

DENEY NO: 7
LİPİD PEROKSİDASYON

A) Genel Bilgi:

Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller hakkında genel bilgi:

Serbest radikal, bir veya daha fazla sayıda eşlenmemiş elektron taşıyan, bağımsız bulunabilme yeteneğine sahip olan yapı olarak tanımlanabilir. Kural olarak, serbest radikal, eşlenmemiş elektronunu diğer bir elektronla eşleştirmek ister; bu nedenle de, diğer bir molekülle reaksiyona girer. Reaktif oksijen bileşikleri, hem oksijen radikalleri hem de radikal olmayan O₂ türevleri için kullanılan genel bir terimdir.

Biyolojik sistemlerde, serbest radikallerin başlıca kaynakları, sitokrom P-450 sistemi, mitokondrial oksidasyon, metabolik ürün olarak hidrojen peroksit üreten peroksizomlardaki enzimleri kapsayan yollar tarafından moleküler oksijenin indirgenmesidir; bunun yanında, enflamasyon prosesi de radikallerin oluşmasına katkıda bulunur.

Çizelge 1. Serbest radikallere ve reaksiyonlarına örnekler

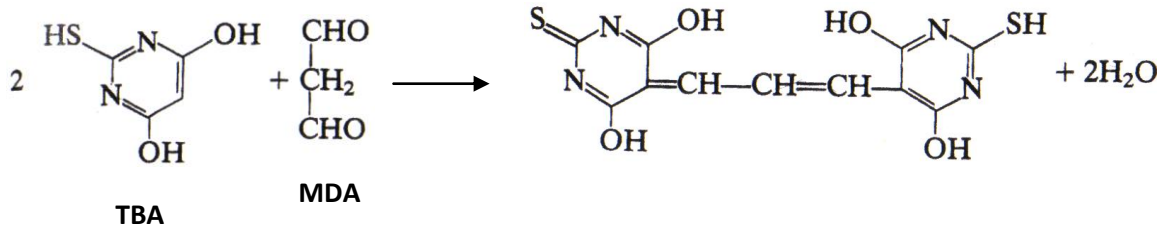
Serbest Radikal	Formül	Özellikler
Hidrojen atomu	H [•]	En basit serbest radikal
Triklorometil	CCl ₃ [•]	Karbon merkezli bir radikaldir (yani, eşlenmemiş elektron, karbon üzerindedir). CCl ₄ 'ün metabolizması sırasında oluşur ve CCl ₄ 'ün toksik etkilerine katkıda bulunur. Karbon merkezli radikaller, genellikle, O ₂ ile hızla reaksiyona girer ve peroksil radikallerini oluşturur. CCl ₃ [•] + O ₂ → CCl ₃ O ₂ [•]
Süperoksit	O ₂ ^{•-}	Oksijen merkezli bir radikaldir.
Hidroksil	[•] OH	Reaktivitesi yüksek, oksijen merkezli bir radikaldir; tüm biyomoleküllere atak yapar.
Peroksil, Alkoksil	RO ₂ [•] , RO [•]	Organik peroksitlerin yıkımı ve karbon radikallerinin O ₂ ile reaksiyonu sırasında oluşan oksijen merkezli radikallerdir.
Nitrojen oksitler	NO ₂ [•] , NO [•]	Nitrik oksit, L-arjinin'den <i>in vivo</i> olarak oluşmaktadır; nitrojen dioksit ise NO [•] 'nin O ₂ ile reaksiyonuyla meydana gelir. Her ikisi de, kirli havada bulunur ve organik materyallerin yanması sonucu (örneğin, sigara dumanı) açığa çıkan dumanda bulunur.
Geçiş metal iyonları	Fe, Cu vb.	Oksidasyon basamağını bir basamak değiştirebilme yeteneği, tek elektron almalarına/vermelerine olanak verir; dolayısıyla da, serbest radikal reaksiyonlarının güçlü katalizleyicileridir.

Lipid Peroksidasyon: Hidroksil radikali gibi son derece reaktif olan radikaller, çoklu doymamış yağ asitlerine atak yaparak metilen ($-\text{CH}_2-$) grubundan bir hidrojen atomu kopmasına ve bu şekilde lipid peroksidasyonun başlamasına neden olur. Yağ asidi zincirinde çift bağ sayısı arttıkça, hidrojen atomu koparılması kolaylaştığı için, çoklu doymamış yağ asitleri peroksidasyona çok duyarlıdır. Hidrojen atomu, bir elektron alarak molekülden ayrıldığında, yağ asidinin karbonunda tek elektron kalır; çift bağa komşu karbon atomundaki C-H bağındaki zayıflamanın giderilmesi amacıyla, karbon-merkezli radikal konjuge dien oluşturur. Konjuge dien, oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil radikali ($\text{LOO}\bullet$) meydana gelmesine neden olur; bu basamakta oluşan lipid radikali, başka bir yağ asidinden hidrojen atomu kopararak bir zincir reaksiyonu başlatması sebebiyle önem taşımaktadır. Peroksil radikalleri, $\bullet\text{OH}$ 'ne göre daha az reaktif özellik gösterir; ancak, biyosistemlerde daha uzak bölgelere ulaşabilirler. Peroksil radikalleri, kendi aralarında reaksiyon verebileceği gibi, membran proteinlerine atak yapabilir veya komşu yağ asidi zincirinden hidrojen atomu kopararak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunun ilerlemesine yol açabilir.

Biyolojik membranlardaki lipid peroksidasyon, membran akışkanlığının ve membran potansiyelinin azalması, H^+ ve diğer iyonlara permeabilitenin artması ve organel veya hücre bütünlüğünün bozulmasına yol açabilir. Oluşan serbest radikaller ($\text{LO}\bullet$, $\text{LOO}\bullet$) ve elektrofilik ürünler (örneğin, 4-hidroksinonenal), yakınlarında bulunan membran proteinleri ile reaksiyon verebilecekleri gibi, difüze olarak DNA gibi uzaktaki moleküllerle de reaksiyon verebilir.

Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Ölçülmesi

Lipid peroksidasyonun göstergesi olarak, malondialdehit düzeylerinin tayini için Ohkawa ve ark. (1979) tarafından bildirilen spektrofotometrik yöntem esas alınacaktır. Yöntemin temeli, biyolojik materyalde, peroksida lipidlerin yıkım ürünü olan malondialdehitin tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonu sonucunda oluşan **pembe** renkli ürünün miktar tayinidir (Şekil 1).



Şekil 1. TBA'nın MDA ile reaksiyonu

Çözeltilerin Hazırlanışı:

- **% 0.8 Tiyobarbitürik asit:** 100 mL için, TBA'nın saflık derecesi de dikkate alınarak 0.8 g saf TBA bulunacak şekilde tartılır. Çözünmenin kolaylaştırılması amacıyla, bazik ortam veya ısı uygulanması yararlı olabilir.
- **%20 Asetik asit çözeltisi:** Mezürle 20 mL asetik asit alınır, çeker ocak altında distile su eklenir (yaklaşık 80 mL olacak şekilde). Çözeltinin pH'ı 3.5'e ayarlanır (NaOH çözeltisi ile) ve toplamda 100 mL olacak şekilde hacim tamamlanır.
- **%8.1 Sodyum dodesil sülfat:** 10 mL içinde 0.81 g olacak şekilde tartılır ve üzerine 7 mL kadar distile suda eklenir. Köpürmeyi engellemek için, bir süre bekletilir, daha sonra

hafifçe karıştırılır ve çözüldükten sonra 10 mL'ye tamamlanır. Pipetleme sırasında da, köpürmemesine dikkat edilmelidir.

Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması:

Deneyde kullanılacak olan çözeltilerden aşağıda belirtilen miktarlarda alınarak bir cam şişede karıştırılır. Bu şekilde, her bir tüpe ayrı ayrı pipetleme yapmak yerine, kullanılacak tüp sayısından 1 fazlası dikkate alınır ve sonuçta her tüpte bulunması gereken toplam hacim "çalışma çözeltisi"nden alınarak her bir tüpe pipetlenir. Örneğin, 7 örnek ve 2 kör (blank) ile çalışılacaksa, 9 tüp kullanılacak demektir. Bunun bir fazlası hesaplanır: 10 adet tüple çalışıldığı düşünülür. Her tüpte bulunması gereken reaktif hacmi, 10 ile çarpılır.

Çözeltiler	Her bir tüpe ilave edilmesi gereken çözelti miktarı (mL)	X	Çalışma çözeltisi için gereken miktar (mL)
% 0.8 Tiyobarbitürik asit	0.75	10	7.5
%20 Asetik asit çözeltisi	0.75	10	7.5
%8.1 Sodyum dodesil sülfat	0.1	10	1
TOPLAM HACİM	1.6	----	16

Bu çalışma, kapaklı cam tüplerde yapılır.

- Her bir tüpe; \Rightarrow 1.6 mL çalışma çözeltisi,
 \Rightarrow 0.1 mL örnek veya standart pipetlenir.
- Kör tüpü hazırlanmasında, örnek/standart yerine, homojenizasyon için kullanılan %1.15 KCl çözeltisi kullanılır. Kör tüpü, diğer örneklerin iki katı hacimde hazırlanır.
- Tüplerin ağzı kapatılır; kaynar su banyosunda 30 dakika tutulur. Tüpler, süre sonunda soğutulur.
- Absorbanslar, köre karşı 532 nm'de okunur.
- Standartlar yardımıyla oluşturulan kalibrasyon grafiğinin denklemini bulunur. Bu denklem, eğim (**m**) hesaplamada kullanılır.
- "**(A₅₃₂ / m) x dilüsyon faktörü**" formülü yardımıyla hesaplama yapılır.

Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması:

- Kalibrasyon grafiğinin hazırlanmasında, standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksi propanın asit hidrolizi ile elde edilen malondialdehit kullanılır.
- 1 mM konsantrasyonda stok çözeltilerden hareketle, farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler (örneğin, 2.5, 5, 10 nmol) hazırlanarak, reaksiyon sonrasında absorbansları, örneklerde olduğu gibi 532 nm'de ölçülerek kalibrasyon grafiğine işlenir. Kalibrasyon denklemini yardımıyla, absorbansı bilinen örneklerin konsantrasyonları hesaplanır.

Doku Homojenatlarının Hazırlanması: (bu işlem, önceden yapılmıştır; ek bilgi olarak verilmektedir)

Doku örneklerinden %10'luk homojenat hazırlanması amacıyla, her bir örnekten tam olarak 100'er mg tartılır ve üzerlerine 0.9 mL %1.15 KCl çözeltisi ilave edilip, özel cam tüp içinde teflon başlık yardımıyla homojenize edilir. Bu işlem, buz içinde gerçekleştirilir. Homojenatlar, 1000g'de 10 dakika süreyle santrifüjlenir ve süpernatant alınır; kullanılıncaya kadar buz içinde saklanır.