

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE ANTİOKSİDANLAR

Yaşam için oksijen (O₂)

Havasız yerde yaşayamayız. Yaşamımızı sürdürmek için havanın moleküler oksijenini (O₂) tükettiğimizi biliyoruz.

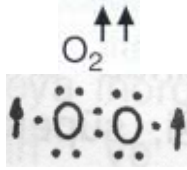
Total oksijen tüketimimizin %90'ından fazlasından elektron transport zinciri (solunum zinciri), %5-10'undan da diğer oksijen gerektiren reaksiyonlar sorumludur.

Elektron transport zincirinde moleküler oksijen, yakıtlardan (glukoz, yağ asidi ve amino asitlerin karbon iskeleti) türeyen NADH ve FADH₂'den elektronları alarak suya indirgenir. Bu yolda oksijen molekülünün kuvvetli oksitleyici gücü, ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağı haline dönüştürülür.

Moleküler oksijen gerektiren fakat ATP'nin oluşumu reaksiyonuyla eşleşmeyen diğer reaksiyonlar, amino asitlerin katabolizması, ilaçların detoksifikasyonu ve steroid hormonların sentezi gibi spesifik metabolik yollar için önemlidirler. Bu reaksiyonlarda diğer oksidazlar (oksijeni suya veya hidrojen perokside indirgeyen enzimler) ve oksijenazlar (oksijeni okside olan moleküle bağlayan enzimler) görev alırlar.

Moleküler oksijenin özellikleri

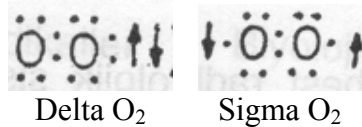
Moleküler oksijen (O₂), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir.



Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller **serbest radikal** olarak tanımlanırlar. Ancak Fe³⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ ve Mo⁵⁺ gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler.

Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen, bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer.

Biradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle **singlet oksijen** oluşur. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür, delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır.

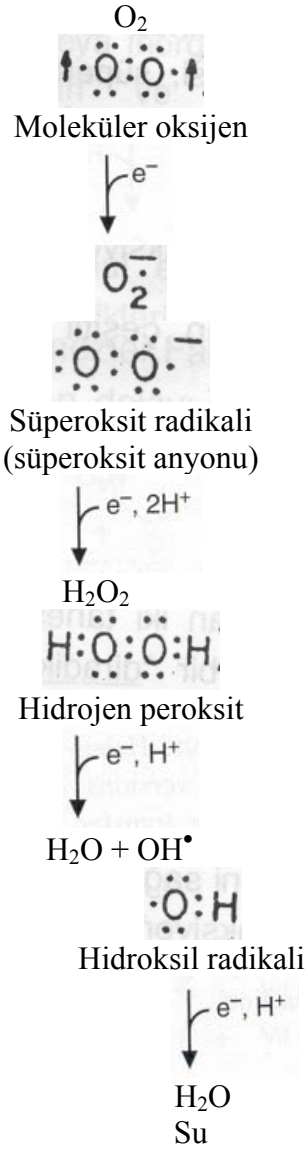


Organizmada geçiş metallerini (Fe²⁺ ve Cu⁺ gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle oksidasyon reaksiyonları meydana gelir.

Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede **reaktif oksijen türleri (ROS)** oluşturma eğilimindedir.

Reaktif oksijen türleri (ROS)

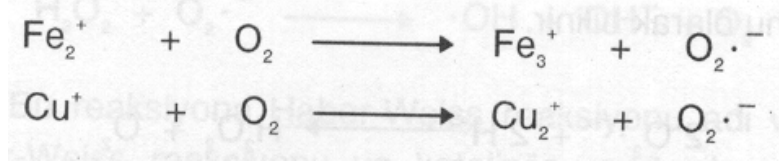
Reaktif oksijen türleri (ROS), normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^\bullet)'dir.



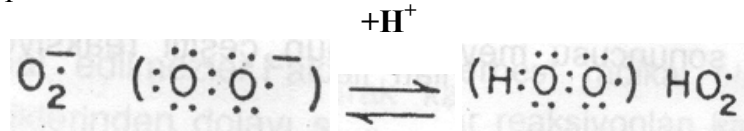
Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R^\bullet), peroksit radikalleri (ROO^\bullet), alkoksi radikalleri (RO^\bullet), tiyil radikalleri (RS^\bullet), sülfenil radikalleri (RSO^\bullet), tiyil peroksit radikalleri (RSO_2^\bullet) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar.

Süperoksit radikali (O_2^-)

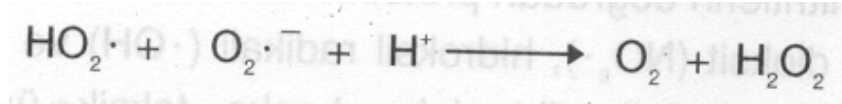
Süperoksit radikali (O_2^-) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallere otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir.



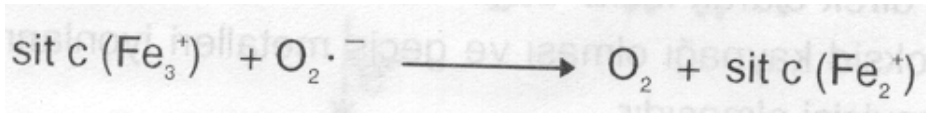
Süperoksit radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir, oksidan perhidroksi radikali (HO_2^\bullet) oluşturmak üzere protonlanır.



Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir.



Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin ferrisitokrom c ya da nitroblue tetrazolium ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur.

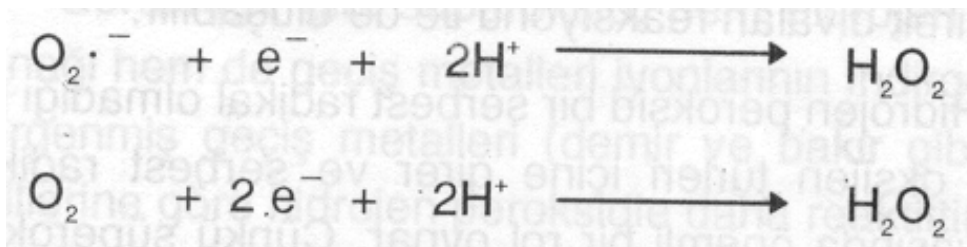


Süperoksit radikali epinefrinin oksidasyonunda oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenir.

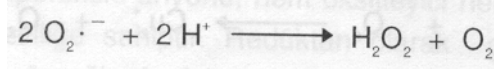
Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO^\bullet) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO^-) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit (NO_2^\bullet), hidroksil radikali (OH^\bullet), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki nitrik oksitin (NO^\bullet) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur.

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksidin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir.

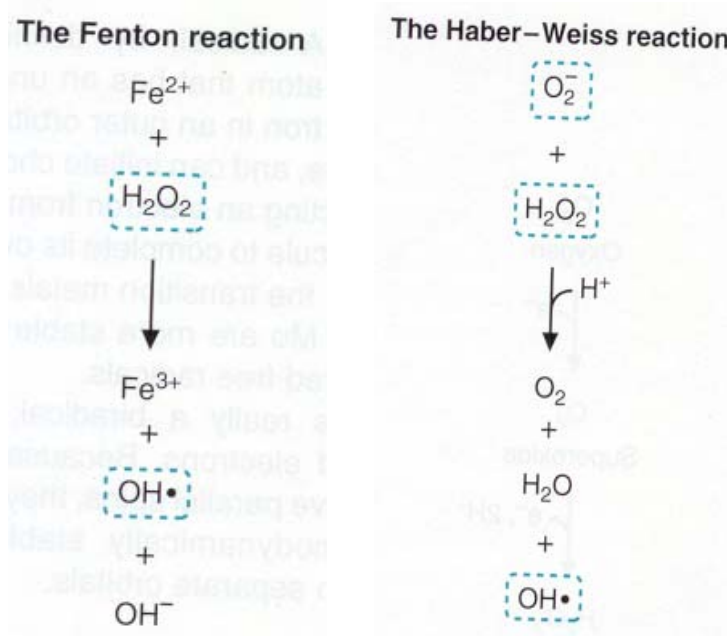


Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin ($O_2^{\cdot-}$) dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar.



Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da **süperoksit dismutaz (SOD)** enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir.

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında **Fenton reaksiyonu** sonucu, süperoksit radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) varlığında **Haber-Weiss reaksiyonu** sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH^{\cdot}) oluşturur.



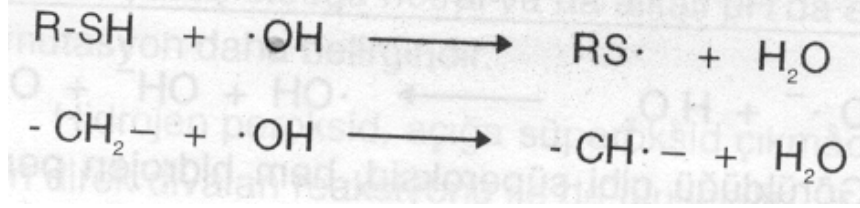
Süperoksit radikalının lipid solubilitesi sınırlı olduğu halde hidrojen peroksit lipid solubldur. Bu nedenle hidrojen peroksit kendisinin olduğu yerden uzakta olan fakat Fe^{2+} içeren membranlarda hasar oluşturabilir.

Hidroksil radikali (OH^{\cdot})

Hidroksil radikali (OH^{\cdot}), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur.

Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır.

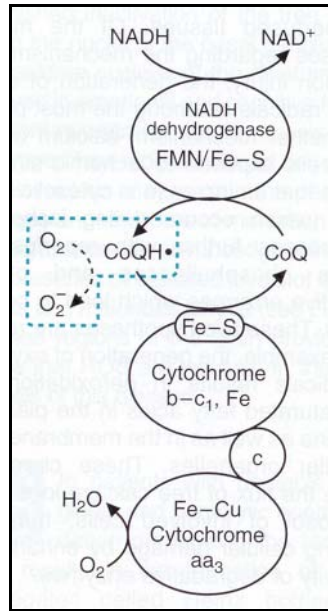
Hidroksil radikali olasılıkla reaktif oksijen türlerinin (ROS) en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS^{\cdot}), karbon merkezli organik radikaller (R^{\cdot}), organik peroksitler ($RCOO^{\cdot}$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur.



Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) kaynağı

Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir. Bazen bu serbest radikal ara ürünler enzimlerin aktif yerinden sızarlar, moleküler oksijenle kazara etkileşirler ve sonuçta serbest oksijen radikalleri oluşur.

➔ Normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirindedir. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgenmiş zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar.



➔ Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır.

➔ Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidazdır. **Ksantin oksidaz** hasarlanmamış dokularda bir dehidrojenaz olarak vardır, pürinlerin yıkılım yolunda hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşumu basamaklarında elektron akseptörü olarak moleküler oksijenden (O₂) daha çok NAD⁺ kullanır. Oksijensizliğe bağlı olarak ADP'nin ATP'ye fosforilasyonunun azaldığı durumlarda (iskemi durumlarında) ADP yıkılır ve pürin bazı, ksantin oksidazın bir oksidaz olarak etkili olmasıyla hipoksantine dönüştürülür. Ksantin oksidazın oksidaz olarak aktivite göstermesi durumunda hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside dönüşürken moleküler oksijen kullanılmakta, moleküler oksijen hidrojen peroksit indirgenmektedir. İskemi durumlarında oksijen seviyesi düşük olduğundan önemli hasar olmaz. Ancak oksijen seviyesi reperfüzyon sırasında normale dönünce iskemi yerinde ksantin oksidaz etkisiyle fazla miktarda hidrojen peroksit (H₂O₂) ve süperoksit radikali (O₂^{•-}) oluşur, bunların etkisiyle de iskemi/reperfüzyon hasarı denen durum ortaya çıkar. Ksantin oksidazın özellikle intestinal

mukoza hücrelerinde görülen iskemi/reperfüzyon hasarında önemli faktör olduğu düşünülmektedir.

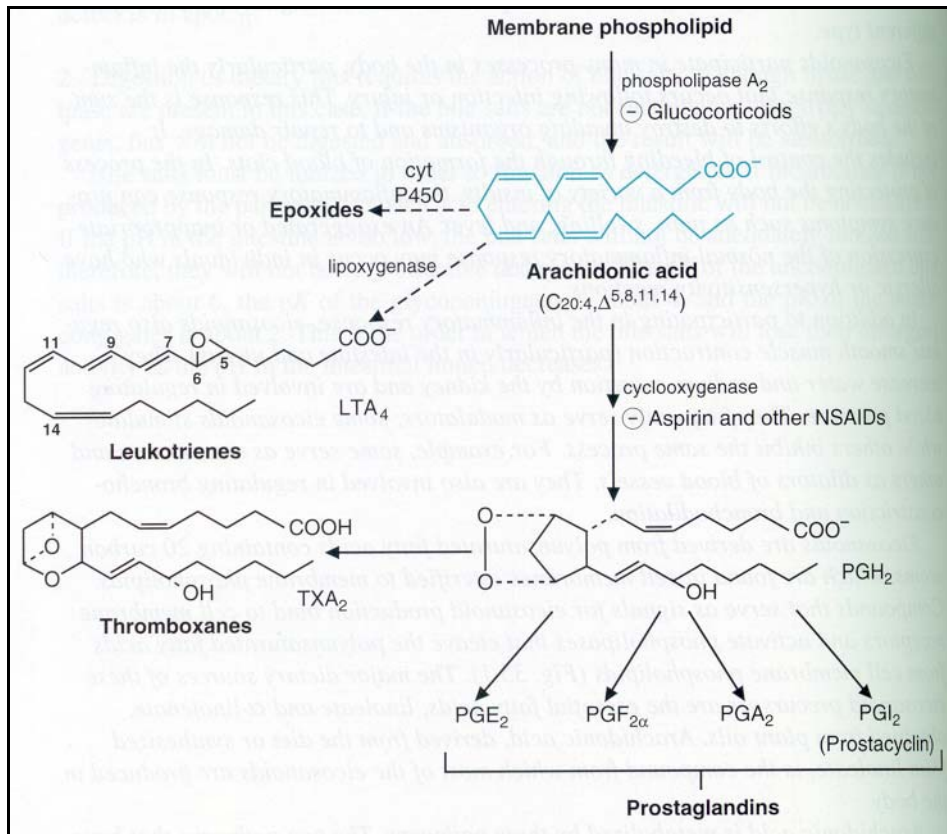
Aldehit oksidaz yapı itibariyle ksantin oksidaza benzer, substratlarının çoğu aynıdır ve süperoksit radikali (O_2^-) üretir.

Dihidroorotat dehidrojenaz, flavoprotein dehidrojenaz, amino asit oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimler de serbest radikal oluşmasına neden olurlar.

Peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağıdır. Peroksizomlardaki D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açil-CoA oksidaz gibi oksidazlar, süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimine neden olurlar. Ancak peroksizomlarda, hidrojen peroksidin suya ayrışmasını katalizleyen katalaz (CAT) enziminin aktivitesi de çok yüksek olduğundan peroksizomlardan sitozole ne kadar hidrojen peroksit (H_2O_2) geçtiği bilinmemektedir.

► Hayvan hücrelerinde askorbik asit, tiyoller, adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonu da süperoksit radikalinin (O_2^-) bir başka kaynağıdır.

► Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesine yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana gelirler.

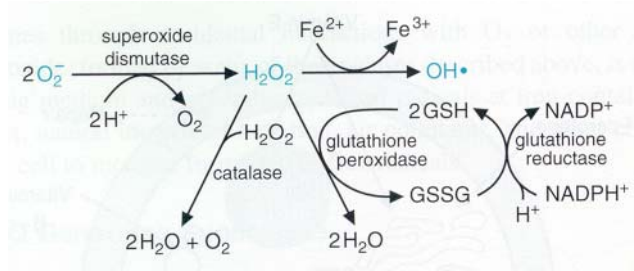


Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine "**enzimatik lipid peroksidasyonu**" denir.

Serbest radikallerle prostaglandin metabolizması birbiriyle yakından ilişkilidir. Reaktif oksijen metabolitleri, fosfolipaz aktivasyonu yoluyla prostaglandin E_2 , prostaglandin F_2 , 6-keto prostaglandin $F_{1\alpha}$ ve tromboksan B_2 sentezini sağlarlar. Prostaglandin E_2 ve I_2 (prostasiklin) de adenilat siklazı aktive ederek cAMP sentezini artırırılar. PGA , PGE_1 ve PGE_2 'nin burun mukozası damarlarında vazokonstriksiyona neden olduğu bilinmektedir.

metabolitlerinin oluşumuyla birlikte mitokondri dışında oksijen tüketiminde bir patlama (solunumsal patlama) gösterirler. Fagositte edilmiş bakteri, solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konak hücelere zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynarlar.

Fagositlerin uyarılması, heksoz monofosfat şantı yoluyla glukozun oksidasyonunda artışa yol açar. Solunumsal patlama sırasında elektron vericisi olarak NADPH kullanılır ve moleküler oksijenin (O_2) süperoksit radikaline ($O_2^{\cdot-}$) indirgenmesi sonucu $NADP^+$ üretimi artar ve heksoz monofosfat yolu aktive olur. Heksoz monofosfat yolunun aktivasyonuna neden olan $NADP^+$ nin diğer kaynağı hidrojen peroksidin (H_2O_2) detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemidir.



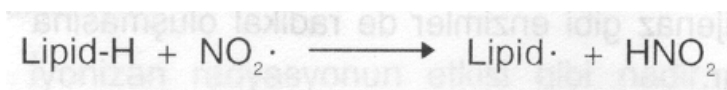
Nötrofiller ve monositlerin primer lizozomal granüllerinde Fe-hem içeren miyeloperoksidaz enzimi bulunur. Çeşitli uyarıcıların etkisiyle fagositler miyeloperoksidaz içeren granüllerini ekstrasellüler aralıktaki fagositik vakuol içine boşaltırlar. Miyeloperoksidaz, hidrojen peroksid (H_2O_2) varlığında klorür, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek hipoklorik asit (HOCl), hipoyodik asit (HOI) ve hipobromik asit (HOBr) oluşturur. Bu bileşikler ve bunların tuzları güçlü oksidanlardır, biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerek mikroorganizmayı etkileyen toksik ajanlar meydana getirirler.

Fagositin kendisi de reaktif oksidanların zarar vermelerine karşı hassastır. Bununla birlikte kendilerini oksidanlarına karşı koruyabilirler. Fagositlerin antioksidan sistemleri, süperoksidi hidrojen perokside dönüştüren **süperoksit dismutaz (SOD)**, hidrojen peroksidi suya indirgeyen **katalaz (CAT)**, hidrojen peroksidi detoksifiye edici **glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemi**, antioksidan vitaminlerden α -tokoferol (vitamin E) ve askorbik asit (vitamin C) gibi antioksidanlardır.

Nötrofillerden toksik ajanların sızıntısı veya sekresyonu, yakın hücelere ve solubl sistemlere zarar verir. Fagosit kaynaklı oksidanlar ototoksik, immünosupresif ve mutajenik etkiler gösterirler. Örneğin romatoid artritli (RA) hastaların diz eklemlerinde fazla miktarda nötrofil birikir ve bu nötrofillerden ortama salınan serbest radikaller eklem hasarını hızlandırır.

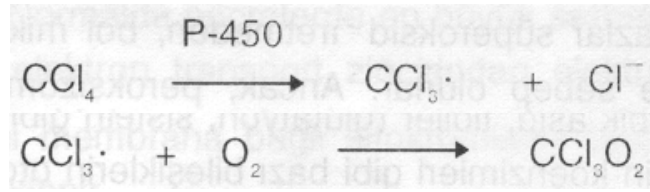
► Bazı yabancı toksik maddeler hücrede serbest radikal üretimini artırır. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler ya da serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler dört grupta toplanabilirler:

1) Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Örneğin kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit gazı (NO_2^{\cdot}) böyle bir maddedir. Azot dioksit (NO_2^{\cdot}) etkili bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır.



2) Toksin bir serbest radikale metabolize olur. Örneğin kuru temizlemede kullanılan toksik bir madde olan karbon tetraklorür (CCl_4), karaciğerde sitokrom p450 tarafından triklorometil

serbest radikaline (CCl_3^\bullet) dönüştürülür. Triklorometil serbest radikali de moleküler oksijenle (O_2) etkileşerek peroksil serbest radikali ($\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$) oluşturur.



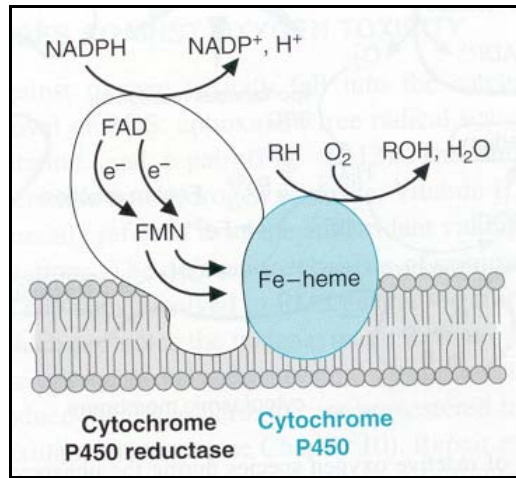
Triklorometil serbest radikali (CCl_3^\bullet) ve peroksil serbest radikali ($\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$) kuvvetli lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır. Böylece reaktif serbest radikal üretimi karaciğerde antioksidan savunmaları aşar, sellüler membranlarda oksidatif yıkım ve ciddi doku hasarı meydana gelir.

3) Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Örneğin özellikle karaciğerde biriken paraquat bir serbest radikale indirgendikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken oksijen indirgenir ve böylece bol miktarda süperoksit radikali (O_2^\bullet) üretilmiş olur.

Diyabetik bir ajan olan alloxan da paraquat gibi etki eder.

Antikanserojen bir madde olan doxorubicin de DNA replikasyonunu inhibe ederken olasılıkla önemli miktarda süperoksit radikali (O_2^\bullet) ve hidroksil radikali (OH^\bullet) üretimine neden olur.

Birçok endojen bileşiğin ve ksenobiyotiğin hidroksilasyonunu, endoplazmik retikulum membranında yerleşmiş iki üniteden oluşmuş bir hem proteini olan sitokrom P450 katalize eder.



Bu reaksiyonlarda oksijen kaynağı olarak moleküler oksijen kullanıldığı gibi peroksitler (ROOH) de kullanılabilir. Ancak, alkol ve asetonla indüksiyonunda olduğu gibi bazı hallerde sitokrom P450 aşırı miktarda süperoksit radikali (O_2^\bullet) üreten bir izoenzime dönüşür.

4) Toksin antioksidan aktiviteyi düşürür. Örneğin parasetamolün karaciğerde sitokrom P450 tarafından metabolizması antioksidan aktivitede önemli yeri olan glutatyonla reaksiyona giren bir ürün oluşturarak sonuçta glutatyonun miktarını azaltır.

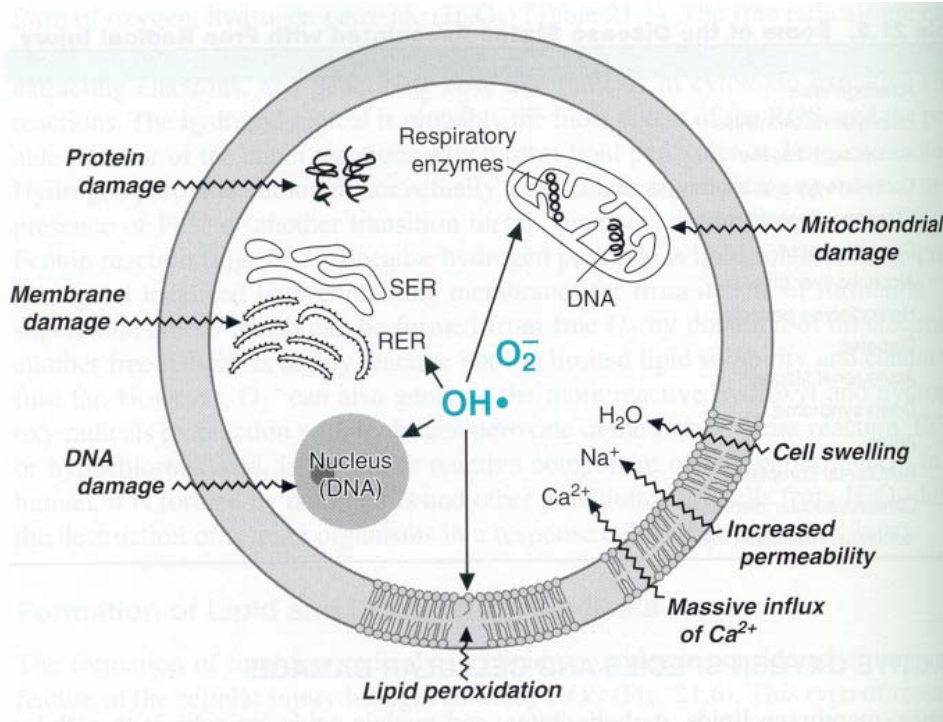
Serbest oksijen radikallerinin etkileri

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO_2), ozon (O_3) ve azot dioksit (NO_2^\bullet), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar.

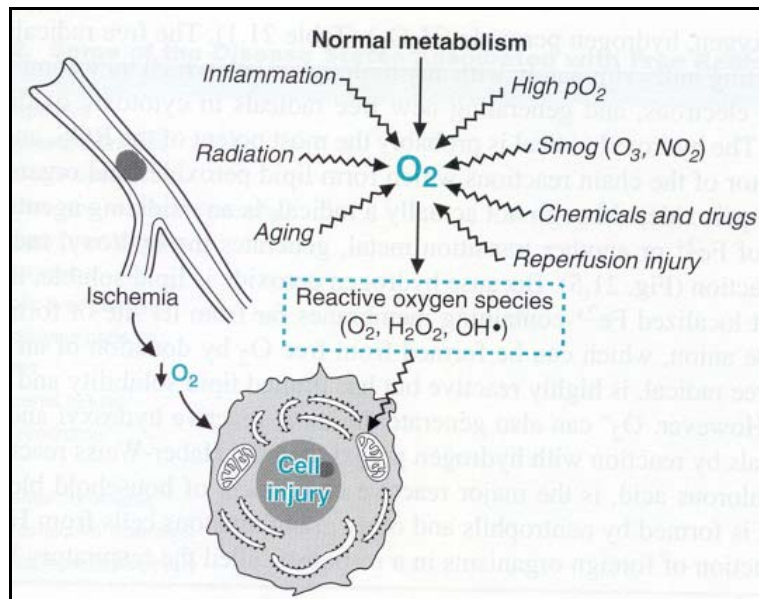
Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler.

Süperoksit radikali (O_2^-) ve hidroksil radikali (OH^\bullet) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran permeabilitesi artar.

Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur.



Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. İskemi sonrasında reperfüzyon da reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına bağlı olarak iskeminin oluşturduğu hücre hasarını artırır.



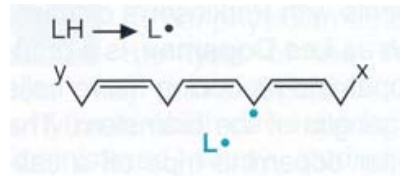
Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aterogenez, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, Duchenne tipi musküler distrofi, gebelik preeklampsisi, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, diabetes mellitus, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar, iskemi/reperfüzyon injürisi gibi durumlarda serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarı söz konusudur.

Serbest radikallerin lipidlere etkileri

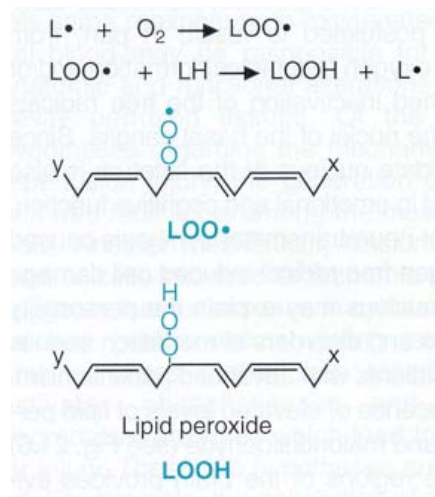
Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar.

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri (L^\bullet) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO^\bullet) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "**nonenzimatik lipid peroksidasyonu**" denir.

Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar.



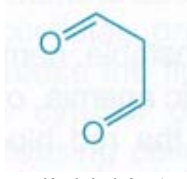
Lipid radikali (L^\bullet) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin (L^\bullet) moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO^\bullet) oluşur. Lipid peroksit radikalleri (LOO^\bullet), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine ($LOOH$) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder.



Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin (LOOH) yıkılımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten (H_2O_2) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali (OH^\bullet) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir.

Lipid peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar.

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir.



Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA) kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit (MDA) ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır.

Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur.

Serbest radikallerin proteinlere etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur.

Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immüoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin reaktif oksijen türleri (ROS) üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali (O_2^-) veya hidrojen peroksitle (H_2O_2) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur.

Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA'ya etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH^\bullet) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nütrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H_2O_2) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Süperoksit (O_2^-) maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir, çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozusta (SLE) ve romatoid artrit (RA) dolaşımında anti-DNA antikörler bulunur.

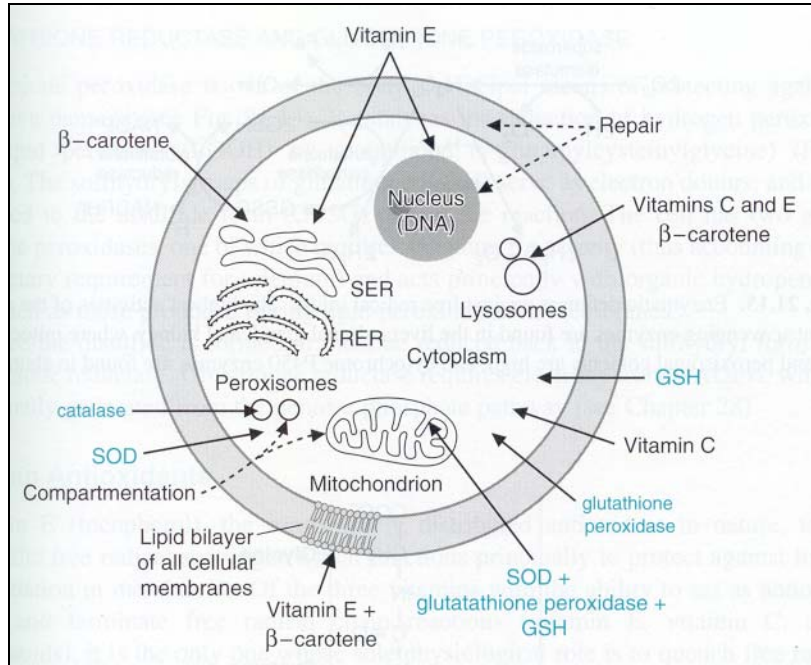
Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar.

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriyazis, romatoid artrit, Behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hallerde serbest radikal artışının sebep mi yoksa sonuç mu olduğu tam olarak bilinmemektedir.

Serbest radikallere karşı hücresel savunma (antioksidan savunma sistemleri, antioksidanlar)

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "**antioksidan savunma sistemleri**" veya kısaca "**antioksidanlar**" olarak bilinirler.



Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler. 1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme **toplayıcı etkidir**. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler. 2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme **bastırıcı etkidir**. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler. 3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki **zincir kırıcı etkidir**. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler. 4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması **onarıcı etkidir**.

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler.

Endojen antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır: 1) Süperoksit dismutaz (SOD). 2) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px). 3) Glutasyon S-Transferazlar (GST). 4) Katalaz (CAT). 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi. 6) Hidroperoksidaz.

Enzim olmayan endojen antioksidanlar şunlardır: 1) Melatonin. 2) Seruloplazmin. 3) Transferrin. 4) Miyogloblin. 5) Hemogloblin. 6) Ferritin. 7) Bilirubin. 8) Glutasyon. 9) Sistein. 10) Metiyonin. 11) Ürat. 12) Laktoferrin. 13) Albümin.

Eksojen antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler.

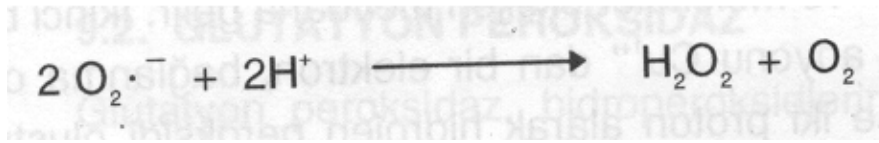
Vitamin eksojen antioksidanlar şunlardır: 1) α - tokoferol (vitamin E). 2) β -karoten. 3) Askorbik asit (vitamin C). 4) Folik asit (folat).

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar şunlardır: 1) Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten). 2) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenylene iodonium). 3) Rekombinant süperoksit dismutaz. 4) Trolox-C (vitamin E analogu). 5) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein). 6) Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin). 7) Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin). 8) Nötrofil adezyon inhibitörleri. 9) Sitokinler (TNF ve IL-1). 10) Barbitüratlar. 11) Demir şelatörleri.

Gıdalardaki eksojen antioksidanlar şunlardır: 1) Butylated hydroxytoluene (BHT). 2) Butylated hydroxyanisole (BHA). 3) Sodium benzoate. 4) Ethoxyquin. 5) Propylgalate. 6) Fe-superoxyde dismutase.

Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1, EC-SOD) süperoksit serbest radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir.



İnsanda süperoksit dismutazın iki izomer tipi bulunmaktadır. **Cu-Zn SOD** sitozolde bulunur, Cu ve Zn içerir, dimerik yapıdadır, siyanidle inhibe edilir. **Mn SOD** mitokondride bulunur, Mn içerir, tetramerik yapıdadır, siyanidle inhibe olmaz. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dır.

SOD'ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar.

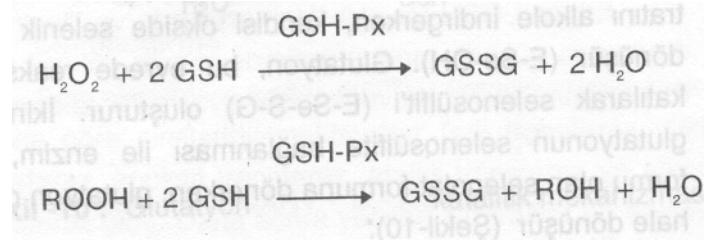
SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO_2 artışıyla artar. SOD'ın ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür.

Cu-Zn SOD'ın spesifik aktivitesi Down sendromlu hastaların eritrositlerinde yüksek, prematürelerin ve yaşlıların eritrositlerinde ve psöriyazisli hastaların lökositlerinde düşük bulunmuştur.

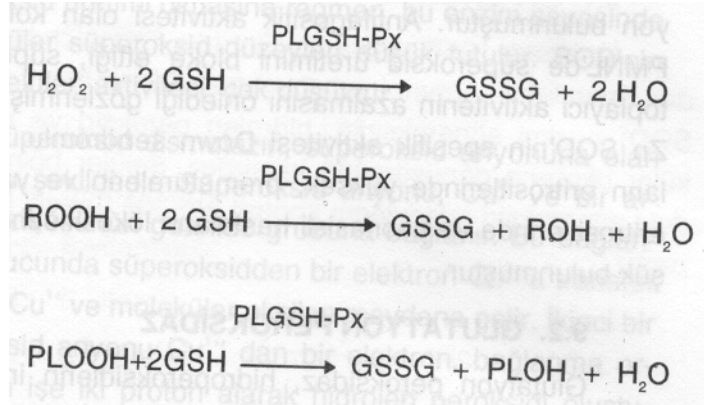
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) sitozolde bulunur, 4 selenyum atomu içerir, tetramerik yapıdadır.

Glutasyon peroksidaz (glutasyon: H_2O_2 oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9), hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir.



Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px) adı verilen bir enzim monomerik yapıdadır ve esas olarak membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger.



Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px) membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı korur.

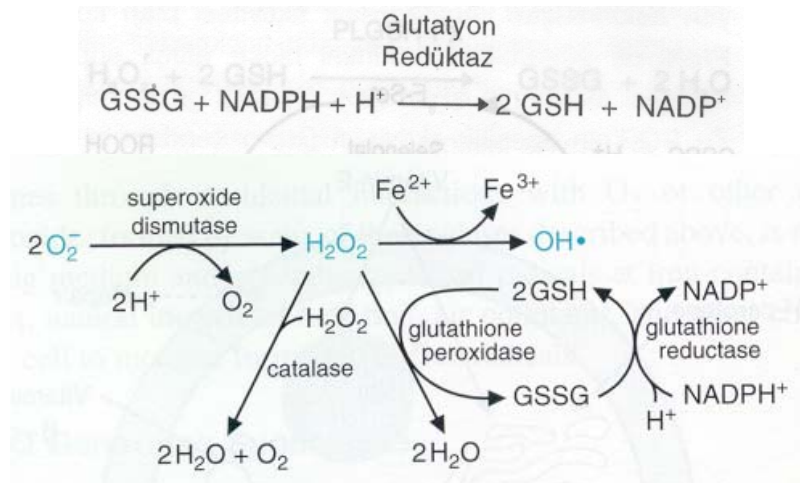
GSH-Px'ın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler.

GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Eritrosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelere düşük bulunmuştur.

Lökosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur.

Glutatyon redüktaz

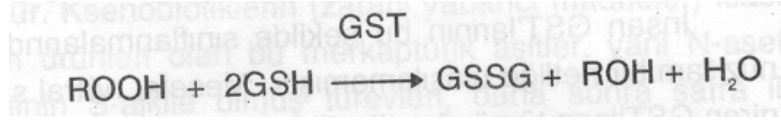
Glutatyon redüktaz, GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalize eder.



Glutasyon S-Transferazlar (GST)

Glutasyon S-transferazlar (GST), EC 2.5.1.18 kodlu ve her biri iki alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir.

Glutasyon S-transferazlar (GST), başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar.



Glutasyon S-transferazlar (GST) katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Bunlar hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. GST'lar, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizlerler.

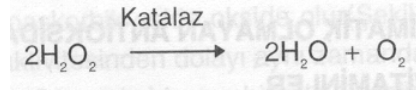
Serum GST konsantrasyon tayininin aminotransferazlardan (AST ve ALT) daha duyarlı bir hepatosellüler hasar indeksi sağladığı gösterilmiştir.

Katalaz (CAT)

Katalaz ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir.

Katalaz esas olarak peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur.

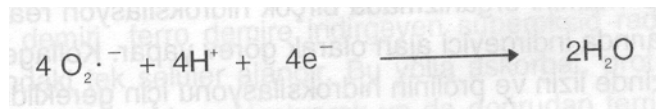
Katalaz hidrojen peroksidi (H_2O_2) suya ve oksijene parçalar.



Granulomatöz hücrelerde katalaz, hücreyi kendi solunumsal patlamasına karşı koruma işlevini de görür. Hücrede oluşan hidrojen peroksidi (H_2O_2) hidroksil serbest radikali (OH^\bullet) oluşumunu önlemek için ortadan kaldırır.

Mitokondriyal sitokrom oksidaz

Mitokondriyal sitokrom oksidaz solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi (O_2^-) detoksifiye eder.



Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyondur, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi (ATP) sağlanır. Ancak çoğu zaman süperoksit (O_2^-) üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin (O_2^-) zararlı etkilerine engel olurlar.

Vitamin C (askorbik asit)

Vitamin C (askorbik asit) organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak görev yapar Kollajen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir.

Tirozinden epinefrin sentezinin dopamin β -hidroksilaz basamağında görev alır. Tirozin yıkılımında p-hidroksi fenil pirüvatın homogentizata oksidasyonunda rol alır. Safra asitlerinin sentezindeki 7- α -hidroksilaz başlangıç basamağında rol alır. Lizinden karnitin sentezinde rol alır. Demirin emiliminde enzimatik olmayan bir yol ile indirgeyici olarak rol oynar, midede ferri demiri ferro demire indirger. İmmünite ve yara iyileşmesinde etkilidir.

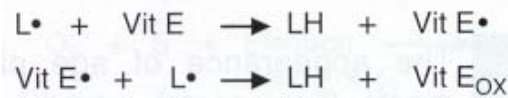
Askorbik asit, güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler.

Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali (OH^{\cdot}) oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir.

Vitamin C'nin fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir.

Vitamin E (α -tokoferol)

Vitamin E (α -tokoferol) çok güçlü bir antioksidandır, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Vitamin E zincir kırıcı antioksidan olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu, vitamin E vasıtasıyla sonlandırılabilir.



Vitamin E okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Vitamin E ve C verilmesinin, yaşlı kişilerde ortalama kan lipid peroksit konsantrasyonlarında bir azalma sağladığı saptanmıştır.

Glutatyon peroksidaz ile vitamin E, serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Glutatyon peroksidaz oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken vitamin E peroksitlerin sentezini engeller.

Vitamin E selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar. Vitamin E selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır.

Serbest radikallerin kanserin başlamasında rol aldığı ve vitamin E ile diğer antioksidanların antikanserojen etki göstererek kanserin yayılmasını ve tümörün büyümesini önlediği kaydedilmiştir.

Karotenoidler

Vitamin A'nın ön maddesi olan β -karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikallerini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü saptanmıştır.

Melatonin (MLT)

Melatonin en zararlı serbest radikal olan hidroksil serbest radikalini (OH^{\cdot}) ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır, günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir.

Melatonin hidroksil serbest radikali (OH[•]) ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür ki bunun da ortamdaki süperoksit radikalini (O₂⁻) tutarak antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir.

Melatoninin antioksidan olarak diğer bir özelliği lipofilik olmasıdır, hücrenin hemen bütün organallerine ve hücre çekirdeğine ulaşabilir ve böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir.

Serbest oksijen radikalleri oluşturmak suretiyle kansere sebep olan safrolün DNA üzerine hasar oluşturucu etkisinin, melatonin tarafından çok etkili şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir. Melatonin kanserin ilerleme ve gelişme safhalarını geciktirir.

Yaşlanma ile birlikte melatonin üretimi de azalır ki bunun da yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogenezinde önemli rolü olabileceği kaydedilmiştir.

Glutasyon (GSH)

Glutasyon (GSH) karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen bir tripeptittir. Glutasyon (GSH) çok önemli bir antioksidandır, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. Glutasyon (GSH) yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar.

Glutasyon (GSH) eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir.

Ürat

Normal plazma konsantrasyonunda ürat, hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler. Fakat lipid radikalleri üzerine etkisi yoktur. Ayrıca vitamin C oksidasyonunu engelleyici etkisi vardır.

Bilirubin

Bilirubin süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.

Albümin

Albümin LOOH ve HOCl toplayıcısıdır.

Seruloplazmin

Seruloplazmin olasılıkla SOD'a benzer mekanizmayla etki gösterir. Ferro demiri (Fe²⁺) ferri demire (Fe³⁺) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder.

Transferrin ve Laktoferrin

Transferrin ve laktoferrin dolaşımdaki serbest demiri bağlarlar.

Ferritin

Ferritin dokudaki demiri bağlar.

Sistein

Sistein süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.

Ebselen

Ebselen selenyumlu bir bileşiktir. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesini güçlendirir ve lipoksijenaz yolunu inhibe eder.

Sitokinler

Sitokinler başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler. Ancak proteolitik enzimleri aktive ettiklerinden dolayı zararlı da olabilirler.

Demir şelatörleri

Demir şelatörleri hücre içine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler, böylece Fenton reaksiyonunu ve sonuçta hidroksil radikali oluşumunu inhibe ederler. Bu özelliklerinden dolayı reperfüzyonda kullanılmalarının faydalı olduğu kaydedilmiştir.

Desferroksamin

Desferroksamin serbest Fe^{3+} 'ü bağlar.

Oksipürinol

Oksipüranol allopürinolün metabolitidir, doğrudan hidroksil radikali ve hipokloriti azaltıcı yönde etki eder.

Mannitol

Mannitol hidroksil radikalini toplayıcı etki gösterir.

Probukol

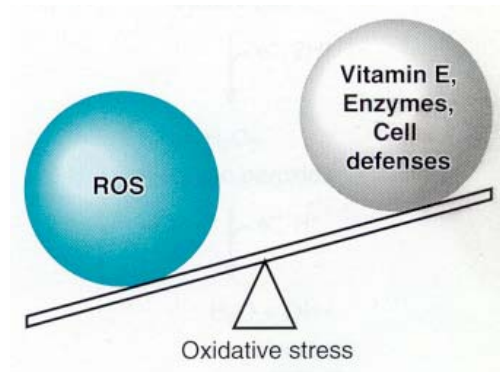
Probukol kan kolesterolünü düşürmede kullanılır. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu kırıcı etkisi vardır.

Oksidatif stres

Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluştuğunu biliyoruz. Bazen bu serbest radikal ara ürünler enzimlerin aktif yerinden sızmakta, moleküler oksijenle kazara etkileşerek serbest oksijen radikalleri oluşturmaktadırlar.

Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri (ROS), "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırılırlar.

Ancak bazen hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılardan daha fazla reaktif oksijen türleri (ROS) oluşabilir. Organizmada Hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılardan daha fazla reaktif oksijen türlerinin (ROS) meydana gelmesi **oksidatif stres** olarak tanımlanır.



Oksidatif stresin, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarıyla birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aterogenez, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, Duchenne tipi musküler distrofi, gebelik preeklampsisi, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, diabetes mellitus, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar, iskemi/reperfüzyon injürisi gibi durumların patogenezinde oksidatif stresin rolünden söz edilmektedir.

Oksidatif stres araştırmaları

Oksidatif stresin hastalıkların patogenezinde rolü anlaşıldıkça bu alandaki çalışmalar da yoğunlaşmıştır.

Oksidatif stres çalışmalarında serbest radikallerin artışı veya antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği araştırılmaktadır. Bunun için plazma, serum, eritrosit, doku örnekleri gibi çeşitli materyallerde analiz yapmaya uygun yöntemler geliştirilmiştir.

Serbest radikaller son derece reaktif ve kısa ömürlüdürler. Bu yüzden direkt olarak ölçülmeleri zordur. Serbest radikalleri direkt olarak ölçen tek analitik teknik spin rezonans spektrometrisidir. Spin rezonans spektrometrisi ileri teknik donanım gerektirir, ayrıca çok duyarlı olmaması ve mikromolar düzeyde sabit konsantrasyonlarda serbest radikaller gerektirmesi nedeniyle kullanımı yaygın değildir.

Serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi için bunların lipidlerle, proteinlerle ve DNA ile reaksiyonları sonucu oluşan çeşitli ürünlerin ölçümü gibi indirekt yöntemler kullanılır. Bu yöntemler arasında lipid peroksidasyonunun son ürünlerinin ölçümü en çok kullanılan yöntemdir.

Hidroksil serbest radikali (OH^\bullet) reaksiyon ürünlerinin ölçümü ile tayin edilebilir. Hidroksil serbest radikali (OH^\bullet) salisilik asitle reaksiyona girerek 2,3-dihidroksibenzoat (2,3-DHB) ve fenilalanin ile reaksiyona girerek o- ve m-tirozinleri oluşturur. Organizma sıvılarında 2,3-dihidroksibenzoat (2,3-DHB) veya o- ve m-tirozinlerin tespiti hidroksil serbest radikalının (OH^\bullet) artışını gösterir. Ancak bu teknik uygulanması zor ve sonuçları bakımından pek güvenilir değildir.

Lipid peroksidasyon ürünlerinin ölçülmesi

Oksidatif stres çalışmalarında, *organizmada serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi için* çeşitli biyolojik materyalde lipid peroksidasyonunun çeşitli ürünlerinin konsantrasyonları sıklıkla ölçülmektedir.

Serbest oksijen radikallerin başlattığı lipid peroksidasyon zincir reaksiyonu sonucunda lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve konjuge dienler oluşur. Lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve konjuge dienler de daha sonra alkan aldehitler, alken aldehitler, hidroksialken aldehitler, malondialdehit (MDA) ve uçucu hidrokarbonlar oluşturmak üzere parçalanırlar.

Serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi için lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) ölçümü, konjuge dienlerin ölçümü, MDA dışındaki aldehitlerin ölçümü, uçucu hidrokarbonların ölçümü, lipid peroksidasyonu fluoressan ürünlerinin ölçümü ve malondialdehit (MDA) ölçümü yapılabilir. Her bir tekniğin kendine göre zorlukları vardır ve hiçbir metodun lipid peroksidasyonunu tam bir doğrulukta ölçtüğü söylenemez. Ayrıca, oluşan ürünlerin miktarı çeşitli faktörlerden etkilenebileğinden bir tek ürün yerine birden fazla ürünü ölçmek idealdir.

➔ **Lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) ölçümü** çeşitli tekniklerle plazmada yapılır. Bu tekniklerden biri, hassas olmakla birlikte pahalı bir teknik olan gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) tekniğidir.

Plazma lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) ölçümü ticari olarak mevcut kitlerle de yapılabilir. Ancak bu ölçümlerin sonuçları diğer metotların sonuçlarıyla iyi bir korelasyon göstermemektedir.

➔ **Konjuge dienlerin ölçümü** biyolojik materyallerde hem proteinleri gibi bazı maddelerin varlığından dolayı zordur. Ayrıca normalde insan plazmasında mevcut olan düşük düzeylerdeki konjuge dienler de ölçümü zorlaştırırlar.

➔ **MDA dışındaki aldehitlerin ölçümü** genellikle zaman alıcı, pahalı ve rutin olarak kullanılmaya uygun olmayan metotları gerektirir.

➔ **Uçucu hidrokarbonların ölçümü** flame iyonizasyon dedektörlü gaz kromatografisi yöntemiyle, dışarı verilen solunum havasında yapılır. Yöntem oldukça hassastır ve olgulardan tekrar tekrar numune alınabilme avantajı vardır, fakat zaman alıcı ve pahalıdır. Ayrıca sigara dumanı ve egzoz gazı gibi eksojen kaynaklardan hidrokarbon kontaminasyonu riski vardır.

➔ **Lipid peroksidasyonu fluoresan ürünlerinin ölçümü** peroksidasyonun geç aşamasını yansıtır ve her laboratuvarında uygulanması zordur.

➔ **Malondialdehit (MDA) ölçümü** lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için en sık başvurulan testtir. MDA ölçümü en yaygın olarak tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemiyle yapılır. Bazı deneysel sistemlerde TBA yönteminin esas olarak MDA'nın kendisini ölçtüğü gösterilmiştir. Ancak çoğu sistemde bu test MDA için spesifik olmadığından tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddelerin (TBARS) ölçümü şeklinde ifade edilir. Saf lipidlerle yapılan çalışmalar ve hayvanlar üzerinde yapılan denemeler, TBARS ölçümü ile lipid peroksidasyonunu ölçen diğer metotlar arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermiştir.

TBARS ölçümü çok basit ve hızlı olmakla birlikte biyolojik materyallere uygulanmasında çeşitli problemler vardır. Numunede mevcut ya da reaksiyon sırasında açığa çıkan pigmentler kolorimetrik ölçümü interfere edebilirler. Ayrıca MDA dışındaki aldehitler de tiyobarbitürik asitle (TBA) renkli kompleks oluşturmak üzere reaksiyona girebilirler.

Serbest MDA'nın direkt tayini en güvenilir şekilde yüksek performans likit kromatografisi (HPLC) yöntemiyle yapılır. HPLC çok hassas ve hızlı bir metottur ve az numune gerektirir. Fakat teknik çok dikkatli numune hazırlığı gerektirir.

Antioksidan aktivitenin ölçülmesi

Oksitativ stres çalışmalarında, *organizmada antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliğini araştırmak için* çeşitli biyolojik materyalde çeşitli antioksidanların aktiviteleri veya konsantrasyonları sıklıkla ölçülmektedir. Enzim olan ve enzim olmayan birçok antioksidan çeşitli yöntemlerle ölçülmektedir.

➔ **Redüe glutasyon (GSH) ölçümü** eritrositlerde, kolorimetrik yöntemle yapılır. Bunun için EDTA'lı veya heparinli tam kan alınır. Tam kan, 4 °C'de 1 gün stabildir.

➔ **Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi ölçümü** eritrositlerde, UV yöntemle yapılır. Bunun için EDTA'lı tam kan alınır. Tam kan, 4 °C'de 20 gün stabildir.

➔ **Glutasyon redüktaz aktivitesi ölçümü** eritrositlerde, kolorimetrik yöntemle yapılır. Bunun için EDTA'lı veya heparinli tam kan alınır. Tam kan, 4 °C'de 20 gün stabildir.

➔ **Glutasyon S-tansferaz aktivitesi ölçümü** için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

➔ **Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü** eritrositlerde, kolorimetrik yöntemle yapılır. Bunun için EDTA'lı veya heparinli tam kan alınır.

➔ **Katalaz aktivitesi ölçümü** eritrositlerde, titrimetrik yöntemle yapılır. Bunun için EDTA'lı veya heparinli tam kan alınır.

➔ **β-karoten ölçümü** serumda, HPLC ile yapılır. Işıktan korunmalıdır ve serum hemolizli olmamalıdır. -70 °C'de yıllarca stabildir.

➔ **Vitamin C (askorbik asit) ölçümü** oksalatlı, EDTA'lı veya heparinli plazmada, serumda, lökositlerde kolorimetrik yöntemle ve HPLC ile yapılabilir. Plazma ve serum hemolizli olmamalı, lökositler eritrositlerle kontamine olmamalıdır.

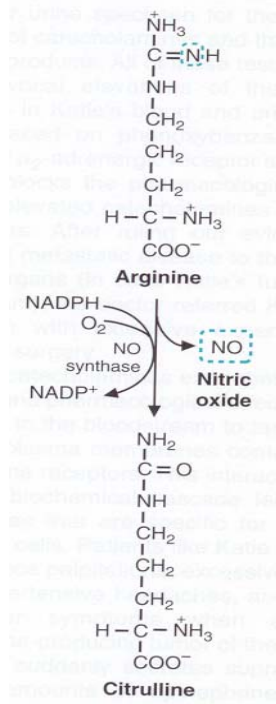
➔ **Vitamin E (α-tokoferol) ölçümü** serum veya heparinli plazmada, HPLC ile yapılır. Numune açlık fazında alınmalı ve ışıktan korunmalıdır.

► **Melatonin ölçümü** son zamanlarda güncelleşmiş görünmektedir.

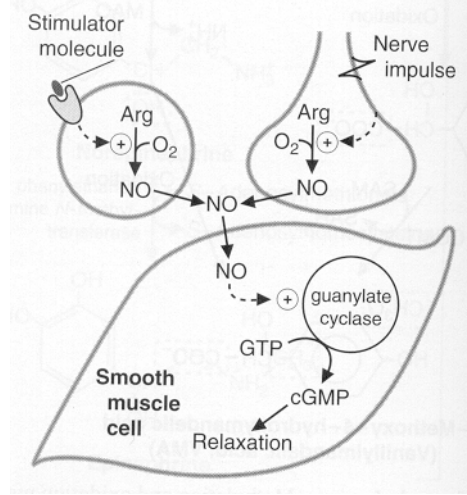
Nitrik oksit (NO•)

Nitrik oksit (NO•) hem fizyolojik hem patofizyolojik süreçlerde önemli bir role sahip serbest radikaldir.

NO• sentezi bazı hücrelerde bir reseptöre bir stimülörün bağlanmasına veya nöronlarda bir sinir uyarısına yanıt olarak meydana gelir. Nitrik oksit (NO•) muskarinik veya histamin reseptörleri gibi çeşitli reseptörlerin aktivasyonu sonucu L-arjinin ve oksijenden, **nitrik oksit sentaz (NOS, EC 1.14.13.39)** etkisiyle sentezlenir.



Nitrik oksit (NO•) sentezinin insanda vasküler tonüsün düzenlenmesinde önemli rol oynadığı, kan basıncı ve böbrek fonksiyonunun kontrolünde kesin bir role sahip olduğu bilinmektedir. Nitrik oksit (NO•) vasküler endotelial hücrelerde oluşturulan önemli bir vazodilatatördür. NO• düz kas hücrelerine girer ve 3',5'-siklik GMP (cGMP) oluşturmak üzere solubl guanilat siklazı stimüle eder. Böylece hücrede cGMP konsantrasyonu artar. Düz kas hücrelerinde cGMP, bir veya daha fazla protein kinazı cAMP gibi aktive eder. Aktive olan protein kinazlar düz kasın relaksasyonu ve ardından damarların dilatasyonundan sorumludurlar.



Nitrik oksit (NO^\bullet) korpus kavernosumu kan ile doldurmak için düz kas relaksasyonunu uyaran bir nörotransmitter olarak etki ederek penil eraksiyonu uyarır

Nitrik oksit sentaz (NOS) sinir dokuda, vasküler endotelde, trombositlerde ve diğer dokularda bulunur. Nitrik oksit sentazın (NOS), nöronal NOS (tip I, nNOS), endotelial NOS (tip III, eNOS) ve indüklenebilir NOS (tip II, iNOS) olmak üzere farklı lokalizasyon ve düzenlenmeye sahip üç izoenzimi vardır.

Nöronal NOS (tip I, nNOS) ve endotelial NOS (tip III, eNOS), Ca^{2+} ve kalmodulin bağımlı esas izoformlardır. Nöronal NOS (tip I, nNOS), nöral iletide foksiyon görür.

Endotelial NOS (tip III, eNOS) böbreklerde bulunur. Endotelial NOS (tip III, eNOS) vasıtasıyla oluşturulan nitrik oksit (NO^\bullet), vasküler düz kas hücrelerinin relaksasyonu için en önemli sinyaldir.

İndüklenebilir NOS (tip II, iNOS) normal şartlar altında bulunmaz. İnflamasyon veya enfeksiyon durumlarında sitokinler veya endotoksinler tarafından indüklenir ve uzun dönemde bol miktarda üretilir.

iNOS hepatositler, makrofajlar, nötrofiller, düz kas hücreleri, kondrositler gibi birçok hücre tipinde indüklenebilir. iNOS vasıtasıyla oluşturulan NO^\bullet , antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve bu nedenle nonspesifik konak savunma sisteminin önemli bir parçasıdır.

Sepsis, astım, romatoid artrit, aterosklerotik lezyonlar, tüberküloz, inflamatuvar bağırsak hastalığı, Helicobacter pylori'nin yol açtığı gastrit, allogreft rejeksiyonu, Alzheimer hastalığı ve multipl skleroz gibi geniş bir hastalık grubunda iNOS'un arttığı saptanmıştır. NO^\bullet un devamlı ve aşırı üretilmesinin, bu hastalıkların semptomlarının bir kısmından sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Nitrik oksidin (NO^\bullet) oksidatif etkileri

Nitrik oksit (NO^\bullet) Fe-S proteinlerinden demiri çıkararak yerine kendisi bağlanır, böylece Fenton reaksiyonunu stimüle eder ve bu mekanizma ile karsinogenezde rol oynar.

Nitrik oksitin süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit (O_2^-) radikaliyle etkileşmesi sonucu peroksinitrit (ONOO^-) oluşur. Böylece nitrik oksitin fizyolojik etkisi inhibe edilir, oksidatif etkisi ortaya çıkar. Vasküler tonüsün düzenlenmesi için süperoksit (O_2^-) ve nitrik oksit (NO^\bullet) arasındaki fizyolojik dengenin önemli olduğu ileri sürülmektedir.

Peroksinitrit, nitrik oksit toksisitesinin başlıca sorumlusudur. Peroksinitritin proteinlere doğrudan zararlı etkileri vardır ve azot dioksit (NO_2^\bullet), hidroksil radikali (OH^\bullet), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşür.

Peroksinitrit, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilir. NO^\bullet radikalinin stabil son ürünlerin nitrit ve nitratıdır. Plazma gibi çoğu vücut sıvısında nitritin çoğu nitrate dönüşmüştür.

Organizmada nitrik oksit (NO^\bullet) artışını araştırma çalışmaları

Organizmada nitrik oksit(NO^\bullet) artışının belirlenmesi için birçok NO^\bullet veya metabolitlerini ölçüm yöntemi geliştirilmiştir.

Gerçek zamana dayanan NO^\bullet üretiminin tayini biopsi örnekleri veya lökositler gibi canlı biyolojik örneklerde yapılabilir, ancak kompleks teknikleri gerektirir.

NO^\bullet radikalinin stabil son ürünleri olan nitrit ve nitratın tayini için geliştirilen metotlar, hem taze hem saklanmış plazma, serum, idrar, safra, sinovyal sıvı, balgam, tükürük, serebrospinal sıvı gibi vücut sıvılarına uygulanabilir.

KAYNAKLAR

1. Dawn BM, Allan DM, Colleen MS. Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland.(1996).
2. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. Konya. (1995).
3. Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Tests. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania. (1995).
4. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania. (1999).

EKLER

① ➔ *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999 Jun;108(6):564-8

Lipid peroxides in middle ear fluid after acute otitis media in guinea pigs.

Takoudes TG, Haddad J Jr

Division of Pediatric Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Columbia-Presbyterian Medical Center, Babies and Children's Hospital, New York, New York 10032, USA.

Oxygen free radical damage has been demonstrated in the middle ear mucosa of a guinea pig model of acute otitis media (AOM). Potential sources of free radicals include both neutrophils responding to infection and *Streptococcus pneumoniae*, a common AOM pathogen. This project was conducted to examine the middle ear fluid in a guinea pig model of AOM for evidence of elevated lipid peroxide (LPO) as a marker of free radical damage. Twenty-one guinea pigs were injected transtympanically with bacteria into the left (infected) middle ear cavity and sterile saline into the right (control) middle ear. Middle ear fluid was recovered on postoperative day 5. The fluid was weighed and analyzed for quantity of LPO. Results indicated an increased absolute level of LPO, as well as an increased level of LPO divided by the weight of the fluid recovered. Histologic examination confirmed leukocyte infiltration and mucosal edema that were consistent with mucosal damage. While free radical damage to the middle ear mucosa in a guinea pig model of AOM is well documented, this is the first study to demonstrate evidence of free radical damage in middle ear fluid. These results are relevant because they correlate mucosal damage with lipoperoxidation in fluid. Additionally, this serves as an important precursor to human studies, since middle ear fluid is readily available in patients with otitis media.

② ➔ *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999 May;120(5):638-42

Evidence of oxygen free radical damage in human otitis media.

Takoudes TG, Haddad J Jr

Division of Pediatric Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Babies & Children's Hospital of New York, Columbia-Presbyterian Medical Center, New York 10032, USA.

Recent work with a guinea pig model of otitis media has demonstrated evidence of oxygen free radical damage to the middle ear mucosa. However, the relevance of an animal model to

human disease is uncertain. Accordingly, the following pilot study was conducted to examine human middle ear fluid for lipid hydroperoxides as evidence of free radical damage. Thirty-five specimens of middle ear fluid from children with chronic otitis media were collected and described as mucoid (n = 19), purulent (n = 10), or serous (n = 6); specimens were weighed and analyzed for lipid hydroperoxide content. The results demonstrated the presence of lipid hydroperoxide in all 3 types of middle ear fluid. Additionally, there was a statistically significant elevation of total lipid hydroperoxide content in mucoid effusions compared with serous effusions, as well as a significant elevation of lipid hydroperoxide divided by weight of purulent effusions compared with serous effusions. This is the first study to document free radical damage in human otitis media.

③ ➔ *Laryngoscope* 1998 Apr;108(4 Pt 1):524-30

Lipoperoxidation as a measure of free radical injury in otitis media.

Haddad J Jr

Division of Pediatric Otolaryngology, Columbia-Presbyterian Hospital, New York, New York 10032, USA.

Free radical damage, as evidenced by lipoperoxidation, has previously been demonstrated to contribute to the inflammatory changes associated with acute otitis media. The present study was undertaken to evaluate whether lipoperoxidation continues to be present for a period of time after middle ear infection. Eighty-two 300- to 400-g guinea pigs were injected with *Streptococcus pneumoniae* in the left ear and sterile saline in the right ear as a control. Animals were examined and sacrificed on day 5, 10, 20, or 30; middle ear mucosa was harvested and assayed for lipid hydroperoxide content. A statistically significant increase in lipoperoxidation was seen at each time point studied, compared with controls. Lipoperoxidation was highest at days 5 and 10; a significant decrease was seen at days 20 and 30. Histologic sections of middle ear mucosa of two animals per group were prepared and evaluated for inflammation. These results demonstrate that lipoperoxidation may contribute to middle ear inflammation for a significant period of time after acute infection; the findings are discussed in light of other work on the role of free radicals in otitis media.

④ ➔

Evidence of oxygen radical injury in experimental otitis media.

Parks RR, Huang CC, Haddad J Jr

Department of Otolaryngology, Columbia Presbyterian Medical Center, New York, N.Y. 10032.

Free radicals have been implicated in the pathogenesis of an increasing number of diseases and inflammatory states. They may cause tissue damage by their chemical modification of proteins, carbohydrates, nucleotides, and lipids. Lipid peroxidation occurs as a consequence of free radicals acting on the polyunsaturated fatty acids of cellular membranes. To determine if free radicals play a role in the pathogenesis of otitis media, lipid peroxides and their by-products were assayed in the mucosa of a guinea pig model of otitis media. Both lipid hydroperoxide (LPO) and malondialdehyde (MDA) were measured in the tissues of the middle ear mucosa. Comparisons were made between an infected and a control group. Both LPO and MDA were found to be significantly elevated ($P < .01$ and $P < .05$, respectively) in the infected mucosa. Correlation of the biochemical data was made with histologic studies.

The significance of these findings as well as suggestions for future experimentation are addressed.

⑤ ➔ *Laryngoscope* 1997 Feb;107(2):206-10

Hydrogen peroxide in acute otitis media in guinea pigs.

Takoudes TG, Haddad J Jr

Division of Pediatric Otolaryngology--Head and Neck Surgery, Babies and Children's Hospital of New York, New York, 10032, USA.

Evidence has emerged that oxygen free radicals contribute to middle-ear mucosa damage in acute otitis media (AOM). *Streptococcus pneumoniae* is the most common pathogen in AOM and produces hydrogen peroxide, a free radical intermediate, as it grows. To better characterize the mechanism of free radical damage in AOM, an experiment was conducted to examine the production of hydrogen peroxide. Thirty-two guinea pigs were injected transtympanically with bacteria in the left (infected) middle ear and sterile saline into the right (control) middle ear. Middle-ear fluid was removed and analyzed for quantity of hydrogen peroxide. Results indicated significantly greater hydrogen peroxide levels in infected versus control middle-ear fluid at 6, 12, and 24 h. Likely sources of hydrogen peroxide include both the neutrophil response to infection and pneumococcal growth and death.

⑥ ➔

Middle ear catalase distribution in an animal model of otitis media.

Parks RR, Huang CC, Haddad J Jr

Department of Otolaryngology, Columbia Presbyterian Medical Center, New York, NY 10032, USA.

Increasing evidence implicates free radicals in the pathogenesis of inflammatory disease, including otitis media. The anti-oxidant enzymes catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase protect tissues from the destructive effects of free radicals. Our previous work has shown depressed levels of superoxide dismutase in the infected middle ears of a guinea pig model of otitis media in comparison with normal control ears. We studied the distribution and relative abundance of catalase in the middle ear of this animal model in an effort to elucidate the role free radicals play in the pathogenesis of otitis media. Catalase distribution was mapped immunohistochemically in the middle ears of guinea pigs with induced streptococcus otitis media, and compared with normal control ears. In the control ears, catalase was localized to the epithelium of the middle ear mucosa, with scant distribution in the submucosa. The infected ears demonstrated inflammatory cell invasion with hyperemia and submucosal edema. Catalase was localized to the epithelium and had scant distribution in the submucosa. This distribution was similar to that found previously with superoxide dismutase. Enzyme-linked immunosorbent assay of catalase demonstrated a mean value of 1.00 +/- 0.06 microgram/mg protein in the control ears, and 1.06 +/- 0.12 microgram/mg in the infected ears, but these two values were not statistically different.

⑦ ➔ *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995;252(3):153-8

Superoxide dismutase in an animal model of otitis media.

Parks RR, Huang CC, Haddad J Jr

Department of Otolaryngology, Columbia Presbyterian Medical Center, Babies Hospital North, New York, NY 10032, USA.

Cu, Zn superoxide dismutase (SOD) is a metalloprotein that catalyzes the dismutation of the superoxide anion into O₂⁻ and H₂O₂, and therefore functions to maintain a low intracellular concentration of an otherwise toxic metabolite of oxygen. SOD protects living tissue from the destructive effects of free radicals. Increasing evidence implicates free radicals, including the superoxide radical (O₂⁻), in the pathogenesis of disease, including otitis media. In an effort to elucidate the role free radicals play in the pathogenesis of otitis media, SOD was localized immunocytochemically to determine its cellular distribution in specimens of guinea pig middle ear. In normal ears, SOD was found concentrated in the epithelium of the middle ear mucosa. Low quantities were characteristic of connective tissue, bone, and cartilage. In streptococcus-infected ears, SOD localized similarly, concentrating in the epithelium. The infected ears had extensive submucosal edema which stained poorly and appeared to have less SOD than did normal ears. This was confirmed by an assay using laser densitometry of Western blots to quantify the amount of SOD in the mucosa of normal versus infected middle ears. This demonstrated a value of SOD in normal mucosa of 1.77 +/- 0.48 micrograms/mg of protein compared with 1.02 +/- 0.28 micrograms/mg in the infected mucosa. The two groups were significantly different at P < 0.05. These findings are discussed, and suggestions for future experimentation addressed.

⑧ ➔ *Am J Physiol* 1999 Dec;277(6 Pt 1):L1089-95

Superoxide anion impairs Ca(2+) mobilization in cultured human nasal epithelial cells.

Koyama T, Oike M, Komiyama S, Ito Y

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan.

We examined the effects of superoxide anion (O₂⁻) on the intracellular Ca(2+) concentration in cultured human nasal epithelial cells. The cells were exposed to O₂⁻ by pretreatment with xanthine (X) and xanthine oxidase (XO); control cells were treated with X alone. When Ca(2+)-containing Krebs solution was reperfused in the thapsigargin-treated, store-depleted cells, reapplication-induced intracellular Ca(2+) concentration elevation was significantly smaller in X/XO-treated cells than in the control cells, suggesting that O₂⁻ impairs Ca(2+) release-activated Ca(2+) entry (CRAC). Bath application of ATP induced a steep Ca(2+) transient in both control and X/XO-treated cells. However, the concentration-response curve of the ATP-induced Ca(2+) transient was shifted to a higher concentration in X/XO-treated cells. The impairments of CRAC and ATP-induced Ca(2+) transient induced by X/XO were reversed by superoxide dismutase. Furthermore, all these X/XO-induced effects were also observed in cells pretreated with pyrogallol, also an O₂⁻ donor. These results indicate that O₂⁻ impairs at least two mechanisms involved in Ca(2+) mobilization in human nasal epithelial cells, i.e., CRAC and ATP-induced Ca(2+) release.

⑨ ➔ *Auris Nasus Larynx* 1999 Apr;26(2):159-63

Effects of free radicals on ciliary movement in the human nasal epithelial cells.

Min YG, Ohyama M, Lee KS, Rhee CS, Oh SH, Sung MW, Yun JB, Jung IH

Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Seoul National University College of Medicine, South Korea.

OBJECTIVE: There have been few reports on the effects of free oxygen radicals on ciliary mobility of nasal respiratory epithelial cells. The aim of this study was to determine the effects of free radicals and antioxidants on human nasal epithelial cells (HNECs) using video-

computerized analysis. METHODS: Human nasal epithelial cells were obtained from the nasal cavity of normal volunteers. Ciliary beat frequency (CBF) was calculated as the mean value of ten randomly selected cells. The proportion of the area with normal CBF (above 8 Hz) was calculated from 10 randomly selected sites per specimen. Free radicals were produced by xanthine-xanthine oxidase enzymatic system. The generation of free radicals was confirmed by chemoilluminometer. CBF and the proportion of the area with normal CBF were measured at every 5 min for 30 min after the addition of enzyme. For the evaluation of the antioxidant effects on free radical-mediated ciliary slowing in HNECs, cells were incubated in superoxide dismutase solution (300 unit/ml) for 30 min and 3-aminobenzamide (5 mM). RESULTS: Superoxide produced by 0.4 mM xanthine and 400 miliunit/ml xanthine oxidase decreased CBF (7.71 +/- 1.91 Hz). A total of 2 min later, ciliary slowing was evident (3.87 +/- 1.10 Hz). Regarding the changes in proportion of epithelial area that showed normal CBF experimental group showed a significant decrease in percentage of epithelial area with normal CBF over time. Superoxide dismutase prevented ciliary slowing (8.76 +/- 0.99 Hz). Moreover, 3-aminobenzamide, an inhibitor of the DNA repair enzyme poly-ADP ribose polymerase, prevented inhibition of CBF (8.32 +/- 0.61 Hz). CONCLUSIONS: These results suggest that oxygen-mediated damage to DNA may be the mechanism of the deterioration effects of oxygen radicals on the ciliated respiratory nasal epithelium.

⑩ ➡ *Nitric Oxide* 1999 Jun;3(3):235-43

Nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide production in brain mitochondria after haloperidol treatment.

Arnaiz SL, Coronel MF, Boveris A

School of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Argentina.
slarnaiz@ffyb.uba.ar

Inhibition of mitochondrial respiration and free radical induction have been suggested to be involved in haloperidol neurotoxicity. In this study, mice were injected i.p. with haloperidol, according to two different treatments: (a) a single injection (1 mg/kg), sacrificed 1 h after the injection (single-dose model); and (b) two injections (1 mg/kg each), sacrificed 24 h after the first dose (double-dose model). Determinations of oxygen consumption and hydrogen peroxide (H₂O₂) production rate were carried out in isolated brain mitochondria. Nitric oxide (NO) and superoxide (O₂⁻) production rates were measured in submitochondrial particles (SMP). Single-dose haloperidol treatment produced a 33% inhibition in malate-glutamate-dependent respiration, while no significant changes were found after double-dose treatment. NO production was inhibited by 39 and 54% in SMP from haloperidol-treated mice (single- and double-dose treatments, respectively) (control value: 1.6 +/- 0.2 nmol/min mg protein). NO steady-state concentration was estimated at about 16.5 nM and was decreased by 40% by haloperidol treatment. Increases of 105 and 54% were found in succinate-supported O₂⁻ and H₂O₂ production rates, respectively, after haloperidol single-dose treatment. Haloperidol treatment generated a 248% increase in SMP O₂⁻ production rate when measured in the presence of NADH plus rotenone. Our results suggest that haloperidol neurotoxicity would be mediated by a decreased mitochondrial NO production, a decreased intramitochondrial NO steady-state concentration, and by an inhibition of mitochondrial electron transfer with enhancement of O₂⁻ and H₂O₂ production. This inhibition does not seem to be caused by increased NO or ONOO⁻ formation.

Exhaled nitric oxide concentrations during treatment of wheezing exacerbation in infants and young children.

Baraldi E, Dario C, Ongaro R, Scollo M, Azzolin NM, Panza N, Paganini N, Zacchello F

Departments of Pediatrics and Anesthesia and Intensive Care, University of Padova, School of Medicine, Padova, Italy. eugi@child.pedi.unipd.it

While it is known that exhaled nitric oxide (ENO) is increased in adults and school children with asthma exacerbation probably as an expression of disease activity, no studies have investigated whether this phenomenon also occurs in infants and young children with recurrent wheeze exacerbation. We measured ENO in 13 young children (mean age 20.2 mo) with recurrent wheeze (Group 1) during an acute episode and after 5 d of oral prednisone therapy. ENO was measured also in nine healthy control subjects (Group 2) (mean age 16.9 mo) and in six children with a first-time viral wheezy episode (Group 3) (mean age 11 mo). To measure ENO, infants inhaled NO-free air via a face mask from a reservoir and, through a nonbreathing valve, exhaled in a collecting bag that was analyzed by chemiluminescence. To address the question of whether the levels of ENO collected in the bag are a reflection of the pulmonary airway, ENO determinations were performed in two healthy infants before and after tracheal intubation for elective surgery. During the acute episode of wheezing the mean (\pm SEM) value of ENO in children with recurrent wheeze (Group 1) was 14.1 \pm 1.8 ppb, almost threefold higher than in healthy control subjects (5.6 \pm 0.5 ppb, $p < 0.001$). After steroid therapy we found a mean fall of 52% in ENO (5.9 \pm 0.7 ppb, $p < 0.01$) compared with baseline values. ENO values measured before and after intubation in two infants were 6 ppb and 5 ppb in one child and 7 ppb and 6 ppb in the other one. The mean value of ENO of children with first-time wheeze (Group 3) was 8.3 \pm 1.3 ppb, significantly lower ($p < 0.05$) than the value of children with recurrent wheeze (Group 1). In conclusion, we describe a method to measure ENO in young children and show that infants with recurrent wheeze have elevated levels of ENO during exacerbation that rapidly decrease after steroid therapy. This suggests that, in these children, airway inflammation could be present at a very early stage.