



Derleme Makalesi / Review Article

Serbest Radikallerin ve Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı Olarak Mitokondri Mitochondria as Source of Free Radicals and Reactive Oxygen Species

Rabia ŞEMSİ

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Öz

Mitokondri içinde reaktif oksijen türlerinin üretimi, bu organelin birincil işlevi olan oksidatif metabolizma ve ATP sentezi ile yakından ilişkilidir ve birçok patolojide oksidatif hasarın temelini oluşturarak redoks sinyaline katkıda bulunur. Sinyal molekülleri olarak reaktif oksijen türleri, hücre proliferasyonu, hipoksi adaptasyonu ve hücre kaderinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar, ancak aşırı üretilen reaktif oksijen türleri, geri dönüşü olmayan hücre hasarına ve hatta hücre ölümüne neden olabilir. Bir dizi hastalığın ortaya çıkması ve gelişmesi, reaktif oksijen türlerinin fazla üretimi ile yakından ilişkilidir. Serbest radikaller vücudumuzda çeşitli sistemler tarafından üretilir. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki denge, uygun fizyolojik fonksiyon için önemli bir konudur. Bu derleme, serbest radikaller, reaktif oksijen türleri, bazı antioksidanlar ve aralarındaki ilişki hakkında kısa bir genel bakış sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mitokondri, serbest radikaller, reaktif oksijen türleri, antioksidanlar

Abstract

The production of reactive oxygen species within the mitochondria is closely related to the primary function of this organelle, oxidative metabolism and ATP synthesis, and contributes to redox signalling by forming the basis of oxidative damage in many pathologies. As signaling molecules, reactive oxygen species play an important role in cell proliferation, hypoxia adaptation and cell fate determination, but excessive reactive oxygen species can cause irreversible cell damage and even cell death. The occurrence and development of a number of diseases are closely related to reactive oxygen species overproduction. Free radicals are generated in our body by several systems. A balance among free radicals and antioxidants is an important matter for appropriate physiological function. The present review provides a brief overview of free radicals, reactive oxygen species, some antioxidants and the relationship between them.

Keywords: Mitochondria, free radicals, reactive oxygen species, antioxidants

İletişim adresi/Address for Correspondence:

Rabia Şemsi: <https://orcid.org/0000-0002-8477-5537>

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD, Ankara, Türkiye

Tel: +905454156384

E-mail: rabiasemsi2010@gmail.com

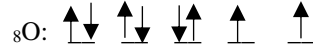
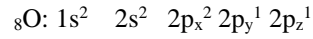
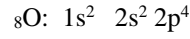
Geliş Tarihi/Received:01 Ekim 2021 Kabul Tarihi/Accepted:28 Kasım 2021 Çevrimiçi Yayın/Published online:31 Aralık 2021.

GİRİŞ

Mitokondri tarafından ATP üretimi, hücre fonksiyonu, sinyal yolları ve genel hücre aktiviteleri için gereklidir. Mitokondri, oksidatif fosforilasyon, anahtar moleküllerin sentezi ve oksidatif strese yanıt yoluyla hücrelere ATP sağlanmasında rol oynar. Ayrıca apoptozda ve füzyon/fisyon yoluyla doğru solunum aktivitesi ve metabolik verimlilik için gerekli dinamik hareketlere katılırlar¹. Mitokondri bir çok redoks enzimi içerir ve oksidatif fosforilasyonun yetersiz olması durumunda reaktif oksijen türlerini üretir. Bu reaktif oksijen türlerinin üretimi, çeşitli patolojik durumlarda mitokondriyal hasara katkıda bulunur ve ayrıca organelden hücrenin geri kalanına redoks sinyalizasyonunda önemlidir²⁻⁸. Elektron taşınması sırasında, elektronların %2-3'ü elektron taşıma zincirinden (ETZ'den) sızar ve moleküler oksijene bağlandıklarında süperoksit üretilir. Süperoksit daha sonra zincir tepkimelerinde çeşitli diğer reaktif oksijen türlerine (ROS) dönüştürülür. Reaktif oksijen türleri arasında, süperoksit ve nitrik oksidin bağlanmasıyla yapılan peroksinitrit, hücrelerde oksidatif stres oluşturmada önemli bir rol oynamaktadır. Bu derlemede, fizyolojik olarak mitokondrideki ilgili bölgelerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu destekleyen biyoenerjetik faktörler bahsedilecektir. Ayrıca, solunum zincirinin ilk bileşeni olan kompleks I tarafından reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ve NADH:NAD⁺ oranının reaktif oksijen türlerinin oluşumuna nasıl düzenlendiğine değinilmektedir.

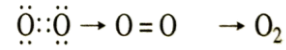
Yaşamımız İçin Gerekli Olan Oksijen (O₂) Zehirli Midir?

Yaşamın sürdürülebilmesi için oksijene olan bağımlılığın temel ve en önemli nedeni enerji üretmektir. Solunumla alınan oksijenin %90'ı oksidatif fosforilasyon sırasında kullanılmaktadır. Bu süreç sonucunda gereken enerjinin kaynağı olan ATP üretilir. Oksijenin zehirli olmasının nedeni molekülün kimyasal yapısı ve davranışına dayanmaktadır. Oksijen molekülü periyodik cetvelde ikinci periyotta bulunan 6A grubunun ilk elementidir. Atom numarası 8 olan oksijen atomunun 8 protonu ve 8 elektronu vardır.



Oksijen molekülünün elektron dağılımı

Elektron dağılımına baktığımız zaman her iki oksijen atomunun birer elektronunun iki atom arasındaki kovalent bağı oluşturmak için kullanıldığı, diğer iki elektronun da eşleşmemiş olarak birer orbital de yer aldığı görülür⁹⁻¹¹.



Dış orbitallerinde tek sayıda eşleşmemiş elektron taşıyan atom, molekül veya gruplara *radikal* veya *serbest radikal* denir. Oksijen molekülünün de iki orbitalinde aynı yönde spini olan iki eşleşmemiş elektronu bulunduğu için diradikaldir. Serbest radikaller yapılarındaki dengesizlik nedeni ile kararsız yapılardır. Kararlı hale geçmek için hızlı davranırlar. Yani, başka bir atom ya da molekülden var olan elektronlarına ters spinli olacak şekilde bir elektron alarak yarı boş orbitalini doldurmaya ve kararlı yapıya geçmeye çalışacaktır. Yarı ömürleri çok kısadır⁹⁻¹¹.

Kimyasal davranışına baktığımız zaman ise radikal gibi davranmadığı görülür. Güçlü bir oksitleyici olmasına rağmen aktivitesi çok düşüktür. Mevcut elektronlarının spinleri aynı olduğu için, diğer atom ya da molekülden gelecek iki elektronun spinlerinin ters olması gerekir. Bu koşulu sağlayabilecek atom ya da molekül bulunması çok zordur, çünkü verebilecek elektron çifti zaten birbiri ile ters spinli olarak eşleşmiştir. Bu durum oksijen molekülünün elektron alışverişine bir tür spin kısıtlaması getirerek molekülün aktivitesini azaltmaktadır. Bu engeli aşmak için oksijen molekülü elektronları birer birer alır. Böylece mevcut olan spin kısıtlamasını ortadan kaldırır. Vücudumuzda oksijene tek elektron verebilecek bir çok madde bulunmaktadır. Özellikle geçiş elementlerinden demir (+2) ve bakır (+1) iyonları çok önemlidir. Mitokondride bulunan elektron taşıma zinciri elemanlarının ve birçok oksidaz ve oksijenaz enzimlerinin aktif bölgelerinde bu iyonlar bulunmaktadır⁹⁻¹¹.

Reaktif Oksijen Türleri

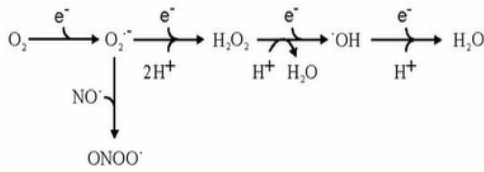
Moleküler oksijenden daha reaktif durumda olan tüm aerobik hücreler tarafından üretilen oksijen türleridir. En iyi konak savunma mekanizmalarındaki rolü ile bilinir. Genellikle hücre metabolizmasının toksik yan ürünleri olarak ve temel sinyal molekülleri olarak kabul edilir¹².

Mitokondri içinde reaktif oksijen türlerinin üretimi, bu organellerin birincil işlevi olan oksidatif metabolizma ve ATP sentezi ile yakından ilişkilidir.

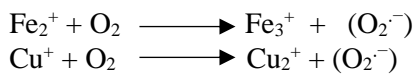
Reaktif oksijen türleri, normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) dir.

Süperoksit Radikali

Mitokondri içinde süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) O_2 'nin bir elektron indirgenmesiyle üretilir. Bu nedenle, potansiyel elektron vericilerinin O_2 ile etkileşiminin altında yatan kinetik ve termodinamik faktörler mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin üretimini kontrol eder. Paralel dönüşlü anti-bağ orbitallerinde iki eşleşmemiş elektrona sahip olmak, temel durumdaki O_2 'nin bir seferde bir elektron kabul etmesini sağlar¹³.



İndirgenmiş geçiş metallere otoksidasyonu süperoksit radikali meydana getirir.



Süperoksit güçlü bir oksidan değil, diğer reaktif oksijen türlerinin öncülüdür ve oksidatif zincir tepkimelerinin yayılmasında rol oynar. Non-enzimatik veya enzimatik tepkimelerle oluşur.¹² Ayrıca, lipid peroksidasyonuna neden olur, katalaz ve glutatyon gibi antioksidan sistemi zayıflatır. Ribonükleotitlere zarar vererek DNA sentezini, dolayısıyla protein sentezini bozar¹².

Bir elektronun süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), oluşturmak üzere O_2 'ye aktarılması için standart indirgeme potansiyeli, standart 1M O_2 durumu için pH 7'de -160 mV'dir. ($O_2^{\cdot-}$)'nin pKa'sı 4.7 olduğundan, bu standart indirgeme potansiyeli biyolojik pH değerinde değişmezdir¹²⁻¹⁴.

Solunum zincirinin standart indirgeme potansiyeli -320'den +390 mV'a kadar değişkenlik gösterir. Mitokondri içindeki

yüksek indirgeme potansiyeli nedeniyle dinamik olarak oksijene bir elektron transfer edilir (sürekli bir süperoksit oluşumu mevcuttur). Ancak mitokondride bunları elimine edecek güçlü antioksidan savunma sistemleri vardır¹⁴.

Zarlar arası boşluktaki süperoksit, voltaja bağlı anyon kanalları aracılığıyla sitoplazmaya taşınabilir. Kompleks I beyin (Parkinson ve Alzheimer), Kompleks III ise kalp ve akciğer için ana kaynaktır¹⁵.

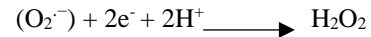
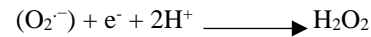
Süperoksit oluşumu hem elektron akışını artırabilir hem de oksijen konsantrasyonu arttığında rotenon (kompleks I) ve antimisin (kompleks III) süperoksiti artırabilir. İnhibitörlerin yukarı akışı tamamen azalır, ancak tüm inhibitörler bu etkiye sahip değildir¹⁵.

Hidrojen Peroksit

Oksijenin enzimatik olarak iki elektron indirgenmesi ile ya da süperoksitlerin enzimatik/non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur.

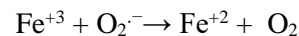
Yapısında eşleşmemiş elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz.

Mikrozom, mitokondri ve fagositik hücrelerden esas olarak süperoksit radikali üzerinden üretilmektedir.



Mitokondri de üretilen hidrojen peroksit, hücrelerde proliferasyondan, apoptoz ve nekroza geçişte belirleyici bir rol oynar.

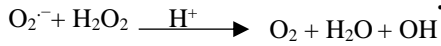
Hidrojen peroksit serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türlerindedir ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Fenton tepkimesinde $O_2^{\cdot-}$ öncelikle bir metal (Cu^{+2} veya Fe^{+3}) iyonu ile tepkimeye girer, böylece indirgenmiş metal ve O_2 meydana gelir. Daha sonra indirgenen metal iyonu H_2O_2 ile tepkimeye girerek başlangıçtaki metal iyonunu ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) oluşturur. H_2O_2 , OH^{\cdot} radikali meydana getirmek için Cu^{+2} ile Fe^{+2} iyonuna oranla daha çok tepkimeye girer¹².



Hidroksil radikali canlı hücrelerde bulunan polisakkaritler, aminoasitler, fosfolipitler, DNA bazları ve organik asitler gibi pek çok molekül ile tepkimeye girebilir. Hidrojen peroksit,

myeloperoksidaz enzimi (MPO) katalizörlüğünde Cl⁻ ile tepkimeye girerek daha güçlü bir radikal olan hipokloriti (HOCl) meydana getirir.

Doğal enzimler ve glutatyon yetersiz düzeyde ise süperoksit ve hidrojen peroksit ortamda serbestleşmiş halde bulunan Fe⁺³ veya Cu⁺² katalizörlüğünde birbirleriyle tepkimeye girerek en güçlü radikal olan OH[•] molekülünü oluşturur. Bu tepkimeye *Haber-Weis tepkimesi* denir.¹²



Elektron Taşıma Zinciri; Süperoksit Radikali ve Hidrojen Peroksit Oluşum Hızı Zincirin Metabolik Durumu ile İlişkili Midir?

Metabolik durumu 3 farklı şekilde açıklayabiliriz.

Birinci durum: Solunum hızı yavaş ve kullanılabilir. ADP yok ise solunum zincir elemanlarının yüksek indirgen durumları süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşumuna neden olur.

İkinci durum: Mitokondriyal solunum aktif olduğunda yani yeterli oksijen ve ADP varlığında solunum zincir elemanlarının okside formda olması durumunda, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşum hızı yavaştır.

Üçüncü durum: Oksijen sağlanmasında sınırlama ve solunum (respirasyon) yetersizliğinde oksijenin süperoksit radikaline veya hidrojen peroksite indirgenmesi gerçekleşmez^{14,15}.

Hidroksil Radikali (OH[•])

Serbest radikallerin en güçlü olanıdır. Hidroperoksitlerin (ROOH) ayrışması ile ortaya çıkar. Bunun için süperoksit anyonu da gereklidir.

Sitotoksik etkilidir. Hemen her moleküle atak yapıp yaşayan dokulardaki her moleküle hasar verebilir.

Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır^{14,15}.

Peroksil Radikali (ROO[•])

Canlı sistemlerdeki oksijenden türetilir. Peroksil radikalının en basit şekli, süperoksidin protonlanmasıyla oluşan perhidroksil radikaldir¹⁶. Bir hücrenin sitozolündeki toplam süperoksit radikalının yaklaşık %0.3'ü protonlanmış formdadır. Yağ asidi

peroksidasyonunu başlatır ve aynı zamanda tümör gelişimini de teşvik edebilir¹⁷.

Singlet Oksijen (¹O₂)

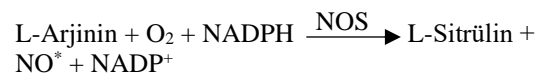
Moleküler oksijenin elektron alarak yüksek uyarılmış, meta-kararlı halidir. Oldukça reaktif, toksik bir oksijen türüdür.¹⁸ Aktivasyon üzerine, moleküler oksijen ilk olarak ¹Δ_g durumuna ve ardından bir sonraki daha yüksek uyarılmış singlet durumuna ¹ε_g uyarılır. İlk uyarılmış durum, ¹Δ_g, aynı p* orbitalinde zıt dönüşlü iki elektrona sahipken, ikinci uyarılmış durum, ¹ε_g, ters dönüşlü her dejenere Π* orbitalinde bir elektrona sahiptir. ¹Δ_g durumu son derece reaktiftir¹⁹. Nötrofiller ve eozinofillerin aktivasyonu ile *in vivo* üretilir. Ayrıca lipoksijenazlar, dioksijenazlar ve laktoperoksidaz gibi enzimler tarafından katalize edilen bazı enzimatik tepkimelerle de oluşur. DNA hasarına ve doku hasarına neden olabilen oldukça güçlü bir oksitleyici ajandır.

* ¹ε_g: yüksek enerjili singlet durumu ; ¹Δ_g: düşük enerjili singlet durumu ; Π*:orbital (spin-eşleştirilmiş iki değerlik elektronu bulunur)

Nitrik Oksit (NO)

Oksijen gibi hem hayat için vazgeçilmez, hem de toksiktir. NO'nin eşleşmemiş bir elektronu bulunur ve dolayısıyla eşleşmemiş elektronu bulunan demir (+3) gibi diğer bileşiklere bağlanabilir. NO gaz formunda bulunur ve sitozole hücre lipid membranları üzerinden difüze olur²⁰⁻²².

NO, oksijen içeren bir serbest radikaldir. NO arjininin nitrik oksit sentaz ile sitrülline yıkılması sonucu oluşan vazodilatatör bileşiktir.



Mitokondriyal matriks NO sentazın bir formunu bulundurmaktadır. Fizyolojik rolü tam olarak bilinmemesine rağmen mitokondriyal NO sitokrom oksidaza bağlanarak solunumu inhibe eder. Böylece ubikinolün ubisemikinona oksidasyonuna neden olarak otooksidasyonla O₂⁻ oluşumuna neden olur. Artan O₂⁻ radikali NO ile etkileşerek potent peroksinitrit radikalini oluşturur. Peroksinitrit önemli enzimleri inhibe eder ve mitokondri bütünlüğünü bozar²⁰⁻²².

Serbest Radikal

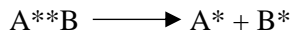
Son yörüngesinde bir veya daha çok sayıda eşleşmemiş elektron bulunan atom ya da moleküle *serbest radikal (veya radikal)* denir.

Çok reaktif maddelerdir, çeşitli tepkimelerde oksidan ve redüktan olarak görev yapabilirler^{23,24}.

Birçok hastalık durumunda en önemli oksijen içeren serbest radikaller hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, oksijen singleti, hipoklorit, nitrik oksit radikali ve peroksinitrit radikalidir. Bunlar, DNA, proteinler, karbohidratlar ve lipitler gibi biyolojik olarak ilgili moleküllere zarar verme yeteneğine sahip, çekirdekte ve hücre zarlarında oldukça reaktif türlerdir²⁵.

Serbest radikaller, hücre hasarına ve homeostatik bozulmaya yol açan önemli makromoleküllere saldırır. Serbest radikallerin hedefleri vücuttaki her türlü molekülü içerir. Bunlar arasında lipitler, nükleik asitler ve proteinler başlıca hedeflerdir.

Serbest radikaller 3 farklı yol ile oluşabilirler:²⁵ Bir molekülün kovalent bağının molekülün her bir parçasına eşleşmiş elektronlardan bir tanesinin kalacak biçimde (homolitik) bölünmesiyle;



Bir molekülden tek bir elektron kaybıyla;



Bir moleküle tek bir elektron eklenmesiyle;



Serbest Radikal Kaynakları

Reaktif oksijen türleri, endojen veya eksojen kaynaklardan üretilebilir. Endojen kaynakları, oksijen tüketiminin yüksek olduğu mitokondri, peroksizomlar ve endoplazmik retikulum gibi farklı hücresel organları içerir.

Mitokondri

Hücre içi reaktif oksijen türlerinin çoğu mitokondri kaynaklıdır. Süperoksit radikalleri elektron taşıma zincirinde kompleks I ve kompleks III olmak üzere iki ana bölgede üretilir. Elektronların kompleks I veya II'den koenzim Q'ya veya ubiquinon'a transferi, indirgenmiş koenzim Q formunun oluşumuyla sonuçlanır. İndirgenmiş form olan QH₂, Q döngüsünde kararsız bir ara anyon aracılığıyla koenzim Q'yu yeniden üretir. Oluşan semikinon anyonu, elektronları moleküler oksijene transfer ederek süperoksit radikalinin oluşumuna yol

açar. Süperoksit üretimi enzimatik değildir ve bu nedenle metabolik hız ne kadar yüksekse, reaktif oksijen türlerinin üretimi de o kadar fazla olur²⁶.

Süperoksit anyonu, mitokondriyal süperoksit dismutazın etkisiyle hidrojen peroksite dönüştürülür. H₂O₂, katalaz ve glutatyon peroksidad tarafından detoksifiye edilebilir.

Reaktif oksijen türlerinin oluşumuna katkıda bulunan diğer mitokondriyal bileşenler, monoamino oksidaz, α-ketoglutarat dehidrojenaz ve gliserol fosfat dehidrojenaz içerir²⁷.

Peroksizomlar

Peroksizomlarda solunum yolu, çeşitli metabolitlerden oksijene elektronların transferini içerir ve H₂O₂ oluşumuna yol açar. ATP üretmek için oksidatif fosforilasyona bağlanmaz, bunun yerine serbest enerji ısı şeklinde salınır. Peroksizomlarda üretilen diğer serbest radikaller arasında H₂O₂, O₂⁻, OH[•] ve NO[•] bulunur. Yağ asitlerinin β-oksidasyonu, peroksizomlarda H₂O₂ üreten ana metabolik süreçtir²⁸.

Endoplazmik Retikulum

Sitokrom p-450 ve b5 enzimleri ve diamine oksidaz gibi endoplazmik retikulum enzimleri reaktif oksijen türlerinin oluşumuna katkıda bulunur. Bir diğer önemli tiyol oksidaz enzimi olan Eroplp, elektronların ditiyollerden moleküler oksijene transferini katalize ederek H₂O₂ oluşumuna neden olur²⁹.

Diğer endojen reaktif oksijen türleri kaynakları arasında prostaglandin sentezi, adrenalinin oto-oksidasyonu, fagositik hücreler, indirgenmiş riboflavin, FMNH₂, FADH₂, sitokrom P 450, immün hücre aktivasyonu, inflamasyon, zihinsel stres, aşırı egzersiz, enfeksiyon, kanser, yaşlanma, iskemi bulunur.

Serbest Radikallerin Moleküler Hedefleri

Serbest radikal üretimi ve antioksidan savunmalar arasında bir dengesizlik olduğunda, serbest radikal üretimi daha yüksek konsantrasyonlarda meydana gelerek oksidatif stres ve nitrozatif strese yol açar. Bu serbest radikaller reaktif olduklarından, nükleik asitler, proteinler ve lipitler dahil olmak üzere üç önemli biyolojik molekül sınıfının tümüne zarar verebilirler.

Mitokondriyal Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimine Genel Bakış

Mitokondri tarafından reaktif oksijen türlerinin üretimi, trikarboksilik asit döngüsü, yağ asidi

oksidasyonu, üre döngüsü, çoğu hücrenin normal işleyişi için merkezi olan amino asit metabolizması, hem sentezi ve FeS merkezleri dahil olmak üzere, mitokondriyal proteinlerde, membranlarda ve DNA'da oksidatif hasara yol açarak mitokondrinin ATP sentezleme ve geniş metabolik fonksiyonlarını yerine getirme yeteneğini bozabilir².

Mitokondriyal oksidatif hasar, mitokondriyal dış zar geçirgenliği yoluyla mitokondrinin sitokrom c gibi zarlar arası boşluk proteinlerini sitozole salma eğilimini artırabilir ve böylece hücrenin apoptotik mekanizmasını aktive eder. Ek olarak, mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin üretimi, mitokondriyal zarların uyarılmasına yol açar, bu da iskemi/reperfüzyon hasarı gibi durumlarda iç zarı küçük moleküllere karşı geçirgen hale getirir. Sonuç olarak, mitokondriyal oksidatif hasarın çok çeşitli patolojilere katkıda bulunması şaşırtıcı değildir. Ek olarak, mitokondriyal reaktif oksijen türleri mitokondri, sitozol ve çekirdekteki bir dizi fonksiyonun aktivitesini geri dönüşümlü olarak etkileyen düzenlenebilir bir redoks sinyali olarak hareket eder².

Reaktif Oksijen Türleri Kaynakları

Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik tepkimelerde enzimlerin aktif bölgesinde ara ürünler yerine sürekli olarak serbest radikaller oluşabilir. Bazen bu serbest radikal ara ürünler enzimlerin aktif bölgesinden sızarlar, moleküler oksijenle rastgele etkileşirler ve serbest oksijen radikalleri oluşur.

Normalde hücrelerde en önemli serbest oksijen radikal kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirindeki sızıntıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır.

Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidazdır. Diğer reaktif oksijen türlerinin kaynakları ise mitokondri, NADPH oksidaz, lipooksijenaz ve nitrik oksit sentazdır.

Mitokondriyal Üretilen Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları

Süperoksit/dioksijen çiftinin orta düzeydeki redoks potansiyeli göz önüne alındığında, oksijenin bir elektron indirgenme tepkimesi, sayısız mitokondriyal oksidoredüktaz enzimi

için termodinamik açıdan uygundur. Süperoksitin tepkimeden etkin bir şekilde uzaklaştırıldığı ve birçok redoks taşıyıcısının yüksek oranda indirgenmiş hali dikkate alındığında, tepkime geri dönüşümsüzdür. Bu nedenle, taşıyıcılardan hangisinin reaktif oksijen türlerinin üretim bölgeleri haline geldiği kinetik olarak kontrol edilir. Memeli mitokondrilerinde dokuz enzim tüm dokularda bulunur, ancak reaktif oksijen türlerini üretme kapasiteleri ve ifadenmeleri dokular ve türler arasında büyük farklılıklar gösterir. Bu nedenle, *in vivo* tek bir "ana" reaktif oksijen türleri kaynağının tanımlanması zor olabilir. Bu dokuz enzimden yedi enzim aşağıda tartışılmaktadır³¹.

1. Sitokrom b5 redüktaz

Dış mitokondriyal zara yakın konumludur. Sitoplazmik NAD(P)H'ı okside eder. Dış zarda sitokrom b5'i azaltır. Serbest radikal üretebilir. Şizofreni hastalarında bu enzim miktarı yüksektir.

2. Monoamin oksidaz (MAO)

Dış mitokondriyal zarda konumludur. Monoamin nörotransmitterlerinin döngüsel üretiminde önemlidir. Biyojenik aminler aldehitin oksidatif deaminasyonunu ve H₂O₂ salınımını katalize eder. Doku iskemi hasarında, yaşlanmada, Parkinson hastalığında enzim miktarı artar.

3. Dihidrorotat Dehidrogenaz (DHOH)

İç zarın dış yüzeyinde bulunur. Pirimidin nükleotit sentezi sürecinde DHOH, dihidroorotatı orotata dönüştürür. Elektron reseptörü koenzim Q'dur ve *in vitro* koşullarda koenzim Q'nun yokluğunda H₂O₂ üretilir.

4. α – Gliserofosfat Dehidrogenaz

İç zarın dış yüzeyinde bulunur. Elektron reseptörü olarak koenzim Q kullanır ve gliserol-3-fosfatın dihidroksiasetona oksidasyonunu katalize eder. Lipit metabolizmasında ve NAD'in NADH'ye indirgenme tepkimesinde kullanılır. Fareler ve drosophila üzerinde yapılan çalışmalar, H₂O₂ ürettiğini öne sürmektedir.

5. Akonitaz

Mitokondriyal matrikse konumludur. Trikarboksilik asit döngüsünde sitratın izositrata dönüşümünü katalize eder. Süperoksit tarafından inaktive edilir ve Fe⁺² salınımı ile OH⁻ üretir.

6. α-Ketoglutarat Dehidrogenaz Kompleks

İç zarın matriks tarafında bulunur. Elektron alıcısı olarak NAD⁺ kullanır ve α-ketoglutaratın

süksinil-CoA'ya oksidasyonunu katalize eder. Ketoglurat dehidrogenaz kompleks 3 ayrı enzimden oluşur:

- α -ketoglutarat dehidrogenaz
- süksinil transferaz
- lipoamid dehidrogenaz

Diğer kaynaklara benzer şekilde, sınırlı elektron alma isteği reaktif oksijen türlerinin üretimini teşvik eder.

7. Süksinat Dehidrogenaz (SDH; aka Kompleks II)

İç zarın iç yüzeyinde bulunur. Elektron reseptörü olarak koenzim Q kullanarak süksinatı fumarata oksitleyen flavoproteindir. İzole edilmiş SDH, elektron reseptörünün yokluğunda reaktif oksijen türlerini üretebilir. Okside süksinatın submitokondriyal parçası karboksil tarafından inhibe edilir. Aynı inhibitör antimisine bağlı reaktif oksijen türlerinin yapımını ve bu yapıyı destekleyen NADH oksidasyonunu baskılar. SDH alt birimlerindeki mutasyonlar, özellikle süperoksit olmak üzere mitokondride bulunan reaktif oksijen türlerinde bir artışa neden olur.

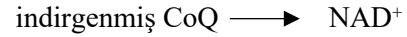
Kompleks I: Mitokondriyal Üretilen Reaktif Oksijen Türlerinin Birincil Kaynağı

Kompleks I, hem matriks hem de zarlar arası boşluğa maruz kalan ayrılmaz bir iç zar, çoklu protein kompleksidir. Proton pompası üreten transmembran potansiyeli ile birleşen tersinir bir tepkimede elektron alıcısı olarak koenzim Q kullanarak NADH'yi oksitler. Böylelikle, trikarboksilik asit döngüsü substratlarından türetilen eşdeğerleri azaltmak için solunum zincirine iki ana giriş noktasından birini temsil eder. En eski çalışmalardan biri, izole edilmiş Kompleks I'in NADH varlığında süperoksit üretebileceğini göstermiştir. Ubikinon bağlanma bölgesine yakın elektron transferini bloke eden bir inhibitör olan rotenon tarafından inhibe edildiğinden, ubikinonun sıkı bağlandığı bir tepkime gerektirir. Bu kinon bağımlılığı, gözlenen reaktif oksijen türlerinin üretim mekanizmasının bir şekilde Kompleks III aracılı süperoksit oluşum tepkimesine benzediğini düşündürmektedir.

Diğer çalışmalarda ise rotenon, azalmış NADH varlığında Kompleks I tarafından reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırmış ya da etki etmemiştir³²⁻³⁵.

Süperoksitin Ters Elektron Transfer Üretimi

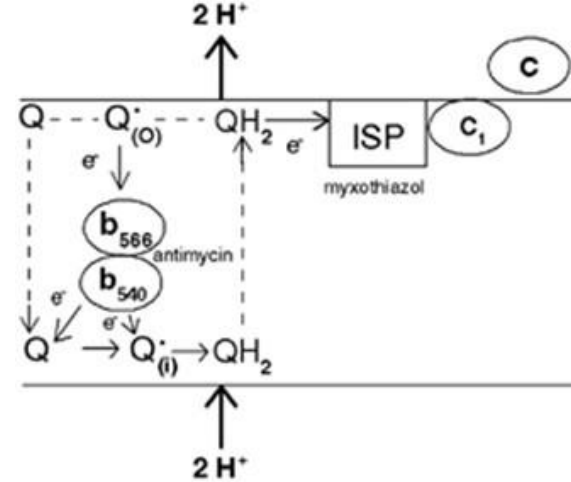
Elektronlar redoks potansiyel gradientine karşı aktarılır.



CoQ'yu azaltmak için süksinat ya da α -gliserofosfat kaynağı elektronları düşük ATP üretimi sırasında ortaya çıkar, yüksek proton hareket kuvveti ve düşük CoQ ile sonuçlanır. Bu şekilde, ters elektron transferine bağlı mitokondride meydana gelebilecek süperoksit üretim hızı en yüksek oranda gözlenir^{34,35}.

Kompleks III: Mitokondriyal Üretilen Reaktif Oksijen Türlerinin Birincil Kaynağı

Elektron alıcısı olarak sitokrom c kullanarak CoQ'yu oksitler. İndirgenmiş CoQ (QH₂) bir elektronu FeS proteinine (ISP, diğer adıyla Rieske proteini) ve sonunda sitokrom c'ye aktarır. Ortaya çıkan semikinon (Q^{*}) elektronları sitokrom b'ye, ardından Q_i bölgesine aktarır ve bu da başka bir CoQ molekülünün indirgenmesiyle sonuçlanır (Q-döngüsü). Semikinon (Q^{*}) kararsızdır ve oksijen oluşturan süperoksite elektron verebilir (Şekil 1).



Şekil 1. Koenzim Q oksidasyonunun Q döngüsü modeli

Kompleks III'ün Antimisin ile Uyarılan İnhibisyonu

Antimisin, elektronların Q_i bölgesine transferini bloke eder, bu da kararsız semikinonun birikmesine neden olur. Kararsız semikinon, elektronları oksijen üreten süperoksite aktarabilir³⁶.

Mitokondriyal Yerleşimli Antioksidanlar

Memeli mitokondrieleri, enzimler ve enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşan reaktif

oksijen türleri savunma ağına sahiptir.

Manganez Süperoksit Dismutaz (MnSOD; SOD2)

Hidrojen peroksit ve oksijen üreten süperoksitin dismutasyonunu katalize eder. Sadece mitokondri matriksinde bulunur. Tetramerik yapıdadır, siyanidle inhibe olmaz. Bir mitokondriyal hedef dizisine sahip nükleer kodlanmış proteindir. Tümör hücrelerinin büyük bir yüzdesi düşük MnSOD aktivitesine sahiptir^{37,38}.

Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz (CuZnSOD; SOD1)

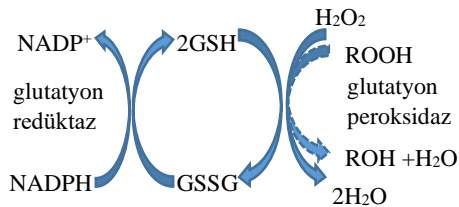
MnSOD ile aynı tepkimeyi katalize eder. Esas olarak sitoplazmada, ancak mitokondride de bulunur. Dimerik yapıdadır, siyanidle inhibe edilir. Mitokondriye taşınma mekanizması da belirsizdir^{37,38}.

Katalaz

Katalaz enzimi H₂O₂'in su ve moleküler oksijene çevrildiği tepkimeyi katalizleyen bir hemoproteindir. Dört tane hem grubu içerir. Hücre içinde esas yerleşim yeri peroksizomdur.

Glutasyon

Glisin, glutamat ve sistein amino asitlerinden meydana gelen bir tripeptittir. Ekzojen ve endojen kaynaklı bir antioksidandır. Glutasyon (GSH)'dan oluşan glutasyon radikali (GS.) bir prooksidan olmakla birlikte başka bir GS. ile birleşerek yükseltgenmiş glutasyonu (GSSG) oluşturur, bu da NADPH bağımlı GSH redüktaz tarafından GSH'a indirgenir. GSH doğrudan glutasyon peroksidaz enzimi ya da dolaylı enzimatik tepkime ile reaktif oksijen türlerini yok eder. Ayrıca, glutasyon hücresel oksidasyon-redüksiyon dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan tiyol proteinleri ile etkileşime girer (Şekil 2).

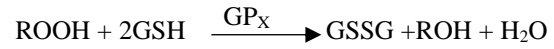
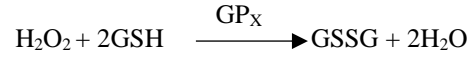


Şekil 2. Glutasyonun antioksidan aktivitesi

Glutasyon Peroksidaz (GP_x)

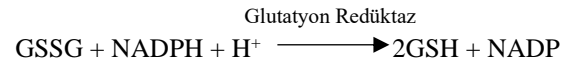
Mitokondriyal matriks ve zarlar arası boşlukta bulunur. İndirgenmiş glutasyon (GSH) varlığında H₂O₂ ve lipid peroksidlerin parçalanmasında rol alır. Enzimin aktif bölgesinde 4 tane selenyum atomu bulunur, tetramerik yapıdadır. Bu enzim lipid

peroksidlerini de indirgeyebilir ve bu nedenle lipid peroksidasyonun önlenmesinde önemli role sahiptir³⁹.



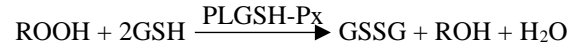
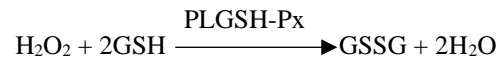
Glutasyon Redüktaz

Hidrojen peroksitin suya indirgenmesi sırasında GSH oksitlenir. Glutasyon peroksidazın etkisinin sürebilmesi için oksitlenmiş glutasyonun (GSSG) yeniden indirgenmesi gerekir. Bu tepkime NADPH bağımlı bir flavoprotein olan GSH peroksidaz tarafından katalizlenir. NADPH kaynağı pentoz fosfat yoludur.³⁹



Fosfolipit Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz (PLGSH-Px; GPx4)

Monomerik yapıdadır. Lipid hidroperoksidleri ve hidrojen peroksiti azaltır. Membran fosfolipit hidroperoksidlerini alkole indirger. Mitokondride ifade edilen GPx4 uzun formudur³⁹.



Sitokrom c

Zarlar arası boşlukta bulunur. Süperoksitleri ortadan kaldırabilir. İndirgenmiş sitokrom c, sitokrom c oksidaz tarafından geri dönüştürülür.



Peroksiredoksinler

Hidrojen peroksit ve lipid hidroperoksidleri azaltır. Peroksiredoksin 3, kalp, adrenal bez, karaciğer ve beyin mitokondriyelerinde yüksek oranda eksprese edilir. Peroksiredoksin 5 yüksek oranda testis de ifade edilir.

Tioredoksin Sistem

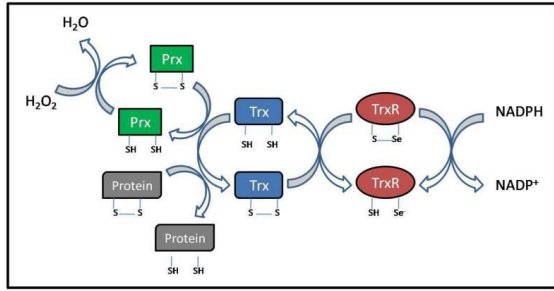
Tioredoksin sistemi, redoks aktif protein tioredoksin (Trx), enzim tioredoksin redüktaz (TrxR) ve NADPH'den oluşur.

Trx sistemi, transkripsiyon faktörlerinin redoks kontrolü, deoksiribonükleotitlerin sentezi,

hücre büyümesi ve oksidatif strese karşı koruma dahil olmak üzere birçok hücrel fonksiyonda önemli bir rol oynar^{40,41}.

İndirgenmiş Trx, peroksiredoksin (Prx) gibi oksitlenmiş hücrel proteinlerdeki disülfidlerin (S-S) indirgenmesini katalizler.

Bu süreç de Trx oksitlenir ve karşılığında NADPH kullanan tioredoksin redüktaz (TrxR) tarafından indirgenir (Şekil 3)^{40,41}.

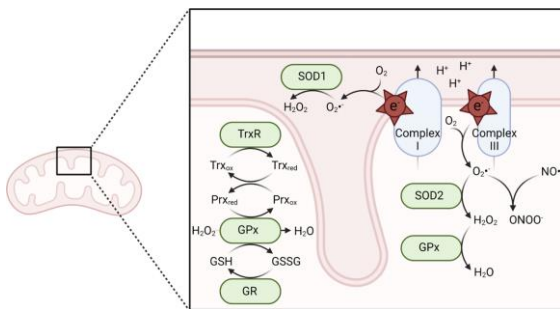


Şekil 3. Tioredoksin (Trx) redoks sisteminin etki mekanizması

Mitokondride Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu ve İnaktivasyonu

Reaktif oksijen türlerinde elektronlar, süperoksit üretmek için elektrofilik oksijen molekülleri ile tepkimeye girer. Süperoksit, mitokondriyal zarlar arası boşlukta SOD1 ve mitokondriyal matriks içinde SOD2 tarafından hidrojen peroksit'e dönüştürülür.

Hidrojen peroksit daha sonra indirgeyici bir eşdeğeri olarak NADPH kullanılarak glutatyon peroksidaz, peroksiredoksin ve tioredoksin ailesi üyeleri ile etkisiz hale getirilir. Ek olarak, nitrik oksit, peroksinitritleri oluşturmak için süperoksit ile tepkimeye girebilir (Şekil 4)^{35,36}.



Şekil 4. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve inaktivasyonu

Non-Enzimatik Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikale bir hidrojen atomu vererek serbest radikalleri nötralize eden bileşiklerdir. Serbest radikaller enzimatik

olmayan tepkimeler ile de toksik olmayan forma yani non-radikale çevrilirler.

Antioksidanlar serbest radikalleri indirger ve tepkimede kendileri okside edilir.

Enzim olmayan antioksidanlar;

- Vitamin E
- Askorbik Asit
- Karotenoidler
- Diğer Besinsel Antioksidanlar
- Endojen Antioksidanlar

Eksojen Mitokondriyal Hedefli Antioksidanlar

Mitokondriyi hedefleyen bir lipofilik trifenilfosfonyum katyonuna kovalent olarak bağlanan antioksidan bileşiklerdir.

Bu tür bileşikler şunları içerir: SOD mimetik M4043 (MitoSOD) ve tempol (MitoTempol); peroksidaz mimetik ebselen (MitoPrx); koenzim Q (MitoQ); tokoferol (MitoE)⁴².

Mitokondriyal Üretilen Reaktif Oksijen Türlerini Ölçme Yöntemleri

- MitoSOX Kırmızı floresan
- İzole mitokondri üzerinde elektron paramanyetik rezonans (EPR)
- İzole mitokondriden hidrojen peroksit akışını tespit etmek için Amplex Red⁴³

SONUÇ

Serbest radikaller normal metabolik süreçte vücutta üretilen hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda yer alan moleküllerdir. Antioksidanlar ve oksidanlar arasında bir dengesizlik olduğunda, serbest radikaller birikerek nükleik asitler, proteinler ve lipitler gibi makromoleküllerde şiddetli hasara yol açmaktadır³¹. Radikal hasarına karşı hücrel savunma mekanizmaları; savunma enzimlerini, antioksidanları ve serbest radikallerin kompartmantalizasyonunu sağlar.

Tempolu yaşam, insan vücudunda hücrelere, dokulara ve organlara zarar veren ve yaşam süresini kısaltan serbest radikallerin artmasına neden olur. Doğal veya sentetik antioksidanların optimum konsantrasyonda alımı Alzheimer, yaşlanma, kanser, karaciğer, kardiyovasküler hastalıklar gibi akut ve kronik hastalıkların önlenmesinde bir araç görevi görerek tedaviye destek olabilmektedir.

Mitokondrinin temel bileşeni olan elektron transfer zincirinde oksidatif fosforilasyon süreci, ATP üretimi ile birleştğinde reaktif oksijen türlerinin üretimi ile sonuçlanır. Reaktif

oksijen türleri sinyal yollarında önemli olduğu kadar, aşırı üretimi de hücre hasara neden olabilir. Kompleks III tarafından üretilen reaktif oksijen türleri, yalnızca matriske salınmaz, aynı zamanda zarlar arası boşluğa da salınır. Zarlar arası boşluğa salınan reaktif oksijen türleri, SOD1 tarafından katalize edilen bir tepkimede H₂O₂'ye dönüştürülebilir ve H₂O₂ mitokondriden difüze olur. Bu nedenle, Kompleks III alanında reaktif oksijen türlerinin yapay düzenlenmesi büyük önem taşır. Reaktif oksijen türlerinin üretiminin mekanizması hala belirsiz olsa da patolojik koşullar altında aşırı reaktif oksijen türlerinin üretimini azaltmak için özgül inhibitörlerinin kullanılması oksidatif stres aracılı hastalıkların tedavisine katkı sağlamaktadır.

Mitokondriyal reaktif oksijen türleri, sadece mitokondriyal solunumun yan ürünleri değildir, aynı zamanda hücre sinyalleşmesinde de önemli bir rol oynar. Mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin sinyali, hipoksiye fizyolojik yanıt veya insülin salınımının düzenlenmesi gibi birçok işlevin düzenlenmesinde yer almıştır. Mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, metabolik hastalıklar, kanser, nöronal hastalıklar ve normal yaşlanma süreci gibi birçok hastalığın patogeneze katkısında bulunan fizyolojik sinyalleşme ve mitokondriyal disfonksiyonda bozulmaya yol açar. Birçok hastalıkta mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin üretimi artar; bu nedenle, üretimlerinin düzenlenmesi umut verici bir tedavi stratejisi gibi görünmektedir.

Redoks homeostazi, reaktif oksijen türleri, lipid peroksitler ve metaller dahil olmak üzere çok çeşitli oksidanları ortadan kaldırmaktan sorumlu olan antioksidan savunma sistemi tarafından sağlanır. Hücre içi reaktif oksijen türlerinin başlıca üreticileri olan mitokondri, yaşlanma ve diğer kronik hastalıkların nedeni ile bağlantılı olduğundan, mitokondriyal yerleşimli antioksidanlar geniş çapta incelenmektedir. Mitokondri hedefli antioksidanlar, mitokondriyal fosfolipit çift katmanını geçtikleri ve kaynağın merkezindeki reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırdıkları için büyük potansiyel göstermiştir.

Fenton tepkimesi yoluyla demir aracılı oksidatif hasarın rolünü değerlendirme ihtiyacı, demir birikimi ve mitokondriyal disfonksiyonun çeşitli hastalıkların patolojik gelişimine ve ilerlemesine katkısını daha fazla belirlemede önemlidir. Antioksidanlar ve şelatlayıcı ajanlar arasındaki etkileşimler hakkında çok sınırlı

kanıt mevcuttur ve daha net açıklama, toksik olmayan, güçlü terapötik ajanların yanı sıra özgül hastalıklı dokuların yeni biyobelirteçlerinin ve oksidatif yolların aşağı akış araçlarının geliştirilmesine yol açabilir.

Redoks sinyali, kritik protein tiyollerinin geri dönüşümlü oksidasyonu yoluyla hedef proteinlerin aktivitesini düzenleyen ve böylece mitokondri, sitozol veya çekirdekdeki enzimlerin, kinazların, fosfatazların ve transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini değiştiren H₂O₂'nin serbest kaldığı mitokondride gerçekleşir. Günümüzde mitokondriyal redoks sinyali hakkında sınırlı bilgi olmamasına rağmen, bu derleme oluşan reaktif oksijen türlerinin üretiminin tanımı, nasıl meydana gelebileceğini ve hızla gelişen bu alanın araştırılmasında faydalı olacağını göstermektedir.

Etik Onay:-

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemektedir

Finansal Destek: Yok

Ethical Approval: -

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Support: None

KAYNAKLAR

1. Karbowski M. Mitochondria on guard: role of mitochondrial fusion and fission in the regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2010;687:131–42. doi: 10.1007/978-1-4419-6706-0_8.
2. Balaban, R. S., Nemoto, S. and Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120, 483–495. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.001.
3. Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 1979; 59, 527–605. doi: 10.1152/physrev.1979.59.3.527.
4. Cadenas, E. and Davies, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biol. Med.* 2000;29, 222–230. doi: 10.1016/s0891-5849(00)00317-8.
5. Raha, S. and Robinson, B. H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem.* 2000; 25, 502–508. [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01674-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01674-1).
6. Adam-Vizi, V. and Chinopoulos, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006;27, 639–645. doi: 10.1016/j.tips.2006.10.005. Epub 2006 Oct 23.
7. Muller, F. The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain. *J. Am. Aging Assoc.* 2000; 23, 227–253. <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs11357-000-0022-9>
8. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82, 47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.

9. Gürdöl F. *Tıbbi Biyokimya*, 5. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, 2021.
10. Petrucci RH. *General Chemistry: Principles and Modern Applications*, 8th ed. Macmillan Publishing Company, 2001.
11. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 7th ed, W.H. Freeman and Company, New York, 2017.
12. Oxygen Toxicity and Free Radical Injury". Marks' Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach. Smith C, Marks A, Lieberman M (ed.). 2005; 439-457.
13. Sawyer, D. T. and Valentine, J. S. How super is superoxide? *Acc. Chem. Res.* 1981;14, 393-400. <https://doi.org/10.1021/ar00072a005>
14. Phaniendra A., Jestadi DB., Periyasamy L. Free radicals. Properties, sources, targets and their implications in various diseases. *Ind J Clin Biochem*,2015; 30:11-26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.
15. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MT., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007; 39:44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
16. De Grey ADNJ. HO2: the forgotten radical. *DNA Cell Biol.* 2002;21:251-7. doi: 10.1089/104454902753759672.
17. Cerruti PA. Pro-oxidant states and tumor activation. *Science.* 1985;227:375-81. <https://doi.org/10.1126/science.2981433>.
18. Hojo Y, Okado A, Kawazoe S, Mizutani T. In vivo singlet oxygen generation in blood of chromium(VI)-treated mice an electron spin resonance spin-trapping study. *Biol Trace Elem Res.* 2000;76(1):85-93. doi: 10.1385/BTER:76:1:85.
19. Agnez-Lima LF, Melo JT, Silva AE, Oliveira AH, Timoteo AR, Lima-Bessa KM, et al. Review DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutat Res.* 2012;751(1):1-14. doi: 10.1016/j.mrrev.2011.12.005.
20. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.* 1999;43(3):521-31. doi: 10.1016/s0008-6363(99)00115-7.
21. Chiueh CC. Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;890:301-11. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb08007.x.
22. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chandhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:9265-9. doi: 10.1073/pnas.84.24.9265.
23. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radicals chemistry. *Br Med Bull.* 1993;49:481-93.
24. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001;54:176-86. doi: 10.1136/jcp.54.3.176.
25. Phaniendra A. Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *J Clin Biochem* 2014;30(1):11-26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0. Epub 2014 Jul 15.
26. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000;408:239-47. doi: 10.1038/35041687.
27. Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1147:37-52. doi: 10.1196/annals.1427.015.
28. Schrader M, Fahimi HD. Review Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763(12):1755-66. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.09.006.
29. Gross E, Sevier CS, Heldman N, Vitu E, Bentzur M, Kaiser CA, et al. Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2006;103(2):299-304.
30. Alkadi H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infect Disord Drug Targets.* 2020;20(1):16-26. doi: 10.2174/1871526518666180628124323.
31. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol (Lond)* 2003;552:335-344. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>.
32. Skulachev, V. P. *Membrane Bioenergetics*, Springer-Verlag, New York, 1988
33. Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I., and Stoppani, A. O. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977; 180, 248-257. doi: 10.1016/0003-9861(77)90035-2.
34. Kushnareva, Y., Murphy, A. N., and Andreyev, A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem. J.*, 2002;368, 545-553. <https://dx.doi.org/10.1042/BJ20021121>.
35. Liu, Y., Fiskum, G., and Schubert, D. J. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Neurochem.*, 2002;80, 780-787. doi: 10.1046/j.0022-3042.2002.00744.x
36. Andreyev A.U., et al. Mitochondrial ROS Metabolism: 10 Years Later. *Biochemistry (Moscow)*. 2015;70:200-14. <https://dx.doi.org/10.1134%2FS0006297915050028>.
37. Sturtz et al. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 2001;276:38084-38089. doi: 10.1074/jbc.M105296200.
38. Okado-Matsumoto and Fridovich. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2001;276:38388-38393. doi: 10.1074/jbc.M105395200.
39. Ursini F., Maiorino M., in *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, 2013.
40. Echtay K. Mitochondrial uncoupling proteins, what is their physiological role? *Free Radic Biol Med Sci* 2007;43:1351-1371. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.011.
41. Karlenius TC. And Tonissen KF. Thioredoxin and Cancer: A Role for Thioredoxin in all States of

- Tumor Oxygenation. *Cancers* 2010, 2, 209-232.
<https://doi.org/10.3390/cancers2020209>
42. Smith R.A.J., et al. Mitochondria-targeted antioxidants in the treatment of disease *Ann NY Acad Sci.* 2008;1147:105-111. doi: 10.1196/annals.1427.003.
 43. Mariappan N. et al. TNF-induced mitochondrial damage: a link between mitochondrial complex I activity and left ventricular dysfunction *Free Rad Biol Med.* 2009; 46:462-70. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.049.