

Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki Gelişimi

Ufuk ÇAKATAY ¹, Refik KAYALI ²

¹ İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Merkez Laboratuvarı, İstanbul

² İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Biyokimya Laboratuvarı, İstanbul

Özet

Serbest radikallerin kimyasal olarak mevcudiyeti konusunda, yaklaşık 100 yıl önce bir sonuca ulaşılmakla birlikte, varlıkları ilk 30-40 yıl boyunca dünya çapında kabul görmemiştir. Serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki varlığı ve önemi 1950'lerin ortalarına kadar kabul görmese de, reaktif oksijen biyokimyasını kuran bir grup bilim adamının katkıları ile varlıkları ve önemleri aydınlatılmıştır. Yirminci yüzyılın ikinci yarısının büyük bir kısmında, reaktif oksijen türevlerine, doku hasarı ve hastalığına yol açan bir tür biyokimyasal "oksitleyici ajan" gözüyle bakılmıştır. Yirmibirinci yüzyıla girerken reaktif oksijen biyokimyası bir disiplin olarak olgunlaşmış ve biyomedikal bilimler arasındaki önemi yerleşmiştir. Günümüzde hemen her hastalığın bir dereceye kadar oksidatif strese bağlı olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca günümüzde, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) homeostazisini devam ettirmeye yardımcı olmak üzere, normal ve sağlıklı dokuların hücrelerinde sıkı-kontrollü bir şekilde olduğu kabul görmeye başlamıştır. Ortaya çıkan yeni teknolojilerin, özellikle proteomik teknolojilerin, reaktif oksijen biyokimyası alanında ilerideki gelişmeleri kolaylaştıracağı konusu bilimsel çevrelerce tartışılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Serbest radikal, biyokimya, tarihsel gelişim-evrim

Cerrahpaşa Tıp Dergisi 2006; 37: 162 - 167

The Evolution of Free Radical Biochemistry in Historical Perspective

Abstract

The existence of free radicals, as chemical entities, was inferred 100 years ago but not universally accepted for nearly 40 years. The existence and importance of free radicals in biological systems was not recognized until the mid 1950's, by a small number of visionary scientists who can be credited with founding the field of reactive oxygen biochemistry. For most of the remaining 20th century, reactive oxygen species (ROS) were considered a type of biochemical "rusting agent" that caused tissue damage and disease. As we enter 21st century, reactive oxygen biochemistry is maturing as a discipline and establishing its importance among the biomedical sciences. It is now recognized that virtually every disease state involves some degree of oxidative stress. Moreover, we are now beginning to recognize that ROS are produced in a well-regulated manner to help maintain homeostasis on the cellular level in normal, healthy tissue. Emerging technologies, particularly proteomic technologies are discussed in scientific community that will facilitate further evolution in the field of free radical biochemistry.

KeyWords: Free radicals, biochemistry, historical perspective, evolution

Cerrahpaşa J Med 2006; 37: 162 - 167

SERBEST RADİKALLERİN TANIMI

Yapılarında eşleşmemiş elektron içeren atom veya bileşikler serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır [1,2]. Diğer bir tanımlama ile serbest radikaller; yapılarında tek sayıda elektron içeren, açık elektron kabuğu konfigürasyonuna sahip atom veya moleküllerdir [2]. Radikal ve serbest radikal terimleri sıklıkla birbirlerinin yerine kullanılmakla beraber, radikal terimi, serbest radikalın su molekülleri tarafından tutulmuş bağlı formunu ifade etmek için

kullanılmaktadır. Tarihsel olarak ise "Radikal" terimi, reaksiyon sırasında değişmeden kalan atom gruplarını tanımlamaktadır. Günümüzde ise bu tanım sıklıkla kullanımdan kalkmıştır.

SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES

Biyolojik serbest radikaller oldukça dayanıksız ve aynı zamanda reaktif moleküller olup, elektronları hücredeki diğer moleküllerle etkileşime girerek oksidatif stres (hasar) meydana getirirler. Serbest radikaller normal hücre metabolizma sırasında oluşabildiği gibi, çeşitli dış etkenler aracılığı ile de meydana gelebilir. Oksidatif stres, organizmadaki pro-oksidan ve anti-oksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır [1]. Radikaller; lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi temel hücre bileşenlerinde hasara

Alındığı Tarih: 18 Ocak 2006

Yazışma Adresi (Address): Doç. Dr. Ufuk Çakatay
Şenesenevler, Abdüleziz Paşa Sok. Çiçek Apt. No: 9/7
Bostancı - İstanbul

E-posta: cakatay@yahoo.com

yol açabilme özelliğine sahiptir. Oluşan bu hasarın kanser, ateroskleroz, amiloidoz, yaşa bağlı bağışıklık yetersizliği, senil demans ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkili olduğu ve biyolojik yaşlanma sürecinde rol oynadığı bilinmektedir [1].

SERBEST RADİKAL VE OKSİDATİF STRES TEORİSİNİN GELİŞİMİ

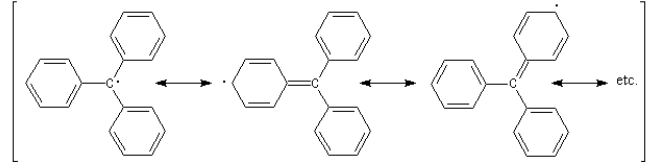
Serbest radikal ve oksidatif stres teorisinin kökeni, 19. yüzyılın sonlarına dayanmaktadır. H. J. H. Fenton'un 1876 yılında, hidrojen peroksit ile Fe⁺⁺ iyonlarının varlığında tartarik asitin oksidasyonunu keşfi bu yolda atılan ilk adımdır [3]. Fenton 1894 yılında yayımlanan makalesinde, demirin bu reaksiyonda katalizör görevini üstlendiğini bildirmiştir [4]. Reaksiyon ürünü olan dihidroksimaleik asitin, araştırmacı tarafından saptanması ise ancak yirmi yıl sonra 1896 yılında gerçekleşmiştir [5]. Biyografisi W. H. Koppenol tarafından 1993 yılında yayımlanan H. J. H. Fenton'un kendi adıyla anılan reaksiyonun mekanizmasını aydınlatmakta çokta aceleci davranmadığı öne sürülmektedir [6].

1900 yılında Michigan Üniversitesinde organik kimya profesörü olarak çalışan Moses Gomberg (1866-1947) (Şekil 1) tarafından organik serbest radikal yapısındaki trifenilmetil radikalinin keşfi, serbest radikallerle ilgili araştırmaların başlamasına yol açmıştır [7,8].



Şekil 1. Moses Gomberg (1866-1947).

Gomberg, heksafeniletan sentezi için Michigan Üniversitesindeki laboratuvarında çalışırken bir tesadüf sonucu renksiz trifenilmetil halojenlerinin gümüş ile reaksiyona girdiğinde sarı renkli trifenilmetil radikali oluşturduğunu gözlemlemiştir (Şekil 2) ve oluşan bu radikalın hem çözelti halinde hem de kristal formda oldukça dayanıklı olduğunu saptayarak, elde ettiği sonuçları yayımlamıştır [9]. Radikallerin pek çoğu oldukça dayanıksız yapıda olmasına karşın, Gomberg'in dayanıklı bir radikali saptamış olması dikkate değer bir başarıdır. Bu durum karbon atomuna bağlı üç benzen halkasının hacimli yapıları nedeniyle ortadaki radikal formdaki karbon atomunu 120°'lik açılarla çevreleyip dayanıklı hale getirmesiyle açıklanabilir (Şekil 2) [10,11].



Şekil 2. Trifenilmetil radikalinin mezomerik formları.

1927 tarihinde Binger ve ark. [12] oksijenin toksik etkisi olduğunu bildirmekle birlikte, bu tarihlerde henüz oksijenin serbest radikallerle ilişkisi bilinmemekteydi. Bunun izleyen yıllarda, 1931'de Haber ve Willstätter [13] ile 1932'de Haber ve Weiss [14] o zamanlar doğru kabul edilen mekanizma ile hidroksil radikalının, hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu ile birlikte bir zincir reaksiyonu sonucunda, hidrojen peroksiti suya dönüştürdüğünü öne sürmüşlerdir. Günümüzde hidroksil radikalının ürün olarak açığa çıktığı bilinen Haber-Weiss reaksiyonu, hücrede meydana gelen reaktif oksijen türevlerinin (ROS) pek çoğunun oluşumundan sorumlu tutulmaktadır.

1950'li yıllarda çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan *in vitro* çalışmalarda ROS'nin hücrede oluştuğu öne sürülmüştür. Commoner ve ark. [15] 1954'de elektron spin rezonans (ESR) tekniğini kullanarak yaptıkları çalışmada, serbest radikallerin hücrede oluştuğunu ortaya koyan ilk kanıtları elde ederek, sonuçları Nature dergisinde yayımlamışlardır. Diğer taraftan, araştırmacılar yayımladıkları bu makalede metabolik olarak aktif olan dokularda oluşan serbest radikallerin düzeyinin diğer dokulara göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

II. Dünya Savaşı sırasında (1939-1945) iki atom bombasının (6 Ağustos 1945, Hiroşima ve 9 Ağustos 1945, Nagasaki) patlamasının yol açtığı toplu ölümler ve hayatta kalanların kısa yaşam süreleri, direkt olarak serbest radikal biyokimyasının doğumuna yol açmıştır [16]. Serbest radikallerin toksik ajanlar olduğu düşüncesi ilk defa Rebecca Gerschman ve ark. [17] tarafından 1954 yılında ortaya atılmıştır. Yaşlanmanın serbest radikal teorisi ise Denham Harman tarafından 1956 yılında öne sürülmüştür (Şekil 3) [17].



Şekil 3. Yaşlanmanın serbest radikal teorisinin kurucusu Denham Harman.

Denham Harman öne sürdüğü bu teori kapsamında serbest radikalleri Pandora'nın "Felaketler kutusuna" benzeterek, biyolojik oksidasyonlar sonucu oluşan serbest radikallerin tesadüfi ve birikimsel hücre hasarı oluşturarak, doku ve organ yaşlanmasına yol açtığını bildirmiş, radikallerin büyük çaplı hücre hasarı, mutagenез, kanser ve yaşlanmanın dejeneratif sürecinden sorumlu olabileceği görüşünü öne sürmüştür (Şekil 4).



Şekil 4. Pandora'nın yaratılışı; Solda Athena, sağda Hephaistos'un görüldüğü beyaz zemin üzerinde erken klasik döneme (İ.Ö. 470-460) ait keramik (British Museum).

McCord ve Fridovich'in süperoksit dismutazı, Fenton'un paradigmasından yola çıkarak 1969 yılında keşfinden sonra, organizmadaki serbest radikalleri inceleyen bilim dalı ikinci bir çağa girmiş ve sonuç olarak araştırmacıların bir çoğu serbest radikallerin biyolojideki önemi konusunda ikna olmuştur [18]. 1972 yılında Harman [19], serbest radikal teorisinin özgün bir devamı olarak, yaşlanmanın mitokondrial teorisini açıklamıştır. Harman bu teorisinde hücredeki kusurlu mitokondrilerin artışının yaşlanmaya yol açan esas etken olduğu görüşünü savunmuştur. Mitokondriyal solunum zincirinin, hücredeki oksijen radikallerinin esas kaynağı olduğu ve tüketilen oksijenin yaklaşık % 1-4'lük kısmının serbest radikallere dönüştüğü ise ancak 1988 yılında kesinlik kazanmıştır [20].

Serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki önemi, 1970'lerin başlarına kadar genel olarak bilim çevrelerinde kabul görmemiştir. Bunun nedeni, radikallerin çok dayanıksız yapılı olmaları ve buna bağlı olarak tespit edilmeleri için ileri tekniklerin gerekli olmasıdır. 1980'lerin başlarında elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi ve floresan probaların kullanılması serbest radikal biyokimyası alanındaki çalışmaları olanaklı kılmış, serbest radikallerin yapılarının yanı sıra, lipid ve protein oksidasyonu ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* araştırmalar sonucunda önemli bilgilerin elde edilmesini sağlamıştır. Nitrik oksit (NO) 1987 yılında keşfi ve aynı yıl içinde "*endothelium-derived relaxing factor*"ün gerçekte NO olduğunun saptanmasıyla, serbest radikallerin toksik etkilerinin ötesinde hücredeki sinyal transdüksiyon olayında ikinci haberci olarak rol oynadığı görüşü araştırmacılar arasında kesinlik kazanmıştır [21,22]. 1990 yılında Beckman ve ark. [23] nitrik oksit,

süperoksit ile reaksiyona girmesi sonucu peroksinitriti (ONOO⁻) oluşturduğunu, oluşan bu peroksinitritin oksidasyona uğrayarak endotel hasarına yol açan hidroksil (HO) radikalini meydana getirdiğini bildirmişlerdir. S.H. Snyder, Nature dergisinde yayımlanan makalesinde nitrik oksidi hem zararlı hem de koruyucu etkisinden dolayı, bir fenomen olarak Janus'un iki yüzüne benzetmiştir (Şekil 5) [24]. 1995 yılında ise Lyman ve Hurst peroksinitritin proteinlerin nitrasyonuna yol açtığını bildirmesiyle bu alanda önemli bir adım daha atılmasını sağlamıştır [25].



Şekil 5. Janus Büstü "Roma Dönemi" (Vatikan).

Wenworth ve ark. [26] 2002 yılında, bağışıklık cevabı sırasında oluşan antikörlerin, nötrofil aktivasyonu ile meydana gelen singlet oksijeni su molekülleri ile indirgeyerek hidrojen peroksit ve ozon oluşumuna yol açtığını saptamışlar ve bulgularını Science dergisinde yayımlamışlardır. Aynı grup araştırmacı halen oluşan ozonun biyolojik önemi araştırmaktadırlar. Son yıllarda süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türevlerinin ikinci haberci olarak iş gördüğü ve hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde sinyal transdüksiyon mekanizmaları yolu ile etkili olduğu görüşü gittikçe açıklığa kavuşmaktadır. Yoshikawa ve ark. [27] 2000 yılında yayımladıkları makalelerinde serbest radikal-sinyal transdüksiyon ilişkisinin aydınlatılmaya başlanmasını, serbest radikal biyokimyasında rönesans olarak nitelendirmişlerdir.

Tarihsel Süreçte Lipid , Protein ve DNA Oksidasyonu Çalışmaları:

Lipidlerin, oksijen varlığında bozulması olarak bilinen ekşileşme, antik çağdan beri yağların, özellikle zeytin yağının depolanmasında büyük problem oluşturmakla birlikte, yüzyılda yağlı boya resimlerin ve baskı mürekkeplerinin kurutulmasında yararlı bir araçtı [15]. Lipid oksidasyonu problemi ile ilgili ilk çalışma İsveçli kimyager Nicolas-Théodore de Saussure tarafından 1800 yıllarında basit bir civalı manometre kullanılarak, hava ile temas halinde bırakılan ceviz yağı tabakasının bir yıl boyunca

absorbe ettiği oksijen hacminin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

Lipitlerin oto-oksidasyon mekanizması ile ilgili ilk geniş çaplı bilgi H. N. Stephens tarafından lipid yapısında olmayan siklohekzenin oksidasyonu model alınarak elde edilmiştir [28]. Stephens 1928 yılında siklohekzenden oluşan peroksiti izole ettiğini açıklamış [28], oluşan bu peroksite yapısının doğru bir şekilde saptanması ise ancak 1942 yılında E. H. Farmer tarafından gerçekleştirilen çalışmalar ile mümkün olmuştur [29]. Hidroperoksit hipotezinin gelişmesindeki en büyük katkı E. H. Farmer ve ark. [30] İngiliz Kauçuk Üreticileri Derneği Laboratuvarlarında yaptıkları araştırmalara dayanmaktadır.

1960'lı yılların başlarında doymamış yağların oksidasyon mekanizmalarının açıklığa kavuşmasında, yeni analitik cihazların uygulamaya girmesinin büyük katkısı olmuştur. 1970'li yıllarda poliansature yağ asitlerinin oksidasyon ürünleri üzerinde çok sayıda araştırmacı grubu çalışmaya başlamış ve daha önce bildirilen aksine, lipid oksidasyon ürünlerinin geniş çeşitlilik gösteren kompleks ürünler olduğu gerçeği ortaya çıkmıştır [31]. HPLC'nin uygulama alanına girmesiyle araşidonik asitlerden oto-oksidasyon ve lipoksigenaz etkisi ile oluşan çok sayıda hidroperoksit ürününün analizi mümkün olmuştur [32,33].

N.A. Porter ve ark. [34] tarafından 1980 yılında membran fosfolipidlerinin serbest radikaller tarafından oksidasyonunun ilk defa olarak saptanması, serbest radikal biyokimyası alanında çok sayıda çalışmanın başlamasına yol açmıştır.

Proteinlerin biyolojik sistemlerin esas bileşenleri olması ve sinyal transdüksiyon, mitoz, transport sistemleri ve şaperon aktivitesi gibi çeşitli hücrel fonksiyonlarda önemli rol oynamaları nedeniyle, oksidatif hasara uğramaları organizma için önem taşır [35]. Protein oksidasyonu reaksiyonları ilk defa Swallow [36], Garrison ve ark. [37] ile Shuessler ve Schilling [38] adlı araştırmacıların çalışmalarıyla aydınlatılmaya başlanmıştır. Bu araştırmacılar protein oksidasyonuna yol açan ana mekanizmanın, polipeptid omurgasındaki çeşitli aminoasitlerin α -karbon atomlarından hidroksil radikalinin etkisiyle hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda başladığını saptamışlardır.

Protein oksidasyonu XX. yüzyılın ortalarından beri araştırılmış olmakla birlikte, bu reaksiyonların ürünlerinin *in vivo* oksidatif hasarın, spesifik genel belirteçleri olarak kullanılması ancak son yıllarda gerçekleşmiştir. Bunun nedeni, oluşan ürünlerin yapısının bilinmemesi ve bu ürünleri biyolojik materyalde saptayacak duyarlı metodların olmamasıdır. Protein oksidasyonunun protein karbonil gibi belirteçlerin *in vivo* protein oksidasyonunun derecesini gösterecek bir araç olarak kullanılması ise nispeten daha uzun bir geçmişe dayanmaktadır [39, 40]. Oksidatif protein hasarının fizyolojik önemi ilk defa 1983 yılında Rodney Levine tarafından ortaya konulmuştur [41]. Levine bu çalışmasında glutamin sentazdaki histidin bakiyelerinden birinin karbonil grubuna oksidasyonu sonucunda, enzimin

inaktive olduğunu göstermiştir. 1987'de Oliver ve ark. [42] ise, sağlıklı bireylerin fibroblast kültürlerinde yaşlanmanın etkisiyle protein karbonil düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir. Stadtman ve ark. [43] 1988 yılında protein oksidasyonunun çeşitli hastalıkların gelişiminde ve yaşlanma sürecinde önemli olduğu görüşünü öne sürmüşlerdir. Aynı araştırmacılar protein karbonil düzeylerinin sıçan karaciğeri, insan dermal fibroblastları ve lensinde yaşlanmayla arttığını ayrıca Werner sendromunda ve progeria hastalarının fibroblastlarında da artış gösterdiğini saptamışlardır [44]. Günümüzde Western Blot tekniğinin kullanılmasıyla, spesifik proteinlerin oksidasyonunun gösterilebilmesi mümkün olmuştur.

DNA'daki *in vivo* oksidatif hasarın varlığı 1980'li yıllara kadar saptanamamıştır. 1981 yılında Frenkel ve ark. [45] ince tabaka kromatografisi tekniğini kullanarak fare karaciğerinin nDNA'sında oksidatif hasar sonucu timidin glikol oluştuğunu göstermişlerdir.

Floyd ve ark. [46] ise 1986 yılında diğer bir oksidatif DNA hasarı parametresi olan, 8-okso-2-deoksi guanozini (oxo-8dG), HPLC yöntemi ile elektrokimyasal olarak analiz ederek, bu alandaki çalışmaların ivme kazanmasını sağlamışlardır. Richter ve ark. [47], oxo8dG'yi sıçan karaciğer mitokondri DNA'sında (mtDNA) saptamışlar ve mtDNA'da meydana gelen oksidatif hasarın düzeyinin nükleus DNA'sına (nDNA) göre 16 kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Dizdaroğlu ve Gajewski'nin gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi (GC/MS) tekniğini bu alanda kullanıma sokması ile, genom'daki DNA bazlarının oksidasyonlarını aydınlatmada çok önemli bir ilerleme sağlanmıştır [48]. 1990 yılında Bruce Ames'in Kaliforniya'daki laboratuvarı, yaşlanmanın DNA oksidasyonu üzerine olan etkisiyle ilgili ilk verileri yayımlamıştır [49]. Araştırmacılar bu çalışmalarında 2 -24 ay arası gruplardaki erkek sıçanların karaciğer, böbrek ve barsaklarından izole edilen nDNA'sında oxo8dG düzeyinin yaşlanma ile yaklaşık iki kat arttığını gözlemlemişlerdir. 1993'de Ames ve ark. [50] erkek sıçanların karaciğerlerinden izole ettikleri mtDNA'daki oxo8dG düzeylerinin yaşlanmayla iki veya üç kat arttığını bildirerek, bu alandaki çalışmalara diğer önemli bir katkıda bulunmuşlardır.

SONUÇ

Yirmibirinci yüzyıla girerken reaktif oksijen biyokimyası bir disiplin olarak olgunlaşmış ve biyomedikal bilimler arasındaki önemi anlaşılmıştır. Günümüzde hemen her hastalığın bir dereceye kadar oksidatif strese bağlı olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca günümüzde, ROS'nin homeostazi devam ettirmeye yardımcı normal ve sağlıklı dokuların hücrelerinde sıkı-kontrollü bir şekilde oluştuğu kabul görmeye başlamıştır. Proteomik teknoloji gibi yeni teknolojilerin reaktif oksijen biyokimyası alanındaki gelişmeleri kolaylaştıracağı, günümüz bilimsel çevrelerince tartışılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Kopáni M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biró C. Oxidative stress and electron spin resonance. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 61-66.
2. Staroverov VN, Davidson ER. Distribution of effectively unpaired electrons. *Chem Phys Lett* 2000; 330: 161-168.
3. Fenton HJH. On a new reaction of tartaric acid. *Chem News* 1876: 33; 190.
4. Fenton HJH. The oxidation of tartaric in the presence of iron. *J Chem Soc Proc* 1894; 10: 157-158.
5. Fenton HJH. Constitution of a new dibasic acid, resulting from the oxidation of tartaric acid. *J Chem Soc Trans* 1896; 69: 546-562.
6. Koppenol WH. The centennial of the Fenton reaction. *Free Radical Biol Med* 1993; 15: 645-651.
7. Schoepfle CS, Bachmann WE. Moses Gomberg 1867-1947. *J Am Chem Soc* 1948; 69: 2915-2921.
8. Ihde AJ. The history of free radicals and Moses Gomberg's contributions. *Pure and Applied Chemistry* 1967; 30: 1-16.
9. Gomberg M. An instance of trivalent carbon: Triphenylmethyl. *J Am Chem Soc* 1900; 22: 757-771.
10. McBride JM. The hexaphenylethane riddle. *Tetrahedron* 1974; 30: 2009-2022.
11. Tidwell TT. Sterically crowded organic molecules: synthesis, structure and properties. *Tetrahedron* 1978; 34: 1855-1868.
12. Binger CAL, Faulkner JL, Moore RL. Oxygen poisoning in mammals. *J Exp Med* 1927; 45: 849-864.
13. Haber F, Willstätter R. Unpaarigkeit und radikalketten im reaktion-mechanismus organischer und enzymatischer vorgänge. *Chem Ber* 1931; 64: 2844-2856.
14. Haber F, Weiss J. Über die katalyse des hydroperoxydes. *Naturwiss* 1932; 51: 948-950.
15. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature* 1954; 174: 689-691.
16. Devasagayam TPA, Tilak JC, Bloor KK Sane KS, Ghas-kadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *JAPI* 2004; 52: 794-804.
17. Gershman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and X-irradiation a mechanism in common. *Science* 1954; 119: 623-626.
18. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase; an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.
19. Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatric Soc* 1972; 20: 145-147.
20. Richter C. Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett* 1988; 241:1-5.
21. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327: 524-526.
22. Ignarro LJ, Buga JM, Wood KS, Byrns RS, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-9269.
23. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-1624.
24. Snyder SH. Janus faces of nitric oxide. *Nature* 1993; 364: 577.
25. Lyman SV, Hurst JK. Rapid detection between peroxynitrite and carbon dioxide: implications for biological activity. *J Am Chem Society* 1995; 117: 8867-8868.
26. Wenworth P, McDunn JE, Wentworth AD, Takeuchi C, Nieva J, Jones T, Bautista C, Ruedi JM, Gutierrez A, Janda KD, Babior BM, Eschnmoser A, Lerner RA. Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science* 2002;298: 2195-2199.
27. Yoshikawa T, Toyokuni S, Yamamoto Y, Naito Y.(eds). *Free radicals in Chemistry Biology and Medicine*, OICA International, London, 2000.
28. Stephens HN. Studies in auto-oxidation. I. Cyclohexene peroxide. (Preliminary communication). *J Am Chem Soc* 1928; 50: 568-571.
29. Farmer EH. α -Methylene reactivity in olefinic and polyolefinic systems. *Trans Faraday Soc* 1942; 38: 340-348.
30. Farmer EH. The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. Part I. The structure and reactive tendencies of the peroxides of simple olefins. *J Chem Soc* 1942, 121-139.
31. Porter NA. Autoxidation of polyunsaturated lipids. Factors controlling the stereochemistry of product hydroperoxides. *J Am Chem Soc* 1980; 102: 5597-5601.
32. Porter NA, Wolf RA, Yarbro EM, Weenen H. The auto-oxidation of arachidonic acid: formation of the proposed SRS-A intermediate. *Biochem Biophys Res Comm* 1979; 89:1058-1064.
33. Porter NA, Byers JD, Holden KM, Menzel DB. Synthesis of prostoglandin H₂. *J Am Chem Soc* 1979; 101: 4319-4322.
34. Porter NA, Weenen H. High performance liquid chromatographic separations of phospholipids and phospholipid oxidation products. *Methods Enzymol* 1981; 72: 34-40.

35. Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Aging Dev* 2004; 125: 811-826.
36. Swallow AJ. Radiation chemistry of organic compounds. New York, John Wiley&Sons, 1960; 211-224.
37. Garrison WM, Jayko ME, Bennett W. Radiation induced oxidation of protein in aqueous solution. *Rad Research* 1962; 16: 483-502.
38. Schuessler H, Schilling K. Oxygen effect in radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin. *Int J Radiat Biol* 1984; 45: 267-281.
39. Stadtman ER. Protein modification in aging. *J Gerontol* 1988; 43: 112-120.
40. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 207-218.
41. Levine RN Oxidative modification of glutamine synthetase. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J Biol Chem* 1983; 258: 11823-11827.
42. Oliver CN, Ahn B, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem* 1987; 262: 5488-5491.
43. Stadtman ER. Biochemical markers of aging. *Exp Gerontol* 1988; 23: 327-347.
44. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257: 1220-1224.
45. Frenkel K, Goldstein MS, Teebor GW. Identification of the cis-thymine glycol moiety in chemically oxidized and gamma-irradiated deoxyribonucleic acid by high-pressure liquid chromatography analysis. *Biochemistry* 1981; 26: 7566-7571.
46. Floyd RA, Watson JJ, Wong PK Altmiller DH, Rickard RC. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanism of formation. *Free Radical Res Commun* 1986; 1: 163-172.
47. Richter C, Park J, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6465-6467.
48. Dizdaroğlu M, Gajewski E. Selected ion mass spectrometry: assays of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol* 1990; 186: 530-544.
49. Fraga CG, Shigenaga MK, Park J, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during ageing: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4533-4537.
50. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7915-7922.