








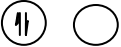
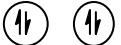























I RADICALI NEI SISTEMI BIOLOGICI

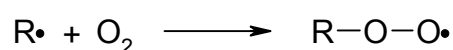
L'OSSIGENO E I SUOI DERIVATI

Nei sistemi biologici, uno dei principali intermedi per la formazione di radicali liberi è l'ossigeno. L'ossigeno pur essendo assolutamente necessario per la vita degli organismi aerobici (animali, piante e batteri aerobici), si dimostra tossico quando la sua concentrazione supera anche di poco quella presente nell'aria. E' tossico, non di per se, in quanto è scarsamente reattivo, ma a causa dei vari intermedi di riduzione, molto più reattivi dell'ossigeno molecolare.

σ^*2p  π^*2p  $\pi 2p$  $\sigma 2p$  σ^*2s  $\sigma 2s$  σ^*1s  $\sigma 1s$ 	σ^*2p  π^*2p  $\pi 2p$  $\sigma 2p$  σ^*2s  $\sigma 2s$  σ^*1s  $\sigma 1s$ 	σ^*2p  π^*2p  $\pi 2p$  $\sigma 2p$  σ^*2s  $\sigma 2s$  σ^*1s  $\sigma 1s$ 	σ^*2p  π^*2p  $\pi 2p$  $\sigma 2p$  σ^*2s  $\sigma 2s$  σ^*1s  $\sigma 1s$ 
OSSIGENO (TRIPLETTO)	OSSIGENO SINGOLETTO	ANIONE SUPEROSSIDO	DIANIONE PEROSSIDO

Rappresentazione schematica degli orbitali dell'ossigeno biatomico in diversi stadi di riduzione. Le frecce rappresentano gli elettroni, e la direzione delle frecce lo spin ($+\frac{1}{2}$; $-\frac{1}{2}$).

L'ossigeno si trova in natura sotto forma di molecole biatomiche che presentano due elettroni spaiati di spin uguali sistemati su due orbitali diversi (tripletto), e che quindi possiedono caratteristiche paramagnetiche. Il fatto di possedere elettroni disaccoppiati rende l'ossigeno particolarmente reattivo verso le specie radicaliche per formare legami covalenti; infatti i radicali centrati al carbonio, come quelli che si formano durante il processo della perossidazione lipidica, reagiscono in soluzione con l'ossigeno con velocità pari alla diffusione, portando alla formazione di radicali perossidi:



I perossi radicali come vedremo in seguito rivestono un ruolo molto importante nei fenomeni di perossidazione lipidica.

L'ossigeno tuttavia, pur favorendo i fenomeni ossidativi, non possiede un elevato potere ossidante: esso infatti ha un potenziale redox di - 0.16 V in H₂O che ne evidenzia il basso carattere ossidante, cioè non strappa facilmente un elettrone da un substrato. Questa è la ragione per cui nell'ossidazione di biomolecole, per il trasferimento di un elettrone dalla sostanza biologica all'ossigeno, debbono intervenire dei trasferitori di elettroni che in genere sono degli ioni di metalli di transizione nel loro stato di ossidazione più basso o degli enzimi, (come la citocromo ossidasi) che contengono ioni metallici nel loro sito attivo.

Radicale superossido

Partendo da una molecola di ossigeno e aggiungendo un elettrone nell'orbitale esterno, (figura 2) otteniamo il radicale superossido che è il primo prodotto della riduzione univalente dell'ossigeno.



Questo radicale può essere prodotto accidentalmente, a livello della catena di trasferimento elettronico mitocondriale e microsomiale per trasferimento di un elettrone dai trasportatori di elettroni direttamente all'ossigeno che quindi viene ridotto a radicale superossido. Il radicale superossido viene inoltre prodotto durante l'azione di alcuni enzimi ossidativi tra cui l'aldeide ossidasi, la NADH ossigenasi e la xantina ossidasi. Nelle nostre cellule il radicale superossido viene rapidamente trasformato o per meglio dire, dismutato in acqua ossigenata ed ossigeno, attraverso una reazione nella quale una molecola di superossido si ossida diventando ossigeno e l'altra molecola di superossido si riduce e si protona diventando acqua ossigenata.



Il radicale superossido reagisce con proteine, lipidi, polisaccaridi e acidi nucleici ma la sua reattività è piuttosto bassa, tanto che non rappresenta una sostanza eccessivamente tossica per l'organismo. La sua azione tossica dipende in larga misura dalla produzione di acqua ossigenata e dall'interazione con essa. In questo modo si genera il radicale idrossile (OH•), che è una specie estremamente reattiva, anzi una delle specie radicaliche conosciute più reattive.



La produzione in vivo di superossido può essere però anche funzionale, come nel caso dei fagociti attivati (monociti, nucleofili, eosinofili, macrofagi) che generano questa specie

affinché produca per dismutazione (enzimatica o spontanea) acqua ossigenata, la quale viene poi utilizzata per la loro attività fagocitaria.

Acqua ossigenata e idrossi radicali

Un altro prodotto della riduzione dell'ossigeno, è rappresentato dall'acqua ossigenata o perossido d'idrogeno (H_2O_2) che è la forma protonata del dianione perossido ($\text{O}_2^{\ominus\ominus}$), che può essere ottenuto mediante riduzione bivalente dell'ossigeno,



o indirettamente, mediante riduzione univalente dell' O_2 a superossido, seguita da dismutazione (eq. 2). Nelle cellule l' H_2O_2 si forma come prodotto primario della riduzione dell'ossigeno da parte di numerose ossidasi la maggior parte delle quali è localizzata a livello dei perossizomi. L'acqua ossigenata è una specie dannosa in quanto è capace di ossidare composti sulfidrici come i residui di metionina nelle proteine e, a concentrazioni basse può portare alla lisi degli eritrociti umani. La pericolosità dell'acqua ossigenata non è dovuta ad un suo attacco diretto a livello dei componenti cellulari, bensì all'interazione con le forme ridotte di alcuni metallo-ioni come il ferro bivalente o il rame monovalente, che porta alla formazione dell'idrossi radicale e dello ione ossidrilico (eq. 5).



L'idrossi radicale si può anche formare, come già accennato, dall'interazione del superossido con l'acqua ossigenata, come riportato nell'eq. 3. Il carattere riducente dello ione superossido spiega perché questa specie, in presenza di ioni metallici diventi dannosa. Lo ione superossido può infatti ridurre il $\text{Fe}^{3\oplus}$ a $\text{Fe}^{2\oplus}$ (eq. 6) e quest'ultimo può a sua volta decomporre l'acqua ossigenata, dando luogo alla formazione di radicali OH• secondo la reazione di Fenton (eq. 5).



L'idrossi radicale si può anche generare per azione fotochimica sulla stessa acqua. Esponendo i tessuti corporei ad esempio alle radiazioni γ , la maggior parte dell'energia viene assorbita dall'acqua, semplicemente perché l'acqua è la componente più abbondante. Questo provoca la rottura omolitica dei legami covalenti O-H, portando alla formazione di un radicale idrogeno e uno idrossilico:



L'idrossi radicale è estremamente ossidante, come dimostra la coppia redox, $\text{HO}\cdot/\text{HO}^\ominus$ con potenziale $E^\ominus = 1.9 \text{ V}$ in acqua, e risulta notevolmente dannoso a livello dei sistemi biologici in quanto reagisce con moltissime molecole di interesse biologico (come ad esempio carboidrati, lipidi, proteine, DNA] a velocità vicine al limite teorico della diffusione. Il radicale idrossilico è una specie altamente reattiva che si combina velocemente, in meno di un millisecondo, con una molecola nelle immediate vicinanze attraverso tre tipi di reazioni: idrogeno estrazione, addizione e trasferimento elettronico.

L'idrogeno estrazione può essere effettuata a livello delle membrane biologiche, dove il radicale idrossilico risulta estremamente dannoso, a causa dell'attacco ossidativo sui lipidi poli-insaturi che innesca il processo autocatalitico di perossidazione lipidica. L'idrossi radicale può effettuare reazioni di addizione a doppi legami come quelli presenti nelle strutture aromatiche di purine e pirimidine, che troviamo a livello di RNA e DNA, e può attaccare gli zuccheri, come il deossiribosio presente anche esso nel DNA. Quindi l'idrossi radicale può portare a diversi tipi di danni a livello del DNA, che in ultima analisi si traducono in mutazioni, rottura della doppia elica e cancerogenesi.

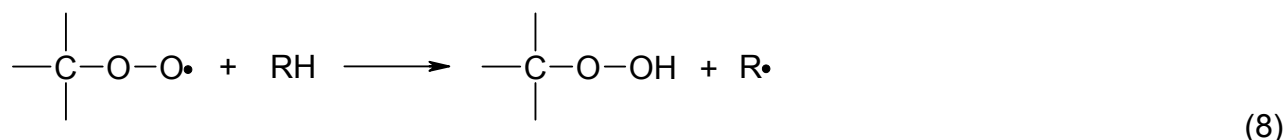
La reattività dell'idrossi radicale è talmente vasta che se questo radicale si forma nei sistemi viventi, lascia un segno nella cellula sotto forma di reazioni radicaliche libere a catena, in quanto reagisce immediatamente con qualsiasi molecola biologica nelle sue vicinanze, producendo dei radicali secondari di reattività variabile, che possono diffondere dal sito di origine determinando un danno a distanza. A livello cellulare, ci sono dei sistemi enzimatici in grado di prevenire il danno causato da queste specie radicaliche. L'enzima superossido dismutasi (SOD) può eliminare il radicale superossido, che è il primo precursore dell' $\text{HO}\cdot$, mentre le catalasi e le perossidasi possono decomporre l'acqua ossigenata. L'inibizione della formazione dell'idrossi radicale, si può anche attuare attraverso il sequestro di ioni metallici nel loro stato di ossidazione più bassa.

Perossi radicale e alcossi radicale

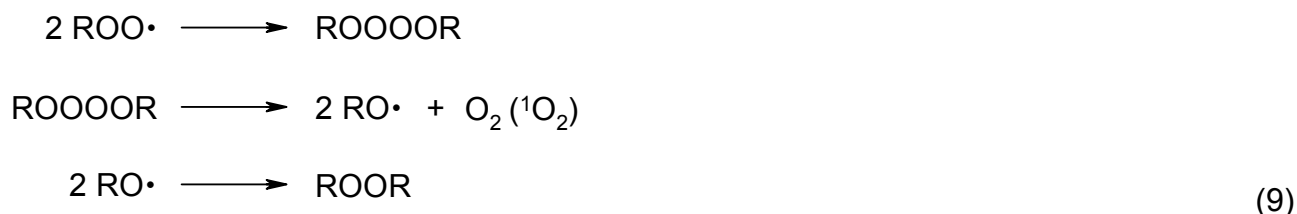
I perossi radicali sono il prodotto della reazione di radicali centrati al carbonio con ossigeno molecolare:



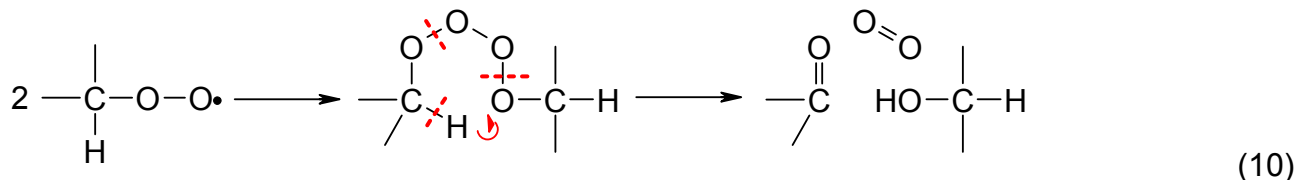
Queste specie radicaliche sono la causa principale della propagazione delle catene di autossidazione (come la perossidazione lipidica) e reagiscono, per idrogeno estrazione, portando alla formazione di alchilidroperossidi e un altro radicale che propaga la catena.



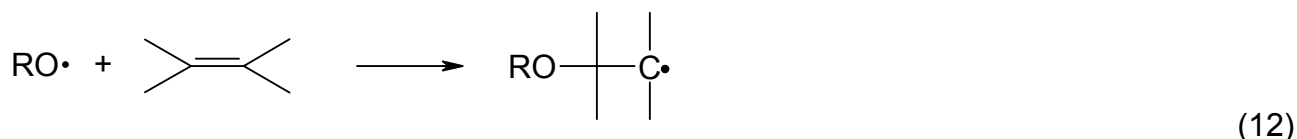
Un aspetto importante della reattività dei perossidi radicali sono le reazioni di terminazione che possono avvenire tramite dimerizzazione del perossido a tetrossido secondo quanto indicato sotto:



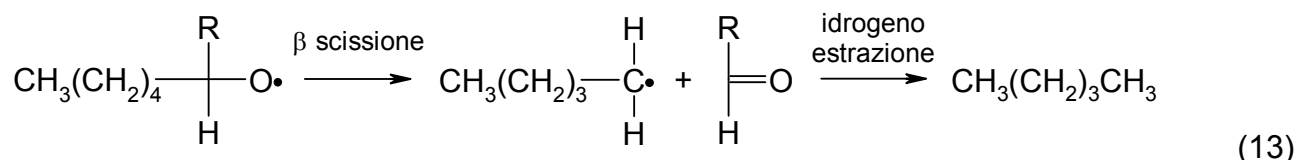
La decomposizione del tetrossido porta alla formazione di ossigeno che in parte può essere ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$) e di dialchilperossido; il radicale alcossilico ($\text{RO}\cdot$) però, se non si accoppia completamente nella gabbia del solvente, può in parte uscire dalla gabbia e reagire come tale. Un altro meccanismo di decomposizione dei perossi radicali (secondari e primari) è stato proposto da Russel nel 1957; il tetrossido si decompone tramite uno stato di transizione ciclico in cui uno degli idrogeni in α viene trasferito per dare chetone, alcool ed ossigeno singoletto come prodotti.



Gli alcossi radicali, che richiamano molto da vicino l'idrossi radicale, hanno anche se con velocità più basse rispetto a quest'ultimo, un buon potere idrogeno estrattore compreso nell'intervallo di 10^5 - $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ed una notevole capacità di addizionarsi ad un doppio legame, originando un radicale centrato al carbonio che, come è stato detto precedentemente, può essere l'origine di un nuovo perossi radicale quando reagisce con l'ossigeno. Anche le reazioni di addizione avvengono con elevata velocità.



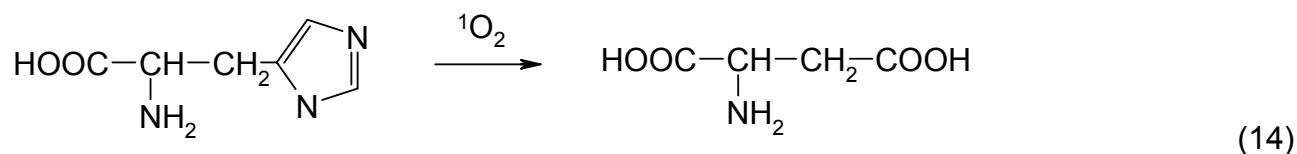
Gli alcossi radicali che si formano per esempio durante la perossidazione lipidica, possono andare incontro a un reazione di β -scissione che porta alla formazione di composti contenenti gruppi carbonilici (soprattutto aldeidi e chetoni) ed idrocarburi.



Quindi anche queste specie, possono provocare danni non trascurabili durante le perossidazioni a livello cellulare.

Ossigeno singoletto

Un'altra forma reattiva dell'ossigeno che però non è un radicale è l'ossigeno singoletto. Questo è uno stato eccitato dell'ossigeno molecolare che si forma quando sufficiente energia viene assorbita dalla molecola di ossigeno in modo da attuare una inversione di spin di uno degli elettroni spaiati accompagnata da uno spostamento in un diverso orbitale. L'ossigeno singoletto viene considerato un forte ossidante in quanto possiede un potenziale redox di 0.34 V in DMF o 0.79 V in H₂O. Ciò comporta che esso è in grado di reagire con parecchie classi di composti, molte delle quali sono di interesse biologico. Ad esempio, può attaccare i doppi legami dei caroteni, delle clorofille e degli acidi grassi insaturi mediante reazioni di addizione con formazione di idroperossidi o endoperossidi che vanno poi incontro ad ulteriori stadi di degradazione. L'ossigeno singoletto danneggia anche i polipeptidi e le proteine, in quanto ossida soprattutto i residui di metionina, triptofano, istidina e cisteina. Per esempio, con l'istidina si ha la rottura dell'anello imidazolico:



L'ossigeno singoletto è in grado di ossidare le basi puriniche e pirimidiniche provocando quindi danni anche al DNA. Nei sistemi biologici, l'ossigeno singoletto può formarsi per dismutazione spontanea del superossido radicale oppure per interazione di quest'ultimo con il radicale idrossile o con l'acqua ossigenata. La tossicità del superossido radicale deve quindi anche essere riferita alla possibilità di agire da precursore di ossigeno singoletto. Esso si può anche formare durante il processo di perossidazione lipidica in cui sono presenti dei radicali perossilici intermedi che reagendo fra di loro formano un tetrossido che, decomponendosi produce ossigeno singoletto oltre a un composto carbonilico e ad un alcool o ad un perossido (eq. 9). L'ossigeno singoletto viene inoltre prodotto durante la reazione fra lo ione ipoclorito e l'acqua ossigenata attraverso l'enzima mieloperossidasi.