

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE ANTIOKSİDANLAR

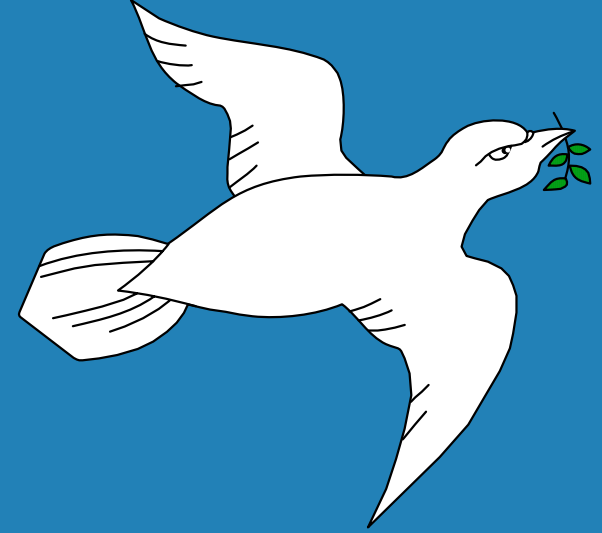
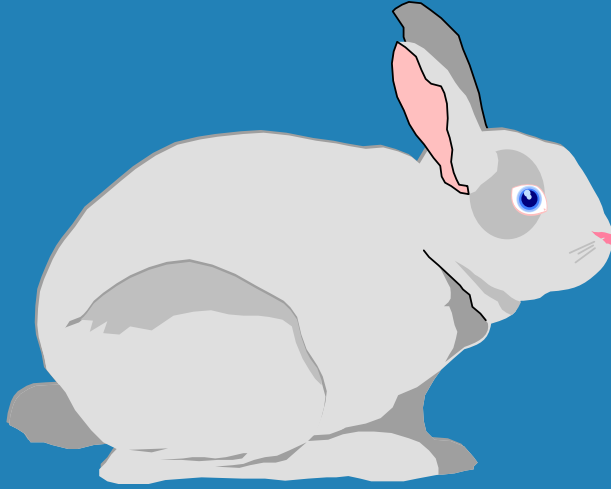
**Yard.Doç.Dr. Mustafa ALTINIŞIK
ADÜ Tıp Fakültesi Biyokimya AD**

AYDIN-2000

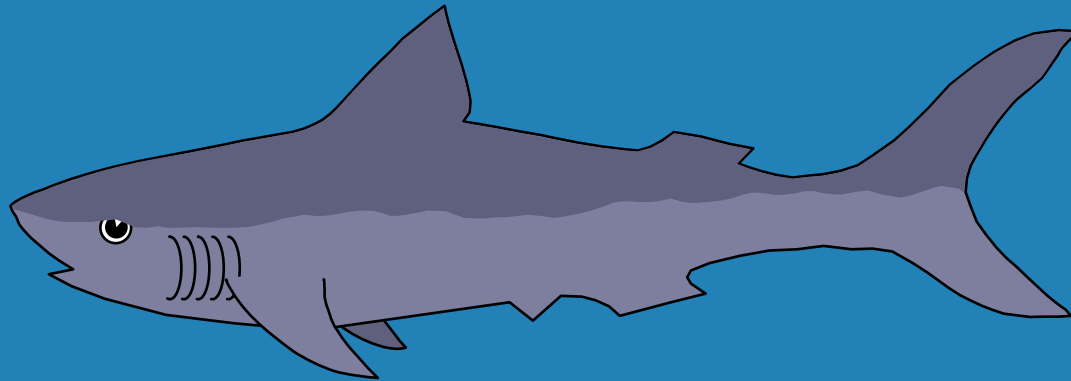
Sunum Planı

- **Oksijen, reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikaller**
- **Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) kaynağı**
- **Serbest oksijen radikallerinin etkileri**
- **Serbest radikallere karşı hücreSEL savunma (antioksidanlar)**
- **Oksidatif stres ve incelenmesi**
- **Nitrik oksit (NO•)**

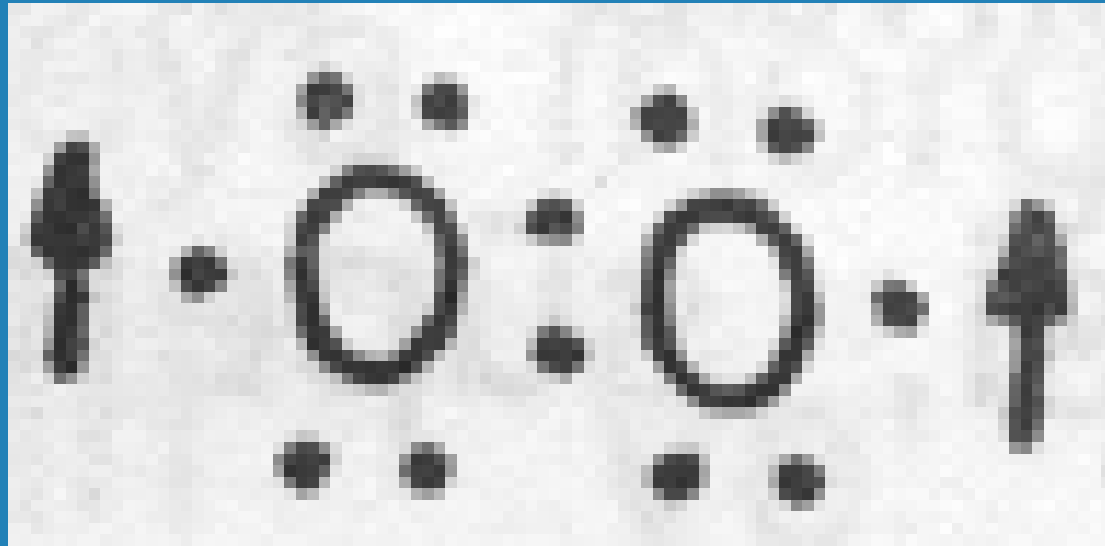
Yaşam için oksijen (O₂)



O₂



Moleküler oksijenin özellikleri



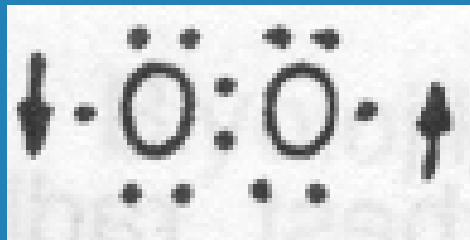
biradikal
(diradikal)



Singlet oksijen

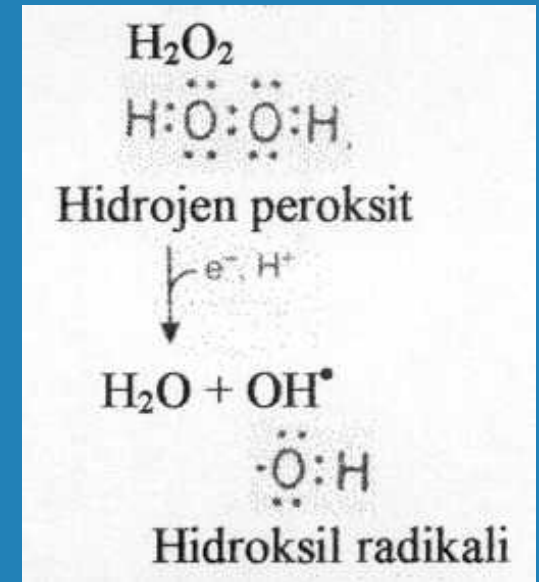
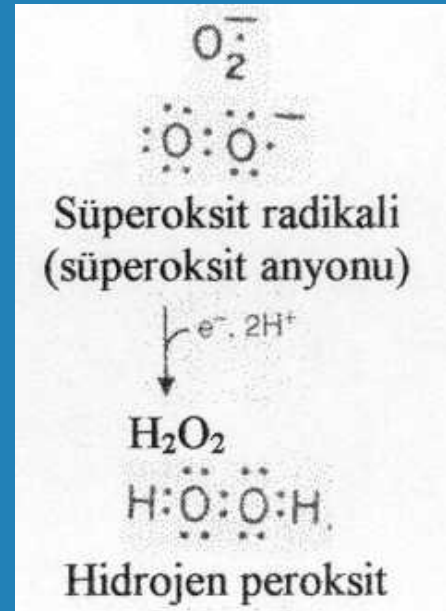
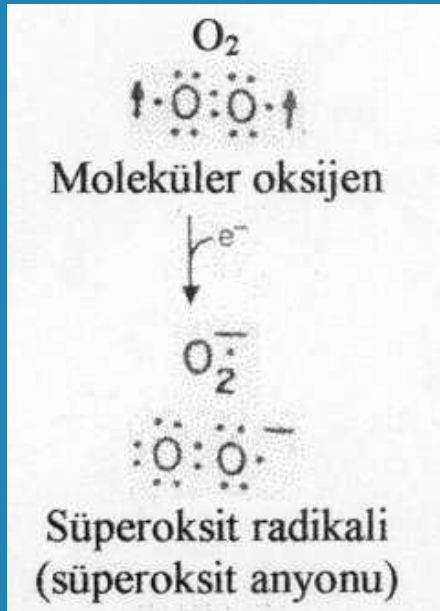


Delta O₂



Sigma O₂

Reaktif oksijen türleri (ROS)



serbest radikaller





∞ karbon merkezli organik radikaller (R^\bullet),
(L^\bullet)

∞ peroksit radikalleri (ROO^\bullet), (LOO^\bullet)

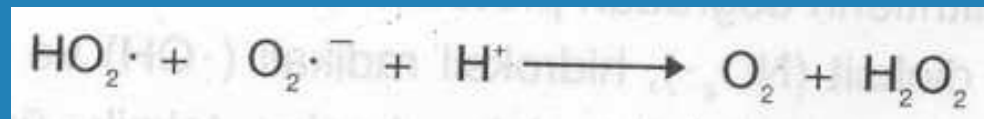
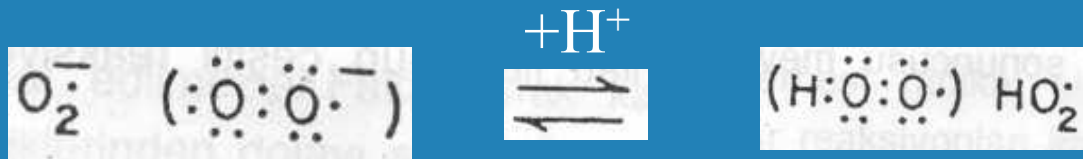
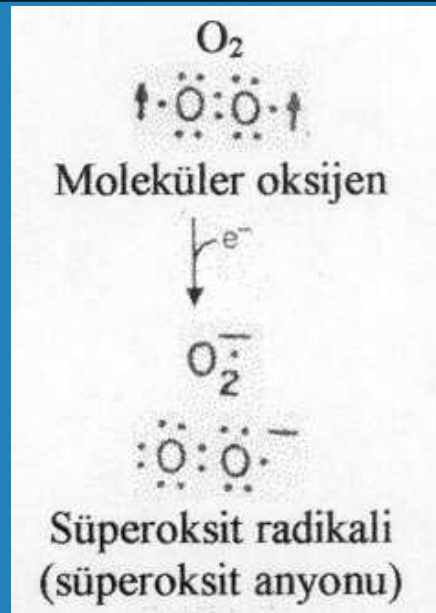
∞ alkoksi radikalleri (RO^\bullet)

∞ tiyil radikalleri (RS^\bullet)

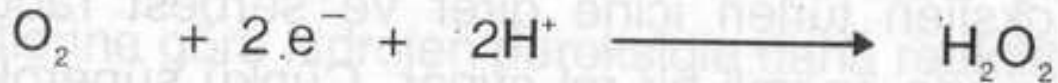
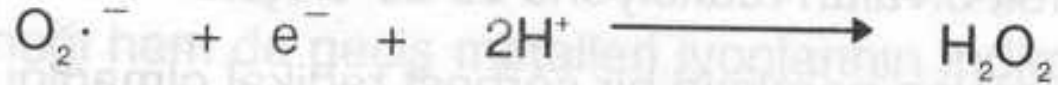
∞ sülfenil radikalleri (RSO^\bullet)

∞ tiyil peroksit radikalleri (RSO_2^\bullet)

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)



Hidrojen peroksit (H_2O_2)

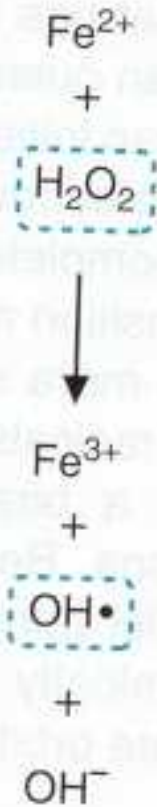


SOD

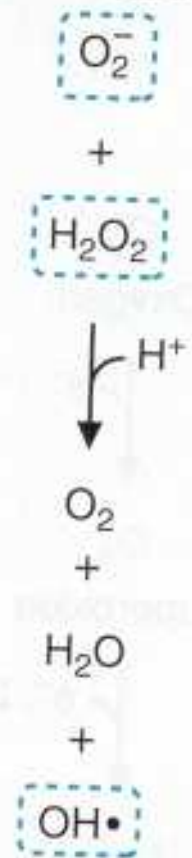
(Süperoksit dismutaz)

Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu

The Fenton reaction

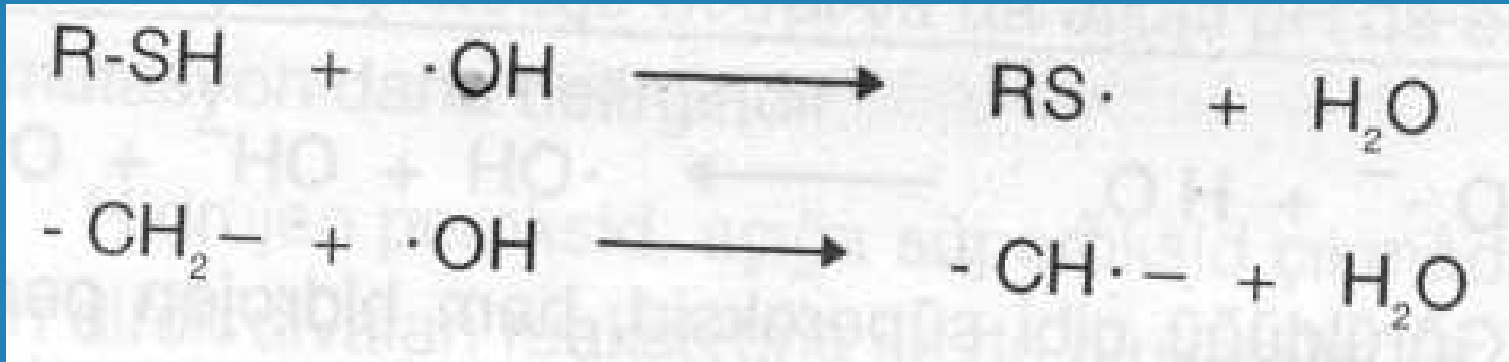


The Haber–Weiss reaction



Hidroksil radikali (OH•)

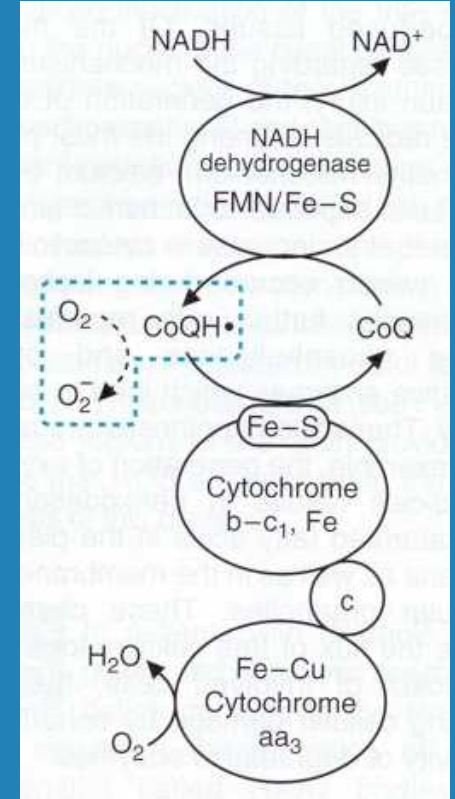
Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur.




olasılıkla reaktif oksijen türlerinin (ROS) en güçlüsü

Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) kaynağı

★ Mitokondriyal elektron transport zincirinden elektron sızıntısı

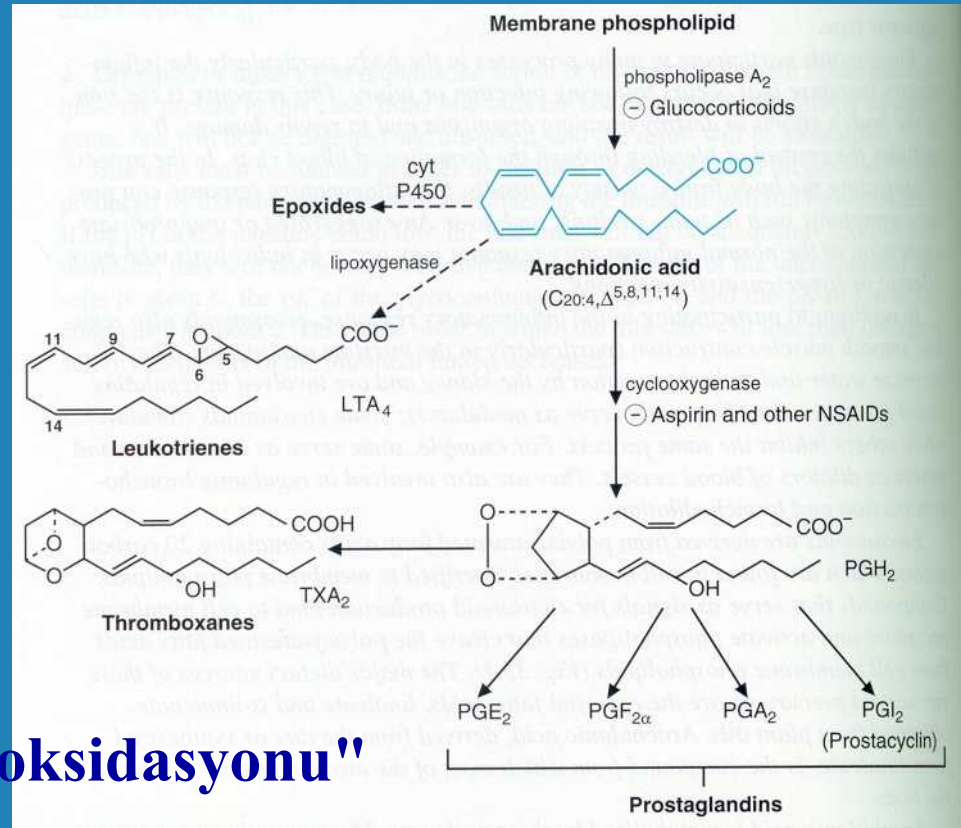


- 
- 🕒 **Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda membrana bağlı sitokromların oksidasyonu**
 - 🕒 **Ksantin oksidazın katalitik döngüsü**
 - 🕒 **Dihidroorotat dehidrojenaz, flavoprotein dehidrojenaz, amino asit oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimlerin katalitik döngüsü**



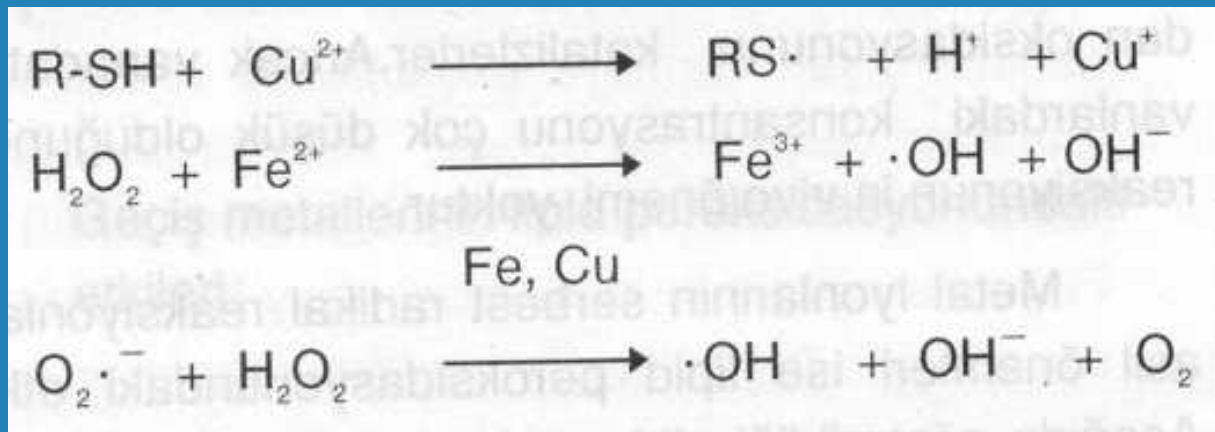


Araşidonik asit metabolizması

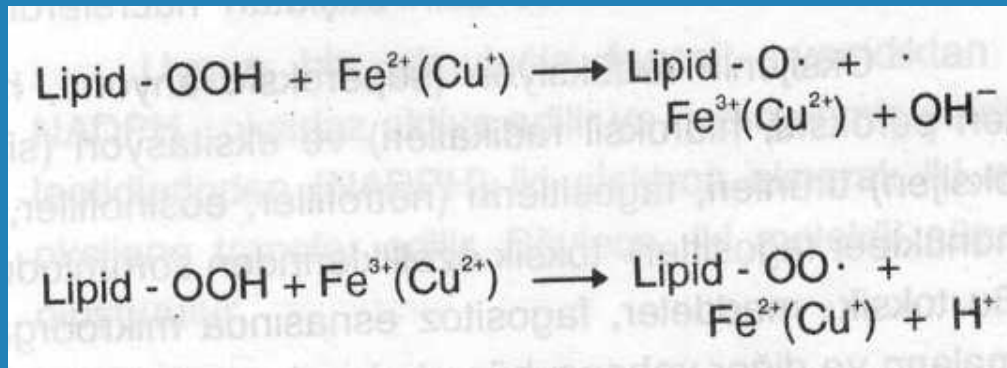


"enzimatik lipid peroksidasyonu"

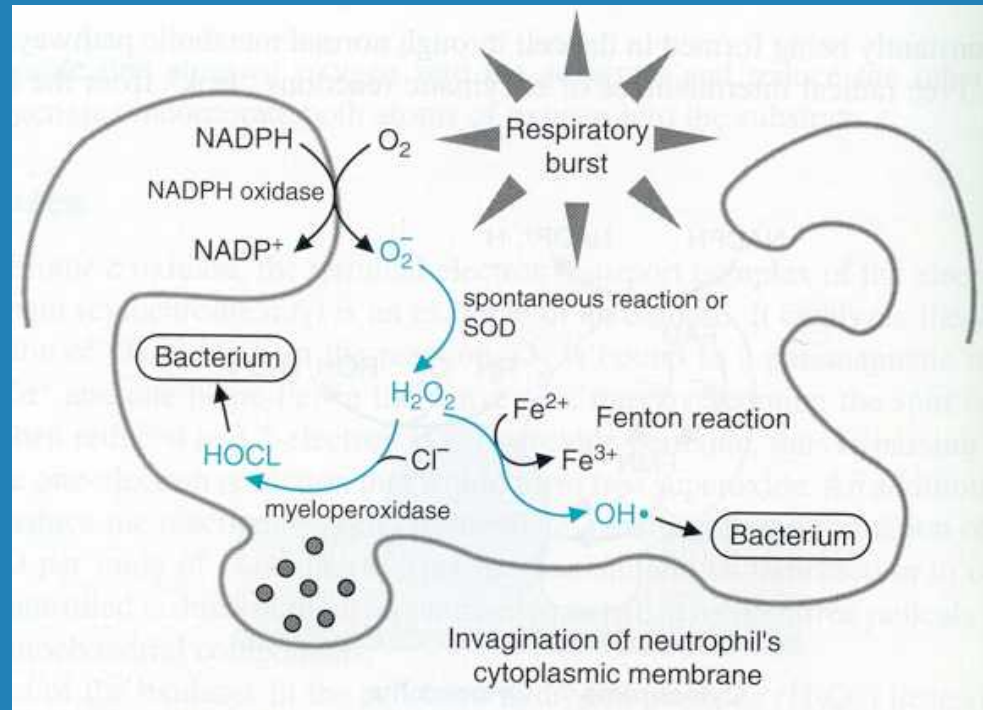
🕒 **Demir ve bakır, tiyollerden tiyil sentezini, H_2O_2 ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ den $\text{OH}\cdot$ sentezini katalizlerler.**



🕒 **Geçiş metalleri, lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederler.**



🕒 Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama

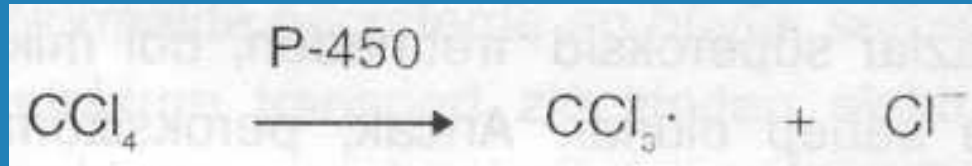


🕒 Bazı yabancı toksik maddelerin etkisi

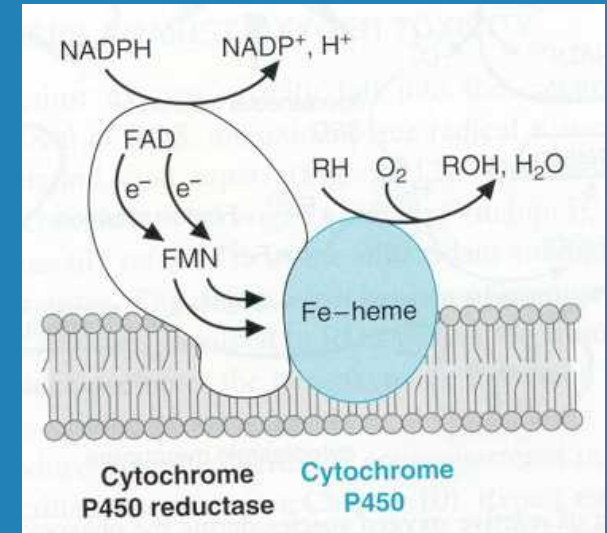
1. Toksinin kendisi bir serbest radikaldir.

*kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit gazı ($\text{NO}_2\cdot$)

2. Toksin bir serbest radikale metabolize olur.



3. Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir.




bazı hallerde sitokrom p450, aşırı miktarda süperoksit radikali (O₂⁻) üreten bir izoenzime dönüşür.



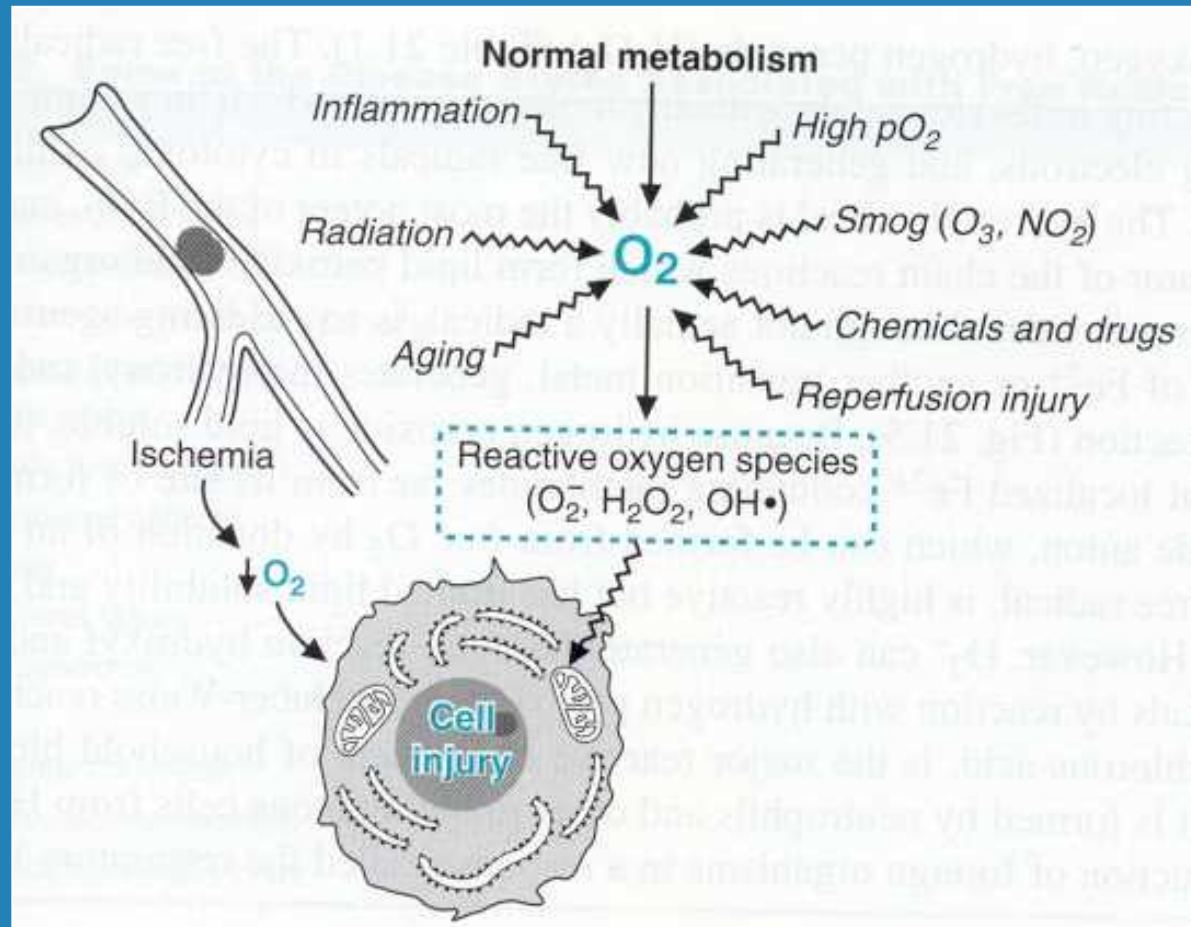
4. Toksin, antioksidan aktiviteyi düşürür.

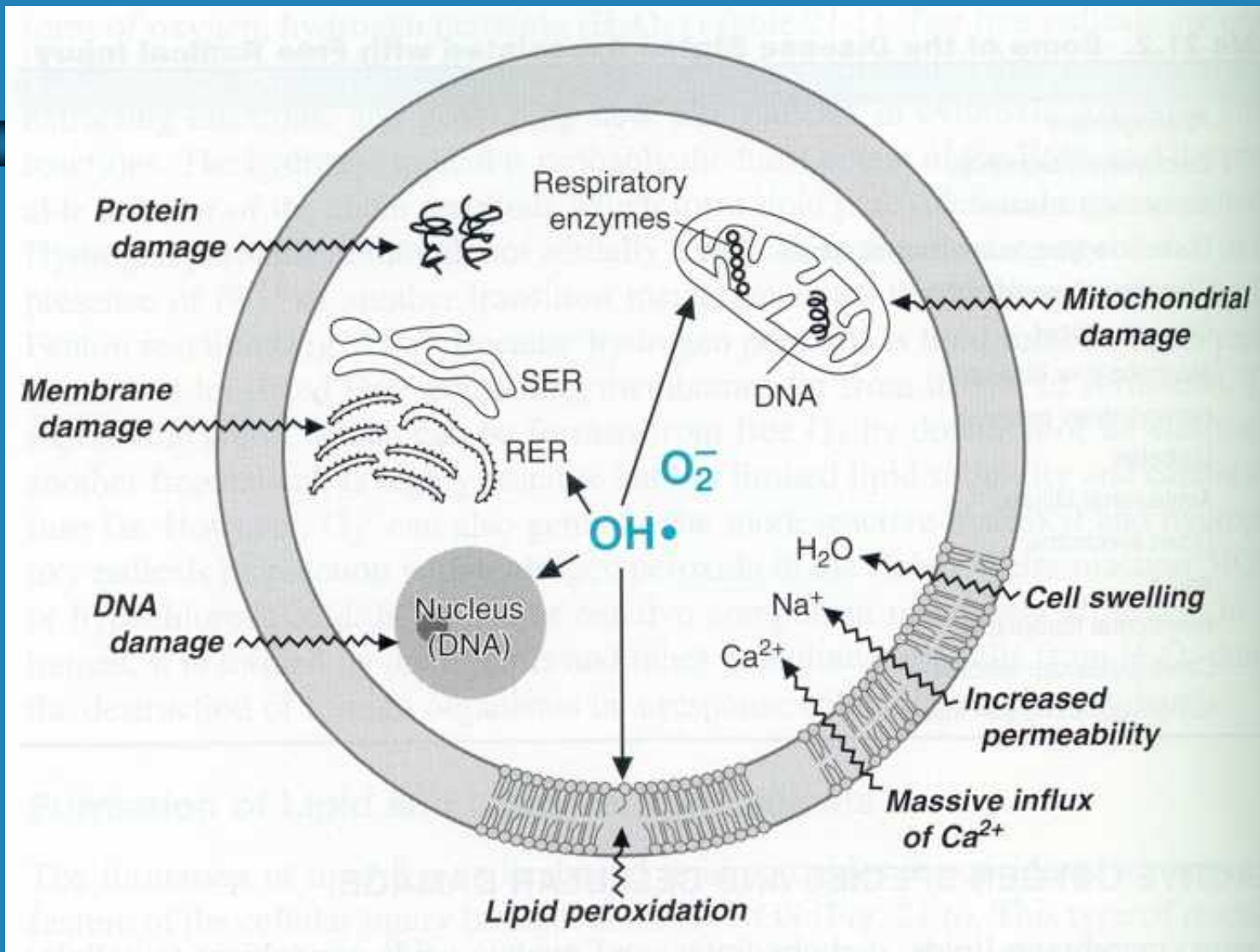
*Örneğin parasetamolün karaciğerde sitokrom P450 tarafından metabolizması, glutatyonun miktarını azaltır.



**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 oksijen radikallerinin etkileri





HÜCRE HASARI

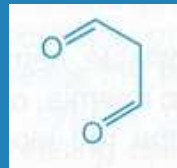
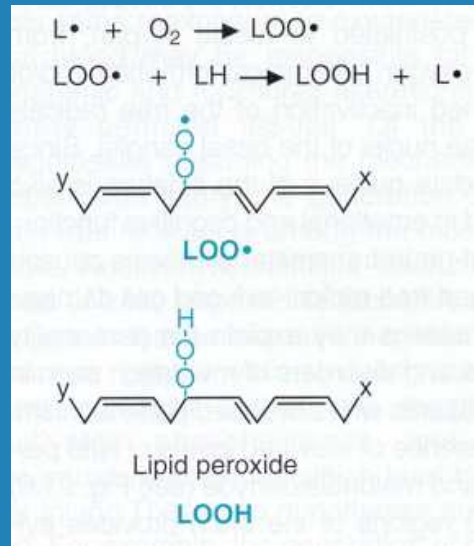
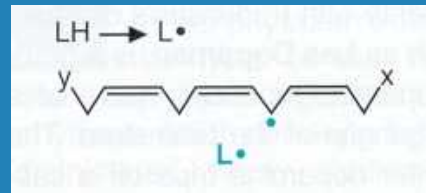


BİRÇOK HASTALIK

- ∞ aterogenez
- ∞ amfizem/bronşit
- ∞ Parkinson hastalığı
- ∞ Duchenne tipi musküler distrofi
- ∞ gebelik preeklampsis
- ∞ serviks kanseri
- ∞ alkolik karaciğer hastalığı
- ∞ diabetes mellitus
- ∞ akut renal yetmezlik
- ∞ Down sendromu
- ∞ yaşlanma
- ∞ retrolental fibroplazi
- ∞ serebrovasküler bozukluklar
- ∞ iskemi/reperfüzyon injürisi

Serbest radikallerin lipidlere etkileri

"nonenzimatik lipid peroksidasyonu"



**Malondialdehit
(MDA)**

Serbest radikallerin proteinlere etkileri

∞ Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler duyarlı

Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur.

Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA'ya etkileri

DNA hasarı



hücre disfonksiyonu

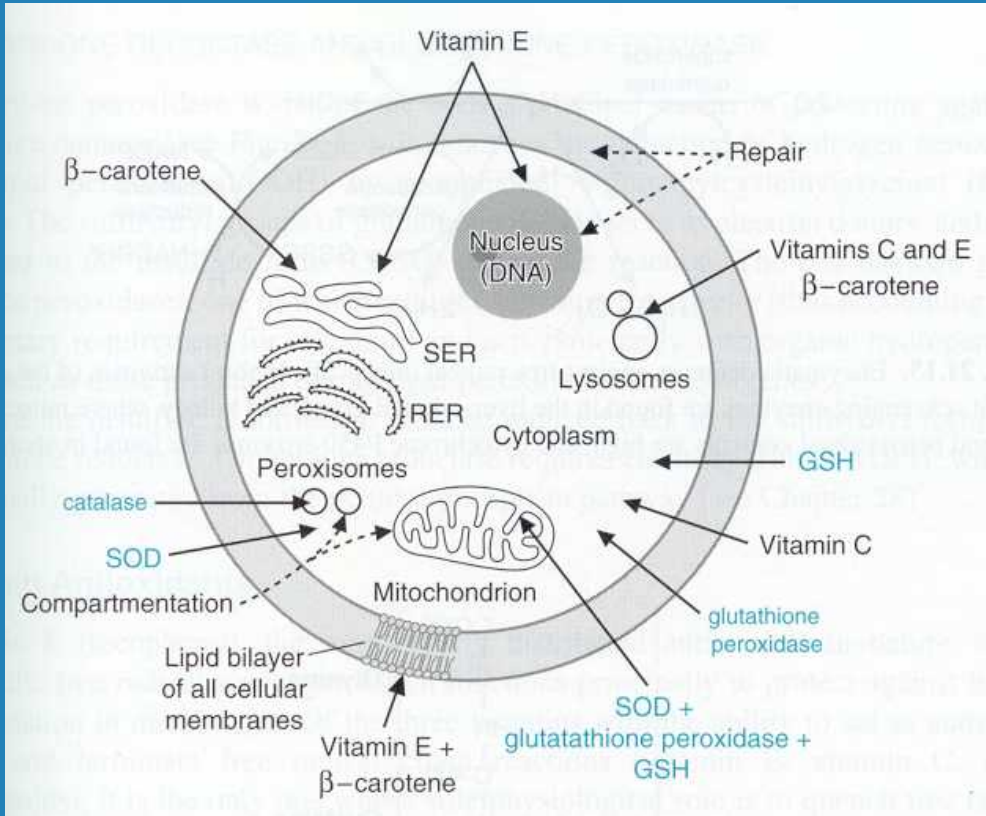


hücre ölümü

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri

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

Antioksidan savunma sistemleri (antioksidanlar)



Etki şekilleri:

- 1) toplayıcı etki
- 2) bastırıcı etki
- 3) zincir kırıcı etki
- 4) onarıcı etki

Endojen antioksidanlar

- ∞ Süperoksit dismutaz (SOD)
- ∞ Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)
- ∞ Glutatyon-S-Transferazlar (GST)
- ∞ Katalaz (CAT)
- ∞ Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi
- ∞ Hidroperoksidaz

- ∞ Melatonin
- ∞ Seruloplazmin
- ∞ Transferrin
- ∞ Miyoglobin
- ∞ Hemoglobin
- ∞ Ferritin
- ∞ Bilirubin
- ∞ Glutatyon
- ∞ Sistein
- ∞ Metiyonin
- ∞ Ürat
- ∞ Laktoferrin
- ∞ Albümin

Eksojen antioksidanlar

vitaminler

ilaçlar

gıda antioksidanları

Antioksidan vitaminler

- ∞ α-tokoferol (vitamin E)
- ∞ β-karoten
- ∞ askorbik asit (vitamin C)
- ∞ folik asit

Antioksidan ilaçlar

- ∞ Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol)
- ∞ NADPH oksidaz inhibitörleri (lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar)
- ∞ Trolox-C (vitamin E analogu)
- ∞ Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)

Gıdalardaki eksojen antioksidanlar

- ∞ Butylated hydroxytoluene (BHT)
- ∞ Butylated hydroxyanisole (BHA)
- ∞ Sodium benzoate
- ∞ Ethoxyquin
- ∞ Propylgalate
- ∞ Fe-superoxyde dismutase

Süperoksit dismutaz (SOD)

süperoksit serbest radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzim



Cu-Zn SOD

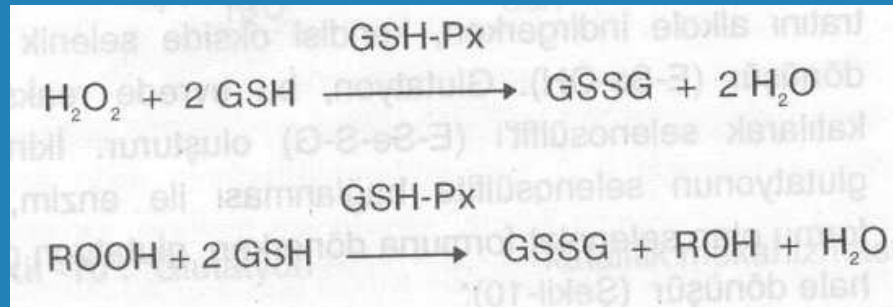
sitozolde bulunur,
dimerik yapıdadır,
siyanidle inhibe edilir.

Mn SOD

mitokondride bulunur,
tetramerik yapıdadır,
siyanidle inhibe olmaz.

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzim



GSH-Px

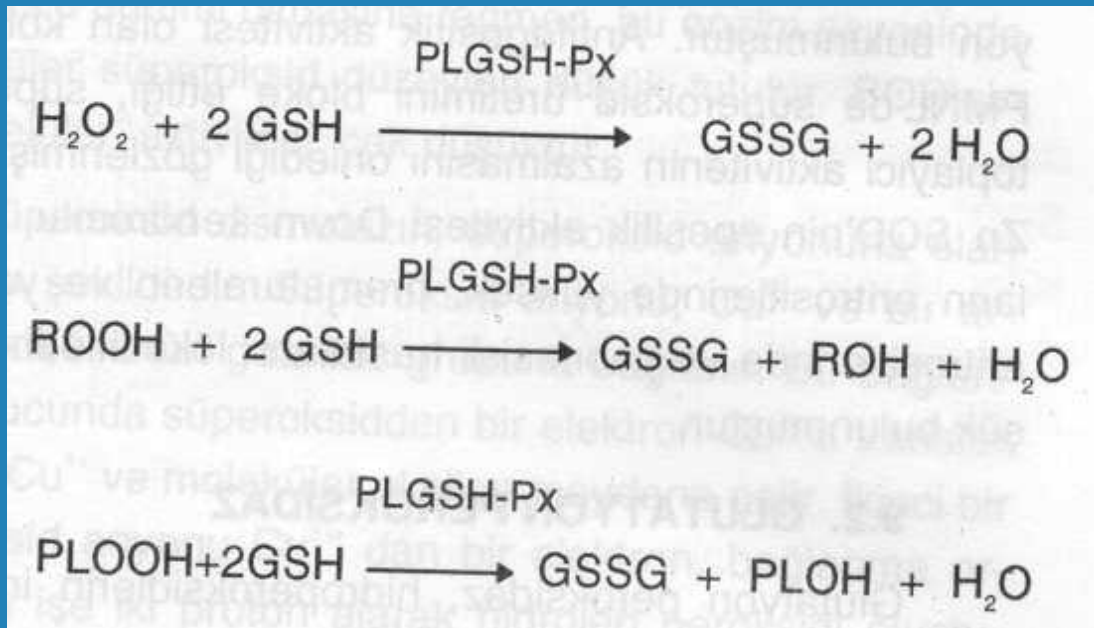
sitozolde bulunur,

4 selenyum atomu içerir,
tetramerik yapıdadır.

Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px)

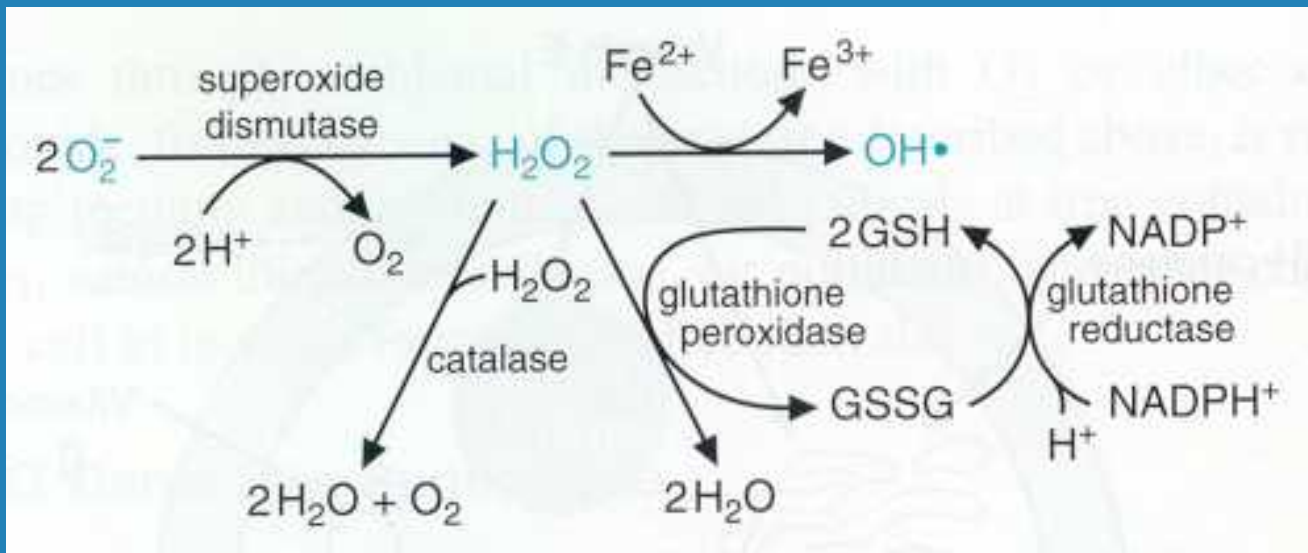
monomerik yapıdadır

esas olarak membran fosfolipid hidroperoksitlerini
alkollere indirger



Glutatyon redüktaz

GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü katalize eder



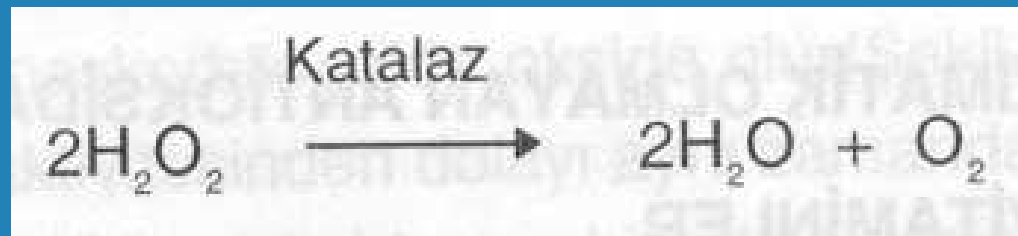
Glutatyon-S-Transferazlar (GST)

başta araşidonik asit ve lineolat hidropersitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı, selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar



Katalaz (CAT)

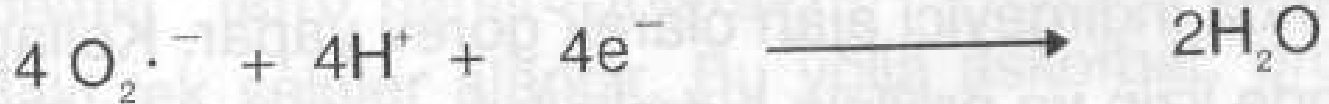
hidrojen peroksidi (H_2O_2) suya ve oksijene parçalar



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

Mitokondriyal sitokrom oksidaz

solunum zincirinin son enzimidir, süperoksidi ($O_2^{\cdot-}$) detoksifiye eder



Vitamin C (askorbik asit)

güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı güçlü bir antioksidandır

süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler.

antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir.

Vitamin E (α -tokoferol)

hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur



okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir

Karotenoidler

β -karoten

singlet oksijeni bastırır

süperoksit radikalini temizler

peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek
antioksidan görev görür

Melatonin (MLT)

en zararlı serbest radikal olan hidroksil serbest radikalini (OH[•]) ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır

günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir.

Glutasyon (GSH)

Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır.

Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur

Ürat

hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler.

Ayrıca vitamin C oksidasyonunu engelleyici etkisi vardır.

Bilirubin

süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır

Albümin

LOOH ve HOCl toplayıcısıdır

Seruloplazmin

Ferro demiri (Fe^{2+}) ferri demire (Fe^{3+}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder.

Transferrin ve Laktoferrin

dolaşımdaki serbest demiri bağlarlar

Ferritin

dokudaki demiri bağlar

Sistein

süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır

Ebselen

selenyumlu bir bileşiktir.

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesini güçlendirir ve lipoksijenaz yolunu inhibe eder.

Sitokinler

başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler.

Ancak proteolitik enzimleri de aktive ettiklerinden dolayı zararlı olabilirler.

Demir Őelatrleri

hücre içine girerek serbest demiri baėlamak suretiyle onu etkisizleŐtirirler, böylece Fenton reaksiyonunu ve sonuçta hidrosil radikali oluşumunu inhibe ederler.

Desferroksamin

serbest Fe³⁺ 'i bağlar.

Oksipürinol

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

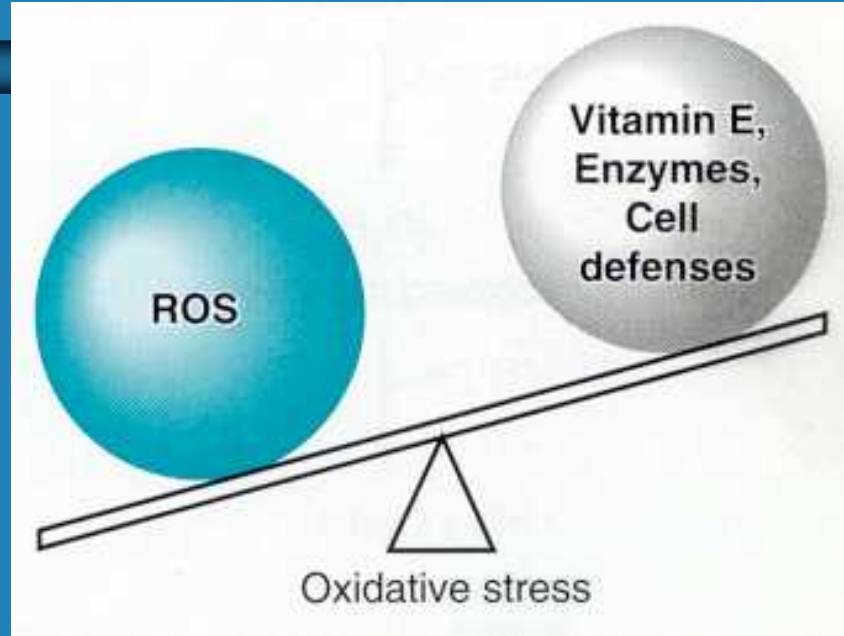
Mannitol

hidroksil radikalini toplayıcı etki gösterir

Probukol

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

Oksidatif stres



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....

Oksidatif stres araştırmaları

∞ serbest radikallerin artışının araştırılması

∞ antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliğinin araştırılması

plazma, serum, eritrosit, doku örnekleri gibi çeşitli materyallerde analiz


Serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi

son derece reaktif ve kısa ömürlü olduklarından direkt olarak ölçülmeleri zordur.

Spin rezonans spektrometrisi

Lipid peroksidasyon ürünlerinin ölçülmesi en sık olarak uygulanan indirekt yöntemdir.



- 
- ☆ Lipid hidropersitlerinin (LOOH) ölçümü
plazmada yapılır
 - 🕒 Konjuge dienlerin ölçümü
zordur
 - 🕒 Malondialdehit (MDA) dışındaki aldehitlerin ölçümü
zaman alıcı, pahalı
 - 🕒 Uçucu hidrokarbonların ölçümü
solunum havasında yapılır



⌚ Lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) ölçümü
zordur

⌚ **Malondialdehit (MDA) ölçümü**

en yaygın olarak tiyobarbitürik asit
(TBA) yöntemiyle yapılır

Serbest MDA'nın direkt tayini en
güvenilir şekilde yüksek performans likit
kromatografisi (HPLC) yöntemiyle yapılır.

Antioksidan aktivitenin ölçülmesi

★ Redü 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) ölçümü

eritrositlerde, UV yöntemle yapılır. Bunun için EDTA'lı tam kan alınır. Tam kan, 4 °C'de 20 gün stabildir.



⌚ Glutatyon redüktaz ölçümü

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

⌚ Glutatyon-S-tansferazların ölçümü



🕒 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü

eritrositlerde, kolorimetrik yöntemle yapılır. Bunun için EDTA'lı veya heparinli tam kan alınır.

🕒 Katalaz 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

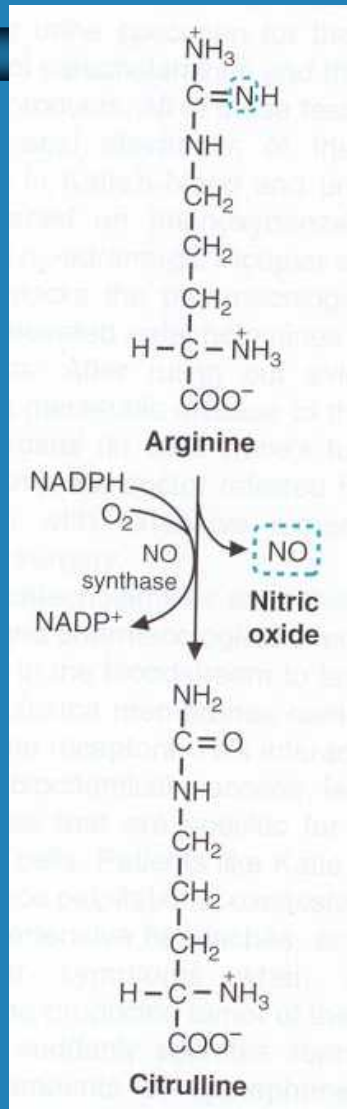
serum veya heparinli plazmada, HPLC ile yapılır. Numune açlık fazında alınmalı ve ışıktan korunmalıdır.



Melatonin (MLT) ölçümü

son zamanlarda güncellik kazanmış
görünmektedir.

Nitrik oksit (NO•)



Nitrik oksit sentazın (NOS) üç izoenzimi vardır.

⊗ **nöronal NOS (tip I, nNOS)**

nöral iletide foksiyon görür.

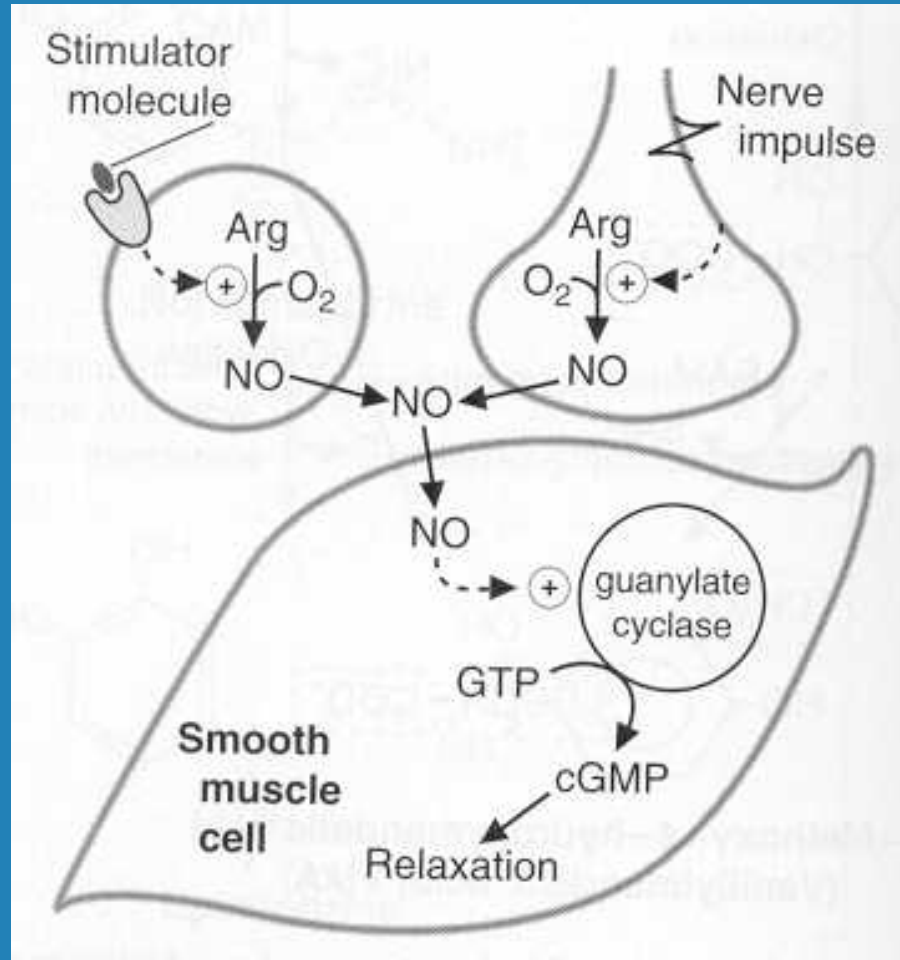
⊗ **endoteliyal NOS (tip III, eNOS)**


böbreklerde bulunur.

⊗ **indüklenebilir NOS (tip II, iNOS)**

normal şartlar altında bulunmaz.


Nitrik oksit (NO) sentezinin, insanda vasküler tonüsün düzenlenmesinde önemli rol oynadığı, kan basıncı ve böbrek fonksiyonunun kontrolünde kesin bir role sahip olduğu bilinmektedir.






Sepsis, astım, romatoit 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• un devamlı ve aşırı üretilmesinin, bu hastalıkların semptomlarının bir kısmından sorumlu olduğu düşünülmektedir.




⌚ Nitrik oksit (NO^\bullet), Fe-S proteinlerinden demiri çıkararak yerine kendisi bağlanır, böylece Fenton reaksiyonunu stimüle eder.




∞ Nitrik oksitin (NO^\bullet) süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radikaliyle etkileşmesi sonucu **peroksinitrit (ONOO^-)** oluşur.

Vasküler tonüsün düzenlenmesi için süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve nitrik oksit (NO^\bullet) arasındaki fizyolojik dengenin önemli olduğu ileri sürülmektedir.



∞ NO• radikalinin stabil son ürünleri nitrit (NO_2^-) ve nitrattır (NO_3^-).

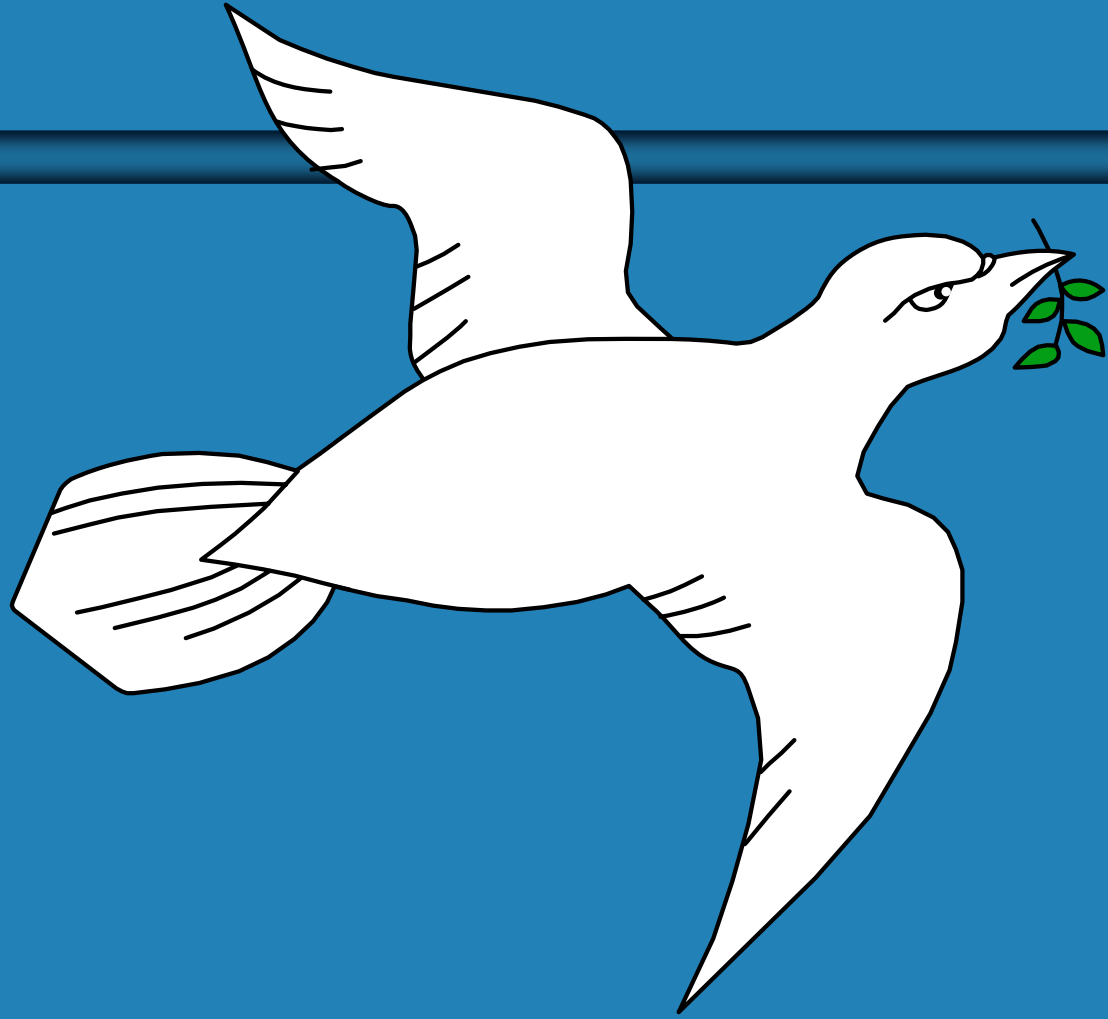
Plazma gibi çoğu vücut sıvısında nitritin çoğu nitrata dönüşmüştür.



∞ NO• 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.

ÖZET

- ❧ reaktif oksijen türleri (ROS) nelerdir?
- ❧ hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) kaynakları nelerdir?
- ❧ serbest oksijen radikallerinin etkilerine en hassas moleküller nelerdir?
- ❧ antioksidanlar nelerdir?
- ❧ oksidatif stres nedir?
- ❧ oksidatif stres nasıl incelenir?
- ❧ nitrik oksit (NO^\bullet) nedir?



TEŞEKKÜRLER