دانشگاه پیام نور

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوشیمی

دانشکده علوم

گروه علمی زیست شناسی

سنجش میزان بی رنگ شدن کروسین استخراج شده از زعفران ایرانی برای ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی

استاد راهنما:

خانم دکتر سیده زهرا بطحایی

نگارش:

فاطمه مقدس زاده کرمانی

خرداد ۱۳۸۸

چکیده:

Crocin bleaching assay CBA یک روش جدید برای تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی است. در CBA حذف و یا اضافه شدن هیدروژن به پیوند های دو گانه کونژوگه کروسین منجر به کاهش جذب کروسین در ٤٤٠ نانومتر شده، که این معیار برای محاسبه قدرت آنتی اکسیدانی به کار می رود. در اینجا روش CBA با استفاده از دی جنتیوبیوزیل کروستین عصاره گیری و خالص شده از زعفران ایرانی، راه اندازی شد. سپس فعالیت چند آنتی اکسیدان شناخته شده مانند آسکوربیک اسید، بیلی روبین، ترولکس، اوریک اسید به علاوه نمونه های پلاسمای نوزادان سنجیده شد. نتایج با آنچه از روش ferric reducing antioxidant power FRAP بدست آمده بود، به عنوان یک روش استاندارد مقایسه شد. پروسه CBA در دو شرایط آبی مختلف انجام شد، ۹۰%< یا ۵۰%< آب. نتایج به وسیله روش Bors (محاسبه ثابت سرعت نسبی(Krel)) و روش Tsimidou (محاسبه درصد بازدارندگی بیرنگ شدن آلفا-کروسین (Inh%)) آنالیز شد. نتایج ما مشخص کننده قدرت آنتی اکسیدانی مقابل برای مواد ذکر شده در بالا می باشد: ترولکس<اوریک اسید<آسکوربیک اسید. گرچه این نتایج بسیار مشابه با داده های گزارش شده از دیگران است، ولی آنها به شدت به شرایط آبی محیط وابسته اند. به علاوه اوریک اسید خصوصیات متفاوتی را در شرایط مختلف نشان داد به این صورت که در غلظت های پایین خاصیت آنتی اکسیدانی دارد ولی در غلظت های بالا به عنوان یک پرواکسیدانت عمل می کند. بیلی روبین با این تست تداخل دارد که احتمالا به دلیل بیشینه جذب آن است که نزدیک به کروسین است. نتایج بدست آمده برای ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم با نتایج FRAP قابل مقایسه بود. در کل به نظر می رسد CBA با استفاده از اجزای اصلی آلفا-کروسین یک روش ساده و کاربردی برای تعیین قدرت آنتی اکسیدان نمونه های آبی می باشد. این پایان نامه راه اندازی یک روش سنجش میزان فعالیت آنتی اکسیدان ها crocin bleaching assay CBA بر اساس کروسین که یکی از اجزای زعفران است، برای اولین بار در ایران می باشد. این روش بر اساس میزان بی رنگ شدن ماده رنگی کروسین می باشد. برای راه اندازی این روش از چند آنتی اکسیدان معروف و در بخش بالینی از چند نمونه پلاسمای کودکان استفاده شد.که به عنوان یک روش سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی مواد مختلف و پلاسما قابل استفاده است.

فصل اول :مقدمه

بخش اول

۱-۱ انوع مواد واکنش گر.....۱

۱-۲ استرس اکسیداتیو.....۲

۱-۲-۱ عوامل ایجاد کننده استرس اکسیداتیو در بدن موجود زنده..... ۳

۱-۳ سیستم آنتی اکسیدانی.....۵

۱-۳-۱ آنتی اکسیدان های شکننده زنجیره..... ۵

۱-۳-۱-۱ مولکول های کوچک آنتی اکسیدانی.....۵

۱-۳-۱-۲ آنتی اکسیدان های آنزیمی ۵

۱-۳-۲ آنتی اکسیدان های باز دارنده.....٦

۱-٤ مراحل دفاع آنتی اکسیدانی.....٦

۱-٤-۱ سازش با استرس اکسیداتیو.....۷

۱-٤-۱-۱ آنزیم های اصلی آنتی اکسیدان.....۸

۱-٤-۱-۲ آنزیم های کمکی آنتی اکسیدان.....۹

۱-٤-۲ جلوگیری از تشکیل رادیکال های آزاد.....۹

۱-٤-۲-۱ آنتی اکسیدان های پروتئینی.....۱۰

۱-٤-۲-۲ آنتی اکسیدان های غیر پروتئینی.....۱۲

۱-٤-۲-۲-۱ آنتی اکسیدان های محلول در چربی.....۱۲

۱-٤-۲-۲-۲ آنتی اکسیدان های محلول در آب.....۱۲

۱-٤-۳ فرایندهای ترمیمی.....۱۳

۱-۵ عوامل موثر بر سیستم آنتی اکسیدانی.....۱٤

۱-۵-۱ سن.....۱۵

۱-۵-۲ تغذیه و شرایط محیطی.....۱۶
۱-۵-۳ بیماری‌ها.....۱۷
۱-۶ معرفی خصوصیات چند ماده دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی.....۱۸
۱-۶-۱ ترولکس.....۱۸
۱-۶-۲ آسکوربیک‌اسید.....۱۹
۱-۶-۲-۱ ساختمان شیمیایی.....۲۰
۱-۶-۲-۲ نقش این ویتامین.....۲۱
۱-۶-۳ اوریک اسید.....۲۳
۱-۶-۴ گلوتاتیون.....۲۷
۱-۶-۵ BSA.....۳۲
۱-۶-۶ DPPH.....۳۶
۱-۶-۷ بیلی‌روبین.....۳۷
۱-۶-۷-۱ خواص شیمیایی و فیزیولوژیک بیلی‌روبین.....۳۸
۱-۶-۷-۲ چندین اختلال مربوط به بیلی‌روبین.....۴۱
۱-۶-۷-۳ نقش آنتی‌اکسیدانی بیلی‌روبین.....۴۳
۱-۷ اندازه‌گیری فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی.....۴۴
۱-۷-۱سنجش in vivo.....۴۴
۱-۷-۲ سنجش in vitro:.....۴۵
۱-۷-۲-۱ انتقال اتم هیدروژن (HAT).....۴۵
۱-۷-۲-۲ انتقال الکترون (ET).....۴۶

بخش دوم: زعفران

۱-۸ مشخصات گیاه‌شناسی سرده زعفران.....۴۹

۱-۹ تستهای تشخیص خلوص زعفران.....٥٦
۱-۱۰ کاربردهای زعفران در قدیم.....٥٧
۱-۱۱ اثرات مضر زعفران.....٥٨
۱-۱۲ ترکیبات شیمیایی زعفران ٥٩
۱-۱۲-۱ ترکیبات عمومی زعفران.....٥٩
۱-۱۲-۲ کروسین وکروستین عوامل رنگ در زعفران.....٦١
۱-۱۲-۳ پیکروکروسین و سافرانال عامل طعم و عطر در زعفران.٦٤
۱-۱۳ خواص و کاربردهای جدید دارویی زعفران.....٦٥
۱-۱٤ خاصیت آنتی اکسیدانی کروسین.....٦٩
۲)فصل دوم:مواد و روشها
۲-۱ مواد مصرفی.....٧٢
۲-۱-۱طرز تهیه بافر فسفات PBS.....٧٣
۲-۱-۲ طرز تهیه AAPH..... ٧٣
۲-۲ روش خالصسازی کروسین.....٧٤
۲-۲-۱ روش انجام کروماتوگرافی لایه نازک(TLC) ٧٥
۲-۳ اندازهگیری ضریب جذب مولی کروسین نوع ۱.....٧٦
۲-٤ سنجش میزان بیرنگ شدن کروسینCrocin bleaching assay ٧٦
۲-٤-۱ L-آسکوربیکاسید.....٨٠
۲-٤-۱-۱ استفاده از استوک رقیق کروسین در روش بورس.....٨٠
۲-٤-۱-۲ استفاده از استوک رقیق کروسین در روش تسیمودو....٨١
۲-٤-۱-۳ استفاده از استوک غلیظ کروسین در روش بورس.....٨٢
۲-٤-۱-٤ استفاده از استوک غلیظ کروسین در روش تسیمودو....٨٢
۲-٤- ۲ ترولکس.....٨٣

۲-٤-۳ اوریک اسید.....۸۳
۲-٤-٤ گلوتاتیون احیاءشده.....۸۳
۲-٤-٥ BSA.....۸٤
۲-٤-٦DPPH.....۸٤
۲-٤-۷ بیلی‌روبین.....۸٤
۲-٤-۸ آزمایشات مربوط به پلاسمای انسانی.....۸٤
۲-٤-۸-۱ آزمایشات روی پلاسمای فردی بالغ.....۸٥
۲-٤-۸-۲ آزمایشات روی پلاسمای خون کودکان.....۸٥
۲-٥ FRAP.....۸٥
۲-٦ سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی دیگر اجزای زعفران.....۸۷
۲-۷ کاربرد دیگر اجزای زعفران در CBA به جای کروسین.....۸۸
فصل سوم:نتایج و بحث
۳-۱ نتایج مربوط به کروسین.....۸۹
۳-۱-۱ خالص سازی کروسین.....۸۹
۳-۱-۲ محاسبه ضریب جذب برای کروسین.....۹۰
۳-۲ *گزارش نتایج*.....۹۰
۳-۲-۱ نتایج مربوط به ترولکس.....۹۳
۳-۲-۱-۱ روش بورس.....۹۳
۳-۲-۱-۲ روش تسیمودو.....۹٥
۳-۲-۲ نتایج مربوط به آسکوربیک اسید.....۹٦
۳-۲-۲-۱ روش بورس.....۹٦
۳-۲-۲-۲ روش تسیمودو.....۹۷

۳-۲-۳ نتایج مربوط به DPPH.....۹۷
۳-۲-۳-۱ روش بورس.....۹۷
۳-۲-۳-۲ روش تسیمودو.....۹۸
۳-۲-۴ نتایج مربوط به اوریک اسید.....۹۹
۳-۲-۴-۱ روش بورس.....۹۹
۳-۲-۴-۲ روش تسیمودو.....۱۰۱
تست مواد بیولوژیک حاوی پروتئین.....۱۰۱
۳-۲-۵ نتایج مربوط به گلوتاتیون.....۱۰۲
۳-۲-۵-۱ روش بورس (استفاده از استوک غلیظ کروسین).....۱۰۲
۳-۲-۵-۲ روش تسیمودو (استفاده از استوک غلیظ کروسین).....۱۰۲
۳-۲-۶ نتایج مربوط به BSA.....۱۰۳
۳-۲-۶-۱ روش بورس (استفاده از استوک غلیظ کروسین) ۱۰۳
۳-۲-۶-۲ روش تسیمودو (استفاده از استوک غلیظ کروسین).....۱۰۳
۳-۲-۷ نتایج مربوط به بیلی روبین.....۱۰۳
۳-۲-۷-۱ روش بورس (استفاده از استوک رقیق کروسین) ۱۰۳
۳-۲-۷-۲ روش تسیمودو (استفاده از استوک رقیق کروسین).....۱۰۴
۳-۲-۸ نتایج مربوط به پلاسمای انسانی.....۱۰۴
۳-۲-۸-۱ روش بورس برای پلاسمای فرد بالغ (استفاده از استوک غلیظ کروسین).....۱۰۴
۳-۲-۸-۲ روش تسیمودو برای پلاسمای فرد بالغ(استفاده از استوک غلیظ کروسین).....۱۰۵
۳-۲-۸-۳ روش تسیمودو (استفاده از استوک غلیظ کروسین) برای نمونه های کودکان.....۱۰۵
۳-۳ نتایج مربوط به روش FRAP.....۱۰۶

۳-٤ نتایج بکار بردن کروستین و پیکروکروسین در جایگاه آنتی‌اکسیدان‌ها.....۱۰٦
۳-٥ جدول اجمالی نتایج حاصل از روش CBA ۱۰۷
۳-٦ بحث.....۱۰۹
فصل چهارم:فهرست منابع
مراجع.....۱۱۸

بخش اول

۱-۱ انواع مواد *واکنش* گر:

واکنش‌های شیمیایی شامل اکسیدشدن و احیای مولکول‌ها در هر سلولی رخ می‌دهد. این واکنش‌ها می‌توانند منجر به تولید رادیکال‌های[۱] آزاد شود. یک رادیکال آزاد شامل هر گونه شیمیایی است که قابلیت وجود مستقل را دارد و دارای یک یا تعداد بیشتری الکترون‌های جفت نشده است. رادیکال‌های بیولوژیک مولکول‌های به شدت پایداری هستند که دارای الکترون‌هایی با قابلیت واکنش با سوبستراهای اورگانیک[۲] متفاوت است. حضور رادیکال‌های آزاد و مولکول‌های فعال غیر رادیکالی مشتق شده از رادیکال‌های آزاد (جدول۱-۱) در غلظت بالا برای اورگانیسم های زنده

جدول۱-۱: انواع مواد واکنش گر(که شامل سه زیر گروه است)

Table 1. Reactive oxygen species (ROS).

Free radicals	
Hydroxyl	$OH^{\bullet}$
Superoxide	$O_2^{\bullet-}$
Nitric oxide	$NO^{\bullet}$
Thiyl	$RS^{\bullet}$
Peroxyl	$RO_2^{\bullet}$

Table 2. Non-radical reactive oxygen species.

Non-radicals	
Peroxynitrite	$ONOO^-$
Hypochlorous acid	HOCl
Hydrogen peroxide	H_2O_2
Singlet oxygen	$^1\Delta_g$ ($^1O_2$)
Ozone	O_3
Lipid peroxide	LOOH

Table 3. Reactive nitrogen species (RNS).

Nitrous oxide	N_2O	Nitrosyl cation	NO^+
Peroxynitrite	$OONO^-$	Nitrogen dioxide	$NO_2^{\bullet}$
Peroxynitrous acid	ONOOH	Dinitrogen trioxide	N_2O_3
Nitroxyl anion	NO^-	Nitrous acid	HNO_2
Nitryl chloride	NO_2Cl		

[۱] Radical

[۲] Organic substrate

خطرناک است.

در محیط‌های آزمایشگاهی وجود بعضی از مواد که توانایی تولید رادیکال را داشته باشند، ضروری است. از این مواد به عنوان آغازگر یاد می‌شود. که خود به دوگروه تقسیم می‌شوند.

۱- آغازگران آزو[۱]: این آغازگران به مقدار وسیعی در مطالعات سنجش کینتیکی اکسیدشدن مورد استفاده قرار می‌گیرند، با این مزیت که ایجاد رادیکال‌های پیروکسیل با یک سرعت ثابت می‌نمایند. ساختار این آغازگر (RN=NR) توسط تیمار گرمایی شکسته شده وایجاد رادیکال‌های آزاد می‌کند که این رادیکال‌ها خود آزادکننده دیگر رادیکال‌ها و واکنش‌های زنجیره‌ای هستند.

۲- هیدروپراکسیدها: این آغازگران توسط فتولیز ایجاد رادیکال‌های آلکوکسیل می‌نمایند (۱).

۱-۲ استرس اکسیداتیو

ترکیبات شیمیایی که دارای قدرت تولید ترکیبات سمی اکسیژنی (ROS[۲]) هستند را می‌توان با نام پرواکسیدانت[۳] معرفی کرد. در سلول‌های طبیعی تعادل مناسبی بین پرواکسیدانت و آنتی‌اکسیدانت برقرار است. این تعادل هنگامیکه تولید گونه‌های اکسیژنی به مقدار زیادی افزایش می‌یابد (مثلا هضم مواد یا داروهای خاص) یا

---

[۱] Azo-initiator

[۲] Reactive oxygen species

[۳] Prooxidant

هنگامیکه سطح آنتی‌اکسیدان‌ها خیلی کم شود می‌تواند به سمت پرواکسیدانت‌ها شیفت پیدا کند که این حالت، استرس اکسیداتیو نام دارد.

به عبارتی به هم خوردن تعادل پرواکسیدانت-آنتی‌اکسیدانت را استرس اکسیداتیو گویند (۱)

۱-۲-۱ عوامل ایجاد کننده استرس اکسیداتیو در بدن موجود زنده:

این عوامل عمدتا بوسیله دو مکانیسم ایجاد می‌شود:

۱- کاهش غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها: مثلاً: جهش در آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، اختلالات مادرزادی همولیتیک مانند جهش در ژن‌های هموگلوبین، این امر در گلبول‌های قرمز بیماران بتا-تالاسمی ماژور که افزایش بار آهن دارند مشاهده می‌شود، تجمع مس در کبد، کلیه، مغز در اثر بیماری ویلسون همچنین تجمع آهن در بافت‌ها (کبد وپانکراس) ناشی از بیماری هموکروماتوزیز سبب افزایش آسیب‌های اکسیداتیو و تخریب اریتروسیت‌ها می‌شود. ورزش‌های سنگین وفعالیت‌های ناگهانی که همراه با کاهش میزان ویتامین Eدر ماهیچه‌ها است، سبب آزاد شدن رادیکال‌های آزاد و افزایش پراکسیدشدن لیپیدها و دیگر واکنش‌های اکسیداتیو در بدن می‌شود. سم‌ها، کاهش ورود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مثلا کمبود ویتامین E و یا کمبود سلنیوم که موجب اختلال در عملکرد گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود (۲, ۳).

۲- افزایش تعداد گونه‌های فعال دارای بنیان‌های اکسیژنی، نیتروژنی، کربنی مشتق شده از فاگوسیت‌های فعال‌شده، افزایش یابد؛ مانند تورم‌های مزمن (chronic inflammation) (۱)، همچنین مصرف برخی داروها نظیر استامینوفن وافزایش پرواکسیدان‌هایی نظیر آهن، مس و آلودگی هوا از عوامل دیگر استرس اکسیداتیو هستند. گازهایی نظیر ازن، دی‌اکسیدنیتروژن و دود سیگار باعث اکسیدشدن بیومولکول‌ها وشروع واکنش‌های زنجیری رادیکال‌های آزاد می‌شوند.

اگر استرس اکسیداتیو، تحت شرایط پاتولوژیک رخ دهد می‌تواند منجر به تولید زیاد گونه های اکسیژنی فعال شود که سبب القاء تغییرات شیمیایی در بیوماکرومولکول‌ها می‌شود، مانند تغییر در DNA و پروتئین وپراکسیدشدن لیپیدها.

الف: آسیب به DNA: تاکنون بیش از صد نوع تغییر اکسیداتیو در DNA شناخته شده ولی فقط چند تغییر خاص در بازهای آلی به عنوان شاخص آسیب اکسیداتیو مطرح است که مهمترین آنها اکسیدشدن کربن شماره هشت در گوانین است (٤).

ب: اکسیدشدن پروتئین‌ها: پروتئین‌ها در استرس اکسیداتیو در ساختار ریشه‌های آمینواسیدی خود دچار تغییر می‌شوند. که میزان این آسیب به نوع و مقدار عوامل اکسیدان، میزان کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی و منابع رادیکال‌های آزاد دارد (٥).

ج: پراکسیدشدن چربی‌ها: رادیکال‌های آزاد موجب اکسیدشدن اسیدهای چرب بویژه اسیدهای چرب غیراشباع موجود در غشاء سلول‌ها می‌شود که شامل مراحل شروع، پیشرفت و پایان است (٦).

۱-۳ سیستم آنتی‌اکسیدانی:

واژه آنتی‌اکسیدان می‌تواند برای هر ماده‌ای هر چند با غلظت کم که از اکسیدشدن سوبسترا جلوگیری می‌کند به کار رود. برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها در درون بدن تولید می‌شوند و برخی دیگر از طریق مصرف مواد غذائی بدست می‌آیند.

تقسیم بندی آنتی‌اکسیدان‌ها بر اساس مکانیسم عمل:

۱-۳-۱ آنتی‌اکسیدان‌های شکننده زنجیره:

طرز عمل آنها مقاومت در مقابل تکثیر زنجیره و برداشتن ROSها است. این دسته،خود به چند زیر گروه تقسیم می‌شود که عبارتند از:

۱-۳-۱-۱ مولکول‌های کوچک آنتی‌اکسیدانی:

الف- قابل حل در آب مثل: ویتامین C و گلوتاتیون.

ب- قابل حل در چربی مثل: ویتامین E ، کاروتن، لیپوئیک اسید، کوآنزیم Q.

۱-۳-۱-۲ آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی:

شامل سوپراکسیددیسموتاز (برای یون سوپراکسید)، کاتالاز (برای هیدروژن پراکساید) و گلوتاتیون پراکسیداز (برای پراکسیدهای سلولی) (۷).

۱-۳-۲ آنتی‌اکسیدان‌های بازدارنده:

این تقسیم‌بندی بر اساس نوع عملکرد رادیکال‌ها می‌باشد. طرز عمل آنها کاهش سرعت آغاز زنجیره واکنش‌های رادیکال آزاد است که توسط ۲ مکانیسم انجام می‌شود:

۱- مانع از تشکیل رادیکال‌های آزاد و مهار گونه‌های اکسیژن فعال کنترل نشده می‌شود.

۲- مانع از واکنش آنها با ساختارهای بیولوژیکی می‌شود. در این دسته می‌توان به کاتالازها، پراکسیدازها، کلاتکننده یون‌های آهنی مثل EDTA(Ethylenediamine tetraacetate) و DTPA (Diethylenetriamine pentacetate). اشاره کرد (جدول۲-۱) (۷).

جدول۲-۱: طرز عمل اولیه برخی از آنتی اکسیدان (با منبع تولید درون بدن و یا کسب از خارج)

Chain breaking antioxidants	Preventive antioxidants
Albumin, bilirubin, uric acid Vitamin C, vitamin E, carotenes, lipoic acid, Coenzyme Q_{10}, glutathione, flavonoids	Metallothionine, transferrin, Coeruloplasmin, myoglobin, ferritin, Selenium, flavonoids EDTA (ethylenediamine tetraacetate) DTPA (diethylenetriamine pentacetate)
Enzymatic antioxidants: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase	

۱-٤ مراحل دفاع آنتی‌اکسیدانی:

موقعیت قرارگیری آنتی‌اکسیدان‌ها در سلول بر اساس مشخصه‌های شیمیایی است:

۱- شکننده‌های زنجیر آب‌دوست که در سیتوزول، میتوکندری وترکیبات هسته‌ای موجود است.
۲- شکننده‌های زنجیر آب‌گریز که عمدتاً در غشاءهای سلولی موجود هستند که واکنش زنجیره‌ای پراکسیدشدن لیپیدها را قطع کرده و مانع از ادامه این چرخه می‌شوند.
مکانیسم دفاع در برابر عوامل اکسیدکننده را می‌توان در سه مرحله بررسی کرد:
۱-٤-۱ سازش با استرس اکسیداتیو.
۱-٤-۲ جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد.
۱-٤-۳ فرآیندهای ترمیمی.

۱-٤-۱ سازش با استرس اکسیداتیو:

در هنگام استرس اکسیداتیو، تغییراتی در سلول‌ها ایجاد می‌شود که موجب سازش با شرایط جدید می‌شود. در اولین مرحله، رشد سلول‌ها متوقف می‌شود و٤ الی ٦ ساعت بعد، میزان بیان ژن‌های مختلف تغییر می‌کند که منجر به سازش موقت می‌گردد سازش موقت هم در پروکاریوت‌ها مشاهده شده است. به عنوان مثال پس از قرار دادن فیبروبلاست‌ها در محیط کشت حاوی پراکسیدهیدروژن، سه مرحله از تغیر بیان ژن در فواصل زمانی ٤، ۸ و۱۲ ساعت صورت می‌گیرد (۸, ۹).
حداقل ٤۰ ژن سازش در پستانداران وجود دارد که اکثراً مربوط به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، آنزیم‌های ترمیمی و آنزیم‌های تجزیه‌کننده مولکول‌های اکسید شده می‌باشد. مقاومت پایدار در برابر استرس اکسیداتیو در مراحل

بعدی ایجاد می‌شود که همراه با افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز تا ۲۰ برابر میزان طبیعی می‌باشد (۱۰).
فرآیند سازش با استرس اکسیداتیو بر عهده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اصلی و کمکی است.

۱-٤-۱-۱ آنزیم‌های اصلی آنتی‌اکسیدان:

سوپراکسیددیسموتاز[۱] (SOD):

اصلی‌ترین آنتی‌اکسیدان در موجود زنده است. رادیکال آنیون سوپراکسید ($O_2^{\bullet}$) بسیار سمی است این رادیکال طی متابولیسم عادی سلول‌ها عملکرد بسیاری از داروها و سموم و پرتوها و همچنین فاگوسیتوز، پیری، سرطان و غیره به وجود می‌آید.

در محیط غیرزنده و در PH=۷/۸ دیسموتاسیون دو رادیکال سوپراکسید با دو رادیکال $HO_2^{\bullet}$ با سرعت کم صورت می‌گیرد. این فرآیند در بدن موجودات زنده و در حضور آنزیم SOD با سرعت یک میلیون برابر انجام می‌شود (۱۱).

کاتالازCatalas:

دیسموتاسیون رادیکال سوپراکسید منجر به تشکیل هیدروژن پراکسید می‌شود که در وضعیت اکسیدشدن بالاتری قرار دارد. در این مرحله آنزیم کاتالاز وارد عمل شده و H_2O_2 را تجزیه می‌کند. این آنزیم در تمام موجودات زنده اعم از پروکاریوت و یوکاریوت وجود دارد و موجب دیسموتاسیون دو مولکول H_2O_2 و تشکیل مولکول‌های آب و

---

[۱] Super Oxid dismutase

اکسیژن می‌شود که در سطح اکسیدشدن پایین‌تری قرار دارد (۱۲).

پراکسیدازها:

این گروه از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان هموپروتئینی بوده و منحصراً در موجودات هوازی وجود دارند و واکنش‌های مشابه کاتالاز را انجام می‌دهند.

۱-٤-۱-۲آنزیم‌های فرعی آنتی‌اکسیدان:

در (جدول ۳-۱) چند آنزیم فرعی که دارای نقش آنتی‌اکسیدانی اند معرفی می‌شوند:

جدول ۲-۱: آنزیم های کمکی دارای نقش آنتی‌اکسیدانی

آنزیم	نام سیستماتیک
NAD (P) H دهیدروژناز دیافوراز-DT	NAD (P) H: (نام پذیرنده) اکسیدو ردوکتاز
منو دهیدرو آسکوربات ردوکتاز (NADH) ، AFRردوکتاز	NADH:منو دهیدرو آسکوربات اکسید و ردوکتاز
گلوتاتیون‌دهیدروژناز (آسکوربات)DHA ردوکتاز	گلوتاتیون: دهیدرو آسکوربات اکسید و ردوکتاز
پروتئازهای خنثی داخل سلولی	نام سیستماتیک ندارد، تجزیه کننده پروتئین های اکسید شده
ماکروکسی پروتئیناز	نام سیستماتیک ندارد، تجزیه کننده پروتئین های اکسید شده در گلبول های قرمز

۱-٤-۲ جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد:

دومین مرحله در دفاع آنتی‌اکسیدان جلوگیری از تولید رادیکال‌های آزاد و همچنین حذف آنها است. بدین منظور در بدن موجودات زنده، ترکیبات خاصی وجود دارند که به مقابله با رادیکال‌های آزاد می‌پردازند.

ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی:

علاوه برآنزیم های آنتی‌اکسیدان، انواع مختلفی از پروتئین‌ها وجود دارند که مانع از تولید رادیکال‌های $OH^{\bullet}$و اکسیدشدن پروتئین‌ها و چربی‌ها می‌شوند.

۱-٤-۲-۱ آنتی‌اکسیدان‌های پروتئینی:

آلبومین: این پروتئین که به مقدار زیاد در پلاسما وجود دارد، به سرعت به یون‌های مس متصل شده و آنها را جمع‌آوری می‌کند و تولید رادیکال $OH^{\bullet}$را به حداقل می‌رساند (۱۳).

ترانسفرین: گلیکوپروتئین منومریک با وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون است که آهن را درپلاسما منتقل می‌کند. در پستانداران هر مولکول ترانسفرین قادر به اتصال با دو یون فریک با میل ترکیبی زیاد است. نقش آنتی‌اکسیدانی ترانسفرین همراه با فریتین اعمال می‌شود (۱٤).

فریتین: پروتئین ذخیره آهنی در سیتوزول سلول‌های کبد که قادر به ذخیره بیش از ٤٥۰۰ اتم آهن در حفره داخلی خود است (۱٤).

ترانسفرین و فریتین با اتصال به یون‌های آهن، مقدار آهن آزاد را در سلول‌ها و سرم به حداقل رسانده، فرآیندهای اکسیدشدن درون سلولی را کاهش می‌دهند (۱٥).

سرولوپلاسمین: این پروتئین حاوی مس دارای فعالیت آنزیمی فروکسیداز نیز می‌باشد و باعث تبدیل یون فرو ($Fe(II)$) به فریک ($Fe(III)$) وقرارگرفتن آن در آپوفریتین می‌شود که نشان‌دهنده خاصیت آنتی‌اکسیدانی سرولوپلاسمین است (۱٦, ۱۷).

متالوتیونئین: این پروتئین غنی از سیستئن است (حدود ۳۳%) با توجه به این که گروه‌های سولفیدریل ریشه‌های سیستئین که قادر به اتصال با یون‌های روی، کادمیوم، جیوه و بسیاری از کاتیون‌های سنگین دیگر است، این پروتئین در جمع‌آوری یون‌های فلزی آزاد نقش بسزائی دارد به طوری که هر مولکول متالوتیونئین قادر به حمل ۷ یون کادمیوم یا روی است. این پروتئین در جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد نیز شرکت می‌کند (۱۸, ۱۹).

احتمالاً متالوتیونئین در محافظت از DNA در مقابل حمله رادیکال‌های هیدرکسیل نیز نقش دارد.

پروتئین‌های شوک حرارتی Heat Shock Proteins (HSP): سنتز این پروتئین‌ها در شرائط غیر طبیعی و استرس، القاء می‌شود. در اثر استرس اکسیدایتو ممکن است پروتئین‌های هسته‌ای یا ایمنوگلوبولین‌ها تجمع یافته و نامحلول شوند. مولکول‌های HSP70، رشته‌های پلی‌پپتیدی را باز کرده و آنها را به درون اندامک‌های سلول هدایت می‌کنند و همچنین پروتئین‌های به هم چسبیده را از هم جدا می‌کنند (۲۰). بنابراین، به طور کلی مولکول‌هایHSP در بازیافت و حفظ پروتئین‌ها نقش دارند.

سایر پروتئین‌های شرکت کننده در دفاع آنتی‌اکسیدانی عبارتند از: لاکتوفرین، هاپتوگلوبین، موسین‌ها و هموپکسین (۲۱).

۱-۴-۲-۲ آنتی‌اکسیدان‌های غیر پروتئینی:

۱-۴-۲-۲-۱ آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی:

کاروتنوئیدها: تاکنون بیش از ۶۰۰ نوع کاروتنوئید طبیعی شناسایی شده است. به نظر می‌رسد که این ترکیبات رادیکال‌های آزاد را به دام می‌اندازند (۲۲).

ویتامینE: این ویتامین یک آنتی‌اکسیدان بسیار مهم برای محافظت از ساختارهای غشایی در مقابل حمله رادیکال‌های آزاد است. ویتامینE مهمترین جمع‌کننده رادیکال آزاد از غشاء اریتروسیت‌ها است و موجب محافظت از آنها در مقابل پراکسیدشدن لیپیدهای غشائی می‌شود (۲۳).

۱-۴-۲-۲-۲ آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب

ویتامین C: یکی از مهمترین عوامل آنتی‌اکسیدان محلول در آب است که الکترون را در اختیار رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن قرار می‌دهد، سمی‌کینون‌ها و کینون‌ها را احیا می‌کند، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها را در مقابل آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند و موجب احیا شدن رادیکال‌های توکوفریل می‌شود (۲۴, ۲۵).

چندین ترکیب محلول در آب که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند در (جدول ۴-۱) معرفی می‌شوند.