

DOI: <https://doi.org/10.28942/atuju.v5i1y2025.116>

TOKSİKOLOGİYADA ANTİOKSİDANT FƏALLIQ VƏ TƏYİNİ SINAQLARI

Qarayev E.A., Paşayeva S.A., Hüseynquliyeva K.F., Nəsirli İ.Ü.

Azərbaycan Tibb Universiteti, Əczaçılıq toksikologiyası və kimya kafedrası

E-mail: eldargar@mail.ru

Xülasə

Məqalədə orqanizmdə toksik maddələrin təsirindən oksidləşmə-reduksiya reaksiyaları nəticəsində sərbəst radikal – antioksidant tarazlığın pozulması və sərbəst radikalların artıq miqdarda toplanaraq oksidativ stress yaratması qeyd edilir. Sərbəst radikalların təsirindən orqanizmin toxumalarının qorunması üçün orqanizmə xaricdən antioksidant fəallıqlı maddələrin daxil edilməsi ehtiyacları göstərilir. Qəbul edilən bioloji fəal maddələrin antioksidant fəallıqlarının ölçülməsi məqsədilə istifadə edilən sınaqlar (ORAC, HORAC, TRAP, CUPRAC, FRAP, Folin – Çiokalto, ABTS (TEAC) və DPPH testləri), həmin sınaqların aparılma qaydaları və mahiyyəti təsvir olunur.

Açar sözlər: antioksidant, sərbəst radikal, oksidativ stress, ORAC, HORAC, TRAP, CUPRAC, FRAP, Folin – Çiokalto, ABTS (TEAC) və DPPH testləri

GİRİŞ

Oksigen həyat üçün vacib elementdir. Hüceyrələrin enerji əldə etmək üçün mitoxondrilərdə ATF istehsalı prosesində oksigen sərf etdikləri zaman sərbəst radikallar yaranır. Sərbəst radikallar hüceyrə oksidləşmə-reduksiya reaksiyaları nəticəsində yaranan oksigen (ROS – *Reactive Oxygen Species*) və azotun (RNS – *Reactive Nitrogen Species*) fəal formalarıdır. Sərbəst radikallar orqanizmdə ikili

rol oynayır, yəni eyni zamanda həm toksik və həm də qoruyucu təsir göstərir. Onlar orqanizmin sağlamlığını təmin edən bir çox zəruri funksiyalara malikdirlər. Belə funksiyalara hüceyrələrin mayalanması və inkişafı, prostoqlandirlərin və nuklein turşularının biosintezi, toksik məhsulların orqanizmdən uzaqlaşdırılması, bakteriya, virus, şiş hüceyrələrindən qorunma və s. aid edilə bilər. Sərbəst radikal olan oksigenin fəal forması “toxuma tənəffüsü” kimi xarakterizə olunan hüceyrələrin normal metabolizminin təmin

olunmasında mühüm əhəmiyyətə malikdir. Normal aerob metabolizm və ya bakteriya və virus hücumu zamanı, həmçinin ksenobiotiklərin metabolizmində faqositlərin oksidləşdirici aktivləşməsi baş verərkən hüceyrələr tərəfindən oksidləşdiricilər istehsal olunur, beləliklə orqanizmin müdafiəsi təmin olunur.

Lakin sərbəst radikalların orqanizmdə normadan artıq miqdarda yaranması toxuma zədələnməsi, iltihab və neyrodegenerativ xəstəliklər kimi müxtəlif patoloji proseslərin əmələ gəlməsinə gətirib çıxarır. Normadan artıq yaranmış sərbəst radikallar orqanizmdə sərbəst radikal – antioksidant tarazlığının pozulmasına səbəb olur və nəticədə oksidativ stress əmələ gəlir. Oksidativ stress isə lipid, zülal, nuklein turşuları kimi vacib molekulların geri dönməz zədələnmələrinə səbəb ola bilər. Hüceyrələrdə oksigen metabolizmə uğrayaraq oksigenin potensial zərərli təsirə malik aktiv formalarına çevrilir. Proseslərin normal vəziyyətlərində oksidləşdiricilərin yaranma sürəti və amplitudası onların xaric olma sürətləri ilə tarazlaşdırılır. Lakin prooksidant və antioksidant tarazlığı pozulduqda ROS-un bioloji hüceyrələrdə artıq miqdarının toplanılması baş verir və oksidativ stress inkişaf edir. Oksidativ stress nəticəsində yaranan ROS-un aktiv məhsulları – hidrogen peroksid və hidroperoksidlər orqanizmin antioksidant müdafiə gücünü tükədərək lipidlərin peroksid oksidləşməsinə stimullaşdırır, hüceyrə membranının tamlığını pozur və nuklein turşularını (DNT və RNT) oksidləşdirir ki, nəticədə hüceyrə ciddi zədə alır. Xərçəngin müxtəlif növləri, diabet, arterial hipertenziya, ateroskleroz, DNT kodunda dəyişiklik, kəskin böyrək çatışmazlığı, Alsheymer, Parkinson, xora, artrit, kardiovaskular və s. xəstəliklərin yaranma səbəbi kimi sərbəst radikalların zərərli təsiri göstərilir. Həmçinin, sərbəst radikalların

orqanizmdə tədricən toplanılması qocalma prosesinin sürətlənməsinə səbəb olur. Müxtəlif toxumalarda, o cümlədən beyin, ürək və qanyaradıcı orqanların toxumalarında iltihabi proseslər sürətlənir.

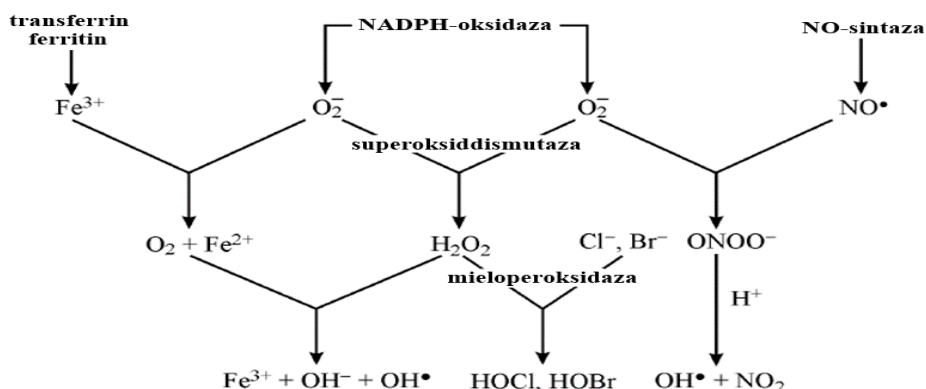
SƏRBƏST RADİKALLAR

Sərbəst radikallar xarici elektron təbəqəsində bir və ya bir neçə cütləşməmiş elektrona malik kimyəvi hissəciklərdir. Radikallarda cütləşməmiş elektron nöqtə (●) ilə işarə olunur. ROS sərbəst radikallara hidroksil ($\text{OH}^\bullet$), superoksid ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroksid ($\text{ROO}^\bullet$), alkoksid ($\text{RO}^\bullet$), hidroperoksid ($\text{HO}_2^\bullet$) və lipid peroksid ($\text{ROO}^\bullet$) aid edilir. RNS sərbəst radikallara isə azot oksid ($\text{NO}^\bullet$), azot dioksid ($\text{NO}_2^\bullet$) aiddir. Bununla yanaşı, hidrogen peroksid (H_2O_2), ozon (O_3), sinqlet oksigen ($^1\text{O}_2$), hipoxlorit turşusu (HOCl), nitrit turşusu (HNO_2), peroksinitrit (ONOO^-), nitrit xlorid (NO_2Cl), diazot trioksid (N_2O_3), lipid peroksid (LOOH) sərbəst radikal deyildir və ümumi şəkildə oksidləşdirici adlanırlar, lakin canlı orqanizmdə asanlıqla sərbəst radikal əmələ gətirməyə qadirdirlər [1]. Xarici təbəqəsində cütləşmiş elektrona malik atomlar stabil olurlar, lakin cütləşməmiş elektronlu atomlar, yəni xarici elektron orbitallarında tək elektronları olan atomlar qeyri-stabil və reaksiyaya həris olurlar. Belə atomlar çatmayan elektronlarını bərpa etmək üçün qonşu qeyri-radikal atomların elektronlarını ya mənimsəyirlər və yaxud xarici təbəqədəki tək elektronunu onlara ötürməklə özlərini stabilləşdirirlər. Proses orqanizmdə baş verdiyi üçün qonşu atom canlı toxuma ola bilər və belə halda toxuma, öz elektronunun sərbəst radikal ilə mübadiləsindən sonra zədələnir. Sonra həmin toxuma molekulu öz stabilliyini təmin etmək üçün digər qonşu molekul ilə

elektron mübadiləsi edir, özündə çatmayan elektronu qonşu toxumadan, məs., hüceyrə membranının ikiqat təbəqəsində olan molekuldan qoparmağa və ya öz artıq elektronunu qonşu molekula ötürməyə çalışır. Nəticədə ikincili sərbəst radikal yaranır və beləliklə, toxuma molekullarının zəncirvari zədələnməsi davam edir. Proses uzunmüddətli olduqda oksidativ stress inkişaf edir, məruz qalan hüceyrələrin tamlığı pozulur və sonda həmin hüceyrələr məhv olurlar.

Sərbəst radikallar orqanizmdə daxili (təbii) və xarici (yad) olmaqla iki yolla əmələ gəlirlər [2]. Orqanizm daxilində ROS və RNS kimi sərbəst

radikalların yaranması hüceyrə fəaliyyəti və təbii maddələr mübadiləsi nəticəsində baş verir. Hüceyrələrdə sərbəst radikallar fermentativ və qeyri-fermentativ reaksiyalarla yaranma bilirlər. Müxtəlif funksiyalara malik hüceyrələrin həyat fəaliyyətində oksidləşmə-reduksiya reaksiyaları mühüm əhəmiyyətə malikdir və bu reaksiyalar nəticəsində artıq miqdarda sərbəst radikalların yaranması müşahidə oluna bilər. Hüceyrə sistemləri (NADPH, ksantinoksidaza, Sitoxrom P450 fermentləri) sərbəst radikallar yarada bilirlər (Şək. 1). Əksər məməlilərin hüceyrələrində sərbəst radikal xassəli reaktiv oksigenin müxtəlif formalarının yaranması mitoxondrilərdə baş verir [3].



Şək. 1. Bioloji sistemlərdə OH-radikalların və hipohalogenidlərin yaranmasına səbəb olan əsas proseslər

Sərbəst radikalların orqanizmdə yaranmasında digər yol isə xarici mühit amillərinin təsirindən baş verən prosesdir. Tütün tüstüsünə, rentgen şüalarına, mikrodalğa şüalanmasına, vulkan qazlarına, zərərli qazlara (xloroform, xlorlu törəmələr), radioaktiv şüalanmaya, kosmetik vasitələrə, meşə yanğınlarına, alkoqoldan mütəmadi və çox istifadəyə, bəzi dərman preparatlarının qəbuluna, günəş şüalarının zərərli təsirinə məruzqalma nəticəsində orqanizmdə sərbəst radikalların artıq miqdarda toplanılması baş verir. Həmçinin, sərbəst radikalların toplanılmasına qidaya konservant kimi əlavə edilmiş kanserogen maddələr (nitritlər, nitratlar), bitki yağlarının həddən artıq qızdırılması nəticəsində yaranan peroksid və

politsiklik aromatik karbohidrogenlər də səbəb ola bilər.

Sərbəst radikalların yaranmasında ksenobiotiklərin rolu böyükdür. Ksenobiotiklərin metabolizmi zamanı orqanizmi onların zərərli təsirindən qorumaq üçün qaraciyərdə gedən detoksikasiya prosesində qlütation (GSH) aktiv fəaliyyət göstərir, ksenobiotiklərlə birləşərək onların orqanizmdən uzaqlaşmasını təmin edir. Bu prosesə GSH-ın çox hissəsi sərf olunaraq tükənir və antioksidant fəaliyyətini yerinə yetirmək üçün onun miqdarı kifayət etmir. GSH-ın iki növü vardır – reduksiya olunmuş (GSH) və oksidləşmiş qlütation (GSSG).

Reduksiya olunmuş qlütation (GSH) əhəmiyyətli antioksidant kimi təsir göstərir və sərbəst radikalları aktiv şəkildə neytrallaşdırır. Oksidlənmiş qlütation (GSSG) isə bir GSH ilə digər GSH molekulunun qlütationperoksidaza fermentinin iştirakı ilə birləşməsi nəticəsində yaranır. Adətən, hüceyrələrdə olan qlütationun 90%-ni reduksiya olunmuş forma (GSH) və 10%-ni isə oksidlənmiş forma (GSSG) təşkil edir ki, o, da qlütationreduktaza fermenti təsirindən reduksiya olunmuş qlütationa çevrilə bilər. Oksidativ stress zamanı reduksiya olunmuş GSH bu prosesa sərf olunduğundan hüceyrələrdə oksidlənmiş qlütationun miqdarı reduksiya olunmuş qlütationa nisbətən artıq olur.

Tədqiqatlar nəticəsində müəyyən edilmişdir ki, ksenobiotiklərin orqanlara – böyrək, qaraciyər, sinir və ürək-damar sisteminə zərərli təsirlərinin yaranması mexanizmi oksidativ stress ilə əlaqədardır. Qeyri-steroid iltihab əleyhinə dərman preparatlarının, xərçəng zamanı istifadə edilən kimya terapiyanın, antipsixotik təsirli preparatların toksiklikləri oksidativ stress yaratmaları ilə əlaqələndirilir. Dərman preparatlarının oksidativ stress yaratma mexanizmləri fərqlidir. Bəzi preparatlar molekulyar oksigeni reduksiya etməklə oksigenin sinqlet oksigen və superoksid kimi aktiv formalarını əmələ gətirən reaktiv aralıq məhsullar yaradırlar, digərləri isə birbaşa hüceyrələrdə oksigenin aktiv formalarının miqdarının artmasını stimullaşdırırlar [4].

ANTIOKSIDANTLAR

Antioksidantlar qida məhsullarında və insan orqanizmində rast gəlinən və aşağı qatılıqda tapılan maddələrdir [5]. Onlar orqanizmdə baş verən oksidləşmə proseslərinə nəzarət edir və ehtiyac yarandıqda bu reaksiyaları inhibə edirlər. Antioksidantlar elektron donoru xassəsinə malik kimyəvi birləşmələrdir. Onlar sərbəst radikalların patoloji təsirini

zərərsizləşdirir və insan orqanizminin müdafiəsini həyata keçirirlər. Antioksidantlar elektron verdikdən sonra özləri sərbəst radikala çevrilmirlər və stabil vəziyyətdə qalırlar. Antioksidant xassəyə malik molekullar orqanizmdə endogen yolla yarana bilər və ya xaricdən qida məhsulları ilə ekzogen yol ilə daxil ola bilərlər. Antioksidant xassəli əsas fermentlərə superoksid dismutaza (SOD – *Superoxyde Dismutase*), catalaza (CAT – *Catalase*) və qlütation peroksidaza (GSH-Px – *Glutathion Peroxydase*) aid edilir. SOD superoksid anionu CAT və GSH-Px üçün substrat olan hidrogen peroksidə (H_2O_2) çevirir. Catalaza H_2O_2 -ni suya və oksigenə metabolizmə uğradır, GSH-Px isə H_2O_2 -ni və eləcə də üzvi hidroperoksidləri GSH ilə reaksiya vasitəsilə reduksiya edir. Həmçinin, metallarla birləşmə əmələ gətirən zülallar (ferritin, laktoferrin, albumin), tiol qrupu saxlayan amin turşular (sistein), ubixinol, lipoy turşusu, sidik turşusu, superoksidreduktaza və s. antioksidant xassəyə malikdirlər.

Ekzogen antioksidantlara vitaminlər (A, E, C), makro- və mikroelementlər (selen, mis, sink, maqnezium), karotinoidlər (beta-karotin, likopin, beta-kriptoksantin), stilbenlər (rezveratrol), polifenollar, flavonoidlər, taninlər, kumarinlər, antosianlar, liqnanlar və s. aiddir. Ekzogen antioksidantlardan sayılan E və C vitaminləri orqanizmin hüceyrə zarlarında (membranlarında), həmçinin hüceyrə xarici və hüceyrə daxili mayelərdə rast gəlinir. Onlar ROS ilə reaksiyaya girərək sonuncuları inhibə edir və ya neytrallaşdırırlar. Membranların daxili hidrofob lipid sahələrinə müxtəlif antioksidantlar təsir edirlər. Yağlarda həll olan E vitamini bu mühit üçün çox əhəmiyyətli antioksidantdır və membranın təmizliyini qorunmasını təmin edir.

Yağlarda həll olan antioksidantlar bioloji membranlarda polidoymamış yağ turşularının peroksid oksidləşməsinin qarşısının alınmasında böyük əhəmiyyətə malikdirlər.

Suda həll olan antioksidantların (C vitamini) hidrofil mühitdə ROS-un neytrallaşdırılmasında müstəsna əhəmiyyətləri vardır.

1. Antioksidant fəallığı yoxlanılması. Kimyəvi birləşmələrin antioksidant fəallığının qiymətləndirilməsi üçün spektrometrik, elektrokimyəvi analiz və s. üsullardan istifadə edilir [6]. Spektrometrik üsullara oksigen radikalı udma bacarığı (ORAC – *Oxygen Radical Absorption Capacity*), hidrosil radikalı antioksidantlıq bacarığı (HORAC – *Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity*), ümumi peroksid radikal tutma antioksidant parametri (TRAP – *Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter*), misi reduksiyaedici (misin reduksiyası) antioksidant qüvvə (CUPRAC – *Cupric Reducing Antioxidant Power*), dəmiri reduksiyaedici (dəmirin reduksiyası) antioksidant qüvvə (FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power*), kalium-ferrisianidi reduksiyaedici (kalium-ferrisianidin reduksiyası) qüvvə (PFRAP – *Potassium Ferricyanide Reducing Power*), 2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfon turşusu (ABTS), difenil pirilhidrazil radikal (DPPH – [2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl] və flüorimetrik analiz aiddir. Elektrokimyəvi analiz üsullarına voltammetriya, amperometriya və biamperometriya aid edilir.

Spektrometrik üsullarla təyinatın mexanizmində kimyəvi reaksiya nəticəsində baş verən dəyişikliyin qeyd edilməsi dayanır. Kimyəvi reaksiyaların aparılması iki prosesə əsaslanır: hidrogen atomu ötürülməsi (HAT – *hydrogen atom transfer*) və tək elektronun ötürülməsi (SET – *single electron transfer*).

Hər hansı bir üsulun istifadəsi ilə əldə edilən nəticələrin dürüstlüyünün müəyyənəşdirilməsi üçün alınan nəticələrin statistik işləmələri yerinə yetirilir.

2. Hidrogen atomunun ötürülməsinə əsaslanan testlər (HAT). Antioksidant aktivliyin HAT mexanizmini fenolun (Ar-OH)

hidrogen atomunun (H) peroksid radikala ötürülməsi reaksiyası təşkil edir:



burada, fenol (Ar-OH) ilə peroksid radikalın (ROO[•]) reaksiyası nəticəsində yaranan ariloksil radikal (ArO[•]) rezonansla stabilləşir, AH isə qorunan biomolekullardır.

HAT-əsaslı testlərin tipik nümunələri kimi oksigen radikalı udma bacarığı (ORAC), ümumi peroksid radikal tutma antioksidant parametri (TRAP) və ümumi oksiradikal tutma bacarığı (TOSC – *Total Oxyradical Scavenging Capacity*) sınaqlarıdır.

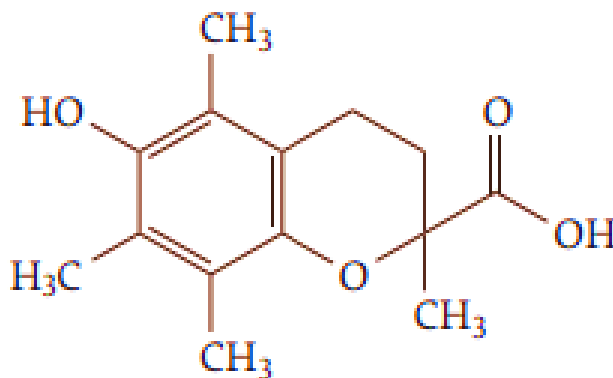
2.1. ORAC testi. Antioksidant aktivliyin təyin edilməsində istifadə olunan geniş yayılmış sınaqdır. İlk dəfə Q.Kao tərəfindən təklif edilmişdir. ORAC testlər peroksid radikalın oksidləşməsinin qarşısının alınmasına nəzarət etməklə antioksidantlar tərəfindən radikal zəncirvari reaksiyanın parçalanma qabiliyyətini ölçür. Peroksid radikallar bioloji sistemlərdə lipidlərin oksidləşməsi zamanı, həmçinin fizioloji şəraitdə qida məhsullarında üstünlük təşkil edir və sərbəst radikallar kimi xarakterizə olunur. ORAC sınaqlar antioksidant effektivliyi üçün bir meyar kimi dəyərləndirilir.

Bu analizdə istifadə edilən peroksid radikal generatorlarını azobirləşmələr təşkil edir. Bu azobirləşmələrə lipofil α,α,-azobisizobutironitril (AIBN), 2,2'-azobis(2-amidinpropan) xlorhidrat (ABAP), 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (AMVN) və hidrofil 2,2'-azobis(2-amidinpropan) dihidroxlorid (AAPH) aid edilir.

ORAC testinin mexanizmi flüoressensiyanın intensivliyinin reaksiyanın getmə müddətindən asılılığını ölçməyə əsaslanır. ORAC testinə əsasən generator tərəfindən emissiya edilən peroksid radikal flüoressent nümunə ilə reaksiyaya daxil olur, bu zaman onun flüoressensiyasının itməsi baş verir ki, proses flüorimetrdə qeydə alınır. Bu üsulda antioksidantın mövcud olub olmamasına əsasən

kalibrə qrafikində əyrialtı sahə ölçülür. Antioksidant aktivliyin miqdarca qiymətləndirilməsi antioksidant mövcudluğu və yoxluğu ilə əldə olunan iki əyrialtı sahənin ölçülməsi ilə yerinə yetirilir. Etalon kimi adətən

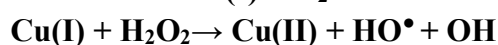
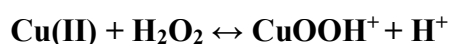
troloks antioksidant standartından istifadə edilir və antioksidantlar tərəfindən qiymətləndirilən ORAC göstəricisi troloksun ekvivalenti kimi təsvir edilir. Troloks E vitamininin suda həll olan analogudur (Şək. 2).

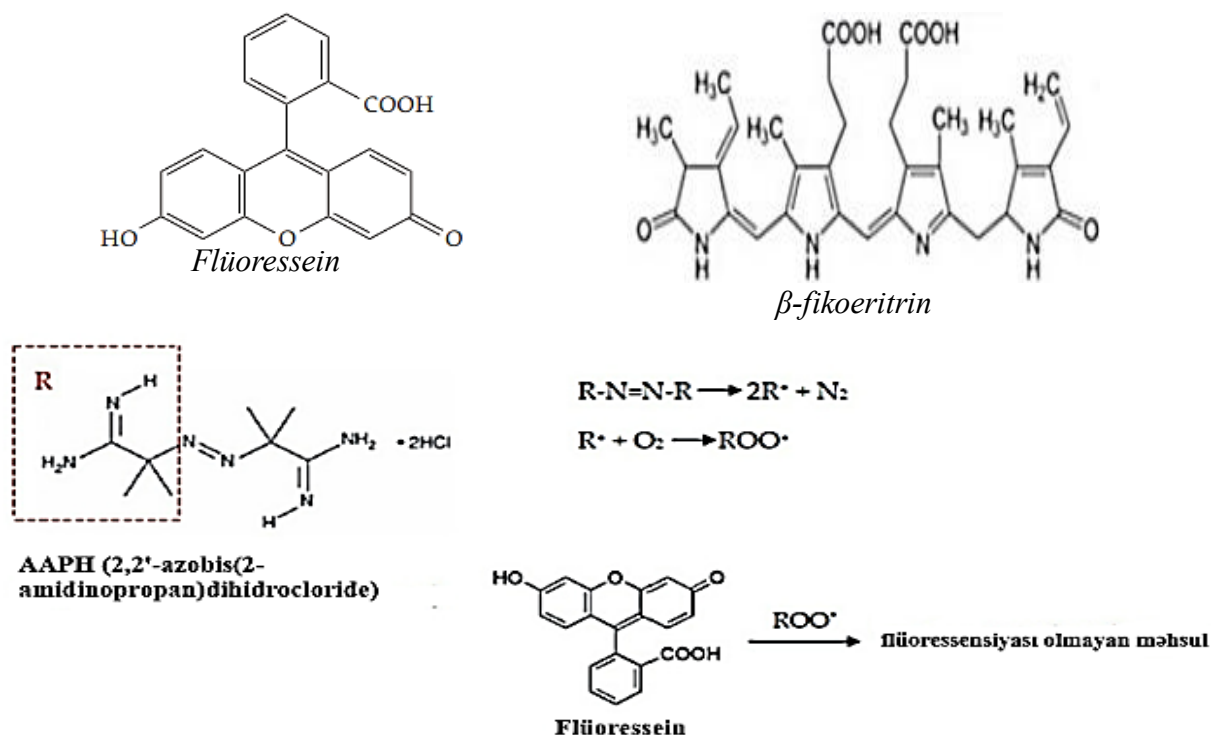


Şək.2. Trolok

Çox zaman hidroksil radikalı generatoru kimi H_2O_2 - CuSO_4 sistemi, β -fikoeritrin isə zülalın oksidləşmə-reduksiya flüorosent indikatoru kimi istifadə edilir ki, onun da flüoressensiya zamanı parçalanması sərbəst radikal tutucuları iştirakında ölçülür. Bu zaman standart kimi troloks tətbiq edilir. Kompleks əmələgəlmə ($\text{Cu(II)} + \text{H}_2\text{O}_2$) reaksiyasının başlanğıcında mis (II)

hidroperoksid (CuOOH^+) yaranır ki, sonrakı mərhələdə reaksiya zəif sürətlə getməklə Cu(I) və O_2^- əmələ gəlir. Hidrogen atomu donorlarının iştirak etmədiyi şəraitdə Cu-O rabitəsinin hemolitik qırılması CuOOH^+ birləşməsinin parçalanması üstünlüyü ilə baş verir. Növbəti reaksiyada Cu(I) H_2O_2 ilə reaksiyaya daxil olur və sərbəst hidroksil radikalı $\text{HO}^\bullet$ əmələ gəlir (Şək. 3)

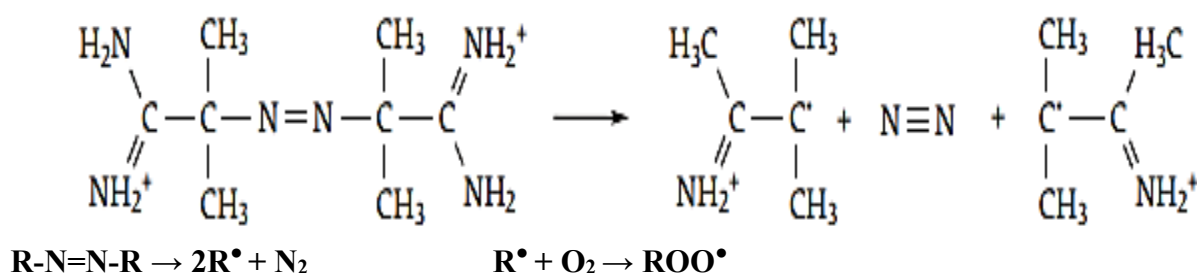




Şək.3. Hidroksil və peroksid radikalların müəyyənləşdirilməsi üçün ORAC testində gedən reaksiyaların sxemi

Flüoresenssiyanın ölçülməsi 515 nm dalğa uzunluğunda yerinə yetirilir. Həyəcanlandırma dalğa uzunluğu 485 nm seçilir. Flüoresenssiyanın intensivliyi 35 dəqiqə ərzində hər 1 dəqiqədən bir ölçülür. Ölçmə həm

antioksidant iştirakı və həm də antioksidantsız aparılır. Ümumi ölçmə müddəti 70 dəqiqə davam edir. Hər analizin nəticəsi kalibrə qrafikinə görə hesablanır və maddənin mkmol/qır quru qalıqlına əsasən aparılır (Şək. 4).



Şək.4. AAPH molekulunun sərbəst radikallara parçalanması (37°C temperaturda)

Beləliklə, AAPH-ın ($R-N=N-R$) termo parçalanması nəticəsində alkil radikal $R^{\bullet}$ molekulyar oksigenlə O_2 birləşərək peroksid radikalın $ROO^{\bullet}$ yaranmasını təşviq edir. Burada peroksid radikalın əmələ gəlməsi temperaturdan çox asılı olduğu üçün analizin gedişi zamanı

temperatur fərqi yaranmaması nəzarətdə saxlanılmalıdır.

ORAC testinin tətbiqinin ilk illərində flüorescent nümunə kimi *Porphyridium cruentum*-dan alınmış β-fikoeitrin zülalından istifadə edilirdi. Lakin β-fikoeitrinin bəzi

çatmayan cəhətlərinə görə bəzi tədqiqatçılar onu flüoressein, Nil göy fosforu, *p*-aminbenzoy turşusu və digər maddələr ilə əvəzləməyə üstünlük verirlər.

Beləliklə, ORAC testinin mexanizmi aşağıdakı kimi izah olunur. Azobirləşmələr qızdırıldıqda əmələ gələn ROO• radikalının flüoressent molekulunu zədələməsi nəticəsində flüoressensiyanın itməsi müşahidə olunur. Oksidləşməklə parçalanma davam etdikcə flüoressensiyanın zəifləməsi də davam edir. Lakin antioksidantlar flüoressent molekulunu oksidləşməklə zədələnmədən müdafiə edərək qoruyurlar. Müdafiə dərəcəsi miqdarca flüorometr tərəfindən ölçülür.

ORAC testi qida maddələrinin (çay, meyvə, tərəvəz, bitki ekstraktları, melatonin, dofamin, flavonoid və s.) antioksidant aktivliyinin yoxlanılmasında geniş istifadə edilir. Qeyd etmək lazımdır ki, ABŞ-da qida maddələrinin antioksidant aktivliyin əsasında yaradılan bank məlumatları ORAC üsulu nəticələri ilə hazırlanır.

2.2. HORAC testi. Bu test Cu (II) kompleksin hidroksil radikalın yaranmasından qorunma üçün müdafiə qabiliyyətinin dəyərləndirilməsini ölçür. Tədqiq edilən $TRAP = R_{ROO\bullet} \times \tau_{plazma}$

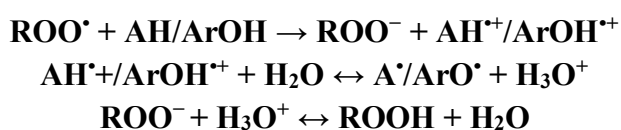
burada, $R_{ROO\bullet}$ – ROO•-nün yaranma sürəti, τ_{plazma} – insan plazması iştirakı ilə yaranan oksigenin istehlakında gecikmə müddətidir.

3. Tək elektronun ötürülməsi testləri (SET). Tək elektronun ötürülməsi testləri, həmçinin elektron transferi (ET) testləri də adlandırılır. Bu testlər sərbəst radikalların, karbonil qrupunun və metalların reduksiyası məqsədi ilə

nümunə flüoressein ilə inkubasiya edilir, sonra üzərinə Fenton qarışığı (hidroksil radikalı generatoru) əlavə edilir. Başlanğıc flüoressensiya və sonrakı qarışdırılma zamanı hər dəqiqədəki flüoressensiya ölçülür. Kalibrə əyrisinin qurulması üçün standart kimi qall turşusunun müxtəlif qatılıqlı məhlullarından istifadə edilir. HORAC testi hidroksil radikallara qarşı antioksidant aktivliyin radikal reaksiyaların qırılması yolu ilə birbaşa ölçülməsini təmin edir.

2.3. TRAP testi. Bu sınaq antioksidantların hədəf molekul ilə peroksid radikallar arasında gedən reaksiyanı inhibə etmək qabiliyyətinin ölçülməsinə əsaslanır. Hədəf molekul 2,2-azobis(2-amidinpropan) dixlorid ABAP-ın termik parçalanması nəticəsində baş verən peroksid oksidləşmə zamanı əvvəlcə özünü O₂ uducu kimi (nümunə şəklində) göstərir. Molekulyar oksigenin O₂ udulma müddətində müşahidə olunan gecikmələr, yəni induksiya dövrü miqdarca ölçülə və nümunənin ümumi antioksidant göstəricisi TRAP parametrini ifadə edə bilər. TRAP indeksi bir litr mayədə (plazmada) olan ROO• radikalının mollarının sayına əsasən aşağıdakı düsturla hesablanır:

antioksidantın elektron ötürmə qabiliyyətinin ölçülməsinə əsaslanır. SET testlərinin antioksidant təsirini aşağıdakı reaksiyalar kimi təsvir etmək olar:

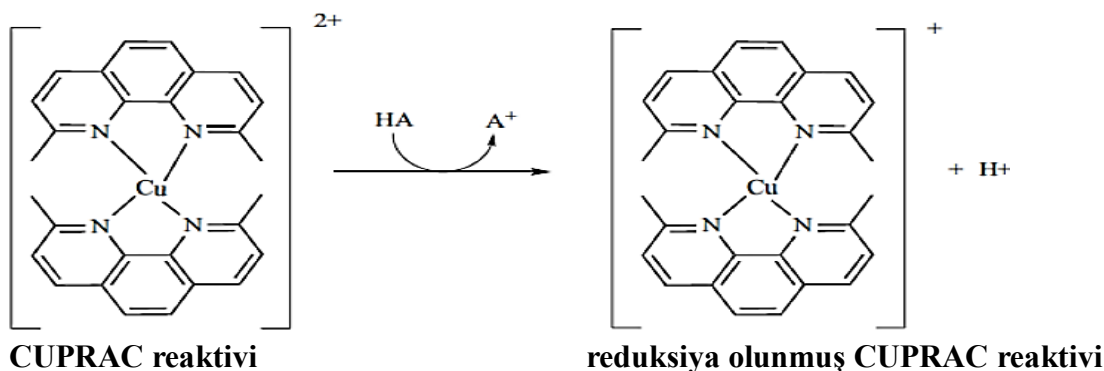
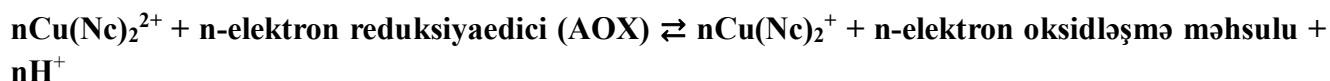


Folin-Çiokalto, dəmiri reduksiyaedici antioksidant qüvvə (FRAP) və misi reduksiyaedici antioksidant qüvvə (CUPRAC) daxil olmaqla SET spektroskopik testləri oksidləşdiricinin reduksiya edilməsi üçün antioksidant qabiliyyətinin ölçülməsinə əsaslanır ki, bu zaman azalma davam etdikcə rəng dəyişməsi müşahidə olunur. Rəngin dəyişmə dərəcəsi ümumi antioksidantın miqdarı ilə korrelyasiya olunur.

3.1. CUPRAC testləri. Ümumi antioksidant qabiliyyətinin ölçülməsi üçün istifadə edilən CUPRAC testlərinin ilkin variantı 2000-ci ildə təklif edilmişdir. Lakin sonradan müxtəlif antioksidant aktivliyin ölçülməsi üçün bir qədər təkmilləşdirilmişdir. Sınaq Cu^{2+} ionlarının Cu^+ ionlarına reduksiyasına əsaslanır. Digər üsullarda olduğu kimi optik sıxlığın ölçülməsinin asanlaşdırılması məqsədi ilə mis-

liqand kompleksi almaq üçün liqanddan istifadə edilir. Liqand qismində neokuproin (Nc; 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) tətbiq edilir. Bu üsul həm lipofil və həm də hidrofıl maddələrin antioksidant xüsusiyyətlərinin ölçülməsi üçün yararlıdır.

CUPRAC testlərindən qida maddələrinin antioksidantlıq xassələrinin öyrənilməsində geniş istifadə edilir. Testlər qida komponentlərinin Cu^{2+} –neokuproin reaktivinin xromogen oksidləşdirici xüsusiyyətlərinə əsaslanır ki, nəticədə Cu^{2+} vəziyyətdən Cu^+ vəziyyətə keçir. Mis ionlarının Cu^{2+} reduksiyaedici neokuproin iştirakı ilə reduksiyası 450 nm maksimum udma verən kompleks əmələ gətirir. CUPRAC sınağının xromogen oksidləşdirici reaktivi Cu^{2+} –Nc reduksiyaedici antioksidant substansiyasının (AOX) n-elektronları ilə reaksiyaya daxil olur (şək. 5 və 6)



Şək.5. CUPRAC testinin sxemi: HA – antioksidant molekulu, A – oksidləşmiş antioksidant molekulu.



Şək.6. CUPRAC analizində rəngin dəyişməsi

Bu reduksiya reaksiyasında polifenol və digər antioksidantların Ar-OH qrupları müvafiq xionlara oksidləşirlər, Cu^{2+} -neokuproin kompleksi isə sarı-narıncı rəngli Cu^{+} -neokuproin kompleksinə qədər reduksiya olunur.

Bir çox spesifik maddələrin, o cümlədən rozmarin turşusu, epikatexin- qallat, kversetin, katexin, kofein turşusu, epikatexin, qall turşusu, rutin, xlorogen turşusu və s. üçün CUPRAC testləri maddələrin antioksidant fəallıqlarının ölçülməsində ən yaxşı sınaqlar kimi özünü doğrultmuşdur [7].

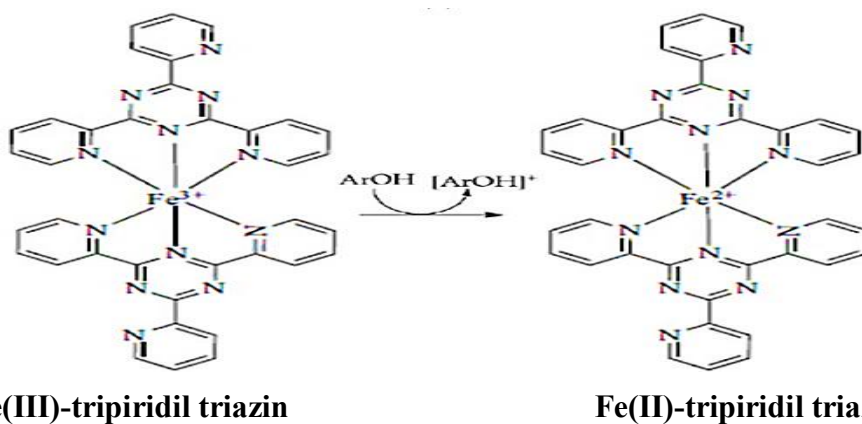
3.2. FRAP testlər. FRAP sınaqları Fe (III)-tripiridil triazin kompleksinin aşağı pH (pH =

Antioksidant + $\text{Fe}^{3+} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}$ + oksidləşmiş antioksidant

$\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} \leftrightarrow \text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-}$ və ya

Antioksidant + $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} \leftrightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ + oksidləşmiş antioksidant

$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} + \text{Fe}^{3+} \leftrightarrow \text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-}$



Şək.7. FRAP reaksiyasının mexanizmi

Bu testlər bioloji mayələrin, qida maddələrinin, bitki ekstraktlarının və s. antioksidant fəallıqlarının müəyyənəndirilməsi üçün istifadə edilir. Lakin molekulunda tiol qrupu olan birləşmələr üçün istifadə oluna bilmir.

3.3. Folin – Çiokalto üsulu. Folin – Çiokalto testləri ümumi fenol tərkibinin öyrənilməsi üçün tətbiq edilir. Bu sınaqlar bitki mənşəli qidalarda və bioloji nümunələrdə ümumi

3.6) göstəricilərində Fe (II) kompleksinə çevrilməsi ilə xarakterizə edilir. Belə reduksiya prosesi 593 nm dalğa uzunluğunda udulmanın ölçülməsi ilə aparılır. Reaksiyanın aparılması üçün 3 ml işçi reaktiv məhlulu hazırlanır, onun üzərinə tədqiq edilən durulaşdırılmış nümunə məhlulundan 100-150 mkl əlavə edilir. Termostatda 37 °C temperaturda 30 dəqiqə saxladıqdan sonra 593 nm dalğa uzunluğunda udulma ölçülür.

FRAP testlərində gedən reaksiya aşağıdakı şəkildə gedir. Rəngsiz məhlul intensiv göy rəngə çevrilir (şək.7):

polifenol tərkibin öyrənilməsi üçün istifadə edilmişdir.

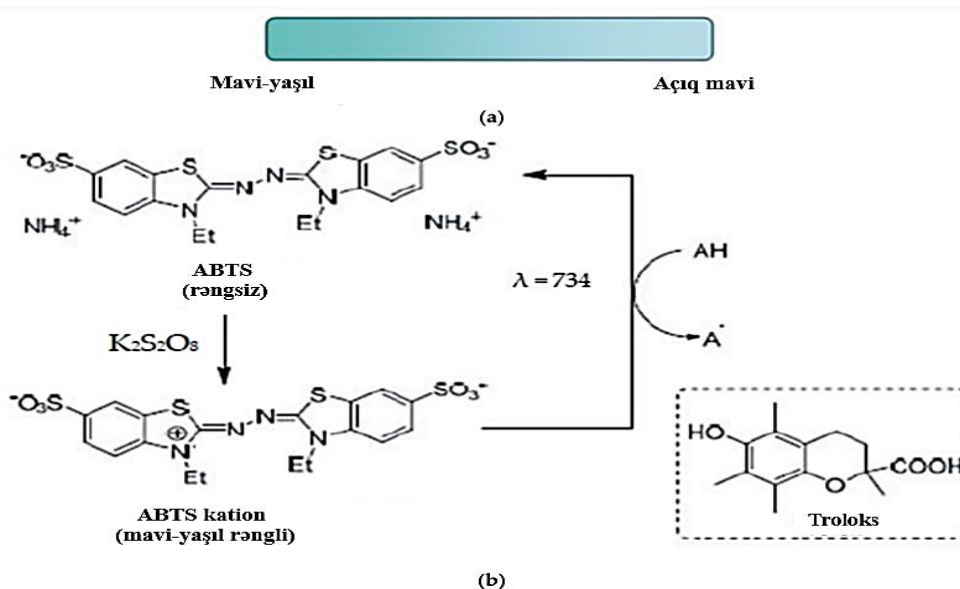
Folin – Çiokalto sınağının mahiyyəti Folin – Çiokalto reaktivinin (fosformolibden/ fosforvolfram turşusu) qələvi mühitdə fenol birləşmələri tərəfindən reduksiya olunmasına əsaslanır. Bu zaman ilkin sarı rəngli məhlul göy rəngli məhlula çevrilir və onun optik sıxlığı 765 nm dalğa uzunluğunda ölçülür.

4. Qarışıq sınaqlar (HAT/SET). Bu sınaqlar reaksiyanın getmə şəraitindən asılı olaraq (mühitin pH göstəricisi, həlledicinin təbiəti) hidrogenin və tək elektronun ötürülməsi müxtəlif nisbətlərdə baş verir. Bu sınaqlara ABTS, DPPH və s. aiddir.

4.1. ABTS (TEAC) testləri. ABTS testləri 1993-cü ildə N.Miller və onun komandası tərəfindən təklif edilmişdir. Bu testlər antioksidant təsirindən 2,2'-azinbis(3- etilbenzotiazolin-6-sulfon turşusu) (ABTS•+) kation-radikalın rənginin dəyişmə dərəcəsini ölçməyə əsaslanır. Tədqiqatlar reaksiya nəticəsində əmələ gələn göy-yaşıl məhlulun rəng intensivliyinin

azalmasının 734 nm dalğa uzunluğunda optik sıxlığının ölçülməsi ilə yerinə yetirilir. ABTS testləri tətbiqində alınan nəticələr troloksa nisbətə mmol/kq və ya mmol/litr ilə ifadə olunur (şək.8).

4.2. DPPH testləri. Bu sınaq ilk dəfə 1922-ci ildə Qoldsmit və Renn tərəfindən təklif edilmişdir. DPPH• (2,2-di(4-tert-oktilfenil)-1-pikrilhidrazil) π -radikalıdır və udma sahəsi 517 nm dalğa uzunluğuna uyğundur. Bu üsulun tətbiqi DPPH-in ilkin qatılığının azalması üçün zəruri olan antioksidantın miqdarının spektrofotometriya ilə ölçülməsinə əsaslanır.



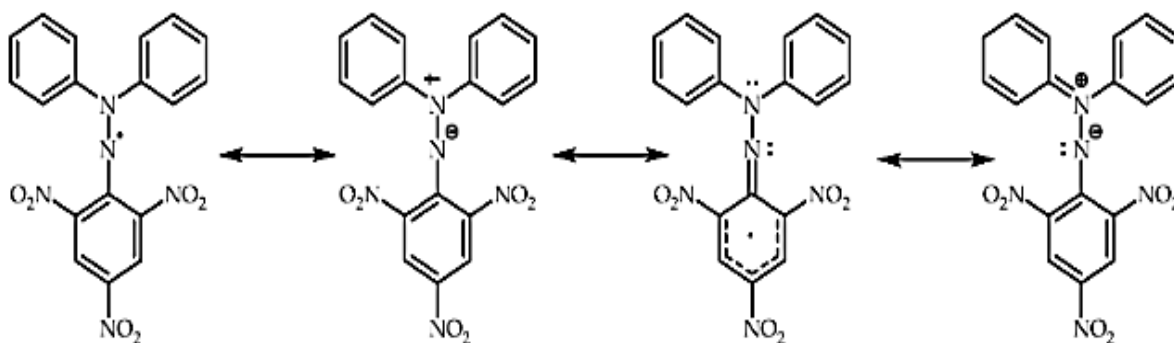
Şək.8. ABTS sınaq zamanı məhlulun rənginin dəyişməsi (a) və ABTS kation-radikalların udulması aktivliyi sxemi (b)

Bu zaman qeyd edilən prosesin getməsi üçün tələb olunan zaman qeyd edilir. Reaksiyanın gedişində DPPH molekulundakı azot atomunun tək elektronunun antioksidantdan hidrogen atomunu qəbul etməklə müvafiq hidrazinə reduksiya olunması baş verir. DPPH• radikalı stabil və intensiv bənövşəyi rəngə malikdir. Radikalın stabilliyi birinci dərəcəli ikivalentli azot atomunun sterik sıxlığı və elektron donoru rolunu daşıyan ikinci dərəcəli difenilamin qrupu və elektron akseptoru olan pikril tərəfindən

həyata keçirilən “özünə çək-itələ” effekti ilə əlaqədardır. Belə təsir molekulun kanonik quruluşunu əhəmiyyətli dərəcədə sabitləşdirir. Qeyd edilir ki, DPPH• radikalının UB spektrində meydana çıxan iki ayrı zolaq π - π^* keçidi nəticəsində yaranır və qoşalaşmamış elektron görünən sahədə zolağa təsir edir. Təyinat zamanı DPPH məhlulu özündən hidrogen atomu verə bilmə qabiliyyətinə malik maddə məhlulu ilə qarışdırılarkən bənövşəyi rəng itir və DPPH radikalının reduksiya

olunmuş forması (DPPH-H) əmələ gəlir (şək.9). Spektrdə daha geniş zolaq DPPH[•] radikalı məhlulunun dərin bənövşəyi rənginə uyğundur. Hidrazinin (DPPH-H) əmələ gəlməsi ilə H donoru olan antioksidant molekulundan hidrogen atomunun köçürülməsi nəticəsində

məhlulun rəngi bənövşəyidən açıq sarı rəngə qədər dəyişir və görünən zolaq yox olur. Reaksiyanın intensivliyi spektrofotometriyanın görünən sahəsində optik sıxlığın ölçülməsi ilə təyin edilir [8].



Şək.9. DPPH[•] (2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) radikalın kimyəvi quruluşu

Radikal sudan fərqli olaraq etanol, metanol və ya onların sulu məhlullarında həll olur. Spirtlərin sulu məhlullarında suyun miqdarı 60%-i keçməməlidir.

DPPH testi antioksidant tərəfindən DPPH[•] radikalın neytrallaşdırılması üçün elektronların ötürülməsinə əsaslanır. Reaksiya 517 nm dalğa uzunluğunda ölçülmüş rəngin dəyişməsi ilə müşayiət edilir ki, rəng dəyişikliyi maddənin antioksidant fəallığını qiymətləndirməyə imkan verir (şək.10).

Reaksiya aparmaq üçün hazırlanmış qarışıq qaranlıq yerdə 4°C temperaturda 60 dəqiqə saxlanılır. DPPH reaktivinin iştirakı ilə baş verən dəyişiklik, yəni aktivlik spektrofotometrdə 517 nm dalğa uzunluğunda aşağıdakı düsturla hesablanır:

$I(\%) = 100 \times (A_0 - A_1)/A_0$ burada, A_0 – kontrol məhlulun, A_1 – isə tədqiq edilən məhlulun optik

sıxlığıdır. Alınan rəqəmlərə görə sərbəst radikalın 50% inhibisiyası (IC_{50}) hesablanır. Sərbəst radikal inhibisiyası IC_{50} göstəricisinin nə qədər az olması antioksidantlığın bir o qədər çox olmasını bildirir. IC_{50} göstəricisi sərbəst radikalların 50%-nin inhibə olunması üçün nümunənin tələb olunduğu qatılıqdır. İnhibisiya (%) ilə qatılıq ($\mu\text{g/ml}$) arasında olan kalibrə əyrisi aşağıdakı düstur ilə hesablanır: $y=ax+b$

Burada, y göstəricisi IC_{50} göstəricisini müəyyən etmək üçün 50% ilə əvəz edilir, x isə kalibrə əyrisinə görə IC_{50} kəmiyyətidir, $\mu\text{g/ml}$ və ppm ilə ifadə olunur. Kalibrə əyrisində korrelyasiya əmsalı dəyərinin 0.999 olması kəmiyyətlər arasında düz mütənasib asılılığı göstərir. Analiz edilən nümunənin qatılığı artdıqca antioksidantlıq da artmağa doğru gedir [9].

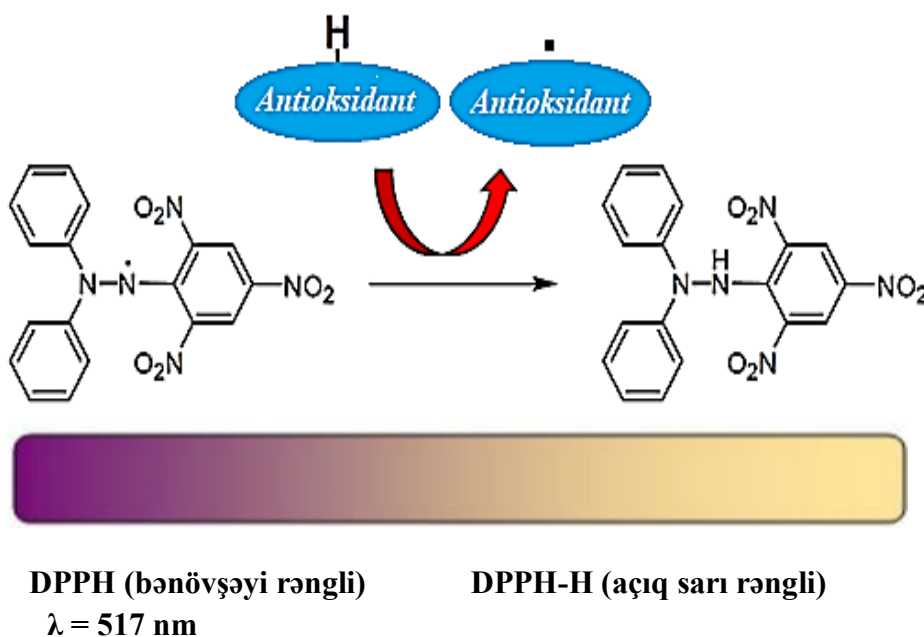
Alınan IC_{50} göstəricisinə görə antioksidant fəallıq aşağıda verilən cədvəllərdəki kimi qiymətləndirilir (cədvəl 1 və 2) [10]:

Cədvəl 1. IC_{50} (ppm) göstəricisinə əsaslanan antioksidant aktivliyin parametrləri

IC_{50} göstəricisi (ppm)	Antioksidant fəallıq
<50	Çox qüvvətli
50 – 100	Qüvvətli
100 – 150	Orta
150 – 200	Zəif

Cədvəl 2. IC_{50} (µg/ml) göstəricisinə əsaslanan antioksidant aktivliyin parametrləri

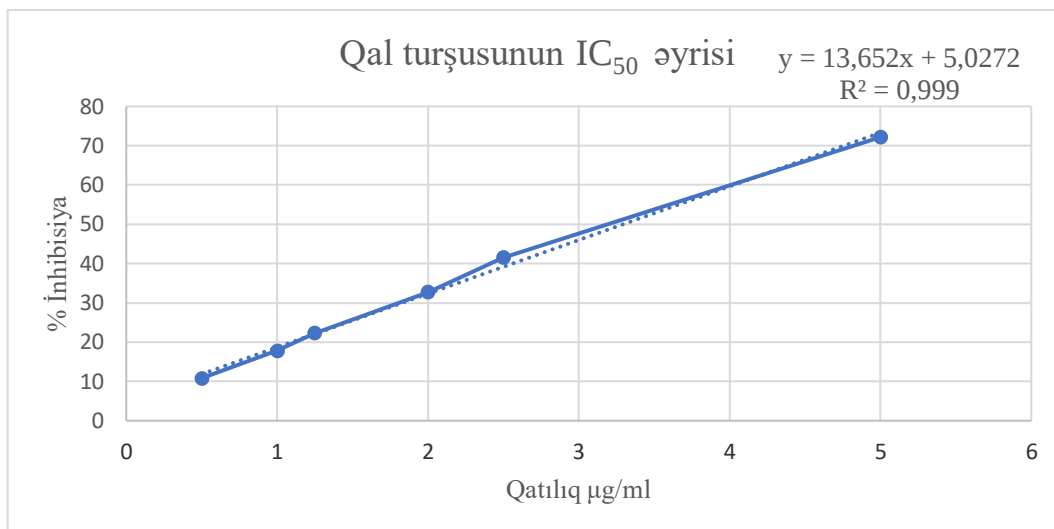
IC_{50} göstəricisi (µg/ml)	Antioksidant fəallıq
< 10 µg/ml	Çox qüvvətli
10–50 µg/ml	Qüvvətli
50-100 µg/ml	Orta
100-250 µg/ml	Zəif
> 250 µg/ml	Qeyri-aktiv

*Şəkl.10. DPPH testinin mexanizmi*

Nümunə üçün aşağıda DPPH standartlarından olan qall turşusunun inhibisiya (%) ilə qatılıq

(µg/ml) arasında olan kalibrə əyrisi göstərilmişdir (sxem):

Sxem: Qal turşusunun inhibisiya (%) ilə qatılıq (µg/ml) arasında olan kalibrə əyrisi



Burada x-in qiymətini hesablamaqla IC₅₀ göstəricisini müəyyən etmək mümkündür.

DPPH sınağı fərdi antioksidant molekulların və eləcə də, bitki ekstraktlarının və fenol birləşmələrin antioksidantlığının qiymətləndirilməsi üçün geniş istifadə edilir.

hansı dozada təyin edilməsini müəyyən edir. Kimyəvi maddələrin antioksidant fəallıqlarının ölçülməsi müxtəlif sınaqlardan (ORAC, HORAC, TRAP, CUPRAC, FRAP, Folin – Çiokalto, ABTS (TEAC) və DPPH testləri) istifadə etməklə yerinə yetirilir.

YEKUN

Beləliklə, ksenobiotiklərin canlı orqanizmdə oksidləşmə-reduksiya reaksiya məhsulları olan

sərbəst radikalların oksidativ stress yaratması fəsadlarının qarşısının alınması üçün xaricdən antioksidant fəallıqlı maddələrin qəbul edilməsinə ehtiyac vardır. Oksidativ stress prosesinin dərinləşmədiyi hallarda gündəlik qəbul edilən qida maddələri (meyvələr, tərəvəzlər) sərbəst radikal – antioksidant tarazlığını qormağa kifayət edir. Lakin bu yolla oksidativ stresin qarşısının alınması mümkün olmadıqda orqanizmin sərbəst radikalların zərərli təsirindən qorunması üçün antioksidant fəallıqlı maddələrin qəbul edilməsinə ehtiyac yaranır. Qəbul edilən bioloji fəal maddələrin antioksidant fəallıq göstəricilərinin əvvəlcədən təyin edilməsi onların hansı patoloji hallarda və

Əlavə məlumatlar.

Minnətdarlıq.

Bu məqalə milli səviyyədə aparılmış araşdırma və təhlil nəticəsində ərsəyə gəlmişdir; hazırlanmasında iştirak edən bütün həmkarlarımı təşəkkür edirəm.

Müəlliflərin töhfələri.

Konsepsiya və dizayn, Məlumatların əldə edilməsi, təhlili və ya təfsir, Əlyazmanın tərtibi, Əlyazmanın mühüm intellektual məzmun üçün tənqidi təftişi, Statistik təhlil, Məlumatların idarəedilməsi, Araşdırma, Əldə edilmiş dəstək, maliyyə və nəzarət: bütün müəlliflər bərabər qaydada. Müəlliflər yekun əlyazmanı oxuyub və təsdiq edib.

Maliyyələşdirmə.

Məqalənin hazırlanması məqsədilə aparılan təhlil və araşdırmalar üçün heç bir kənar maliyyə əldə edilməmişdir. Heç bir digər qurum və ya sponsor təşkilatlararasıdırmanın və ya tədqiqatın və ya təhlilin dizaynı və aparılmasında; məlumatların toplanması, idarə edilməsi, təhlili, məlumatların təfsirində, habelə əlyazmanın hazırlanması, nəzərdən keçirilməsi və ya

təsdiqində heç bir rola malik olmayıb; əlyazmanın nəşrə təqdim edilməsi haqqında qərarların verilməsində iştirak etməmişdir.

Məlumat və materialların əlçatanlığı.

Təhlil zamanı istifadə olunan və/yaxud təhlil edilən məlumatlar (datalar) müəlliflərə və ya jurnalın redaksiyasına müraciət etməklə əldə edilə bilər.

Bəyannamələr.**Etik Komitənin icazəsi və məlumatlı razılıq.**

Hər bir iştirakçıdan yazılı və ya uyğun olduqda şifahi məlumatlı razılıq alınıb. Etik Komitə (ATUJ, Azərbaycan) bu təhlili təsdiq edib.

Nəşr üçün razılıq.

Nəzərdə tutulmur.

Maraqların toqquşması.

Müəllif(lər) hər hansı maraqların toqquşmasını bəyan

etməyiblər.

Müəlliflərə dair təfərrüatlar.

1. Azərbaycan Tibb Universiteti, Bakı, Azərbaycan.

Göndərilib: 16 aprel 2025-ci il. **Qəbul edilib:** 17 aprel 2025-ci il. **Elektron nəşr:** 20 aprel 2025-ci il.

ƏDƏBİYYAT

1. Hayrullah K., Mehmet Ş.G. Serbest Radikaller // MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg. 2016, No. 4(1), s.:50-59
2. Lien A.Ph., Hua H., Chuong Ph. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health // Int J Biomed Sci. 2008, No. 4(2), p.:89-96.
3. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Кандалинцева Н.В.. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Строение, свойства, механизмы действия: монография /Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012, 496 с.
4. Said E., Metwally E.A., Ahmed M.M. Role of Natural Antioxidants in Treatment of Toxicity // Journal of Toxicological Analysis 2018, Vol.1, No. 1(3), p. 1-8.

5. Яшин А.Я. Методология определения антиоксидантной активности пищевых продуктов и биологических жидкостей // Аналитика, 2021, Том 11, №5, с.: 370-384
6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8037236/>
7. Munteanu I.G., Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review // Intern. Journal of Molecular Sciences. 2021, No. 22(7), p.:3380; doi: 10.3390/ijms22073380
8. Gulcin I., Alwasel S.H. DPPH Radical Scavenging Assay // Processes 2023, No.11(8), p.: 2248 (<https://doi.org/10.3390/pr11082248>)

9. Breaud C., Lallemand L., Mares G., Mabrouki F., Bertolotti M., Simmler C., Greff S., Mauduit M., Herbertte G., Garayev E.A. and ets. LC-MS Based Phytochemical Profiling towards the Identification of Antioxidant Markers in Some Endemic Aloe Species from Mascarene Islands // Antioxidants 2022, No. 12(1), p.: 50; doi.org/10.3390/antiox12010050
10. Phongpaichit S., Nikom J., Rungjindamai N., Sakayaroj J., Hutadilok N., Rukachaisirikul V. and Kirtikara K. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from Garcinia plants // FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2007, No.51(3), p.:517-525; doi:10.1111/j.1574-695X.2007.003

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ И ТЕСТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ТОКСИКОЛОГИИ

Гараев Э.А., Пашаева С.А., Гусейнгулиева К.Ф., Несирли И.У.

Азербайджанский Медицинский Университет, кафедра Фармацевтической токсикологии и химии
eldargar@mail.ru

Резюме

В статье упоминается о нарушении свободнорадикально-антиоксидантного баланса в результате протекания окислительно-восстановительных реакций в организме под действием токсических веществ, а также накопления свободных радикалов в избытке, создающих оксидативный стресс. Чтобы защитить ткани организма от воздействия свободных радикалов, необходимо принимать извне организма вещества, обладающие антиоксидантной активностью. Описаны тесты, используемые для измерения антиоксидантной активности биологически активных веществ (ORAC, HORAC, TRAP, CUPRAC, FRAP, Folin-Ciocalto (Фолин-Чокальтеу), ABTS (TEAC) и DPPH-тесты), правила и сущность этих тестов.

Ключевые слова: антиоксидант, свободный радикал, оксидативный стресс, ORAC, HORAC, TRAP, CUPRAC, FRAP, Фолин-Чокальтеу (Folin-Ciocalto), тесты ABTS (TEAC) и DPPH

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND DETERMINATION TESTS IN TOXICOLOGY

Qarayev E.A., Pashayeva S.A., Huseynquliyeva K.F., Nesirli I.U.

Azerbaijan Medical University, Department of Pharmaceutical toxicology and chemistry
eldargar@mail.ru

Abstrakt

The given article talks about the disruption of the free radical-antioxidant balance as the result of oxidation-reduction reactions in the body under the influence of toxic substances, and the creation of oxidative stress resulting from the accumulation of excess free radicals. It also mentions the need for taking external antioxidants in order to protect the body tissues from the effects of free radicals. The paper describes the tests used to measure the antioxidant activity of biologically active substances (ORAC, HORAC, TRAP, CUPRAC, FRAP, Folin-Ciocalto, ABTS (TEAC) and DPPH tests), as well as the methods and essence of those tests.

Keywords: antioxidant, free radical, oxidative stress, ORAC, HORAC, TRAP, CUPRAC, FRAP, Folin-Ciocalteu, ABTS (TEAC) and DPPH tests