

# Capitolo 2

## Il sistema di difesa antiossidante

A cura di Eugenio Luigi Iorio

### 2.1 Generalità e definizioni

Le specie chimiche reattive (SCR) e, in particolare, le specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species, ROS), sono potenzialmente lesive. Per questo motivo, gli organismi viventi hanno sviluppato nel corso di millenni di evoluzione un complesso sistema di difesa, costituito dall'insieme degli antiossidanti. Questi ultimi sono appunto definiti, funzionalmente, come agenti – chimicamente eterogenei tra loro (enzimi, vitamine, sostanze simil-vitaminiche, oligoelementi, ecc.) – in grado di prevenire o annullare l'azione, tipicamente ossidante, delle SCR (9, 39).

Gli antiossidanti possono essere classificati secondo diversi criteri: sulla base dell'origine, in endogeni ed esogeni, sulla base della struttura chimica, in enzimatici e non enzimatici, e sulla base della solubilità, in liposolubili e idrosolubili.

Considerando, invece, il meccanismo d'azione prevalente, risulta molto utile sotto il profilo fisiopatologico suddividere gli antiossidanti in 3 gruppi principali: preventivi, scavenger e di riparo.

Ognuno di questi gruppi di agenti è in grado di intervenire a uno dei livelli della sequenza indesiderata di eventi che, innescata da agenti esogeni (fisici, chimici o biologici) e/o endogeni (attività metabolica) conduce all'evento morboso (invecchiamento precoce e/o malattie), bloccandola (figura 2. 1).

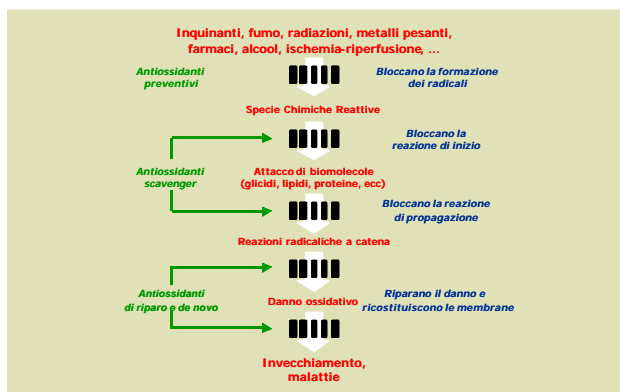


Figura 2. 1 Meccanismo d'azione degli antiossidanti

In particolare, gli antiossidanti preventivi sono agenti che, attraverso vari meccanismi, quali la chelazione dei metalli di transizione (transferrina, lattoferrina, aptoglobina, emopessina, ceruloplasmina, albumina), il "quenching" delle ROS (carotenoidi e superossidodismutasi) o l'inattivazione dei perossidi (catalasi e perossidasi) impediscono a monte la generazione di SCR; in questo modo la sequenza delle reazioni radicaliche a catena non viene proprio innescata (tabella 2. 1).

Tabella 2. 1 Classificazione degli antiossidanti preventivi

Classe	Esempi	Meccanismod'azione
Sequestratori di metalli	Transferrina, lattoferrina	Sequestro di ferro
	Aptoglobina	Sequestro di emoglobina
	Emopessina	Stabilizzazione dell'eme
	Ceruloplasmina, albumina	Sequestro di rame
"Quencher" di ROS	Carotenoidi	Quenching dell'ossigeno singolo
	Superossido dismutasi	$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Inattivatori o "breaker" di perossidi	Catalasi	$2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$
	Perossidasi	$H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2 H_2O + A$ $LOOH + AH_2 \rightarrow LOH + H_2O + A$
	Glutazione perossidasi (plasmatica)	$H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GS-SG$ $PLOOH + 2GSH \rightarrow PLOH + H_2O + GS-SG$
	Glutazione perossidasi dei perossidi fosfolipidici	$PLOOH + 2GSH \rightarrow PLOH + H_2O + GS-SG$
	Glutazione perossidasi (intracellulare)	$H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GS-SG$ $LOOH + 2GSH \rightarrow LOH + H_2O + GS-SG$
	Glutazione-S-trasferasi	Scissione dei perossidi lipidici

Gli scavenger ed i chain breaker – funzionalmente assimilabili tra loro – sono sostanze chimicamente eterogenee, alcune idrosolubili, altre liposolubili, generalmente a basso peso molecolare, che formano, a sostegno della prima linea di difesa, estremamente specifica, costituita dagli enzimi (superossidodismutasi, catalasi e perossidasi), una seconda barriera difensiva, più aspecifica, ma non per questo poco efficiente, nei confronti delle SCR (12).

In particolare, gli scavenger (lett. "spazzini") sono agenti che riducono la concentrazione di radicali liberi rimuovendoli dal mezzo in cui si trovano, grazie alla loro capacità di interagire direttamente con essi, e, quindi, di inattivarli. Essi comprendono l'ubichinone, i composti tiolici, l'albumina, la bilirubina e l'acido urico (5).

I chain breaker (lett. "che spezzano la catena"), invece, sono agenti in grado di bloccare la propagazione delle reazioni radicaliche a catena. Tra questi sono da citare carotenoidi, tocoferoli ed ascorbato.

Nel complesso, la linea di difesa costituita da scavenger – e chain breaker – è in grado di bloccare l'inizio o impedire la propagazione delle reazioni radicaliche a catena.

Gli agenti di riparo, invece, comprendono esclusivamente enzimi che intervengono dopo che il danno da specie reattive si è instaurato. La loro azione – spesso sequenziale – prevede dapprima l'identificazione del segmento molecolare ossidato, poi la separazione del frammento ormai inutilizzabile e, infine, la sintesi e l'inserimento di un nuovo segmento in sostituzione di quello danneggiato.

Appartengono agli agenti di riparo le idrolasi (glicosidasi, lipasi, proteasi), le trasferasi e le polimerasi, tutte indispensabili per la riparazione del danno da radicali liberi di importanti molecole o strutture cellulari (es. DNA, membrane, ecc).

Ovviamente, quando queste attività idrolitiche superano le capacità di riparazione, esse si traducono in un ulteriore danno tissutale.

È da rilevare che un antiossidante può agire, a seconda delle condizioni e/o delle necessità, anche con più di un meccanismo, tra quelli finora descritti. Per esempio, l'albumina è un antiossidante preventivo, in quanto ha la capacità di chelare il rame (metallo di transizione che catalizza la generazione di radicali alcossili e perossili dagli idroperossidi), ma è anche uno scavenger in virtù della sua capacità di donare specificamente equivalenti riducenti a specie radicaliche, annullandone la potenziale lesività. Analogamente, i carotenoidi agiscono sia da antiossidanti preventivi, in quanto quencher nei confronti del cosiddetto "ossigeno singoletto", sia da scavenger, nei confronti di varie specie radicaliche.

Il sistema di difesa antiossidante è regolarmente distribuito nell'organismo, sia a livello extracellulare che a livello intracellulare.

A livello dei liquidi extracellulari e, in particolare, nel plasma, l'insieme delle sostanze potenzialmente in grado di cedere equivalenti riducenti (atomi di idrogeno o singoli elettroni) si da soddisfare "l'avidità di elettroni" che rende i radicali liberi instabili costituisce la cosiddetta barriera antiossidante (figura 2. 2).

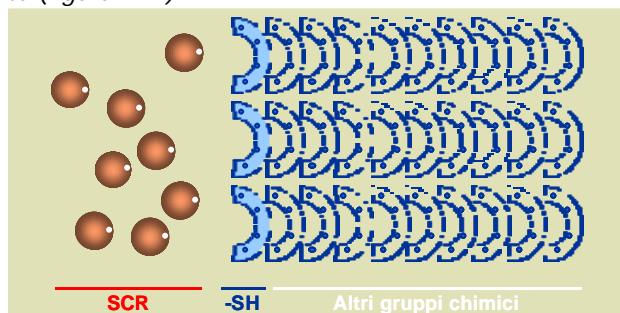


Figura 2. 2 Il sistema antiossidante extracellulare

Ne fanno parte, nel plasma, tutte le proteine e, in particolar modo, l'albumina, la bilirubina, l'acido urico, il colesterolo, e i vari antiossidanti esogeni introdotti con l'alimentazione o sotto forma di integratori dietetici (ascorbato, tocoferolo, polifenoli ecc.). Un ruolo di particolare importanza è svolto, nel contesto di tale barriera, dai gruppi tiolici (-SH).

All'interno delle cellule il sistema di difesa antiossidante ha una sua ben precisa compartimentalizzazione (figura 2. 3).

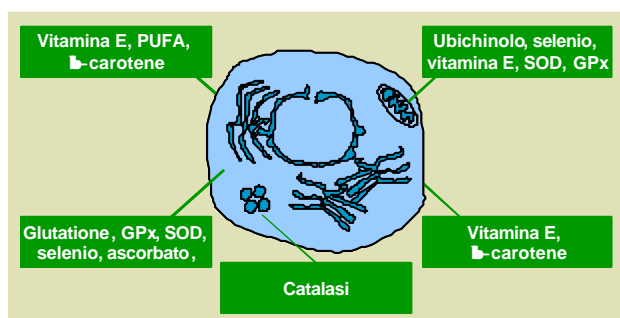


Figura 2. 3 Compartimentalizzazione dei sistemi antiossidanti

È importante sottolineare che gli antiossidanti di tipo enzimatico sono presenti prevalentemente a

livello intracellulare mentre gli altri prevalgono a livello extracellulare. Qui, gli agenti liposolubili (es. tocoferoli), entrando nella compagine delle biomembrane, costituiscono la prima linea di difesa contro l'attacco dei radicali liberi, mentre quelli idrosolubili (es. ascorbato), invece, intervengono soprattutto nel contesto della matrice solubile del citoplasma e degli organuli cellulari.

Va, infine, aggiunto che, accanto alle 3 principali categorie descritte, esiste una quarta classe di antiossidanti di più difficile inquadramento, in quanto non necessariamente riconducibili ad una sostanza chimica. Si tratta dei cosiddetti "agenti di adattamento", ovvero tutte quelle sostanze o tecniche o procedure attraverso le quali è possibile potenziare il sistema antiossidante fisiologico di un organismo. Per esempio, un corretto esercizio fisico o l'adozione di un regime alimentare corretto ed equilibrato sono misure di per sé in grado di controllare il metabolismo ossidativo attraverso la riduzione della produzione di specie reattive e l'induzione di enzimi ad attività antiossidante.

Scopo del presente capitolo è descrivere le proprietà, il metabolismo ed il ruolo biologico specifico dei principali antiossidanti.

## 2. 2 Sequestratori di metalli

Il ferro ed il rame rappresentano due metalli di transizione essenziali per la sintesi e la modulazione dell'attività di numerose proteine, specialmente quelle enzimatiche.

Tuttavia, allo stato libero, essi possono agire da catalizzatori nella scissione dei perossidi (perossido di idrogeno,  $H_2O_2$ , e idroperossidi, R-OOH), che porta alla generazione di radicali liberi estremamente reattivi ed istolesivi, quali l'idrossile, l'alcossile e il perossile, secondo la reazione di Fenton.

Pertanto, la prima strategia di difesa antiossidante dell'organismo è affidata ad una serie di proteine aventi la capacità più o meno specifica di complessare i metalli di transizione ed impedire a questi ultimi di esistere in forma libera e, quindi, di esercitare la loro azione lesiva. Tali proteine sono, a rigore, potenti antiossidanti preventivi, in quanto impediscono la formazione di radicali liberi, come quelli generati, appunto, dalla scissione metallo-catalizzata dei perossidi (20).

Fra le varie proteine ad azione "chelante", la ferritina forma un complesso con il ferro all'interno delle cellule, mentre la transferrina e la lattoferrina legano il ferro nei liquidi extracellulari, nel sangue circolante e nelle secrezioni, rispettivamente. Va rilevato che, in condizioni fisiologiche, la concentrazione plasmatica della transferrina, di circa tre volte superiore a quella necessaria al normale trasporto del ferro, assicura l'assenza di ioni ferro nel plasma. Inoltre, il ferro liberatosi da eventuali processi emo-

litici sotto forma di eme – e che risulta cataliticamente attivo, secondo la reazione di Fenton – viene “bloccato”, nel sangue circolante, da proteine specifiche quali l’aptoglobina (che veicola l’emoglobina) e l’emopessina (che stabilizza l’eme) (35).

La ceruloplasmina ha il compito di chelare specificamente il rame circolante. Analoga funzione viene svolta, sebbene in maniera meno specifica, dall’albumina.

Purtroppo, alcune condizioni, quali l’acidosi, anche lieve, possono indurre una modifica conformazionale delle proteine plasmatiche impegnate nel “sequestro” dei metalli di transizione, provocando il rilascio di questi ultimi in forma libera. Una volta liberi, il ferro o il rame innescheranno la reazione di Fenton con scissione degli idroperossidi organici circolanti in radicali alcossilici e perossilici estremamente reattivi. Dall’azione di questi dipenderà in larga misura il danno dell’endotelio ed il processo di perossidazione di componenti plasmatiche chiave (es. lipoproteine), eventi patogenetici ambedue fondamentali nell’aterosclerosi (vedi capitolo terzo).

Comunque, della conoscenza dei fenomeni appena descritti se ne avvantaggia una speciale forma di trattamento farmacologico, la cosiddetta terapia chelante, che si basa sull’infusione endovenosa di etilendiamminotetraacetato (EDTA), un “sequestratore sintetico” di metalli (figura 2. 4).

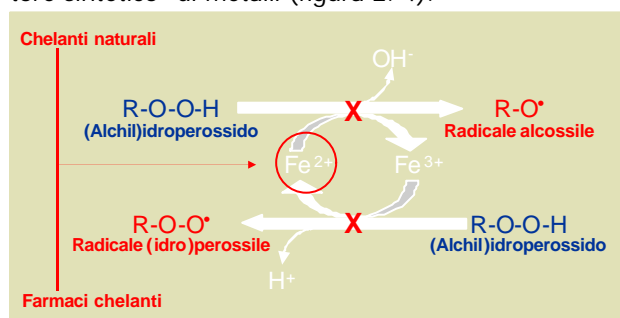
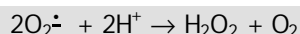


Figura 2. 4 Meccanismo d’azione degli agenti chelanti

### 2. 3 Superossidodismutasi

Scoperta da McCord e Fridovich nel 1968, la superossidodismutasi (SOD) è un enzima, presente praticamente in tutte le cellule, la cui attività catalitica consiste nella dismutazione di 2 molecole di anione superossido in perossido d’idrogeno ed ossigeno molecolare, secondo la reazione:



Tra i prodotti della reazione, il perossido d’idrogeno è un debole ossidante ed è relativamente stabile, in particolare se confrontato con il precursore anione superossido. Questo è il motivo per cui la SOD rientra fra gli enzimi ad azione antiossidante. In realtà, come si è detto, in particolari condizioni, quali l’acidosi, in presenza di metalli di transizione allo stato libero, il perossido d’idrogeno può generare, secondo la reazione di Fenton, il radicale idrossile, il più potente radicale istolesivo.

Tuttavia, in condizioni fisiologiche, ciò non accade e se il perossido d’idrogeno dovesse aumentare oltre misura nella cellula, esso sarebbe definitivamente inattivato dalla catalasi (vedi più avanti).

All’interno delle cellule sono state identificate due isoforme della SOD, la Cu-Zn-SOD e la Mn-SOD. La Cu-Zn-SOD è una proteina dimerica, le cui due subunità, legate tra loro da un ponte disolfuro, sono costituite ciascuna da una catena polipeptidica di 151 amminoacidi legata ad atomo di Cu ed uno di Zn (metalloproteine). Mentre gli ioni Cu probabilmente giocano un ruolo chiave nella catalisi, consentendo all’enzima di interconvertirsi nelle sue due forme funzionali (ossidata e ridotta), gli ioni Zn sembrano abbiano il ruolo di stabilizzare l’enzima dal punto di vista conformazionale. La Cu-Zn-SOD è localizzata elettivamente all’interno del citoplasma (37). La Mn-SOD è una metalloproteina il cui esatto meccanismo d’azione, non ancora ben chiarito, si basa su modifiche redox del manganese. Può trovarsi sia nel citoplasma che nei mitocondri.

Accanto a queste due forme, intracellulari, di SOD ne esisterebbe una terza, a localizzazione extracellulare (EC-SOD).

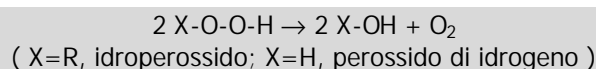
### 2. 4 Sistema delle perossidasi

Una classe importante di sostanze derivate dall’attacco delle SCR su substrati organici, quali glicolipidi, lipidi, amminoacidi, proteine e nucleotidi, sono gli idroperossidi (R-O-O-H) che, insieme al perossido di idrogeno (H-O-O-H o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), costituiscono i cosiddetti perossidi (R-O-O-R).

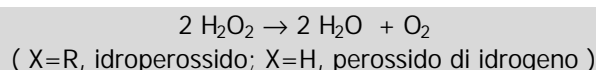
Gli idroperossidi, pur dotati di una certa capacità ossidante, sono relativamente stabili. Tuttavia, in presenza di un metallo di transizione e in ambiente acido, possono essere decomposti liberando radicali altamente reattivi, quali l’alcossile, il perossile e l’idrossile.

Pertanto, fra i sistemi antiossidanti endogeni esiste una classe di enzimi il cui fine è quello di inattivare i perossidi, sì da prevenire il danno che potrebbe derivare dalla loro scissione metallo-catalizzata.

Tali enzimi vengono genericamente definiti perossidasi e mostrano un comune meccanismo d’azione, che prevede la demolizione del perossido con liberazione di una molecola di ossigeno molecolare e una di alcool (se il substrato è un idroperossido) oppure di acqua (se il substrato è il perossido di idrogeno):



La perossidasi che ha come substrato il perossido di idrogeno viene chiamata catalasi (CAT) e catalizza la seguente reazione:



Si tratta di un enzima formato da 4 subunità, ciascuna delle quali contiene un gruppo eme con un sito attivo, stabilizzato da una molecola di NADPH. La CAT si trova nella maggioranza delle cellule animali e vegetali in organuli denominati perossisomi ove la sua funzione è quella di inattivare il perossido di idrogeno. Essa è stata ritrovata anche nel citosol ma il suo ruolo in questo compartimento intracellulare non è completamente noto. In generale, comunque, la CAT viene attivata da elevate concentrazione di perossido di idrogeno e, in qualche modo, lavora in maniera sequenziale rispetto alla SOD, svolgendo un'importantissima funzione antiossidante. Nell'uomo l'enzima è espresso ad elevati livelli nel fegato e negli eritrociti (37).

Le perossidasi in grado di agire non solo sul perossido di idrogeno ma anche su altri perossidi organici presentano come cofattore il glutatione e, pertanto, sono chiamate anche glutatione-perossidasi (GSHPx o GPx) (53).

Il glutatione è un tripeptide costituito da acido glutammico, cisteina e glicina, che può esistere in una forma ridotta (GSH) oppure in una forma dimebrica, ossidata (GS-SG) (figura 2. 5) (17).

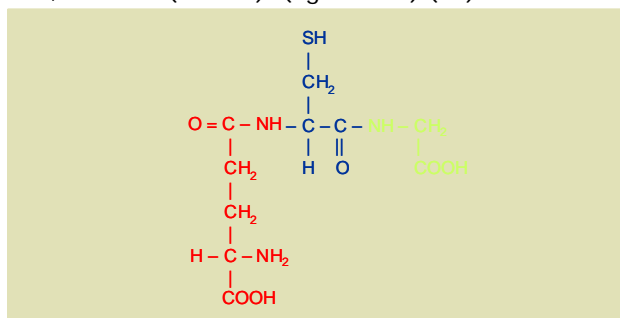


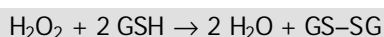
Figura 2. 5 Formula di struttura del glutatione (GSH)

L'interconversione dall'una all'altra forma, resa possibile grazie al gruppo tiolico della cisteina, è sfruttata dalle GPx per catalizzare reazioni di ossidoriduzione finalizzate all'inattivazione del perossido di idrogeno o di altri perossidi, secondo lo schema generale delle perossidasi sopra riportato (17).

Il glutatione ha una diffusione ubiquitaria nei mammiferi nei cui tessuti, agisce non solo come riducente dei perossidi (antiossidante preventivo) ma anche come nucleofilo nei confronti di specie elettrofile radicaliche, come quelle generate dal metabolismo di xenobiotici (scavenger) (45, 60).

I livelli di glutatione intracellulari aumentano fortemente in presenza di elevati livelli di perossidi. In tali condizioni, per evitare reazioni collaterali fra i gruppi tiolici delle proteine ed il GS-SG, quest'ultimo sarebbe escreto grazie all'attivazione di una specifica traslocasi di membrana ATP-dipendente (figura 2. 6) (5).

La classica GPx catalizza la riduzione del perossido d'idrogeno ad acqua ed ossigeno molecolare attraverso la conversione (ossidazione) del GSH a GS-SG:



La GPx è formata da 4 subunità apparentemente uguali e contiene selenio sotto forma di seleniocisteina nelle varie subunità. Pertanto, la carenza di selenio provoca una marcata riduzione dell'attività dell'enzima. Presente nel citosol e nei mitocondri, la GPx agisce attraverso un meccanismo piuttosto complesso che prevede un ciclo di reazioni nel quale sono coinvolti anche la glutatione transidrogenasi e la glutatione reduttasi. Sembra, comunque, che la GPx agisca quando i bassi livelli di perossido d'idrogeno non sono sufficienti ad attivare la catalasi.

La GPx può anche rimuovere molecole di idroperossidi lipidici derivati dai processi di lipoperossidazione.

A questo proposito, giova sottolineare che, oltre alla GPx "classica" appena descritta, esiste anche una GPx, selenio-indipendente, indicata con la sigla Sel-GPx che non metabolizza il perossido di idrogeno ma solo i perossidi organici, con un ruolo, quindi, preferenziale, di protezione specifica nei confronti della lipoperossidazione (15).

In condizioni ideali, la SOD, la CAT e la GPx agiscono in maniera ordinata e sequenziale potenziandosi nel loro importante ruolo di antiossidanti (figura 2. 6).

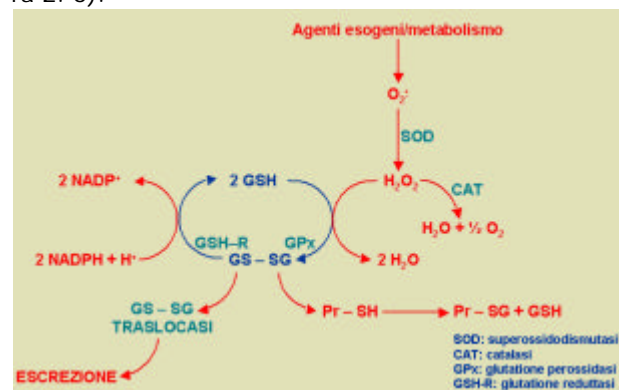


Figura 2. 6 Interazioni fra enzimi antiossidanti

## 2. 5 Vitamina A e caroteni

Sotto la denominazione di "vitamina A" si raggruppa un'intera classe di sostanze poliisoprenoidi poliinsature dotate di attività retinolo-simile (figura 2. 7).

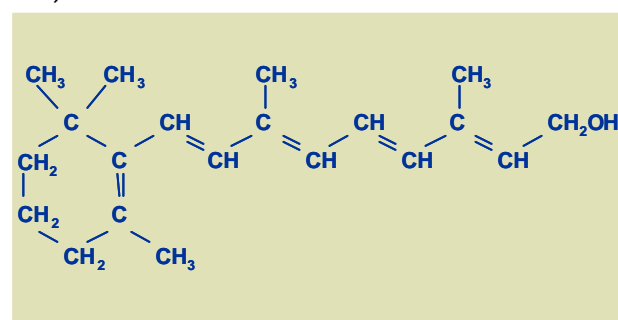


Figura 2. 7 Formula di struttura della vitamina A (retinolo)

Nell'Uomo, la vitamina A viene per lo più generata dalla scissione ossidativa dei caroteni vegetali

per azione di enzimi intestinali, quali la carotene diossigenasi (figura 2. 8).

Essendo fortemente insatura, la vitamina A risulta molto reattiva nei confronti dei radicali perossilici, che vengono intrappolati nella sua molecola, la quale funziona prevalentemente da "chain breaker" piuttosto che da donatrice di equivalenti riducenti. In questo modo, essa risulta particolarmente efficace nel ridurre l'entità della perossidazione lipidica (5, 25, 31, 57).

I caroteni sono lipidi poliisoprenoidi poliinsaturi a lunga catena carboniosa. Fra le numerose specie chimiche diffuse in natura (almeno 600) la più studiata è il  $\beta$ -carotene, presente nei vegetali come pro-vitamina A, e disponibile anche in commercio come una miscela di isomeri *trans* (90%) e *cis* (10%) (figura 2. 8) (6, 16, 19, 28, 29, 34).

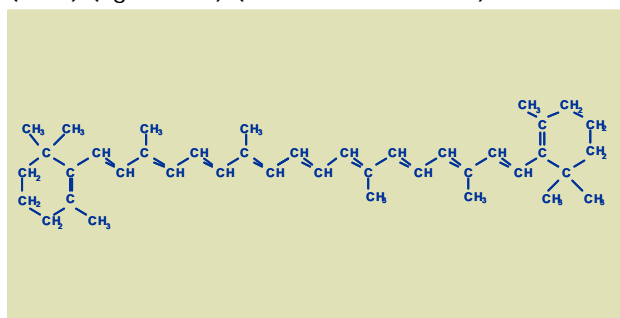
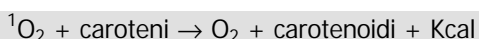


Figura 2. 8 Formula di struttura del  $\beta$ -carotene

Nei vegetali, i caroteni, abbondantemente distribuiti nei cloroplasti, esercitano un'importante funzione di quenching nei confronti del cosiddetto "ossigeno singoletto" generato durante la fotosintesi (6, 16, 19, 28, 29, 34, 59). Infatti, si chiamano proprio "quencher" gli antiossidanti in grado di "smorzare" l'azione potenzialmente ossidante dell'ossigeno singoletto (14).

A questo meccanismo è dovuta in larga misura anche l'azione antiossidante esercitata dal  $\beta$ -carotene negli animali, secondo la reazione:



E' stato calcolato che una molecola di  $\beta$ -carotene è in grado di neutralizzare circa 1000 molecole di ossigeno singoletto senza andare incontro a rottura. Questo aspetto è interessante in quanto recenti studi indicano che il 20% dell'ossigeno molecolare consumato nel corso del "respiratory burst" dei polimorfonucleati è convertito in tale specie reattiva dalla mieloperossidasi. Inoltre, sembra che l'ossigeno singoletto generato nel torrente circolatorio sia inattivato per il 40% dai carotenoidi plasmatici, contro il 20% attribuito all' $\alpha$ -tocoferolo (24).

I caroteni, comunque, possono agire anche da chain breaker. Infatti, si ritiene che il  $\beta$ -carotene sia in grado di interrompere la lipoperossidazione formando un complesso proprio con il radicale idroperossilico ( $\text{R-OO}^*$ ), bloccandone l'azione spiccatamente elettrofila (49).

## 2. 6 Vitamina E e tocoferoli

I tocoferoli, riuniti in 8 principali isomeri sotto la denominazione di vitamina E, sono ampiamente distribuiti in natura e, in particolare, negli oli vegetali. Tra essi, la forma  $\alpha$ , cioè l' $\alpha$ -tocoferolo è risultata essere la più importante per l'attività antiossidante della vitamina E (figura 2. 9) (1, 41, 42).

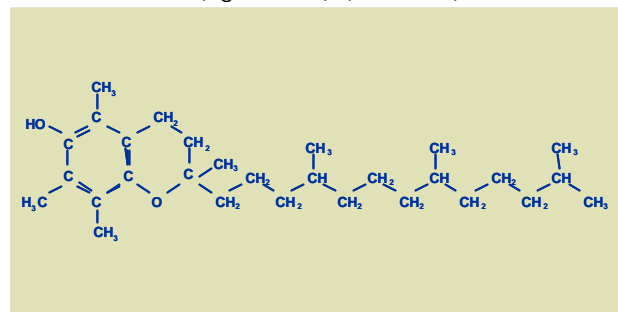


Figura 2. 9 Formula di struttura della vitamina E

L' $\alpha$ -tocoferolo agisce come un antiossidante catturando i radicali lipoperossilici prima che interagiscano con il substrato, prevenendo, in questo modo, il danno a carico di strutture lipidiche complesse e delicate quali le membrane biologiche e le lipoproteine plasmatiche (32, 46).

L' $\alpha$ -tocoferolo agisce non solo singolarmente, ma anche in sinergia con altri antiossidanti, quali carotenoidi, ubiquinone, ascorbato, ecc. In tale contesto, un'importante interazione è quella con la vitamina C sulla superficie della plasmamembrana, in quanto il tocoferolo è lipofilo mentre l'ascorbato è idrofilo; la vitamina C riduce il radicale tocoferilico rigenerando il tocoferolo. Tale recupero può avvenire anche per via enzimatica, o tramite tioli, ubiquinone, glutazione e cisteina (30, 43).

La vitamina E, oltre all'attività antiossidante, esercita un gran numero di altre funzioni. Infatti, essa stabilizza le membrane biologiche regolandone la fluidità, inibisce la lipoossigenasi e modula l'attività della protein chinasi C (4, 58).

## 2. 7 Vitamina C (acido ascorbico)

La vitamina C è una vitamina idrosolubile la cui attività antiossidante, *in vivo*, è legata alla capacità di esistere in una forma ridotta (acido ascorbico) ed una ossidata (acido deidroascorbico) tra loro interconvertibili (figura 2. 10).

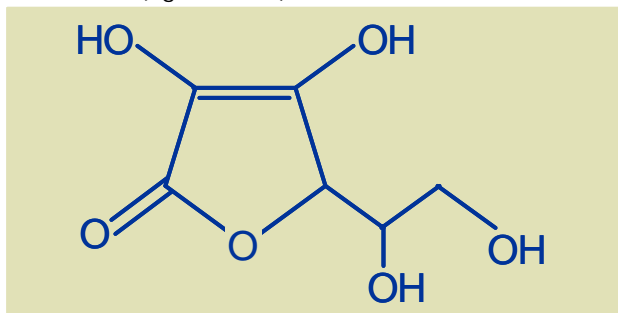


Figura 2. 10 Formula di struttura dell'acido ascorbico

Essa è in grado di agire come scavenger nei confronti dei radicali superossido ed idrossilico e di intrappolare i radicali idroperossilici nella fase acquosa prima che diffondano nei lipidi della plasmamembrana, prevenendo così la lipoperossidazione. Inoltre, è implicata nella rigenerazione della forma non radicalica della vitamina E, dopo che questa ha agito con un radicale libero (23, 60).

Non va dimenticato, comunque, che l'acido ascorbico può anche agire, in determinate circostanze, da agente riducente: per esempio, in presenza di metalli di transizione come il  $Fe^{3+}$  ed il  $Cu^{2+}$  può innescare la perossidazione lipidica. Tuttavia, l'azione antiossidante della vitamina, *in vivo*, risulterebbe globalmente superiore a quella pro-ossidante (48).

## 2.8 Coenzima Q (ubichinone)

L'ubichinone è una sostanza liposolubile il cui nome gli deriva dal fatto di essere presente in tutti i sistemi di accoppiamento di energia legati alle membrane. Alternativamente, esso viene chiamato anche coenzima Q.

Dal punto di vista chimico è un derivato isoprenoide costituito da un anello chinonico e da una catena laterale di lunghezza variabile, in funzione del numero delle unità ripetitive di isoprene.

Uno dei più noti derivati dell'ubichinone è il coenzima  $Q_{10}$ , detto così perché possiede, appunto, una catena laterale di 10 unità isopreniche (figura 2.11).

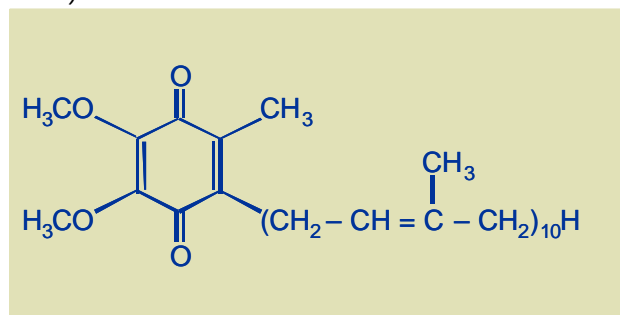
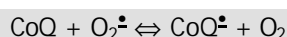


Figura 2.11 Formula di struttura del coenzima  $Q_{10}$

Il coenzima Q viene sintetizzato a livello cellulare lungo la via del mevalonato (la stessa del colesterolo) che ha inizio nel reticolo endoplasmatico. Da qui esso viene traslocato nel Golgi e quindi nelle varie sedi cellulari, quali la plasmamembrana e la membrana dei mitocondri. Una piccola quota è rilevabile anche nel sangue.

Oltre ad essere uno dei principali trasportatori di elettroni, il coenzima Q rientra in un complesso sistema di ossido-riduzioni a livello mitocondriale (2).

In realtà, l'ubichinone può comportarsi sia da scavenger, interagendo interamente con specie radicaliche, sia da generatore di specie reattive, attraverso il fenomeno dell'autoossidazione:

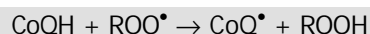


L'equilibrio di questa reazione dipende dalle condizioni chimiche del microambiente. Infatti, in ambiente aprotico l'equilibrio è spostato verso destra (funzione antiossidante) mentre in un ambiente idrofilico esso è spostato verso sinistra (funzione pro-ossidante) (5).

Pertanto, la zona centrale del bilayer fosfolipidico delle membrane biologiche costituisce un ambiente ottimale per l'attività antiossidante dell'ubichinone nei confronti della lipoperossidazione. Tale attività è esercitata principalmente dalla forma ridotta del coenzima, detta anche ubichinolo ( $QH_2$ ).

Il relativo meccanismo, tuttavia, resta da chiarire, anche se sono state avanzate due suggestive ipotesi.

Secondo la prima, l'ubichinone agirebbe da chain breaker donando idrogeno per ridurre il radicale perossilico o alcossilico:



Secondo l'altra ipotesi, invece, l'ubichinolo reagirebbe con la vitamina E ossidata (radicale fenossilico) consentendone il recupero attraverso una serie di reazioni cicliche (figura 2.12).

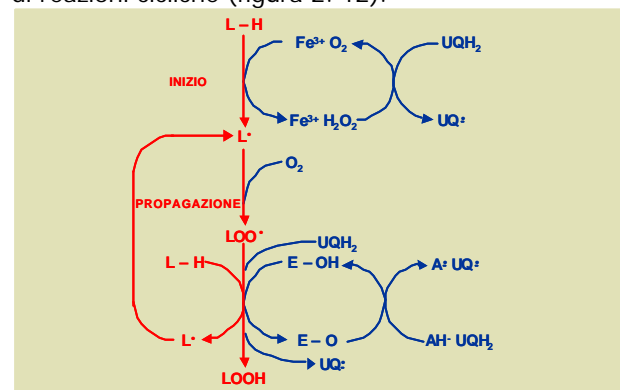


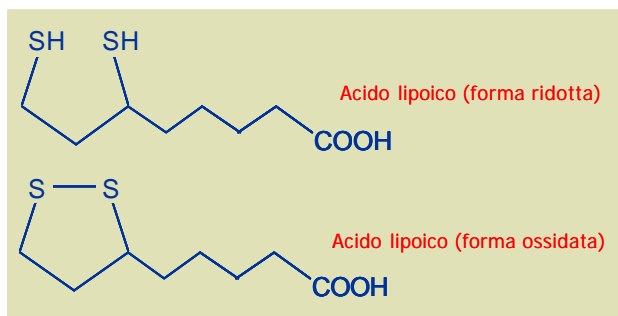
Figura 2.12 Antiossidanti e perossidazione lipidica

Pertanto, l'ubichinone possiede effetti protettivi nei confronti del danno ossidativo verso i lipidi, le proteine e il DNA. Nel caso dei lipidi esso agisce come preventivo nei confronti sia dell'inizio che della propagazione, mentre la vitamina E interviene come chain breaker inibendo specificamente la propagazione, ma non la reazione di inizio (13, 44).

## 2.9 Acido lipoico

L'acido  $\alpha$ -lipoico o acido 6,8-ditioctico – sintetizzato dagli animali e dall'Uomo, ma prontamente assorbito anche con gli alimenti – è uno dei 5 cofattori del sistema enzimatico che catalizza la decarbossilazione ossidativa degli  $\alpha$ -chetoadidi (piruvato,  $\alpha$ -chetoglutarato, ecc.) (7, 55, 56).

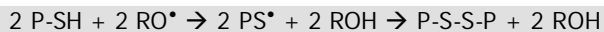
Come la vitamina C ed il glutatione, anch'esso deve la sua attività antiossidante alla sua capacità di esistere in una forma ridotta, l'acido diidrolipoico (DHLA), ed una forma ossidata, l'acido  $\alpha$ -lipoico propriamente detto (figura 2.13) (7, 55, 56).


**Figura 2. 13** Formule di struttura dell'acido lipoico

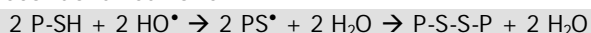
L'acido  $\alpha$ -lipoico, che è attivo contro numerose SCR (es. ossigeno singoletto, radicale idrossilico, acido ipocloroso) ma non contro alcune ROS (es. anione superossido e perossido d'idrogeno), è anche in grado di chelare gli ioni metallici e di rigenerare altri antiossidanti dalla loro forma radicalica, con meccanismo diretto (es. ascorbato) o indirettamente (es. vitamina E) (3, 11, 26, 27, 50).

## 2. 10 Tioli

Tra gli scavenger idrosolubili, i tioli rappresentano una componente qualitativamente significativa della barriera antiossidante sia intracellulare (GSH) che plasmatica. In particolare, i gruppi sulfidrilici (SH) delle molecole dei componenti plasmatici (quali, ad esempio, le proteine, PSH) sono in grado di opporsi alla fase di propagazione dei processi radicalici grazie alla loro capacità di inattivare i radicali alcossilici ( $RO^{\bullet}$ ), secondo la reazione:



I tioli, inoltre, sono anche in grado di neutralizzare l'azione istolesiva del radicale idrossilico ( $HO^{\bullet}$ ), secondo la reazione:

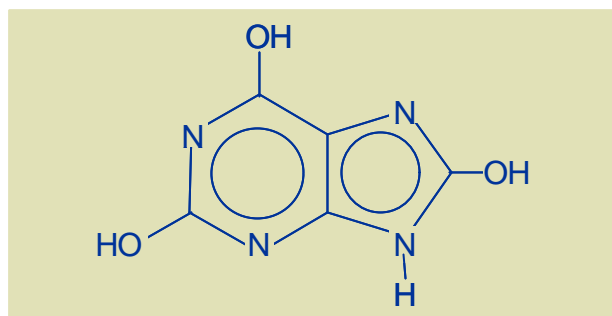


Considerando questi eventi dal punto di vista stechiometrico, una coppia di gruppi tiolici può ridurre una coppia di radicali alcossilici ( $RO^{\bullet}$ ) o idrossilici ( $HO^{\bullet}$ ), cedendo ad essa due elettroni (sotto forma di due atomi di idrogeno).

In questo modo ambedue i tipi di radicali vengono inattivati: i radicali alcossilici sono rilasciati come molecole di alcool mentre i radicali idrossilici diventano innocue molecole d'acqua. I gruppi tiolici ormai ossidati, invece, reagiscono tra loro, generando ponti disolfuro.

## 2. 11 Acido urico

L'acido urico viene prodotto in seguito a ossidazione della xantina, ad opera o della xantina ossidasi (nel corso del catabolismo purinico) o della xantina deidrogenasi (nel corso del cosiddetto danno da ischemia-riperfusion) (figura 2. 14).


**Figura 2. 14** Formula di struttura dell'acido urico

Sostanza idrosolubile, a basso peso molecolare, si accumula nei liquidi corporei a concentrazione di 0.25-0.44 mM; a pH fisiologico esso è presente completamente in forma ionizzata (urato), carica negativamente; come prodotto del catabolismo purinico esso viene eliminato attraverso le urine (18, 52).

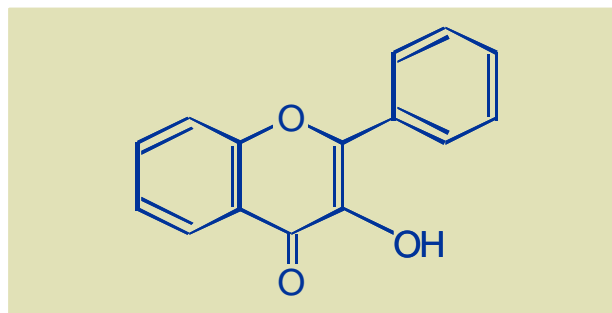
Si è visto che l'urato è un potente antiossidante ad azione scavenger nei confronti del radicale idrossilico, dell'acido ipocloroso, dell'ossigeno singoletto e dell'ozono.

Inoltre, esso è in grado di chelare ioni di metalli di transizione (quali ferro e rame) prevenendo non solo la generazione di ROS, ma anche l'ossidazione ferro-dipendente dell'ascorbato e la stessa lipoperossidazione (10, 21, 40).

## 2. 12 Altri antiossidanti

Oltre agli agenti fin qui descritti esistono altre sostanze ad attività antiossidante, quali la bilirubina, i ginkgolidi e, in particolare i flavonoidi (33, 36, 54).

I flavonoidi sono dei polifenoli, ampiamente presenti nei vegetali, che hanno dimostrato di possedere una ben documentata attività antiossidante e di chelazione dei metalli così da poter ricoprire un ruolo importante nel controllo dello stress ossidativo (figura 2. 15) (8, 22, 38, 47, 51).


**Figura 2. 15** Formula di struttura del diidroflavonolo

Appartiene, tra l'altro, ai flavonoidi il noto resveratrolo, responsabile del potere antiossidante di numerosi vini rossi e, probabilmente, del cosiddetto "paradosso francese".

## Bibliografia

1. Barclay L, Locke S, MacNeil J. *The autoxidation of unsaturated lipids in micelles. Synergism of inhibitors of vitamin C and E.* Can J Chem. **1983**. 61: 1288-1290.
2. Bargossi AM, Battino M, Gaddi A, Fiorella PL, Grossi G, Barozzi G, Di Giulio R, Descovich G, Sassi S, Genova ML, Lenaz G. *Exogenous CoQ<sub>10</sub> preserves plasma ubiquinone levels in patients treated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors.* Int J Clin Lab Res. **1994**. 24: 171-176.
3. Bonomi F, Pagani S. *Removal of ferritin-bound iron by DL-dihydrolipoate and DL-dihydrolipoamide.* Eur J Biochem. **1986**. 155: 295-300.
4. Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey, C Azzi A. *Inhibition of cell proliferation by tocopherol: role of protein kinase C.* J Biol Chem. **1991**. 266: 188-194.
5. Braga PC. *I radicali ossidanti, le patologie polmonari: l'acido ascorbico.* Springer. **1997**.
6. Burton GW, Ingold KU.  *$\beta$ -carotene: an unusual type of lipid antioxidant.* Science. **1983**. 224: 569-573.
7. Carreau IP. *Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids.* Meth Enzymol. **1979**. 62: 152-158.
8. Cotelle N, Bernier IL, Henichart IP, Catteau IP, Gaydou E, Wallet IC. *Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavons.* Free Rad Biol Med. **1992**. 31: 211-219.
9. Cotgreave IA, Moldeus P, Orrenius S. *Host biochemical defence mechanism against prooxidants.* Annu Rev Pharmacol Toxicol. **1988**. 28: 189-212.
10. Davies KIA, Sevanian A, Muakkassah-Key SF, Hochstein P. *Uric acid-ion ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid.* Biochem J. **1986**. 235: 747-754.
11. Devasagayama TPA, Subramanian M, Pradhan DS, Sies H. *Prevention of singlet oxygen-induced DNA damage by lipoate.* Chem Biol Interact. 1993. 86: 79-92.
12. Diplock AT. *Antioxidants and free radical scavengers.* In: Rice-Evans CA, Burdon RH. Free radical damage and its control. Elsevier Science BV, Amsterdam. **1994**. Pp. 113-130.
13. Folkers K, Littarm GP, Yamagami T, Lenaz T. *The bio medical and clinic aspects of coenzyme Q.* Clin Invest. **1993**. 71(Supp) 51: 176.
14. Foote CS, Denny RW, Weaver L, Chan Y, Peters J. *Quenching of singlet oxygen.* Ann NY Acad Sci. **1970**. 171: 139-148.
15. Forstrom JW, Zokowski JJ, Tappel AL. *Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine.* Biochemistry. **1978**. 17: 2639-2644.
16. Frank HA. *Physical and chemical properties of carotenoids.* Ann NY Acad Sci. **1993**. 692:1-9.
17. Gibson DO, Hawrylko J, McCay PB. *GSH-dependent inhibition of lipid peroxidation: properties of a potent cytotoxic system which protects cell membrane.* Lipids. **1985**. 20: 704-711.
18. Grootveld M, Halliwell B. *Measurement of allantoin and acid uric in human body fluids.* Biochem J. **1987**. 243: 803-808.
19. Gross J. *Pigments in vegetables. Chlorophylls and carotenoids.* Van Nostrand Reinhold Eds, New York. **1991**.
20. Gutteridge JMC. *Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin: a study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis.* Biochem Biophys Acta. **1986**. 869: 119-127.
21. Halliwell B. *Uric acid: an example of antioxidant evaluation.* In Cadenas E, Packer L. Handbook of antioxidants. Marcel Dekker Inc, New York. **1996**. Pp. 243-256.
22. Husain SR, Cillard I, Cillard P. *Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids.* Phytochemistry. **1987**. 26: 2489-2491.
23. Kalyanaraman B, Darley-Usmar VM, Wood I, Joseph I, Parthasarathy S. *Synergistic interaction between the probucol phenoxyl radical and ascorbic acid in inhibition the oxidation of low density lipoprotein.* J Biol Chem. **1992**. 267: 6789-7502.
24. Kanofsky JR. *Quenching of singlet oxygen by human plasma.* Photochem Photobiol. **1990**. 51: 299-303.



25. Kin Y, English C, Reich P, Geber LE, Simpson KL. *Vitamin A and carotenoids in human milk*. J Agric Food Chem. **1990**. 38: 1930-1933.
26. Kogan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Powell R, Packer L. *Dihydrolipoic acid a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase*. Biochem Pharmacol. **1992**. 44: 1637-1649.
27. Kour H, Halliwell B. *Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products*. Chem-Biol Interact. **1990**. 73: 235-247.
28. Krinsky N. *Actions of carotenoids in biological system*. Annu Rev Nutr. **1993**. 13: 561-587.
29. Krinsky N. *Antioxidant functions of carotenoids*. Free Rad Biol Med. **1989**. 7: 617.
30. Liebler DC, Kling DA, Reed DJ. *Antioxidant protection of phospholipid bilayers by  $\alpha$ -tocopherol*. J Biol Chem. **1986**. 261: 12114-12119.
31. Livrea MA, Tesoriere L, Freisblen HJ. *Vitamin A as an antioxidant*. In: Cadenas E, Packer L. Handbook of antioxidants. Marcel Dekker, New York. **1996**. Pp. 371-405.
32. Maguire JJ, Wilson DS, Packer L. *Mitochondrial electron transport-linked tocopheroxyl radical reduction*. J Biol Chem. **1989**. 264: 21462-21465.
33. Maitra I, Marcocci L, Droy-Lefaix MT, Packer L. *Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGB 761*. Biochem Pharmacol. **1995**. 49: 1649-1665.
34. Mangels AR, Holden JM, Beecher GR, Forman MR, Lanza E. *Carotenoids contents of fruit and vegetables: an evaluation of analytic data*. J Am Diet Assoc. **1993**. 93: 284-296.
35. Maples KR, Jordan SI, Mason RP. *In vivo rat hemoglobin thyl free radical formation following administration phenylhydrazinic and hydrazine-based drugs*. Drug Metab Disp. **1988**. 16: 799-803.
36. Marcocci L, Maguire II, Droy-Lefaix MT, Packer L. *The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGB 761*. Biochem Biophys Res Commun. **1994**. 201: 748-755.
37. Marklund Si, Westman NG, Lundgren E, Roos G. *Copper and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues*. Cancer Res. **1982**. 42: 1955-1961.
38. Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G. *Red wine and antioxidant activity in serm*. Lancet. **1994**. 344: 193-194.
39. Maxwell SJR. *Prospect for the use of antioxidant therapies*. Drugs. **1995**. 49: 345-361.
40. Meadows I, Smith RC, Reeves I. *Uric acid protects membranes and linoleic acid from ozone-induced oxidation*. Biochem Biophys Res Commun. **1986**. 137: 536-541.
41. Motoyama T, Kuki M, Mino M, Takahashi M, Niki E. *Synergistic inhibition of oxidation in dispersed phosphatidylcholine liposomes by a combination of vitamin E and cysteine*. Arch Biochem Biophys. **1989**. 270: 655-661.
42. Niki E, Noguchi N, Gotoh N. *Dynamics of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidants*. Biochem Soc Trans. **1989**. 21: 313-317.
43. Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N. *Interaction among vitamin C, vitamin E, and  $\beta$ -carotene*. Am J Clin Nutr. **1995**. 62 (Suppl): 1322S-1326S.
44. Nohl H, Stolze K. *Ubisemiquinones of the mitochondrial respiratory chain do not interact with molecular oxygen*. Free Rad Res Commun. **1992**. 16: 409-419.
45. Oshino N, Chance B. *Properties of glutathione release observed during reduction of organic hydroperoxide, demethylation and aminopyrine and oxidant of some substances in perfused rat liver, and their implications for the physiological function of catalase*. Biochem J. **1977**. 162: 509-525.
46. Packer L. *Interactions among antioxidants in health and disease: vitamin E and its redox cycle*. Proc Soc Expt Biol Med. **1992**. 200: 271-276.
47. Ratty AK, Das NP. *Effects of flavonoids on non-enzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship*. Biochem Med Metab Biol. **1988**. 39: 69-79.

48. Rowley DA, Halliwell B. *Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide and ions salts by superoxide and ascorbate-dependent mechanism: relevance to the pathology of rheumatoid disease.* Clin Sci. **1983**. 64: 649-653.
49. Samokyszyn VM, Marnett LJ. *Inhibition of liver microsomal peroxidation by 13-cis retinoic acid.* Free Rad Biol Med. **1990**. 8: 491-496.
50. Scholick H, Murphy ME, Sies H. *Antioxidant activity of dihydrolipoate against microsomal lipid peroxidation and its dependence on  $\alpha$  tocopherol.* Biochim Biophys Acta. **1989**. 100: 256-261.
51. Shiraki M, Hara Y, Osawa T, Kumon H, Nakayama T, Kawakishi S. *Antioxidative and antimutagenic effects of theaflavins from black tea.* Mutat Res. **1994**. 323: 29-34.
52. Soberon G, Cohen PP. *Peroxidative formation of alloxan from uric acid by leucocytes.* Arch Biochem Biophys. **1963**. 103: 331-337.
53. Splittgerber AG, Tappel AL. *Inhibition of glutathione peroxidase by cadmium and other metals ions.* Arch Biochem Biophys. **1979**. 197: 534-542.
54. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance.* Science. 1987. 235: 1043-1046.
55. Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L. *Thioctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species.* Free Rad Res Commun. **1991**. 15: 255-263.
56. Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L. *Antioxidant activities of dihydrolipoic acid and its structural homologues.* Free Rad Res Commun. **1993**. 18: 115-122.
57. Swanson JE, Parker RS. *Biological effects of carotenoids in humans.* In: Cadenas E, Packer L. Handbook of antioxidants. Marcel Dekker, New York. **1996**. Pp. 337-367.
58. Urano S. *Membrane stabilization by vitamin E* In: Mino M, Nakamura H, Diplock AT, Kayden HJ. Vitamin E. Japan Science Society Press, Tokyo. **1993**. Pp. 41-50.
59. Wagner J, Motchnik P, Stocker R, Sies H, Ames B. *The oxidation of blood plasma and low density lipoprotein components by chemically generated singlet oxygen.* J Biol Chem. **1993**. 268: 18502-18506.
60. Wefers H, Sies H. *The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E* Eur J Biochem. **1988**. 174: 353-357.