بسم الله الرحمن الرحيم

٩٩٥٢

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان
دانشکده داروسازی و علوم دارویی
مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس

پایان نامه دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

بررسی میزان استرس اکسیداتیو سرم شاغلین کارخانه سیمان داراب

توسط:
عطاء اله ناعمی

به راهنمایی:
دکتر شیرین پور نور محمدی
دکتر احمد غلامحسینیان

مهرماه ۱۳۸۷
شماره پایان نامه:۵۰۶

۹۹۵۱۰

تقدیم به بهترین های زندگیم

پدر و مادرم

مایه استواری قامتم، آنان که قبل از هر قدم من قدم برداشتند تا سالم به مقصد برسم. آنان که تپش مهرشان تنها نوای قلبم است. آنان که پشتم به وجود مهربانشان گرم است و هیچ برای جبران زحماتشان ندارم. مادری که دریای محبتش را کرانه نیست و پدری که هیچگاه محبتش را پاسخ نگفتم.

هزاران بوسه بر دستان پرمهرشان

همسرم و خانواده محترمش

الهه عشق زندگیم، او که وجودم را با جام محبتش لبریز ساخت. تقدیم به تک گل زیبای باغ من سارا که طراوت را از او آموختم و صداقت را با او زمزمه کردم طعم ماندگار عشق را به من چشانید و نگاه گرمش همواره شکوه زندگی ام بوده است

هزاران بوسه بر چشمان پرمهرش

خواهر مهربانم فروغ

به پاس عشق خواهرانه اش

آسمان خوشبختی و موفقیت زندگیش ستاره باران، بهار شادیش بی خزان

عموی مهربانم دکتر منصور ناعمی

برادر عزیزم دکتر محمدرضا ناعمی

به پاس الگوی موفقیتم، نامشان در اوج قله موفقیت ماندگار

و به یاد تمامی دوستان عزیزم

ورودی ۸۱ دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

به امید تحقق آرزوهایشان

و با تشکر صمیمانه از اساتید گرانقدرم

سرکارخانم دکتر شیرین پورنورمحمدی

جناب آقای دکتر احمد غلامحسینیان

و با سپاس فراوان از:

ریاست محترم دانشکده جناب آقای دکتر پرداختی

و کلیه اساتید دانشکده داروسازی

و با تشکر از تمام عزیزانی که در این مدت همراهم بودند...

خلاصه:

مقدمه: رادیکالهای آزاد گونه های شیمیایی بسیار فعالی هستند که در شرایط طبیعی طی فرآیندهای سلولی یا از منابع خارجی تولید می شوند. استرس اکسیداتیو عمدتاً در انسان در نتیجه کاهش آنتی اکسیدان های بدن یا افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن دار به وجود می آید، که منجر به پراکسیداسیون لیپیدی می شود. اندازه گیری محصولات پراکسیداسیون لیپیدی مانند مالون دی آلدهید و سطح سرمی مولکول های تیول و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بخشی از شاخص های موثر در مطالعه اثرات رادیکال های آزاد اکسیژن در بدن می باشند. صنعت سیمان به عنوان عامل اصلی آلودگی در نظر گرفته شده است که به علت غبار و ذرات ریز پخش شده در مراحل گوناگون تولید سیمان است. کارگران کارخانه سیمان به طور مزمن، در تماس با بعضی از آلاینده ها از قبیل $CaCO3$ ، SiO_2 ، Al_2O_3 و Fe_2O_3 می باشند.

روش: به این منظور ۹۰ نفر از کارگران کارخانه سیمان (گروه مورد) و ۳۰ نفر فرد سالم (گروه شاهد) که از لحاظ سن و سابقه کار متناسب بودند، انتخاب شدند. افراد مورد نظر به ۲ گروه مواجهه مستقیم و غیرمستقیم تقسیم شدند. سپس نمونه گیری خون انجام گرفت و سرم جدا گردید. تیوباربیتوریک اسید به نمونه اضافه شد و سپس مواد بدست آمده از تیوباربیتوریک فعال (TBARs) استخراج گردید و جذب آن در ۵۳۲nm اندازه گیری شد.مولکول های تیول با استفاده از دی تیونیتروبنزوئیک اسید در ٤١٢nm اندازه گیری شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی کل با معرف تری پیریدیل تریازین در ۵۹۳nm اندازه گیری شد.

نتایج: سطح سرمی TAC, TTM به طور معنی داری در هر ۲ گروه مستقیم و غیرمستقیم در مقایسه با گروه کنترل پائین تر بود (P=0.00). TAC, TTM در سرم به طور معنی داری در گروه در تماس مستقیم نسبت به گروه در تماس غیرمستقیم پائین تر بود (به ترتیب P=0.00 و P=0.024). تفاوت معنی داری در سطح سرمی پراکسیداسیون لیپیدی (TBARs) در بین گروه ها مشاهده نشد.

نتیجه گیری: با توجه به پایین بودن سطح مولکول های تیول و ظرفیت آنتی اکسیدانی در کارگران مواجه مستقیم نسبت به گروه های دیگر بنابراین این کارگران باید از عوامل آنتی اکسیدان مانند ویتامین E به میزان بیشتری استفاده نمایند و یا به وسیله ماسک مسیرهای تنفسی خود را پوشش دهند.

واژه های کلیدی: سیمان، سرم، آنتی اکسیدان ها، استرس اکسیداتیو، گروههای تیول، پراکسیداسیون لیپیدی.

Abstract

Introduction: Free radicals are reactive chemical species wich are naturally produced in cells. Principally, oxidative stress in human can result from diminished body antioxidants or increased production Raective Oxygen Species (Ros), which leads to lipid proxidation. Measurement of lipid proxidation products like Malon Di Aldehyde (MDA) and Total Thiol Molecules (TTM) and Total Antioxidant Capacity (TAC) are effective markers to study oxygen free radical effects in the body. The cement industry is considered as a major pollution problem because of dust and particulate matter emitted at various steps of cement production. Worker in the cement factory are chronically exposed to some pollutants like $CaCO_3$, SiO_2, Al_2O_3, Fe_2O_3.

Method: 90 workers were chosen from cement factory (test group) and 30 healthy from the volunteer population of the city near the factory (control group) who were age and work history matched subjects. The subjects were divided into two groups of direct and indirect exposure. After that blood samples were taken and plasma dispersed. Thiobar Bituric Acid (TBA) was added then TBA reactive substances (TBARs) adducts were extracted and absorbance was measured at 532 nm. TTM were measured at 412 nm using Di Thio Nitro Benzoic Acid (DTNB). TAC were measured at 593nm using Tripyridil striazine (TPTZ).

Results: Serum levels of TTM and TAC were significantly lower in both direct- and indirect-exposed groups in comparison to healthy control group (p=0.00). Serum TTM and TAC were significantly lower in direct-exposed workers as compared to indirect-exposed ones (p=0.00 and p=0.024, respectively). There was no significant difference on the level of lipid per oxidation among groups.

Conclusion: It is contcluded that direct-exposed workers have more oxidative stress components in comparison to non-directly exposed ones. So it is recommended workers should use more antioxidants agents like Vit E and cover their mouth by mask during their work.

Key words: cement; serum; antioxidants; oxidative stress; thiol groups; lipid peroxidation;

جدول اختصارات

A	Adenine
C	Cytosine
CBC	Cell Blood Counter
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Potential
G	Guanine
GSH	Glutathione
Hb	Hemogobin
Hct	Hematocrit
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
MCV	Mean Corpuscular hemoglobin Volume
MDA	Malon Di Aldehyde
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
OHdG	Hydroxy Deoxy Guanosine
Plt	Platelet
RBC	Red Blood Cells
ROS	Reactive Oxygen Species
RPM	Rate Per Minute
SOD	Super Oxide Dismutase
T	Thymine
TAC	Total Antioxidant Capacity
TBA	Thio Barbituric Acid
TCA	Tri Chloroacetic Acid
TPTZ	Tri Pyridyl-striazine
TTM	Total Thiol Molecules
WBC	White Blood Cells

فهرست مطالب

عنوان صفحه

خلاصه فارسی I
خلاصه انگلیسی II
جدول اختصارات III

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه ۲
۱-۲ منابع تولید رادیکالهای آزاد ۲
۱-۲-۱ منابع اندوژن ۲
۱-۲-۲ منابع اگزوژن تولید کننده رادیکال آزاد ۵
۱-۳ اثرات مخرب رادیکال آزاد بر ماکرو مولکول ها ٦
۱- ۳-۱ اثر بر لیپیدها ٦
۱-۳-۲ اثر بر پروتئین ها ۷
۱-۳-۳ اثر بر اسیدهای نوکلئیک و پیش سازهای آنها ۸
۱-٤ استرس اکسیداتیو ۱۲
۱-۵ مکانیسم های دفاعی سلول در برابر رادیکالهای آزاد و استرس اکسیداتیو ۱۲
۱-۵-۱ منابع آندوژن ۱۳
۱-۵-۱-۱ آنزیم های آنتی اکسیدان ۱۳
۱-۵-۱-۱-۱ آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) ۱۳
۱-۵-۱-۱-۲ آنزیم کاتالاز (CAT) ۱۳
۱-۵-۱-۱-۳ آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز ۱٤

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۱-۵-۲ منابع اگزوژن ۱٤
۱-۵-۲-۱ ویتامین های آنتی اکسیدان ۱٤
۱-۵-۲-۱-۱ ویتامین E (α توکوفرول)..... ۱٤
۱-۵-۲-۱-۲ ویتامین C (اسید اسکوربیک) ۱٤
۱-۵-۲-۱-۳ β کاروتن ۱۵
۱-۵-۲-۲ فلزات آنتی اکسیدان ۱۵
۱-۵-۲-۲-۱ سلنیوم (Se) ۱۵
۱-۵-۲-۲-۲ روی (Zn) ۱۵
۱-۵-۲-۲-۳ مس (Cu) ۱٦
۱-۵-۳ سایر انتی اکسیدانها ۱٦
۱-۵-۳-۱ سرولوپلاسمین ۱٦
۱-۵-۳-۲ بیلی روبین ۱٦
۱-۵-۳-۳ اسید اوریک ۱۷
۱-۵-۳-٤ یوبی کینون ۱۷
۱-۵-۳-۵ اسید α لیپوئیک..... ۱۷
۱-۵-۳-٦ گلوتاتیون ۱۸
۱-٦ رابطه استرس اکسیداتیو با برخی آلاینده های صنعتی سیمان..... ۱۸

فصل دوم: مواد، دستگاهها، روشها

۲-۱ مواد..... ۲۳

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۲-۲ دستگاهها و تجهیزات ۲۳
۲-۳ روش کار ۲٤
۲-۳-۱ جمع آوری اطلاعات دموگرافیک ۲٤
۲-۳-۲ جمع آوری نمونه خون ۲٥
۲-٤ روشهای سنجش و ارزیابی میزان رادیکالهای آزاد ۲٦
۲-٤-۱ روش اندازه گیری TAC ۲۷
۲-٤-۲ روش اندازه گیری TTM ۲۷
۲-٤-۳ روش اندازه گیری TBARs ۲۸
۲-٥ محاسبات و آنالیزهای آماری ۲۹

فصل سوم: نتایج

۳-۱ نتایج ۳۱

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

٤-۱ بحث و نتیجه گیری ۳٦

فصل پنجم: منابع

منابع ٤۰

ضمائم

فصل اول

مقدمه

۱-۱ مقدمه

رادیکالهای آزاد مولکولها یا گونه های شیمیایی فعال هستند که در حالت طبیعی طی فرآیندهای سلولی همچون تنفس میتوکندریایی، فاگوسیتوز، متابولیسم اسید آراشیدونیک، تخمک گذاری، باروری و... تولید می شوند. تولید این گونه های فعال که نیمه عمر کوتاهی دارند در شرایط پاتولوژیک مثل التهاب افزایش چندین برابر دارد. (۱) از نظر شیمیایی رادیکال آزاد به اتم یا مولکولی اطلاق می شود که دارای یک یا چند الکترون جفت نشده باشد. (۲) این الکترون منفرد برای جفت شدن به الکترون دیگری نیازمند است و بنابراین بسیار فعال است. حمله رادیکال آزاد به مولکولها جهت کسب الکترون به طور مکرر انجام شده و زنجیره رادیکال بوجود می آید ولی در حضور آنتی اکسیدانهایی مثل ویتامین E و هیدروکسی تولوئن بوتیله خاتمه می یابد. (۳)

۱-۲ منابع تولید رادیکالهای آزاد:

این منابع به ۲ دسته داخلی (اندوژن) و خارجی (اگزوژن) تقسیم می شوند.

۱-۲-۱ منابع اندوژن:

به طور طبیعی در بدن وجود دارند با دو منشاء آنزیمی و غیر آنزیمی عمل می کنند. اکسیژن مولکولی بواسطه واکنشهای اتواکسیداسیون توسط اجزاء محلول داخل سلولی به شکل فعال رادیکالی تبدیل می شود. از طرفی برخی آنزیم های داخل سلولی در چرخه کاتالیتیک با احیا ملکولی اکسیژن رادیکالهای پراکسید هیدروژن و سوپر اکسید تولید می کنند. از این آنزیمها می توان به گزانتین اکسیداز، آلدهیداکسیداز و تریپتوفان دی اکسیژناز اشاره نمود. از طرفی آنزیمهای متصل به غشاء و سیستم انتقال الکترونی نیز قادر به این کار هستند. (٤) در سیستمهای اکسیداسیون و احیا بیولوژیکی ابتدا اتم هیدروژن از سوبسترا حذف شده و از طریق یک یا چند واکنش اکسیداسیون و احیا به

مولکول پذیرنده هیدروژن منتقل می گردد. چنانچه فرآیند مورد نظر تنفس سلولی باشد الکترون ها به صورت اتمهای هیدروژن از طریق کمپلکسهای زنجیره تنفسی به مولکول اکسیژن انتقال می یابند. در این مسیر اکسیژن بیشترین پتانسیل کاهش را دارد، به عنوان آخرین پذیرنده هیدروژن به انتقال پایان می دهد.

تصور آسیب های مخرب O_2 از جهت تولید رادیکالهای آزاد در کنار نقش حیاتی آن مشکل است. توانایی اکسیژن در تولید رادیکال آزاد به خصوصیات اتمی آن وابسته است. (۳)

اکسیژن الکترون منفرد را به راحتی می پذیرد و گونه های نیمه کاهیده به نام ROS را تولید می کند. مثلاً سوپر اکسید $O_2^{\cdot-}$ نمونه مهمی از این ترکیبات است و به میزان قابل توجهی در زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی و میکروزومی تولید می شود. (۱)

این رادیکال در گلبول قرمز بر اثر اتواکسیداسیون هموگلوبین و تولید مت هموگلوبین ایجاد می شود و در بافتهای دیگر به طور مستقیم توسط آنزیمهای گزانتین اکسیداز، تریپتوفان دی اکسیژناز و ایندول آمین دی اکسیژناز تولید می گردد. لازم به ذکر است این رادیکال فعال در جریان انفجار تنفسی نوتروفیلها و تحت اثر آنزیم NADPH اکسیداز تولید می شود. (۵)

$$O_2 + \bar{e} \rightarrow O_2^{\cdot-}$$

$$NADPH + 2O_2 \xrightarrow[oxidase]{} 2O_2^{\cdot-} + NADP + H^+$$

اکثر رادیکالهای سوپراکسید تولید شده تحت اثر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به پراکسید هیدروژن تبدیل می شوند.

آنزیمهای منوآمین اکسیداز و L آمینواسید اکسیداز نیز به طور مستقیم H_2O_2 تولید می کنند. (٦)

پراکسید هیدروژن چند سرنوشت دارد:

۱) کاتالیز H_2O_2 به آب و اکسیژن تحت اثر آنزیم کاتالاز که در بسیاری از سلول ها وجود دارد.

$$2H_2O_2 \underline{catalase}\ 2H_2O + O_2$$

۲) آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز با کوفاکتور سلنیوم در حضور گلوتاتیون احیا، بر H_2O_2 اثر کرده و آن ها را به گلوتاتیون اکسید شده و آب تبدیل می کند. این آنزیم قادر است پراکسیدهای دیگر را نیز به عنوان سوبسترا استفاده کند.

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow[Peroxidase]{Glutathion} GssG + 2H_2O$$

۳) از دو سوبسترای H_2O_2 و رادیکال $O_2^{\cdot-}$ طی واکنشهای به ترتیب فنتون و هابر- ویس، در حضور کاتالیزور کاتیون فرو رادیکال هیدروکسیل تولید می شود. (۵)

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$$
$$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

گونه فعال دیگر نیتریک اکسید است که تحت اثر آنزیم نیتریک اکسیدسنتتاز از آرژینین تولید می شود.

این ترکیب به طور طبیعی بوسیله ایزو آنزیم های اندوتلیالی و نورونی و در شرایط التهابی بوسیله ایزو آنزیم ماکروفاژی و نیز در سلولهای ماهیچه صاف سنتز می شود. نیتریک اکسید طی واکنش با رادیکال سوپر اکسید گونه فعال پراکسی نیتریت ($ONOO^-$) را تولید می کند که عامل مهم در پراکسیداسیون لیپیدی و نیتراسیون پروتئین ها است. (۷) لازم به ذکر است طی عبور الکترون از کمپلکسهای چهارگانه موجود در میتوکندری این امکان وجود دارد که الکترون از زنجیره تنفسی خارج شود و طی واکنش با اکسیژن تولید $O_2^{\cdot-}$ نماید که علت اصلی آسیب اکسیداتیو سلولی است که منجر به پیری و بیماری های دژنراتیو می شود. بررسی ها نشان داده است که بیشترین مقدار سوپر

اکسید در کمپلکس I میتوکندریایی تولید و در غیاب مهار کننده هایی چون روتنون سرعت تولید آن افزایش می یابد. (۸)

این کمپلکس، $O_2^{\cdot-}$ را در سمت ماتریکس غشاء داخلی میتوکندری تولید می کند ولی محل دقیق آن مشخص نیست و به هر یک از اجزاء این کمپلکس نسبت داده شده است. (۹) کمپلکس III پس از I بیشترین رادیکال را تولید می کند. (٤)

۱-۲-۲ منابع اگزوژن تولید کننده رادیکال آزاد:

اشعه یونیزه کننده و مواد شیمیایی مثل دود سیگار، آفت کش ها، داروها، لایه ازن، حلالهای صنعتی و مواد رادیواکتیو از عوامل خارجی تولید کننده رادیکال های آزاد هستند. (۱۰)

یکی از این عوامل شیمیایی مجموعه ای از چند ماده شیمیایی مخرب به نام سیمان است.

سیمان ماده ای است که در صنایع گوناگون کاربردهای مختلفی دارد مثل احداث ساختمان ها، پل ها و غیره. سیمان متشکل از ترکیبات زیر است:

Na_2O، K_2O، SO_3، MgO (۱-۲٪)، CaO (سنگ آهک ٦٦-٦۲٪)، Fe_2O_3 (۲-۵٪)، SiO_2 (سیلیس)، آزبست ($Mg_3Si_2O_5(OH)_4$)، Al_2O_3 اکسید آلومینیوم (۸٪-٤) و نیز مقدار کمی کروم، کبالت و نیکل هم در ساختمان آن بکار رفته است. (۱۱)

سیمان دو نوع است: ۱) سیمان طبیعی که از آسیاب کردن سنگ سیمان حاصل می شود. ۲) سیمان مصنوعی پرتلند که در ۱۸۲٤ در لندن به ثبت رسید و از پخت مواد آهکی و مواد رسی بدست می آید. مواد تشکیل دهنده سیمان که در بالا ذکر شده را پس از آسیاب کردن و هموژنیزه شدن سیلو می کنند و در کوره در درجه حرارت ۱٤۰۰-۱٦۵۰c° می پزند. از پخت آن گلوله هایی به نام کلینکر حاصل می شود (٤cm-۳ قطر)، سپس آنها را خرد و آسیاب می کنند و با افزودن مقداری گچ که در گیرش سیمان نقش دارد آن را تهیه می کنند. (۱۲)

۱-۳ اثرات مخرب رادیکال آزاد بر ماکرو مولکولها:

رادیکال آزاد بر روی لیپیدها، پروتئین ها، DNA و کربوهیدراتهای سلولی تاثیر بیولوژیک می گذارند. شکل (۱-۱)

۱-۳-۱- اثر بر لیپیدها:

اکسید اسیون لیپیدها مهمترین آسیبی است که در اثر حمله رادیکالهای آزاد به سلولها وارد می شود و نسبت به سایر آسیب های وارده بیشترین حساسیت را دارد. (۱۳،۱٤)

با حمله رادیکال های آزاد و جدا کردن اتم های هیدروژن از اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در لیپوپروتئین های غشاء و نیز اسیدهای چرب آزاد پر اکسیداسیون لیپیدی آغاز می شود.

مطالعات in vitro حاکی از سه مرحله آغاز، پیشرفت و پایان در روند پراکسیداسیون لیپیدی است. (۱۵)

الف) مرحله آغاز (Initiation): طی این مرحله تحت تاثیر رادیکال آزاد یک اتم هیدروژن از لیپید غیر اشباع (LH) جدا و رادیکال حاوی مرکز کربنی ($L^{\cdot}$) تولید می شود. این رادیکال با سرعت کنترل شده طی واکنش با O_2 ایجاد رادیکال پراکسیل ($Loo^{\cdot}$) می کند. این واکنش با، باز آرایی پیوندهای دوگانه و تولید دی ان (=' های کونژوگه توام است.

ب) مرحله پیشرفت (Propagation): رادیکال پراکسیل ($Loo^{\cdot}$) اتم هیدروژن را از یک اسید چرب غیر اشباع دیگر جدا کرده و لیپیدهیدروپراکسید (LOOH) و رادیکال $L^{\cdot}$ دیگری تولید می نماید. در صورت عدم وقوع مرحله پایان این فرآیند تا اتمام کامل اسیدهای چرب غیر اشباع ادامه می یابد.

ج) مرحله پایان (Termination): طی این مرحله ۲ رادیکال با هم واکنش کرده و ترکیب غیر رادیکالی و غیر فعال تولید می کنند:

$$L^{\cdot} + L^{\cdot} \rightarrow LL$$

$$Loo^{\circ} + Loo^{\circ} \rightarrow LooL + O_2$$

$$Loo^{\circ} + L^{\circ} \rightarrow LooL$$

اما ترکیباتی مانند ویتامین های C,E رادیکال های آزاد پایداری تولید می کنند که نمی توانند در مرحله پیشرفت شرکت کنند و به همین علت به عنوان آنتی اکسیدان به پراکسیداسیون لیپیدی پایان می دهد. (۱۵)

غشاهای بیولوژیکی مهمترین اهداف گونه های فعال می باشند. این گونه ها منجر به پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع فسفولیپیدهای غشاء می گردند و به این ترتیب بر خواص فیزیکی غشاء مانند سیالیت، نفوذپذیری و فعالیت آنزیم های غشاء اثر می گذارند. (۱۶)

مالون دی آلدهید و هیدروکسی نوننال (Hydroxy nonenal) از جمله محصولات اصلی اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع می باشند که پس از استخراج آنها در فاز آبی به روش اسپکتروفتومتری قابل سنجش هستند. (۱۷)

ایزوپروستان ($F_{2\alpha}$) که ایزومری از پروستاگلاندین ها می باشد نیز تحت اثر رادیکال های آزاد از اسید آراشیدونیک استریفیه مستقل از مسیر سیکلواکسیژناز تولید می شود و به وسیله آنزیم فسفولیپاز A_2 آزاد شده و یک بیومارکر اختصاصی کمی و پایدار از لحاظ شیمیایی برای ارزیابی استرس اکسیداتیو در شرایط in vivo مطرح می باشد. (۱۷)

۱-۳-۲- اثر بر پروتئین ها:

رادیکال های آزاد منجر به اکسیداسیون اسید آمینه های انتهایی زنجیره های پروتئینی، تشکیل پیوند عرضی پروتئین- پروتئین یا قطعه قطعه شدن و تخریب اسکلت پروتئینی می گردند. اسیدهای آمینه لیزین، پرولین، ترئونین و آرژینین با تولید مشتقات کربونیل دار، با آلدهیدهایی که در جریان پراکسیداسیون لیپیدی تولید شده اند واکنش کرده و یا گلیکوزیله می شوند. (۱۸)

این پروتئین های کربونیل دار شاخص قابل اعتمادی برای بررسی تغییرات اکسیداتیو پروتئین ها می باشد. افزایش مشتقات کربونیل دار با شرایط پاتوفیزیولوژیکی چون پیری (۳)، آرتریت-روماتوئید (۱۹) و آلزایمر (۲۰) همراه است.

به علاوه اکسیداسیون تیروزین، دوپا تولید می کند که خود می تواند رادیکال آزاد بیشتری تولید کند. (دوپا DOPA= دی هیدروکسی فنیل آلانین)

البته پروسه فوق تحت اثر UV در پوست انجام می شود. (۲۱) همچنین از اکسیداسیون پرولیل موجود در پروتئین ها پیروگلوتامیل تولید می شود. (۲۲)

۱-۳-۳- اثر بر اسیدهای نوکلئیک و پیش سازهای آنها:

حمله رادیکال های آزاد به ویژه رادیکال هیدروکسیل حاصل از واکنش فنتون، منجر به اضافه شدن این رادیکال به پیوندهای دوگانه غنی از الکترون در بازهای پورین و پیریمیدین می گردد. (۲۳) ۸- هیدروکسی- ۲- داکسی گوانوزین (8OHdG) عمده ترین محصول حمله عوامل اکسیداتیو به DNA را تشکیل می دهد (۲٤) این ماده تنها ٥ درصد از کل آسیب اکسیداتیو وارده به DNA را نشان می دهد. (۲٥) این ترکیب اثر موتاژنی بالقوه ای دارد به طوریکه طی همانندسازی DNA باعث تغییر جفت بازهای G:C به T:A می گردد. (۲٦) تجمع آن با اختلالات فیزیولوژیکی مختلفی مرتبط است. (۲۷) رادیکال های آزاد باعث تشکیل پیوندهای متقاطع بین DNA و پروتئین ها و آسیب اسکلت داکسی ریبوز فسفات می گردند. آسیب های وارده معمولاً توسط آنزیم های اندونوکلئاز و گلیکوزیلاز تعمیر می شوند. (۹)

آسیب اکسیداتیو وارده به DNA میتوکندریایی بیش از DNA هسته ای می باشد و علت این امر آن است که میتوکندری بیش از ۹۰ درصد اکسیژن سلولی را مصرف می کند و زنجیره انتقال الکترون مهمترین منبع تولید رادیکال آزاد می باشد. علت انواعی از بیماری ها مثل پارکینسون، میوپاتی

میتوکندریایی، دیستروفی میوتونیک و ضعف ماهیچه ای نوروژنی به افـزایش آسـیب DNA نـسبت داده شده است. (۲۵) شایان ذکر است که سیکل سلولی هم از اثرات مخرب رادیکال های آزاد مصون نمی باشد. سلول های پستانداران به روش های متفاوتی به استرس اکسیداتیو حاصل از رادیکال های آزاد پاسخ می دهند که تا حدودی به شدت آسـیب وارده بـستگی دارد. مـثلاً پراکـسید هیـدروژن در مقیاس غلظت های کم (۱۰ میکرومولار) پاسخ میتوژنی قابل توجهی ایجاد می کند. در غلظـت هـای بالا در حد ۱۵۰ میکرومولار منجر به توقف کوتاه مدت رشد می شود که طـی ایـن مرحلـه پـروتئین های هیستونی حفاظت DNA را به عهده دارند. بیان ژن های غیر ضـروری کـاهش مـی یابـد و در مقابل ژن های مولد پروتئین های مربوط به استرس به میزان زیادی افزایش می یابد. در غلظت هـای بالاتر سلول وارد مرحله توقف دائمی رشد می شود ولی به نظر می رسد کـه هنـوز عملکـرد طبیعـی خود را حفظ کرده است. (۱۰)

جدول ۱-۱: گونه های فعال مهم در سیستم های بیولوژیکی

گونه فعال	فرمول مولکولی	نحوه تشکیل
رادیکال سوپراکسید	$O_2^{-\cdot}$	احیا تک مولکول اکسیژن
رادیکال هیدور پراکسیل	$HOO^{\cdot}$	پروتوناسیون رادیکال سوپر اکسید
هیدروکسیل	$HO^{\cdot}$	احیا تک الکترونی H_2O_2 و ۳ الکترونی ملکول اکسیژن
منوکسید نیتروژن	NO	احیاتک الکترونی نیتریت
آلکوکسی	$RO^{\cdot}$	هیدروپراکسید
پراکسیل	$ROO^{\cdot}$	اکسایش تک الکترونی هیدرو پراکسید
هیدروژن پراکسید	H_2O_2	احیا دو الکترونی O_2 و سپس پروتوناسیون
پراکسی نیتریت	$ONOO^{\cdot}$	واکنش NO با $O_2^{\cdot}$
هیدرو پراکسید	$ROOH$	اکسیداسیون ترکیبات غیر اشباع
اسید هیپوکلرو	$HClO$	هیدرولیز کلرین مولکولی