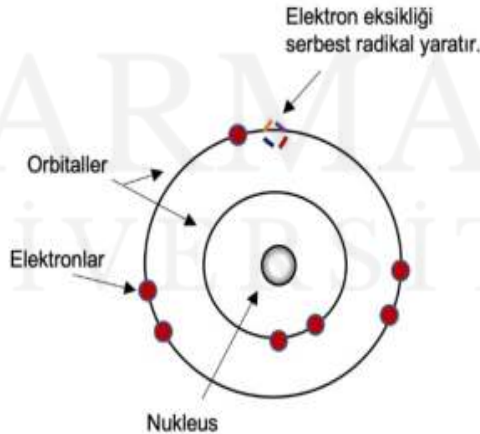


Serbest Radikal Kimyası

Sema Arslan Eseryel*

A. Süha Yalçın*

Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron taşıyan, yüksek enerjili atom veya moleküllerdir. Yapılarındaki eşleşmemiş elektronların varlığı onları kararsız yapar ve diğer moleküllerle kolaylıkla reaksiyona girebilir hale getirir. Eşleşmiş elektronları olan atom veya moleküller ise kararlıdır, serbest radikaller gibi başka moleküllerle kolayca reaksiyonlara girmezler. Radikaller genellikle kısa ömürlüdür ve yapıları atomun üzerine bir nokta koyularak ($\cdot\text{OH}$ gibi) ifade edilir. Ancak moleküler oksijen gibi uzun ömürlü radikaller de mevcuttur. Serbest radikaller çeşitli kimyasal ve biyolojik süreçlerde yan ürün olarak oluşur. Önceleri zararlı etkileri üzerinde durulmuşken, son yıllarda metabolizmada önemli düzenleyici görevler üstlendikleri gösterilmiştir.

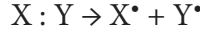


Şekil 1. Serbest radikal yapısı

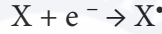
* Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Serbest radikaller hem çevrede hem de hücrede sürekli olarak üretilir. Organizmadaki serbest radikaller endojen veya eksojen kaynaklardan oluşabilir. Hücresel metabolizmanın ürünleri olarak oluşan serbest radikaller hem yararlı hem de zararlı etki gösterebilir. Serbest radikallerin endojen yollardan oluşması üç farklı şekildedir. ¹

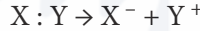
1. Homolitik bölünmeyle yani kovalent bağlı bir molekülün, her atomunun ortak elektronlardan bir tanesini alması yoluyla:



2. Bir moleküle, tek bir elektronun eklenmesiyle:

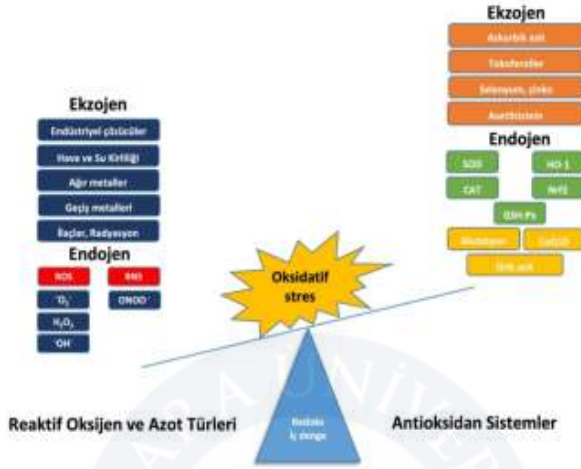


3. Heterolitik bölünmeyle yani bir molekülden tek bir elektronun kaybıyla:



Her ne kadar serbest radikal denilince ilk akla gelenler oksijen kaynaklı olanlar olsa da, çok farklı atomların radikalleşmesi söz konusudur. Lipit peroksidasyonunun ara ürünleri karbon merkezli radikallerdir. Azot kaynaklı radikaller de çeşitli şekillerde, örneğin fenilhidrazin metabolizması sırasında oluşurlar. Geçiş metal iyonları da serbest radikal tanımına uyar. Radikal yapısında olanların dışında bir de radikale dönüşme potansiyeli olan moleküller mevcuttur. Bunlar reaktif türler olarak bilinir: Oksijen kaynaklı olanlar reaktif oksijen türleri (*reactive oxygen species*, ROS), azot kaynaklı olanlar reaktif azot türleri (*reactive nitrogen species*, RNS), kükürt kaynaklı olanlar reaktif kükürt türleri (*reactive sulfur species*, RSS) olarak adlandırılır (Tablo 1.1). Hücre içinde reaktif türlerin oluşumu birçok uyarının etkisiyle artar. Oluşan serbest radikaller lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklere etki ederler. Fizyolojik koşullarda hücrede sürekli oluşan reaktif türlere karşı koyan ve onlarla etkileşen antioksidanlar arasında bir denge mevcuttur. Bu dengenin reaktif türler lehine bozulması yani hücrede radikallerin birikmesi veya endojen savunma sistemlerinin yetersiz kalması halinde ise oksidatif stres olarak tanımlanan durum ortaya çıkar. ²

-
- 1 Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, USA.
 - 2 Sies, H. (2019). Chapter 13 – Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. In G. Fink (Ed.), *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (pp. 153-163). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8>.



Şekil 2. Reaktif türler, antioksidanlar ve oksidatif stres arasındaki ilişki³

Reaktif oksijen, azot ve kükürt türleri

Reaktif Oksijen Türleri	<p>Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) Ozon (O_3) Singlet oksijen (1O_2) Hidrojen peroksit (H_2O_2) Hidroksil radikali ($\cdot OH$) Hipokloröz asit (HOCl) Hipobromöz asit (HOBr) Alkoksil radikali ($RO\cdot$) Peroksi radikali ($ROO\cdot$) Hidroperoksil radikali ($ROOH\cdot$)</p>
Reaktif Azot Türleri	<p>Nitrik oksit ($NO\cdot$) Azot dioksit ($NOO\cdot$) Peroksinitrit ($ONOO^-$) Nitroz asit (HNO_2) Nitrozil kationu (NO^+) Nitroksi anyonu (NO^-) Nitroz asit (HNO_3) Diazot tetraoksit (N_2O_4) Peroksinitrik asit ($ONOOH$) Nitronyum kationu (NO_2^+) Alkilperoksi nitrit (RONO)</p>
Reaktif Kükürt Türleri	<p>Tiyil radikali ($RS\cdot$) Sülfenil ($RSO\cdot$) Tiyil peroksil ($RSO_2\cdot$)</p>

3 Ogura, Y., Kitada, M., & Koya, D. (2021). Sirtuins and Renal Oxidative Stress. *Antioxidants*, 10(8), 1198. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antiox10081198>.

Serbest radikal kaynakları

Serbest radikallerin başlıca kaynağı mitokondriyal solunum zinciridir.⁴ Aerobik solunum gerçekleşirken, elektronların teker teker moleküler oksijene aktarılması sırasında süperoksit radikali üretilir. Ayrıca inflamasyon durumunda, sitokinler serbest bırakıldığında uyarılan nötrofil ve makrofajlar serbest radikalleri üretmeye başlar. Serbest radikaller lipid peroksidasyonu sırasında ara ürün olarak veya mitokondriyal sitokrom oksidaz gibi bazı enzimlerin etkisiyle de oluşabilir. Düz kas hücrelerinde ve trombositlerde araşidonik asit metabolizması tarafından üretilebilir. Otooksidasyon reaksiyonları sırasında, NADPH oksidaz gibi enzimlerle veya endoplazmik retikulumda sitokrom P450 sisteminde meydana gelen elektron kaçaklarından serbest radikal oluşabilir. Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, aminoasit oksidaz gibi bazı enzimlerin katalitik döngüleri esnasında da serbest radikaller oluşur.⁵

- Tiyoller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler gibi oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında görev alabilen küçük moleküller, serbest radikal oluşturabilir.
- Nükleer membranlara ve endoplazmik retikulum bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklı serbest radikal üretimi olur.
- Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarında rol alan bakır, demir gibi geçiş metalleri, serbest radikal reaksiyonlarını katalizler. Plazma membranında yer alan lipooksijenaz, protein kinaz, siklooksijenaz, gibi enzimlerin aktivasyonu ile serbest kalan araşidonik asidin oksidasyonu sonucunda serbest radikaller oluşur.
- Aktive olmuş fagositer hücrelerde (nötrofil, makrofaj vb.) solunumsal patlama sırasında süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve hipokloröz asit gibi bir çok reaktif oksijen türleri oluşur.
- İskemi, travma ve yanık gibi oksidatif stres meydana getiren durumlar da serbest radikal kaynağıdır.

Serbest radikaller çoğu çevresel olan çok sayıda ekzojen kaynaktan da oluşur. Hava kirliliği, radyasyon, sigara dumanı,

4 Raha, S., & Robinson, B. H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(10), 502-508.

5 Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26. <https://doi.org/10.1007/s12291.014.0446-0>.

solventler, aromatik hidrokarbonlar ve pestisitler gibi çevresel ajanlar stres kaynağıdır. Tüm bunlar katekolamin sentezini uyarır, katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal oluşumuna sebep olur. Aşağıda sıralanan dış etkenler de serbest radikal üretimine katkıda bulunabilir.

- UV ışınları, X-ışını, gamma ışınları, mikrodalga ışınları
- Organik maddelerin yakılması, orman yangınları, volkanik faaliyetler
- Benzen, karbonmonoksit, formaldehit, ozon ve toluen gibi hava kirleticiler
- Temizlik ürünleri, tutkal, boya, tiner, parfümler ve böcek ilaçları gibi kimyasallar
- Kloroform ve diğer trihalometanlar gibi su kirletici maddeler
- Alkol ve sigara kullanımı, sigara dumanı, egzoz dumanı

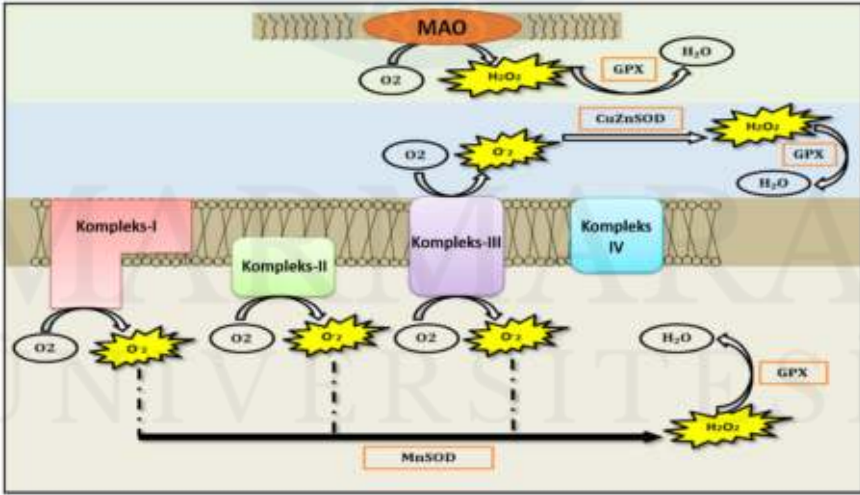
Oksijenli yaşam

Moleküler oksijen, dünyayı çevreleyen atmosferde yaklaşık 2.2 milyar yıl önce, siyanobakterilerin güneşten gelen enerjiyi kullanarak suyu parçalamasıyla ortaya çıkmıştır. Siyanobakteriler canlılıklarının devamı için suyu parçalayarak hidrojen atomlarını elde ettiler ve bunun yan ürünü olarak atmosfere O_2 salındı. Salınan O_2 'nin çoğu bugün kayalarda ve cevherlerde bulunan metal oksit yataklarının oluşumu ile tüketildi. Bu tüketime rağmen atmosferde önemli miktarda O_2 birikimi olmuştur. Atmosferik oksijendeki artış, dünyadaki yaşam için oldukça avantajlıydı. Bu avantaj, stratosferde ozon (O_3) tabakasının oluşumuna yol açtı. Ayrıca dünyada en bol bulunan dördüncü element olan demir ortamlarını meydana çıkardı.

Ozon tabakasının ve atmosferdeki serbest oksijenin dünyaya gelen güneş ışınlarındaki yoğun ultraviyole (UV-C) radyasyonunu filtrelemesinin bir sonucu canlı organizmaların denizden ayrılarak kara yaşantısını keşfetmeleri olmuştur. Ancak atmosferde O_2 artışı sorun da yaratmıştır. Canlı organizmalar ilk ortaya çıktıklarında, atmosferdeki gazlar N_2 ve CO_2 idi. Bugün hala mevcut olan bu canlı grubunun (anaeroblar) O_2 oksijen varlığındaki büyümeleri genellikle yavaştır. Ayrıca, atmosferik seviyedeki oksijene maruz bırakıldıklarında ölürlere. Buradan anlaşılacağı gibi atmosferdeki serbest O_2 miktarı arttıkça, bu türlerin birçoğunun ölmüş olması gerekirdi. Ancak öyle olmamıştır, canlı sistemlerin değişen çevreye ve koşullara adaptasyonu söz konusudur. Günümüzde de bulunan ve adaptif bir evrim gösteren anaerobların torunları, kendilerini O_2 'nin bulunmadığı ortamlarla sınırlandırarak, yükselen atmosferik O_2 seviyelerinde hayatta kalmanın yolunu bulmuşlardır. Diğer organizmalar ise O_2 toksisitesine karşı koruma sağlamak için

antioksidanlar ile savunma geliştirmeye başlayarak farklı bir adaptif evrim yolunu seçmişlerdir.

Yaşamın biçimlenmesinde önemli kavşaklarından biri, prokaryot yaşamdan ökaryot hücreli yaşama geçiştir. Bunun devamında çok hücreli canlıların evrimi gerçekleşmiştir. Yeryüzündeki atmosferin oksijen açısından zenginleşmeye başlamasıyla birlikte, büyük anaerobik bakteriler hücresel solunum ürünlerini kullanmak için daha küçük aerobik bakterileri kullanmış olmalıdır. Bu şekilde küçük bir aerobik bakterinin büyük hücre tarafından korunmuş olması, her iki organizmanın bu durumdan yararlanmasını sağlamıştır. Bu simbiyotik ilişki sonucunda bugün mitokondri olarak bildiğimiz organeller oluşmuştur. Mitokondrinin başlıca görevi enerji üretimidir. Mitokondride yer alan solunum zinciri (elektron taşıma zinciri) hücre içindeki süperoksit radikallerinin en önemli kaynaklarından biridir.⁶ Solunum zincirindeki bir dizi protein kompleksi üzerinden aktarılan elektronlarla moleküler oksijen suya indirgenir. Normal şartlar altında solunum zincirinde oksijen radikalleri açığa çıkmaz. Çünkü sitokrom oksidaza kadar olan tüm ara basamaklar kararlıdır. Ancak, fosforilasyon için gerekli substrat eksikliği olduğunda elektron kaçakları olur ve oksijen indirgenerek süperoksit radikalini oluşturur. Radikal oluşumunun nedeni NADH-KoQ redüktaz enziminin elektron sızıntısıdır.



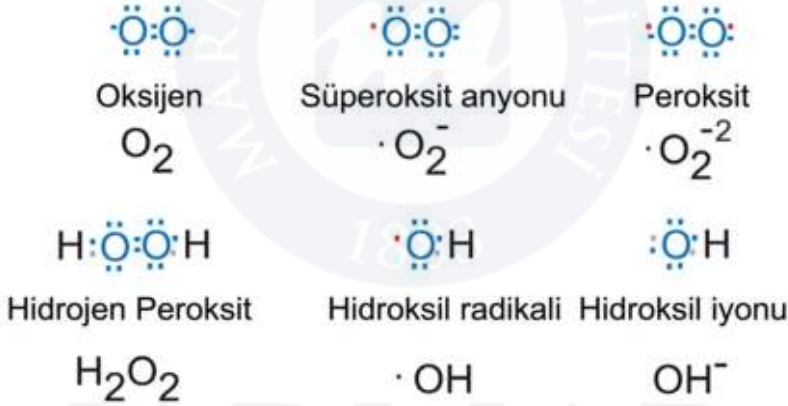
Şekil 3. Mitokondriyal solunum zinciri ve oksidatif fosforilasyon⁷

- 6 Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3-4), 222-230. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8).
- 7 Al Shahrani, M., Heales, S., Hargreaves, I., & Orford, M. (2017). Oxidative Stress: Mechanistic Insights into Inherited Mitochondrial Disorders and Parkinson's Disease. *Journal of Clinical Medicine*, 6(11), 100. <https://www.mdpi.com/2077-0383/6/11/100>.

Oksijen kaynaklı reaktif türler

Oda sıcaklığında oksijen moleküler oksijen olarak adlandırılan dioksijen (O_2) formundadır. Moleküler orbitallere yerleşmiş onaltı elektrona sahip olan moleküler oksijen bir biradikaldir. Oksijenin metabolizması sonucu oluşan çeşitli moleküller, canlı sistemlerde üretilen en önemli radikal sınıfını (*reactive oxygen species*, ROS) temsil etmektedir.^{8,9}

Moleküler oksijenin yapısına bir elektron eklenmesiyle, bu radikal süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) haline dönüşür. Süperoksit anyonu çeşitli metabolizma süreçlerinde veya fiziksel ışınlama ile oluşmaktadır. Birincil reaktif oksijen türü olarak kabul edilen süperoksit anyonu enzimlerin veya metal iyonlarının etkisiyle, ikincil reaktif oksijen türlerini üretmek üzere diğer moleküller ile etkileşime girer.



Şekil 4. Moleküler oksijen ve reaktif oksijen türleri

Serbest radikal reaksiyonları sonrasında açığa çıkan singlet oksijen ise bir serbest radikal değildir. Yapısında eşleşmemiş elektron yoktur, yine de reaktif oksijen türleri içerisinde yer alır ve birkaç farklı yoldan oluşabilir. Aerobik hücrelerde oksijenin kararlı duruma geçmek ve suya dönüşmek üzere bir elektron alarak indirgenmesiyle, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) oluşur. Oksijenin potansiyel bir toksik madde sayılmasının asıl nedeninin bu dönüşüm olduğu ileri sürülmektedir. Endojen oksijen radikallerinin başlıca kaynağı olan süperoksit anyonu hem oksitleyici, hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Hidrojen peroksitin kaynağı olması ve geçiş metalleri

8 Auten, R. L., & Davis, J. M. (2009). Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatric Research*, 66(2), 121-127.

9 Halliwell, B. (1984). Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62, 71-77.

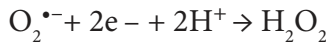
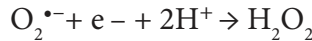
iyonlarını indirgemesi nedeniyle de önemlidir. Nitrik oksitle reaksiyona girmesiyle, daha sonra azot dioksit (NO_2), nitronyum iyonu (NO_2^+), hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) gibi toksik ürünlere de dönüşebilen peroksinitriti (ONOO^-) oluşturur. Süperoksitin bir diğer önemli etkisi, indirgenmiş geçiş metallerinin geri dönüşümlü otooksidasyonu olarak bilinen, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyon ile ilişkilidir. Süperoksit anyonu mitokondriyal solunum zincirini yanı sıra endoplazmik retikulumdan da elektron sızmasıyla oluşur. Bir başka süperoksit kaynağı fagositik hücrelerdeki solunumsal patlamadır. Nötrofillerde plazma membranının dış yüzünde yerleşmiş olan NADPH oksidaz enzimi, nötrofilin uyarılmasıyla birlikte oksijen molekülüne iki elektron aktararak iki molekül süperoksit oluşturur. Hücrelerde süperoksit üreten bir başka kaynak ksantin oksidazdır. Bu enzimin kataliziyle ksantinin ürik aside dönüşümü sırasında süperoksit oluşur

Reaktif türlerin kimyası

Reaktif türlerin termodinamik etkinliği ve aktivitelerinin değerlendirilmesinde kimyasal yapıları önemlidir. Termodinamik kimyasal reaksiyonların meydana gelme olasılığını gösterir. Enzimler sadece termodinamik olarak mümkün reaksiyonları hızlandırabilir. Klasik olarak serbest enerji değişimi (ΔG) negatif ise reaksiyon termodinamik açıdan mümkündür.

Serbest radikallerin ana kaynağı moleküler oksijendir. Organizmadaki pek çok oksitlenme reaksiyonu Fe, Cu gibi geçiş metallerini içeren enzimler vasıtasıyla ve moleküler oksijene tek elektron transferi ile meydana gelir. Yapısında eşleşmemiş elektronlar bulunduran moleküler oksijen, reaktif türlerin oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) ve hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) gibi reaktif oksijen türleri toksik etkilere yol açarlar.

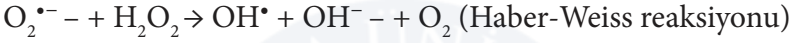
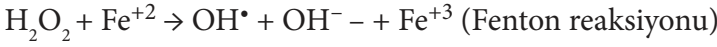
Hidrojen peroksit, süperoksit veya moleküler oksijenin çevredeki moleküllerden bir veya iki elektron almasıyla oluşan peroksitin iki protonla (H^+) birleşmesi sonucunda meydana gelir.



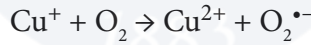
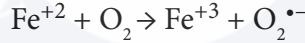
Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksit üretimi dismutasyon yoluyla olur. Süperoksit dismutaz enziminin kataliziyle ya da spontan olarak gerçekleşen bu reaksiyonda, iki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturur.



Hidrojen peroksitin kendisi serbest radikal değildir. Ancak serbest radikal oluşumunda önemli rol oynamaktadır, bu nedenle reaktif türlerin kapsamına girer. Fe^{+2} , Cu^{+} gibi geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu, süperoksit radikallerinin varlığında da Haber-Weiss reaksiyonu hidroksil radikalini (OH^{\bullet}) oluşturur. Hidroksil radikali en güçlü oksitleyici radikal olarak belirlenmiştir. DNA, proteinler, lipitler, amino asitler, metaller ve glukoz ile etkileşime girebilir.



Öte yandan, mitokondride enerji üretimi sırasında meydana gelen elektron kaçakları oksijenin süperoksit radikaline dönüşümüne neden olur. Süperoksit radikali oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesi dışında, geçiş metallerinin ootooksidasyonu da meydana gelebilir. Süperoksit radikalının reaktifliği yüksek derecede değildir ve direkt olarak zarar vermez. Bu radikalın asıl önemi, hem hidrojen peroksit kaynağı hem de geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.



Reaktif türlerin kimyasını değerlendirmede sık kullanılan bir parametre indirgeme potansiyelidir. Redoks reaksiyonlarının yönünü ve olabilirliğini belirleyen indirgeme potansiyelleri, hangi bileşiklerin kendi kendine oksitlenebilir olduğunu tahmin etmeye yarar. Ootooksidasyon, termodinamik olarak mümkün olsa bile, genellikle yavaştır.¹⁰

Periyodik tablodaki d-bloğu geçiş elementlerini içerir. Geçiş elementlerinin ilk sırasındaki metallerin atom ve/veya iyonlarında eşleşmemiş elektronlar bulunur. Bu nedenle, çinko dışında tümü serbest radikaldir. Geçiş metallerinin biyolojik etkilerinin çoğu, tek elektron kabul etme veya bağışlama yeteneği ile ilişkilidir. İndirgeme potansiyelleri de metale giden ligandlara bağlıdır. Bu nedenle değişik enzimlerde bulunabilir, aynı metalin farklı reaksiyonların katalizinde görev alırlar.¹¹

Bazı geçiş metalleri ile üstlendikleri görevler şunlardır:

10 Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161-1208.

11 Miller, D. M., Buettner, G. R., & Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(1), 95-108.

- Bakır (Cu): EC-SOD, Cu/Zn-SOD, sitokrom oksidaz, lizil oksidaz, dopamin hidroksilaz gibi enzimler için gereklidir.
- Çinko (Zn): RNA polimeraz, karbonik anhidraz, Cu/Zn-SOD, gliksalaz I ve çinko parmak yapısında bulunur.
- Krom (Cr): Glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynar.
- Manganez (Mn): MnSOD, arginaz, hidrolazlar ve karboksilaz enzimlerini aktive eder.
- Demir (Fe): Hemoglobin, miyogloblin, siklooksijenazlar, sitokromlar, hidroksilaz/oksidazlar, ribonükleotit redüktaz, akonitaz, süksinat dehidrojenaz ve katalaz için gereklidir.
- Kobalt (Co): B12 vitamini için gereklidir.

Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit (H_2O_2) reaktif olmayan bir oksijen türevidir. Yüksek seviyelerde birçok hücre tipi için toksik olmasına rağmen, sınırlı ve seçici reaktivitesi nedeniyle bir sinyal molekülü olarak da görev yapar. Hidrojen peroksit, suyla kolayca karışır ve *in vivo* olarak hücrelerin içinde ve arasında yayılabilir. Difüzyon hızlıdır, ancak tamamen serbest değildir ve membran lipid bileşiminden etkilenir. Genellikle, hücre zarlarını geçen H_2O_2 demir ve muhtemelen bakır iyonları ile reaksiyona girerek $OH\cdot$ gibi daha zararlı türleri oluşturur. Zayıf reaktivitesine rağmen sitotoksiktir, yüksek konsantrasyonda dezenfektan olarak kullanılır. Yara tedavisinde kullanılan balın antiseptik aktivitesi de kısmen H_2O_2 oluşumundan kaynaklanmaktadır. Askorbat, tiyoller ve bazı flavonoidler hücre kültürü ortamlarında oksitlenerek H_2O_2 üretebilir. Bu da hücre kültürü deneylerinde bazı yanlış yorumlara neden olabilir. Ayrıca hücreleri H_2O_2 'ye maruz bırakmak NADPH oksidazları aktive ederek $O_2^{\bullet-}$ üretimini artırabilir.¹²

Hidroksil radikali

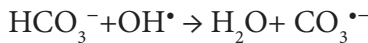
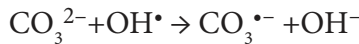
Organizmada hidroksil radikalleri çok farklı yollardan oluşmaktadır.¹³ Ozondan, peroksinitritten, hidrojen peroksitin metal iyonları ile reaksiyona sokulmasıyla veya hidrojen peroksit

12 Abdollahi, M., & Hosseini, A. (2014). Hydrogen Peroxide. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (pp. 967-970). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00736-3>.

13 Kehrer, J. P., Robertson, J. D., & Smith, C. V. (2010). 1.14 – Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (pp. 277-307). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7>.

yapısındaki O – O bağının homolitik fisyonuyla hidroksil radikali üretilebilir. Başlıca hidroksil radikali kaynakları aşağıda sıralanmıştır.

- **İyonize radyasyon:** Canlı hücrelerin ana bileşeni sudur. Yüksek enerjili radyasyona maruz kalınması suyun homolitik fisyonuna ve OH• üretimine neden olur. İyonlaştırıcı radyasyonun canlı organizmalara verdiği hasarın çoğundan OH• sorumludur.
- **Hipokloröz asit :** Ferrosiyanit ve Fe²⁺ – sitrat gibi bazı demir şelatları ile reaksiyona girebilir. Aromatik bileşiklerin hidroksilasyonuna eden olur.
- **Ultrason:** Akustik kavitasyon adı verilen bir olay olan gaz kabarcıklarının oluşumuna, büyümesine ve çökmesine neden olur. Birkaç bin derecelik sıcaklık ve yüzlerce atmosfer basıncının bir araya geldiği sıcak noktalara çöker ve H₂O ile H• ve OH• arasındaki homolitik fisyonuna neden olur. Böbrek taşları, litotripsi teknikleriyle hızlı sonik darbeler kullanılarak yaratılan şok dalgası ile parçalanmaktadır. Ancak, yapılan çalışmalar bu sırada oksidatif hasarın ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir.
- **N-hidroksitiyopiridonlar:** Laboratuvarında OH• kaynağı olarak kullanılır. Aynı zamanda dikkate alınması gereken bir kükürt radikalini üretir.
- **Kinonlar ve yarı-kinonlar:** H₂O₂'den demir iyonları içeren redoks reaksiyonları ile OH• üretebilir. Tetrakloro-1,4-benzokinonun metal iyonundan bağımsız reaksiyonlar ile OH• üretebildiği gösterilmiştir. Bu reaksiyon bir peroksit ara ürününün oluşumunu içerir. OH• serbest bırakmak için homolitik olarak bölünmektedir.
- **Karbonat ve bikarbonat:** Hidroksil radikalinin karbonat veya bikarbonat ile reaksiyonu karbonat radikallerini oluşturur. Bu nedenle, deneysel modellerde kullanılan reaksiyon karışımlarının CO₂/HCO₃⁻ içeriğine dikkat edilmelidir. Bu oksidatif hasarı etkilemede önemli bir parametredir.



Karbonat radikalleri yaklaşık 600 nm'deki ışığı absorplamaktadır. Reaksiyon karışımlarındaki seviyelerini bu yolla izlemek mümkün olmaktadır.

Süperoksit radikali

Süperoksit anyonu diğer reaktif türlere kıyasla çok daha az reaktiftir.¹⁴ Sulu çözeltilerdeki çoğu biyolojik molekülle reaksiyona girmez. Bununla birlikte, NO• gibi radikaller ile bazı enzimlerdeki demir-sülfür kümeleriyle ve hidrositirozin grubundan hidrojenin soyutlanmasıyla oluşan fenoksil radikalleriyle hızlıca reaksiyona girmektedir. Sulu çözeltilerdeki O₂^{•-}'nin hızla kaybolması dismutasyon reaksiyonundan kaynaklanır. Dismutasyon, aynı türün hem oksitlendiği hem de azaltıldığı bir kimyasal reaksiyondur. Bu reaksiyonda, bir süperoksit O₂'ye oksitlenirken, diğeri H₂O₂'ye indirgenir.



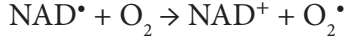
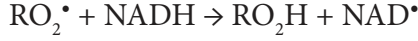
Dismutasyon reaksiyonu fizyolojik koşullar altında O₂^{•-} protonlaması ve ardından HO₂[•]'nin başka bir O₂^{•-} ile reaksiyonu şeklinde devam eder. Asidik pH değerlerinde hızlıdır. Süperoksit radikali karmaşık bir reaksiyon mekanizması ile formazan üretmek üzere nitroblue tetrazolyumu (NBT) tüketir. Bu reaksiyon SOD analizinde kullanılır. Süperoksit organik çözücüler içinde çözüldüğünde, kimyasal olarak suda olduğundan çok daha sert hale gelir. Bir baz ve bir indirgeyici ajan olarak hareket etme kabiliyeti artar. Örneğin, organik çözücülerde çözünmüş sülfür dioksit (SO₂) gazını azaltabilir, ancak sulu çözeltide bu etki yoktur. Ortamda protonlar mevcut değilse, dismutasyon önlenir ve O₂^{•-} uzun süre kalır ve başka bir moleküldeki pozitif yük merkezine saldıran bir nükleofil görevi görür. Böylece O₂^{•-} esterlere saldırarak alkolün yer değiştirmesine ve bir karboksilik asit oluşumuna yol açabilir. Organik ortamdaki süperoksit ise kloroform, tetraklorometan (CCl₄), heksaklorobenzen (C₆Cl₆) ve poliklorobifeniller gibi klorlanmış hidrokarbonlarla nükleofil olarak etkileşebilir.

Peroksil ve alkoksil radikalleri

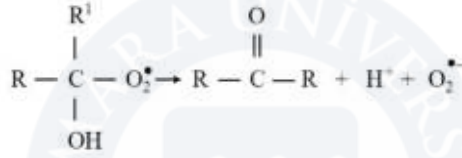
Peroksil (RO₂[•]) ve alkoksil (RO[•]) radikalleri çok iyi oksitleyici ajanlardır.¹⁵ Süperoksitin protonlanmış hali olan HO₂[•], en basit peroksil radikali olarak kabul edilebilir. Peroksil radikalleri askorbat ve NADH'yi oksitler, O₂ varlığında O₂^{•-} oluşumuna yol açarlar.

14 Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chemical Reviews*, 116(5), 3029-3085.

15 Kehrer, J. P., Robertson, J. D., & Smith, C. V. (2010). 1.14 – Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (pp. 277-307). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7>.



Alkoksil ve peroksil radikalleri, diğer moleküllerden H[•] soyutlayabilir. Bu lipit peroksidasyonu yolağında önemli bir reaksiyondur. Bazı RO₂[•] radikalleri O₂^{•-}'i serbest bırakmak için parçalanır. Örneğin, glukoz OH[•] ile reaksiyona girdiğinde altı farklı RO₂[•] radikali oluşur. Çünkü mevcut altı karbon atomunun herhangi birinde OH[•] ile soyutlama meydana gelebilir.

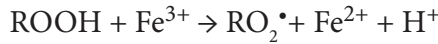


Peroksil radikalleri, singlet oksijen (¹O₂) üretmek üzere birbirleriyle reaksiyona girebilir. Aromatik alkoksil ve peroksil radikalleri alifatik olanlardan daha az reaktif olma eğilimindedir. Çünkü bunlarda elektronlar benzen halkasına delokalize durumdadır. Biyolojik sistemlerde üretilen tirozin fenoksil radikali (tirozil, TyrO[•]), O₂^{•-} ile reaksiyona girebilmesine rağmen bitirozin vermek için çapraz bağlanır. Tirozil radikali ayrıca askorbatla veya sistein ve glutatyon (GSH) gibi tiyollerle reaksiyona girerek onları radikale dönüştürür.

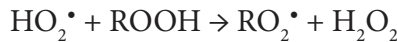


Ayrıca, GSH eklentileri oluşturabilir. Tirozil radikalleri fotosentezde ve prostaglandin biyosentezinde de yaygın olarak kullanılır.

Karbon merkezli radikaller de RO₂[•] radikalleri oluşturmak için O₂ ile hızla reaksiyona girerler. Organik peroksitlerin (ROOH) ayrışması ile hem RO₂[•] hem de RO[•] üretilir.

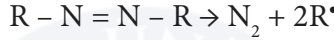


Yukarıdaki reaksiyonlar demir iyonu ile uyarılan lipit peroksidasyonunda önemlidir. Protein peroksitleri de protein radikalleri vermek için metal iyonları tarafından ayrıştırılabilir. Lipit peroksitleri ayrıca RO₂[•] oluşturmak üzere HO₂[•] ile reaksiyona girebilir.



Halojenlenmiş kinonların, hidroperoksitleri RO• radikallerine ayrıştırdığı bildirilmiştir. Azo başlatıcılardan 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorür (AAPH) ve 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (AMVN) *in vivo* olarak RO₂• radikalleri üretmek için kullanılmaktadır. AAPH suda çözünürken, AMVN hidrofobiktir ve daha çok lipit fazında radikal üretmek için kullanılır.

Bu bileşikler, karbon merkezli radikaller (R) vermek üzere belirli bir oranda ayrışır. Daha sonra RO₂• radikalleri vermek üzere O₂ ile hızla reaksiyona girerler.



Karbon merkezli radikallerin kendileri, albüminin -SH grupları dahil olmak üzere bazı biyolojik moleküller ile de reaksiyona girebilir. Bu nedenle RO₂•'ye tam dönüşümlerini sağlamak için ortamda yeterli O₂ sağlanması önemlidir.¹⁶

Nitrik oksit

Nitrik oksit (NO) renksiz bir gazdır, suda orta derecede (20°C'de 2 mM'ye kadar, 37°C'de yaklaşık 1.6 mM), organik çözücülerde daha iyi çözünür. Bu nedenle NO• membranları geçebilir ve hücreler arasında ve hücre içinde kolayca yayılabilir. Nitrik oksit bir serbest radikaldir ve kolayca dimerleşmeyen bir yapıya sahiptir. Nitrik oksitin reaktivitesi düşüktür, tiyoller de dahil olmak üzere çoğu biyolojik molekülle yavaş reaksiyona girer. Tiyollerden tiyonitritler (nitrosotiyoller) oluşturması için önce ONOO⁻ veya N₂O₃ gibi daha yüksek bir azot oksit oluşturmalıdır.

Literatürdeki nitrik oksit ile ilgili bilgiler büyük ölçüde nitrik oksitin süperoksitle yaptığı reaksiyona ve oluşan peroksinitrit üzerine odaklanmıştır. Bu molekülün potansiyel zararlı etkileri arasında sitokrom oksidaz ve ribonükleotid redüktaz gibi enzimlerin inhibisyonu sayılabilir. Nitrik oksit çeşitli hem türleriyle de reaksiyona girer. Peroksitlerin varlığında bu yolla proteinlerin prooksidan özelliklerini azaltır.

Nitrik oksit, vücudun hemen hemen her yerinde önemli fizyolojik roller üstlenmiştir.¹⁷ Etkilerinin çoğu guanilat siklaz enzimidaki Fe²⁺ gruplarına bağlanmasından kaynaklanır. Vasküler endotel hücrelerde sentezlenen NO• hemen her yöne yayılır. Düz kas tabakasına ulaştığında guanilat siklaza bağlanır ve aktive olur. Böylece daha fazla cGMP yapılır, cGMP hücre içi serbest Ca²⁺ miktarını

16 Forbes, M. D. (2010). *Carbon-centered free radicals and radical cations: structure, reactivity, and dynamics* (Vol. 2). John Wiley & Sons.

17 Kelm, M. (1999). Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411(2-3), 273-289.

azaltarak kasları gevşetir. Ayrıca damarları genişletir ve kan basıncını düşürür. Nitrik oksitin sinyal iletideki diğer rollerine, proteinlerdeki sistein kalıntılarının S-nitrozilasyonu aracılık eder. Aşırı üretimi hücre hasarına neden olabilir. Bu etki doğrudan olabilir veya N_2O_3 veya $ONOO^-$ gibi diğer reaktif azot türlerinden kaynaklanır.

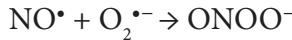
Hayvanlarda NO sentezi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından katalizlenir. Üç tip NOS vardır. Nöronal NOS (nNOS) sinir sistemi dokularında tanımlanmıştır. İskelet kasında kasılmayı düzenlemeye yardımcı olduğu bilinir. Endotelial NOS (eNOS) yapısal olarak endotel hücrelerinde eksprese edilir. Kan basıncının düzenlenmesi için gerekli nitrik oksiti sentezler. Vasküler endotelyumdan gelen nitrik oksit kan damarlarını rahatlatan endotel kaynaklı bir gevşeme faktörü olarak tanımlanmıştır. eNOS ve nNOS enzimleri, Ca^{2+} iyonlarını ve kalmodulin proteinlerini gerektirir. Genellikle inflamasyon bölgelerinde bulunan ve uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) adı verilen bir NOS da bulunur. Bu enzim ilk olarak endotoksinler veya bazı sitokinlerle etkileşen makrofajlar ile karaciğer hücrelerinde tanımlanmıştır. Kalmodulini sıkıca bağlar ve aktivitesi Ca^{2+} 'dan bağımsızdır. Hızlı bir şekilde NO^{\bullet} oluşumunu katalize eder ve normalden çok daha yüksek lokal konsantrasyonlar üretir. NOS enzimi için hız sınırlayıcı faktör O_2 konsantrasyonudur. Nitrit, *in vivo* koşulda önemli bir NO^{\bullet} donörüdür.



Nitrovazodilatörler adı verilen ilaçlar vazokonstriksiyonu anormal olan hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. Bu ilaçlar arasında organik nitrat ve nitritler, inorganik nitrozo bileşikleri ve nitrosotiyoller bulunur. Bu bileşikler laboratuvar deneylerinde NO^{\bullet} donörü olarak kullanılmaktadır.

Peroksinitrit

Nitrik oksit reaktif oksijen türleriyle çeşitli şekillerde etkileşime girebilir. ¹⁸ Hidrojen peroksit ve NO^{\bullet} bazı sistemlerde sinerjistik etki gösterir. Hücre tipine, kullanılan NO^{\bullet} donörüne, reaktif türlerin konsantrasyonuna ve hücrelerin daha önceden bu moleküllere maruz kalıp kalmadığına bağlı olarak, birbirlerinin sitotoksitesini artırabilir veya azaltabilir.



Bu reaksiyon, süperoksitin SOD ile reaksiyonundan daha büyük bir hız sabitine sahiptir. Süperoksit, hücre kültürü ortamında

18 Radi, R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxyxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(23), 5839-5848. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.180.493.2115>.

çeşitli mekanizmalarla üretilebilir. Bu durumda, eklenen NO^\bullet donörlerinden ONOO^- oluşur. Hücrelere, dokulara veya vücut sıvılarına peroksinitrit eklenmesi antioksidanların tükenmesine, lipidlerin oksidasyonuna ve nitrasyonuna, DNA iplikçiklerinin kırılmasına, DNA bazlarının nitrasyonu ve deaminasyonuna, proteinlerde aromatik amino asit kalıntılarının nitrasyonuna ve sisteinin oksidasyonuna neden olur.

Proteinlerde en çok rastlanan reaksiyon, tirozinin 3-nitrotirozine dönüştürülmesidir. Triptofan ve fenilalanin de nitratlanabilir. Hemoglobin ve diğer hem proteinleri de ONOO^- ile hızla oksitlenir. Tirozin kalıntılarının nitrasyonu bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Nitrasyon genellikle enzim inaktivasyonuna ve sinyal iletim sistemleri ile etkileşime yol açar. Kısmi nitrasyon tirozin-OH grubunun pK_a sını 10'dan 7.5'e düşürerek, pH 7.4'te önemli miktarda iyonizasyona neden olur ve tirozini hidrofilitik hale getirir. Tirozinlerin nitrasyonu bazı durumlarda tirozin kinazlarla olan fosforilasyonu engelleyebilir. Manganez içeren süperoksit dismutaz enzimi de nitrasyona duyarlıdır ve enzim inaktivasyonuna neden olur. Peroksinitritin diğer protein hedefleri arasında N-asetiltransferazlar, sitokromlar, glutatyon transferazlar, nörofilament proteinleri, siklooksijenazlar, prostasiklin sentaz ve albümin yer alır. Çeşitli dokularda ve azot oksitlere maruz kalan organizmalarda hangi proteinlerin nitratlandığını tanımlamak için proteomik teknikler kullanılmaktadır.

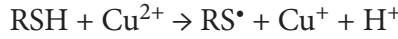
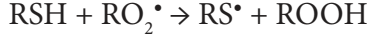
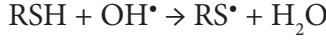
Kükürt kaynaklı radikaller

Kükürt yaşamsal bir elementtir. Hücrelerin büyümesinde ve işlevselliğinde önemli roller üstlenmiştir. Sistein ve metiyonin kükürt içeren iki amino asit olup pek çok proteinin bileşenlerindedir. Dünyamızda yaşamın gelişimiyle birlikte kükürt pek çok metabolik yolda yer almıştır ve farklı oksidasyon hallerinde bulunur. Kükürt merkezli radikaller ve reaktif türler doğada ve hücrelerde çeşitli koruyucu görevlere sahiptir. Ancak bu bileşikler de diğer reaktif türler gibi yüksek konsantrasyonda hücrenel bileşenlere zarar vermektedir. Tiyollerin antioksidan görevi gördüğü uzun süredir bilinmektedir. Son yıllarda hidrojen sülfürün de bir sinyal molekülü olduğuna dair kanıtlar ortaya çıkmıştır.^{19, 20} Ancak, bu molekülün antioksidan özellik gösterebilmek için *in vivo* olarak yeterince yüksek seviyelere ulaşmış olması bilinmemektedir. Tiyoller serbest radikal de üretebilir. Tiyollerin karbon merkezli radikallerle, geçiş

19 Giles, G. I., Nasim, M. J., Ali, W., & Jacob, C. (2017). The reactive sulfur species concept: 15 years on. *Antioxidants*, 6(2), 38.

20 Mishanina, T. V., Libiad, M., & Banerjee, R. (2015). Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nature Cell Biology*, 11(7), 457-464.

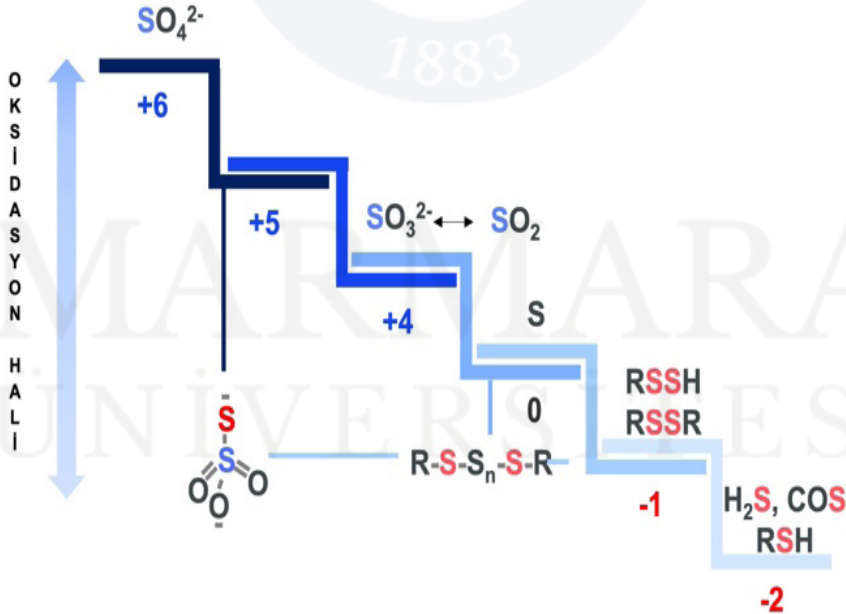
metali iyonlarıyla veya oksijen radikalleriyle reaksiyona girmesiyle tiyil radikalleri oluşur.



Proteinlerdeki disülfid bağlarının homolitik fisyonu da radikal oluşturabilir.



Tiyoller azot dioksit, tirozil radikalleri ve peroksinitrit ile reaksiyona girdiği zaman veya tiyollerin peroksidazlarla oksidasyonu sırasında da tiyil radikalleri oluşmaktadır.



Şekil 5. Biyolojik açıdan önemli kükürt türleri²¹

21 Bora, P., Chauhan, P., Pardeshi, K. A., & Chakrapani, H. (2018). Small molecule generators of biologically reactive sulfur species [10.1039/C8RA03658F]. *RSC Advances*, 8(48), 27359-27374. <https://doi.org/10.1039/C8RA03658F>.