مرکز اطلاعات مدارک علمی ایران
تقدیم مدارک

دانشگاه علوم پزشکی تهران
دانشکده داروسازی

۱۳۷۹ /۹/ ۲۰

پایان نامه جهت دریافت درجه دکترای داروسازی

موضوع:

بررسی اسپکتروفلورومتری میانکنش DNA ،کارنوزین و نیکل با واسطه نشانگر دی کلروفلورسین و شناسایی اثر کاتالیزوری DNA و کارنوزین

استاد راهنما:

آقای دکتر بیژن فرزامی

10299

اساتید مشاور:

آقای دکتر حسن فرسام

آقای دکتر موسوی موحدی

آقای دکتر اسماعیل علمی آخونی

نگارنده:

علی شمسایی گهکانی

سال تحصیلی ۸۰-۱۳۷۹

۴۳۲۴۶

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

که سود و سرمایه و خیر و برکتِ زندگیم

تماماً متعلق به آنهاست

۳۳۲۴۶

تقدیم به

استاد بزرگوارم

جناب آقای دکتر فرزامی

که افتخار و اعتبار این پایان نامه همه از اوست

با تقدیر و تشکر فراوان از:

- جناب آقای دکتر فرسام که بدون مساعدت های ایشان این پایان نامه به سرانجام نمی رسید.

- جناب آقای دکتر علمی آخونی که مشاورت و قضاوت این پایان نامه را بر عهده گرفتند.

- جناب آقای دکتر موسوی موحدی که در مراحل مختلف از امکانات آزمایشگاه ایشان برخوردار بودم.

- جناب آقای دکتر ملک نیا وسرکار خانم دکتر پاسالار که تدریس بی نظیر و به یاد ماندنیشان بسیاری را چون من به بیوشیمی علاقمند کرد.

- سرکار خانم دکتر بطحایی و آقای دکتر صفریان که در بخش تجربی این پایان نامه از تجربیاتشان بهره های بسیار بردم.

- اساتید، پرسنل و اعضای صمیمی گروه بیوشیمی که در کنارشان احساس راحتی می کردم.

- جناب آقای دکتر Philippe Collery که ترکیب دی کلروفلورُسین را به ما هدیه کردند.

و تمام کسانی که به هر نحو در انجام مراحل مختلف این پایان نامه از همراهی و همکار یشان استفاده کردم.

چکیده

انگیزه اولیه در این تحقیق ، مطالعه میانکنش" نیکل و DNA " و بررسی نقش رادیکال های آزاد (از جمله ROS*) در ژنوتوکسیسیته نیکل بود. در همین راستا، تکنیک اسپکتروفلوریمتری که حساسیت فوق العاده ای در اندازه گیری های بیوشیمیایی دارد، مورد استفاده قرار گرفت.

دی کلروفلورسین(LDCF) که یک ترکیب غیر فلورسنت است توسط اکسید کننده های قوی اکسید شده و تبدیل به دی کلرفلورسئین(DCF) می گردد. DCF دارای فلورسانس است و می تواند به عنوان یک شاخص کیفی و کمی برای سنجش گونه های اکسید کننده (مثلROS) بکار گرفته شود.

کارنوزین، که یک دی پپتید آندوژن است، از آن جهت مورد توجه واقع شد که گزارشاتی مبنی بر دخالت آن در ژنوتوکسیسیته نیکل موجود بود.

مشاهده رفتار غیر منتظره DNA و کارنوزین در کاتالیز اکسیداسیون DCF ثقل توجه مطالعه را از میانکنش نیکل-DNA به سوی میانکنش کارنوزین-DNA معطوف کرد.

پس از آن واکنش اکسیداسیون LDCF به DCF بیش از آنکه به عنوان ابزاری برای ردیابی ROS مطرح باشد، به صورت یک واکنش اکسیداسیون و احیاء زمینه ای برای بررسی تاثیر عوامل واکنشگر بر روی سرعت واکنش در آمد. نیکل هم از آن جهت که می توانست کاتالیز این واکنش را مهار کند، اهمیت پیدا کرد.

از جمله دیگر نتایج این تحقیق، رفتار پرواکسیدانی (pro-oxidant) کارنوزین در سیستم واکنشی فوق بود. این رفتار هر چند که با بعضی مطالعات انجام شده سازگار است ولی با ادعاهایی که کارنوزین را یک آنتی اکسیدان به حساب آورده اند، منافات دارد.

هم چنین در این مطالعات به اجمال به بررسی نقش هماتین (که دارای خاصیت پراکسیدازی است) و نیز آب اکسیژنه (به عنوان یک اکسیدکننده قوی) در کاتالیز DNA و کارنوزین پرداخته شد و این نتیجه حاصل گردید که هماتین برای واکنش اکسیداسیونLDCF ضروری بوده و آب اکسیژنه در تسریع کاتالیز DNA و کارنوزین موثر است.

*ROS = reactive oxygen species یا *گونه های فعال اکسیژن*

کلمات کلیدی:

DNA ، کارنوزین ، نیکل، کاتالیز، فلورسانس، اکسیداسیون، دی کلروفلورسین، دی کلروفلورسئین

فهرست مطالب

	شماره صفحه
۱- مقدمه	۱
۱-۱ - میانکنش DNA و یون های فلزی	۱
۱-۱-۱- انواع میانکنش بین DNA و یونهای فلزی	۱
۱-۱-۲- نقش بیولوژیک یون های فلزی در میانکنش با اسیدهای نوکلئیک	۲
۱-۱-۳- روش های مطالعه میانکنش یون های فلزی و DNA	۲
۱-۱-۴- پارامترهای مؤثر در میانکنش DNA و یون های فلزی	۲
۱-۱-۵- اثر غلظت یون فلزی	۲
۱-۱-۶- اثر یون های فلزی مختلف	۳
۱-۲- سرطانزایی یون های فلزی	۴
۱-۲-۱- مقدمه	۴
۱-۲-۲- نتایج بیولوژیک حمله رادیکال های آزاد به DNA	۵
۱-۳- نیکل	۷
۱-۳-۱- مقدمه	۷
۱-۳-۲- سرطانزایی نیکل	۸
۱-۳-۳- آزمایشات حیوانی	۸
۱-۳-۴- مکانیزم های آسیب رسانی نیکل	۹
۱-۳-۵- نقش ROS در ژنوتوکسیسیته نیکل	۱۱
۱-۳-۶- اثر scavengers در آسیب ناشی از نیکل	۱۲
۱-۳-۶-۱- singlet oxygen scavengers	۱۲
۱-۳-۶-۲- hydroxy radical scavengers	۱۲
۱-۳-۷- ردیابی ROS ناشی از نیکل با استفاده از دی کلروفلورُسین	۱۴
۱-۳-۸- اثر ترکیبات مختلف نیکل بر lipid peroxidation	۱۴
۱-۴- کارنوزین	۱۶
۱-۴-۱- مقدمه	۱۶
۱-۴-۲- بیوسنتز و تجزیه	۱۶
۱-۴-۳- نقش بیولوژیکی	۱۷
۱-۴-۴- کارنوزین و پیری	۱۷
۱-۴-۵- خواص آنتی اکسیدانی و radical scavenging کارنوزین	۱۸
۱-۴-۶- مشاهدات تجربی و بالینی	۱۹
۱-۴-۷- اثرات ضد سرطان کارنوزین	۱۹
۱-۴-۸- دیگراثرات درمانی کارنوزین	۱۹
۱-۵- میانکنش کارنوزین و یون های فلزی	۲۱

۱-۶- رادیکال های آزاد ۲۳
۱-۶-۱- مقدمه ۲۳
۱-۶-۲- منبع رادیکا ل های آزاد ۲۴
۱-۶-۳- آنتی اکسیدان ها ۲۵
۱-۶-۴- اندازه گیری رادیکال های آزاد ۲۵
۱-۷- دی کلروفلورُسین ۲۶
۱-۷-۱- مقدمه ۲۶
۱-۷-۲-کاربرد دی کلرو فلورُسین در اندازه گیری هیدروپراُکسید ها ۲۷
۱-۷-۲-۱- اثر هماتین ۲۸
۱-۷-۲-۲- اثر deareation (هوازدایی) ۳۰
۱-۷-۲-۳- اثر دما و زمان انکوباسیون ۳۰
۱-۷-۲-۴- اثر حلال در سنجش هیدروپراکسید ها ۳۰
۱-۷-۲-۵- اثر طول موج ۳۱
۱-۷-۲-۶- اثر pH ۳۱
۱-۷-۲-۷- اثر آنتی اکسیدانها ۳۲
۱-۷-۲-۸- اثر نوع پراکسید مورد سنجش ۳۲
۱-۷-۳- استوکیومتری واکنش (stoichiometry) ۳۳
۱-۷-۴- کاربرد دی کلرو فلورُسین در تحقیقات سلولی ۳۴
۱-۸ - اصول فلورسانس ۳۶
۱-۸-۱- مقدمه ۳۶
۱-۸-۲- بازده کوانتومی ۳۶
۱-۸-۳- فلورسانس و ساختمان ۳۶
۱-۸-۴- اثر استحکام ساختمانی (rigidity) بر فلورسانس ۳۷
۱-۸-۵- اثر دما و حلال بر فلورسانس ۳۸
۱-۸-۶- اثر یونها بر فلورسانس ۳۸
۱-۸-۷- اثر غلظت بر شدت فلورسانس ۳۸
۱-۸-۸- محاسبات و فرمولها ۳۸
۱-۸-۹- حساسیت فلورسانس ۳۹
۱-۸-۱۰- فلوریمتر و اسپکتروفلوریمتر ۳۹
۲- بخش تجربی ۴۱
۲-۱- استخراج و خالص سازی DNA ۴۱
۲-۱-۱- اصول استخراج و خالص سازی DNA ۴۱
۲-۱-۲- مواد مورد نیاز ۴۲
۲-۱-۳- وسایل و دستگاه های مورد نیاز ۴۲
۲-۱-۴- تهیه محلولها ۴۲

۲-۱-۴-۱- تقطیر فنل ۴۲
۲-۱-۴-۲- محلول فنل اشباع و بافره ۴۳
۲-۱-۴-۳- بافر فنل ۴۳
۲-۱-۴-۴- بافر NET ۴۳
۲-۱-۴-۵- بافر TE ۴۳
۲-۱-۴-۶- RNase جوشیده ۴۴
۲-۱-۴-۷- Proteinase K ۴۴
۲-۱-۴-۸- محلول SDS (۱۰٪) ۴۴
۲-۱-۴-۹- محلول سدیم استات (۳ مولار) ۴۴
۲-۱-۵- روش استخراج ۴۴
۲-۱-۶- تعیین خلوص و غلظت DNA ۴۵
۲-۲- آماده سازی نمونه ها برای سنجش فلورسانس ۴۷
۲-۲-۱- اصول آزمایش ۴۷
۲-۲-۲- مواد مورد استفاده ۴۷
۲-۲-۳- وسایل و دستگاه های مورد استفاده ۴۸
۲-۲-۴- تهیه محلول ها ۴۸
۲-۲-۴-۱- محلول استوک LDADCF ۴۸
۲-۲-۴-۳- محلول هماتین ۴۸
۲-۲-۴-۴- محلول آب اکسیژنه با رقت مناسب ۴۹
۲-۲-۵- آماده سازی نمونه ها ۴۹
۲-۲-۶- انکوباسیون نمونه ها ۴۹
۲-۲-۷- قرائت نمونه ها ۴۹
۲-۲-۸- کالیبراسیون سنجش آب اکسیژنه ۵۰
۳- نتایج ۵۱
۳-۱- اثر نیکل و DNA بر فلورسانس DCF ۵۱
۳-۲- اثر کارنوزین بر فلورسانس DCF ۵۳
۳-۳- اثر DNA ، کارنوزین و نیکل بر اکسیداسیون LDCF ۵۴
۳-۴- اثر کاتالیتیکی DNA بر اکسیداسیون LDCF در حضور کارنوزین ۵۵
۳-۵- اثر مهاری نیکل بر اکسیداسیون LDCF در حضور کارنوزین و DNA ۵۷
۳-۶- اثر گوانین بر اکسیداسیون LDCF ۵۹
۳-۷- تأئید اثر کاتالیتیکی DNA در حضور کارنوزین ۶۰
۳-۸- نقش هماتین در اکسیداسیون LDCF ۶۱
۳-۹- اثر حذف آب اکسیژنه ۶۳
۳-۱۰- نقش DNA در مهار اکسیداسیون LDCF توسط نیکل ۶۴
۳-۱۱- نقش هماتین و آب اکسیژنه در کاتالیز اکسیداسیون LDCF ۶۶

۴- بحث ۶۸
۴-۱- اثر کاتالیتیکی DNA و کارنوزین ۶۸
۴-۲- اثر پرواکسیدانی کارنوزین ۷۱
۴-۳- اثر آب اکسیژنه ۷۱
۴-۴- اثر هماتین ۷۳
۴-۵- اثر مهاری نیکل ۷۳
۴-۶- پیشنهاد ۷۵
خلاصه به زبان لاتین ۷۶
منابع و مآخذ ۷۷

۱- مقدمه

۱- مقدمه

۱-۱- میانکنش DNA و یون های فلزی

۱-۱-۱- انواع میانکنش بین DNA و یون های فلزی:

اسیدهای نوکلئیک، پلی آنیون هایی هستند که برای تعادل بار خود نیاز به کاتیون دارند. علاوه بر پروتئین های هیستونی که از طریق ریشه های مثبت آرژنین و لیزین، این تعادل را ایجاد می کنند، وجود یون های فلزی(مثل K^+، Na^+، Mg^{++} و احتمالاً Zn^{++}) نیز برای این مهم ضروری است. وجود شارژ منفی بر روی اسکلت اسیدهای نوکلئیک، تمایل آنها را برای میانکنش با یون های فلزی (به صورت آزاد یا کمپلکس کاتیونی) افزایش می دهد.

میانکنش بین یون های فلزی و اسیدهای نوکلئیک ممکن است کووالان(covalent) یا غیرکووالان (non-covalent) باشد. انواع پیوندهای محتمل بین یون های فلزی و اسیدهای نوکلئیک عبارتند از:

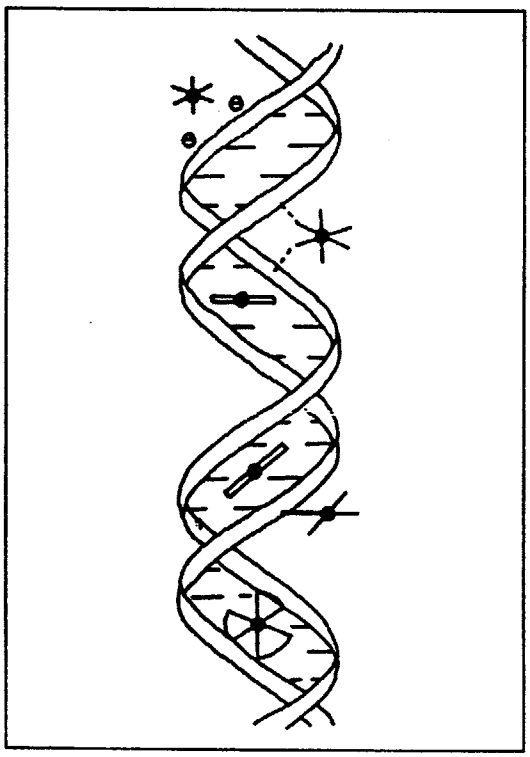
۱- پیوند یونی

۲-پیوند هیدروژنی : بین اسیدهای نوکلئیک و لیگاندهایی از کاتیون های بی اثر مانند $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ که باعث تغییر کنفورماسیون DNA از B به Z می شوند.

۳- intercalation (مابین رشته های DNA قرار گرفتن)، در خصوص فلزاتی که همراه خود لیگاندهای هتروآروماتیک و مسطح دارند. مثل کمپلکس های فلز- پورفیرین یا ترکیبات ارتوفنانترولین.

۴- پیوند با شیارها (minor or major grooves) . مثل کمپلکس فلز- پورفیرین یا ترکیبات ارتوفنانترولین.

۵- پیوند های کووالانسی با بخش های هتروسیکلیک بازهای آلی (مثل پلاتین)، با اکسیژن های فسفات (مثل منیزیوم) و با اکسیژن های قند (مثل مس و اُسمیم[osmium]) یا ترکیبی از این موارد.[54,57]



تصویر شماتیک انواع میانکنش های محتمل بین یون فلزی و DNA به ترتیب از بالا به پائین: پیوند یونی، پیوند هیدروژنی، اینترکَلیشن، اتصال به شیار کوچک، اتصال کووالان و اتصال به شیار بزرگ

۱-۱-۲- نقش بیولوژیک یون های فلزی در میانکنش با اسیدهای نوکلئیک

یون های فلزی در حفظِ شکل و ساختمان سه بعدی اسیدهای نوکلئیک نقش دارند. برای مثال حضور یون منیزیوم برای folding (تا شدن) خاصِ tRNAs ضروری است. بی شک یون های فلزی برای تا شدگی mRNA و همینطور در تشکیل ساختمان های غیر معمول DNA دخالت مؤثر دارند.

یون های فلزی (بسته به نوع و غلظت آنها) همچنین در unwinding یا melting (از هم گسیختگی) و rewinding (تاب خوردگی) رشته های DNA مؤثرند. برای مثال Mg^{++} باعث پایداری ترمودینامیکی DNA می شود، حال آنکه Cu^{++} به شدت باعث ناپایداری دوپلکسِ DNA می گردد. Zn^{++} به دلیل آنکه هم به اکسیژن های فسفات و هم به نیتروژن های حلقه هتروآروماتیکِ بازها تمایل دارد هم melting و هم rewinding را تسهیل می کند.[54]

۱-۱-۳- روش های مطالعه میانکنش یون های فلزی و DNA :

اثر کاتیون های فلزی بر تراکم DNA (condensation) با استفاده از تکنیک های اسپکتروسکپی (مثل UV و CD)، تفرق نوری (light scattering) ، اسپکتروفلوریمتری و همینطور بوسیله میکروسکپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین تکنیک اسپکتروسکپی ارتعاشی (vibrational) ، laser raman spectroscopy ، FT-IR Difference Spectroscopy و NMR به طور گسترده ای برای مطالعه محل های اتصال (binding sites) و مطالعات کامفورمیشنی به کار گرفته شده اند.[48,49,52,57]

۱-۱-۴- پارامترهای مؤثر در میانکنش DNA و یون های فلزی:

خصوصیات یون فلزی(عنصر واسطه یا اصلی بودن، بار، پلاریزاسیون، مُمان دوقطبی، آرایش الکترونیِ اربیتال های d، سختی و نرمی) و نوع لیگاند متصل به یون فلزی از جمله عوامل تعیین کننده در میانکنش DNA و یون های فلزی محسوب می شود.[53]

۱-۱-۵- اثر غلظت یون فلزی :

یون های فلزی در غلظت های پائین و بالا رفتار متفاوتی از خود نشان می دهند. در غلظت های خیلی پائین، گروه های فسفات موجود در اسکلت DNA سایت های ترجیحی برای اتصال کاتیون های فلزی هستند. اتصال به گروه های فسفات باعث خنثی شدن بارهای منفی و متعاقباً افزایش پایداری دوپلکس DNA (duplex stability) می شود.

با افزایش غلظت یون های فلزی به تدریج تفاوت های میان یون های فلزی برای اتصال به گروه فسفات و یا بازهای DNA آشکار می شود.[48]

۱-۱-۶ - اثر یون های فلزی مختلف :

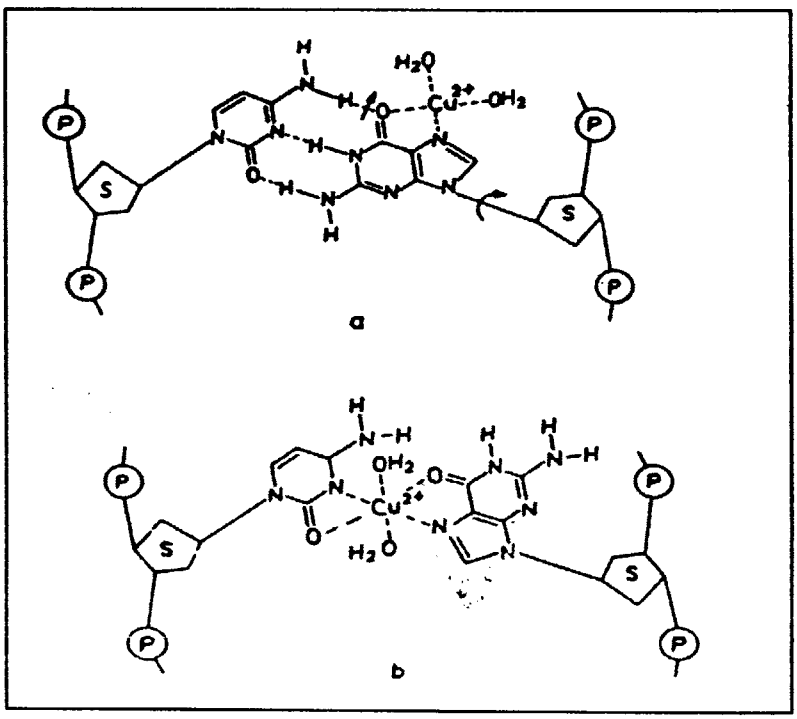
یون های فلزی قلیایی خاکی مثل Mg^{2+} به گروه های فسفات موجود در اسکلت خارجی DNA باند شده و با خنثی کردن بار منفی اسکلت DNA ، موجب پایداری ساختمان دو رشته ای DNA شده و افزایش حرارت ذوب (T_m) می شوند. بر عکس Cu^{2+} وCd^{2+} از طریق اتصال به باز های نوکلئوتید و شکستن پیوندهای هیدروژنی مابین دو رشته DNA باعث کاهش T_m می گردند.

دسته ای دیگر از یون های فلزی از قبیلCo^{2+} ،Ni^{2+} ،Mn^{2+} وZn^{2+} هم خاصیت اتصال به بازها را دارند و هم توانایی اتصال به گروه های فسفات .[57]

در یک مطالعه میل ترکیبی یون های فلزی برای اتصال به گروه های فسفات مقایسه شد و به ترتیب زیر مشخص گردید [49,50] :

$$Mg^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Mn^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$$

کاتیون مس که تمایل زیادی برای اتصال به بازهای DNA دارد باعث از هم گسیختگی رشته های DNA می شود[48,51]. حدس زده می شود که Cu^{2+} از یک طرف با N7 و O6 گوانین و از طرف دیگر با N3 سیتیدین در DNA باند شود (شکل زیر). .[57]



تصویر شماتیک کمپلکس شدن +Cu2 به DNA از طریق جفت بازهای گوانین- سیتوزین

۱-۲- سرطانزایی یون های فلزی:

۱-۲-۱- مقدمه:

آنچه مورد توجه ماست بیشتر معطوف به جنبه های شیمیایی سرطانزایی یون های فلزی(مخصوصاًکاتیون(Ni(II))است. در همین راستا اثر مهاری یا تحریکی بعضی مشتقات His (مثل کارنوزین) بر این واکنش های سرطانزایی نیز اهمیت پیدا می کند.

براساس جدول تناوبی عناصر، یونهای فلزی سرطانزا در گروه های مختلف جدول قرار می گیرند.

بیشتر فلزات سرطانزا در اولین ردیف عناصر واسطه قرار گرفته اند(مثل:Ni ، Co ، Fe و Cr). از این میان نیکل و کروم بیشترین اثر سرطانزایی را نشان داده اند. ابهاماتی در رابطه با سرطانزایی Fe ، Cu و Co وجود دارد (uncertain carcinogens).

مطالعات نشان می دهد که عوامل دیگری مثل complexation و محیط complex و واکنش سایر مولکول ها با یون فلزی در سرطانزایی یون فلزی موثر است.[1]

به طور کلّی خواص فیزیکو شیمیایی کمپلکس بر سرطانزایی یون فلزی تأثیر می گذارد. به عنوان نمونه: درمیان ترکیبات مختلف کروم، فقط کروم(IV) باعث سرطان ریه می شود. همچنین در مورد نیکل مشخص شده که تنها نیکل ۲ ظرفیتی است که اثر سرطانزایی دارد.

بنابراین تنها با توسل به جدول تناوبی و مشاهده جایگاه یک فلز در آن نمی توان به میزان سرطانزایی آن پی برد بلکه باید به وضعیت complexation و محیط واکنش نیز توجه کرد.

الکترونگاتیویته (electronegativity) فلزات نیز به عنوان شاخصی برای میزان سرطانزایی فلزات مطرح شده است. سرطانزاترین فلزات، الکترونگاتیویته ای در محدوده1.9-1.1 دارند(به جز چند استثناء). در میان یونهای فلزی به نظر می رسد که نیکل از لحاظ شیمیایی مؤثرترین فلز سرطانزا باشد.

شواهد غیر مستقیمی مبنی بر ایجاد رادیکال های آزاد بوسیله یونهای فلزی در سلول وجود دارد که بر اساس شناسایی محصولات ناشی از حمله رادیکال های آزاد به بیومولکولها بدست آمده. ایجاد محصولات اکسید شده مولکول DNA و ردیابی آنها مدرکی دال بر آسیب رسیدن به DNA و سرطانزایی در اختیار می گذارد.

فلزاتی چون Cu(I) ، Fe(II) ، Co(II) و Ti(III) به صورت کاتیون آبی (aquo cation) از طریق واکنش های Fenton/Haber-Weiss و یا از طریق واکنش های autoxidation باعث آسیب رساندن به DNA و ایجاد محصولات اکسیدهٔ DNA می شوند.

بعضی کاتیون ها مثل Cu(II) و Mn(II) و بعضی کمپلکس های Fe(II) و Ni(II) میتوانند اثرات مشابه superoxide dismutase ایجاد کنند. سوبسترای اصلی برای این واکنش ها احتمالاً H_2O_2 و $O_2^{\cdot -}$ است که در متابولیسم اکسیداتیو موجودات بی هوازی ایجاد می شود.

یکی از انواع اکسیژن فعال singlet oxygen نام داردکه مستقیماً از اثر کاتیون های فلزی سرطانزا بر H_2O_2 حاصل می شود.

شلات شدن یونهای فلزی بر روی این مکانیزم ها اثر مهاری یا تحریکی دارد. برای مثال: Ni وقتی به بعضی لیگاندهای غیر آلی متصل می شود در واکنش با H_2O_2 و O_2 مقاومت نشان می دهد ولی وقتی به بعضی پپتیدها یا پروتئین ها متصل می شود، در واکنش با H_2O_2 و O_2 ،فعال می شود. Co(III) در حضور مواد شلات کننده تمایل بیشتری در واکنش با O_2 نشان می دهد.

در بسیاری از موارد خود مولکول های آلی که به یون های فلزی متصل می شوند، اولین هدف (target) برای حمله اکسیژن فعال شده هستند. سپس این مولکول های آلی فعال می شوند و با سایر مولکولها (مثل پروتئین ها و DNA) وارد واکنش می شوند.

آلکیل هیدروپراکسیدها(alkyl hydroperoxides) مثل لیپید پراکسیدها می توانند با کاتیون های فلزی واکنش داده و ایجاد alkoyx radicals نمایند:

$$ROOH + M^{n+} \longrightarrow RO^{\cdot} + OH^{-} + M^{(n+1)+}$$

به نظر می رسد وقتی Ni(II) با تتراگلایسین(Gly4) کمپلکس می شود، به طور خودبخودی با O_2 وارد واکنش می شود و کمپلکس واسطی(intermediate complex) از Ni(III) حاصل می شود.

محصول نهایی این واکنش ها لیگا ندهای آلی تخریب شده(decomposed organic ligands) و نسبت های متفاوت از Ni(II) و Ni(III) است.

وقتی نیکل (II) با پپتیدهای دپروتونه (deprotonated) وارد واکنش می شود نتایج مشابهی حاصل می گردد.

پیشنهاد شده که با اتصال Ni(II) به بعضی پپتید های حاوی His (و همینطور به آلبومین سرم) رادیکال های بسیار فعالی (highly reactive radicals) به نام Ni-oxene [NiO^{2+}] ایجاد می شود [19].

این رادیکال احتمالاً یک ترکیب اکسید کننده قوی site specific می باشد. لازم است بدانیم که نه ترکیبات حاوی His ونه Ni(II) هیچکدام به تنهایی نمی توانند اثری برH_2O_2 بگذارد.

در اثر ایجاد کمپلکس بین ترکیبات حاوی His و کاتیون Ni(II) و سپس اثر این کمپلکس بر O_2 یا H_2O_2 ترکیبات واسطی مثل رادیکال های $OH^{\cdot}$ وNi-oxene و سایر رادیکال های اکسیژن، گوگرد یا کربن دار ایجاد می شود که باعث آسیب رساندن به بیومولکول ها می شود.[1]

۱-۲-۲- نتایج بیولوژیک حمله رادیکال های آزاد به DNA :

تعدادی از محصولات ناشی از حمله رادیکال های آزاد به DNA که به عنوان *مارکر* (biomarker) نیز قابل استفاده هستند، عبارتند از:

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)
8-hydroxyguanosine (8-OHG)
5-hydroxy-2'-deoxycytidine (5-OHdC)