

# RADICALII LIBERI ÎN SISTEMELE BIOLOGICE: MECANISME DE FORMARE ȘI DE PROTECȚIE A CELULELOR

*Natalia SECARA, doctorandă  
acad. Gheorghe DUCA*

## THE FREE RADICALS IN BIOLOGICAL SYSTEMS: FORMATION AND PROTECTION MECHANISMS

*The paper reviews the mechanisms of formation of free radicals in cells, pathways of propagation of radical chain reactions and processes of their termination. Also, existent protective mechanisms of the cells are outlined*

### Introducere

Organismele aerobe s-au adaptat pentru utilizarea cu succes atât a oxigenului molecular, cât și a produselor de reducere ale acestuia și astfel radicalii liberi au un rol esențial în mai multe procese biologice normale *in vivo* [1,2]. Exemplu tipic îl constituie enzimele, a căror activitate catalitică implică radicalii liberi: radicalii superoxid, la fel ca și alte specii reactive de oxigen sunt produsele activității oxidazelor, cum ar fi xantinoxidaza, NADPH oxidaza etc., și sunt generate de un număr larg de celule pentru a efectua funcții importante în organism. De exemplu, celulele fagocite, care fac parte din sistemul imun al organismului, posedă o activitate antimicrobiană grație NADPH oxidazei. În momentul în care întâlnesc particule străine, celulele fagocite se activează, suferă o explozie respiratorie, și înconjoară bacteria sau particula străină. Cum consumul de oxigen din macrofagi se datorează activității complexului dintre NADPH oxidază și membrană (electronii eliberați la oxidarea NADPH reduc oxigenul la radicalul superoxid), particulele înghițite sunt expuse unui flux puternic de radicali superoxid în interiorul citoplasmei fagocitelor, care nimicesc bacteria.

### Radicalii liberi și reacțiile radicalice

Radicalii liberi sunt compuși care posedă unul sau mai mulți electroni necuplați pe orbitalii exteriori [3]. Prezența electronilor necuplați conferă instabilitate acestor specii, radicalii liberi fiind foarte reactivi la interacțiunea cu alte molecule [2,4]

din necesitatea de a cupla electronii și a forma un compus mai stabil.

Reacțiile radicalice sunt, de regulă, reacții înlănțuite [1,2,5]. Radicalii sunt generați în cadrul etapei de inițiere, participă într-o secvență de reacții de propagare, în care numărul radicalilor rămâne constant, și ulterior sunt distruși în etapa de întrerupere a lanțului. Deși în unele cazuri moleculele necesită condiții extreme pentru a forma radicali, multe celule pot fi transformate în radicali în condiții relativ blânde, inclusiv cele care se întâlnesc în organismele vii [6].

### Specii reactive de oxigen

Oxigenul este esențial pentru viața organismelor aerobe, însă poate deveni toxic în concentrații prea mari. Oxigenul molecular în stare fundamentală este practic inert, iar reducerea parțială a acestuia duce la formarea speciilor active de oxigen care sunt cei mai periculoși radicali liberi [1,7] – acest grup de compuși poartă denumirea SRO, i.e. specii reactive de oxigen. SRO este un termen colectiv care include nu numai radicalii oxigenului ( $\dot{O}$  și  $\dot{OH}$ ) dar și unii derivați de natură non-radicalică ai oxigenului, inclusiv peroxidul de hidrogen ( $H_2O_2$ ), acidul hipocloros ( $HOCl$ ) și ozonul ( $O_3$ ) [7]. Cu toate că SRO nu sunt radicali liberi veritabili, aceste specii sunt extrem de reactive cu moleculele din jur [1,2,5,7].

În celule, radicalii liberi se formează în mod continuu, fiind produse secundare ale metabolismului oxigenului în timpul procesului de fosforilare oxidativă care are loc în mitocondrii. Astfel, principala sursă de radicali liberi este mitocondria [7]. Surse exogene de radicali liberi includ fumul de țigară, radiația ionizantă, unii poluanți, solvenții organici și pesticidele.

Interacțiunea acestor specii cu membranele lipidelor, acizii nucleici, proteine și enzime sau alte molecule mici, duce inevitabil la leziuni celulare. Leziunile cauzate celulelor de către radicalii liberi sunt considerate a fi unul dintre cei mai importanți factori care duc la îmbătrânire și boli degenerative, cum ar fi cancerul, bolile cardiovasculare, cataracta, bolile ficatului, inflamații, insuficiența renală ș.a. [8,9].

### Inițierea procesului de formare a radicalilor liberi în celule

În celulele vii, formarea radicalilor are loc preponderent prin patru procese: homoliza legăturilor chimice, fotoliza, radioliza și ca rezultat al reacțiilor redox [1,6]. Multe enzime produc radicali

ca intermediari catalitici. De asemenea, expunerea la specii reactive, precum sunt oxidul nitric (NO) sau oxigenul singlet, poate iniția reacțiile radicalice [2].

Cea mai probabilă cale de inițiere a formării radicalilor liberi în celule este procesul în care homoliza legăturilor chimice este acompaniată de formarea altor legături, ceea ce duce la scăderea semnificativă a energiei de activare a procesului în întregime. Astfel de procese includ, de exemplu, descompunerea hidroperoxidilor în prezența alcoolilor, acizilor, a altor hidroperoxizi, sau a oricăror compuși care pot forma legături de hidrogen și astfel duc la micșorarea energiei de disociere a legăturii O – O.

Reacțiile radical-înlănțuite pot fi inițiate de acțiunea luminii, radiației ionizante și a ultrasunetului [1,6]. Lumina, în special cea din spectrul ultraviolet, poate duce la fotoliza legăturilor chimice ca rezultat al absorbției energiei de către o moleculă; aici trebuie menționată homoliza legăturii din H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cu generarea ·OH [9].

Radicalii se formează în celule ca rezultat al proceselor de oxidare mono-electronică și reducere mono-electronică. Cu toate că majoritatea reacțiilor de oxidoreducere biochimice implică schimbul a doi electroni, numeroase oxidoreductaze generează în timpul ciclului catalic radicali intermediari [10]. Astfel de radicali formați endogen în componenții normali ai celulelor (de ex. tiolii organici, chinone/hidrochinone, ortocateholi, nucleotide piridinice) pot difuza de la centrul catalitic al enzimei înainte de oxidarea/reducerea lor până la specii cu număr par de electroni [6]. De altfel, metabolismul diferitor xenobiotici (medicamente, substanțe fitochimice, poluanți) generează radicali C-, N-, S- sau O-centrați ca rezultat al schimbului monoelectronic. Datorită prezenței oxigenului molecular, acești radicali pot fi reoxidați rapid iar produsul final al acestei reacții monoelectronice în lanț este anionul superoxid O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Reacțiile redox care implică ionii metalelor de tranziție (de regulă fier [9,11], dar și cupru [9,12], crom [13] și vanadiu [14]) sunt de asemenea importante în producerea intracelulară a radicalilor. Interacțiunea acestor ioni cu oxigenul molecular, peroxidul de hidrogen și cu peroxizii organici, duce la formarea radicalilor ·OH, alchilici (R·), alcoxilici (RO·), și alchilperoxidici (ROO·) [9].

Cele mai importante reacții de inițiere, propagare și întrerupere care au loc în sistemele biologice sunt reprezentate schematic în Fig.1

### Mecanismele de protecție a celulelor de leziunile oxidative

Rolul radicalilor liberi în inducerea multor boli a fost pe larg dovedit. Numeroase reacții biochimice, care au loc în organismul uman, generează specii reactive de oxigen care pot produce leziuni biomoleculare importante dacă nu sunt dezactivate la timp de către constituenții celulari [15].

Antioxidanții au capacitatea de a stabili sau dezactiva radicalii liberi înainte ca aceștia să atace celulele [16]. Plantele au dezvoltat o serie de strategii de apărare (sistem antioxidant) pentru a face față stresului oxidativ. Sistemul antioxidant include sistemul enzimatic și cel non-enzimatic. Sistemul non-enzimatic include acidul ascorbic (vitamina C); α-tocoferolul, cartenele etc. iar sistemul enzimatic include superoxid dismutaza, catalaza, peroxidaza, ascorbat peroxidaza, glutatión reductaza și polifenol oxidaza etc. Funcția acestui sistem antioxidant constă în distrugerea radicalilor toxici produși în timpul stresului oxidativ, astfel ajutând plantele să supraviețuiască în astfel de condiții. Organismul uman a dezvoltat, de asemenea, un sistem antioxidant de protecție pentru a-și proteja celulele și organele.

Autorii [17] definesc antioxidanții ca fiind substanțe ce pot întârzia sau preveni oxidarea unui substrat, prezente în cantități mult mai mici față de substrat. Halliwell și Gutteridge [18] au sugerat faptul că antioxidanții posedă mai multe mecanisme de acțiune și se implică în diferite etape ale procesului oxidativ. Referitor la peroxidarea lipidelor, acești autori au evidențiat existența a cinci mecanisme posibile de acțiune, și anume: a) micșorarea concentrațiilor de oxigen din anumite locații; b) prevenirea inițierii lanțului prin distrugerea radicalilor inițiatori; c) legarea catalizatorilor, precum sunt ionii metalelor, pentru a preveni inițierea generării radicalilor; d) descompunerea peroxidilor pentru ca aceștia să nu poată fi transformați înapoi în radicali inițiatori, e) întreruperea lanțului pentru a preveni ruperea continuă a atomilor de hidrogen de către radicalii liberi.

Se consideră [17] că protecția antioxidantă constă din trei nivele de activitate de protecție care sunt cel mai bine ilustrate în cadrul mecanismului de prevenire a peroxidării lipidice. Aceste trei nivele pot fi explicate pe baza celor 5 mecanisme amintite anterior. Astfel, primul nivel de apărare, care este în mare parte enzimatic, implică acele enzime, activitatea cărora depinde de prezența micro-cantităților mineralelor Mn, Cu, Zn și Se.

Aceste enzime controlează formarea și creșterea numărului de radicali primari derivați din oxigenul

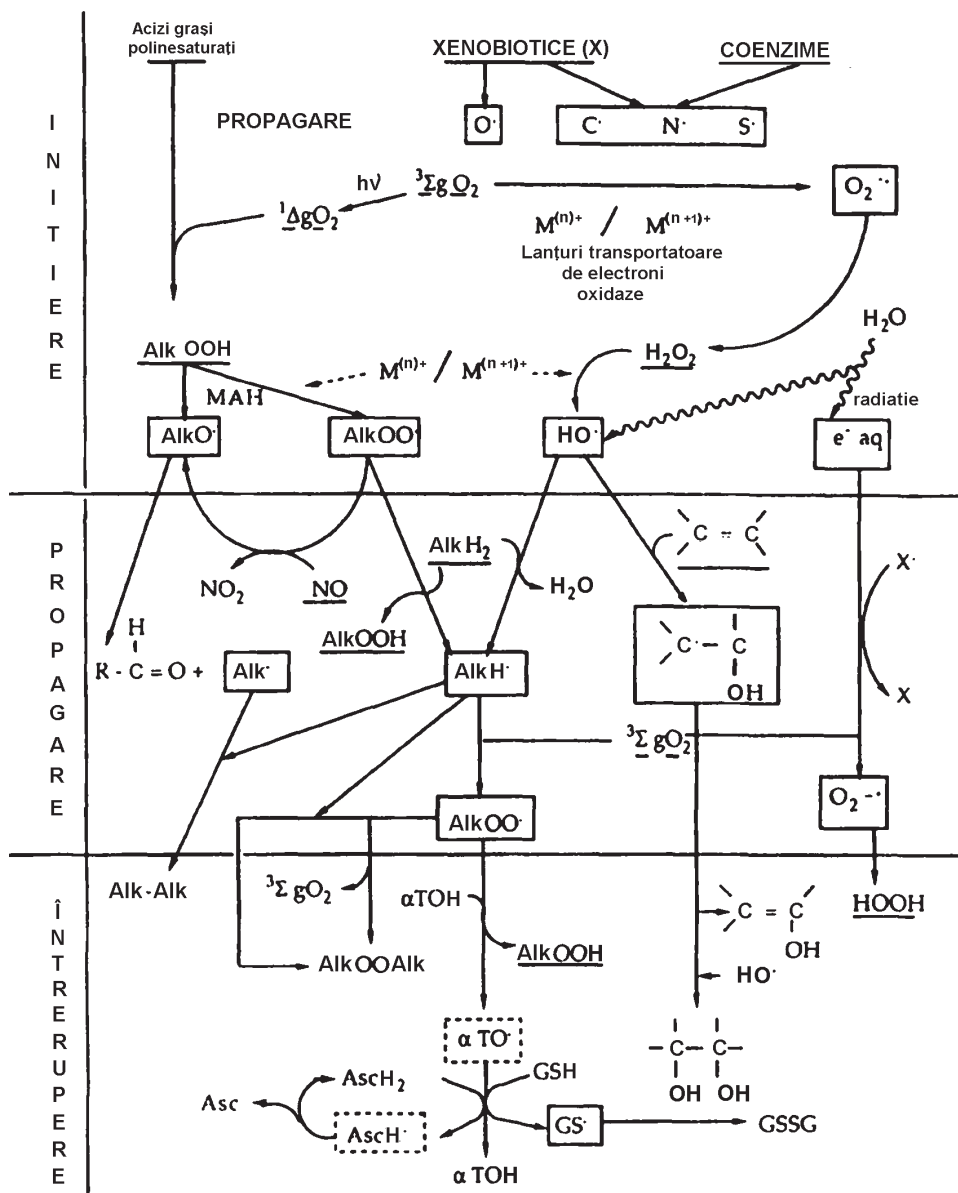
molecular. Al doilea nivel al mecanismului de apărare implică vitaminele C, E și carotenoizii, și răspunde de prevenirea creșterii radicalilor secundari în reacțiile radical-înlănțuite, inițiate și menținute de către radicalii primari. Al treilea nivel constă în prevenirea enzimatică a formării radicalilor secundari din derivații formați la întreruperea lanțului. Este o etapă semnificativă, deoarece reacțiile catalizate de ioni metalelor ar putea cauza leziuni oxidative ulterioare.

**Clasificarea antioxidanților**

Antioxidanții au o importanță semnificativă pentru a menține sănătatea celulelor și a sistemelor

organismelor. Pentru a putea avea un rol important în distrugerea radicalilor liberi, o substanță trebuie să poseze următoarele caracteristici [1,6,15]:

- să fie prezentă în locul necesar în cantități adecvate, deoarece radicalii liberi au o durată de viață scurtă;
- să posede un caracter nespecific, pentru a putea reacționa cu toate speciile de radicali;
- să fie distribuită pe larg în spațiul intracelular, sau să se poată transloca;
- să fie sintetizată de celule sau să fie parte componentă a alimentației;
- să posede capacitatea de a fi regenerată;



**Fig.1. Principalele etape ale reacțiilor radical-înlănțuite (din ref.6), importante din punct de vedere biologic. Incluse în dreptunghi – specii moleculare radicalice; subliniate – substrat potențial pentru inițiere sau propagare a reacțiilor radicalice; M<sup>(n)+</sup>/M<sup>(n+1)+</sup> – ioni ai metalelor de tranziție; α TOH – α tocoferol; AscH<sub>2</sub> și ASCH – ascorbatul și radicalul ascorbil, respectiv**

- dacă este o moleculă sintetică, să nu fie toxică.

Independent de locul de acțiune și de natura substratului, toate moleculele antioxidante pot fi clasificate prin compararea mecanismelor lor de acțiune: primul grup va cuprinde moleculele care posedă activitate enzimatică, adică enzimele antioxidante (cât și analogii acestora). Din punct de vedere mecanistic, acțiunea lor implică o modificare a substratului (de ex.  $O_2^-$ , care este transformat în  $H_2O_2$  prin acțiunea superoxid dismutazei). Produsele finale sunt, de regulă, mai puțin reactive și de natură neradicalică. Enzimele sunt pe larg răspândite în celule și deseori acționează împreună (cum este, de exemplu, cazul acțiunii SOD și CAT), iar cel mai important este faptul că enzimele acționează în mod catalitic, ceea ce înseamnă că sunt regenerate în mod continuu.

Toate celelalte molecule pot fi incluse în cel de-al doilea grup: molecule antioxidante de natură non-enzimatică. La interacțiunea cu radicalii, aceste substanțe formează produși radicalici care pot fi stabili și persistenți (puțin reactivi). Aceste reacții sunt de regulă stoichiometrice, adică molecula antioxidantului este consumată în timpul reacției și trebuie să fie regenerată din alte molecule sau din alte reacții. Aceste substanțe se află în diferite compartimente celulare, în funcție de polaritatea lor: de exemplu, vitaminele A și E se află în regiunile hidrofobe (membrane), în timp ce vitamina C și glutatationul (GSH) se află în zonele hidrofile.

În pofida localizării în diferite părți în interiorul celulelor, moleculele hidrofobe și cele hidrofile acționează conjugat. De exemplu, se consideră că radicalul tocoferil ( $\alpha$ -T.) este generat de către acidul ascorbic, cu formarea radicalului ascorbil, care la rândul său este redus de un compus donator de electroni.

Reieșind din de funcțiile pe care le au, aceste substanțe pot fi divizate în trei categorii:

a. Antioxidanți preventivi, care reduc formarea radicalilor și a speciilor reactive de oxigen prin descompunerea peroxidului de hidrogen și a hidropoxidului fără a genera radicali liberi (glutation peroxidaza, glutatation S-transferaza, peroxidaza, catalaza) prin acapararea ionilor de metale (apoferritina, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmin) și prin dezactivarea și dismutarea oxigenului activ (carotenoizi, superoxid dismutaza).

b. Antioxidanți care dezactivează radicalii prin inhibarea etapei de inițiere și întreruperea etapei de propagare prin captarea radicalilor înainte ca aceștia să ajungă la țintele celulare (vitamina C, acidul uric, albumina, bilirubina, vitamina E, carotenoizii)

c. Moleculele implicate în reparare și me-

canismele de novo (fosfolipaze, proteaze, transferaze).

Înțelegerea rolului semnificativ al speciilor reactive de oxigen și al stresului oxidativ în etiologia și dezvoltarea principalelor boli degenerative a dus la apariția unui interes semnificativ față de compușii antioxidanți, endogeni și exogeni. Antioxidanții naturali se găsesc în toate părțile plantelor și includ carotenoizi, vitamine, fenoli, flavonoizi [19]. Există numeroase rezultate care atestă potențialul antioxidantilor obținuți din plante în prevenirea diferitor boli, în special a cancerului, insuficienței cardiace, diabetului și cataractelor.

### Bibliografie

1. Duca Gh., Scurlatov Yu., Sychev A., Redox catalysis and ecological Chemistry. Tipografia USM, Chișinău, 2002.
2. Duca Gh., Scurlatov Yu., Chimie ecologică, Tipografia USM, Chișinău, 2002.
3. Jesberger, J.A. and J.S. Richardson, 1991. Oxygen free radicals in brain dysfunction. Intl. J. Neurosci., 57: 1-17.
4. Karlsson, J., 1997. Introduction to Nutraology and Radical Formation. In: *Antioxidants and Exercise*. Illinois: Human Kinetics Press, pp: 1-143.
5. Isac V., Hurduc N., Chimie fizică. CINETICĂ ȘI CATALIZĂ, Știința, 1992.
6. Roberfroid M., Calderon P.B., Free Radicals and Oxidation Phenomena in Biological Systems, 1995, Marcel Dekker Inc.
7. Przedborski, S. and V. Jackson-Lewis, 1998. Experimental developments in movement disorders: update on proposed free radical mechanisms. Current Opinion Neurol., 11: 335-339.
8. Bhuiyan M.A., Hoque M.Z., Hossain S.J., World Journal of Agricultural Sciences 5 (3): 318-322, 2009.
9. Duca Gh., Sychev A., Aspecte fundamentale și aplicative ale catalizei omogene cu compușii complecși ai metalelor de tranziție. Partea I și II. Tipografia USM, Chișinău, 2002 (Rus.).
10. Yamazaki I., Free Radicals in Biology, Vol 3. (editor W. Pryor), Academic Press, New York, 1977.
11. Minotti G., Chem. Res. Toxicol., 6:134, 1993.
12. Rowley D.A. și Halliwell B., Arch. Biochem. Biophys., 225:279, 1983.
13. Shi X. și Dalal N.S., Arch. Biochem. Biophys., 292:323, 1992.
14. Liochev S. și Fridovich I., Arch. Biochem. Biophys., 291:379, 1991.
15. Halliwell, H., 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *Lancet*. 344: 721-724.
16. Beris, H., Antioxidant effects a basis of drug selection, *Drugs*, 42, 1991, 569-605.
17. Free radical damage and its control (editori C.A. Rice-Evans și R. Burdon), vol 28, Elsevier, 1994.
18. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd edition, 543 pg, Clarendon Press, Oxford.
19. Larson R. A. (1988) *Phytochemistry*, 4: 969-978.