استرس اکسیداتیو

دکتر هادی انصاری هادی پور

هنگامیکه موجودات زنده در معرض ترکیبات سمی قرار می گیرند، متحمل ضایعات مختلفی می شوند که اکثراً دارای اساس بیوشیمیایی هستند. مثلاً حمله به اسیدهای نوکلئیک باعث ایجاد تومور می‌گرددو یا اتصال ترکیبات گزنوبیوتیک به پروتئین ها منجر به پاسخهای ایمنولوژیک می‌شود. اثرات مواد سمی را از شش دیدگاه می توان مورد توجه قرار داد: 1) اثرات سمی مستقیم و ایجاد ضایعات بافتی، 2) اثرات فارماکولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، 3) اثرات تراتوژنیک، 4)اختلال در سیستم ایمنی، 5) موتاسیون و 6) کارسینوژنز.
یکی از جالبترین مباحث در دانش سم‌شناسی، مطالعه اثرات اکسیژن است. زیرا گرچه موجودات زنده برای ادامه حیات وابسته به تنفس هوازی هستند، ولی مولکولهای اکسیژن با تولید رادیکالهای آزاد موجب استرس اکسیداتیو میشوند.

متابولیسم هوازی دارای مزایای فراوانی است ولی در اثر فعال شدن مولکولهای اکسیژن، محصولات سمی ایجاد می شود که گونه های اکسیژن فعال نامیده می شوند.

رادیکال هیدروکسیل یکی از فعال ترین رادیکالهای آزاد است که قادر به شروع فرآیند لیپید پراکسیداسیون در ساختارهای غشایی است. فلزاتی نظیر آهن نیز قادر به تشکیل رادیکالهای هیدروکسیل هستند.

در موجودات هوازی، مکانیسم های متعددی برای مقابله با اثرات سمی رادیکالهای آزاد وجود دارد ولی چنانچه مقدار زیادی ماده سمی وارد بدن گردد یا سیستم‌های آنتی اکسیدان کارآیی لازم را نداشته باشند، مقادیر زیادی ROS در بدن تجمع می یابد و استرس اکسیداتیو رخ می دهد که منجر به تغییر ساختار بیومولکولهایی نظیر چربی ها، پروتئین‌ها و اسید های نوکلئیک می شود.

استرس اکسیداتیو موجب تغییرات ساختمانی در اسیدهای نوکلئیک می شود. تاکنون بیش از 100 نوع تغییر اکسیداتیو در DNA بررسی و شناسائی شده است. ولی فقط چند تغییر ساختمانی خاص در بازهای آلی، بعنوان شاخص صدمه اکسیداتیو به DNA مطرح است. در هنگام ترمیم DNA، محصولات مختلفی ایجاد می شود که اندازه گیری آنها در ادرار، نشاندهنده میزان کارآیی سیستم های ترمیمی است.

رادیکالهای آزاد در طی یک رشته فرآیندهای شیمیایی موجب اکسیداسیون اسیدهای چرب می‌شوند که شامل مراحل شروع (initiation)، پیشرفت (propagation) و پایان (termination) است.

الف) مرحله شروع: در اثر حمله ROS، اسیدهای چرب غیر اشباع به لیپیدهیدروپروکسید تبدیل می شوند که بسهولت تجزیه گردیده رادیکالهای آزاد را بوجود می آورند. فلزات واسط از قبیل آهن و بیومولکولهایی نظیر هموگلوبین، در تسریع این فرآیند نقش بارزی دارند.

ب) مرحله پیشرفت: پس از تشکیل رادیکال اسید چرب، در شرایط مناسب مجموعه ای از واکنش ها آغاز می شود که منجر به تشکیل رادیکالهای مختلف می گردد:

در خون و بافتهای مختلف بدن همواره مقادیر کافی اکسیژن برای تداوم مرحله پیشرفت وجود دارد. پیوندهای غیر اشباع نسبت به سایر قسمتهای مولکول، آمادگی بیشتری برای پراکسیداسیون دارند.

ج) مرحله پایان: در آخرین مرحله از واکنشهای رادیکالی، الکترونهای متعلق به دو رادیکال آزاد در کنار یکدیگر قرار گرفته و یک جفت الکترون پیوندی را تشکیل می دهند:

با توجه به اینکه احتمال برخورد دو رادیکال آزاد، بسیار کمتر از احتمال برخورد یک رادیکال با یک مولکول است، بنابراین فرآیند لیپیدپراکسیداسیون باید آنقدر ادامه یابد تا مقادیر قابل توجهی از رادیکالهای آزاد بوجود آید. بعبارت دیگر روند اکسیداسیون چربی ها زمانی متوقف می شود که آسیب وسیع و قابل توجهی به مولکولهای چربی وارد شده است. در حالیکه در موجودات زنده

هوازی هرگز چنین مرحله ای صورت نمی گیرد. زیرا ترکیبات خنثی کننده رادیکالهای آزاد[1]، با در اختیار قرار دادن اتمهای هیدروژن، آنها را از بین می‌برند و خود به رادیکالهای پایدار و غیر فعالی تبدیل می شوند که قادر به شرکت در واکنشهای زنجیره ای نیستند:

اگرچه تاکنون در زمینه لیپید پراکسیداسیون تحقیقات گسترده ای انجام شده است ولی هنوز یک روش ساده و استاندارد برای اندازه گیری مقادیر واقعی این محصولات وجود ندارد. روشهای متداول شامل اندازه گیری مالونیل دی آلوئید و دی ان های کونژوگه است. در سالهای اخیر بررسی غلظت MDA با روش اسپکترو فتوفلوریمتری مورد توجه قرار گرفته است که دارای حساسیت و دقت زیادی است

در هنگام وقوع استرس اکسیداتیو، ساختار ریشه های آمینو اسیدی در پروتئین ها دستخوش تغییر می گردد که میزان آسیب وارده بستگی به ماهیت و غلظت عوامل اکسیدان، میزان کارآئی سیستم آنتی اکسیدان و منابع رادیکالهای آزاد دارد.

مهمترین تغییرات اکسیداتیو عبارتند از تبدیل لوسین به هیدروکسی لوسین، تریپتوفان به N فرمیل کینورنین، هیستیدین به آسپارتات یا آسپاراژین متیونین به متیونین سولفوکسید، تیروزین به دی تیروزین، O تیروزین، نیتروتیروزین، شکسته شدن پیوندهای پپتیدی[2] یا ایجاد اتصالات عرضی جدید در یک رشته پروتئینی یا بین رشته های پلی پپتیدی مختلف و تشکیل مجموعه‌های پروتئینی با وزن مولکولی زیاد، تغییر در میزان گروههای تیول پروتئین ها، تجمع پروتئین ها[3] و تشکیل گروههای کربنیل در ریشه آمینواسیدها.

در هنگام وقوع استرس اکسیداتیو، مکانیسم‌های دفاعی در بدن موجودات زنده فعال شده، به مقابله با رادیکالهای آزاد می‌پردازند و همچنین از ادامه روند اکسیداسیون جلوگیری میکنند.

1- Radical Scavengers

2- Fragmentation

3- Aggregation

در هنگام استرس اکسیداتیو، سلولها دستخوش تغییرات بیوشیمیایی خاصی می شوند که منجر به سازش با شرایط جدید می گردد. در اولین مرحله رشد سلولها متوقف شده و 4 الی 6 ساعت بعد، میزان بیان ژنهای مختلف تغییر می کند که منجر به سازش موقت[1] می گردد.

سازش موقت هم در پروکاریوت ها و هم در یوکاریوت ها مشاهده شده است. بعنوان مثال پس از قرار دادن فیبروبلاست ها در محیط کشت حاوی پراکسید هیدروژن، سه مرحله از بیان ژنها در فواصل زمانی 4،8 و 12 ساعت صورت می گیرد. حداقل 40 ژن سازشی در پستانداران وجود دارد

آنزیم های موثر در استرس اکسیداتیو

پراکسیدازها:

این گروه از آنزیم های آنتی اکسیدان هموپروتئین بوده منحصراً در موجودات هوازی وجود دارند.

دیافوراز:

این فلاووآنزیم که قبلاً DT دیافوراز[2]یا کینون ردوکتاز[3] نامیده می شد، قادر است کینون ها را با افزودن دو الکترون احیاء نموده به مولکولهای پایدارتر دی هیدرو کینون تبدیل کند:

$$Q + NAD(P)H + H^+ \rightarrow QH_2 + NAD(P)^+$$

ظاهراً این آنزیم از دو فلاووپروتئین تشکیل شده است که در هر لحظه، هر یک از زیر واحدها، یک الکترون از $NAD(P)H_2$ دریافت کرده تا حدودی احیاء می شود. این فرآیند در ابتدا باعث تسهیل تبدیل کینون به سمی کینون[4] و سپس احیای سریع به دی هیدروکینون می شود و به این ترتیب مانع از تشکیل رادیکال سوپر اکسید و سمی کینون می گردد. در سلولهای مقاوم به منادیون، فعالیت زیاد آنزیم NQO1 موجب احیای منادیون و جلوگیری از تشکیل رادیکالهای سمی کینون می شود.

1- Transient adaptation
2- DT- diaphorase
3- Quinone reductase
4- Semiquinone

آنزیم های متابولیسم اسید آسکوربیک

ویتامین C یکی از مهمترین عوامل آنتی اکسیدان محلول در آب است که الکترون را در اختیار رادیکالهای آزاد اکسیژن و نیتروژن قرار می دهد، سمی کینون ها و کینون ها را احیاء می کند، اسیدهای نوکلئیک و چربی ها را در مقابل آسیب اکسیداتیو محافظت می کند و موجب احیاء شدن رادیکالهای توکوفریل[1] می شود.

بسیاری از ترکیبات خارجی که آنزیم های میکروزومی را فعال می کنند سبب افزایش بیوسنتز اسید آسکوربیک نیز می گردند. سنتز القاء شده اسید آسکوربیک در موش های صحرائی به تغذیه و عوامل هورمونی وابسته است.

اسید آسکوربیک(AH_2) با آزاد کردن یک الکترون به منو هیدروآسکوربات یا رادیکال آزاد آسکوربیل($A^{\bullet}$) و با آزاد کردن دو الکترون به دهیدروآسکوربات[2] (DHA) تبدیل می شود.

آسکوربات پراکسید از[3] (EC 1.11.1.7): این آنزیم قادر به احیاء کردن پراکسید ها و تبدیل آنها به الکل ها ی مربوطه:

$$ROOH + AH_2 \rightarrow ROH + DHA$$

و همچنین تجزیه پراکسید هیدروژن است(Dalton et al.,1986):

$$H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + DHA$$

در شرایط استرس اکسیداتیو، میزان اسید آسکوربیک احیاء سریعاً کاهش یافته سیستم آنتی اکسیدان تضعیف می شود. بهمین دلیل موجودات زنده هوازی از طریق رژیم غذایی و یا احیای مجدد، این کمبود را جبران می کنند. دو آنزیم در احیای ویتامین C نقش دارند:

1- **آنزیم احیاء کننده رادیکال آزاد آسکوربات**[4]: این آنزیم در حضور اکی والان های احیاء کننده نظیر NADH , NADPH، رادیکال $A^{\bullet}$ را به اسید آسکوربیک تبدیل می کند(Bowditch and Donaldson , 1990; Rose and Bode , 1992):

$$A^{\bullet -} + NAD(P)H_2 \rightarrow AH_2 + NAD(P)^+$$

1- Tocopheryl radicals
2- Dehydro-L-ascorbic Acid (dehydroascorbate: DHA)
3- Ascorbate peroxidase: Asc-POD
4-Ascorbate free radical reductase

2-آنزیم احیاء کننده دهیدروآسکوربات[1]: این آنزیم وابسته به GSH است و باعث احیاء شدن دهیدروآسکوربات به دی هیدروآسکوربات می شود:

لازم به ذکر است که همانند بسیاری از عوامل آنتی اکسیدان دیگر، آسکوربات می تواند بعنوان یک پرواکسیدان نیز عمل کند و در حضور یونهای آهن، رادیکالهای $OH^{\bullet}$ تولید نماید.خصوصیات پرواکسیدان- آنتی اکسیدان بستگی به غلظت دارد. آسکوربات در غلظت های کم، فلزات واسطه را احیاء کرده موجب تشکیل رادیکال آزاد می شود. درحالیکه در غلظتهای بالا قادر به جمع آوری رادیکال های $OH^{\bullet}$ و آنیون سوپر اکسید است(Halliwell et al, 1990). تجمع داخل سلولی اسید آسکوربیک احتمالاً موجب مهار آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو می‌شود. آسکوربیک اسید با احیاء کردن تیول های اکسید شده در آپو B موجب مهار آپوپتوز ناشی از LDL اکسید شده در ماکروفاژها می شود

علاوه بر آنزیم های آنتی اکسیدان، انواع مختلفی از پروتئین وجود دارند که مانع از انجام فرآیندهای هابر-ویز و فنتون می‌شوند و بدین ترتیب از تولید رادیکالهای $OH^{\bullet}$ و اکسیداسیون پروتئین ها و چربی ها جلوگیری می کنند.

آلبومین: این پروتئین که به مقدار زیاد در پلاسما وجود دارد، سریعاً به یون مس متصل شده و آنرا جمع آوری می کند و تولید رادیکال $OH^{\bullet}$ را به حداقل رسانده احتمال LP را کاهش میدهد.

ترانسفرین: گلیکو پروتئین منومریک با وزن مولکولی 80 کیلو دالتون که آهن را در پلاسما منتقل می کند. در پستانداران هر مولکول ترانسفرین قادر به اتصال با دو یون فریک با میل ترکیبی زیاد ($k_d = 10^{-23}\ mol/L$) است. نقش آنتی اکسیدانی ترانسفرین همراه با فریتین ها اعمال می شود.

فریتین: پروتئین ذخیره آهن در سیتوزول کبد که دارای وزن مولکولی حدود 450 کیلو دالتون و قادر به ذخیره بیش از 4/500 اتم آهن در حفره داخلی خود است. این پروتئین در حد میکرومول بصورت گلیکوزیله در سرم وجود دارد. ترانسفرین و فریتین با اتصال به یونهای آهن، مقدار آهن آزاد را در سلولها و سرم به حداقل رسانده، فرآیندهای هابر -ویز و فنتون را کاهش می دهند.

[1]-Dehydroascorbate reductase