بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد(M.S.c)

مهندسی علوم دامی- ژنتیک و اصلاح نژاد دام

اثر H_2O_2 بر رشد سلول‌های اپی‌تلیال پستان گاو و بیان ژن **STAT5 در شرایط آزمایشگاهی**

تحقیق و نگارش:

مرضیه دارابی

استاد راهنما:

دکتر طاهر هرکی نژاد

زمستان ۹۱

تقدیم به پدر و مادرم

به مادرم که مهرش در دلم گرامی و مقدس است

و

پدرم که بنایی شد برای تلاش پرشورم در کسب دانش.

تقدیر و تشکر

به نام یگانه لایق پرستش

سپاس خدایی را که اول است بی آنکه پیش از او اولی باشد، و آخر است بی آنکه پس از او آخری باشد. خدایی که دیده‌های بینندگان از دیدنش فرو مانده و اندیشه‌های توصیف‌کنندگان از وصفش عاجز شده‌اند.

قبل از هر مطلب و سخنی از پدر عزیز و مادر مهربانم که دلیلی بودند برای هر آنچه که امروز از زندگی می‌خواهم، تشکر و قدردانی می‌کنم و از خداوند رحمان طول عمر، همراه با سلامتی را برایشان خواستارم. از همسر مهربان و فداکارم که زیباترین روزهای زندگیش را ارزانی آرزوی من کرد خاضعانه سپاس‌گذارم.

این پژوهش بیش از آنکه پایان‌نامه کارشناسی ارشد باشد، تجربه‌ای بود برای بیشتر دانستن و قرارگیری در این مسیر از الطاف الهی بود که بر من جاری گشت. من به تنهایی نمی‌توانستم مسیر دانستن را بیازمایم. به راهنمایی نیاز داشتم تا اندیشه مرا در جهتی خاص سوق دهد. استاد ارجمندم جناب آقای دکتر محمد طاهر هرکی‌نژاد راهنمای من در این مسیر بودند و من سعادت شاگردی ایشان را شکرگذارم و صمیمانه از زحمات بی‌دریغی که بر من ارزانی داشتند تشکر می‌نمایم.

هم‌چنین از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر شهرام ننه کرانی که مشوق و همراه همیشگی من در امر ادامه تحصیل بوده اند تشکر می‌نمایم.

از اساتید محترم داور سرکار خانم دکتر فروزان قاسمیان و جناب آقای دکتر رضا معصومی و نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر مجید شاهمرادی کمال تشکر و قدردانی را دارم. از پرسنل محترم آزمایشگاه علوم دامی و پژوهشکده فیزیولوژی و بیوتکنولوژی دانشگاه زنجان جهت همکاری در پیشبرد این پایان‌نامه سپاسگزارم. و در پایان از تمامی دوستانم که در انجام این پایان‌نامه مرا یاری کردند، تشکر می‌نمایم.

چکیده

استرس گرمایی و استرس اکسیداتیو می‌توانند تأثیری جدی بر شیردهی حیوان، هم‌چنین نکروز و از بین رفتن سلول‌ها داشته باشند. هدف این پژوهش تأثیر H_2O_2 بر روی رشد سلول‌های اپی‌تلیال پستان گاو و بیان ژن STAT5 در این سلول‌ها بود. در پژوهش حاضر چندین پروتکل مختلف جهت کشت خالص سلول‌های اپی‌تلیال پستان گاو مورد آزمایش قرار گرفت. از آنزیم‌های مختلف، جهت هضم آنزیمی بافت پستان و روش‌های متفاوت، در راستای کشت خالص سلول‌های اپی‌تلیال پستان استفاده شد ولی به دلایل عمده‌ای (از جمله استفاده نکردن از فاکتورهای رشد) کشت خالص سلول‌های اپی‌تلیال نتیجه بخش نبود و در نهایت این سلول‌ها به صورت مخلوط کشت داده شدند. به این منظور سلول‌های بافت پستان گاو از کشتارگاه تهیه و جهت کشت اولیه مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌ها پس از رشد و پوشش کامل کف فلاسک به تعداد ۱۶ فلاسک پاساژ داده شد. هر چهار عدد فلاسک به عنوان یک تیمار در نظر گرفته شد. در تیمار اول مقدار ۰/۵ میلی‌مولار، در تیمار دوم ۳ میلی‌مولار و در تیمار سوم ۵ میلی‌مولار H_2O_2 (در فلاسک $25cm^2$) اضافه شد و چهار عدد فلاسک بدون افزودن H_2O_2 به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. بعد از گذشت هشت ، ۱۶ و ۲۰ ساعت از اعمال تیمارها رشد سلول‌ها توسط میکروسکوپ اینورت بررسی شد. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد، با افزایش غلظت H_2O_2 نکروز سلولی افزایش پیدا کرد. سپس توسط تکنیک Real time PCR بیان ژن STAT5 که یکی از مهم‌ترین ژن‌های دخیل در تکثیر سلول‌های پستان می‌باشد، مورد بررسی قرار گرفت. بیان ژن STAT5 بین غلظت ۰/۵ میلی‌مولار و گروه کنترل در سطح ۹۵ درصد معنی‌دار بود. اما بین گروه کنترل و غلظت ۳ و ۵ میلی مولار هیچ تفاوت معنی داری مشاهده نشد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت H_2O_2 میزان نکروز سلولی افزایش می‌یابد، که نشان می‌دهد استرس اکسیداتیو می‌تواند خطری جدی برای سلامت سلولهای پستانی باشد. هم‌چنین در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار H_2O_2، بیان ژن STAT5 کاهش پیدا کرد با افزایش غلظت در سطح ۳ میلی‌مولار این کاهش بیان ژن کم‌تر شده و در غلظت ۵ میلی‌مولار افزایش بیان ژن STAT5 مشاهده شد، که با آنچه به عنوان نقش این ژن متصور است، تفاوت داشت.

کلمات کلیدی: استرس اکسیداتیو، H_2O_2، سلول‌های اپی‌تلیال پستان گاو، ژن STAT5، بیان ژن

فصل اول ۱

۱- مقدمه ۲

۱-۱- اهدف پژوهش ٦

فصل دوم ۷

۲- بررسی منابع ۸

۲-۱- استرس اکسیداتیو ۸

۲-۱-۱- آسیب اکسایشی و استرس اکسیداتیو ۹

۲-۱-۲- استرس اکسیداتیو و کشت سلولی ۱۱

۲-۱-۳- پیامدهای سلولی RS ۱۲

۲-۱-٤- آنتی اکسیدان ۱۳

۲-۱-٤-۱- آنتی اکسیدان چیست؟ ۱٤

۲-۱-۵- تأثیر H_2O_2 بر روی رشد سلول‌های اپی‌تلیال پستان گاو ۱۸

۲-۲-۱- کشت‌های اولیه تا چه مدت می‌توانند رشد و بقا داشته باشند ۱۸

۲-۲-۲- سلول‌های بنیادی جنینی ۲۰

۲-۲-۳- سلولهای بنیادی بالغ ۲۱

۲-۲-٤- مراحل کشت ۲۲

۲-۳- آناتومی پستان گاو ۲٤

۲-۳-۱- کنترل هورمونی تکامل غده پستانی و شیردهی ۲۵

۲-٤- خانواده STAT ۲٦

۲-٤-۱-ساختار STAT ۲۷

۲-٤-۲- STAT3 ..... ۳۰

۲-٤-۳-STAT5 ..... ۳۲
۲-٤-۳-۱- STAT5a و STAT5b ۳٤
۲-٥- روشهای تعیین کمیت با Real- time PCR ٤۰
۲-٥-۱- کمیت سنجی مطلق ٤۲
۲-٥-۱-۱- رسم یک منحنی استاندارد نسبی ٤۳
۲-٥-۱-۲- روش منحنی استاندارد نسبی ٤٤
۲-٥-۲- کمیت‌سنجی نسبی ٤٤
فصل سوم ٤۷
۳- مواد و روش‌ها ٤۸
۳-۱- مواد مورد نیاز در کشت سلول ٥۰
۳-۲- نمونه گیری ٥۰
۳-۳- کشت سلول (کشت تک لایه) ٥۱
۳-٤- تعویض محیط کشت ٥۲
۳-٥- پاساژ سلولها ٥۲
۳-٦- اعمال تیمارها ٥۳
۳-۷- استخراج سلول ٥۳
۳-۸- استخراج RNA ٥٤
۳-۹- تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده ٥٥
۳-۹-۱- انجام نانودراپ ٥٥
۳-۹-۲- الکتروفورز RNA ٥٥
۳-۱۰- سنتز cDNA ٥٦
۳-۱۱- طراحی پرایمر ٥۷

۳-۱۲- Real time PCR ۵۸
۳-۱۳- آنالیز داده ها ٦۰
فصل چهارم ٦۱
٤- نتایج و بحث ٦۲
٤-۱- نتایج حاصل از کشت سلول ٦۲
٤-۱-۱- افزودن H_2O_2 ..... ٦٤
٤-۲- کیفیت RNA استخراج شده ٦۷
٤-۳- نتایج حاصل از انجام Real-time PCR ٦۷
فصل پنجم ۷٤
۵- نتیجه‌گیری کلی ۷۵
فصل ششم ۷٦
٦- پیشنهادها ۷۷
فصل هفتم ۷۸
فهرست منابع ۷۹

فهرست شکل‌ها

شکل۲-۱- تأثیر H_2O_2 روی سلول‌های اپی‌تلیال پستان موش در حالت حضور و عدم حضور آنتی‌ژن T ۱۷
شکل ۲-۲- آناتومی پستان گاو ۲۵
شکل ۲-۳- ساختار STATs ۲۷
شکل ۲-٤- ساختار سه بعدی STAT ۲۹
شکل۲-۵- تمایز سلول‌های اپیتلیال پستان در حضور و عدم حضور پرولاکتین و STAT5 ..... ۳۷

شکل ۲-٦- فازهای مختلف یک واکنش PCR ٤٢

شکل ٤-١- سلول‌های اپی‌تلیال پستان گاو در کشت اولیه. روز چهارم و روز هشتم کشت اولیه، ٦٤

شکل ٤-٢- سلول‌های اپی‌تلیال پستان گاو در شرایط کشت تک لایه (روز چهاردهم) ٦٤

شکل ٤-٣- تأثیر غلظت‌های متفاوت H_2O_2 در رشد سلول‌های اپی‌تلیال پستان گاو ٦٥

شکل٤-٤- توده های نکروز شده‌ی سلول‌ها در غلظت ۳ میلی‌مولار ٦٦

شکل٤-٥- تأثیر غلظت ٥ میلی‌مولار H_2O_2 در رشد سلول‌های اپی‌تلیال پستان گاو ٦٦

شکل ٤-٦- باندهای الکتروفورزRNA ٦٧

شکل ٤-٧- نتایج حاصل از واکنش Real time PCR در بیان ژن STAT5 بین گروه شاهد و تیمار ۰/٥ میلی مولار ٦٨

شکل ٤-٨- نتایج حاصل از واکنش Real time PCR در بیان ژن STAT5 بین گروه شاهد و تیمارها ٦٩

شکل ٤-٩- نتایج حاصل از واکنش Real time PCR در بیان ژن مرجع ٦٩

نمودار ٤-١- نمودار اختلاف بیان ژن بین تیمارها و گروه شاهد. ٧٠

فهرست جدول‌ها

جدول ۳-١- مواد استفاده شده جهت کشت سلول پژوهش حاضر ٥٠

جدول ۳-٢- اجزای مخلوط اول سنتز cDNA..... ٥٦

جدول ۳-۳- اجزای مخلوط دوم سنتز cDNA ٥٧

جدول ۳-٤- پرایمرهای استفاده شده در Real time PCR ٥٨

جدول ۳-٥- مواد مورد استفاده جهت واکنش Real time PCR..... ٥٩

جدول ۳-٦- برنامه زمانی ودمایی Real time PCR ٥٩

جدول ٤-١- نتایج حاصل از آزمون نمونه‌های جفتی برای ژن STAT5..... ٧٠

معادله۲-۱- معادله فاز رشد سلول‌ها ۲۲

فصل اول

مقدمه و اهداف پژوهش

۱- مقدمه

رادیکال‌های آزاد مربوط به روندهای بیولوژیک، اتم‌های فعال یا گروهی از اتم‌ها (معمولاً حاوی اکسیژن یا نیتروژن) با تعداد الکترون‌های فرد هستند. وجود الکترون‌های فرد در ساختار رادیکال آزاد آنها را ناپایدار و بسیار واکنش‌پذیر می‌سازد. خطرناک‌ترین رادیکال‌های آزاد، اکسی رادیکال‌های بسیار فعال، متحرک و کوچک هستند. این مولکول‌های اکسیژن ناپایدار، محصولات طبیعی زائدی هستند که از تنفس و سایر روندهای متابولیکی که اکسیژن در آن‌ها دخیل است حاصل می‌شوند (Goldfarb *et al*., 1999; Karlsson *et al*., 1997).

رادیکال‌های آزاد بعد از تشکیل، واکنش‌های زنجیره‌ای را آغاز و به پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA آسیب می‌رسانند. اولین قسمتی که به وسیله رادیکال‌های آزاد تخریب می‌شود DNA میتوکندری‌ها میباشد. DNA موجود در دیگر قسمت‌های سلول نیز ممکن است به وسیله رادیکال‌های آزاد آسیب ببینند. آسیب DNA به صورت جهش، خطای ترجمه و ممانعت از سنتز پروتئین‌ها می‌باشد، درحالی‌که آسیب به پروتئین‌ها سبب تغییراتی در انتقال یون‌ها و فعالیت آنزیم‌ها می‌شود.

دومین قسمت، آسیب به غشای فسفولیپیدی سلول است که موجب پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و سخت شدن دیواره سلول‌ها می‌شود، در این صورت سلول نمی‌تواند به صورت متناسب مواد غذایی مورد نیاز و نیز سیگنال‌هایی که از دیگر سلول‌ها برای اجرای یک عمل صادر می‌شود (نظیر تکانه‌های عصبی) را دریافت کند و بدین ترتیب بسیاری از فعالیت‌های سلول تحت تأثیر قرار می‌گیرد. هم‌چنین رادیکال‌های موجود در پلاسما نیز موجب اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های کم‌چگال[1] دیواره عروق و سخت

[1]. LDL

شدن سرخرگ‌ها می‌شوند. گمان می‌رود که رادیکال‌های آزاد در تخریب اسپرم‌ها، عقیمی، اختلالات دستگاه هاضمه، تخریب کبد، کاهش مقاومت در برابر عفونت‌ها و بیماری‌ها و به خصوص آسیب به لیزوزوم‌ها و تخریب دیگر قسمت‌های سلول نیز دخیل باشد (زیمرمن، ۱۳۸۲ و راداک، ۱۳۸۳).

یکی از عوامل مهم در افزایش تولید رادیکال‌های آزاد انواع مختلف استرس است. شرایط تنش‌زای مختلفی سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداسیونی می‌شود. شرایط تنش‌زا عموماً به سه دسته طبقه بندی می‌شوند.

دسته مهم آن‌ها استرس‌های تغذیه‌ای می‌باشند که شامل سطوح بالای اسیدهای چرب غیراشباع با چند باند دوگانه، کمبود ویتامین E، سلنیوم، روی یا منگنز، مقدار بالای آهن، مقادیر بالای ویتامین A (هایپرویتامینوزیس) و ترکیبات سمی مختلف هستند. دسته دوم فاکتورهای استرس‌زا، شرایط محیطی نظیر افزایش حرارت و رطوبت، کمبود اکسیژن، تشعشع، سر و صدا و... هستند. دسته سوم، فاکتورهای استرس‌زای داخلی شامل بیماری‌های ویروسی و باکتریایی مختلف، هم‌چنین پاسخ‌های آلرژیک می‌باشند. تمام شرایط مذکور در بالا، تولید رادیکال‌های آزاد را با کاهش جفت شدن اکسیداسیون و فسفریلاسیون در میتوکندری تحریک می‌کنند که منجر به افزایش تراوش الکترون و تولید بیش از حد رادیکال سوپراکسید می‌شوند (Lough et al., 2010; Zamora et al., 1997).

ازعوامل استرس‌زای ذکر شده، استرس گرمایی از جمله تنش‌هایی است که واحدهای دامپروری را در بیشتر نقاط کشور، بالاخص در فصل بهار و تابستان تحت تأثیر قرار می‌دهد. عموماً استرس گرمایی تولید رادیکال‌های آزاد را زیاد کرده و منتهی به استرس اکسیداتیو می‌شود. در گاوهای شیری استرس اکسیداتیو اثر منفی بر ایمنی و تولید مثل داشته و سبب افزایش بروز ورم پستان و افزایش تعداد سلول‌های بدنی،

کاهش باروری، افزایش مرگ و میر رویان، افزایش جفت‌ماندگی و زایش زودتر از موقع و در نهایت اثر بر وزن زنده گوساله‌ها، مرگ و میر و کاهش سلامتی می‌شود

(Bach *et al*., 2007; St-Pierre *et al*., 2003; Weiss *et al*., 1990). اما مهم‌تر از همه در یک واحد گاوداری استرس گرمایی می‌تواند باعث افت تولید شیر گردد که تا به امروز یکی از دلایل عمده در افت تولید شیر را کاهش مصرف خوراک حیوان در زمان استرس گرمایی دانسته‌اند. زامیر و همکاران (۱۹۹٤) طی تحقیقی عنوان کردند که تحت شرایط استرس اکسیداتیو تولید سایتوکین‌هایی مانند اینترلوکین۱، اینترلوکین٦ و TNFα می‌تواند منجر به کاهش ماده خشک مصرفی و تغییر مصرف اسیدهای آمینه از فرآیندهای آنابولیکی(تولید شیر، تولید گوشت...) به سمت مصرف آن‌ها در بافت‌های درگیر در التهاب استرس و پاسخ‌های ایمنی شود. در تحقیق دیگری مدوکس[1] و همکاران (۱۹۹۹) اعلام کردند که تنش اکسیداتیو منجر به چسبندگی نوترفیل‌ها در سلول‌های اپی‌تلیال پستان می‌گردد.

نقش تغذیه‌ای شیر و ارزش اقتصادی آن موجب شده است که تلاش‌های بسیاری برای کشف مکانیسم‌های کنترل کننده متابولیسم پستانی انجام شود. سنتز پروتئین‌های شیر توسط سلول‌های اپی‌تلیال پستانی یک فرآیند پیچیده است. هورمون‌های پلی‌پپتید و استروئید به همراه تقابل‌هایی که با سلول‌های استروما و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی[2] دارند تمایز سلولی پستان را کنترل می‌کنند

(German and Barash., 2002).

[1]. Maddox
[2]. ECM

غده پستانی بافتی است که پس از بلوغ به حداکثر رشد می‌رسد، این بافت دارای چرخه تکثیر و تمایز بوده که در هر آبستنی تکرار می‌شود، مهم‌ترین واحد عملی غده‌ای بافت پستان آلوئول است (کاری، ۱۳۸۹). یکی از ژن‌های مهم و تأثیرگذار در رشد لوبول-آلوئول پستان STAT5[1] است

(Fremy *et al*., 1981). پروتئین‌های STAT برای اولین بار در سیستم اینترفرون تشخیص داده شدند. این پروتئین‌ها به طور مؤثری تنظیم کننده رشد، بقاء و تمایز سلول‌ها می‌باشند. خانواده STAT یا به وسیله سیتوکین‌هایی مثل اینترفرون و اینترلوکین یا به وسیله خانواده تیروزین کیناز مثل جانوس‌کیناز[2] فعال می‌شوند. این پروتئین‌ها هم‌چنین به وسیله گیرنده‌های غیر سیتوکینی مثل فاکتور رشد اپیدرمال نیز فعال می‌شوند(Paul .and .Mark., 1998) در پژوهشی که یاماجی[3] و همکاران (۲۰۰۹) روی پستان موش انجام دادند گزارش کردند که STAT5 در توسعه غده پستان نقش مهمی دارد، هم‌چنین تولید لومینای آلوئول را تنظیم می‌کند. STAT5 در بقاء و زنده‌مانی سلول‌های اپی‌تلیال پستان در طول دوره تولید مثل (Cui *et al*., 2004) و بعد از اوج شیردهی بسیار مؤثر می‌باشد

(Lavnilovtch *et al*., 2002; Creamer *et al*., 2010).

فرمی[4] و همکاران (۱۹۸۱) گزارش کردند ژن CPh_2[5] موجب فعال شدن STAT5 و STAT3 می‌شود. STAT5 موجب رشد خارجی لوبول-آلوئول و باعث تولید شیر می‌شود. STAT3 در برگشت بافت پستان به حالت عادی نقش دارد. با خاموش کردن ژن CPh_2 رشد لوبول-آلوئول‌ها در زمان شیردهی اتفاق نمی‌افتد، و باعث تخریب لوبول-آلوئول در شرایط آزمایشگاهی می‌شود و تولید شیر کاهش میابد.

---

[1]. Signal Transducer and Activator of Transcription 5
[2]. Janus Kinase
[3]. Yamaji
[4]. Fremy
[5]. cytoplasmic tyrosin phosphatase

فرمی و همکاران (۱۹۸۱) هم‌چنین گزارش کردند که ژن Cph_2 در تحریک STAT5 و پرولاکتین نقش دارد. چنان‌چه با خاموش کردن این ژن در سلول‌های اپی‌تلیال پستان موش تولید پرولاکتین کاهش مییابد.

کشت سلول، روشی برای آشکارسازی فرآیندهای متابولیک در سطح مولکولی و سلولی می‌باشد ولی برخلاف تحقیقات زیادی که توسط کشت سلول روی ژن STAT5 مخصوصاً در جوندگانی مثل موش انجام شده، تاکنون تحقیقی جهت بررسی تأثیر H_2O_2 روی STAT5 در پستان گاو انجام نشده است.

۱-۱- اهدف پژوهش

۱- تأثیر H_2O_2 روی بیان ژن STAT5 در سلول‌های اپی‌تلیال پستان گاو

۲- تأثیر H_2O_2 روی رشد سلول‌های اپی‌تلیال پستان گاو

فصل دوم

بررسی منابع

۲- بررسی منابع

۲-۱- استرس اکسیداتیو .

سلول‌های یوکاریوتی به طور پیوسته گونه‌های اکسیژن بسیار فعال[1] را به عنوان محصولات فرعی واکنش‌های انتقال الکترون تولید می‌کنند و سلول‌های بدخیم مختلف، مقادیر بیشتری از ROS را تولید و آزاد می‌کنند ($OH-H_2O_2$) که منجر به تغییر حالت اکسیداسیون-احیا می‌شود (Burdon., 1995). در غلظت‌های خیلی کم میکرومولاری، ROS، به عنوان یک پیامبر داخل‌سلولی و بین‌سلولی عمل می‌کند و موجب رشد سلول می‌شود. اما افزایش سطوح این مواد به عنوان استرس اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود (Buttke and Sandstrom., 1994; Clutton., 1997). ROS ممکن است مستقیماً با گیرنده‌های ویژه‌ای تقابل داشته باشد و یا موجب اکسیداسیون مولکول‌های انتقال سیگنال رشد، مانند پروتئین کینازها، پروتئین فسفاتازها، فاکتورهای رونویسی یا مهارکننده‌های عامل رونویسی شود (Jacobson., 1996). متناوباً H_2O_2 ممکن است به صورت غیرمستقیم حالت اکسیداسیون-احیا و فعالیت پروتئین‌های انتقال سیگنال را توسط تغییر سطوح سلولی گلوتاتیون‌های اکسید شده یا احیا شده تنظیم کند (Kayanoki et al., 1996; Morel et al., 1999) .

ایوان[2] (۱۹۹۸) عنوان کرد علی‌رغم این‌که به نظر می‌رسد مرگ سلولی و تکثیر سلولی دو به دو متناقض و ناسازگار باشند، شواهد محکمی نشان می‌دهند که این فرآیندها به هم مربوط هستند.

---

[1]. Reactive Oxygen species (ROS)
[2]. Evan

۲-۱-۱- آسیب اکسایشی و استرس اکسیداتیو

در باکتری‌های هوازی سالم، تولید RS[1] تقریباً با سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان متعادل شده است ولی این تعادل کامل نیست. به هر حال برخی آسیب‌های RS به طور مداوم اتفاق می‌افتد. به عبارت دیگر دفاع آنتی‌اکسیدان، سطوح RS را به جای حذف کنترل می‌کند. به طور مثال سیستم Oxy-R اشرشیاکلی[2] سطح H_2O_2 را تقریباً حدود ۰/۲mm حفظ می‌کند. چرا؟ حفظ کردن دفاع آنتی‌اکسیدان مازاد یک هزینه انرژی می‌باشد که برای تعمیر یا جایگزین کردن بیومولکول‌های آسیب دیده استفاده می‌شود (Halliwel., 2006).

علاوه بر این، آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است به آسانی قادر باشند تا RS را جدا کنند. به عنوان مثال رادیکال هیدروکسیل[3] به شدت واکنش‌پذیر است (Halliwell., 1995) بدین صورت که با هر چیزی که برخورد می‌کند، می‌تواند با آن واکنش دهد در صورتی که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند آن را جدا کنند. به هر حال فاکتور دیگری که وجود دارد این است که RS نقش اساسی در بدن موجود زنده بازی می‌کند. RS در سیتم اکسایش-کاهش، بیان ژن و سایر وقایع سلولی دخیل می‌باشد (Nathan., 2003; Temple *et al*., 2005).

لغت استرس اکسیداتیو به یک عدم تعادل جدی بین تولید RS و آنتی‌اکسیدان برمی‌گردد (Sies., 1991). آسیب اکسایشی یک لغت مبهم دیگر است که هالیول[4] و همکاران (۲۰۰٤) آن را به عنوان آسیب زیست مولکولی، که به وسیله حمله RS به اجزای اصلی ارگانیسم زنده موجب می‌شود، تعریف کرده‌اند.

---

1. Reactive species
2. Escherichia coli
3. OH
4. Halliwell

استرس اکسیداتیو به طور مستقیم می‌تواند به Na^+/k^+-ATPase آسیب برساند و فعالیت کانال‌های K^+ به وسیله واکنش شیمیایی با مانده‌ی اسیدآمینه تعادل پیدا می‌کند، این امر به وضوح آسیب اکسایشی است (Gutterman *et al*., 2005). سؤالاتی در این زمینه وجود دارد. آیا هر تغییر در تعادل یون به طوری که نتایج آن منجر به حوادث زیان‌آوری مثل تغییرات حجم سلولی شود

(Schliess and Haussinger., 2002) آسیب اکسایشی است؟ بسیاری از اثرات چشمگیر استرس اکسیداتیو روی متابولیسم Ca^{+2} است که تمایل دارد سطح Ca^{+2} آزاد درون سلول را افزایش دهد (Perraud *et al*., 2005). یکی از اثرات Ca^{+2} افزایش یافته، افزایش پروتئولیز سلولی به وسیله فعال‌سازی کالپین[1] است (Mcconkey and Orrenius., 1997). آیا باید آسیب پروتئولیز حاصله را آسیب اکسایشی بنامیم؟ جواب این سؤالات در این بحث نمی گنجد به این دلیل که این امر مستقیم به وسیله RS به وجود نیامده است(Halliwel and Whiteman., 2004) و این نکته جای بحث زیادی دارد.

آسیب اکسایشی لغتی است که به آسیب تصادفی بدون هدف بر یک طیف گسترده از بیومولکول‌ها اشاره می‌کند ولی هنوز هم هدف، اغلب به طور شگفت انگیزی به صورت خاص ظاهر می‌شود. به عنوان مثال در بیماری پارکینسون آسیب DNA، آسیب اکسایشی افزیش یافته می‌باشد که به نظر می‌رسد فقط بر گوانین تأثیر می‌گذارد (Alam *et al*., 1997). در سلول‌های در معرض استرس اکسیداتیو تکنیک پروتئومیک آشکار می‌سازد که فقط تعداد کمی از پروتئین‌ها آسیب دیده‌اند. اگر چه مکانیسم این انتخاب به صورت نامعین در بیشتر حالت‌ها باقی می‌ماند. برای مثال در ای‌کولای[2] که با آب تیمار شده، الکل

[1]. Calpain
[2]. E. coli