

Elemente de metabolism integrativ

În organism, deși pot fi identificate căi metabolice distincte, acestea funcționează simultan, interdependent și coordonat. Între cele două laturi generale ale metabolismului, anabolism și catabolism, este dificil de făcut o demarcație.

Astfel, deoarece catabolismul produce ATP, echivalenți reducători și precursori simpli pentru toate sintezele din anabolism, se poate afirma fie că anabolismul este o continuare a catabolismului, fie catabolismul este o etapă inițială a anabolismului. În ambele variante este evidențiată intricarea totală a căilor metabolice.

De exemplu majoritatea căilor metabolice ce catabolizează compuși alimentari de bază (glucide, lipide, proteine) generează acetylCoA, dar acest compus este în același timp și precursorul sintezei de acizi grași, colesterol sau prostaglandine.

O caracteristică este faptul că toate căile de sinteză se desfășoară într-un singur sens, exergonic, prin cuplarea prin hidroliză a unui număr suficient de molecule ATP.

Controlul căilor metabolice se realizează în primul rând prin controlul activității enzimelor, în special a celor care catalizează prima etapă reversibilă din cadrul căii metabolice. Acest control are loc prin reglare alosterică - feed-back negativ prin produs final (reglare rapidă de la milisecunde la secunde) sau prin fosforilare-defosforilare (reglare pe o perioadă mai lungă, de la secunde la minute).

Căile de biosinteză și cele de catabolism sunt aproape întotdeauna distincte. Acest lucru se realizează prin utilizarea unor enzime diferite în cele două procese, cât și prin compartimentarea diferită (de exemplu sinteza acizilor grași are loc în citoplasmă, iar oxidarea în mitocondrie).

Există puncte cheie unde au loc joncțiuni între diferitele căi metabolice, de exemplu la nivelul glucozo-6 fosfat, acetylCoA, acid mevalonic, acid arahidonic, etc.), fapt ce permite o creștere a eficienței reglării metabolismului.

Metabolismul energetic în principalele organe

În organismele multicelulare complexe organele au evoluat în scopul realizării unei funcții fiziologice specifice. Pentru aceasta fiecare organ prezintă o serie de căi metabolice în acord cu destinația fiziologică. Această specializare depinde de coordonarea responsabilităților metabolice ale multiplelor organe astfel încât organismul să prospere ca un întreg.

Rezerva energetică majoră la animale este glicogenul din ficat și mușchi, triacilglicerolii (grăsimile) din țesutul adipos și proteinele din mușchii scheletici. În general, ordinea de utilizare preferențială a depozitelor energetice este: glicogen > triacilgliceroli > proteine.

Organ	Rezerva energetică	Substratul de bază	Sursă energetică exportată
Creier	Nu e cazul	Glucoză (corpi cetonici în infometare)	Nu e cazul
Mușchi scheletici (în repaus)	Glicogen	Acizi grași	Nu e cazul
Mușchi scheletic (în exercițiu prelungit)	Nu e cazul	Glucoză	Lactat

Mușchi cardiac	Glicogen	Acizi grași	Nu e cazul
Țesut adipos	Triacilgliceroli	Acizi grași	Acizi grași, glicerol
Ficat	Glicogen, triacilgliceroli	Aminoacizi, glucoză, acizi grași	Acizi grași, glucoză, corpi cetonici

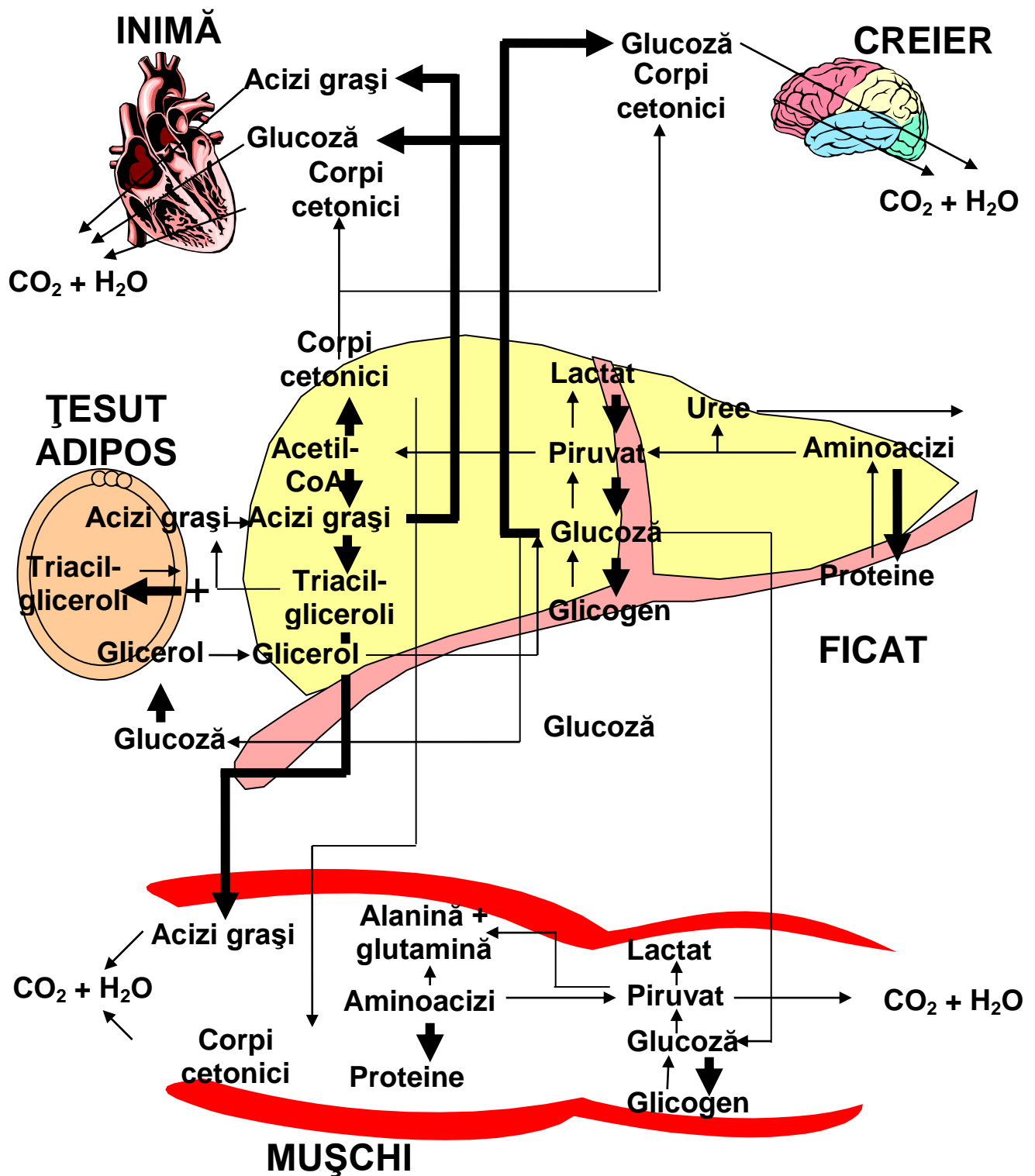


Figura 91. Relațiile metabolice între principalele organe: creier, mușchi, inimă, țesut adipos și ficat

(Cu săgețile groase sunt indicate căile metabolice active postprandial precoce)

A. Creierul

Creierul prezintă două caracteristici metabolice remarcabile. Prima caracteristică se referă la metabolismul respirator foarte ridicat. În repaus, la adult, aproximativ 20% din oxigenul consumat este utilizat de creier deși acesta constituie numai 2% din masa organismului. Interesant este faptul că nivelul consumului de oxigen nu este influențat de activitatea intelectuală, continuând și în timpul somnului. În al doilea rând creierul este un organ care nu prezintă rezerve energetice semnificative. În mod normal creierul utilizează numai glucoza ca sursă energetică (120 g/zi), devenind astfel total dependent de asigurarea unui flux sanguin adecvat. Întreruperea alimentării cu glucoză chiar pentru o scurtă perioadă (de exemplu în atac cerebral) poate conduce la pierderea ireversibilă a funcției creierului. Glucoza este utilizată de creier pentru sinteza ATP prin respirație celulară. Cantitatea mare de ATP este necesară pompei Na^+/K^+ -ATPază care asigură potențialul de membrană esențial transmiterii impulsului nervos.

În timpul înfometării prelungite rezervele energetice de glicogen ale organismului se epuizează. În aceste condiții, creierul începe să utilizeze ca sursă de energie β -hidroxibutiratul (corp cetonc), transformându-l în acetil-CoA care mai departe este transformat prin ciclul citric. Deși creierul nu poate utiliza direct acizii grași sau lipidele din sânge ca sursă de energie, conversia acestor substanțe în β -hidroxibutirat în ficat asigură folosirea rezervelor de lipide ca sursă de energie pentru creier. Această adaptare energetică funcționează până la epuizarea în totalitate a rezervelor de lipide.

B. Mușchiul

Mușchii scheletici sunt responsabili pentru consumul a 30% din cantitatea de oxigen folosită de corpul uman în repaus. În timpul exercițiului fizic intens, procentul de oxigen utilizat se apropie de 90% din total. Metabolismul muscular este în principal dedicat producției de ATP ca sursă de energie pentru contracție și relaxare musculară. Cantitatea de energie sub formă de ATP consumată în timpul relaxării este aproximativ egală cu cea consumată în timpul contracției musculare.

Deoarece contracția musculară este un proces intermitent ce apare la cerere, metabolismul muscular s-a adaptat pentru a răspunde solicitărilor tranzitorii. În repaus mușchiul utilizează acizi grași liberi, glucoză sau corpi cetonici ca sursă de energie producând ATP prin fosforilare oxidativă. Mușchiul în repaus are o rezervă de aproximativ 2% glicogen și o cantitate de fosfocreatină care asigură suficient ATP pentru 4 secunde de exercițiu fizic. În timpul unei activități fizice extenuante, ca de exemplu un sprint de 100 m, după ce fosfocreatina este consumată, mușchiul depinde numai de rezervele de glicogen, obținând ATP prin glicoliză. Spre deosebire de ciclul citric și de fosforilarea oxidativă, glicoliza este capabilă de o creștere explozivă a activității astfel că fluxul de glucozo-6-fosfat prin această cale poate crește de 2000 de ori practic instantaneu! Declanșatorul acestei activări este Ca^{2+} și adrenalina.

Oboseala musculară reprezintă incapacitatea musculară de a menține lucrul mecanic efectuat. În timpul unei activități musculare extenuante oboseala apare după aproximativ 20 s. Oboseala nu este consecința consumării rezervelor de glicogen sau a acumulării de lactat, ci se datorează scăderii pH-ului muscular pe măsură ce protonii sunt generați prin glicoliză. Scăderea pH-ului determină o

scădere a activității fosfofructokinazei deci o reducere a fluxului de hexoze în glicoliză și în consecință instalarea oboselii. Inhibiția fosfofructokinazei are rolul de a salva rezervele de ATP și de a evita astfel consecințele mult mai grave ale epuizării rezervelor de ATP. În timpul exercițiilor excesive sau a postului, proteinele din mușchii scheletici se hidrolizează în aminoacizi al căror schelet hidrocarbonat este utilizat ca sursă de energie.

Cea mai mare parte din scheletele hidrocarbonate sunt convertite în piruvat, care este transaminat în alanină, care este exportată în circulație. Alanina este transportată în ficat, unde este transaminată înapoi în piruvat, care servește ca substrat pentru gluconeogeneză. Deși proteinele musculare pot fi folosite ca sursă de energie, această soluție nu este una economică pentru organism și din acest motiv este folosită numai ca soluție extremă.

C. Inima

În contrast cu lucrul mecanic intermitent efectuat de mușchii scheletici, miocardul prezintă o activitate constantă și ritmică. Inima funcționează ca un organ exclusiv aerob, foarte bogat în mitocondrii. Din acest motiv, orice tulburare care afectează aprovizionarea cu oxigen a miocitelor va afecta și funcționalitatea acestora. Aproximativ jumătate din volumul citoplasmic al unei celule musculare este ocupat de mitocondrii. Din totalul energiei obținute în miocard, circa 60-70% este utilizată în contracție, în timp ce restul susține activitatea pompelor de calciu, sodiu și potasiu.

În condiții normale, inima preferă acizii grași ca sursă de energie, oxidând acetilCoA în ciclul citric și producând ATP necesar contracției musculare prin fosforilare oxidativă. Țesutul cardiac are rezerve energetice minime: o cantitate redusă de fosfocreatină și glicogen. În consecință, miocardul trebuie hrănit continuu cu oxigen, acizi grași liberi, glucoză sau corpi cetonici.

În cazul insuficienței cardiace se consideră că defectele la nivelul metabolismului energetic reprezintă un factor important ce determină progresia bolii. În miocite, calciul și energia sunt profund intricati, astfel că tulburarea unuia îl va afecta și pe cel de-al doilea. Reducerea energiei va antrena scăderea eficienței în captarea și eliberarea calciului, acest lucru afectând contractilitatea miocardului. Ca urmare, îmbunătățirea terapeutică a energiei celulare va ameliora și circuitul calciului.

Deși terapia inotropică îmbunătățește pe moment simptomele, pe termen lung s-a dovedit dăunătoare, deoarece creștea necesarul de energie, în condițiile de deficit a acesteia. În schimb, terapia care are ca efect reducerea necesarului de energie, cum ar fi terapia cu inhibitori ai enzimei de conversie, inhibitori ai receptorilor beta-adrenergici sau diuretice, s-a dovedit cea mai bună opțiune terapeutică pentru creșterea timpului de supraviețuire.

De asemenea agenții terapeutici care trec energetica miocitelor de pe acizii grași pe glucoză s-au dovedit de asemenea o bună opțiune terapeutică. Astfel, administrarea de glucoză cu insulină oferă utilizarea alternativă și rapidă a glucozei, administrarea de beta blocanți reduce consumul de energie și lipoliza, iar inhibitorii căilor metabolice de transport și oxidare a acizilor grași ca perhexiline, trimetazidine, ranolazine și etomoxir reduce utilizarea acizilor grași ca substrat energetic. Explicația fenomenului se datorește coeficientului de utilizare al oxigenului care este de 0,7 pentru acizii grași și de 1 pentru glucoză. În condițiile reducerii fluxului de oxigen, utilizarea cât mai eficientă a acestuia devine o condiție obligatorie.

D. Țesutul adipos

Aproximativ 65% din masa țesutului adipos este constituită din triacilgliceroli depozitați în adipocite. Un adult normal de 70 kg prezintă o rezervă energetică sub formă de grăsimi suficientă pentru a asigura producția energetică pentru 3 luni în condițiile în care nu apar deficiențe minerale sau vitaminice.

În ciuda rolului de rezervor energetic, adipocitele prezintă o rată metabolică mare, sintetizând și degradând triacilglicerolii astfel încât în medie timpul de viață pentru o moleculă este de câteva zile. Adipocitele transformă glucoza în energie prin glicoliză, ciclul citric și fosforilare oxidativă. În cazul în care cantitatea de glucoză este mare, aceasta este convertită în acetylCoA necesar sintezei de acizi grași. În mod normal însă acizii grași liberi necesari sintezei de triacilgliceroli sunt obținuți de la ficat.

Deoarece adipocitelor le lipsește glicerolkinaza, ele nu pot recircula glicerolul din triacilgliceroli și depind de conversia glicolitică a glucozei în dihidroxi aceton fosfat și reducerea acestuia în glicerol-3-fosfat necesar biosintezei de triacilgliceroli. Glucoza joacă un rol central în adipocite. Dacă nivelul glucozei este adecvat, prin glicoliză se obține glicerol-3-fosfat iar acizii grași liberi proveniți din degradarea triacilglicerolilor sunt re-esterificați cu glicerolul pentru a forma noi cantități de triacilgliceroli. Dacă nivelul de glucoză este scăzut, se reduce și cantitatea de glicerol-3-fosfat și acizii grași liberi sunt descărcați în circulația sanguină.

Leptina (din grecescul *lepto*-subțire) este o proteină de 16 kDa (146 resturi aminoacidice) produsă în principal de adipocite. Această proteină injectată zilnic la șoarecii obezi determină o reducere a cantității de hrană ingerată și a masei corporale cu aproximativ 40% într-o lună. În mod normal, pe măsură ce depozitele de grăsimi în adipocite cresc, cantitatea de leptină produsă crește considerabil, fiind eliberată în cantitate din ce în ce mai mare în sânge. Nivelul sanguin de leptină semnalizează sistemului nervos central nivelul triacilglicerolilor din adipocite declanșând modificări ale apetitului. Dacă nivelul de leptină în sânge este scăzut apetitul crește și invers.

Organismele care suferă de obezitate sunt fie deficitare în producția de leptină, fie sunt rezistente la acțiunea proteinei. Receptorii leptinici sunt localizați în hipotalamus, iar legarea de receptorii corespunzători inhibă eliberarea hipotalamică a neuropeptidei Y, o substanță orexică (care stimulează apetitul), astfel leptina acționând ca un agent anorexig.

E. Ficatul

Ficatul constituie un organ central de procesare metabolică. Cu excepția triacilglicerolilor, care sunt metabolizați în principal în țesutul adipos, cea mai mare parte a nutrienților care vin din tractul intestinal sunt transportați prin circulația portală în ficat unde sunt procesați și distribuiți.

Cea mai mare parte a activității hepatice constă în conversia glucozo-6-fosfatului care este transformat în glicogen, eliberat sub formă de glucoză în sânge, utilizat pentru generarea de NADPH și pentozei prin calea pentozofosfaților, catabolizat în acetylCoA necesar sintezei de acizi grași sau obținerii de energie prin fosforilare oxidativă.

Cea mai mare parte din glucozo-6-fosfatul hepatic provine din glucidele alimentare, din degradarea rezervelor de glicogen sau din lactatul muscular care intră în gluconeogeneză. Ficatul joacă un rol central în reglarea metabolismului prin menținerea glicemiei. Țesutul hepatic prezintă două enzime pentru fosforilarea

glucozei: hexokinaza și glucokinaza. Spre deosebire de hexokinază, glucokinaza prezintă o afinitate mică pentru glucoză (K_M destul de ridicat, în jur de 10mM). Atunci când glicemia este ridicată activitatea glucokinazei crește fosforilarea glucozei prin hexokinază, etapa inițială ce conduce la formarea depozitelor de glicogen. Adrenalina, glucagonul și insulina influențează metabolismul glucozei în ficat menținând nivelul glicemiei relativ constant.

Ficatul constituie elementul central al turnoverului acizilor grași. Atunci când necesarul energetic este crescut, triacilglicerolii sunt scindați în acizi grași care sunt catabolizați în ficat la acetylCoA pentru a forma corpi cetonici, exportati la inimă, creier și alte țesuturi. În cazul în care cererea energetică este scăzută, acizii grași sunt încorporați în triacilgliceroli care sunt transportați la țesutul adipos și depozitați ca substrat de rezervă. Colesterolul este de asemenea sintetizat în ficat pornind de la acetylCoA.

Ficatul poate utiliza și aminoacizii ca sursă energetică prin conversia acestora în α -cetoacizi prin acțiunea aminotransferazelor. Gruparea amino este transformată în uree prin ciclul ureogenetic, iar scheletul hidrocarbonat al aminoacizilor glucogenici poate fi utilizat pentru sinteza glucozei, în timp ce aminoacizii cetonici produc corpi cetonici.

Țesutul hepatic este de asemenea principalul organ responsabil de detoxifierea organismului. Reticulul endoplasmic al hepatocitului este bogat în enzime care convertesc, prin hidroxilare și conjugare cu acid glucuronic, substanțele exogene, ca de exemplu medicamentele, substanțele toxice, în produși mai puțin toxici care se pot elimina pe cale urinară sau biliară.

METABOLISMUL RADICALILOR LIBERI

În condiții fiziologice, oxigenul, indispensabil vieții, este utilizat în organism în respirația celulară, apărare, dezvoltare embrionară, detoxifiere, etc. În cursul acestor procese, un procent redus, care crește cu vârsta, este transformat în forme nefiziologice, toxice pentru organism cunoscute sub denumirea generică de **specii reactive ale oxigenului sau radicali liberi**. Procesul este intens în special la nivel mitocondrial ca urmare a proceselor redox din respirația celulară. Aceste forme toxice sunt capabile să reacționeze, în mediul în care sunt produse, cu o gamă largă de substraturi biologice (lipide, proteine, ADN, glucoză) generând compuși toxici.

Pentru protecția împotriva acestui efect toxic al speciilor reactive ale oxigenului, organismul a dezvoltat sisteme de apărare care neutralizează aceste substanțe.

Speciile reactive ale oxigenului (ROS - Reactive Oxygen Species) sunt generate de asemenea, de factorii oxidanți din mediul înconjurător: poluarea cu diverse substanțe chimice, alcoolul, radiațiile ultraviolete, fumatul. Pe lângă acestea, dieta săracă în vitamine, în special vitamina A, C și E nu aduce un aport suficient de antioxidanți naturali necesari controlului efectelor nocive ale oxigenului.

În general, *stresul oxidativ este definit ca rezultatul dezechilibrului dintre oxidanți și antioxidanți, având ca rezultat leziuni celulare (adesea ireversibile)*.

Fiecare individ în parte are o anumită capacitate de a neutraliza speciile reactive, capacitate determinată de stilul de viață și de moștenirea genetică. Evaluarea stresului oxidativ concomitent cu capacitatea individului de a contracara efectele acestuia devine o prioritate în prevenirea unor boli deoarece există o legătură strânsă între alterarea sistemului de apărare antioxidantă al organismului și dezvoltarea a numeroase boli, cum ar fi ateroscleroza, cancerul, SIDA, bolile degenerative, diabetul și chiar procesul de îmbătrânire.

Oxigenul - element cheie în obținerea energiei

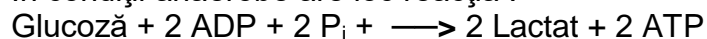
În stadiile originare, pământul a fost anoxic, iar primele organisme, bacterii, aveau un metabolism anaerob.

Oxigenul va apare mai tarziu, acum 2,5 miliarde de ani. Apariția oxigenului poate fi considerată ca fiind evenimentul hotărâtor ce a determinat evoluția vieții pe pământ.

Utilizarea oxigenului ca agent oxidant a realizat oxidarea completa a substratelor organice, cu eliberarea unor cantități mari de energie, ce au putut constitui suportul energetic a unor procese fiziologice din ce în ce mai complexe.

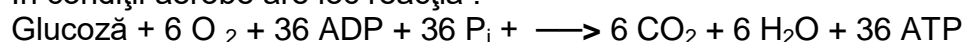
O ilustrare a saltului energetic o constituie oxidarea glucozei, în cele 2 variante, aerobă și anaerobă.

În condiții anaerobe are loc reacția :



Glucoza este oxidată la acid lactic, eliberându-se 47 kcal/mol din cele 686 kcal/mol conținute în molecula de glucoză, randamentul energetic fiind de $47 \times 100 / 686 = 7\%$.

În condiții aerobe are loc reacția :



Glucoza este oxidată complet la CO_2 și H_2O , eliberându-se astfel 100% din energia conținută.

Se constată o creștere a randamentului de eliberare a energiei chimice conținută în substrat (glucoză) de 16 ori.

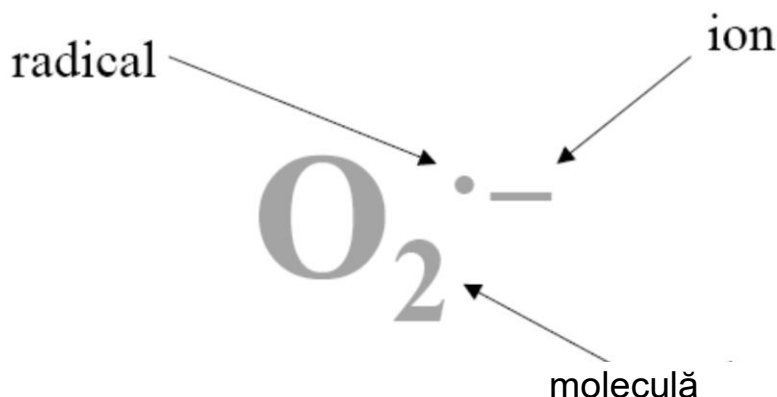
Pentru a obține acest surplus energetic, organismele au trebuit să facă față agresivității acestui agent oxidant deosebit care este oxigenul. În acest sens au dezvoltat structuri specializate ca hemoglobina, mioglobina, citocromii pentru transportul și utilizarea oxigenului.

S-a realizat o compartimentare a utilizării oxigenului în organite specializate ca mitocondrie, lizozomi, peroxizomi.

S-au realizat sisteme de control și corelare complexe și integrate prin care oxigenul să fie utilizat strict în funcție de necesități, evitându-se astfel orice cantitate excedentară de oxigen sau derivați care în aceste condiții ar ataca structurile organismului. Pentru neutralizarea acestora s-au creat sisteme specializate, cu acțiune antioxidantă, de tip enzimatic (catalaze, peroxidaze, dismutaze) sau neenzimatic (acid ascorbic, tocoferoli, glutatation, cisteină etc).

Radicali liberi și specii reactive ale oxigenului

Radicalii liberi reprezintă orice specie chimică (moleculă, atom sau ion) capabilă să existe în mod independent și care conțin cel puțin un electron neîmperecheat pe un orbital exterior.



În general radicalii liberi sunt chimic instabili, reacționând ușor cu alte molecule. Reacțiile în care sunt implicați radicalii liberi sunt autocatalitice, deoarece moleculele care reacționează cu radicalii liberi devin la rândul lor radicali liberi care inițiază noi reacții ce vor forma alți radicali liberi s.a.m.d.

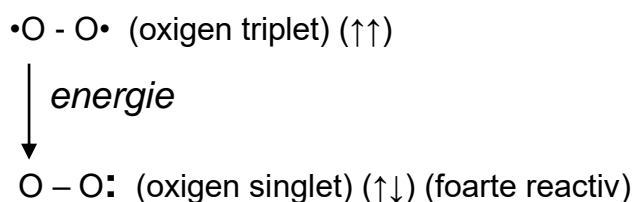
Oxigenul este un radical deoarece are 2 electroni neîmperecheați, ceea ce îi conferă reactivitate sporită. Cei 2 electroni neîmperecheați ai O atomic au spini paraleli, ceea ce înseamnă că oxigenul poate oxida alte molecule acceptând o pereche de electroni care au spin antiparalel astfel încât să ocupe cei doi orbitali cu un singur electron de pe oxigen.

În organism oxigenul se găsește sub mai multe forme printre care unele sunt specii reactive sub formă de radicali liberi.

Oxigenul triplet (oxigenul atmosferic)	$\cdot \text{O} - \text{O} \cdot$
Oxigenul singlet	$\text{O} - \text{O} :$
Oxigenul superoxid	$\cdot \text{O} - \text{O} :$
Radicalul perhidroxil	$\cdot \text{O} - \text{O} : \text{H}$
Apa oxigenată	$\text{H} : \text{O} - \text{O} : \text{H}$
Radicalul hidroxil	$\text{H} : \text{O} \cdot$
Ionul hidroxil	$\text{H} : \text{O} :$
Apa	$\text{H} : \text{O} : \text{H}$

Oxigenul triplet (prescurtat $^3\text{O}_2$) este forma sub care se găsește oxigenul atmosferic. Este un diradical pentru că el conține doi electroni neîmperecheați - fapt dovedit de paramagnetismul său. În această formă, electronii neîmperecheați de pe ultimul strat au spini paraleli ($\uparrow\uparrow$). Astfel, oxigenul triplet nu este foarte reactiv deoarece această dispoziție a electronilor nu îi permite să reacționeze cu majoritatea moleculelor. Dacă oxigenul triplet absoarbe suficientă energie, el se va transforma în oxigen singlet.

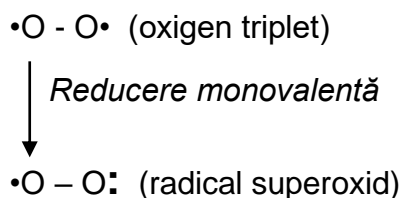
Oxigenul singlet (prescurtat $^1\text{O}_2^*$) conține o pereche de electroni cu spin opus ($\uparrow\downarrow$). Acesta, deși nu este un radical liber, este foarte reactiv.



Reacția mai poate fi scrisă și sub forma:



Radicalul superoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$) poate fi obținut din oxigenul triplet prin acceptarea unui electron. Acest proces de acceptare a unui electron poartă numele de *reducere*, iar în acest caz putem vorbi de o reducere „monovalentă” deoarece doar un singur electron este implicat. Rezultatul reducerii monovalente a oxigenului triplet este radicalul superoxid ce prezintă o încărcătură negativă.



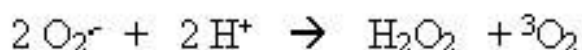
Reacția mai poate fi scrisă sub forma:



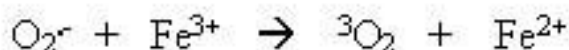
Radicalul superoxid poate juca rol de agent oxidant (acceptând electroni) sau de agent reducător (cedând electroni). Totuși, superoxidul nu este cel mai reactiv radical din sistemele biologice și nu determină de unul singur leziuni.

Efectul său nociv constă în faptul că el este precursor pentru numeroase molecule reactive cum ar fi oxigenul singlet, radicalul hidroxil și apa oxigenată.

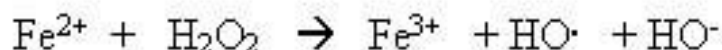
Superoxidul poate reacționa cu el însuși generând *apă oxigenată* și *oxigen triplet*, reacție care poartă numele de dismutare. Această reacție poate avea loc spontan sau sub acțiunea enzimei **superoxid dismutaza** (SOD).



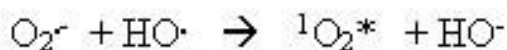
Atunci când superoxidul acționează ca și agent reducător, el va genera radicalul hidroxil (HO^\bullet). Această reacție are loc prin reducerea unui ion metalic (de exemplu, ionul Fe^{3+}) care va converti apa oxigenată în *radical hidroxil*.



Metalul redus (de exemplu, Fe^{2+}) intervine în ruperea legăturii O–O din apa oxigenată cu producerea unui *radical hidroxil* și a unui *ion hidroxil*



Superoxidul poate reacționa și cu radicalul hidroxil cu formarea *oxigenului singlet*



În organism, rolul radicalului superoxid și a moleculelor derivate din el este în primul rând de protecție împotriva microorganismelor.

Apa oxigenată (H_2O_2) este produsă în special din radicalul superoxid prin reducere monovalentă. Prin această reducere ia naștere ionul peroxid (O_2^{-2}) având o încărcătură negativă, dar care în sistemele biologice este neutralizată de către doi protoni formând peroxidul de hidrogen (apa oxigenată, H_2O_2).



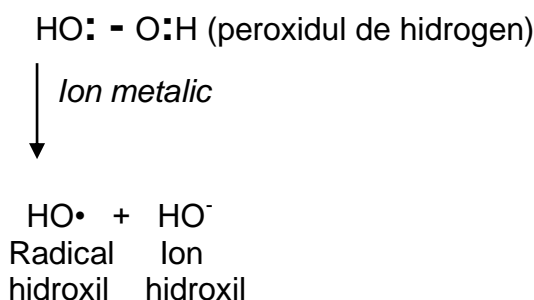
Reducere monovalentă



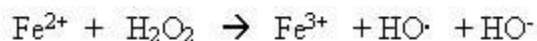
Apa oxigenată poate trece rapid prin membranele celulare. Ca și radicalul superoxid, ea nu este o substanță foarte reactivă dar efectul său nociv se manifestă prin generarea radicalului hidroxil.

Radicalul hidroxil ($\text{HO}\bullet$) este cea mai reactivă specie. El reacționează cu orice moleculă. Poate extrage atomul de hidrogen generând un alt radical liber.

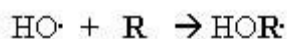
Apa oxigenată în prezența ionilor metalici este convertită în radicalul hidroxil ($\text{HO}\bullet$) și *ionul hidroxil* (HO^-). Ionul metalic este necesar pentru a desface legătura O-O din structura peroxidului de hidrogen. Această reacție poartă numele de reacția Fenton și poate fi catalizată la nivel celular de către fier, cupru sau alte metale prezente aici.



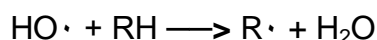
Această reacție mai poate fi scrisă (cu fierul ca și ion metalic):



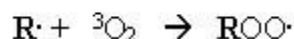
La fel ca și apa oxigenată, radicalul hidroxil trece prin membranele celulare. În prezența unui substrat organic ce conține o catenă de carbon ca de exemplu, în cazul acizilor grași, (reprezentată prin R în exemplul nostru), formează un compus hidroxilat care este el însuși un radical.



Radicalul hidroxil poate de asemenea, să oxideze substratul organic prin extragerea unui electron.



Substratul oxidat rezultat este el însuși un radical și poate reacționa cu o altă moleculă printr-o reacție în lanț. Reacția are loc cel mai adesea cu oxigenul triplet generând **radicalul peroxil** ($\text{ROO}\bullet$).



Radicalul peroxil este la rândul lui foarte reactiv și va reactiona cu un alt substrat organic tot printr-o reacție în lanț.



Acest tip de reacție în lanț este caracteristică alterării oxidative a acizilor grași și a altor lipide. Modificări similare apar și în cazul proteinelor și a acizilor nucleici (în special a ADN-ului).

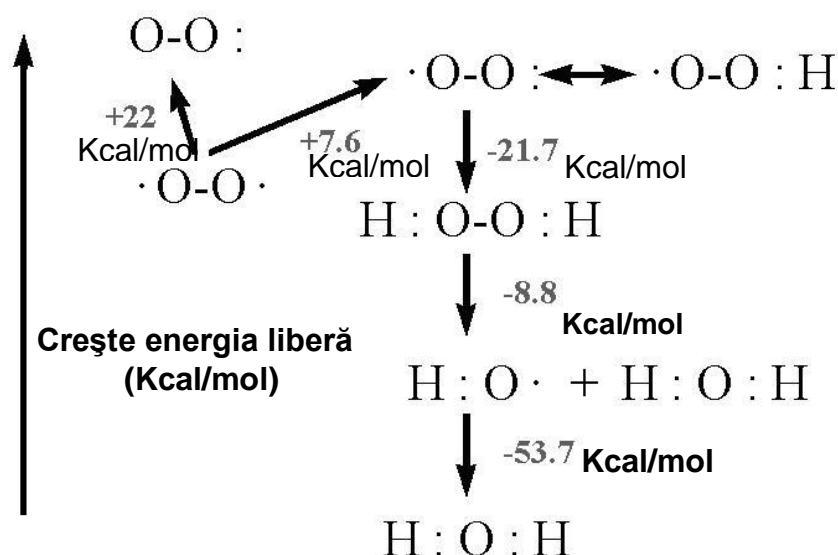


Figura 92. Formarea speciilor reactive ale oxigenului

VII.3. Surse de radicali liberi ai oxigenului in organism (ROS)

În organismul uman contactul permanent cu oxigenul, element deosebit de agresiv, generează permanent radicali liberi ai oxigenului. De exemplu, fiecare inspirație generează la nivelul plămânului peste 1 miliard de molecule ROS.

Atunci când ROS sunt produse în cantități excesive, generează leziuni celulare majore ce induc apoptoza celulară.

Principalele surse de ROS:

1. **Lanțul respirator** joacă un rol cheie la nivel celular, el fiind responsabil de conversia a oxigenului în două molecule de apă. Această reacție de reducere directă cu participarea a 4 electroni este posibilă datorită unui sistem complex de proteine, enzime, citocromi localizate la nivelul membranei interne a mitocondrii.

În cazul procesului, 0,4-4% din oxigen evoluează spre ROS.

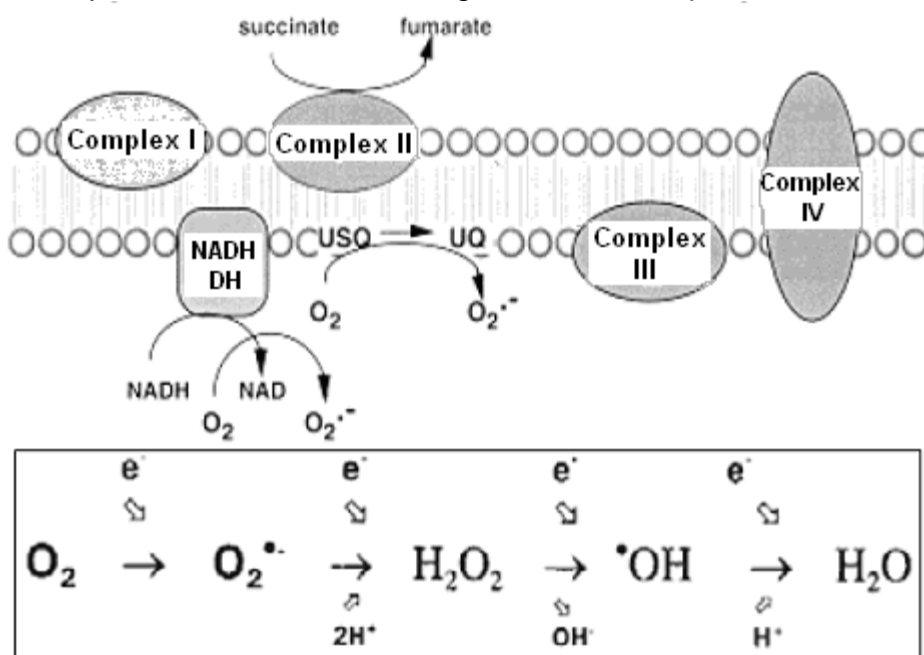


Figura 93. Lanțul respirator și transformarea O_2 în ROS

2. Enzime ce contribuie la producerea de $O_2^{\bullet-}$. Cel mai bine studiată este **xantin oxidaza**, enzimă ce oxidează bazele azotate din acizii nucleici la acid uric și apă oxigenată, prezentă atât în plasmă cât și legată de glicozaminoglicani în peretele arterial.

3. La nivelul neutrofilelor, în procesul fagocitozei, sursa majoră de $O_2^{\bullet-}$ este un complex enzimatic denumit **NAD(P)H oxidază**. Acest complex produce o eliberare rapidă și masivă de $O_2^{\bullet-}$. Mutațiile genetice ale componentelor complexului se întâlnesc în granulomatoza cronică caracterizată prin producerea de infecții repetate. ROS pot fi generați de celulele imune (**neutrofile**) care fagocitează bacteriile sau alte substanțe străine. După fagocitare, în neutrofile se intensifica procesele oxidative, crește cantitatea de oxigen consumat, având ca rezultat producerea de cantități crescute de superoxid și peroxid de hidrogen folosite pentru distrugerea bacteriilor fagocitate.

Anticorprii pot genera ROS, atunci când se leagă de antigen. Sunt peste 100 de tipuri de anticorpi care generează peroxid de hidrogen, în timpul reacției dintre oxigenul singlet (generat de neutrofilele fagocitare în cadrul proceselor oxidative) și apă.

Reacția este:



Anticorprii nu produc doar H_2O_2 ci și ozon (O_3). Ozonul este folosit pentru a distruge antigenii, dar în același timp intervine și ca agent declanșator în procesul inflamator. Anticorprii, în prezența oxigenului singlet pot distruge antigenele chiar și în absența celulelor imune sau a altor proteine (cum ar fi proteinele complement).

Creșterea ROS în sepsis are importanță fiziopatologică, iar antioxidanții reduc leziunile pulmonare și îmbunătățesc hemodinamica. Pacienții cu sepsis care au o capacitate antioxidantă normală în plasmă prezintă un potențial de supraviețuire crescut.

4. Unele enzime metabolice active generează ion superoxid $O_2^{\bullet-}$ ca parte a funcției lor normale sau atunci când există un substrat necorespunzător. De exemplu, **enzimele citocromului P450** pot produce $O_2^{\bullet-}$ atunci când acționează în cadrul procesului de detoxifiere, asupra diferitelor substraturi.

1. **Ciclooxigenaza** poate genera, de asemenea, $O_2^{\bullet-}$ ca parte a metabolismului acidului arahidonic, în cadrul căruia se produc agenți implicați în procesul inflamator ca prostaglandine, tromboxani, leucotriene.

2. $O_2^{\bullet-}$ poate fi produs în prezența O_2 prin **autooxidarea unor molecule** cum ar fi gliceraldehida, FMNH₂, FADH₂, adrenalina, noradrenalina, dopamina și a moleculelor care conțin grupări tiol, cum ar fi cisteina.

Factori ce contribuie la creșterea stresului oxidativ

În vivo, unele sisteme biochimice pot determina creșterea producției ROS. Alterarea transportului electronilor în mitocondrie este prima cauză a creșterii stresului oxidativ.

Acest lucru se întâmplă în procesul de îmbătrânire și în situațiile de ischemie-reperfuzie.

O sursă importantă de ROS este reprezentată de activarea leucocitelor. Atunci când o substanță străină pătrunde în organism, aceste celule trec dintr-o stare de repaus la una activată, având ca și consecință o creștere a consumului de oxigen cu 400%. Diverse sisteme enzimatice transformă o parte din oxigen în ROS care atacă țesuturile sănătoase, acest fenomen numindu-se inflamație. Alte mecanisme contribuie și ele la producția masivă de ROS: activarea xantin oxidazei, oxidarea hemoglobinei, eliberarea de fier liber, activarea metabolismului prostaglandinelor și activarea celulelor endoteliale.

Atât factorii de mediu cât și stilul de viață pot cauza creșterea nivelului stresului oxidativ în organism. Acești factori sunt:

- expunerea prelungită la soare;
- expunerea la radiații;
- contactul cu agenți carcinogeni (de exemplu, azbestul);
- fumatul;
- medicație contraceptivă;
- exerciții fizice excesive sau incorect executate;
- consum excesiv de alcool;
- stres intelectual;
- șoc termic;
- poluarea;
- agenții infecțioși, etc.
- dieta dezechilibrată reprezintă un factor major de stres oxidativ. Fructele și legumele sunt principalii constituenți ai rației alimentare care conțin antioxidanți, fiind bogate în vitamine (A, C, E), oligoelemente și polifenoli. În contrast, consumul regulat de alimente tip fast-food, în special la persoanele tinere, aduce un aport scăzut de substanțe antioxidante.

Modificări oxidative ale ROS asupra componentelor celulare

Datorită reactivității lor crescute, radicalii liberi au fost implicați în etiopatologia a numeroase afecțiuni.

Componentele celulare țintă pentru acțiunea radicalilor liberi includ ADN-ul, proteinele și lipidele (lipoproteinele cu densitate mică).

VII.5.1. Modificarea oxidativă a ADN

Cel mai reactiv dintre toți radicalii liberi ai oxigenului este OH^\cdot , care reacționează rapid cu deoxiriboza și bazele ADN.

Acțiunea asupra deoxiribozei:

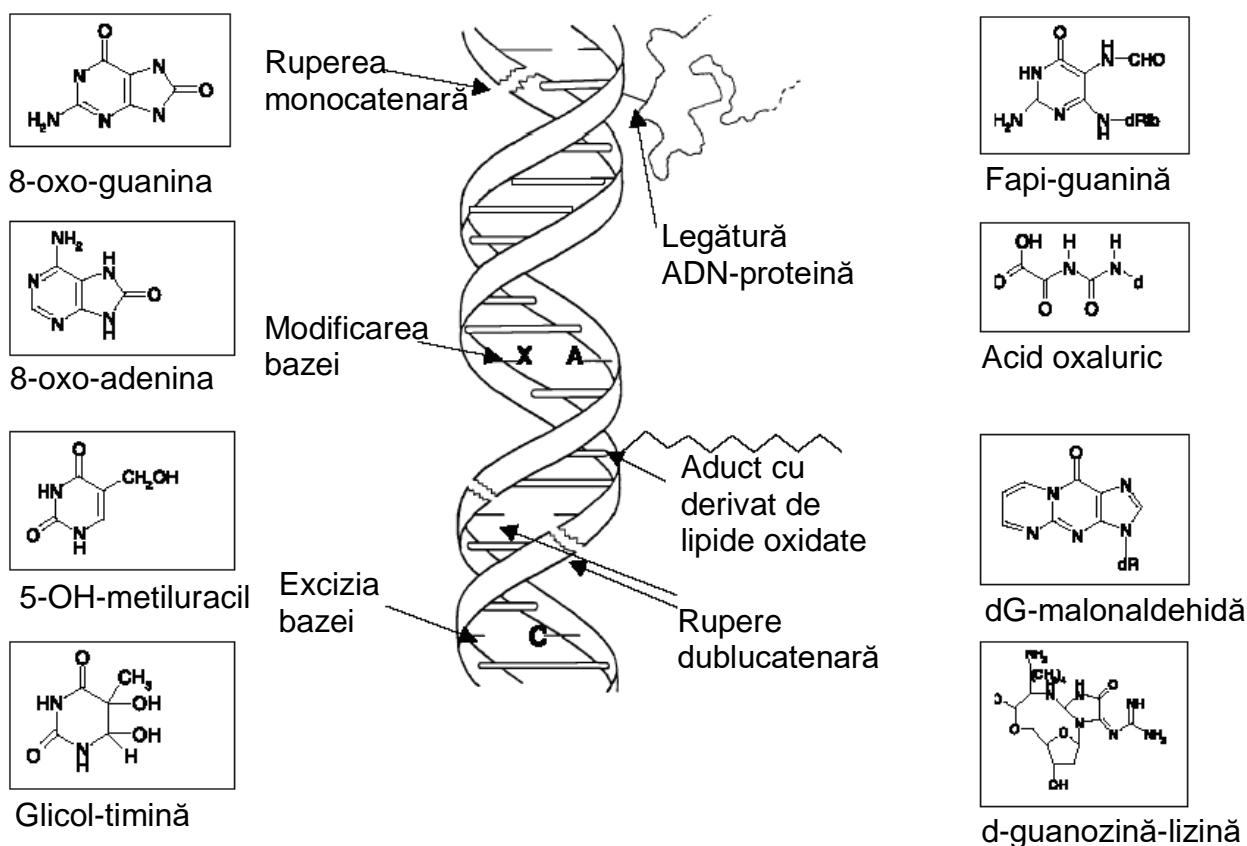
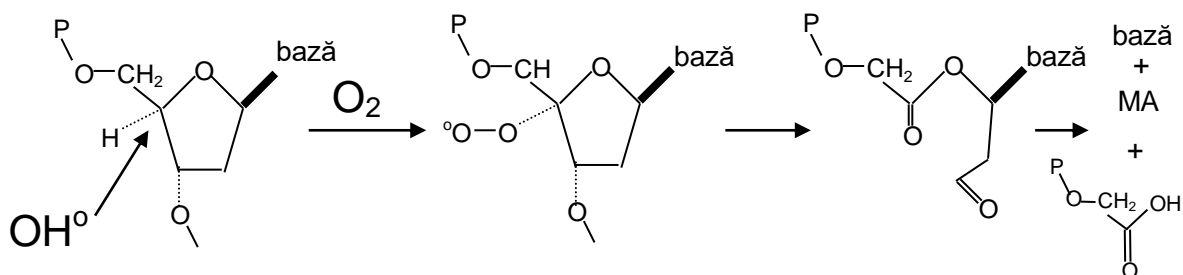


Figura 94. Acțiunea ROS asupra acizilor nucleici

ADN-ul mitocondrial este mai susceptibil la oxidare decât ADN-ul nuclear. Mitocondriile umane au propriul lor genom (16,5 kb, comparativ cu genomul nuclear, de 3 Gb) care codifică 13 subunități proteice implicate în respirație, 22 tRNA_s și 2 RNA_s ribozomali (mitocondria este un vestigiu al unei bacterii care a invadat o celulă primitivă și a stabilit o relație simbiotică cu celula). Mitocondria reprezintă ținta majoră de acțiune a speciilor reactive ale oxigenului în țesuturile îmbătrânite. Există o corelație inversă între ADN-ul mitocondrial oxidat și durata de viață a unui organism, în timp ce această corelație nu se observă la ADN-ul nuclear. ADN-ul nuclear este protejat de stressul oxidativ prin legarea de proteine de tip histonă, iar leziunile ADN sunt reparate de enzime specifice ce acționează permanent (atât proteinele de tip histonă cât și enzimele reparatorii lipsesc mitocondriilor).

Creșterea ratei de deteriorare a ADN și reducerea capacității de reparare a ADN-ului pot accelera viteza procesului de îmbătrânire, scăzând durata vieții.

Speciile reactive ale oxigenului sunt cunoscute a fi implicate în diferite mecanisme pro- și anticarcinogene. Examinarea tumorilor vezicale și pulmonare primare au arătat o frecvență crescută a mutațiilor ADN mitocondriale.

Doi produși de reacție ai OH^\bullet cu ADN servesc la cuantificarea deteriorării ADN-ului: **glicol timina și 8-hidroxideoxiguanina**. Aceste baze modificate sunt eliminate de către enzimele reparatorii ale ADN.

Modificările oxidative ale proteinelor

Radicalii liberi ai oxigenului pot altera structura și funcția proteinelor. Se modifica preferential catenele laterale ale resturilor următorilor aminoacizi: metionina, valina, histidina, arginina, lizina, fenilalanina, tirozina, cisteina. Dintre aceștia:

- metionina este transformată în metionină-sulfoxid;
- oxidarea Phe duce la formarea de o- și m- tirozină, iar oxidarea Tyr duce la formarea ditirozinei;
- cisteina oxidată la gruparea -SH se transformă în cistină.

La nivelul întregii proteine se produce o creștere a susceptibilității la proteoliză (schimbarea conformației facilitează acțiunea proteazelor).

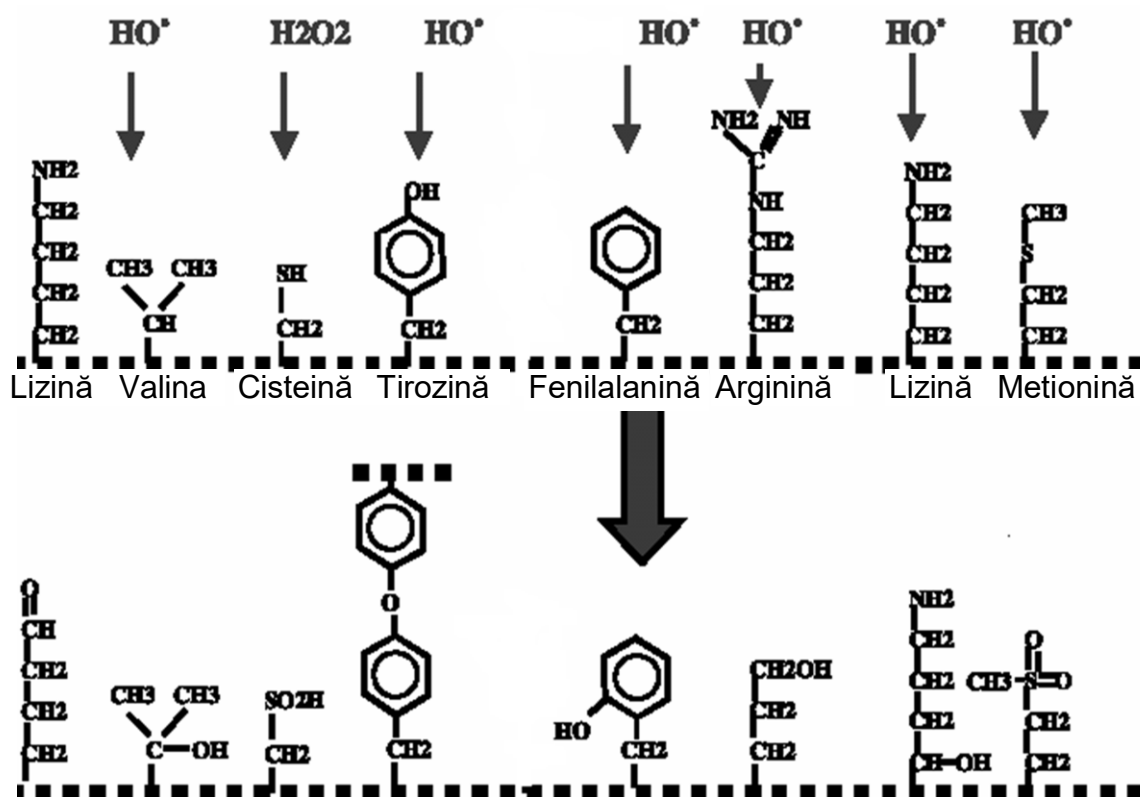


Figura 95. Acțiunea ROS asupra proteinelor

În cazul enzimelor, efectul ROS constă, în general, în diminuarea capacității catalitice. Nivelele proteinelor oxidate cresc dramatic cu vârsta, în special după 40 ani.

Punerea în evidență a proteinelor oxidate se face prin detecția tirozinei hidroxilate.

Afecțiunile asociate cu îmbătrânirea prematură (ex. Progeria, sindromul Werner) prezintă nivele crescute de proteine oxidate la vârste fragede. Fibroblaștii copiilor de 10 ani ce suferă de Progeria au nivele de proteine oxidate care în mod natural nu se întâlnesc sub 70 ani.

Scleroza amiotrofică laterală (boala lui Lou Gehrig) este o afecțiune caracterizată prin degenerarea neuronilor motori (incidența este de 1 la 100000, cu o prevalență familială de 10-15%). În cazurile familiale, aproximativ 25% prezintă o mutație a superoxid- dismutazei I (enzima antioxidantă Cu-Zn dependentă, ce înlătură oxigenul singlet din nucleu și citoplasma).

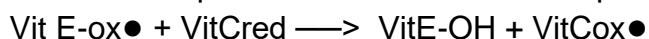
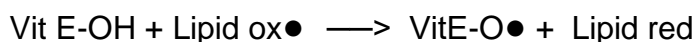
VII.5.3. Modificări oxidative ale lipidelor

O țintă majoră a atacului ROS sunt lipidele membranare, datorită prezenței dublelor legături în structura acizilor grași polinesaturați (în structura fosfolipidelor membranare, acizii grași polinesaturați cei mai frecvenți întâlniți sunt: acidul linoleic, acidul linolenic și acidul arahidonic).

Reacția are loc în 3 etape:

- 1) inițiere – formarea de peroxizi;
- 2) propagare – amplificarea oxidării acizilor grași sub acțiunea peroxizilor;
- 3) întreruperea procesului de oxidare prin neutralizarea radicalilor liberi formați:

procesul are loc în prezența vitaminei E, care acționează ca agent reductor. Ulterior, forma oxidată a vitaminei E se reface în prezența vitaminei C:



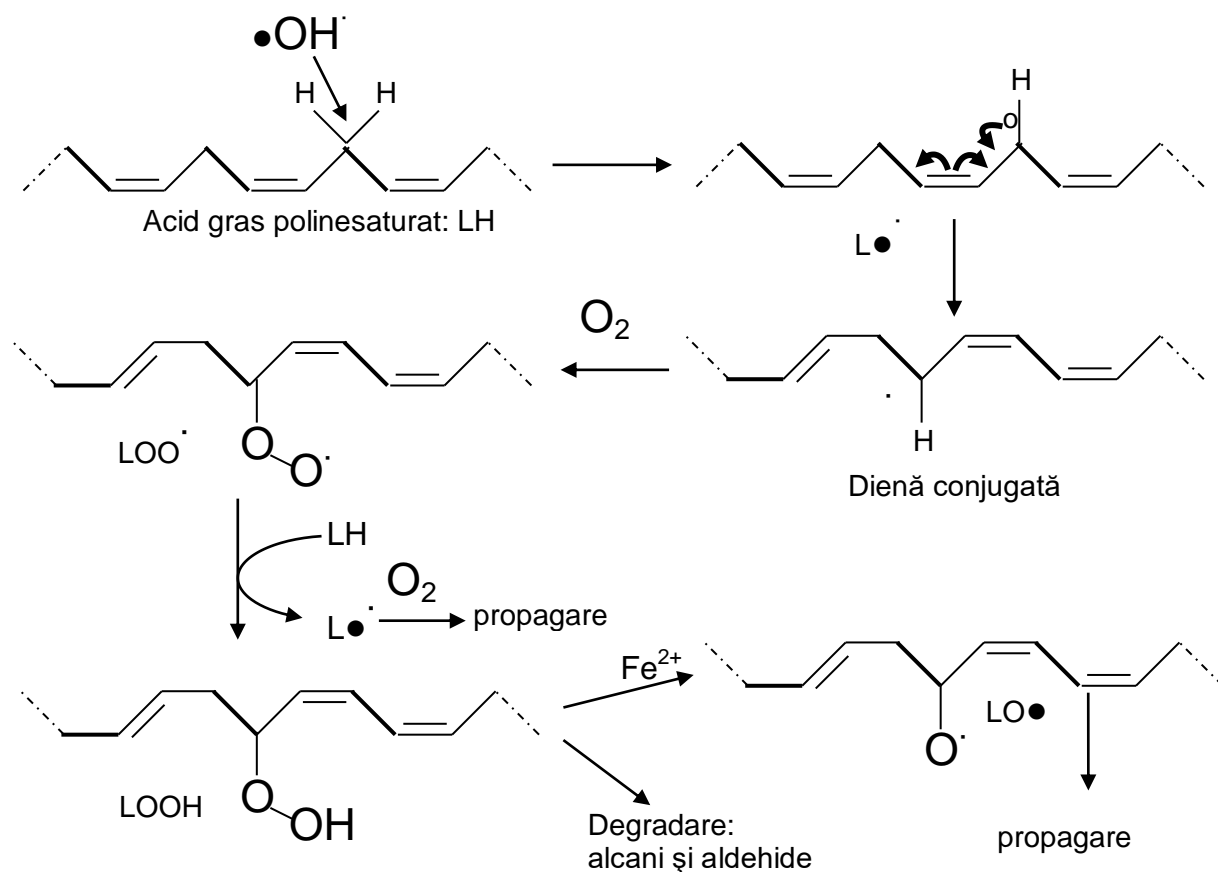


Figura 96. Peroxidarea lipidelor

Consecințele oxidării lipidelor membranare sunt reducerea fluidității și modificarea permeabilității membranei celulare, iar în final dezorganizarea membranei celulare. În aceste condiții, toate procesele realizate la nivelul membranei (transport, transfer semnale extracelulare, endo și exocitoză, etc) vor fi afectate până la anularea funcționalității.

Acțiunea radicalilor liberi asupra lipidelor se constituie ca un factor important în etiopatogenia unor afecțiuni cardio-vasculare ca : ateroscleroza, hipertensiunea arterială, neoxigenarea post-ischemică. În cazul acestor patologii, un indicator important este gradul de oxidare al fracțiunii lipoproteice circulante LDL. Măsurarea LDL oxidate se face în prezent prin metode imunologice: oxidarea LDL duce la apariția anticorpilor împotriva LDL oxidate (Ab-ox-LDL). Nivelele crescute de Ab-ox-LDL sunt asociate cu progresia aterosclerozei la nivelul arterei carotide.

Valori normale ale LDL oxidate în plasmă: 26-117 U/L. Valori normale ale anticorpilor anti-LDL oxidate în ser: 200-600 UI/L.

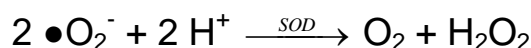
Sisteme de neutralizare a speciilor reactive ale oxigenului

Producția de ROS este inevitabilă datorită utilizării oxigenului, fiind de aceea strict controlată de către organism, care a dezvoltat sisteme de apărare antioxidantă cu efect protector împotriva consecințelor potențial distructive ale ROS. Aceste sisteme de apărare sunt formate din:

- enzime (Cu-Zn și Mn superoxid dismutaze, catalaze, glutatation peroxidaze, hem oxigenaza, proteinele șocului termic);
- proteine transportoare de Cu și Fe (feritina, transferina, ceruloplasmina);
- molecule mici antioxidante (glutathione, acid uric, bilirubină, glucoză, vitaminele A, C, E, ubiquinona, carotenoizii, flavonoizii);
- oligoelemente (cupru, zinc, seleniu) indispensabile activității enzimelor antioxidante.

1. Superoxid dismutaza (SOD)

Superoxid dismutaza asigură eliminarea anionului superoxid, prima specie toxică ce se formează din oxigen, reprezentând astfel prima linie de apărare împotriva stresului oxidativ. Pentru a funcționa corect, este necesară prezența unor oligoelemente: cupru și zinc (pentru SOD din citosol) și mangan (pentru SOD din mitocondrii).



Scăderea concentrației SOD se poate datora deficitului de oligoelemente. Absența acestei enzime este incompatibilă cu viața. De asemenea, concentrațiile prea mari de SOD determină leziuni tisulare datorită producției unei cantități mari de apă oxigenată.

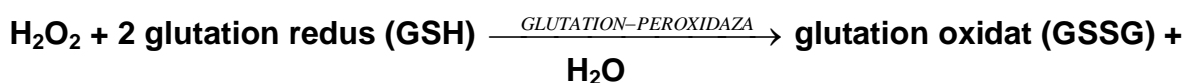
2. Catalaza

Catalaza este o hemoproteină ce catalizează reacția de desfacere a apei oxigenate în oxigen și apă. Este prezentă în toate celulele, în peroxizomi, cu excepția eritrocitelor care nu conțin aceste organite, caz în care ea este o enzimă citoplasmatică. Catalaza are un rol protector asemănător glutatation peroxidazei.



3. Glutathione peroxidaza

Este o enzimă cu localizare citoplasmatică și mitocondrială cu rol de neutralizare a apei oxigenate din celule prin transformarea ei în apă. Este o selenoproteină dar nu există o corelație între nivelul seleniului seric și glutatation oxidaza din eritrocite.



Acțiunea glutatation peroxidazei este cuplată cu cea a glutatation reductazei cu coenzimă NADPH + H⁺, care reface glutationul redus.



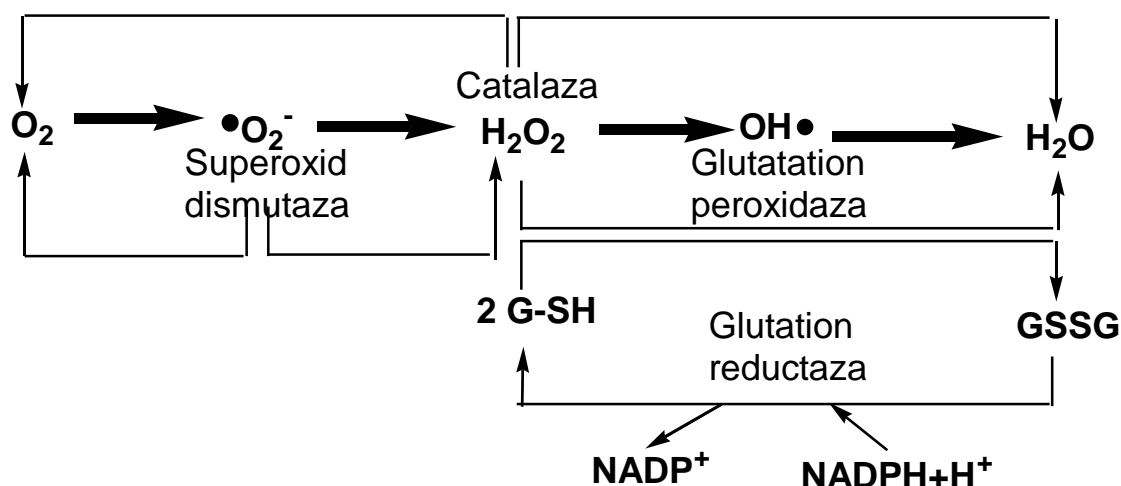


Figura 97. Sistemul enzimatic de neutralizare a speciilor reactive ale oxigenului

4. Tioredoxinele si tioredoxin reductaza

Tioredoxinele sunt enzime cu o activitate antioxidantă intrinsecă și, ca și majoritatea proteinelor, posedă grupări tiol. Ele contribuie la reglarea sistemului imun. O dată oxidate, tioredoxinele sunt reduse de tioredoxin reductază (o enzimă ce posedă o grupare selenocisteină în situsul său activ). Tioredoxin reductaza intervine de asemenea, în degradarea peroxizilor lipidici și a apei oxigenate și în regenerarea acidului ascorbic de la radicalul ascorbil.

5. Hemoxigenaza (HO)

Sistemul hem-oxigenazic este constituit din trei izoenzyme: forma HO-1 inductoare, forma HO-2 constitutivă și forma HO-3. În sistemele biologice HO catalizează conversia hemului la monoxid de carbon, biliverdină și fier. Efectul protector al HO împotriva stresului oxidativ este indirect: o dată formată, biliverdina este convertită la bilirubină ce are o activitate puternică antioxidantă. De asemenea, fierul produs stimulează sinteza de feritină, care are un răspuns antioxidant.

6. Proteinele de soc termic

Proteinele de șoc termic formează o familie de proteine care au rol în stabilizarea, translocarea și asamblarea proteinelor. Ele intervin și în repararea modificărilor de structură a proteinelor cauzate de stresul oxidativ. O creștere a nivelului acestor proteine reprezintă un răspuns adaptativ la stresul oxidativ produs de hipo- și hipertermie, acidoză, ischemie-reperfuzie, infecții virale, exerciții fizice, etc.

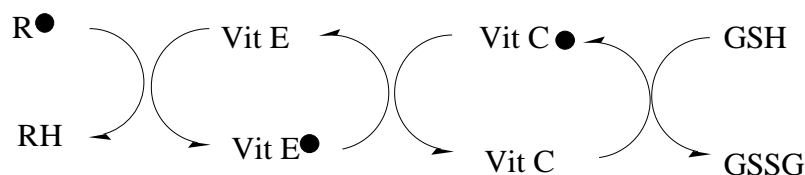
7. Carotenoizii

Carotenoizi ca β -carotenul sunt precursori ai vitaminei A. Majoritatea carotenoizilor și vitamina A interacționează cu oxigenul singlet și astfel, previn oxidarea unor substraturi biologice, în special a acizilor grași polinesaturați.

8. Vitamina C

Vitamina C (acidul ascorbic) nu este sintetizată în organismul uman și din această cauză nivelul său plasmatic depinde de dietă și de modificările survenite în fluxul sangvin hepatic. Vitamina C are rolul de a proteja substraturile biologice (proteine, acizi grași, ADN) împotriva oxidării. La concentrații fiziologice, vitamina C

previne oxidarea fracțiunii LDL-colesterolului cauzată de ROS (neutrofile activate, celule endoteliale activate). Radicalul ascorbil, un intermediar în oxidarea acidului ascorbic, joacă un rol important în regenerarea vitaminei E de la forma oxidată la forma redusă:



Unele studii arată că o scădere a concentrației vitaminei C crește riscul dezvoltării bolilor cardiovasculare.

9. Vitamina E

Caracterul hidrofob al vitaminei E determină inserarea acesteia printre lipoproteinele și acizii grași din structura membranei celulare, unde joacă un rol protector împotriva peroxidării lipidelor determinată de stresul oxidativ. Toți tocoferolii, în special, tocoferolii α și γ au proprietăți antioxidante.

10. Glutathionul

Glutathionul este un tripeptid format din acid glutamic, cisteină și glicocol. Glutathionul redus (GSH) poate interacționa direct cu SRO, dar în primul rând servește ca substrat glutation peroxidazei. GSH influențează expresia genelor ce codează unele proteine pro- și antiinflamatorii. Concentrațiile scăzute de GSH determină slăbirea apărării organismului prin mecanisme imune. GSH este oxidat la GSSG (glutathion oxidat) în cursul stresului oxidativ, iar o evaluarea a acestuia se poate face calculând raportul GSH/GSSG.

Valori normale (în sânge): GSH: 753-958 μM

GSSG: 1,17-5,32 μM

Raportul GSH/GSSG: 156-705.

11. Proteinele ce conțin grupări tiol

Majoritatea proteinelor posedă grupări tiol ($-SH$) care reacționează rapid cu ROS. Deoarece în plasmă există o abundență a acestor proteine (6-8 g%) proteinele plasmatice îndeplinesc pe lângă alte roluri și pe cel de protecție antioxidantă.

12. Acidul uric

Acidul uric reprezintă produsul final de catabolism al bazelor purinice din ADN. El posedă proprietăți antioxidante, putând interacționa cu speciile reactive ale oxigenului în special cu radicalul hidroxil.

13. Coenzima Q_{10}

Ubichinona sau coenzima Q_{10} ($Co Q_{10}$) joacă un rol important în producerea de energie la nivel mitocondrial. $Co Q_{10}$ redusă (ubichinol-10 sau $Co Q_{10}H_2$) posedă proprietăți antioxidante. La fel ca și vitamina E, ea inhibă peroxidarea lipidelor. Pe de altă parte, nivelul $Co Q_{10}$ poate fi un parametru important pentru depistarea pacienților cu risc crescut pentru boala coronariană. Unele studii au arătat faptul că nivelul CoQ_{10} în sânge este scăzut la pacienții cărora li se administrează statine

(pentru reducerea nivelului colesterolului). Statinele inhibă enzima hidroxi-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) reductaza; ca urmare scade cantitatea de acid mevalonic, un intermediar comun în sinteza colesterolului și a CoQ₁₀.

14. Seleniul

Acest oligoelement nu este el însuși antioxidant, dar participă la apărarea organismului împotriva ROS ca și cofactor al enzimei glutathion peroxidaza. Scăderea concentrației serice a seleniului sub 45-50 μg/L se asociază cu apariția bolii coronariene.

15. Cuprul

Cuprul este unul din cofactorii enzimei superoxid dismutaza (SOD). Concentrațiile crescute ale cuprului pot indica o creștere a stresului oxidativ. S-a evidențiat o creștere a cuprului seric în cursul procesului de îmbătrânire.

16. Zincul

La fel ca și cuprul, zincul este și el unul din cofactorii enzimei superoxid dismutaza (SOD). De asemenea, zincul are efect protector asupra grupării tiol din structura proteinelor și poate inhiba parțial reacțiile de producere a ROS. Deficitul de zinc crește sensibilitatea la leziuni produse de stresul oxidativ. Studii efectuate pe persoanele vârstnice cu boli degenerative au pus în evidență un raport Cu/Zn crescut în comparație cu pacienții aparținând aceleiași categorii de vârstă dar fără boli degenerative.