostazına bakılarak açıklanabilir. Redoks homeostazında antioksidan savunma sistemi kanserli hücrelerde lipit hidroksiperoksitleri nötralize ederken fazla miktarda bulunan H_2O_2 kanser hücrelerinin yaşamsal faaliyetlerini destekler. Böylece dışarıdan verilen antioksidanlar kanser oluşmasını engellemez, ancak lipit hidroperoksitlerin birikmesini engelleyerek olası bir apoptoz durumunu ortadan kaldırır. Bu nedenle antioksidan uygulamalarının birçok vakada kanser oluşum riskini artırdığı gözlenmektedir. [23]

---

22 Factor, V. M., Laskowska, D., Jensen, M. R., Woitach, J. T., Popescu, N. C., & Thorgeirsson, S. S. (2000). Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(5), 2196-2201. https://doi.org/10.1073/pnas.040428797.

23 Harris, I. S., & DeNicola, G. M. (2020). The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends in Cell Biology*, *30*(6), 440-451. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.03.002.

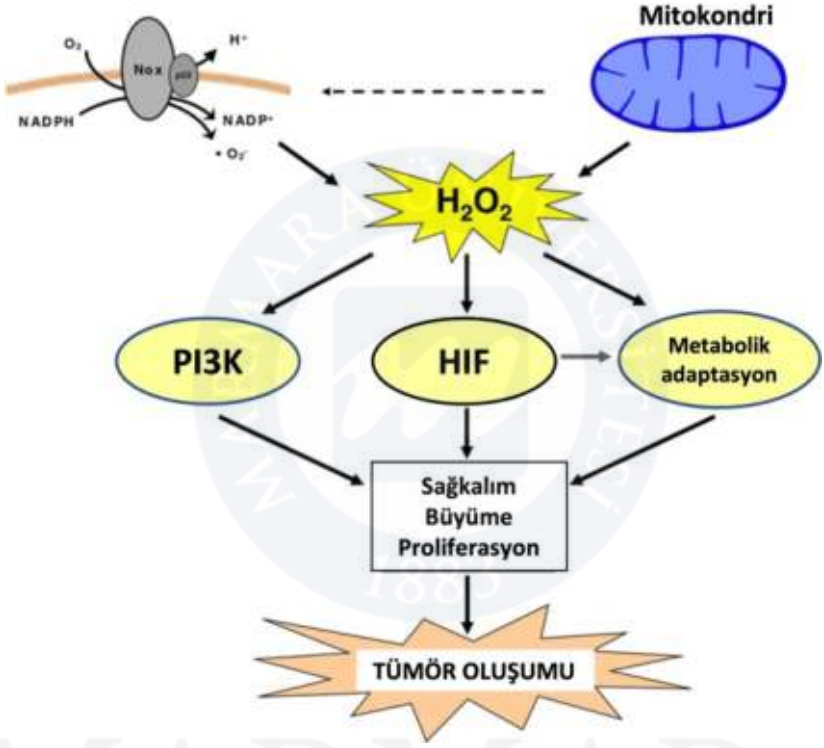
Tümör oluşumu ve hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit (H_2O_2) sinyal ileti yolaklarındaki etkilerini hedef proteinler üzerinde bulunan anahtar sistein kalıntılarındaki tiyolleri oksitleyerek gösterir. [24] Sistein kalıntılarının tiyol grupları (-SH) oksitlenirken hedef proteinlerin fonksiyon ve aktiveleri de engellenir. Tiyol gruplarının okside formu tiyoredoksin (TRX) ve glutaredoksin (GRX) enzimleri ile indirgenerek eski hallerine getirilebilir. Bu tür redoks regülasyonunun ana hedefleri pro-tümörojenik sinyal ileti yolaklarındaki fosfatazlar ve kinazlardır. Hidrojen peroksitin tümör oluşumuna nasıl bir etkisi olduğuna dair çalışmalar 1990'lı yılların başında yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada kanserli hücre ile normal hücre karşılaştırılmış ve kanserli hücrede H_2O_2 miktarı artmış bulunmuştur. Daha sonraları kanser hücrelerinde bulunan bu pro-oksidatif durumun tümör oluşumu için hayati öneme sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmalar kanser hücrelerinde H_2O_2'nin PI3K/AKT/mTOR ve MAPK/ERK sinyal yolaklarını aktive etmek ve sürdürmek için gerekli bir molekül olduğunu göstermiştir. Hidrojen peroksit PTEN gibi anti-tümörojenik yolakları da inaktive eder. Bu yolakların inaktive olması tümörojenik yolakların kontrol altında tutulmasını imkansız kılar. Böylece tümörojenik yolaklar aktif kalmaya devam eder ve AKT sinyal yolağı üzerinden H_2O_2 üretimine neden olur. Son yıllarda yapılan bir çalışmada H_2O_2'nin pro-tümörojenik bir yolak olan NF-Kb yolağını pozitif yönde etkilediğini gösterilmiştir. Bu şekildeki pro-tümörojenik sinyal ileti yolaklarını aktive edici etki kanser hücrelerinin artmış H_2O_2 üretimine göre hedef olarak seçilebileceğini gösterir. Onkojenik transformasyon hücre içi H_2O_2 düzeylerini artırır ve tümörün mikroortamında bulunan birçok bileşen tarafından kanser hücrelerindeki H_2O_2 üretimi desteklenir. EGF, PDGF gibi büyüme faktörleri ile hipoksi durumları H_2O_2 üretimini artırıcı etki gösterirler. Normal koşullar altında tümör baskılayıcı genler antioksidan sistemlerin yolaklarını destekleyici rollere sahipken, kanserli hücrelerde tümör baskılayıcı genlerin inaktif duruma gelmesi antioksidan sistem için olumsuzluk yaratır ve hücreiçi artmış H_2O_2 üretimine katkı sağlar. Örneğin, Nrf2 antioksidan ileti yolaklarının ana düzenleyicisidir. Meme kanseriyle çok yakından ilişkili olan BRCA1 proteini Nrf2'nin aktivasyonunda büyük öneme sahiptir. Kanser hücrelerinde BRCA1 proteininin mutasyonu ve Nrf2'yi aktive edememesi sonucunda antioksidan savunma sistemleri desteklenemez ve hücrede H_2O_2 üretimi artar. Kanser hücrelerinin redoks dengeleri hedeflenerek oluşturulan redoks terapileri ile H_2O_2'in sinyal ileti mekanizmaları üzerine olan etkileri azaltılabilir. [25] Bu terapiler lipit kaynaklı reaktif oksijen türlerinin

24 García-Santamarina, S., Boronat, S., & Hidalgo, E. (2014). Reversible cysteine oxidation in hydrogen peroxide sensing and signal transduction. *Biochemistry*, *53*(16), 2560-2580. https://doi.org/10.1021/bi401700f.

25 Sullivan, L. B., & Chandel, N. S. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species

oluşumunu da destekler. Hedeflenen hücrede artmış olan H_2O_2'in tümorojenik sinyal ileti mekanizmalarını etkilemesinden ziyade lipit peroksidasyonunda kullanılmasını sağlamaktır. Aynı zamanda hücrenin antioksidan sistemini destekleyerek oluşan lipit kaynaklı reaktif oksijen türlerinin birikmesini engellemek söz konusudur. [26]



Şekil 1. Hidrojen peroksit ve tümör oluşumu [27]

Tiyoredoksin redüktaz 1 (TrxR1) ve kanser tedavisi

Sitozolik bir selenoprotein olan tiyoredoksin redüktaz 1 (TrxR1) oksidatif strese karşı indirgeyici yolakları destekleyen bir enzimdir. Uzun yıllar kanser tedavisi için potansiyel ilaç olarak kullanılmıştır. [28] TrxR1, Trx1'nin aktif bölgesinde bulunan disülfit grubunu NADPH

and cancer. *Cancer and Metabolism*, *2*, 17. https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-17.

26 Tong, L., Chuang, C. C., Wu, S., & Zuo, L. (2015). Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer Letters*, *367*(1), 18-25. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.008.

27 Sullivan, L. B., & Chandel, N. S. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer and Metabolism*, *2*, 17. https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-17.

28 Powis, G., & Kirkpatrick, D. L. (2007). Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, *7*(4), 392-397. https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.04.003.

kullanarak indirger ve böylece Trx1'i aktif formunda tutar. Trx1 hücrede indirgeyici enzim yolaklarını destekleyici veya sinyal yolaklarında redoks kullanımını konrol etmek gibi bir fonksiyona sahiptir. TrxR1'in Trx1'e ek olarak başka substratları da bulunur. TrxR1'in fonksiyonları arasında deoksiribonükleotitlerin sentezinin, antioksidan savunma sisteminin, hücre içi peroksiredoksin, metiyonin ve PTP1B sinyal iletilerinin desteklenmesi sayılabilir. [29] TrxR1 doğrudan veya dolaylı olarak proteinlerin persülfatasyonunda, nitrozilasyonunda ve Nrf2, NFκB, HIF gibi transkripsiyon faktörlerinin modülasyonunda rol sahibidir. Memelilerin hayatta kalmaları için önemli olan indirgeyici yolakların düzgün çalışabilmeleri için hem tiyoredoksin sistemi hem de glutatyon sisteminin desteklenmesi ve iki sistemin karşılıklı iletişim halinde olmaları (cross-talk) gerekmektedir. TrxR1, bazı fizyolojik süreçlerin yanı sıra patofizyolojik süreçlerle de bağlantılıdır. Ancak, TrxR1'in hastalık veya sağlık durumları ile olan ilişkisi karmaşıktır. Bu ilk bakışta paradoksal bir durum olarak görülebilir; artmış TrxR1 fonksiyonlarının kanser gelişimine katkısı olduğundan, TrxR1'in çeşitli inhibitörler tarafından hedef alınması kanser gelişimini durdurabilmektedir. Bazı genetik araştırmalar TrxR1 ve kanser gelişimi arasında bir bağlantı olduğunu ortaya koymuştur. Artmış TrxR1 ekspresyonlarında kanser hastalarında azalmış sağkalım ile artmış metastaz ve pankreatik, akciğer, baş-boyun ve kolon kanserlerinde prognozun kötüye gittiği gözlenmektedir. Hepatosellüler karsinoma hastalarında artmış TrxR1 aktivitesi istenilen bir durum değildir. TrxR1'in artmış ekspresyonu, kanser hücrelerinde aktivasyonu artmış olan Nrf2 yolağı sayesinde olabileceği gibi (TrxR1 Nrf2'nin hedef genleri arasındadır) aynı zamanda kanser spesifik etkileri bulunan düzenleyici miRNA'lar nedeniyle de olabilir. Ayrıca bazı kanser vakalarında TrxR1 geninde tek nükleotid polimorfizmlerine (SNP) de rastlanmıştır. Bütün bu varsayımlar kanser vakalarında bazı genetik mekanizmaların TrxR1'in artmış ekspresyonuna veya aktivitesine katkıda bulunduğunu gösterir. Böylelikle artmış TrxR1 aktivitesi kanserde kötü prognozun ve düşük hayatta kalma durumunun sebebi olabilir. Tüm bunlara rağmen, kanser olmayan hücrelerde TrxR1'in kanser başlangıcına karşı hücreleri koruduğu da bir gerçektir. TrxR1 enzimi antioksidan sistemi destekleyerek normal hücreleri oksidatif hasardan ve böylece oluşabilecek mutasyonlardan korur. TrxR1 içermeyen hücrelerde tümör gelişiminin yavaşlaması ve kanser oluşumuyla metastazın azalması, bunlara ek olarak TrxR1 ekspresyonu artmış vakalarda prognozun kötüye gitmesi TrxR1'i kanser tedavilerinde kullanılan ilaçların hedeflerinden biri haline getirmiştir.

29 Sies, H. (2019). Chapter 13 – Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. In G. Fink (Ed.), *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (pp. 153-163). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

TrxR1'i hedef alan birçok anti-kanser ilaç bulunmaktadır. Bunlardan biri cisplatindir. Cisplatin DNA hasarına neden olarak kanserli hücreyi apoptoza sokar ve ortadan kaldırır. Buna ek olarak TrxR1 cisplatin tarafından inhibe edilir. [30] Enzim inhibisyonu cisplatinin etkinliğini artırmanın yanı sıra oksidatif stresin neden olduğu apoptozu da uyarır. Auranofin ve aurotiyoglukoz gibi bazı altın bileşenleri de TrxR1'in efektif inhibitörleridir. Ancak TrxR1'in hedef alındığı kanser tedavi uygulamalarında kanserli hücrelerde oluşan etkilerin yanı sıra tedavinin normal hücrelerde meydana getirdiği yan etkiler de göz önüne alınmalıdır.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

30 Wangpaichitr, M., Sullivan, E. J., Theodoropoulos, G., Wu, C., You, M., Feun, L. G., Lampidis, T. J., Kuo, M. T., & Savaraj, N. (2012). The relationship of thioredoxin-1 and cisplatin resistance: its impact on ROS and oxidative metabolism in lung cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, *11*(3), 604-615. https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-11-0599.

Viral Enfeksiyonlar

Gökhan Biçim*
A. Süha Yalçın**

Virüsler canlı hücrelerin içinde çoğalan ve normal mikroskop ile görülemeyecek kadar küçük (20-350 nm çapında) enfeksiyon ajanlarıdır. Hayvanları, bitkileri, bakterileri ve arkea dahil her türlü organizmayı enfekte edebilirler. Virüsler kapsid adı verilen koruyucu bir protein ile çevrili DNA veya RNA genetik materyalinden meydana gelirler. Genleri olmasına rağmen, yaşamın temel birimi olarak görülen hücresel bir yapıya sahip olmadıklarından, canlı olarak kabul edilmez ve biyolojik ajan olarak adlandırılırlar. Poxviridae familyası virüsleri hariç, virüsler bakterilerden çok daha küçüktür ve incelenmelerinde elektron mikroskopları kullanılır. Bazı virüslerde, konak hücre zarına benzer şekilde fosfolipit ve protein içeren bir membran olan viral zarf bulunur. Zarfın yüzeyindeki glikoproteinler virüsü konakçının bağışıklık sisteminden korumaya yardımcı olabileceği gibi konakçı reseptörlerinin tanınmasına ve reseptörlere bağlanmaya aracılık eder. Viral zarf konakçının hücre zarı ile kaynaşarak viral kapsidin ya da genomun hücreye girmesini de sağlayabilir. Zarflı virüsler konak hücreden tomurcuklanarak ayrıldıkları için konak hücrenin zayıflamasına ve ölümüne neden olurlar. Bu tür virüsler lipit yapısındaki zarfları sayesinde, zarfsız virüslere göre yüksek sıcaklığa, düşük nemli ortamlara, deterjanlara ve alkol içeren dezenfektanlara karşı daha duyarlıdır. Bazı DNA virüsleri ile RNA virüsleri zarflı virüsler grubuna dahildir. Zarflı virüsler mükemmel adaptasyon yeteneğine sahiptir. Konaktaki bağışıklık sisteminden kaçmak için kısa sürede mutasyon geçirebilirler. [1] Bu durum genellikle RNA virüslerinde görülür. Örneğin, koronavirüsler

* İstanbul Kent Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü Biyokimya Birimi

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

1 Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., & Le Mercier, P. (2011). ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Research*, *39*(Database issue), D576-582. https://doi.org/10.1093/nar/gkq901.

RNA genomik yapısına sahip zarflı virüslerdendir. SARS virüsü, SARS-CoV-2 ve MERS virüsü bu grubun başlıca üyelerindendir. [2]

Bilindiği gibi organizmada reaktif türlere karşı koyma enzimleri ve enzim olmayan bileşenleri içeren antioksidan savunma sistemi ile sağlanır. Bazen bu savunma yeterli olmaz, reaktif türlerin üretimindeki bir takım dengesizlikler ve vücudun bunları yeterince kontrol edememesi oksidatif strese yol açar. Viral enfeksiyonları takiben hücresel redoks ortamında ortaya çıkan etkiler de farklıdır. Reaktif türlerin oluşumuna paralel olarak sinyal iletisinde, antioksidan savunmada ve diğer metabolik süreçlerde dengesizlikler gözlenir. Viral patogenezin sonuçlarını azaltmak için oksidatif stresin modülasyonu önemlidir ve yeni bir farmakolojik yaklaşımı temsil eder. Bu bölümde DNA ve RNA virüsleri ile retrovirüslerin reaktif türler ve oksidatif stres üzerine olan etkileri ele alınmıştır

Virüsler ve oksidatif stres

Bir virüsün, konakçıda reaktif türlerin düzeylerini artırarak oksidatif stresi indükleyebileceğine dair ilk kanıt 1979 yılında elde edilmiştir. Fare splenositlerinde yapılan bu araştırmada bir paramiksovirüs olan Sendai virüsü ile enfeksiyonun kemilüminesans seviyelerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca UV ışığı ile etkisiz hale getirilen virüsün reaktif türleri üretebildiği, buna karşın ısı ile etkisiz hale getirilen virüsün bu etkiyi göstermediği bildirilmiştir. Bu durum söz konusu etkilerde viral yapı konformasyonunun aracılık ettiğini düşündürmektedir. Daha sonraları yapılan çalışmalar birçok retrovirüs ile DNA ve RNA virüslerinin reaktif türleri üreterek hücre ölümüne neden olabileceğini göstermiştir.

Reaktif türlerin hücre aktivasyonundaki rolü ile ilgili olarak şunlar söylenebilir: Hücre tipine ve ilgili virüse bağlı olarak viral replikasyonu kolaylaştırabilir ya da teşvik edebilirler. Reaktif türlerin hücresel fonksiyonlar üzerindeki etkisi, miktarlarına ve hücrenin onlara ne kadar süreyle maruz kaldığına bağlıdır. Genellikle virüsler reaktif türlerin üretiminde farklılık gösterir, ancak hem üretimi hem de antioksidan tüketimini içeren ortak bir patojenik yolu paylaşırlar. Enfeksiyon sırasında virüsler, makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücreler dahil olmak üzere çeşitli enflamatuvar hücreler tarafından saptanır, kuşatılır ve fagosite edilir. Patojenler, fagositik hücrelerde NADPH oksidaz kompleksinin ve nitrik oksit sentazın ekspresyonunu aktive ederek reaktif türlerin üretiminin artmasına neden olurlar. Virüsler tarafından indüklenen fagositlerin aktivasyonu oksidatif stres ile ilişkilidir; çünkü hem reaktif türler salınır hem de aktive edilmiş fagositler prooksidan sitokinleri

2 Sahin, F., & Demir, S. (2020). Virüsler, Viral Pandemileri Etkileyen Faktörler ve Sonuçları. In (pp. 55-76). https://doi.org/10.53478/TUBA.2020.026.

salabilir. Tümör nekroz faktörü (TNF) ve interlökin-1 (IL-1) gibi prooksidan sitokinler, retiküloendotelyal sistem tarafından demir alımını ve demir birikimini destekler. Bunun sonucunda Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları yoluyla hidroksil radikali oluşturulur. Viral enfeksiyonlarca indüklenen oksidanlar (NO, $O_2^{\cdot -}$, $OH^{\bullet}$ gibi) hücresel yanıtların modülasyonuna, viral replikasyonun düzenlenmesine, konak savunmalarına ve viral patogeneze katkıda bulunabilecek H_2O_2 gibi yan ürünleri oluşturur. Reaktif türlerle yakından ilişkili olan farklı sinyal yolaklarındaki değişiklikler ise adezyonu, gen ekspresyonunu, hücresel metabolizmayı, hücre döngüsünü ve hücre ölümünü modüle edebilir. Viral enfeksiyonların gelişimi için de reaktif türler önemlidir. [3] Bu nedenle, hücrenin redoks durumu, hücre tipine ve ilgili virüse bağlı olarak belirli viral enfeksiyonlara fayda sağlayabilir ya da zarar verebilir. Başlangıçta reaktif türler enfeksiyonla savaşır ve konak hücre için apoptozun indüksiyonuna katkıda bulunabilen bir koruma mekanizması olarak görülürler. Bununla birlikte, viral çoğalmanın ilerlemesiyle, redoks homeostazında dengesizliğe neden olan aşırı miktarlarda reaktif tür oluşumu söz konusudur. Viral enfeksiyonların oluşturduğu oksidatif stres; inflamatuvar yanıtlar, hücre ölümü ve kilo kaybı dahil patogenezin çeşitli yönlerine katkıda bulunabilir. Konak hücrenin redoks durumundaki değişiklikler belirli viral mutantların seçimine ve mutasyonlara yol açabilir. Ayrıca viral replikasyonu artıran NF-kB gibi transkripsiyon faktörlerini aktive edebilir. Reaktif türler ile oluşan lipit peroksidasyon ürünleri; hücrelerin aktivasyon durumunun modülasyonu ve konakçıda inflamatuvar/immün yanıtların düzenlenmesi gibi yollarla konakçının dokularında ve viral bileşenlerde oksidatif hasara neden olabilir. Enfekte olan bitişik hücrelerin oksidatif hasarı da viral yayılmayı sınırlayabilir. Bu nedenle, oksidatif stresin özellikle hücresel fonksiyonlar ve viral replikasyon üzerine etkileri hakkındaki bilgilerimizi geliştirmek, önümüzdeki yıllar için önemli olacaktır.

İnsan papilloma virüsü

İnsan papilloma virüsü (*Human papilloma virus*, HPV) enfeksiyonunda, mutajenez başlatma ve neoplastik ilerlemedeki rolleri nedeniyle reaktif türler önemlidir. [4] Antioksidan savunma sisteminin yeterince etkin olmaması sonucu reaktif türler lipitlere, proteinlere, DNA'ya zarar verebilir ve hücrelerin normal fonksiyonlarını inhibe edebilir. Bu durum hücre transformasyonu ile ilişkili kromozom

3 Molteni, C. G., Principi, N., & Esposito, S. (2014). Reactive oxygen and nitrogen species during viral infections. *Free Radical Research*, *48*(10), 1163-1169. https://doi.org/10.3109/10715.762.2014.945443.

4 De Marco, F. (2013). Oxidative stress and HPV carcinogenesis. *Viruses*, *5*(2), 708-731. https://doi.org/10.3390/v5020708.

anormalliklerini arttırır. Hemen hemen tüm kanserlerde reaktif türlerin aşırı üretimi tespit edilmiştir; bunlar hücre içi sinyal yolaklarında ikincil haberciler olarak görev yapar, tümör gelişimini ve ilerlemesini birçok yönden teşvik ederler. Oksidatif stres, HPV enfeksiyonunda HPV onkogenlerinin DNA'ya entegrasyonunu kolaylaştırabilir. Ayrıca, çalışmalarda oksidatif stresin viral adsorpsiyon, viral giriş ve viral gen ekspresyonunun kurulması dahil olmak üzere HPV enfeksiyonunun farklı aşamalarını desteklediğini ileri sürülmektedir. HPV enfeksiyonu sonrası üretilen reaktif türler MAPK, NF-kB, PI3K, p53, b-katenin/Wnt gibi moleküllerin aracılık ettiği hücresel sinyal yolaklarını ve anjiyogenez ile ilişkili yolları aktive edebilir. Bütün bu değişiklikler, hücre büyümesi/çoğalması, farklılaşması, protein sentezi, glukoz metabolizması üzerine etkiler ve inflamasyonun modülasyonu yoluyla viral patogeneze katkıda bulunur. HPV'nin, SOD, CAT, peroksiredoksin, glutatyon S-transferaz gibi antioksidan enzimlerin düzenlenmesi, oksidasyona karşı korunma ve stres tarafından indüklenen apoptozun baskılanması gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla, enfekte olmuş hücrelere oksitleyici ortamda hayatta kalma yeteneği sağladığı da vurgulanmaktadır. Bu adaptasyon, anti-apoptotik ve antioksidan moleküllerin up-regülasyonu yoluyla, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını ve anti-kanser ilaçlara karşı direnç geliştirmesini sağlar. Bununla birlikte, hücre içi oksidatif stres seviyelerindeki artışın nasıl algılandığı ve antioksidan genler ile hayatta kalma genlerinin ekspresyonlarını düzenlemek üzere reaktif türlerin spesifik hücre içi sinyallere nasıl dönüştürüldüğü hakkında hala çok az şey bilinmektedir.

Hepatit B virüsü

Hepatit B virüsü (HBV), hepadnavirüs ailesinden zarflı bir DNA virüsü olup kuluçka süresi 25-180 gün arasındadır. Virüs başlıca perkütan yol ve çok yakın temastaki kişiler arasında aktarılan vücut sıvıları ile yayılır. HBV enfeksiyonu klinik olarak akut enfeksiyon, kronik enfeksiyon veya primer hepatosellüler karsinoma şeklinde gözlenir. Hastaların %5-10'unda kronik hepatit; kronik hepatitlilerin de %10'unda siroz ve karaciğer yetmezliği gelişebilir. Primer hepatosellüler karsinoma gelişen olgularının %80'i kronik HBV enfeksiyonu ile ilişkilidir. Yapılan birçok çalışma, HBV'nin hücrelerde, farelerde veya hastalarda oksidatif stresi indüklediğini ve bu durumun hepatosellüler karsinom gelişimine öncülük ettiğini göstermektedir. [5] Bazı deneysel çalışmalarda, kronik viral hepatitteki oksidatif stresin hücre hasarında ve DNA ile RNA yapısının bozulmasında rolü olduğu gösterilmiştir. Akut karaciğer

5 Alavian, S. M., & Showraki, A. (2016). Hepatitis B and its Relationship With Oxidative Stress. *Hepatitis Monthly*, *16*(9), e37973-e37973. https://doi.org/10.5812/hepatmon.37973.

hasarında ve hepatik inflamasyonda hücre ölümünü tetikleyen asıl toksik aracıların, nötrofillerde ve Kupffer hücrelerinde üretilen reaktif oksijen türleri olduğu bildirilmiştir. Birçok araştırıcı HBV'nin oksidatif stresi tetiklediğini ve kronik karaciğer hastalığı olan HBV ile enfekte olgularda oksidatif stresin varlığını bildirmiştir. Kronik hepatitli hastalarda yüksek seviyelerde lipit peroksidasyonu yanı sıra DNA hasarı bulunması, oksidatif stresin HBV tarafından indüklenen karaciğer hasarında önemli rol oynadığını düşündürmektedir. HBV ile enfekte olan hastalar, enfeksiyon sırasında oksidatif stresin göstergelerinden olan Cu/Zn-SOD ve GPx'te bir azalma ve malondialdehit (MDA) seviyelerinde artış gösterir. Ayrıca alfa-interferon ve lamivudin ile tedaviden sonra lipit peroksidasyon ürünlerinde bir azalma ve antioksidan enzim seviyelerinde bir artış gözlemlenmiştir. Oksidatif stres hastalığın şiddetiyle de ilgilidir. Ağır HBV enfeksiyonu olan olgularda lipit peroksidasyonu ve oksidatif DNA hasarı artmıştır. Kronik enfeksiyonda, HBV DNA parçaları konakçı DNA'sı ile mutasyonlar oluşturmak üzere birleşir. Bu parçalar hepatokarsinogenezle ilişkili, hepatit B virüs X protein (HBx) veya kesik pre-S proteinlerini kodlarlar. HBx, lipit peroksidasyonunu tetikler ve sonuçta insan hepatoblastoma hücre dizisinde (HepG2) TNF-α ekspresyonu artışına yol açar. Pre-S mutant taşıyan transgenik farelerin karaciğerinde oksidatif DNA hasarı olduğu, HBx taşıyan farelerin karaciğerlerinde ve HepG2-HBx hücrelerinde reaktif oksijen türleri seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Enfekte hücrelerdeki HBV replikasyonunun, reaktif türlerin üretimini artırarak oksidatif stresi indüklediği ve mitokondriyal SIRT3 proteinini aşırı eksprese eden transfekte edilmiş hücrelerin reaktif türlerin üretimini azaltarak, enfekte hücrelerdeki oksidatif hasarı ve viral replikasyonu baskıladığı da gösterilmiştir. Viral enfeksiyona yanıt olarak, lokal inflamasyon odağı tarafından üretilen ve spesifik olmayan oksidatif stresin yanında, HBV tarafından kodlanmış proteinlerin hücresel DNA onarım yollarını inhibe edebileceği bildirilmiştir. Bu değişiklikler, HBV ile enfekte hücrelerde hücre içi antioksidan savunmanın olumsuz etkilendiğini ve apoptoza yol açarak yaygın karaciğer hasarına neden olabileceğini göstermektedir.

Hepatit C virüsü

Hepatit C virüsü (HCV) flavivirüs ailesinin bir üyesi olan zarflı bir RNA virüsüdür. Kuluçka süresi 11-150 gün arasındadır. Başlıca bulaş yolu enfekte kan ve kan ürünleridir. HCV enfeksiyonu post-transfüzyon hepatitlerinin asıl nedenidir ve alıcıların %5-10'unda gelişebilir. Akut veya kronik HCV enfeksiyonları şeklinde gelişebilir. HCV ile bulaşlı kan transfüzyonunun 1-3 haftalarında viremi gözlenebilir. Akut enfeksiyonun asemptomatik olabilmesinin yanında, kronik hepatit C enfeksiyonu sonrası siroz ve hepatik karsinoma gelişebilir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre; akut

hepatit C hastalarının %80'inde kronik hepatit C, % 20'sinde siroz ve %1-5'inde hepatik karsinoma gelişmektedir. Pek çok çalışmada, oksidatif stresin HCV'nin hepatik patogenezinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir. [6] HCV ile enfekte olan hastaların, serum ve karaciğer biyopsi örneklerinde, MDA, 8-OHdG ve tiyoredoksin gibi çeşitli oksidatif stres belirteçlerinde artış bildirilmiştir. Ayrıca, kronik hepatit C hastalarında karaciğer biyopsileri ve lenfositlerde yapılan reaktif oksijen türleri ölçümlerinde artış gözlenmiştir. Diğer hepatit virüslerine kıyasla, HCV reaktif oksijen türlerini daha fazla üretmektedir. Hepatit A, B, E hastaları ile karşılaştırıldığında kronik hepatit C hastalarının %80'inde kronik hastalık gelişimi gözlenmektedir. HCV'nin çeşitli yapısal ve yapısal olmayan çekirdek proteinlerinin (core proteini, NS3, NS5A, E1, E2, NS4B) ekspresyonu oksidatif stresin indüklenmesi ile ilişkilidir. Bunun sonucunda DNA yapısında karsinojeneze katkıda bulunan hasarlar meydana gelir. Yapısal protein olmayan NS5A, hücrelerde oksidatif stresi indükleyerek NF-kB ve STAT-3 gibi hücresel transkripsiyon faktörlerini aktive edebilir. Endoplazmik retikulum stresinin bir sonucu olarak Ca^{+2} serbest bırakılır ve mitokondri tarafından kolayca alınır. Bu durum mitokondrilerde transmembran potansiyelini etkiler ve mitokondride yükselen reaktif türler oksidatif stresi indükler. NS5A mitokondrilerde glutatyonun oksidasyonuna neden olarak da oksidatif stres artışına yol açar. Daha sonra da NF-kB ve STAT-3 gibi transkripsiyon faktörlerinin çekirdeğe translokasyonu gerçekleşir, bu da oksidatif strese yol açar. HCV proteini NS5A'nın, p38 MAPK, JNK ve AP-1'in aktivasyonunda da kritik bir rol oynadığı ve Mn-SOD artışına neden olduğu bildirilmiştir. HCV NS5A tarafından AP-1 ve Mn-SOD'un aktivasyonu, konakçının redoks durumunun düzenlenmesinde önemli olabilir. Akut karaciğer hasarı ve karaciğer iltihabı sırasında, hücre ölümünü indüklemek üzere Kupffer hücreleri ve nötrofiller tarafından ana toksik aracılar olarak reaktif türler üretilir. Bu hücreler hepatositlere komşu olduklarından, oluşan H_2O_2 gibi reaktif türler hepatositlere difüze olarak hücre içi sinyalleşmeyi indükleyebilir. HCV enfeksiyonlarında reaktif türlerin artışına paralel olarak antioksidan savunmada bir azalma vardır. Bu değişiklikler siroz ve hepatosellüler karsinom gelişimine yol açabilir. Bazı klinik çalışmalar, antioksidanların eklenmesinin oksidatif stresin neden olduğu karaciğer hasarını iyileştirebileceğini ve HCV enfeksyonu için potansiyel bir tedavi olabileceğini göstermiştir.

6 Jain, S. K., Pemberton, P. W., Smith, A., McMahon, R. F., Burrows, P. C., Aboutwerat, A., & Warnes, T. W. (2002). Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. *Journal of Hepatology*, *36*(6), 805-811. https://doi.org/10.1016/s0168-8278(02)00060-0.

Japon ensefalit virüsü

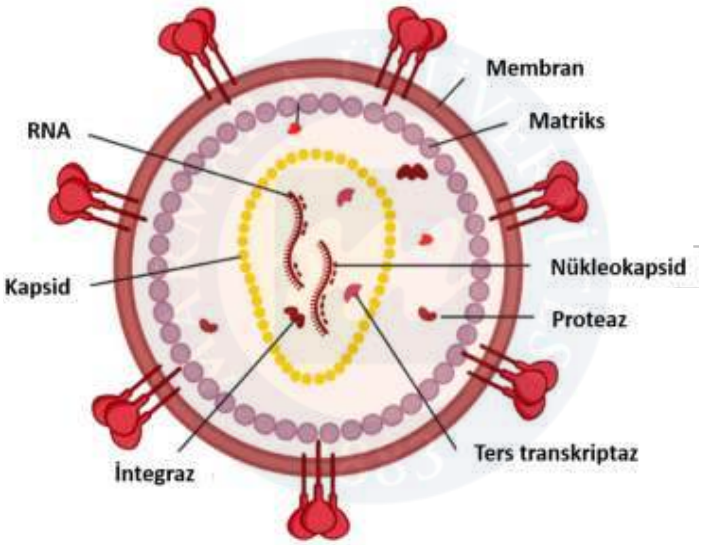
Japon ensefalit virüsü (JEV) enfekte hastaların yaklaşık %20-30'unda ölüme yol açabilir. Hastalarda gözlenen nöronal apoptoz ve inflamasyon JEV ile indüklenen sitopatolojiye atfedilir. Bununla birlikte, viral sitopatolojiye bağl hücre hasarının kapsamı belirsizdir. Sıçan kortikal glial hücrelerinde, JEV enfeksiyonunun süperoksit radikali oluşumunu indüklediği gösterilmişir. Ayrıca sıçan akut JEV enfeksiyonu modellerinde peroksinitrit gibi reaktif türlerin arttığı ortaya konmuştur. Bir başka çalışmada JEV enfeksiyonu, sıçanların beyinlerinde SOD seviyelerini arttırmıştır. Ek olarak, insan promonosit hücrelerinde, p38 MAPK sinyalizasyon yolunun aktivasyonu ile birlikte hücre içi reaktif tür seviyelerinde bir artış gözlenmiştir. Ayrıca JEV enfeksiyonu, sitoplazmik oksidasyonu artırarak enfeksiyon sırasında homeostatik redoks dengesine müdahale edecek olan, tiyoredoksin ekspresyonunu down-regüle etmektedir. Endoplazmik retikulum stresi, reaktif türlerin üretimi ve NF-kB aktivasyonu gibi birçok önemli mekanizma JEV tarafından indüklenen apoptoz ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, JEV enfeksiyonu mikroglial aktivasyonla da ilişkilidir ve IL-1b ve IL-18 dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ile sonuçlanır. Reaktif türler, ATP'nin ve mitokondriyal membran potansiyelinin kaybını tetikleyen, mitokondriden sitokrom c salınımına ve kaspaz 3'ün aktivasyonuna yol açan ve nöronal apoptoza neden olan, peroksinitriti oluşturmak üzere de reaksiyona girebilir.

İnsan immün yetmezlik virüsü

İnsan immün yetmezlik virüsü (*Human immunodeficiency virus*, HIV) enfeksiyonunda, bağışıklık fonksiyonlarında bir azalma ile birlikte antioksidanların tükenmesi de söz konusudur. Bağışıklık hücreleri, redoks dengesini, bütünlüklerini ve işlevlerini korumak için diğer hücrelerden daha yüksek konsantrasyonda antioksidan gerektirir. Bu nedenle, oksidatif stres HIV enfeksiyonunda çok önemli bir yere sahiptir. [7] Başlıca antioksidanlardan olan katalaz enzimi ile GSH azalması, programlı hücre ölümünü işaret eden $OH^{\bullet}$ radikallerini artıran aşırı H_2O_2 birikimine yol açar. Bunun CD4 hücrelerinin apoptoza sürüklenmesi ve bağışıklık sisteminin diğer bileşenlerinin işlevindeki değişiklikler dahil olmak üzere farklı şekillerde immün yetmezliğin ilerlemesine katkısı olduğu düşünülmektedir. Oksidatif stresin yanı sıra, diğer viral enfeksiyonların HIV replikasyonunu teşvik edebileceği ve hem viral replikasyon hem de bağışıklık sisteminin inflamatuvar sitokinlerinin aktivasyonu için gerekli olan

7 Ivanov, A. V., Valuev-Elliston, V. T., Ivanova, O. N., Kochetkov, S. N., Starodubova, E. S., Bartosch, B., & Isaguliants, M. G. (2016). Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 8910396. https://doi.org/10.1155/2016/8910396.

NF-kB'yi aktive edebileceği bilinmektedir. HIV ile enfekte hastalar ve AIDS hastaları genellikle yüksek serum hidroperoksit ve MDA seviyelerine sahiptir. Yapılan çalışmaların çoğu, hem antioksidan sistem bileşenlerinin azaldığını hem de yüksek düzeyde oksidanların varlığını göstermektedir. Ayrıca eritrositlerde ve T hücrelerinde hastalığın ilerlemesi ile yakından ilişkili olarak azalmış GSH seviyeleri belirlenmiştir. GSH, n-asetil sistein ve ATP'nin oral yoldan verilmesinden sonra, virüs kaynaklı hücre hasarında önemli bir iyileşme olmuştur.



Şekil 1. HIV virüsünün yapısı [8]

Solunum yolu viral enfeksiyonları

Dünya çapında milyonlarca insanı, özellikle de çocukları ve yaşlıları etkileyen bir grup hastalığı temsil eder. İnfluenza virüsü (IV), solunum sinsitiyal virüsü (RSV), insan rinovirüs (HRV), insan metapneumovirüs (HMPV), parainfluenza, adenovirüs ve koronavirüsü (CoV) gibi virüsleri içeren solunum yolu virüsleri, insanlarda üst ve/veya alt solunum yollarını enfekte edebilir. Birçoğu burun tıkanıklığı, öksürük, boğaz ağrısı ve ateş gibi yaygın klinik belirtilere veya bronşiolit, pnömoni ve akut solunum yetmezliği sendromu (ARDS) gibi daha spesifik ve ciddi belirtilere neden olur. [9]

8 Rossi, E., Meuser, M. E., Cunanan, C. J., & Cocklin, S. (2021). Structure, Function, and Interactions of the HIV-1 Capsid Protein. *Life*, *11*(2), 100. https://www.mdpi.com/2075-1729/11/2/100.

9 Kuchar, E., Miśkiewicz, K., Nitsch-Osuch, A., & Szenborn, L. (2015). Pathophysiology of clinical symptoms in acute viral respiratory tract infections. *Pulmonary Infection*, 25-38.

İnfluenza virüsü

Influenza A ile enfeksiyondan sonra gelişen akciğer hasarını ve inflamasyonu oksidatif stresin etkilediği bilinmektedir. İnflamatuvar hücreler ile hava yolu epitel hücreleri tarafından süperoksit radikali ve nitrik oksit gibi reaktif türler hücre dışı boşluğa salınır. Bu moleküller, influenza virüsü pnömonisinden sonra akciğer hasarını şiddetlendirebilir. Akciğer dokusuna verilen hasarın, virüsün neden olduğu sitopatik etkinin bir sonucu olduğu ve aşırı inflamasyonun sitotoksik etkilerinden kaynaklandığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada öldürücü dozda influenza A/PR8/34 virüsü ile enfekte olmuş farelerin akciğerleri ve bronkoalveolar lavaj sıvısı değerlendirilmiş ve enfeksiyonun erken evrelerinde artan $O_2^{\bullet-}$ oluşumu ile akciğerlerde H_2O_2 üretiminin arttığı, buna karşılık GSH peroksidaz ve GSH redüktaz aktivitelerinin değişmeden kaldığı gözlenmiştir. Bu durum influenza enfeksiyonunun erken evrelerinde oksidatif stresin varlığını göstermektedir. [10] Benzer bir çalışmada yine influenza A/PR8/34 virüsü ile enfekte olmuş farelerin akciğer, karaciğer ve plazma GSH ile C vitamini ve E vitamini düzeyleri belirlenmiş, antioksidanların toplam konsantrasyonunda azalma gözlenmiştir. Antioksidan konsantrasyonlarındaki azalma, konağın diğer ajanların patojenik etkilerine daha duyarlı hale gelmesine katkıda bulunmaktadır. Bir başka çalışmada, GSH ile ön işlem görmüş köpek böbrek hücreleri ile insan küçük hava yolu epitel hücrelerinin influenza viral enfeksiyonuna karşı korunduğu gösterilmiştir. Bu kapsamda aktif virüs partiküllerinin üretimine, matriks proteinleri ekspresyonunun inhibisyonuna, viral kaspaz aktivasyonunun inhibisyonuna ve Fas up-regülasyonuna karşı korunma vardır. BALB/c farelerin içme suyuna GSH eklenmesi hem akciğer hem de trakea homojenatlarında viral titreyi azaltmıştır. H1N1 influenza A virüsü ile enfekte olmuş farelere rekombinant insan katalaz (rhCAT) uygulanan bir çalışmada inflamatuvar hücre infiltrasyonunda, sitokin seviyelerinde (IL-2, IL-6, TNFα, IFNγ), Toll benzeri reseptörlerde (TLR4, TLR7) ve ayrıca NF-kB mRNA seviyelerinde önemli bir azalma gözlenmiştir. Bu da rhCAT'ın immün cevabın baskılanması yoluyla koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir. Başka bir çalışmada epitelyal akciğer hücrelerinin H5N1 virüsü ile enfeksiyonu SOD1 enziminin ekspresyonunu azaltmıştır. Bu hücrelerin aşırı SOD1 ifade etmek üzere transfeksiyonu ise H5N1 virüsü tarafından reaktif türlerin oluşturulmasını önemli ölçüde inhibe etmiş ve proinflamatuvar yanıtı baskılamıştır. Ayrıca, p38 ve p65'in fosforilasyonunu, viral ribonükleoproteinin çekirdekten dışa verilmesini ve viral replikasyonu önlemiştir.

10 Komaravelli, N., & Casola, A. (2014). Respiratory Viral Infections and Subversion of Cellular Antioxidant Defenses. *Journal of Pharmacogenomics & Pharmacoproteomics*, *5*(4). https://doi.org/10.4172/2153-0645.100.0141.

Solunum sinsitiyal virüsü

Solunum sinsitiyal virüsü (RSV) enfeksiyonu ile gelişen pulmoner inflamasyon patogenezinde de oksidatif stres önemli rol oynar. İnsan akciğer epitel hücrelerinde (A549) ve RSV ile enfekte normal insan bronş epitel hücrelerinde yapılan bir çalışmada hücre içi redoks durumundaki değişiklikler incelenmiş ve RSV ile indüklenen oksidatif stresin hava yolunda inflamasyonu artırdığı gösterilmiştir. [11] Hava yolu epitel hücrelerinin RSV ile enfeksiyonu, reaktif türlerin üretimini indükler ve SOD2'de hafif bir artışla birlikte SOD1, SOD3, CAT ve GST ekspresyonunu azaltırken, lipit peroksidasyonu ürünlerini artırmaktadır. RSV ile enfekte olmuş farelerde yapılan bir çalışmada; NO, MDA ve $OH^{\cdot}$ seviyeleri artmış ve GSH ve SOD aktivitesi azalarak oksidatif stres oluşmuş, ancak melatonin uygulamasının tüm bu etkileri tersine çevirdiği ve RSV ile enfekte olmuş farelerin serumunda proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin inhibe edildiği gösterilmiştir. Virüs kaynaklı pulmoner enfeksiyonlarda melatoninin yeni bir terapötik ajan olabileceği düşünülmektedir.

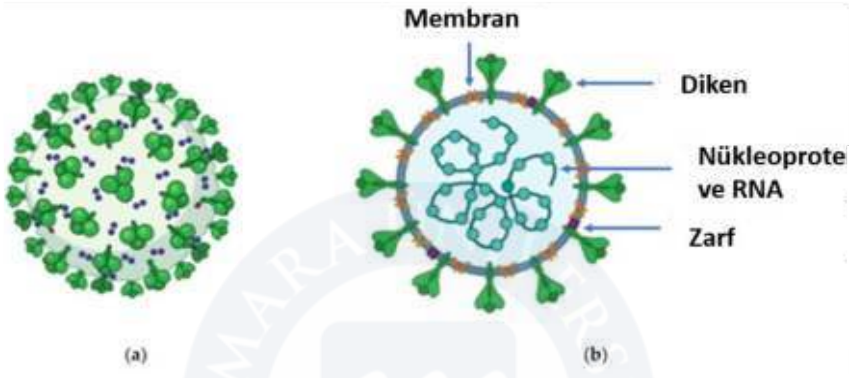
Sentetik katalitik süpürücü enzimlerin, hava yolu epitel hücrelerinde RSV ile indüklenen proinflamatuvar gen ekspresyonu ve oksidatif hücre hasarını azaltıp azaltamayacağını değerlendirmek üzere, bu hücreler SOD, CAT ve GPx aktivitesine sahip olan EUK-8, EUK-189 selen-mangan kompleksleri ile muamele edilmiştir**.** Bu deneysel tedavi, hücresel antioksidan enzim aktivitesini ve lipit peroksidasyon ürünleri olan F(2)-8-izoprostan ve MDA seviyelerini artırarak RSV ile indüklenen oksidatif stres oluşumunu azaltmıştır. Aynı zamanda RSV ile indüklenen sitokin-kemokin salgılanmasıyla transkripsiyon faktörü NF-kB ve IRF-3 aktivasyonu da inhibe edilmiştir. Bunun sonucunda artan antioksidan hücresel kapasitenin RSV tarafından indüklenen oksidatif hücre hasarını azaltabileceği düşünülmüştür. RSV'nin neden olduğu akut bronşiolitli çocuklarda virüsün neden olduğu oksidatif stres ile GSSG ve GPx konsantrasyonları artar. GSSG artışı ile hastalığın şiddeti arasında pozitif bir korelasyon vardır. Bu bulgular, reaktif türlerin üretimi ile hücresel antioksidan savunma arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak RSV'nin hücresel oksidatif hasarı indükleyebildiğini göstermektedir.

SARS-CoV-2 virüsü

Koronavirüsler, Coronaviridae familyasına ve Nidovirales takımına ait olan, insanlarda ve diğer memelilerde sıkça karşılaşılan virüs

11 Khomich, O. A., Kochetkov, S. N., Bartosch, B., & Ivanov, A. V. (2018). Redox biology of respiratory viral infections. *Viruses*, *10*(8), 392.

tipidir. SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 beta-koronavirüs ailesi içinde sınıflandırılır. Son yayınlar, SARS-CoV-2'nin SARS-CoV ile %79 ve MERS-CoV ile %51.8 nükleotid benzerliği olduğunu ve bu üçü arasındaki genetik homolojiyi ortaya koymuştur. [12]



Şekil 2. SARS-CoV-2 virüsünün yapısı [13]

Dünya Sağlık Örgütü, SARS-CoV 2'nin neden olduğu bir solunum yolu hastalığı olan ve dünya genelinde on binlerce kişide teşhis edilen, COVID-19 salgınını 11 Mart 2020 tarihi itibariyle pandemi ilan etmiştir. Çoğu insanda koronavirüs enfeksiyonu hafif belirti göstermesine rağmen, ölüm oranları %10 ve %37 olarak belirlenen SARS-CoV ve MERS-CoV salgınları 10.000'den fazla vakaya neden olmuştur. Klinik özellikleri ve neden olduğu akut solunum hasarına dayanılarak, hastalık patogenezinin altında yatan mekanizmada aşırı inflamatuvar yanıt ve oksidasyon ile abartılı bir bağışıklık tepkisi olabileceği düşünülmektedir. [14, 15]

Hava yollarında kirleticiler, toksinler ve viral enfeksiyonlar nedeniyle yüksek reaktif tür üretimi, hücresel hasara neden

12 Ren, L. L., Wang, Y. M., Wu, Z. Q., Xiang, Z. C., Guo, L., Xu, T., Jiang, Y. Z., Xiong, Y., Li, Y. J., Li, X. W., Li, H., Fan, G. H., Gu, X. Y., Xiao, Y., Gao, H., Xu, J. Y., Yang, F., Wang, X. M., Wu, C., . . . Wang, J. W. (2020). Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chinese Medical Journal (Engl)*, *133*(9), 1015-1024. https://doi.org/10.1097/cm9.000.000.0000000722.

13 Ortega-Berlanga, B., & Pniewski, T. (2022). Plant-Based Vaccines in Combat against Coronavirus Diseases. *Vaccines*, *10*(2), 138. https://www.mdpi.com/2076-393X/10/2/138.

14 Zhang, R., Wang, X., Ni, L., Di, X., Ma, B., Niu, S., Liu, C., & Reiter, R. J. (2020). COVID-19: Melatonin as a potential adjuvant treatment. *Life Sciences*, *250*, 117583.

15 Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., & Gu, X. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, *395*(10223), 497-506.

olan oksidatif stres ile ilişkilidir. Birkaç solunum yolu virüsü, enfeksiyon bölgesine artan inflamatuvar hücre alımının bir sonucu olarak düzensiz bir reaktif tür oluşumuna neden olur. Ayrıca, viral enfeksiyonlar antioksidan mekanizmaları bozarak dengesiz oksidatif-antioksidan duruma ve bunu takip eden oksidatif hücre hasarına yol açar. Solunum yolu viral enfeksiyonları, genel olarak, redoks dengesizliği veya oksidatif stres ile bağlantılı olabilecek sitokin üretimi, inflamasyon, hücre ölümü ve diğer patofizyolojik süreçlerle ilişkilidir. Viral replikasyon ve virüsle ilişkili hastalıkların prognozunda reaktif oksijen türleri ve yetersiz antioksidan mekanizmaların belirleyici olduğu bilinmektedir. Bu durum sitokin fırtınası olarak adlandırılan aşırı sitokin oluşumuna yol açarak epitel ve endotel hücrelerin apoptozunu aktive edebilir. Daha sonra da nötrofil infiltrasyonu, anormal T hücresi ve makrofaj yanıtları ile karakterize akut akciğer hasarına ve hatta ölüme neden olabilir. [16] Yapılan incelemelerde, COVID-19 patogenezinin SARS ve MERS'ten bazı potansiyel farklarla ayrıldığı gözlenmiştir. Hastaların kanlarında artmış IL-1ß, IFN-γ, MCP-1 ve IL-4 ve IL-10 seviyeleri bildirilmiştir. Sitokin fırtınası hem viral hem de bakteriyel enfeksiyonlarda gözlenir; ortak ve spesifik olmayan bir yol ile oksidatif stresin artmasına neden olur. COVID-19'lu hastalarının önemli bir kısmında inflamasyon ve oksidatif stresin bir belirteci olarak artmış hsCRP gösterilmiştir. Oluşan tıbbi tablo bir bütün olarak değerlendirildiğinde, akut akciğer hasarı ve solunum yetmezliğinin temel kaynağının oksidatif stres artışı olduğu bildirilmiştir. [17] SARS-CoV enfeksiyonu üzerine yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar antioksidan savunma bileşenleri düzeylerinin düştüğünü ve reaktif oksijen türlerinin arttığını göstermiştir. SARS-CoV-2 gibi RNA virüsleri farklı yollardan oksidatif stres oluşumuna neden olur. Virüsün hücre içine girmesi ile birlikte mitokondriyal disfonksiyon meydana gelir ve reaktif oksijen tür üretiminde artış gözlenir. Diğer taraftan COVID-19 vakalarında sıkça gözlenen sitokin fırtınası ve artmış inflamatuvar cevabın bir sonucu olarak; hiperinflamasyona eşlik eden sistopeni, hiperferritinemi ve sitokinlerin iNOS'u aktifleştirmesi yanında artmış NO düzeylerinin güçlü bir oksitleyici olan peroksinitril radikallerini oluşturması oksidatif strese neden olmaktadır. Hastalardaki akut solunum sıkıntısı, alveolar kapiller membranın geçirgenliğinin artmasına bağlı olarak refrakter hipoksemi ve bilateral pulmoner infiltratlarla karakterizedir.

16 Channappanavar, R., & Perlman, S. (2017). Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Seminars in Immunopathology*, *39*(5), 529-539. https://doi.org/10.1007/s00281.017.0629-x.

17 Hecker, L. (2018). Mechanisms and consequences of oxidative stress in lung disease: therapeutic implications for an aging populace. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, *314*(4), L642-L653.

KAYNAKÇA

Abdollahi, M., & Hosseini, A. (2014). Hydrogen Peroxide. In P. Wexler (Ed.), Encyclopedia of Toxicology (Third Edition) (pp. 967-970). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00736-3.

Al Shahrani, M., Heales, S., Hargreaves, I., & Orford, M. (2017). Oxidative Stress: Mechanistic Insights into Inherited Mitochondrial Disorders and Parkinson's Disease. Journal of Clinical Medicine, 6(11), 100. https://www.mdpi.com/2077-0383/6/11/100.

Alavian, S. M., & Showraki, A. (2016). Hepatitis B and its Relationship With Oxidative Stress. Hepatitis Monthly, 16(9), e37973-e37973. https://doi.org/10.5812/hepatmon.37973.

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

Alfrey, A. C., LeGendre, G. R., & Kaehny, W. D. (1976). The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. New England Journal of Medicine, 294(4), 184-188. https://doi.org/10.1056/nejm197.601.222940402.

Ali Khan, H., & Mutus, B. (2014). Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. Frontiers in Chemistry, 2, 70.

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

Arnhold, J., & Flemmig, J. (2010). Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. Archives of Biochemistry and Biophysics, 500(1), 92-106.

Arredondo, M., & Nunez, M. (2005). Iron and copper metabolism. Molecular Aspects of Medicine, 26, 313-327.

Arsalani-Zadeh, R., Ullah, S., Khan, S., & MacFie, J. (2011). Oxidative stress in laparoscopic versus open abdominal surgery: a systematic review. Journal of Surgical Research, 169(1), e59-68. https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.01.038.

Auten, R. L., & Davis, J. M. (2009). Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. Pediatric Research, 66(2), 121-127.

Ayer, A., Zarjou, A., Agarwal, A., & Stocker, R. (2016). Heme oxygenases in cardiovascular health and disease. Physiological Reviews, 96(4), 1449-1508.

Aziz, M. A., Diab, A. S., & Mohammed, A. A. (2019). Antioxidant categories and mode of action. In Antioxidants. IntechOpen London, UK.

Bae, W.-Y., Choi, J.-S., & Jeong, J.-W. (2018). The Neuroprotective Effects of Cinnamic Aldehyde in an MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. International Journal of Molecular Sciences, 19(2), 551. https://www.mdpi.com/1422-0067/19/2/551.

Bakulski, K. M., Rozek, L. S., Dolinoy, D. C., Paulson, H. L., & Hu, H. (2012). Alzheimer's disease and environmental exposure to lead: the epidemiologic evidence and potential role of epigenetics. Current Alzheimer Research, 9(5), 563-573. https://doi.org/10.2174/156.720.512800617991.

Barber, S. C., Mead, R. J., & Shaw, P. J. (2006). Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. Biochimica et Biophysica Acta, 1762(11-12), 1051-1067. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.03.008.

Bardaweel, S. K., Gul, M., Alzweiri, M., Ishaqat, A., HA, A. L., & Bashatwah, R. M. (2018). Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. Eurasian Journal of Medicine, 50(3), 193-201. https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2018.17397.

Barja, G. (2004). Free radicals and aging. Trends in Neurosciences, 27(10), 595-600. https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.07.005.

Bartalis, J., Zhao, Y.-L., Flora, J. W., Paine III, J. B., & Wooten, J. B. (2009). Carbon-centered radicals in cigarette smoke: acyl and alkylaminocarbonyl radicals. Analytical Chemistry, 81(2), 631-641.

Basu, S. (2003). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. Toxicology, 189(1-2), 113-127.

Batthyány, C., Bartesaghi, S., Mastrogiovanni, M., Lima, A., Demicheli, V., & Radi, R. (2017). Tyrosine-nitrated proteins: proteomic and bioanalytical aspects. Antioxidants and Redox Signaling, 26(7), 313-328.

Battistelli, M., Malatesta, M., & Meschini, S. (2016). Oxidative Stress to Promote Cell Death or Survival. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 2054650. https://doi.org/10.1155/2016/2054650.

Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., & Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(4), 1620-1624.

Beebe, D. C., Holekamp, N. M., & Shui, Y.-B. (2010). Oxidative damage and the prevention of age-related cataracts. Ophthalmic Research, 44(3), 155-165.

Bendich, A., Machlin, L., Scandurra, O., Burton, G., & Wayner, D. (1986). The antioxidant role of vitamin C. Advances in Free Radical Biology & Medicine, 2(2), 419-444.

Bentinger, M., Brismar, K., & Dallner, G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. Mitochondrion, 7 Supplement, S41-50. https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.02.006.

Berdyński, M., Miszta, P., Safranow, K., Andersen, P. M., Morita, M., Filipek, S., Żekanowski, C., & Kuźma-Kozakiewicz, M. (2022). SOD1 mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis analysis of variant severity. Scientific Reports, 12(1), 103. https://doi.org/10.1038/s41598.021.03891-8.

Berg, D., & Youdim, M. B. (2006). Role of iron in neurodegenerative disorders. Topics in Magnetic Resonance Imaging, 17(1), 5-17. https://doi.org/10.1097/01.rmr.000.024.5461.90406.ad.

Besse-Patin, A., & Estall, J. L. (2014). An Intimate Relationship between ROS and Insulin Signalling: Implications for Antioxidant Treatment of Fatty Liver Disease. International Journal of Cell Biology, 2014, 519153. https://doi.org/10.1155/2014/519153.

Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., & Monks, T. J. (2000). Role of quinones in toxicology. Chemical Research in Toxicology, 13(3), 135-160.

Bora, P., Chauhan, P., Pardeshi, K. A., & Chakrapani, H. (2018). Small molecule generators of biologically reactive sulfur species [10.1039/C8RA03658F]. RSC Advances, 8(48), 27359-27374. https://doi.org/10.1039/C8RA03658F.

Boueiz, A., & Hassoun, P. M. (2009). Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. Microvascular Research, 77(1), 26-34.

Boyland, E. (1985). Tumour initiators, promoters, and complete carcinogens. British Journal of Industrial Medicine, 42(10), 716-718. https://doi.org/10.1136/oem.42.10.716.

Brown, D. Griendling. KK.(2009). NOX proteins in signal transduction. Free Radical Biology and Medicine, 47, 1239-1253.

Bryan, N. S., & Grisham, M. B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. Free Radical Biology and Medicine, 43(5), 645-657.

Bulteau, A.-L., Moreau, M., Nizard, C., & Friguet, B. (2002). Impairment of proteasome function upon UVA-and UVB-irradiation of human keratinocytes. Free Radical Biology and Medicine, 32(11), 1157-1170.

Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radical Biology and Medicine, 29(3-4), 222-230. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8.

Carmona-Gutierrez, D., Hughes, A. L., Madeo, F., & Ruckenstuhl, C. (2016). The crucial impact of lysosomes in aging and longevity. Ageing Research Reviews, 32, 2-12. https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.04.009.

Casas, A. I., Dao, V. T., Daiber, A., Maghzal, G. J., Di Lisa, F., Kaludercic, N., Leach, S., Cuadrado, A., Jaquet, V., Seredenina, T., Krause, K. H., López, M. G., Stocker, R., Ghezzi, P., & Schmidt, H. H. (2015). Reactive Oxygen-Related Diseases: Therapeutic Targets and Emerging Clinical Indications. Antioxidants and Redox Signaling, 23(14), 1171-1185. https://doi.org/10.1089/ars.2015.6433.

Channappanavar, R., & Perlman, S. (2017). Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. Seminars in Immunopathology, 39(5), 529-539. https://doi.org/10.1007/s00281.017.0629-x.

Chau, L.-Y. (2015). Heme oxygenase-1: emerging target of cancer therapy. Journal of Biomedical Science, 22(1), 1-7.

Chen, H., Xu, G., Zhao, Y., Tian, B., Lu, H., Yu, X., Xu, Z., Ying, N., Hu, S., & Hua, Y. (2008). A novel OxyR sensor and regulator of hydrogen peroxide stress with one cysteine residue in Deinococcus radiodurans. PloS one, 3(2), e1602.

Chen, S. Y. (2012). Analysis of Nrf2-mediated transcriptional induction of antioxidant response in early embryos. Methods in Molecular Biology, 889, 277-290. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-867-2_17.

Chen, Y., Thompson, D. C., Koppaka, V., Jester, J. V., & Vasiliou, V. (2013). Ocular aldehyde dehydrogenases: protection against ultraviolet damage and maintenance of transparency for vision. Progress in Retinal and Eye Research, 33, 28-39.

Cherubini, A., Polidori, M. C., Bregnocchi, M., Pezzuto, S., Cecchetti, R., Ingegni, T., di Iorio, A., Senin, U., & Mecocci, P. (2000). Antioxidant profile and early outcome in stroke patients. Stroke, 31(10), 2295-2300. https://doi.org/10.1161/01.str.31.10.2295.

Cho, H.-Y., Van Houten, B., Wang, X., Miller-DeGraff, L., Fostel, J., Gladwell, W., Perrow, L., Panduri, V., Kobzik, L., & Yamamoto, M. (2012). Targeted deletion of nrf2 impairs lung development and oxidant injury in neonatal mice. Antioxidants and Redox Signaling, 17(8), 1066-1082.

Chocron, E. S., Munkácsy, E., & Pickering, A. M. (2019). Cause or casualty: The role of mitochondrial DNA in aging and age-associated disease. Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease, 1865(2), 285-297. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.035.

Christine, C. W., & and Alexander, V. P. (2016). Kinetic approaches to measuring peroxiredoxin reactivity. Molecules and Cells, 39(1), 26-30. https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2325.

Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2011). Redox biology of the intestine. Free Radical Research, 45(11-12), 1245-1266.

Coleman, B. K., Destaillats, H., Hodgson, A. T., & Nazaroff, W. W. (2008). Ozone consumption and volatile byproduct formation from surface reactions with aircraft cabin materials and clothing fabrics. Atmospheric Environment 42(4), 642-654. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.10.001.

Commoner, B., Townsend, J., & Pake, G. E. (1954). Free radicals in biological materials. Nature, 174(4432), 689-691.

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB Journal, 17(10), 1195-1214.

Costanzo, A., Fausti, F., Spallone, G., Moretti, F., Narcisi, A., & Botti, E. (2015). Programmed cell death in the skin. International Journal of Developmental Biology, 59(1-2-3), 73-78.

Cotruvo Jr, J. A., & Stubbe, J. (2011). Class I ribonucleotide reductases: metallocofactor assembly and repair in vitro and in vivo. Annual Review of Biochemistry, 80, 733-767.

Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. Free Radical Biology and Medicine, 95, 27-42.

Cristóvão, A. C., Guhathakurta, S., Bok, E., Je, G., Yoo, S. D., Choi, D. H., & Kim, Y. S. (2012). NADPH oxidase 1 mediates α-synucleinopathy in Parkinson's disease. Journal of Neuroscience, 32(42), 14465-14477. https://doi.org/10.1523/jneurosci.2246-12.2012.

Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. New England Journal of Medicine, 358(5), 502-511. https://doi.org/10.1056/NEJMra072367.

Cross, C. E., Vasu, V. T., Lim, Y., & Gohil, K. (2006). Combating oxidative stress at respiratory tract biosurfaces: challenges yet to be resolved, a commentary on" Vitamin supplementation does not protect against symptoms in ozone-responsive subjects". Free Radical Biology and Medicine, 40(10), 1693-1697.

Csiszár, J., Horváth, E., Bela, K., & Gallé, Á. (2016). Glutathione-Related Enzyme System: Glutathione Reductase (GR), Glutathione Transferases (GSTs) and Glutathione Peroxidases (GPXs). In D. K. Gupta, J. M. Palma, & F. J. Corpas (Eds.), Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses (pp. 137-158). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44081-1_7.

Curtin, N. J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. Nature Reviews Cancer, 12(12), 801-817. https://doi.org/10.1038/nrc3399.

Czubkowski, P., Socha, P., & Pawlowska, J. (2011). Oxidative stress in liver transplant recipients. Annals of Transplantation, 16(1), 99-108.

Dali-Youcef, N., Mecili, M., Ricci, R., & Andrès, E. (2013). Metabolic inflammation: connecting obesity and insulin resistance. Annals of Medicine, 45(3), 242-253. https://doi.org/10.3109/07853.890.2012.705015.

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

Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & D'Arca, D. (2016). ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 3565.127.3565127. https://doi.org/10.1155/2016/3565127.

Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. IUBMB life, 50(4-5), 279-289.

Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. Biochemical Journal, 473(7), 805-825.

De Deken, X., Corvilain, B., Dumont, J. E., & Miot, F. (2014). Roles of DUOX-mediated hydrogen peroxide in metabolism, host defense, and signaling. Antioxidants and Redox Signaling, 20(17), 2776-2793.

de la Paz, M. P., Philen, R. M., Gerr, F., Letz, R., Ferrari Arroyo, M. J., Vela, L., Izquierdo, M., Arribas, C. M., Borda, I. A., Ramos, A., Mora, C., Matesanz, G., Roldán, M. T., & Pareja, J. (2003). Neurologic outcomes of toxic oil syndrome patients 18 years after the epidemic. Environmental Health Perspectives, 111(10), 1326-1334. https://doi.org/10.1289/ehp.111.124.1614.

De Marco, F. (2013). Oxidative stress and HPV carcinogenesis. Viruses, 5(2), 708-731. https://doi.org/10.3390/v5020708.

Deshpande, R., & Zou, C. (2020). Pseudomonas Aeruginosa Induced Cell Death in Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. International Journal of Molecular Sciences, 21(15), 5356. https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5356.

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

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

Dodd, S. L., Gagnon, B. J., Senf, S. M., Hain, B. A., & Judge, A. R. (2010). Ros-mediated activation of NF-κB and Foxo during muscle disuse. Muscle Nerve, 41(1), 110-113.

Efeyan, A., & Serrano, M. (2007). p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. Cell Cycle, 6(9), 1006-1010. https://doi.org/10.4161/cc.6.9.4211.

Egea, J., Fabregat, I., Frapart, Y. M., Ghezzi, P., Görlach, A., Kietzmann, T., Kubaichuk, K., Knaus, U. G., Lopez, M. G., & Olaso-Gonzalez, G. (2017). European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). Redox Biology 13, 94-162.

Elsevier. (2009). Oxidative stress eustress and distress. Retrieved 23.10.2022 from https://www.elsevier.com/books/oxidative-stress/sies/978-0-12-818606-0.

Ermak, G., & Davies, K. J. (2002). Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. Molecular Immunology, 38(10), 713-721.

Evans, P. J., Tredger, J. M., Dunne, J. B., & Halliwell, B. (1996). Catalytic metal ions and the loss of reduced glutathione from University of Wisconsin preservation solution. Transplantation, 62(8), 1046-1049. https://doi.org/10.1097/00007.890.199610270-00002.

Factor, V. M., Laskowska, D., Jensen, M. R., Woitach, J. T., Popescu, N. C., & Thorgeirsson, S. S. (2000). Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(5), 2196-2201. https://doi.org/10.1073/pnas.040428797.

Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. Signal Transduction and Targeted Therapy, 5(1), 28. https://doi.org/10.1038/s41392.020.0134-x.

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

Ferretti, G., Bacchetti, T., Masciangelo, S., & Saturni, L. (2012). Celiac disease, inflammation and oxidative damage: a nutrigenetic approach. Nutrients, 4(4), 243-257. https://doi.org/10.3390/nu4040243.

Fischer-Nielsen, A., Corcoran, G. B., Poulsen, H. E., Kamendulis, L. M., & Loft, S. (1995). Menadione-induced DNA fragmentation without 8-oxo-2′-deoxyguanosine formation in isolated rat hepatocytes. Biochemical Pharmacology, 49(10), 1469-1474.

Flanagan, J., & Jowsey, I. (2005). Glutathione transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 45, 51-88.

Flohé, L. (2020). Looking back at the early stages of redox biology. Antioxidants, 9(12), 1254.

Floyd, R. A., Watson, J. J., Wong, P. K., Altmiller, D. H., & Rickard, R. C. (1986). Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. Free Radical Research Communications, 1(3), 163-172.

Forbes, M. D. (2010). Carbon-centered free radicals and radical cations: structure, reactivity, and dynamics (Vol. 2). John Wiley & Sons.

Forman, H. J., Maiorino, M., & Ursini, F. (2010). Signaling functions of reactive oxygen species. Biochemistry, 49(5), 835-842.

Forman, H. J., Ursini, F., & Maiorino, M. (2014). An overview of mechanisms of redox signaling. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 73, 2-9.

Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. Molecular Aspects of Medicine, 30(1-2), 1-12.

Francis, N., Wong, S. H., Hampson, P., Wang, K., Young, S. P., Deigner, H. P., Salmon, M., Scheel-Toellner, D., & Lord, J. M. (2011). Lactoferrin inhibits neutrophil apoptosis via blockade of proximal apoptotic signaling events. Biochimica et Biophysica Acta, 1813(10), 1822-1826.

Franze, T., Weller, M. G., Niessner, R., & Pöschl, U. (2005). Protein nitration by polluted air. Environmental Science & Technology, 39(6), 1673-1678. https://doi.org/10.1021/es0488737.

Frenkel, K., Goldstein, M. S., & Teebor, G. W. (1981). Identification of the cis-thymine glycol moiety in chemically oxidized and. gamma.-irradiated DNA by HPLC analysis. Biochemistry, 20(26), 7566-7571.

Front-matter. (2016). In M. Malavolta & E. Mocchegiani (Eds.), Molecular Basis of Nutrition and Aging (pp. i-iii). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801816-3.00052-2.

Gad, S. C. (2014). Glutathione. In P. Wexler (Ed.), Encyclopedia of Toxicology (Third Edition) (pp. 751). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00850-2.

Gaetani, G. F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A. M., & Kirkman, H. N. (1989). Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. Blood, 73(1), 334–339.

Galli, F., Azzi, A., Birringer, M., Cook-Mills, J. M., Eggersdorfer, M., Frank, J., Cruciani, G., Lorkowski, S., & Özer, N. K. (2017). Vitamin E:

Emerging aspects and new directions. Free Radical Biology and Medicine, 102, 16-36.

Galli, F., Battistoni, A., Gambari, R., Pompella, A., Bragonzi, A., Pilolli, F., Iuliano, L., Piroddi, M., Dechecchi, M. C., & Cabrini, G. (2012). Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. Biochimica et Biophysica Acta, 1822(5), 690-713. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.012.

García-Santamarina, S., Boronat, S., & Hidalgo, E. (2014). Reversible cysteine oxidation in hydrogen peroxide sensing and signal transduction. Biochemistry, 53(16), 2560-2580. https://doi.org/10.1021/bi401700f.

Gemma, C., Vila, J., Bachstetter, A., & Bickford, P. C. (2007). Frontiers in Neuroscience

Giles, G. I., Nasim, M. J., Ali, W., & Jacob, C. (2017). The reactive sulfur species concept: 15 years on. Antioxidants, 6(2), 38.

Giorgi, C., Marchi, S., Simoes, I. C. M., Ren, Z., Morciano, G., Perrone, M., Patalas-Krawczyk, P., Borchard, S., Jędrak, P., Pierzynowska, K., Szymański, J., Wang, D. Q., Portincasa, P., Węgrzyn, G., Zischka, H., Dobrzyn, P., Bonora, M., Duszynski, J., Rimessi, A., . . . Wieckowski, M. R. (2018). Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases. International Review of Cell and Molecular Biology, 340, 209-344. https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.006.

Gladyshev, V. N. (2014). The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! Antioxidants and Redox Signaling, 20(4), 727-731. https://doi.org/10.1089/ars.2013.5228.

Gleeson, M., Bishop, N. C., Stensel, D. J., Lindley, M. R., Mastana, S. S., & Nimmo, M. A. (2011). The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. Nature Reviews Immunology, 11(9), 607-615.

Goedert, M., Sisodia, S. S., & Price, D. L. (1991). Neurofibrillary tangles and β-amyloid deposits in Alzheimer's disease. Current Opinion in Neurobiology, 1(3), 441-447. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0959-4388(91)90067-H .

Gorelik, S., Kanner, J., Schurr, D., & Kohen, R. (2013). A rational approach to prevent postprandial modification of LDL by dietary polyphenols. Journal of Functional Foods, 5(1), 163-169.

Góth, L., Rass, P., & Páy, A. (2004). Catalase enzyme mutations and their association with diseases. Molecular Diagnosis, 8(3), 141-149.

Goyal, T., Mitra, S., Khaidakov, M., Wang, X., Singla, S., Ding, Z., Liu, S., & Mehta, J. L. (2012). Current Concepts of the Role of Oxidized LDL Receptors in Atherosclerosis. Current Atherosclerosis Reports. https://doi.org/10.1007/s11883.012.0228-1.

Guetens, G., Boeck, G. D., Highley, M., van Oosterom, A. T., & de Bruijn, E. A. (2002). Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 39(4-5), 331-457.

Haber, F., Weiss, J., & Pope, W. J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proceedings of the Royal Society of

London. Series A – Mathematical and Physical Sciences, 147(861), 332-351. https://doi.org/10.1098/rspa.1934.0221.

Hajhashemi, V., Vaseghi, G., Pourfarzam, M., & Abdollahi, A. (2010). Are antioxidants helpful for disease prevention? Research in Pharmaceutical Sciences, 5(1), 1.

Halliwell, B. (1984). Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. Medical Biology, 62, 71-77.

Halliwell, B. (1995). Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. Annals of Rheumatic Diseases, 54(6), 505-510. https://doi.org/10.1136/ard.54.6.505.

Halliwell, B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochemical Journal, 401(1), 1-11. https://doi.org/10.1042/bj20061131.

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

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

Halliwell, B., Zhao, K., & Whiteman, M. (2000). The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? Free Radical Research, 33(6), 819-830.

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. Journal of Gerontology, 11(3), 288-300.

Harman, D. (1972). The biologic clock: the mitochondria? Journal of the American Geriatrics Society, 20(4), 145-147.

Harris, I. S., & DeNicola, G. M. (2020). The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. Trends in Cell Biology, 30(6), 440-451. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.03.002.

Haywood, R. (2013). Spin-Trapping: Theory and Applications. In G. C. K. Roberts (Ed.), Encyclopedia of Biophysics (pp. 2447-2453). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_579.

Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide ion: generation and chemical implications. Chemical Reviews, 116(5), 3029-3085.

Hecker, L. (2018). Mechanisms and consequences of oxidative stress in lung disease: therapeutic implications for an aging populace. American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology, 314(4), L642-L653.

Hercberg, S., Preziosi, P., Galan, P., Faure, H., Arnaud, J., Duport, N., Malvy, D., Roussel, A.-M., Briancon, S., & Favier, A. (1999). "The SU. VI. MAX Study": a primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers. Food and Chemical Toxicology, 37(9-10), 925-930.

Hernández-Tobías, A., Julián-Sánchez, A., Piña, E., & Riveros-Rosas, H. (2011). Natural alcohol exposure: is ethanol the main substrate for alcohol dehydrogenases in animals? Chemico-Biological Interactions, 191(1-3), 14-25.

Huang, C. Y., Ju, D. T., Chang, C. F., Muralidhar Reddy, P., & Velmurugan, B. K. (2017). A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. Biomedicine (Taipei), 7(4), 23. https://doi.org/10.1051/bmdcn/201.707.0423.

Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., & Gu, X. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet, 395(10223), 497-506.

Hukkanen, J., Pelkonen, O., Hakkola, J., & Raunio, H. (2002). Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. Critical Reviews in Toxicology, 32(5), 391-411.

Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., & Le Mercier, P. (2011). ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. Nucleic Acids Research, 39(Database issue), D576-582. https://doi.org/10.1093/nar/gkq901.

Hunter, R. A., Storm, W. L., Coneski, P. N., & Schoenfisch, M. H. (2013). Inaccuracies of nitric oxide measurement methods in biological media. Analytical Chemistry, 85(3), 1957-1963.

Hwangbo, D. S., Lee, H. Y., Abozaid, L. S., & Min, K. J. (2020). Mechanisms of Lifespan Regulation by Calorie Restriction and Intermittent Fasting in Model Organisms. Nutrients, 12(4). https://doi.org/10.3390/nu12041194.

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proceedings of the National Academy of Sciences, 84(24), 9265-9269.

Imai, Y. (2020). PINK1-Parkin signaling in Parkinson's disease: Lessons from Drosophila. Neuroscience Research, 159, 40-46. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neures.2020.01.016.

Ivanov, A. V., Valuev-Elliston, V. T., Ivanova, O. N., Kochetkov, S. N., Starodubova, E. S., Bartosch, B., & Isaguliants, M. G. (2016). Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 8910396. https://doi.org/10.1155/2016/8910396.

Jacob, R. A., & Sotoudeh, G. (2002). Vitamin C function and status in chronic disease. Nutrition in Clinical Care, 5(2), 66-74.

Jain, P., Singh, I., Surana, S. J., & Shirkhedkar, A. A. (2022). Chapter 6 – Tocopherols and tocotrienols: the essential vitamin E. In C. B. B. Cazarin, J. L. Bicas, G. M. Pastore, & M. R. Marostica Junior (Eds.), Bioactive Food Components Activity in Mechanistic Approach (pp. 139-154). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823569-0.00009-6.

Jain, S. K., Pemberton, P. W., Smith, A., McMahon, R. F., Burrows, P. C., Aboutwerat, A., & Warnes, T. W. (2002). Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. Journal of Hepatology, 36(6), 805-811. https://doi.org/10.1016/s0168-8278(02)00060-0.

Jin, K. (2010). Modern Biological Theories of Aging. Aging and Disease, 1(2), 72-74. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21132086.

Johnson, E. J. (2002). The role of carotenoids in human health. Nutrition in Clinical Care, 5(2), 56-65.

Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. Journal of Applied Toxicology, 31(2), 95-107. https://doi.org/10.1002/jat.1649.

Joyce-Brady, M., & Hiratake, J. (2011). Inhibiting glutathione metabolism in lung lining fluid as a strategy to augment antioxidant defense. Current Enzyme Inhibition, 7(2), 71-78. https://doi.org/10.2174/157.340.811796575308.

Jukes, T. H. (1992). Antioxidants, nutrition, and evolution. Preventive Medicine, 21(2), 270-276.

Kadiiska, M., Gladen, B., Baird, D., Germolec, D., Graham, L., Parker, C., Nyska, A., Wachsman, J., Ames, B., & Basu, S. (2005). Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl4 poisoning? Free Radical Biology and Medicine, 38(6), 698-710.

Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. International Review of Cell and Molecular Biology, 298, 229-317. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394309-5.00006-7.

Katsumata, K., Katsumata, Y., & Ozawa, T. (1994). Acute and chronic effect of ethanol on the occurrence of alloxan diabetes in rats. Hormone and Metabolic Research, 26(04), 166-168.

Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables–the millennium's health. International Journal of Food Science & Technology, 36(7), 703-725.

Kehrer, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology, 149(1), 43-50.

Kehrer, J. P., Robertson, J. D., & Smith, C. V. (2010). 1.14 – Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In C. A. McQueen (Ed.), Comprehensive Toxicology (Second Edition) (pp. 277-307). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7.

Keller, J. N., Gee, J., & Ding, Q. (2002). The proteasome in brain aging. Ageing Research Reviews, 1(2), 279-293. https://doi.org/10.1016/s1568-1637(01)00006-x.

Kellner, M., Noonepalle, S., Lu, Q., Srivastava, A., Zemskov, E., & Black, S. M. (2017). ROS Signaling in the Pathogenesis of Acute Lung Injury (ALI) and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). Advances in Experimental Medicine and Biology, 967, 105-137. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2_8.

Kelm, M. (1999). Nitric oxide metabolism and breakdown. Biochimica et Biophysica Acta, 1411(2-3), 273-289.

Khomich, O. A., Kochetkov, S. N., Bartosch, B., & Ivanov, A. V. (2018). Redox biology of respiratory viral infections. Viruses, 10(8), 392.

Kim, Y. J., Kim, E. H., & Hahm, K. B. (2012). Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: challenges and opportunities. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 27(6), 1004-1010. https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2012.07108.x.

Kohno, M. (2010). Applications of electron spin resonance spectrometry for reactive oxygen species and reactive nitrogen species research. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 100.617.0036-100.617.0036.

Koike, K., Kondo, Y., Sekiya, M., Sato, Y., Tobino, K., Iwakami, S.-i., Goto, S., Takahashi, K., Maruyama, N., & Seyama, K. (2010). Complete lack of vitamin C intake generates pulmonary emphysema in senescence marker protein-30 knockout mice. American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology, 298(6), L784-L792.

Koizumi, K., Wang, G., & Park, L. (2016). Endothelial Dysfunction and Amyloid-β-Induced Neurovascular Alterations. Cellular and Molecular Neurobiology, 36(2), 155-165. https://doi.org/10.1007/s10571.015.0256-9.

Koker, E. B., Bilski, P. J., Motten, A. G., Zhao, B., Chignell, C. F., & He, Y. Y. (2010). Real-time visualization of photochemically induced fluorescence of 8-halogenated quinolones: lomefloxacin, clinafloxacin and Bay3118 in live human HaCaT keratinocytes. Photochemistry and Photobiology, 86(4), 792-797. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00741.x.

Komaravelli, N., & Casola, A. (2014). Respiratory Viral Infections and Subversion of Cellular Antioxidant Defenses. Journal of Pharmacogenomics & Pharmacoproteomics, 5(4). https://doi.org/10.4172/2153-0645.100.0141.

Kozakiewicz, M., Kornatowski, M., Krzywińska, O., & Kędziora-Kornatowska, K. (2019). Changes in the blood antioxidant defense of advanced age people. Clinical Interventions in Aging, 14, 763-771. https://doi.org/10.2147/cia.S201250.

Kuchar, E., Miśkiewicz, K., Nitsch-Osuch, A., & Szenborn, L. (2015). Pathophysiology of clinical symptoms in acute viral respiratory tract infections. Pulmonary Infection, 25-38.

Kumar Deshmukh, F., Yaffe, D., Olshina, M. A., Ben-Nissan, G., & Sharon, M. (2019). The contribution of the 20S proteasome to proteostasis. Biomolecules, 9(5), 190. https://www.mdpi.com/2218-273X/9/5/190.

Kurutas, E. B. (2015). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. Nutrition journal, 15(1), 1-22.

Larsen, R., Gouveia, Z., Soares, M. P., & Gozzelino, R. (2012). Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. Frontiers in Pharmacology, 3, 77.

Lassègue, B., San Martín, A., & Griendling, K. K. (2012). Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. Circulation Research, 110(10), 1364-1390.

Lavie, L. (2015). Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia—revisited—the bad ugly and good: implications to the

heart and brain. Sleep Medicine Reviews, 20, 27-45. https://doi.org/10.1016/j.smrv.2014.07.003.

Lev, N., Roncevic, D., Ickowicz, D., Melamed, E., & Offen, D. (2006). Role of DJ-1 in Parkinson's disease. Journal of Molecular Neuroscience, 29(3), 215-225. https://doi.org/10.1385/jmn:29:3:215.

Levitan, I., Volkov, S., & Subbaiah, P. V. (2010). Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. Antioxidants and Redox Signaling, 13(1), 39-75. https://doi.org/10.1089/ars.2009.2733.

Li, Y., & Schellhorn, H. E. (2007). New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. Journal of Nutrition, 137(10), 2171-2184.

Li, Y., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., & Trush, M. A. (1996). Role of Cu/Zn-superoxide dismutase in xenobiotic activation. I. Chemical reactions involved in the Cu/Zn-superoxide dismutase-accelerated oxidation of the benzene metabolite 1, 4-hydroquinone. Molecular Pharmacology, 49(3), 404-411.

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. Clinical Interventions in Aging, 13, 757-772. https://doi.org/10.2147/CIA.S158513.

Liou, G. Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. Free Radical Research, 44(5), 479-496. https://doi.org/10.3109/107.157.61003667554.

Liu, B., Chen, Y., & St Clair, D. K. (2008). ROS and p53: a versatile partnership. Free Radical Biology and Medicine, 44(8), 1529-1535. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.011.

Liu, F.-C., Chuang, Y.-H., Tsai, Y.-F., & Yu, H.-P. (2014). Role of neutrophil extracellular traps following injury. Shock, 41(6), 491-498.

Loffredo, L., Carnevale, R., Sanguigni, V., Plebani, A., Rossi, P., Pignata, C., De Mattia, D., Finocchi, A., Martire, B., & Pietrogrande, M. C. (2013). Does NADPH oxidase deficiency cause artery dilatation in humans? In: Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA.

Lundin, D., Berggren, G., Logan, D. T., & Sjöberg, B.-M. (2015). The Origin and Evolution of Ribonucleotide Reduction. Life, 5(1), 604-636. https://www.mdpi.com/2075-1729/5/1/604.

Luo, J.-D., Wang, Y.-Y., Fu, W.-L., Wu, J., & Chen, A. F. (2004). Gene therapy of endothelial nitric oxide synthase and manganese superoxide dismutase restores delayed wound healing in type 1 diabetic mice. Circulation, 110(16), 2484-2493.

Luo, L., Kaur Kumar, J., & Clément, M. V. (2012). Redox control of cytosolic Akt phosphorylation in PTEN null cells. Free Radical Biology and Medicine, 53(9), 1697-1707. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.566.

Lyras, L., Cairns, N. J., Jenner, A., Jenner, P., & Halliwell, B. (1997). An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. Journal of Neurochemistry, 68(5), 2061-2069. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.680.52061.x.

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

Maccarrone, M., & Brüne, B. (2009). Redox regulation in acute and chronic inflammation. Cell Death & Differentiation, 16(8), 1184-1186. https://doi.org/10.1038/cdd.2009.65.

Majeski, A. E., & Dice, J. F. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36(12), 2435-2444.

Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J. M., Manning, G., Morgan, D. O., Tsai, L. H., & Wolgemuth, D. J. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. Nature Cell Biology, 11(11), 1275-1276. https://doi.org/10.1038/ncb1109-1275.

Mangerich, A., Dedon, P. C., Fox, J. G., Tannenbaum, S. R., & Wogan, G. N. (2013). Chemistry meets biology in colitis-associated carcinogenesis. Free Radical Research, 47(11), 958-986. https://doi.org/10.3109/10715.762.2013.832239.

Maraganore, D. M., Lesnick, T. G., Elbaz, A., Chartier-Harlin, M. C., Gasser, T., Krüger, R., Hattori, N., Mellick, G. D., Quattrone, A., Satoh, J., Toda, T., Wang, J., Ioannidis, J. P., de Andrade, M., & Rocca, W. A. (2004). UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. Annals of Neurology, 55(4), 512-521. https://doi.org/10.1002/ana.20017.

Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family–an evolutionary overview. FASEB Journal, 275(15), 3959-3970.

Mariotti, A. (2015). The effects of chronic stress on health: new insights into the molecular mechanisms of brain-body communication. Future Science OA, 1(3), Fso23. https://doi.org/10.4155/fso.15.21.

Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins, J. B., 3rd. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 17(1), 24-38. https://doi.org/10.1002/jbt.10058.

Marmolino, D. (2011). Friedreich's ataxia: past, present and future. Brain Research Reviews, 67(1-2), 311-330. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2011.04.001.

Martinez-Lopez, N., Athonvarangkul, D., & Singh, R. (2015). Autophagy and aging. Advances in Experimental Medicine and Biology, 847, 73-87. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2404-2_3.

Mattson, M. P. (2009). Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. Experimental Gerontology, 44(10), 625-633. https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.07.003.

Maulik, N., McFadden, D., Otani, H., Thirunavukkarasu, M., & Parinandi, N. L. (2013). Antioxidants in Longevity and Medicine. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2013, 820679. https://doi.org/10.1155/2013/820679.

Maulucci, G., Bačić, G., Bridal, L., Schmidt, H. H., Tavitian, B., Viel, T., Utsumi, H., Yalçın, A. S., & De Spirito, M. (2016). Imaging reactive

oxygen species-induced modifications in living systems. Antioxidants and Redox Signaling, 24(16), 939-958.
McCord, J. (1988). 1. Fridovich, Superoxide dismutase: The first twenty years (1968-1988). Free Radical Biology and Medicine, 5, 363-369.
McGill, M. R., Sharpe, M. R., Williams, C. D., Taha, M., Curry, S. C., & Jaeschke, H. (2012). The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. Journal of Clinical Investigation, 122(4), 1574-1583. https://doi.org/10.1172/jci59755.
McGregor, D. (2007). Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties. Critical Reviews in Toxicology, 37(10), 887-914.
Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. Annual Review of Biochemistry, 52(1), 711-760.
Meiser, J., Weindl, D., & Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. Cell Communication and Signaling, 11(1), 34. https://doi.org/10.1186/1478-811x-11-34.
Miller, D. M., Buettner, G. R., & Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. Free Radical Biology and Medicine, 8(1), 95-108.
Min, J. Y., Lim, S. O., & Jung, G. (2010). Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. FEBS Letters, 584(11), 2427-2432. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.048.
Mishanina, T. V., Libiad, M., & Banerjee, R. (2015). Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. Nature Cell Biology, 11(7), 457-464.
Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. Clinical Microbiology Reviews, 22(2), 240-273.
Mokhtar, S. H., Bakhuraysah, M. M., Cram, D. S., & Petratos, S. (2013). The Beta-Amyloid Protein of Alzheimer's Disease: Communication Breakdown by Modifying the Neuronal Cytoskeleton. International Journal of Alzheimer's Disease, 2013, 910502. https://doi.org/10.1155/2013/910502.
Molteni, C. G., Principi, N., & Esposito, S. (2014). Reactive oxygen and nitrogen species during viral infections. Free Radical Research, 48(10), 1163-1169. https://doi.org/10.3109/10715.762.2014.945443.
Moore, K. J., Sheedy, F. J., & Fisher, E. A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. Nature Reviews Immunology, 13(10), 709-721. https://doi.org/10.1038/nri3520.
Morán, J. M., Ortiz-Ortiz, M. A., Ruiz-Mesa, L. M., & Fuentes, J. M. (2010). Nitric oxide in paraquat-mediated toxicity: A review. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 24(6), 402-409.
Morelli, R., Russo-Volpe, S., Bruno, N., & Lo Scalzo, R. (2003). Fenton-dependent damage to carbohydrates: free radical scavenging activity

of some simple sugars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(25), 7418-7425.

Muller, P. A., & Vousden, K. H. (2013). p53 mutations in cancer. Nature Cell Biology, 15(1), 2-8. https://doi.org/10.1038/ncb2641.

Murphy, M. P., & LeVine, H., 3rd. (2010). Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. Journal of Alzheimer's Disease, 19(1), 311-323. https://doi.org/10.3233/jad-2010-1221.

Nair, D., Ramesh, V., & Gozal, D. (2012). Adverse cognitive effects of high-fat diet in a murine model of sleep apnea are mediated by NADPH oxidase activity. Neuroscience, 227, 361-369. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.068.

Narasaraju, T. A., Jin, N., Narendranath, C. R., Chen, Z., Gou, D., & Liu, L. (2003). Protein nitration in rat lungs during hyperoxia exposure: a possible role of myeloperoxidase. American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology, 285(5), L1037-L1045.

Nathan, C., & Cunningham-Bussel, A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. Nature Reviews Immunology, 13(5), 349-361.

National Institute of Environmental Health Sciences (07.07.2021). Electron paramagnetic resonance/electron spin resonance (EPR/ESR). Retrieved 23.10.2022 from https://www.niehs.nih.gov/research/resources/epresr/index.cfm.

Navab, M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., & Fogelman, A. M. (2011). HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. Nature Reviews Cardiology, 8(4), 222-232. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.222.

Nikolaidis, M. G., Kyparos, A., Spanou, C., Paschalis, V., Theodorou, A. A., & Vrabas, I. S. (2012). Redox biology of exercise: an integrative and comparative consideration of some overlooked issues. The Journal of Experimental Biology, 215(10), 1615-1625.

Nikolic, D., Katsiki, N., Montalto, G., Isenovic, E. R., Mikhailidis, D. P., & Rizzo, M. (2013). Lipoprotein subfractions in metabolic syndrome and obesity: clinical significance and therapeutic approaches. Nutrients, 5(3), 928-948. https://doi.org/10.3390/nu5030928.

Nova, E., Baccan, G., Veses, A., Zapatera, B., & Marcos, A. (2012). Potential health benefits of moderate alcohol consumption: current perspectives in research. Proceedings of the Nutrition Society, 71(2), 307-315.

Nozik-Grayck, E., Huang, Y.-C. T., Carraway, M. S., & Piantadosi, C. A. (2003). Bicarbonate-dependent superoxide release and pulmonary artery tone. American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology, 285(6), H2327-H2335.

Nussbaum, C., Klinke, A., Adam, M., Baldus, S., & Sperandio, M. (2013). Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. Antioxidants and Redox Signaling, 18(6), 692-713.

Ogura, Y., Kitada, M., & Koya, D. (2021). Sirtuins and Renal Oxidative Stress. Antioxidants, 10(8), 1198. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antiox10081198.

Okoh, V., Deoraj, A., & Roy, D. (2011). Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signalings contribute to breast cancer. Biochimica et Biophysica Acta, 1815(1), 115-133. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.10.005.

O'Neill, P., & Wardman, P. (2009). Radiation chemistry comes before radiation biology. International Journal of Radiation Biology, 85(1), 9-25. https://doi.org/10.1080/095.530.00802640401.

Orhan, H., & Şahin, G. (1995). Glutatyon S-Transferazların Klinik ve Toksikolojik Önemi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 15(5), 303-315.

Ortega, Z., & Lucas, J. J. (2014). Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington's disease. Frontiers in Molecular Neuroscience, 7, 77. https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00077.

Ortega-Berlanga, B., & Pniewski, T. (2022). Plant-Based Vaccines in Combat against Coronavirus Diseases. Vaccines, 10(2), 138. https://www.mdpi.com/2076-393X/10/2/138.

Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention. In D. R. Riddle (Ed.), Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms. CRC Press/Taylor & Francis

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

Packer, L., Witt, E. H., & Tritschler, H. J. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radical Biology and Medicine, 19(2), 227-250.

Palmieri, B., & Sblendorio, V. (2007). Oxidative stress tests: overview on reliability and use. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 11(6), 383-399.

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. Journal of Nutritional Science, 5, e47.

Panday, A., Sahoo, M. K., Osorio, D., & Batra, S. (2015). NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. Cellular and Molecular Immunology, 12(1), 5-23.

Parker, A., Cuddihy, S. L., Son, T. G., Vissers, M. C., & Winterbourn, C. C. (2011). Roles of superoxide and myeloperoxidase in ascorbate oxidation in stimulated neutrophils and H2O2-treated HL60 cells. Free Radical Biology and Medicine, 51(7), 1399-1405.

Patel, R., Rinker, L., Peng, J., & Chilian, W. M. (2018). Reactive oxygen species: The good and the bad. Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells, 7.

Peng, C., Wang, X., Chen, J., Jiao, R., Wang, L., Li, Y. M., Zuo, Y., Liu, Y., Lei, L., Ma, K. Y., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2014). Biology of ageing and role of dietary antioxidants. BioMed Research International, 2014, 831841. https://doi.org/10.1155/2014/831841.

Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., & Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. Experimental & Molecular Medicine, 52(2), 192-203. https://doi.org/10.1038/s12276.020.0384-2.

Perluigi, M., Poon, H. F., Maragos, W., Pierce, W. M., Klein, J. B., Calabrese, V., Cini, C., De Marco, C., & Butterfield, D. A. (2005). Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease. Molecular & Cellular Proteomics, 4(12), 1849-1861. https://doi.org/10.1074/mcp.M500090-MCP200.

Pezzilli, R. (2012). Antioxidants for intractable pain in chronic pancreatitis patients. Is the end of the story? Journal of the Pancreas, 13(4), 461-463. https://doi.org/10.6092/1590-8577/979.

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.

Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products, 63(7), 1035-1042.

Pljesa-Ercegovac, M., Savic-Radojevic, A., Matic, M., Coric, V., Djukic, T., Radic, T., & Simic, T. (2018). Glutathione Transferases: Potential Targets to Overcome Chemoresistance in Solid Tumors. International Journal of Molecular Sciences, 19(12), 3785. https://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/3785.

Powis, G., & Kirkpatrick, D. L. (2007). Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy. Current Opinion in Pharmacology, 7(4), 392-397. https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.04.003.

Radak, Z., Asano, K., Inoue, M., Kizaki, T., Oh-Ishi, S., Suzuki, K., Taniguchi, N., & Ohno, H. (1995). Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. Journal of Applied Physiology, 79(1), 129-135.

Radi, R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(23), 5839-5848. https://doi.org/doi:10.1073/pnas.180.493.2115.

Raha, S., & Robinson, B. H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. Trends in Biochemical Sciences, 25(10), 502-508.

Ramana, K. V., Srivastava, S., & Singhal, S. S. (2017). Lipid peroxidation products in human health and disease 2016.. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, 2163285. https://doi.org/10.1155/2017/2163285.

Ravindran, M., Khan, M. A., & Palaniyar, N. (2019). Neutrophil extracellular trap formation: physiology, pathology, and pharmacology. Biomolecules, 9(8), 365. https://www.mdpi.com/2218-273X/9/8/365.

RCSB Protein Data Bank. (01.11.2017). The NADPH binding site on beef liver catalase. https://www.rcsb.org/structure/8cat.

RCSB Protein Data Bank. (29.11.2017). The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. Retrieved 23.10.2022 from https://www.rcsb.org/structure/1gp1.

Reeder, B. J. (2010). The redox activity of hemoglobins: from physiologic functions to pathologic mechanisms. Antioxidants and Redox Signaling, 13(7), 1087-1123.

Reid, M., Badaloo, A., Forrester, T., & Jahoor, F. (2006). In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in adults with sickle cell disease. American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism, 291(1), E73-E79.

Ren, L. L., Wang, Y. M., Wu, Z. Q., Xiang, Z. C., Guo, L., Xu, T., Jiang, Y. Z., Xiong, Y., Li, Y. J., Li, X. W., Li, H., Fan, G. H., Gu, X. Y., Xiao, Y., Gao, H., Xu, J. Y., Yang, F., Wang, X. M., Wu, C., . . . Wang, J. W. (2020). Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. Chinese Medical Journal (Engl), 133(9), 1015-1024. https://doi.org/10.1097/cm9.000.000.0000000722.

Repine, J., Fox, R. B., & Berger, E. (1981). Hydrogen peroxide kills Staphylococcus aureus by reacting with staphylococcal iron to form hydroxyl radical. Journal of Biological Chemistry, 256(14), 7094-7096.

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

Rhee, S. G., Chang, T.-S., Jeong, W., & Kang, D. (2010). Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. Molecular Cell, 29(6), 539-549.

Richardson, J. R., Caudle, W. M., Guillot, T. S., Watson, J. L., Nakamaru-Ogiso, E., Seo, B. B., Sherer, T. B., Greenamyre, J. T., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., & Miller, G. W. (2007). Obligatory role for complex I inhibition in the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Toxicological Sciences, 95(1), 196-204. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl133.

Rogalska, J., Brzóska, M. M., Roszczenko, A., & Moniuszko-Jakoniuk, J. (2009). Enhanced zinc consumption prevents cadmium-induced alterations in lipid metabolism in male rats. Chemico-Biological Interactions, 177(2), 142-152. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.09.011.

Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. Immune Network, 18(4).

Rossi, E., Meuser, M. E., Cunanan, C. J., & Cocklin, S. (2021). Structure, Function, and Interactions of the HIV-1 Capsid Protein. Life, 11(2), 100. https://www.mdpi.com/2075-1729/11/2/100.

Sacca, S. C., Roszkowska, A. M., & Izzotti, A. (2013). Environmental light and endogenous antioxidants as the main determinants of non-cancer ocular diseases. Mutation Research, 752(2), 153-171.

Sahin, F., & Demir, S. (2020). Virüsler, Viral Pandemileri Etkileyen Faktörler ve Sonuçları. In (pp. 55-76). https://doi.org/10.53478/TUBA.2020.026.

Salim, S. (2017). Oxidative Stress and the Central Nervous System. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 360(1), 201-205. https://doi.org/10.1124/jpet.116.237503.

Salonen, J., Nyyssönen, K., Salonen, R., Lakka, H. M., Kaikkonen, J., Porkkala-Sarataho, E., Voutilainen, S., Lakka, T., Rissanen, T., & Leskinen, L. (2000). Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. Journal of Internal Medicine, 248(5), 377-386.

Samocha-Bonet, D., Campbell, L. V., Mori, T. A., Croft, K. D., Greenfield, J. R., Turner, N., & Heilbronn, L. K. (2012). Overfeeding reduces insulin sensitivity and increases oxidative stress, without altering markers of mitochondrial content and function in humans. PloS one, 7(5), e36320. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036320.

Saretzki, G., & Von Zglinicki, T. (2002). Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. Annals of the New York Academy of Sciences, 959, 24-29. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02079.x.

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

Science of Aging, Denham Harman Proposes The Free Radical Theory Of Aging. Retrieved 23.10.2022 from https://www.science-of-aging.com/timelines/harman-free-radical-theory.html.

Sedlak, T. W., Saleh, M., Higginson, D. S., Paul, B. D., Juluri, K. R., & Snyder, S. H. (2009). Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(13), 5171-5176. https://doi.org/doi:10.1073/pnas.081.313.2106.

Seitz, H. K., & Stickel, F. (2007). Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. Nature Reviews Cancer, 7(8), 599-612.

Selman, C., Blount, J. D., Nussey, D. H., & Speakman, J. R. (2012). Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? Trends in ecology & evolution, 27(10), 570-577.

Sen, C. K., & Roy, S. (2008). Redox signals in wound healing. Biochimica et Biophysica Acta, 1780(11), 1348-1361.

Shi, C., Andersson, R., Zhao, X., & Wang, X. (2005). Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. Pancreatology, 5(4-5), 492-500. https://doi.org/10.1159/000087063.

Shoham, A., Hadziahmetovic, M., Dunaief, J. L., Mydlarski, M. B., & Schipper, H. M. (2008). Oxidative stress in diseases of the human cornea. Free Radical Biology and Medicine, 45(8), 1047-1055.

Sies, H. (2019). Chapter 13 – Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. In G. Fink (Ed.), Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology (pp. 153-163). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8.

Sies, H. (2020). Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. Antioxidants, 9(9), 852. https://www.mdpi.com/2076-3921/9/9/852.

Singh, S. K., Suresh, M. V., Voleti, B., & Agrawal, A. (2008). The connection between C-reactive protein and atherosclerosis. Annals of Medicine, 40(2), 110-120. https://doi.org/10.1080/078.538.90701749225.

Smith, J., Telford, R., Mason, I., & Weidemann, M. (1990). Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. International Journal of Sports Medicine, 11(03), 179-187.

Smith, O. (1998). Nobel Prize for NO research. Nature Medicine, 4(11), 1215.

Snyder, S. H. (1993). Janus faces of nitric oxide. Nature, 364(6438), 577-577.

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

Sousa Silva, M., Gomes, R. A., Ferreira, A. E., Ponces Freire, A., & Cordeiro, C. (2013). The glyoxalase pathway: the first hundred years… and beyond. Biochemical Journal, 453(1), 1-15.

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

Squadrito, G. L., Postlethwait, E. M., & Matalon, S. (2010). Elucidating mechanisms of chlorine toxicity: reaction kinetics, thermodynamics, and physiological implications. American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology, 299(3), L289-L300.

Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A., & Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. Redox Biology 25, 101084. https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084.

Stadtman ER, L. R. (2000). Protein oxidation. Annals of the New York Academy of Sciences, 899, 191-208.

Stanley, A., Hynes, A., Brakebusch, C., & Quondamatteo, F. (2012). Rho GTPases and Nox dependent ROS production in skin. Is there a connection? Histology and Histopathology, 27(11), 1395-1406. https://doi.org/10.14670/hh-27.1395.

Štefanac, T., Grgas, D., & Landeka Dragičević, T. (2021). Xenobiotics—Division and Methods of Detection: A Review. Journal of Xenobiotics, 11(4), 130-141. https://www.mdpi.com/2039-4713/11/4/9.

Stefanova, N. A., Kozhevnikova, O. S., Vitovtov, A. O., Maksimova, K. Y., Logvinov, S. V., Rudnitskaya, E. A., Korbolina, E. E., Muraleva, N. A., & Kolosova, N. G. (2014). Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease. Cell Cycle, 13(6), 898-909. https://doi.org/10.4161/cc.28255.

Steinbacher, P., & Eckl, P. (2015). Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. Biomolecules, 5(2), 356-377.

Steinbeck, M., Khan, A., Appel Jr, W., & Karnovsky, M. (1993). The DAB-Mn++ cytochemical method revisited: validation of specificity for superoxide. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 41(11), 1659-1667.

Storz, P. (2011). Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. Antioxidants and Redox Signaling, 14(4), 593-605. https://doi.org/10.1089/ars.2010.3405.

Su, H., Ji, L., Xing, W., Zhang, W., Zhou, H., Qian, X., Wang, X., Gao, F., Sun, X., & Zhang, H. (2013). Acute hyperglycaemia enhances oxidative stress and aggravates myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of thioredoxin-interacting protein. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 17(1), 181-191. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01661.x.

Sullivan, L. B., & Chandel, N. S. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. Cancer and Metabolism, 2, 17. https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-17.

Suschek, C. V., Opländer, C., & van Faassen, E. E. (2010). Non-enzymatic NO production in human skin: effect of UVA on cutaneous NO stores. Nitric Oxide, 22(2), 120-135.

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

Takeda, T. (2009). Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. Neurochemical Research, 34(4), 639-659. https://doi.org/10.1007/s11064.009.9922-y.

Tappel, A. (1973). Lipid peroxidation damage to cell components. Federation Proceedings, 32, 1870-1874.

Tappel, A., & Zalkin, H. (1960). Inhibition of lipid peroxidation in microsomes by vitamin E. Nature, 185(4705), 35-35.

Theory, T. F. (30.11.2010). Two faces of janus. Retrieved 23.10.2022 from https://www.thefeeherytheory.com/two-faces-of-janus/.

Tong, L., Chuang, C. C., Wu, S., & Zuo, L. (2015). Reactive oxygen species in redox cancer therapy. Cancer Letters, 367(1), 18-25. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.008.

Torricella, F., Pierro, A., Mileo, E., Belle, V., & Bonucci, A. (2021). Nitroxide spin labels and EPR spectroscopy: A powerful association for protein dynamics studies. Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics, 1869(7), 140653.

Totter, J. R. (1980). Spontaneous Cancer and Its Possible Relationship to Oxygen Metabolism. Proceedings of the National Academy of Sciences, 77(4), 1763-1767. http://www.jstor.org/stable/8535.

Tur, J. A., Jacob, C., Chaimbault, P., Tadayyon, M., Richling, E., Hermans, N., Nunes dos Santos, C., Diederich, M., Giblin, L., & Elhabiri, M. (2019). Personalized nutrition in ageing society: redox control of major-age related diseases through the NutRedOx Network (COST Action CA16112). Free Radical Research, 53(sup1), 1163-1170.

Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. Current Medicinal Chemistry, 12(10), 1161-1208.

van der Veen, B. S., de Winther, M. P., & Heeringa, P. (2009). Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. Antioxidants and Redox Signaling, 11(11), 2899-2937. https://doi.org/10.1089/ars.2009.2538.

Vandivier, R. W., Fadok, V. A., Hoffmann, P. R., Bratton, D. L., Penvari, C., Brown, K. K., Brain, J. D., Accurso, F. J., & Henson, P. M. (2002). Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. Journal of Clinical Investigation, 109(5), 661-670.

Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R., & Wong, P. C. (2009). The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. Journal of Neuroscience, 29(41), 12787-12794. https://doi.org/10.1523/jneurosci.3657-09.2009.

Vermot, A., Petit-Härtlein, I., Smith, S. M. E., & Fieschi, F. (2021). NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. Antioxidants, 10(6), 890. https://www.mdpi.com/2076-3921/10/6/890.

Victor, V. M., Rocha, M., Solá, E., Bañuls, C., Garcia-Malpartida, K., & Hernández-Mijares, A. (2009). Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. Current Pharmaceutical Design, 15(26), 2988-3002. https://doi.org/10.2174/138.161.209789058093.

Viteri, G., Chung, Y. W., & Stadtman, E. R. (2010). Effect of progerin on the accumulation of oxidized proteins in fibroblasts from Hutchinson Gilford progeria patients. Mechanisms of Ageing and Development, 131(1), 2-8. https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.11.006.

Vollert, C., Zagaar, M., Hovatta, I., Taneja, M., Vu, A., Dao, A., Levine, A., Alkadhi, K., & Salim, S. (2011). Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. Behavioural Brain Research, 224(2), 233-240. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.05.010.

Wakabayashi, K., Tanji, K., Mori, F., & Takahashi, H. (2007). The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. Neuropathology, 27(5), 494-506. https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2007.00803.x.

Wang, F., Yu, Y., Mubarik, S., Zhang, Y., Liu, X., Cheng, Y., Yu, C., & Cao, J. (2021). Global Burden of Ischemic Heart Disease and Attributable Risk Factors, 1990-2017: A Secondary Analysis Based on the Global Burden of Disease Study 2017. Clinical Epidemiology, 13, 859-870. https://doi.org/10.2147/clep.S317787.

Wang, Y., Qi, H., Liu, Y., Duan, C., Liu, X., Xia, T., Chen, D., Piao, H.-L., & Liu, H.-X. (2021). The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. Theranostics, 11(10), 4839-4857. https://doi.org/10.7150/thno.56747.

Wangpaichitr, M., Sullivan, E. J., Theodoropoulos, G., Wu, C., You, M., Feun, L. G., Lampidis, T. J., Kuo, M. T., & Savaraj, N. (2012). The

relationship of thioredoxin-1 and cisplatin resistance: its impact on ROS and oxidative metabolism in lung cancer cells. Molecular Cancer Therapeutics, 11(3), 604-615. https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-11-0599.

Wardman, P. (2007). Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. Free Radical Biology and Medicine, 43(7), 995-1022.

Wardman, P., & Candeias, L. P. (1996). Fenton Chemistry: An Introduction. Radiation Research, 145(5), 523-531. https://doi.org/10.2307/3579270.

Warner, H. R. (1994). Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. Free Radical Biology and Medicine, 17(3), 249-258. https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90080-9.

Wei, H., Kim, S. J., Zhang, Z., Tsai, P. C., Wisniewski, K. E., & Mukherjee, A. B. (2008). ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. Human Molecular Genetics, 17(4), 469-477. https://doi.org/10.1093/hmg/ddm324.

Weinberg, R. (2014). The biology of cancer Second edition. Garland-Norton.

Wickens, A. P. (2001). Ageing and the free radical theory. Respiration Physiology, 128(3), 379-391. https://doi.org/10.1016/s0034-5687(01)00313-9.

Wikipedia. (25.09.2022). Electron paramagnetic resonance. Retrieved 24.10.2022 from https://en.wikipedia.org/wiki/Electron_paramagnetic_resonance.

Winterbourn, C. C., French, J. K., & Claridge, R. (1979). The reaction of menadione with haemoglobin. Mechanism and effect of superoxide dismutase. Biochemical Journal, 179(3), 665-673.

Wisthaler, A., & Weschler, C. J. (2010). Reactions of ozone with human skin lipids: sources of carbonyls, dicarbonyls, and hydroxycarbonyls in indoor air. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(15), 6568-6575.

Witt, E. H., Reznick, A. Z., Viguie, C. A., Starke-Reed, P., & Packer, L. (1992). Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. Journal of Nutrition, 122(3 Suppl), 766-773. https://doi.org/10.1093/jn/122.suppl_3.766.

Wood, Z. A., Schröder, E., Harris, J. R., & Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. Trends in Biochemical Sciences, 28(1), 32-40.

Wrobel, J. K., Power, R., & Toborek, M. (2016). Biological activity of selenium: Revisited. IUBMB life, 68(2), 97-105.

Yalçın, A. S. (1998). Antioksidanlar. Klinik gelişim, 11(342-346).

Yang, Y., Bazhin, A. V., Werner, J., & Karakhanova, S. (2013). Reactive oxygen species in the immune system. International Reviews of Immunology, 32(3), 249-270.

Yoshida, H., & Kisugi, R. (2010). Mechanisms of LDL oxidation. Clinica Chimica Acta, 411(23-24), 1875-1882. https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.038.

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, 129878.

Zhang, R., Brennan, M.-L., Shen, Z., MacPherson, J. C., Schmitt, D., Molenda, C. E., & Hazen, S. L. (2002). Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. Journal of Biological Chemistry, 277(48), 46116-46122.

Zhang, R., Wang, X., Ni, L., Di, X., Ma, B., Niu, S., Liu, C., & Reiter, R. J. (2020). COVID-19: Melatonin as a potential adjuvant treatment. Life Sciences, 250, 117583.

Zhao, T., & Bokoch, G. M. (2005). Critical role of proline-rich tyrosine kinase 2 in reversion of the adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils. Journal of Immunology, 174(12), 8049-8055.

Zondler, L., Kostka, M., Garidel, P., Heinzelmann, U., Hengerer, B., Mayer, B., Weishaupt, J. H., Gillardon, F., & Danzer, K. M. (2017). Proteasome impairment by α-synuclein. PloS one, 12(9), e0184040. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184040.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

Dizin / Index

A

A vitamini 61
ABTS yöntemi 112
Adaptasyon 92, 178, 183, 186
Adipoz doku 131
Aerobik bakteriler 13
Akonitaz 17, 30, 41, 99, 164
Akut solunum 136
Akut solunum yetmezliği sendromu (ARDS) 136
Albümin 23, 120
Aldehit 35, 83, 84, 109, 110, 111, 119
Aldehit reaktif belirteç 109
Alfa-1-antiproteinaz 73
Alfa-keto asitler 57
Alfa-lipoik asit (ALA) 58
Alfa-sinuklein 155
Alfa-tokoferol 63
Alifatik 20
Alkoksil 19, 20, 34, 104, 125
Alkolik yağlı karaciğer hastalığı 119
Alloksan 119
Alüminyum 69, 85, 123
Alzheimer hastalığı 137, 145, 158
Aminoasit oksidaz 11
Amyotrofik lateral skleroz 161
Anaerobik bakteriler 13
Antibiyotik 117
Antioksidan 26, 32, 38, 58, 72, 84, 91, 93, 112, 115, 136, 141, 146, 153, 185, 191
Antioksidan savunma sistemleri 93, 179
Antioksidan takviyeler 177
Antioksidan yanıt elemanları (ARE), 32
AP-1 32, 86, 87, 144, 188
Apoptoz 27 - 30, 32, 34, 73, 143, 169 - 171, 178, 189
Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1'i (ASK1) 73
APP proteinleri 159
Araşidonik asit 11
Arsenat 123
Arsenik 123, 124, 175
Arsenit 123
Asetiltransferazlar 23
Asidoz 133
Askorbat 17, 84, 121, 139, 153
Askorbik asit 80, 122
Ateroskleroz 123, 128, 129, 131, 132, 135
Atmosfer 18
ATM proteinleri 167
Atomik ve moleküler oksijen 14
ATR proteinleri 167
Azo bileşikler 118
Azot dioksit 10, 122

B

B12 vitamini 17
Benzen halkası 20, 62
Benzoat floresansı 97
Beta-amiloid peptidler (Aβ) 159
Bikarbonat 18
Bilirubin 56, 57
BrdU (5-bromo-2'-deoksiuridin) katılması 108

C

Ca^{2+} iyonları 22, 28
Çapraz bağlanma teorisi 144
Çinko 16, 17, 41, 125, 151, 162
Çinko parmak 17
Cisplatin 177, 182
Çölyak hastalığı 139
Comet testi 108
COVID-19 193, 194
cpYFP 100, 105
Crohn hastalığı 138
Cu/Zn-SOD 17, 41, 45, 81, 84, 91, 92, 103, 150, 187
C vitamini 58, 100, 191

D

DABCO 104
D-amino asit oksidazı (DAAO) 106
DAMP 67
DCFH, DCFH-DA 106
Defensin 70
Demir iyonu 20, 34, 81, 84
Demir-sülfür 19
Denham Harman 142
DEPMPO 96
Depurinasyon 176
Diabetes mellitus 132
Diaminobenzidin (DAB) 99
Difenilizobenzofuran 104
Dihidroetidyum (DHE) 98
Dihidrolipoik aside (DHLA) 58
Dihidrorodamin (DHR) 107
Dihidrorodamin oksidasyonu 102
Dikuat 116
Dimetilsülfoksit (DMSO) yöntemi 97
Dismutasyon 15, 19, 44
DJ-1 proteini 158
DNA hasarı 86, 107, 116, 141, 143, 167, 171 - 173, 176, 187
DNA replikasyonu 33, 166, 176
Dokosaheksaenoik asit (DHA) 83
Dopamin hidroksilaz 17
DPPH yöntemi 112
DUOX1, DUOX2 75

E

Efferositoz 30
Elastaz 70
Elektron transport zinciri 13
Endojen oksijen radikalleri 14
Endojen savunma sistemleri 9
Endotoksin 22
Enzimatik etiketleme 108
Epilepsi 165
EPR spektroskopisi 94 - 96, 104
Etanol 77, 119
E vitamini 58, 60, 152, 191

F

F2-IsoPG 135, 138, 149
F2-izoprostan 77
Fenilalanin 23, 62, 97, 103, 136
Fenilhidrazin 9
Fenoksil 19, 20
Fenolik bileşikler 61, 78
Fenton reaksiyonu 16, 117
Fe-SOD 41
Fitoprostan 77
Fitosterol 77
Flavan çekirdeği 62
Flavonoid 62, 63
Forbol miristat asetat 69
Fosfolipaz A2 (PLA2) 90
FRAP 113
Friedreich ataksisi 162

G

Geçiş metal iyonları 9
Geçiş metalleri 11, 14, 16
Glioksalaz 126
Glioksalaz I 17
Glutaredoksin 179
Glutatyon 23, 32, 42, 44, 45, 46, 48, 53, 57, 58, 60, 90, 91, 98, 116, 152, 153, 178, 181, 186, 190
Göç ve yapışma 26
Griess reaksiyonu 102

H

Haber-Weiss reaksiyon 15, 16
Halojenlenmiş hidrokarbonlar 115
Hayflick limiti 141
Heksaklorobenzen 19
Hemoglobin 17, 23, 55, 82, 101
Hemoglobin oksidasyonu 101
Hem oksijenaz 55
Hemoproteinler 54
Hepatit B virüsü (HBV) 186
Hepatit C virüsü (HCV) 187
Hepatotoksisite 115
Hidrojen peroksit 11, 15, 16, 17, 37, 41, 44, 46, 53, 68, 77, 84, 105, 117, 120, 124, 126, 131, 133,

141, 161, 173
Hidrojen sülfür 23
Hidroksilaz/Oksidazlar 17
Hidroksil radikali 10, 16, 17, 82, 97
Hidroksitirozin 19
Hidrolazlar 17
Hipobromöz asit 103
Hipoklorik asit 18
Hipoklorit 59, 104
Hipokloröz asit 73, 103
Hipoksantin 90, 133, 134
Histidin 33, 104
HNE 26, 46, 67, 110
Homolitik bölünme 9
Hormon 30, 177
Horseradish peroksidaz 99
Hücre bölünmesi 33, 146, 166, 168, 176
Hücre ölümü 29, 30, 34, 88, 128, 185, 194
Hücre yaşlanma teorisi 143
Huntington hastalığı 163, 164
HyPer 100, 105, 106

I

İndirgeme potansiyelleri 16
İnflamasyon hipotezi 144
İnflamatuvar bağırsak hastalığı 138
İnfluenza virüsü 190, 191
İnsan immün yetmezlik virüsü 189
İnsan papilloma virüsü 185
İnsülin 32, 132
İnsülin direnci 132
İnterfaz 166
Işık emisyonu 102
İskemi ve reperfüzyon 81, 135
İyonlaştırıcı radyasyon 126

J

Japon ensefalit virüsü 189

K

Kalmodulin 22
Kalori kısıtlaması 144, 145, 151
Kapsid 183
Kararlılık genleri 170
Karboksilaz 17
Karboksilik asit 19
Karbonat radikalleri 18
Karbonik anhidraz 17
Karbon merkezli radikaller 20, 33
Karbon tetraklorür 115
Karotenoidler 60, 61
Karsinogenez 172
Karsinojen 168, 169, 174, 175, 176
Katalaz 17, 43, 56, 57, 78, 81, 84, 88, 90, 93, 99, 100, 172, 191
Katekolaminler 11
Katepsin G 70, 71
Kateşinler 62
Kemilüminesans ve floresans görüntüleme 104
Kemogenetik uygulamaları 106
Kemoterapi 117
Kinolon antibiyotikleri 125
Kinon 60, 117, 118, 123, 126
Kinonlar ve yarı-kinonlar 18
Kinon redüktaz 118
Kistik fibrozis 127, 137
Klorin gazı 121
Koenzim Q 118, 153, 164
Konkanavalin A 69
Kontrol noktaları 167
Kronik yorgunluk sendromu 165
Ksantin oksidaz 11, 90
Ksenobiyotik 32, 114, 118
Kumarin floresansı 97
Kurkumin 62
Kurşun 123, 124

L

Laktoferrin 70, 71
LDL 34, 55, 61, 125, 128, 129, 130, 132
Leptin 131
Lewy cisimcikleri 155
Lipid peroksidasyonu 34, 109, 110
Lipitlerdeki hasar 109
Lipitlerin oksidasyonu 86, 87
Lipit peroksit 20, 34, 46, 77, 82, 84, 132, 178
Lipooksijenaz 11, 57, 63, 89

Litotripsi 18
Lizil oksidaz 17
Lökotrien B4 68
Luminol 104, 110
Lusigenin 98, 105

M

Maillard reaksiyonu ürünleri 77
Makrofaj 11, 30, 129, 136, 194
Malondialdehit 67, 79, 109, 187
Melatonin 57
Mentinol 135
Metastaz 168, 170, 178, 181
Metiyonin 49, 78, 120, 139, 155, 181
Mikonazol 125
Mitojenik sinyaller 166
Mitojenle etkinleşen protein kinaz 73
Mitokondri 13, 30, 31, 48, 76, 79, 89, 119, 133, 136, 142, 145, 147, 148, 151, 157, 158, 160, 163, 164, 178, 188
Mitokondriyal sitokrom oksidaz 11
Mitoz 166
Miyeloperoksidaz 72, 149
Miyoglobin 17, 54, 55, 56, 90
Mn-SOD 41, 81, 84, 92, 103, 151, 188
Moleküler oksijen 8, 13, 14, 15, 101
Monosit 129, 138
MPTP 156, 157
Mutasyon 33, 59, 86, 116, 136, 144, 148, 151, 154, 155, 158, 159, 160 - 162, 164, 168, 170 - 172, 177, 179, 183, 187

N

NADH-KoQ redüktaz 13
NADH oksidaz 54
NADPH oksidaz 11, 15, 74, 75, 76, 77, 85, 88, 124, 129, 134, 136, 149, 155, 160, 164, 173, 178, 184
Naftalin 50
Nekroptoz 28
NF-κB 74, 86, 91, 144
N-hidroksitiyopiridonlar 18
Niemann-Pick C1 hastalığı 165
Nitrasyon 23, 103, 162
Nitrat 101
Nitrat radikali 122
Nitrik oksit 10, 21, 22, 85, 101
Nitrik oksit sentaz 22, 57
Nitrit 22, 102
Nitroblue tetrazolyumu 19
Nitrofurantoin 118
Nitro grupları 118
Nitroksit radikalleri 59
Nitrozo bileşikleri, Nitrosotiyoller 22
N-metil-N-nitrozoguadinler 175
Nod-like reseptörler 67
Nöroendokrin teori 144
Nörofilament proteinleri 23
Nörolojik hastalıklar 153, 154
Nöronal seroid lipofuksinozlar 164
Nörotoksinler 153
Nötrofil 11, 68 - 74, 136, 138, 194

O

Obezite 131
Oksidasyon 11, 32, 62, 67, 77, 78, 81, 86, 87, 102, 106, 124, 125, 137, 165, 193
Oksidatif stres 9, 10, 11, 25 - 30, 32, 33, 34, 41, 42, 44, 55, 65, 79, 80, 81, 83, 87, 91, 93, 107, 115, 117, 119, 120, 125, 127, 128, 129, 131, 132, 134, 135, 136, 137, 140, 141, 142, 145, 146, 148, 154, 158, 167, 168, 174, 177, 180, 182, 184, 185, 186, 188, 189, 191, 192, 194
Oksijenli yaşam 12, 38, 93
Ölümcül hata teorisi 143
Onkogenler 143, 170
ORAC (Oksijen radikali absorbsiyon kapasitesi) yöntemi 112
Organik çözücüler 19
Östrojen 32, 175
Otofaji 36, 150
Otoimmün hastalıklar 137
Otooksidasyon 11, 15, 16, 37, 98
OxyR 100, 106
Ozon 10, 12, 122
Ozonoid 122

P

p38 73, 188, 189, 191
p53 proteini 167, 171, 172
PAMP 67, 136
Parakuat 116, 156
Parasetamol 50
Parkinson hastalığı 154, 155, 156
PBN 96
Peroksil radikali 19, 60
Peroksinitrit 10, 22, 66, 102, 103
Peroksiredoksin 53, 181, 186
PINK1 proteini 157
Polien antifungal antibiyotikler 125
Polifenol 62, 79, 87
Poliklorobifenil 19
Proliferasyon 76
Pro-oksidan 56, 57, 173, 184, 185
Prooksidan 25, 78, 80, 88
Prostasiklin sentaz 23
Proteazom 36, 81, 88, 141, 150, 154, 155, 157, 158, 162, 163
Protein-disülfit izomeraz 52
Protein hasarı 35
Protein karbonil düzeyleri 132
Protein kinaz 11, 28, 31
Protein kinaz A 73
Protein kinaz G 73
Protein nitrasyonu 103
Protein peroksitleri 20
PTEN2 174

R

Radyasyon 11, 18, 25, 94, 126, 127, 171
Radyoterapi 176
Reaktif azot türleri 9, 103, 129
Reaktif halojen türleri 103
Reaktif kükürt türleri 9
Reaktif oksijen türleri 9, 11, 14, 15, 34, 107, 115, 123, 134, 141, 172, 174, 177, 178, 194
Reaktif türlerin kimyası 15
Redoks düzenleme 30
Redoks reaksiyonları 30
Resveratrol 62
Retiküloendotelyal sistem 56, 81, 185
Retinol 61
Rett sendromu 165
Ribonükleotit redüktaz 21, 41, 66
RNA polimeraz 17
Romatoid artrit 137

S

Salisilat 73, 97
Şaperon 52
Selenoprotein 49, 180
Selenyum 49, 123, 139
Semikinon 117, 118, 175
Senescent cell antigen 82
Serbest radikal 9, 11, 14, 16, 23, 57, 58, 59, 79, 83, 87, 89, 90, 91, 93, 94, 101, 104, 109, 110, 112, 113, 121, 123, 125, 140, 142
Serbest radikal kaynakları 11
Serbest radikal teorisi 142, 145
Sigara dumanı 11, 12, 129
Siklin 167
Siklin-bağımlı protein kinaz 167
Siklooksijenaz 11, 110
Singlet oksijen 10, 104
Sistein 179
Sistein kalıntıları 73
Sitokin 52, 53, 68, 70, 83, 86, 144, 191, 192, 194
Sitokin fırtınası 194
Sitokrom c 98, 99, 189
Sitokrom oksidaz 13, 17, 55, 99
Sitokrom P450 enzimleri 114
Sitokrom P450 redüktaz 118
Solunum sinsitiyal virüsü 190
Somatik mutasyon teorisi 144
Spin etiketleme 95, 96
Spin tuzakları 95, 101, 104
Stres 12, 31, 84, 126, 144, 146
Stres kaynaklı yaşlanma 144
Süksinat dehidrojenaz 17
Sülfür dioksit 19
Süperoksit anyonu 11, 14, 19, 105
Süperoksit dismutaz enzimi 84
Süperoksit radikali 11, 66, 72, 89, 102, 117, 120, 126, 133, 189, 191
Süperoksit redüktazlar 42

T

Tau proteini 160
Tek hücreli jel elektroforezi 108
Tekli oksijen 59
Telomer 141, 143, 147
TEMP, TEMPD 104
Termodinamik 15, 16
Tetraklorometan 19
Tetrasiklin 125
Tiroid peroksidaz 75
Tirozil radikali 20, 66
Tiyil radikalleri 24
Tiyobarbitürik asit (TBA) testi 110
Tiyol 79, 152
Tiyol grupları 79, 116, 179
Tiyol peroksidaz 101
Tiyoredoksin 32, 49, 179, 180, 181, 188, 189
Toksikoloji 114
Toll-like reseptörler 67
TP-FRIM, TP-FLIM 105
TRAP (toplam (peroksil) radikal yakalama antioksidan parametresi) yöntemi 112
Triklorometil radikali, Triklorometilperoksil 115
Triptofan 23
Triptofan dioksijenaz 11
Triptofan ile reaksiyon 98
Trombosit aktive edici faktör 68
Tromboz 129
Tümör 86, 124, 169, 170, 185
Tümör baskılayıcı genler 170, 179

U

Ubikitin 91, 155, 162, 163
Ülseratif kolit 138
Ultrason 18
Ürat 39, 43, 60, 67, 73, 83, 99, 122, 149
Uzun yaşam genleri 144

V

Virüs 190, 191, 192

Y

Yaşlanma mekanizmaları, Yaşlanama teorileri 140
Yaşlanma ve antioksidanlar 152

Z

Zarf 183
Zar hipotezi 144
Zellweger sendromu 165

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Sağlık bilimleri ve yaşam bilimleri alanlarında çalışan ve serbest radikaller ile antioksidanlar konusuna ilgi duyan araştırıcılara yol gösterici ve temel bir kaynak olmasını dilediğimiz kitabımızda; kısa bir giriş bölümünden sonra serbest radikal kimyası, oksidatif stres, antioksidanlar, reaktif türlerin yararlı ve zararlı etkileri, ölçüm yöntemleri, yaşlanma ve nörolojik hastalıklar, kanser ve viral enfeksiyonlar ile ilgili bölümler yer almaktadır.

MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

E-ISBN 978-975-400-455-7

9 789754 004557

MARMARA UNIVERSITY PRESS