Conferenţiar universitar dr. Virgil DARIE

BIOCHIMIE MEDICALĂ

Vol. I

ORGANIZAREA MOLECULARĂ ŞI MACROMOLECULARĂ A ORGANISMULUI UMAN

EDITURA ► AMON ◄ CRAIOVA - 1994 -

Motto.

Cel care munceşte, greşeşte.
Ca să nu greşeşti, trebuie să nu munceşti...
Dar asta-i cea mai mare greşeală!

Albert Szent-Györgyi

PREFAŢĂ

In arsenalul ştiinţelor contemporane Biochimia s-a impus ca o disciplină de bază, de însemnătate primordială, cu implicaţii profunde în sfera ştiinţelor biologice teoretice şi aplicate.

Dezvoltarea dinamică, rapidă şi multilaterală a biochimiei în ultimele patru decenii, reprezintă una din cele mai remarcabile cuceriri ale ştiinţelor contemporane.

Este semnificativ faptul că cele mai multe din Premiile Nobel pentru medicină au fost decernate cercetătorilor din domeniul Biochimiei.

Lucrarea de faţă se adresează, în primul rând, studenţilor de la facultăţile cu profil medical, biologic, chimic, cât şi medicilor specialişti în laboratorul clinic.

In acest prim volum, informaţia biochimică se referă la " organizarea moleculară şi macromoleculară a organismului uman ", fiind în acelaşi timp un îndreptar pentru înţelegerea fenomenelor biologice normale şi patologice.

Redactarea prezentei lucrări s-a făcut ţinând seama de nomenclatura actuală utilizată în biochimia modernă.

In speranţa că manualul de faţă va fi un material documentar util pentru cei interesaţi, aşteptăm sugestiile şi eventualele observaţii constructive, care vor constitui pentru autor puncte de referinţă în elaborarea ediţiilor viitoare.

Autorul

PREFACE

In the "arsenal" of the contemporary sciences, Biochemistry has compelled recognition as a fundamental science of primordial importance, having deep implications in the sphere of theoretic and applied biological sciences.

The dynamic, rapid and multilateral development of Biochemistry in the last four decades represents one of the most remarkable conquests of the contemporary sciences.

It is very significant the fact that the most Nobel Prizes in Medicine were awarded to the researchers in the line of Biochemistry.

This work is applied to both medical, biological and chemical students and specialists in clinical laboratory.

In the first volume, biochemical information refers to "the molecular and macromolecular organization of the human body", being in the same time a guidebook for the correct understanding of the biological phenomena in normal state and Pathology.

In order to elaborate this work I took into account the topical nomenclature used in the modern Biochemistry.

I hope that the present piece of work will be an useful documentary material. I'm looking forward to all the constructive suggestions.

The Author

Abrevieri utilizate în text

A = adenină.
Ala = alanină.
Arg = arginină.
Asn = asparagină.
Asp = acid aspartic.
Asp-NH_2 = asparagină.
ADN = acid deoxiribonucleic.
ARN = acid ribonucleic.
mARN = acid ribonucleic mesager.
rARN = acid ribonucleic ribozomal.
tARN = acid ribonucleic de transfer.
AMP = acid adenozin monofosfat.
ADp = acid adenozin difosfat.
ATP = acid adenozin trifosfat.
ACTH = hormon adrenocorticotrop.
C = citozină.
Cys = cisteină.
CMP = citidin monofosfat.
CDP = citidin difosfat.
CTP = citidin trifosfat.
CoA~SH = coenzima A.
2,3 DPG = acid 2,3 difosfogliceric.
E = enzimă.
ES = complex enzimă substrat.
EC = Enzime Comission.
EDTA = acid etilen diamino tetraacetic.
FAD,$FADH_2$ = flavin-adenin dinucleoid oxidat şi redus.
G = guanină.
GABA = acid γ aminobutiric.
Gal = galactoză.
GalNAc = N-acetil galactozamină.
Glu = acid glutamic.
Glu-NH_2 = glutamină.
GMP = guanozin monofosfat.
GDP = guanozin difosfat.
GTP = guanozin trifosfat.
Hb = hemoglobină.
HbO_2 = oxihemoglobină.
HbCO = carboxihemoglobină.
His = histidină.
LT = leucotriene.
LX = lipoxine.
ψ = pseudoracil
NAD^+,NADH = nicotinamid adenindinucleotid -oxidat şi redus.
$NADP^+$,NADPH = nicotinamid adenindinucleotid -oxidat şi redus.
NANA = acid N-acetil neuraminic.
Pi = fosfat anorganic.
PPi = pirofosfat anorganic.
PTA = proteina transportoare de grupări acil.
SAM = S-adenozil metionina.
T = timină.
TSH = hormon tireotrop.
TPP = tiamin pirofosfat.
Tx = tromboxan.
U = uracil.
UMP = uridin monofosfat.
UDP = uridin difosfat.
UTP = uridin trifosfat.
UI = Unităţi internaţionale.
FH_4 = acid tetrahidrofolic.
1,25-DHCC = 1,25-dihidroxi colecalciferol.
PAB = acid paraaminobenzoic.

CUPRINS

1.	**PROTEINE (PROTIDE)**	**13**
1.1	**Consideraţii generale**	**13**
1.1.1	Caracterizare generală a proteinelor	13
1.1.2	Clasificarea proteinelor	13
1.1.3	Rolurile biologice ale proteinelor	14
1.2	**Aminoacizi**	**17**
1.2.1	Caracteristici generale, clasificare	17
1.2.2	Aminoacizi care nu participă în structura proteinelor	23
1.2.3	Proprietăţile fizice, chimice şi biologice ale aminoacizilor	24
1.2.3.1	Aminoacizi esenţiali	24
1.2.3.2	Proprietăţile ionice ale aminoacizilor	25
1.2.3.3	Proprietăţile chimice ale aminoacizilor	27
1.3	**Peptide**	**30**
1.3.1	Caracterizare generală	30
1.3.2	Dipeptide	31
1.3.3	Tripeptide	32
1.3.4	Polipeptide cu activitate biologică	34
1.4	**Structura proteinelor**	**35**
1.4.1	Structura primara	36
1.4.2	Structura secundară	39
1.4.2.1	Modelul α helix	39
1.4.2.2	Tipuri de legături din structura proteinelor	42
1.4.2.3	Modelul în " planuri pliate "	43
1.4.2.4	Modelul tip colagen	44
1.4.3	Structura terţiară	46
1.4.4	Structura cuaternară	48
1.4.5	Morfologia moleculelor proteice	49
1.5	**Proprietăţile generale ale proteinelor**	**50**
1.5.1	Proprietăţi electrochimice. Electroforeza	50
1.5.2	Denaturarea proteinelor	52
1.5.3	Proprietăţi imunologice	53
2	**HETEROPROTEIDE**	**56**
2.1	**Metalproteide**	**56**
2.2	**Fosfoproteide**	**57**
2.3	**Glicoproteide. Proteoglicani**	**58**
2.4	**Lipoproteide**	**59**
2.5	**Cromoproteide**	**60**

2.5.1 Hemoglobinele 60
2.5.1.1 Structura hemoglobinei 61
2.5.1.2 Hemoglobine fiziologice 65
2.5.1.3 Hemoglobine anormale şi patologice 66
2.5.1.4 Combinarea hemoglobinei cu gazele 68
2.5.1.5 Interacţiunea 2,3-DPG cu hemoglobina 71
2.5.1.6 Mioglobina 73
2.5.1.7 Citocromii 74

2.6 Nucleoproteide 76
2.6.1 Caracterizare generală 76
2.6.2 Componenţi structurali 77
2.6.2.1 Componenta proteică 78
2.6.2.2 Pentoze 78
2.6.2.3 Baze azotate 78
2.6.2.4 Nucleozide 80
2.6.2.5 Nucleotide 81
2.6.2.6 Nucleotide naturale libere 82
2.6.2.7 Nucleotide polifosfaţi cu rol de compuşi macroergici 83
2.6.2.8 Caracterizare generală a nucleotidelor 85
2.6.2.9 Polinucleotide. Structura primară a ADN 86
2.6.2.10 Structura secundară a ADN 87
2.6.2.11 Funcţiile biologice ale ADN 90
2.6.2.12 Proprietăţi generale ale ADN 91
2.6.2.13 Acizii ribonucleici 93
2.6.2.14 Acizii nucleici virali 99

3 ENZIME 101

3.1 Consideraţii generale 101
3.1.1 Generalităţi. Istoric 101
3.1.2 Caracteristici generale ale enzimelor 101
3.1.3 Nomenclatura şi clasificarea enzimelor 103
3.1.4 Localizarea intracelulară a enzimelor 105

3.2 Structura enzimelor 106
3.2.1 Enzime monocomponente şi bicomponente 106
3.2.2 Situs catalitic. Situs alloateric 107
3.2.3 Cofactori enzimatici 109
3.2.4 Mecanismul de acţiune al enzimelor 112
3.2.4.1 Ipoteza tip "lacăt-cheie" 112
3.2.4.2 Teoria ajustării induse 113
3.2.4.3 Cataliza covalentă 113
3.2.4.4 Cataliza acido bazică generală 115
3.2.5 Izoenzime 116

3.3 Specificitatea enzimelor 118
3.3.1 Specificitatea de reacţie 118

3.3.2	Specificitatea de substrat	119
3.3.2.1	Specificitatea optică	119
3.3.2.2	Specificitatea relativă de grup	120
3.3.2.3	Specificitatea absolută	121
3.4	**Influenţa factorilor fizico chimici asupra activităţii enzimelor**	**122**
3.4.1	Influenţa temperaturii	122
3.4.2	Influenţa pH-ului	123
3.4.3	Alţi factori care influenţează activitatea enzimatică	124
3.5	**Cinetica enzimatică . . . . . .**	**125**
3.5.1	Energia de activare	125
3.5.2	Ordinul de reacţie	126
3.5.3	Curba de saturare cu substrat	128
3.5.4	Ecuaţia Michaelis-Menten	129
3.5.5	Constantele cinetice ale enzimelor	132
3.5.6	Ecuaţia Lineweaver-Burk	133
3.5.7	Efectori enzimatici	134
3.5.7.1	Activatori enzimatici	135
3.5.7.2	Inhibiţia competitivă	135
3.5.7.3	Inhibiţia necompetitivă	138
3.5.7.4	Inhibiţia allosterică	140
3.5.7.5	Postulatele structurii enzimelor allosterice	141
3.5.7.6	Mecanismul de acţiune al enzimelor allosterice	142
4	**VITAMINE ŞI COENZIME . . . . .**	**145**
4.1	**Consideraţii generale . . . . . .**	**145**
4.1.1	Istoric. Generalităţi	145
4.1.2	Clasificare. Corelaţia vitamine-enzime	146
4.2	**Vitamine liposolubile . . . . . .**	**147**
4.2.1	Vitamina A	148
4.2.2	Vitaminele D	152
4.2.3	Vitaminele E	155
4.2.4	Vitaminele K	158
4.3	**Vitamine hidrosolubile . . . . . .**	**161**
4.3.1	Vitamina C	161
4.3.2	Vitamina P	164
4.3.3	Vitamina B_1	165
4.3.4	Vitamina B_2	167
4.3.5	Vitamina PP	169
4.3.6	Vitamina B_6	171
4.3.7	Acidul pantotenic	173
4.3.8	Biotina	175
4.3.9	Acidul lipoic	178
4.3.10	Acidul paraaminobenzoic	179

4.3.11	Acizii folici	180
4.3.12	Vitamina B_{12}	183
5	**GLUCIDE . . . . . .**	**187**
5.1	**Consideraţii generale . . . . .**	**187**
5.1.1	Definiţie. Nomenclatură	187
5.1.2	Clasificarea glucidelor. Roluri biologice	187
5.2	**Structura monoglucidelor . . . . .**	**188**
5.2.1	Caracterizarea monoglucidelor	188
5.2.2	Structura şi izomeria monoglucidelor	188
5.2.3	Structura perspectivică tip Haworth	190
5.2.4	Seriile D şi L ale monoglucidelor	191
5.3	**Proprietăţi fizice şi chimice ale monoglucidelor . .**	**194**
5.3.1	Proprietăţi fizice şi optice	194
5.3.2	Proprietăţi chimice ale ozelor	195
5.3.2.1	Reacţii datorate grupării carbonil	195
5.3.2.2	Proprietăţi chimice datorate -OH	197
5.3.2.3	Epimerizarea ozelor	200
5.4	**Principalii reprezentanţi ai ozelor . . .**	**201**
5.4.1	Trioze şi tetroze	201
5.4.2	Pentoze	201
5.4.3	Hexoze	203
5.4.4	Deoxiglucide. Aminoglucide	203
5.5	**Oligoglucide . . . . . .**	**205**
5.6	**Poliglucide. Poliozide . . . . .**	**207**
5.6.1	Homoglicanii	208
5.7	**Glicoproteide. Proteoglicani . . . .**	**212**
5.7.1	Glicoproteidele	212
5.7.1.1	Biosinteza glicoproteidelor	213
5.7.1.2	Importanţa biologică a glicoproteidelor	216
5.7.2	Proteoglicani. Glicozaminoglicani	218
5.7.2.1	Acidul hialuronic	218
5.7.2.2	Heparina	220
5.7.2.3	Condroitin sulfaţii. Dermatan sulfaţii	221
6	**LIPIDE . . . . . .**	**226**
6.1	**Definiţie. Clasificare. Roluri biologice . . .**	**226**
6.2	**Componenţii structurali ai lipidelor . . .**	**227**
6.2.1	Acizii graşi	227
6.2.1.1	Acizii graşi saturaţi	227
6.2.1.2	Acizii graşi nesaturaţi	228
6.2.1.3	Acizii graşi particulari	231

494.429

6.2.1.4	Proprietăţi generale ale acizilor graşi	233
6.2.2	Alcooli constituienţi ai lipidelor	234
6.2.2.1	Alcooli alifatici neazotaţi	235
6.2.2.2	Aminoalcooli	235
6.2.2.3	Alcooli ciclici	237
6.3	**Acil gliceroli (Gliceride)**	**237**
6.3.1	Caracterizare generală. Structură. Transport	237
6.3.2	Proprietăţi generale ale acilglicerolilor	239
6.4	**Ceride**	**241**
6.5	**Steride**	**242**
6.5.1	Generalităţi. Clasificare. Reprezentanţi	242
6.5.2	Colesterolul	244
6.5.2.1	Surse de colesterol. Sinteză	244
6.5.2.2	Structura colesterolului. Izomerie	245
6.5.2.3	Rolurile biologice ale colesterolului	245
6.5.3	Acizii biliari	246
6.5.3.1	Acizii biliari primari şi secundari	246
6.5.3.2	Circuitul enterohepatic al acizilor biliari	249
6.5.3.3	Proprietăţile şi rolurile biologice ale acizilor biliari	249
6.6	**Lipide complexe. (Heterolipide)**	**250**
6.6.1	Glicerofosfolipide	251
6.6.1.1	Glicerofosfolipide cu azot	252
6.6.1.2	Glicerofosfolipide fără azot	255
6.6.2	Sfingolipidele	257
6.6.2.1	Sfingolipide cu fosfor	257
6.6.2.2	Glicolipide	258
6.7	**Prostaglandine. Icosanoizi**	**261**
6.7.1	Generalităţi. Clasificare. Structură	261
6.7.2	Biosinteza icosanoizilor	267
6.7.3	Roluri biologice ale icosanoizilor	270
6.7.3.1	Mecanismul de acţiune al PGe la nivelul celular	270
6.7.3.2	Acţiunile biologice ale icosanoizilor asupra organismului uman	271
6.8	**Biomembrane**	**275**
6.8.1	Tipuri de biomembrane	275
6.8.2	Organizarea structurală a biomembranelor	276
6.8.3	Funcţiile biomembranelor	277
6.8.4	Procese de transport prin biomembrane	278
6.8.4.1	Difuziunea simplă	278
6.8.4.2	Difuziunea mediată	279
6.8.4.3	Transportul activ	280
6.8.4.4	Translocarea de grup	282
Bibliografie		**283**

1 PROTEINE (PROTIDE)

1.1 Consideraţii generale

1.1.1 Caracterizare generală a proteinelor

Proteinele sunt biocomponente structurale şi funcţionale de însemnătate primordială pentru procesul vieţii şi care prezintă cel mai înalt grad de complexitate, varietate şi specificitate de specie sau de organ.

Denumirea de "**proteină**" derivă de la cuvântul grecesc "**προτεως**" [proteos] = primul,care este în deplin acord cu rolul fundamental al acestor substanţe în lumea vie.

Proteinele sunt cele mai răspândite biomolecule din celule, constituind 50% sau mai mult din masa lor uscată.

Legătura indisolubilă dintre proteine şi viaţă este marcată de faptul că singurul sistem producător de proteine este organismul viu.

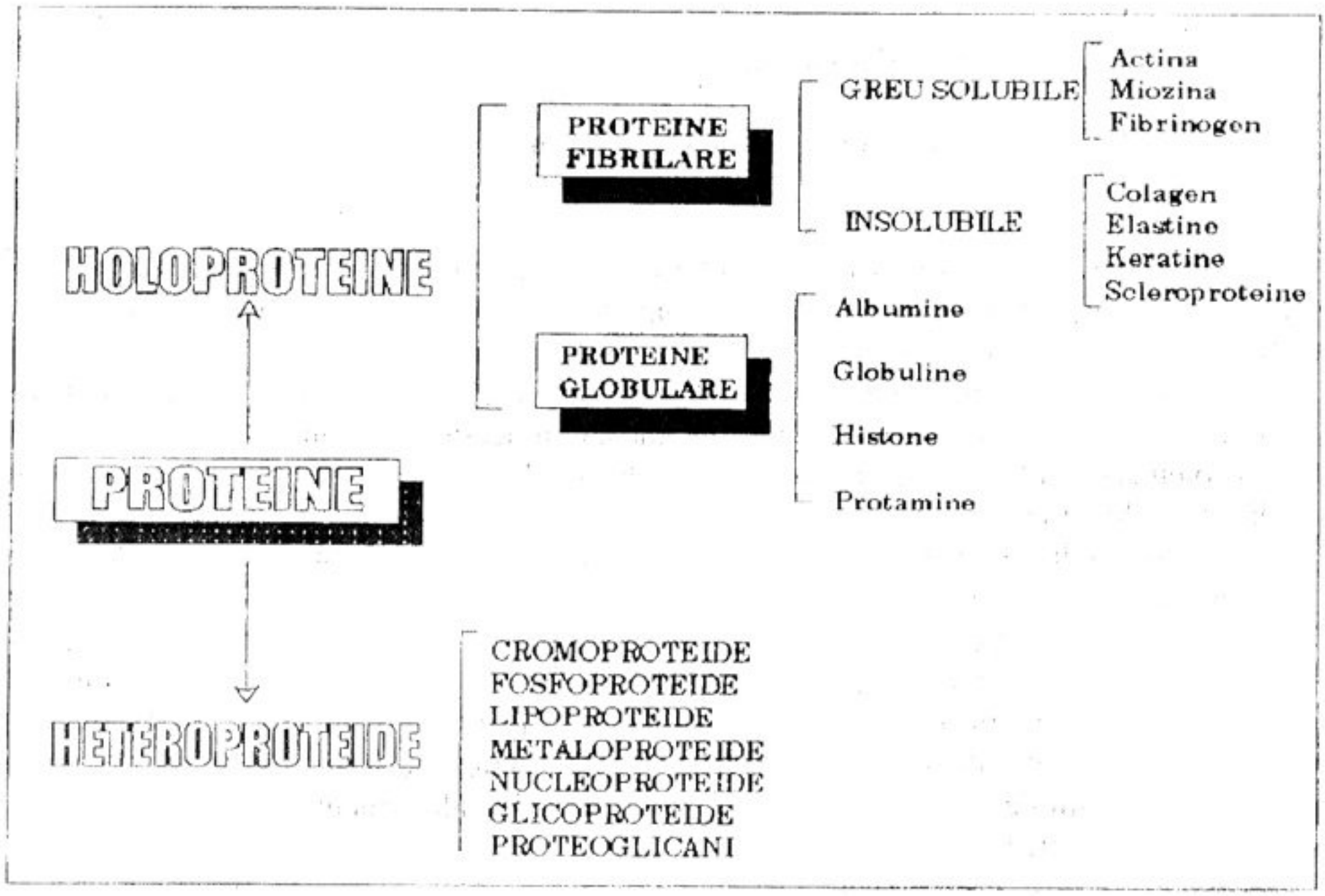
Proteinele se caracterizează prin următoarele particularităţi definitorii:

- reprezintă purtătorii materiali ai vieţii, constituienţi universali şi indispensabili ai tuturor formelor de viaţă: asigură organizarea şi menţinerea structurii morfologice a celulelor;
- sunt biomacromolecule **informaţionale**, caracter conferit de varietatea structurală a aminoacizilor constituienţi, care reprezintă unităţi repetitive ale structurii acestor importante macromolecule;
- sunt biomacromolecule cu o paletă largă de mase moleculare cuprinse între $5*10^3$ - $X*10^9$ daltoni(*) constituite din 20 -22 de aminoacizi care se unesc covalent între ei prin reacţii de policondensare;
- sunt într-o strânsă legătură cu acizii nucleici, informaţia genetică stocată în ADN determină biosinteza proteinelor specifice organismului respectiv;
- prezintă proprietăţi fizico-chimice distincte, care sunt o consecinţă a organizării structurale şi respectiv a conformaţiei spaţiale a macromoleculelor;
- prezintă un înalt grad de organizare structurală caracterizat printr-o entropie scăzută şi posedă un surplus de energie liberă care le asigură atributele unui sistem dinamic în permanentă interacţiune cu mediul ambiant;
- manifestă un puternic dinamism caracterizat printr-o continuă autoînnoire ca rezultat al proceselor anabolice şi catabolice;
- au o specificitate remarcabilă ca o reflectare a particularităţilor structurale şi conformaţionale care le conferă funcţii biochimice variate;
- se prezintă într-o extrem de largă diversitate de tipuri diferite structural şi funcţional.

1.1.2 Clasificarea proteinelor

Pentru clasificarea proteinelor se folosesc simultan mai multe criterii: a) produşii de hidroliză; b) solubilitate în apă; c) structură; d) comportare chimică.

Holoproteinele, prin hidroliză alcalină, acidă sau enzimatică vor pune în libertate numai α aminoacizi.



Solubilitatea proteinelor fibrilare se referă la apă şi la soluţii saline concentrate. Solubilitatea limitată în soluţii saline a unor proteine fibrilare: fibrinogen, actină, miozină, se datoreşte faptului că aceste proteine conţin în anumite porţiuni ale moleculei lor structuri asemănătoare proteinelor globulare.

Aceste proteine constituie o categorie de proteine intermediare între cele globulare şi cele fibrilare, având caracteristici structurale tipice atât proteinelor globulare, cât şi celor fibrilare.

Heteroproteidele au o structură complexă şi prin hidroliză rezultă pe lângă aminoacizi şi o componentă neproteică denumită **componentă prostetică**.

Componenta prostetică poate fi de natură chimică diferită (glucide, lipide, acizi nucleici, porfirine, metale).

În cazul heteroproteidelor legarea grupării prostetice de proteina propriu-zisă se face prin legături chimice covalente şi necovalente care le conferă un caracter de stabilitate.

1.1.3 Rolurile biologice ale proteinelor

Proteinele îndeplinesc funcţii extrem de variate, ca o reflectare a unui înalt grad de

organizare structurală. Rolurile biologice sunt diferite în funcţie de tipul proteinelor (vezi tabela 1.1).

I. Proteine fibrilare

- Intervin în procesul de coagulare al sângelui: fibrinogen, trombină.
- Participă în procesul contracţiei musculare având proprietatea de a transforma energia chimică în energie mecanică: actina, miozina, actomiozina.
- Acţionează ca substanţe de susţinere, protecţie şi rezistenţă mecanică: keratina, elastina, colagenul.

II. Proteine globulare

- Proteinele din hrană servesc ca **sursă primară** de aminoacizi din care se sintetizează proteinele proprii.
- Constituie **suportul chimic**, structural şi funcţional al materiei vii şi al tuturor fenomenelor specifice acesteia.
- În calitate de **enzime** proteinele îndeplinesc un rol catalitic, înlesnind desfăşurarea, coordonarea şi reglarea tuturor reacţiilor biochimice .
- Unele proteine funcţioncază ca **hormoni** participând la reglarea proceselor biochimice: insulina, hormonii hipofizari.
- Acţionează ca **pigmenţi respiratorii** transportând pe cale sanguină la toate ţesuturile oxigenul molecular (hemoglobina) sau depozitând oxigenul în muşchi (mioglobina).
- Rol de **transport** în sânge: siderofilina transportă ioni de Fe; ceruloplasmina transportă ioni de Cu incluşi în structura sa.
- Participă în **procesele imunochimice** de apărare a organismelor de acţiunea agenţilor externi-anticorpi.
- Participă la ultrastructura **biomembranelor** în asociere cu lipidele.
- Datorită caracterului coloidal şi amfoter proteinele intervin în procesele de **permeabilitate** selectivă a biomembranelor, în transportul apei şi ionilor, menţinerea echilibrului acido-bazic funcţionând ca sisteme tampon.
- Au rol energetic în cazuri extreme: subalimentaţie, inaniţie, procese patologice.
- Există un grup de proteine cu efect toxic - toxine, existente în unele plante, agenţi patogeni, venin de şarpe, viperă, scorpion, albină, viespe.

III. Proteine cu funcţii biologice neobişnuite

- **fibroina** secretată de păianjen şi viermele de mătase, care se solidifică rapid formând un fir insolubil şi cu rezistenţă mecanică remarcabilă;
- proteina **"antifrezee"** (contra îngheţului) se găseşte în sângele unor peşti care trăiesc în apele de sub gheaţa din jurul Antarcticei.

Interesant de observat că toate proteinele, inclusiv cele care nu au intensă activitate biologică sau toxică, sunt formate din aceiaşi 22 de aminoacizi, care fiecare luat separat nu are deloc sau are o foarte slabă activitate biologică şi nu are acţiune toxică.

Conformaţia tridimensională este unul din factorii cei mai importanţi care conferă fiecărui tip de proteină o activitate biologică distinctă şi o anumită stabilitate, ceea ce permite ca proteina să poată fi izolată, păstrată şi studiată în stare nativă.

Tabela 1.1 - **Rolul biologic al proteinelor** (după A.L.Lehninger 1987)

Tipuri şi exemple	Localizare sau functie
A - **Proteine de rezervă**	
- Cazeina	Proteina din lapte
- Ovalbumina	Proteina din albuşul de ou
- Feritina	Depozitează fierul în splină
- Gliadina	Proteina din seminţele de grâu
- Zeina	Proteina din boabele de porumb
B - **Enzime**	
- Hexokinaza	Fosforilează glucoza, fructoza, manoza
- Lactat dehidrogenaza	Enzimă, catalizează oxidarea lactatului la piruvat
- Glicogen sintetaza	Participă la sinteza glicogenului
- Amilaza	Digestia amidonului şi glicogenului
- Acid gras sintetaza	Participă la sinteza acizilor graşi
- Pepsina	Participă la digestia proteinelor
- ADN-polimeraza	Rol în replicarea ADN
C - **Proteine de transport**	
- Hemoglobina	Transportă O_2 în sângele vertebratelor
- Mioglobina	Transportă O_2 în celulele musculare
- Transferina	Transportă ioni de fier în sânge
- Ceruloplasmina	Transportă ioni de cupru în sânge
- Citocromi b,c,a	Transportori de electroni
- Serumalbumina	Proteină plasmatică, transportă ioni,vitamine, hormoni
D - **Proteine contractile**	
- Miozina	Filamente groase în miofibrile
- Actina	Filamente subţiri în miofibrile
E - **Proteine cu rol de protecţie**	
- Imunoglobuline	Anticorpi care fixează şi imobilizează agenţii bacterieni
- Fibrinogen	Precursor al fibrinei în coagularea sângelui
- Trombina	Participă în procesul de coagulare a sângelui
F - **Hormoni**	
- Insulina	Hormon hipoglicemiant
- Hormonul adreno-corticotrop (ACTH)	Reglează sinteza hormonilor corticosteroizi
- Hormonul de creştere	Stimulează creşterea oaselor şi biomasei musculare

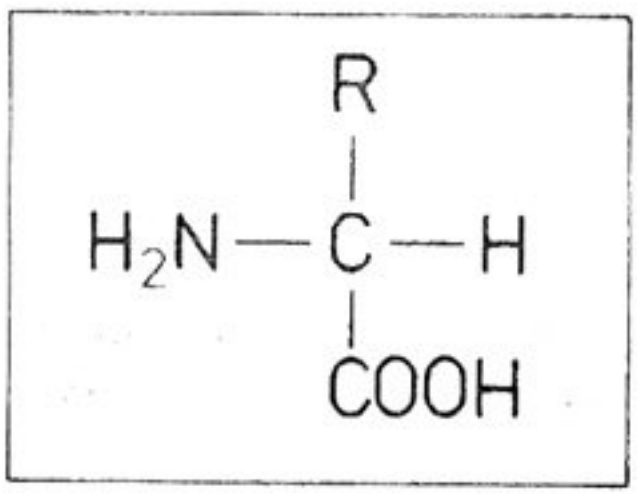
Tabela 1.1 (continuare)

G - **Proteine structurale**	
- Colagenul	Principala proteină a ţesuturilor conjunctive (tendoane, cartilaje)
- α Keratina	Unghii, păr
- Elastina	Ţesut conjunctiv elastic (tendoane)
- Histone	Proteină nucleară asociată cu ADN
- Glicoproteide	Invelişul şi peretele celular
- Proteoglicani	Secreţii mucoase, lichid sinovial
H - **Toxine**	
- Toxina difteriei	Toxină bacteriană
- Veninul de şarpe, viperă, scorpion	Conţine enzime care hidrolizează fosfolipidele-fosfolipaze
- Ricinul	Proteină toxică (seminţe de ricin)
- Toxina din Clostridium botulinum	Produce intoxicaţii alimentare bacteriene

1.2 Aminoacizii

1.2.1 Caracteristici generale. Clasificare.

Prin hidroliza acidă, alcalină sau enzimatică a proteinelor, rezultă aminoacizii componenţi, care reprezintă unităţile chimice de bază ale macromoleculelor proteice. Se cunosc aproximativ 200 de aminoacizi, dar organismele utilizează pentru edificiul structural al proteinelor proprii 20 - 22 α aminoacizi. Toţi cei 22 de α aminoacizi au o serie de caracteristici structurale comune:



- gruparea lor amino este în pozitia α cu două excepţii - prolina şi oxiprolina;
- gruparea aminică este îndreptată spre stânga - sunt deci **L - aminoacizi**. Forma D a aminoacizilor se găseşte în polipeptide de origine microbiană;
- cu o singură excepţie (glicocolul), toţi aminoacizii conţin cel puţin un atom de carbon asimetric, având deci activitate optică;
- prezenţa simultană a celor două grupări, carboxilică şi amino,învecinate spaţial, face posibilă formarea legăturii peptidice caracteristice moleculelor cu semnificaţie biologică - proteinele;

In funcţie de caracterul polar sau nepolar al radicalului R există 4 categorii de aminoacizi:

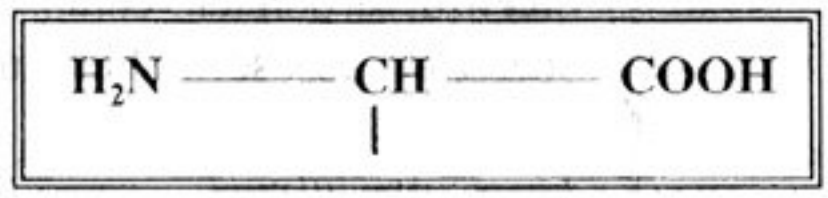
- aminoacizi cu grupări **nepolare** sau hidrofobe **Rh**;
- aminoacizi cu grupări **polare** neîncărcate electric **Rp** ionizate parţial la pH - ul fiziologic;
- aminoacizi cu grupări **polare** încărcate **electronegativ**, având deci un caracter acid **Rpa**;

♦ aminoacizi cu grupări **polare** încărcate **electropozitiv**, având deci un caracter bazic **Rpb**.

Caracterul polar sau nepolar al aminoacizilor este de o mare importanţă pentru a prevedea proprietăţile fizico - chimice şi biologice ale proteinelor studiate.

Proteinele care sunt bogate în aminoacizi polari sunt solubile în apă, în timp ce proteinele care au un conţinut ridicat în aminoacizi nepolari sunt insolubile în apă.

Radicalul **R** constituie **catena laterală** a fiecărui aminoacid, în timp ce **catena principală**



reprezinta componentă structurală comună.

Particularităţile structurale ale radicalului R (aciclic sau ciclic) şi prezenţa altor grupări chimice funcţionale reprezintă criteriile care stau la baza clasificării aminoacizilor.

AMINOACIZI
- Aciclici
  - Monoaminomonocarboxilici.
  - Monoaminomonocarboxilici cu grupări hidroxil (hidroxiaminoacizi).
  - Monoaminomonocarboxilici cu sulf (tioaminoacizi).
  - Monoaminodicarboxilici.
  - Diaminomonocarboxilici.
- Ciclici
  - Homeociclici.
  - Heterociclici.

Acizii organici de la care derivă aminoacizii cu structură alifatică au în catena lor (2 - -6) atomi de carbon: acidul acetic, propionic, butiric, valerianic, izovalerianic, caproic, izocaproic.

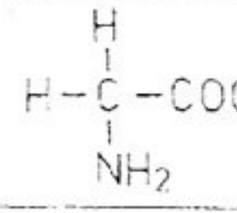
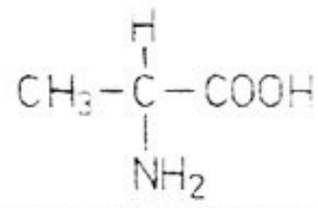
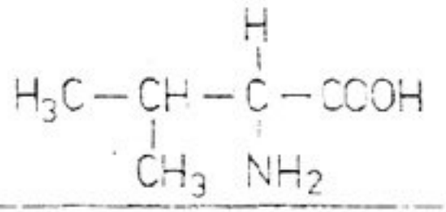
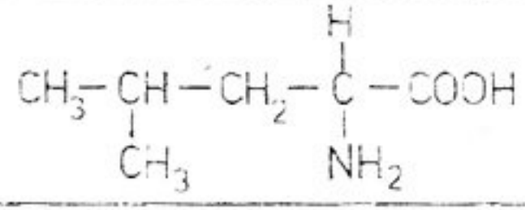
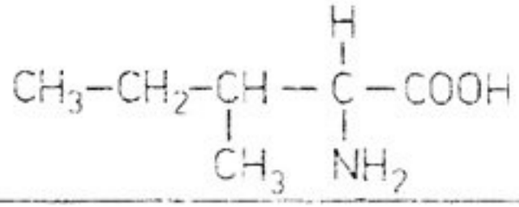
Aminoacizii homeociclici şi heterociclici conţin în structura lor următoarele tipuri de nuclee: benzenic, fenolic, imidazolic, indolic şi pirolidonic.

In catena laterală gruparea $-NH_2$ poate ocupa şi alte poziţii decât alfa: ß (beta), γ (gama), δ (delta), ϵ (epsilon).

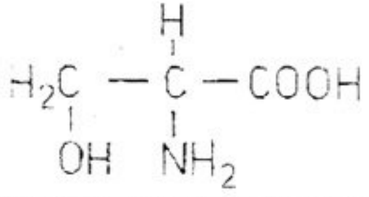
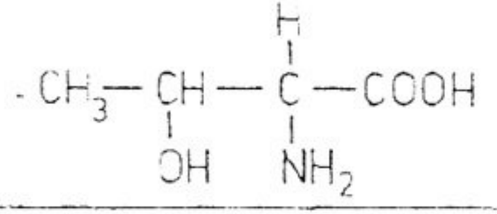
In tabela 1.2 sunt prezentaţi aminoacizii care participă în structura proteinelor şi principalele lor caracteristici.

Rh = radical hidrofob;
Rp = radical polar neâncărcat electric;
Rpa = radical polar cu caracter acid;
Rpb = radical polar cu caracter bazic.

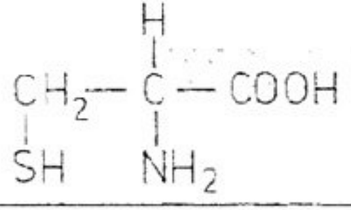
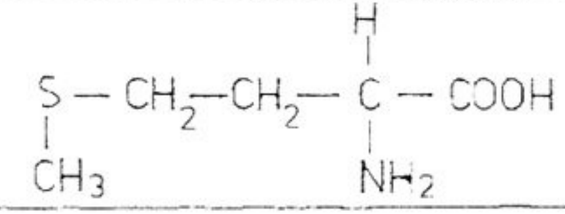
TABELA NR.1.2 Clasificarea si principalele caracteristici ale aminoacizilor proteinogeni

NR.	FORMULA STRUCTURALĂ	DENUMIRE UZUALĂ	DENUMIRE CHIMICĂ	PRESCURTARE DE TREI LITERE	SIMBOL CU O LITERĂ	RADICAL	MASĂ MOLECULARĂ
1	2	3	4	5	6	7	8
GRUPA I - Aminoacizi monoamino monocarboxilici							
1		Glicocol	Acid amino acetic	Gly	G	Rh	75
2		Alanină	Acid α amino propionic	Ala	A	Rh	89
3		Valină	Acid α amino izovalerianic	Val	V	Rh	117
4		Leucină	Acid α amino izocaproic	Leu	L	Rh	131
5		Izoleucină	Acid β metil valerianic	Ile	I	Rh	131

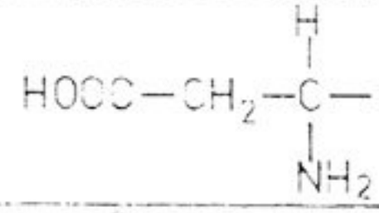
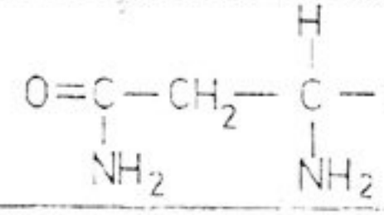
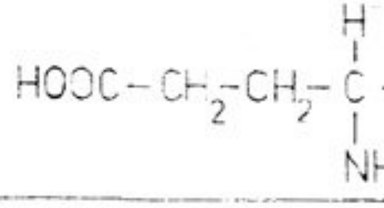
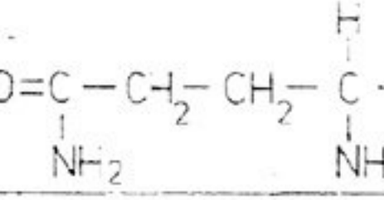
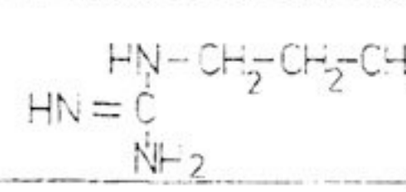
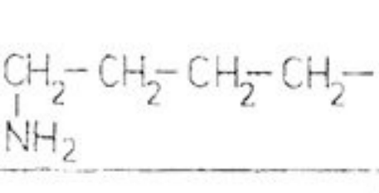
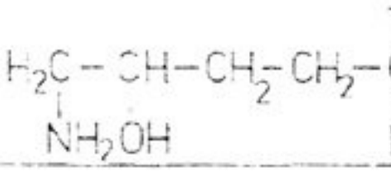
GRUPA II - Aminoacizi cu grupări hidroxil (hidroxiaminoacizi)

1	2	3	4	5	6	7	8
6		Serină	Acid α amino β hidroxi propionic	Ser	S	Rp	105
7		**Treonină**	Acid α amino β hidrexi butiric	Thr	T	Rp	119

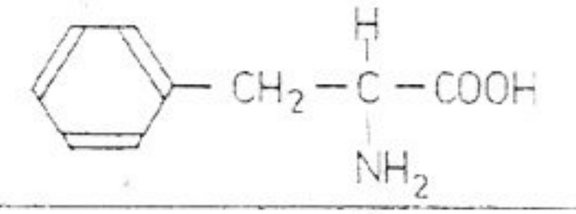
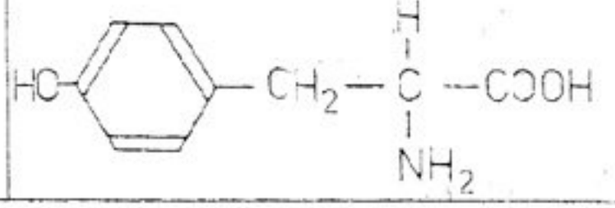
GRUPA III - Aminoacizi cu sulf (tioaminoacizi)

8		**Cisteină**	Acid α amino β tio propionic	Cys	C	Rp	121
9		**Metionină**	Acid α amino γ metil butiric	Met	M	Rh	149

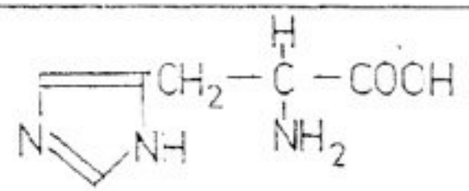
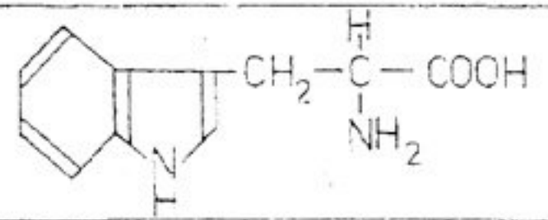
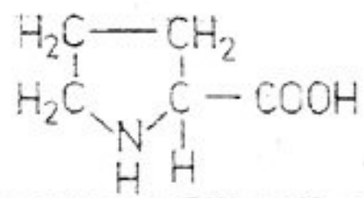
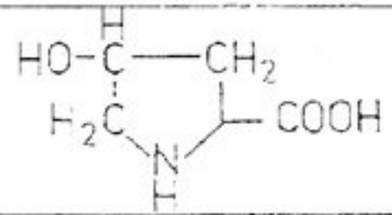
GRUPA IV - Aminoacizi monoaminodicarboxilici si amidele lor

1	2	3	4	5	6	7	8
10		**Acid aspartic**	Acid α amino succin ic	Asp	D	Rpa	133
11		**Asparagină**	Acid α amino β amido succinic	Asn	N	Rp	132
12		**Acid glutamic**	Acid α amino glutaric	Glu	E	Rpa	147
13		**Glutamină**	Acid α amino γ amidoglutaric	Gln	Q	Rp	146
GRUPA V - Aminoacizi diamino monocarboxilici							
14		**Arginină**	Acid α amino δ guanido valerianic	Arg	R	Rpb	174
15		**Lizină**	Acid α ε diamino caproic	Lys	K	Rpb	146
16		**5 Hidroxi Lizină**	Acid αε diamino δ oxi caproic	Ho-Lys		Rpb	162

GRUPA VI - Aminoacizi homeociclici

1	2	3	4	5	6	7	8
17		**Fenilalanină**	Acid α amino β fenil propionic	Phe	F	Rh	165
18		**Tirozină**	Acid α amino β para hidroxi fenil propionic	Tyr	Y	Rp	181

GRUPA VII - Aminoacizi heterociclici

19		**Histidină**	Acid α amino β imidozol propionic	His	H	Rp	155
20		**Triptofan**	Acid α amino β indolil propionic	Try	W	Rh	204
21		**Prolină**	Acid pirolidon 2 carboxilic	Pro	P	Rh	115
22		**Hidroxi Prolină**	Acid 4 Hidroxi pirolidon 2 carboxilic	Ho - Pro		Rp	131

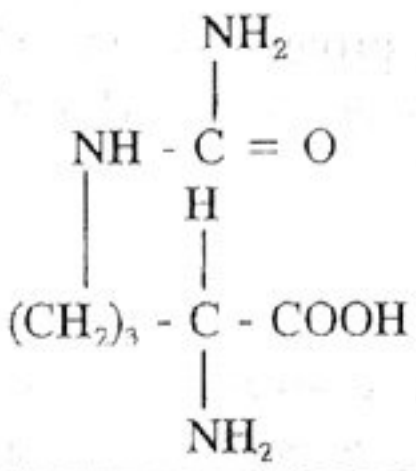
1.2.2 Aminoacizi care nu participă în structura proteinelor

In afara celor 22 de aminoacizi care intră în structura proteinelor, în natură se găsesc o serie de aminoacizi care sunt constituenţi ai altor biomolecule sau produşi intermediari în diferite procese biochimice (vezi tabela 1.3).

Tabela 1.3 **Aminoacizi neproteinogeni**

Formula	Denumire	Rol biologic
COOH | CH_2 | CH_2 - NH_2	ß Alanină	- Componentă a dipeptidelor carnozină şi anserină - Componentă a acidului pantotenic şi coenzimei A
COOH | CH_2 | CH_2 | CH_2 - NH_2	Acid γ amino butiric GABA	- Transmiterea impulsului nervos - Agent de blocare a sinapselor
H_2C - COOH | H-N - CH_3	Sarcozină	- Utilizată în tratamentul cancerului
H_2C - COOH + | CH_3 N — CH_3 CH_3	Betaină	- Rol lipolitic
H_2C - SH | H_2C - NH_2	Cisteamină	- Component al coenzimei A şi PTA
H_2C - SO_3H | H_2C - NH_2	Taurină	- Component al acizilor biliari
$(H_2C)_3$ - NH_2 | HC - COOH | NH_2	Ornitină	- Intermediar al ciclului ureogenetic

Tabela 1.3 (continuare)

	- Citrulina	- Intermediar al ciclului ureogenetic

1.2.3 Proprietăţi fizico - chimice şi biologice ale aminoacizilor

Aminoacizii sunt substanţe solide, albe, cristalizate, solubile în apă cu două excepţii: tirozina şi cisteina. Datorită acestei insolubilităţi, cisteina în anumite condiţii formează o calculoză renală - **cisteinuria**.

Cu excepţia glicocolului, aminoacizii au un atom de carbon asimetric, iar 4 aminoacizi au 2 atomi de carbon asimetrici: treonina, izoleucina, hidroxilizina şi hidroxiprolina.

1.2.3.1 Aminoacizi esenţiali

Biosinteza proteinelor proprii specifice organismului este direct corelată cu aportul de aminoacizi exogeni proveniţi pe cale alimentară. Sinteza tuturor acestor biomolecule fundamentale nu poate fi efectuată decât de către plante şi de unele specii de microorganisme.

Organismul uman şi animal în cursul evoluţiei lor au pierdut capacitatea de sinteză a 8 aminoacizi pe care nu îi poate obţine decât prin aport exogen din proteinele de natură vegetală.

Aminoacizii care sunt absolut necesari pentru creşterea şi dezvoltarea organismului uman şi animal furnizaţi prin alimentaţie au fost denumiţi aminoacizi **esenţiali** (indispensabili). Lipsa acestor aminoacizi din alimentaţie, (tabela 1.4), determină o serie de tulburări foarte grave .

Doi aminoacizi: histidina şi arginina, sunt indispensabili organismelor în creştere, sinteza lor endogenă nu este suficientă pentru a acoperi nevoile mai mari din perioada de creştere (aminoacizi **semiesenţiali**).

Ceilalţi aminoacizi pot fi sintetizaţi în organism printr-o serie de reacţii care au ca

Tabela 1.4 **Aminoacizi esenţiali, semiesenţiali şi neesenţiali**

Esenţiali	Semiesenţiali	Neesenţiali
Valină	Arginină	Glicocol
Leucină	Histidină	Alanină
Izoleucină		Serină
Treonină		Cisteină
Metionină		Acid aspartic
Lizină		Acid glutamic
Fenilalanină		Tirozină
Triptofan		Prolină
		Oxiprolină

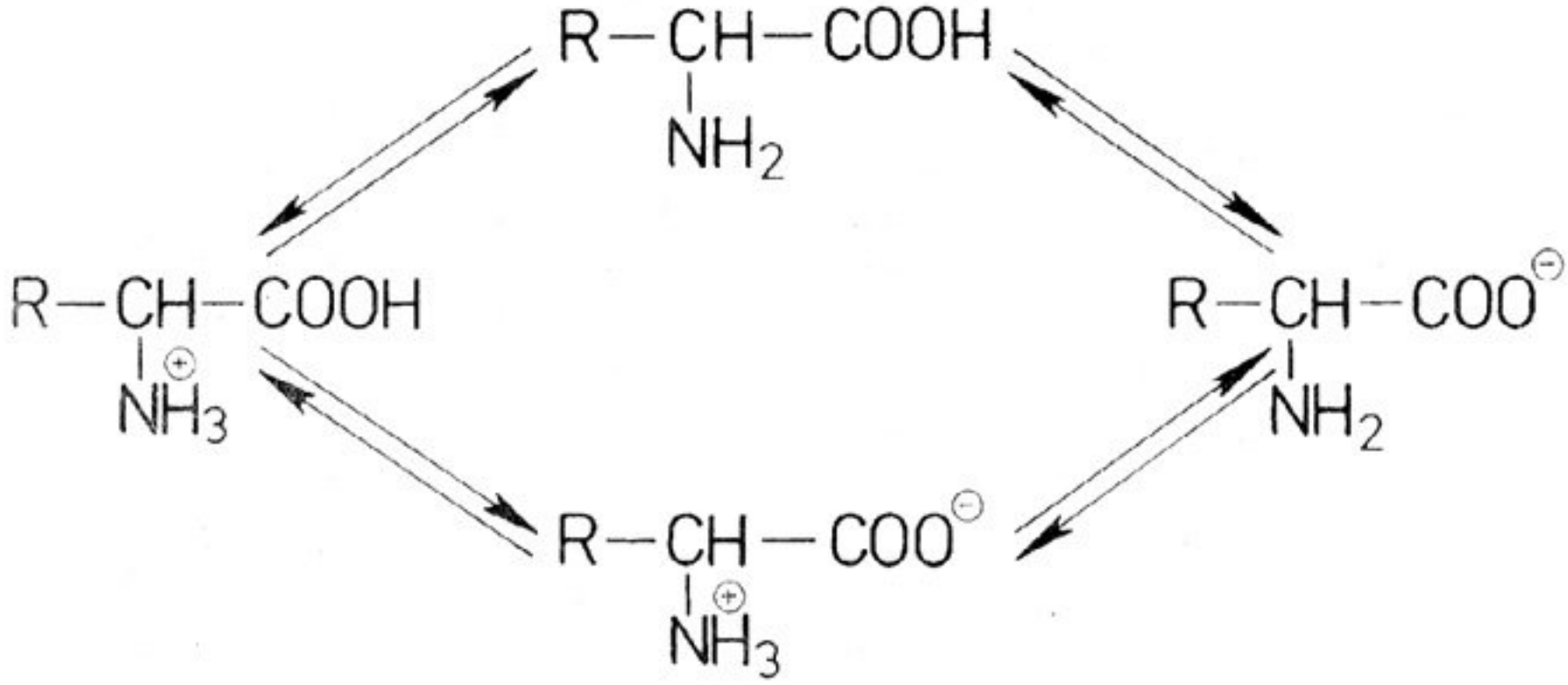
puncte de plecare diverşi metaboliţi; ei sunt aminoacizi **neesenţiali** (dispensabili) şi, prin urmare, pot lipsi din hrană. Carenţa în anumiţi aminoacizi prin aport alimentar insuficient se manifestă printr-o simptomatologie complexă:

- ♦ carenţa în lisină - determină încetinirea creşterii;
- ♦ carenţa în triptofan - determină tulburări vasculare şi modificarea tabloului leucocitar;
- ♦ carenţa în tirozină - determină atrofia tiroidei şi hipofizei;
- ♦ carenţa în tioaminoacizi - determină atrofia testiculelor, degenerarea ovarelor şi sterilitate.

1.2.3.2 Proprietăţile ionice ale aminoacizilor

Aminoacizii datorită prezenţei simultane în structura lor a cel puţin unei grupări amino şi a cel puţin unei grupări carboxilice, se vor comporta în mod diferit în funcţie de pH - ul soluţiei.

Intr-o soluţie apoasă coexistă 4 forme într-un raport cantitativ dependent de natura mediului, dar în care forma nedisociată este prezentă într-o cantitate minimă.



Speciile ionizate nu se găsesc ca entităţi individuale, ci numai în prezenţa unui alt ion cu sarcină opusă:

$$\text{acid} + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + \text{bază}$$

$$\text{bază} + H_2O \rightleftharpoons \text{acid} + HO^-$$

sau evidenţiind în mod separat grupările carboxil, respectiv amino ale aminoacizilor:

$$R - COOH + H_2O \rightleftharpoons R - COO^- + H_3O^+$$

$$R - NH_2 + H_2O \rightleftharpoons R - NH_3^+ + HO^-$$

Disocierea acidă sau bazică va fi dependentă de câte o constantă Ka sau Kb care conform legii acţiunii maselor, va fi egală cu:

$$Ka = \frac{[R - COO][H_3O^+]}{[R - COOH][H_2O]}; \qquad Kb = \frac{[R - NH_3^+][HO^-]}{[R - NH_2][H_2O]}.$$

Dacă $[R - COO^-] = [R - COOH]$ şi $[R - NH_3^+] = [R - NH_2]$

$$Ka = [H^+] \quad \text{şi deci} \quad -\log Ka = -\log[H^+]; \quad pK = pH$$

Aşadar, pentru a caracteriza aciditatea sau bazicitatea aminoacizilor se folosesc exponenţii de aciditate pK. Funcţia carboxil este caracterizată prin pK_α - COOH, iar funcţia aminică printr-un pK_α - NH_2; la unii aminoacizi se adaugă şi a treia mărime pK, corespunzătoare funcţiei acide adiţionale (vezi tabela 1.5).

Tabela 1.5 **Valorile pK şi pI ale aminoacizilor** (după Lehninger 1989)

Aminoacid	pK_α-COOH (25°C)	pK_α-NH_3^+ (25°C)	pK_R	pI
1. Glicocol	2,34	9,60		5,97
2. Alanină	2,35	9,69		6,02
3. Valină	2,32	9,62		5,97
4. Leucină	2,36	9,60		5,98
5. Izoleucină	2,36	9,68		6,02
6.Fenilalanină	1,83	9,13		5,98
7. Prolină	1,99	10,69		6,10
8. Triptofan	2,38	9,38		5,88
9. Serină	2,21	9,15		5,68
10. Treonină	2,63	10,43		6,53
11. Tirozină	2,20	9,11	10,07	5,65
12. Cisteină	1,71	10,78	8,33	5,02
13. Metionină	2,28	9,21		5,75
14. Asparagină	2,02	8,80		5,41
15. Glutamină	2,17	9,13		5,65
16. Acid aspartic	2,09	9,82	3,86	2,97
17. Acid glutamic	2,19	9,67	4,25	3,22
18. Histidină	1,82	9,17	6,00	7,58
19. Lizină	2,18	8,95	10,53	9,74
20. Arginină	2,17	9,04	12,48	10,76

Un număr de 5 aminoacizi din cei 20 cuprind în radicalul R de la Cα grupări acide sau bazice: acidul aspartic, acidul glutamic, lizina, arginina şi histidina. Funcţiile fenol din tirozină şi tioalcool din cisteină sunt acizi foarte slabi care la pH - ul fiziologic se ionizează într-o măsură neglijabilă. La aceşti aminoacizi se adaugă o constantă pK suplimentară (pK_R).

La un pH egal cu semisuma valorilor pK, sarcina netă a aminoacidului este nulă, în soluţie existând practic numai ioni bipolari. Acest pH este denumit pH izoelectric (pI) şi reprezintă o constantă dependentă de numărul de grupări amino sau carboxil pe care le conţin aminoacizii respectivi. La punctul izoelectric (pI) aminoacizii se află disociaţi ca anioni şi cationi în proporţii egale din care cauză nu vor migra în câmp electric; solubilitatea lor este minimă datorită atracţiilor electrostatice dintre anionii şi cationii existenţi. In figura 1.1 este prezentată curba de titrare a alaninei, a neutralizării funcţiilor $-COOH^-$ şi $-NH_3^+$ cu o soluţie de NaOH.

Intr-o soluţie cu pH diferit de pI atât aminoacizii cât şi proteinele vor avea o anumită încărcare electrică, pozitivă sau negativă, ceea ce face să migreze într-un câmp electric spre anod sau spre catod, fiind posibilă separarea lor dintr-un mediu care conţine mai mulţi aminoacizi, respectiv mai multe proteine.

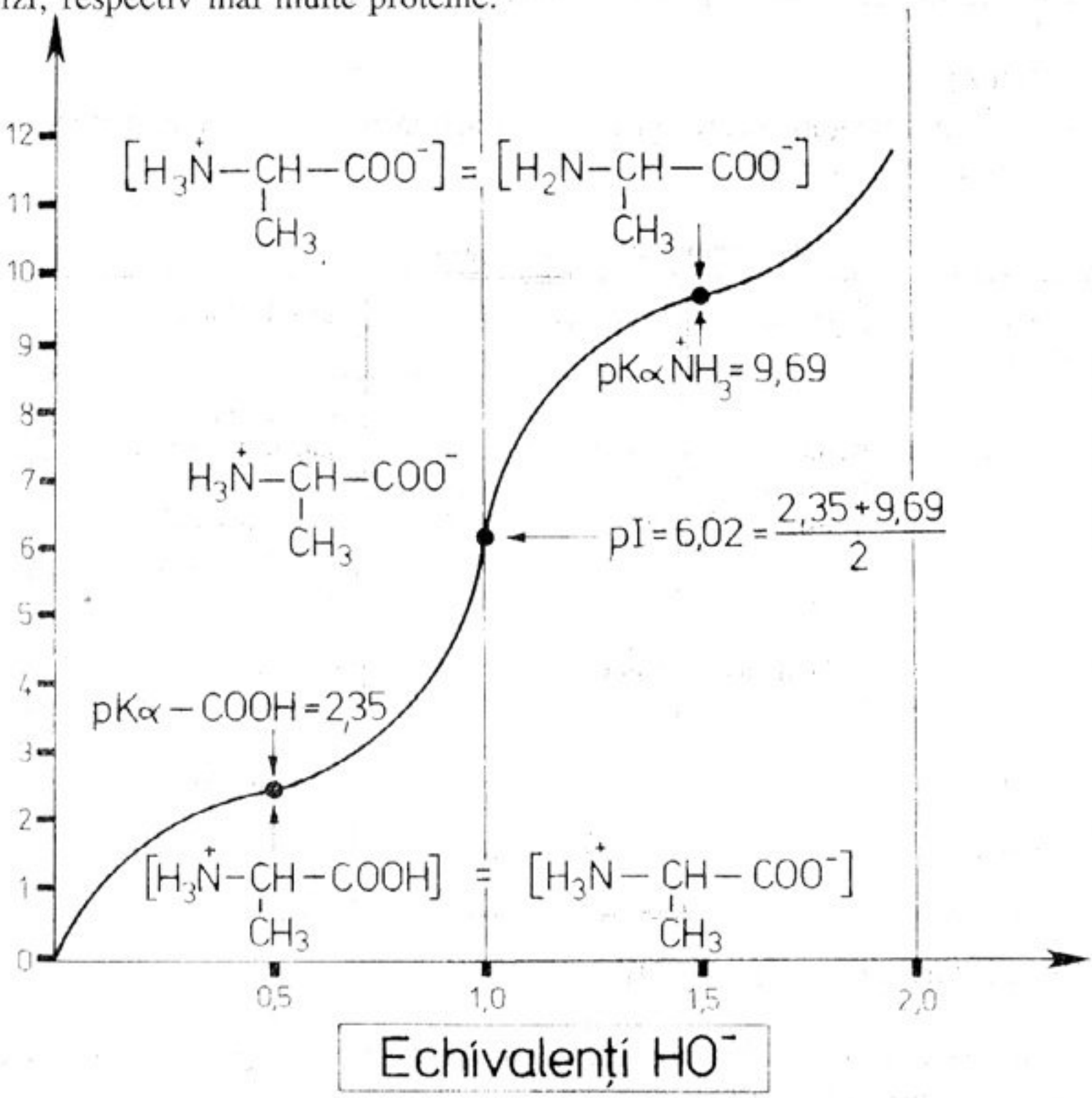


Fig. 1.1 **Curba de titrare a alaninei**

1.2.3.3 Proprietăţile chimice ale aminoacizilor

Reactivitatea chimică a aminoacizilor este determinată de prezenţa grupării -COOH, a grupării $-NH_2$ sau de prezenţa simultană a ambelor grupări.

A. Proprietăţile chimice datorate grupării carboxil

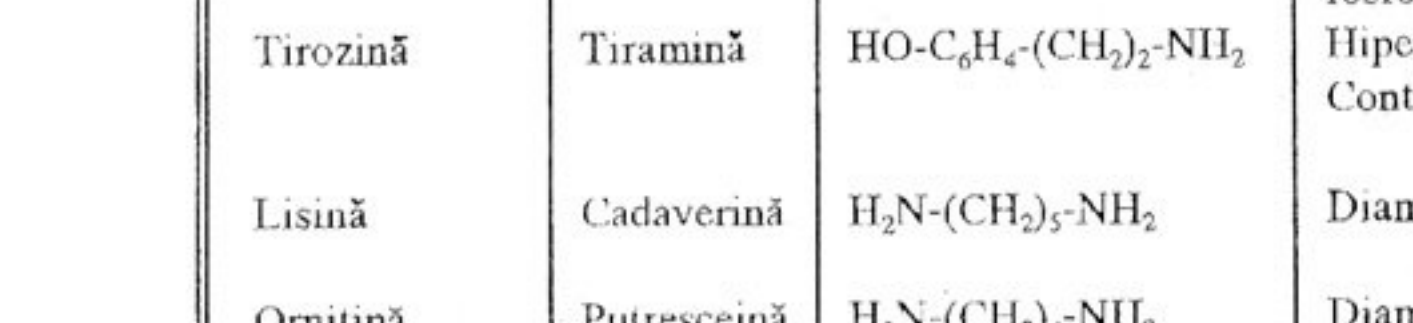
◆ Formarea de amide constituie un proces de mare importanţă biologică şi care are

loc în mod continuu în organism.

$$\text{Acid glutamic} \xrightarrow{NH_3} \text{Glutamină}$$

$$\text{Acid aspartic} \xrightarrow{NH_3} \text{Asparagină}$$

♦ Aminoacizii se pot decarboxila, formându-se aminele respective. Reacţiile de decarboxilare ale aminoacizilor sunt catalizate de enzime denumite aminoacid decarboxilaze care aparţin clasei liazelor şi care au drept coenzimă piridoxal fosfatul (PALPO).



Aminele se pot încadra în trei grupe după acţiunea sau rolul lor metabolic: amine biogene, structurale sau toxice.

Tabela 1.6 **Exemple de amine biogene**

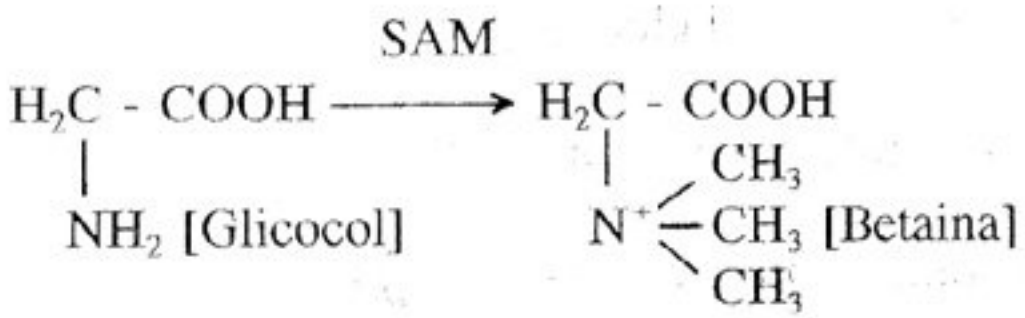
Aminoacidul de origine	Denumire	Formulă	Rol biologic
Acid glutamic	Acid γ amino butiric	$HOOC-(CH_2)_2-NH_2$	Transmiterea impulsului nervos
Cisteină	Cisteamină	$HS-CH_2-CH_2-NH_2$	Component al coenzimei A şi PTA
Serină	Colamină	$HO-CH_2-CH_2-NH_2$	Component al fosfolipidelor
Tirozină	Tiramină	$HO-C_6H_4-(CH_2)_2-NH_2$	Hipertensiv Contracţia uterului
Lisină	Cadaverină	$H_2N-(CH_2)_5-NH_2$	Diamină toxică
Ornitină	Putresceină	$H_2N-(CH_2)_4-NH_2$	Diamină toxică Hipertensiv

B. Reacţii datorate grupării -NH_2

♦ **Alchilarea** Atât în laborator, cât şi în organismul viu gruparea amino se poate metila, formându-se derivaţii metilaţi respectivi.

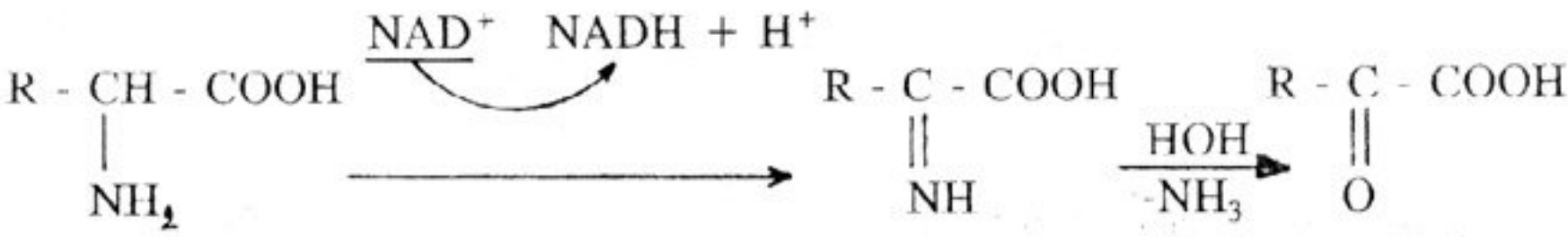
In laborator "in vitro" reacţia are loc în prezenţa iodurii sau sulfatului de metil $(CH_3)_2SO_4$.

In vivo reacţia are loc sub acţiunea metilantă a unei substanţe specializată pentru această reacţie: metionina activată sau S - Adenozil Metionină (SAM).



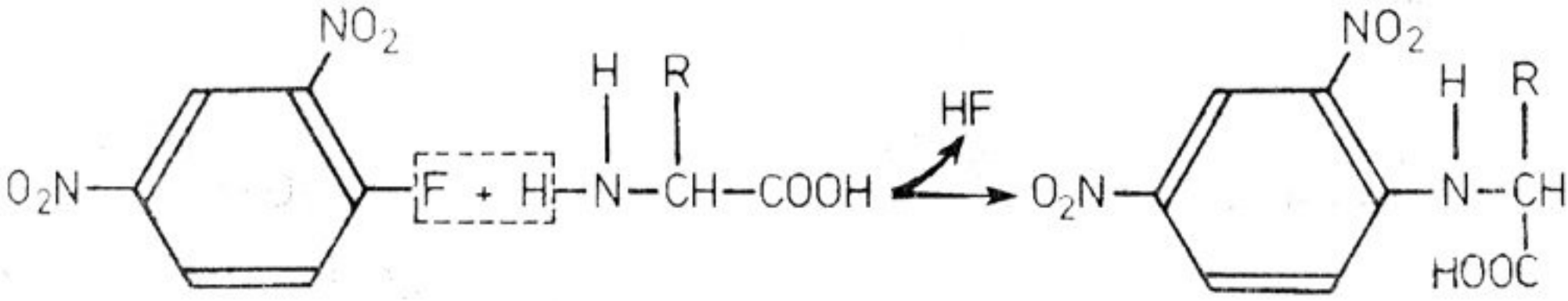
Betaina se administrează în insuficienţa hepatică.

◆ **Dezaminarea** Prin dezaminarea aminoacizilor se formează în organism cetoacizi, intermediari metabolici de mare importanţă şi concomitent se formează şi amoniac.



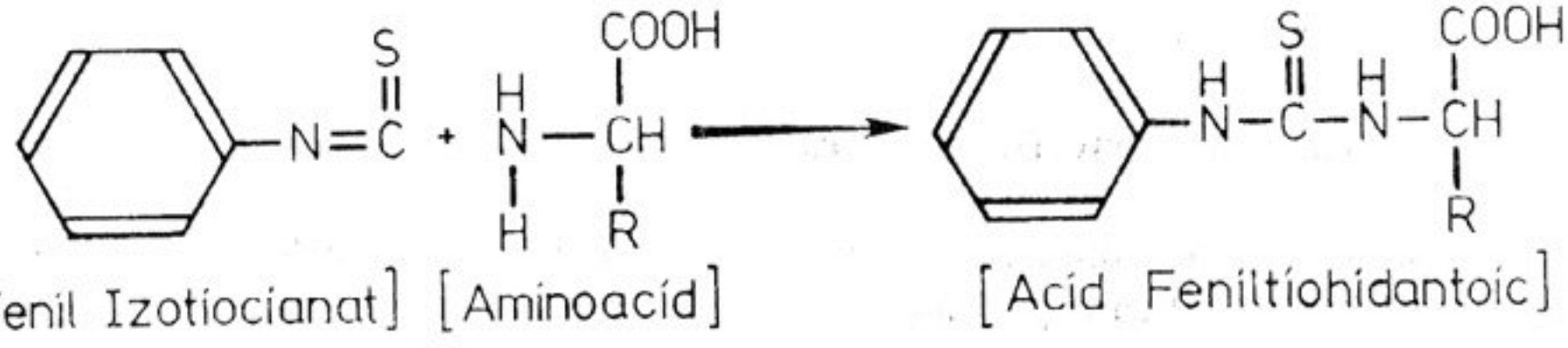
◆ **Reacţia Sanger** Sub acţiunea 1-fluor-2,4-dinitrobenzenului se formează derivaţii dinitrofenilaţi ai aminoacizilor respectivi, compuşi de culoare galbenă care pot fi separaţi cromatografic.

Accastă relaţie prezintă deosebit interes din punct de vedere analitic, căci serveşte la separarea şi recunoaşterea aminoacizilor N-terminali din structura polipeptidelor.

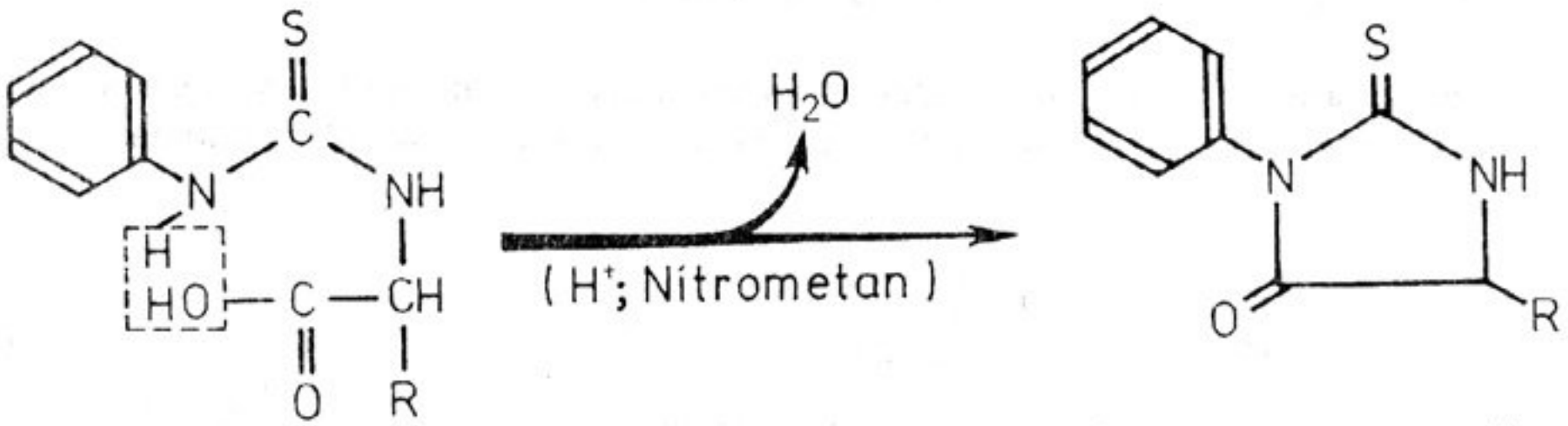


Reacţia a fost utilizată de Sanger pentru stabilirea structurii insulinei (1956).

◆ **Reacţia Edman** Fenilizotiocianatul se condensează în mediu alcalin cu gruparea $-NH_2$ a α aminoacizilor sau a aminoacidului N- terminal din structura peptidelor.



Prin încălzire în mediu acid se ciclizează formându-se feniltiohidantoina (PTH) aminoacidului corespunzător.

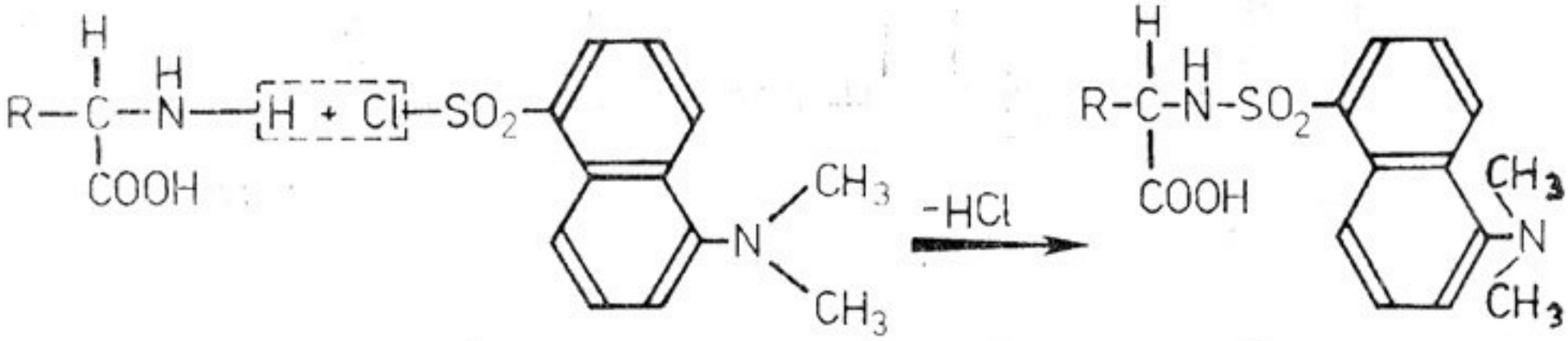


[Acid Feniltiohidantoic] [Feniltiohidantoina]

Pe peptida rămasă cu un aminoacid în minus faţă de cea iniţială, se aplică în mod repetat acelaşi procedeu.

PTH - aminoacizii obţinuţi în fiecare etapă, se identifică cromatografic, obţinându-se secvenţa tuturor aminoacizilor componenţi ai peptidei luate în studiu.

♦ **Reacţia cu clorura de dansyl** este de asemenea utilizată pentru identificarea aminoacidului N-terminal din structura peptidelor, prin formarea unor derivaţi sulfoamidici fluorescenţi.



[Clorură de Dansyl]

Dezavantajul acestei metode este acela că permite numai determinarea primului aminoacid şi reacţia nu se mai poate repeta.

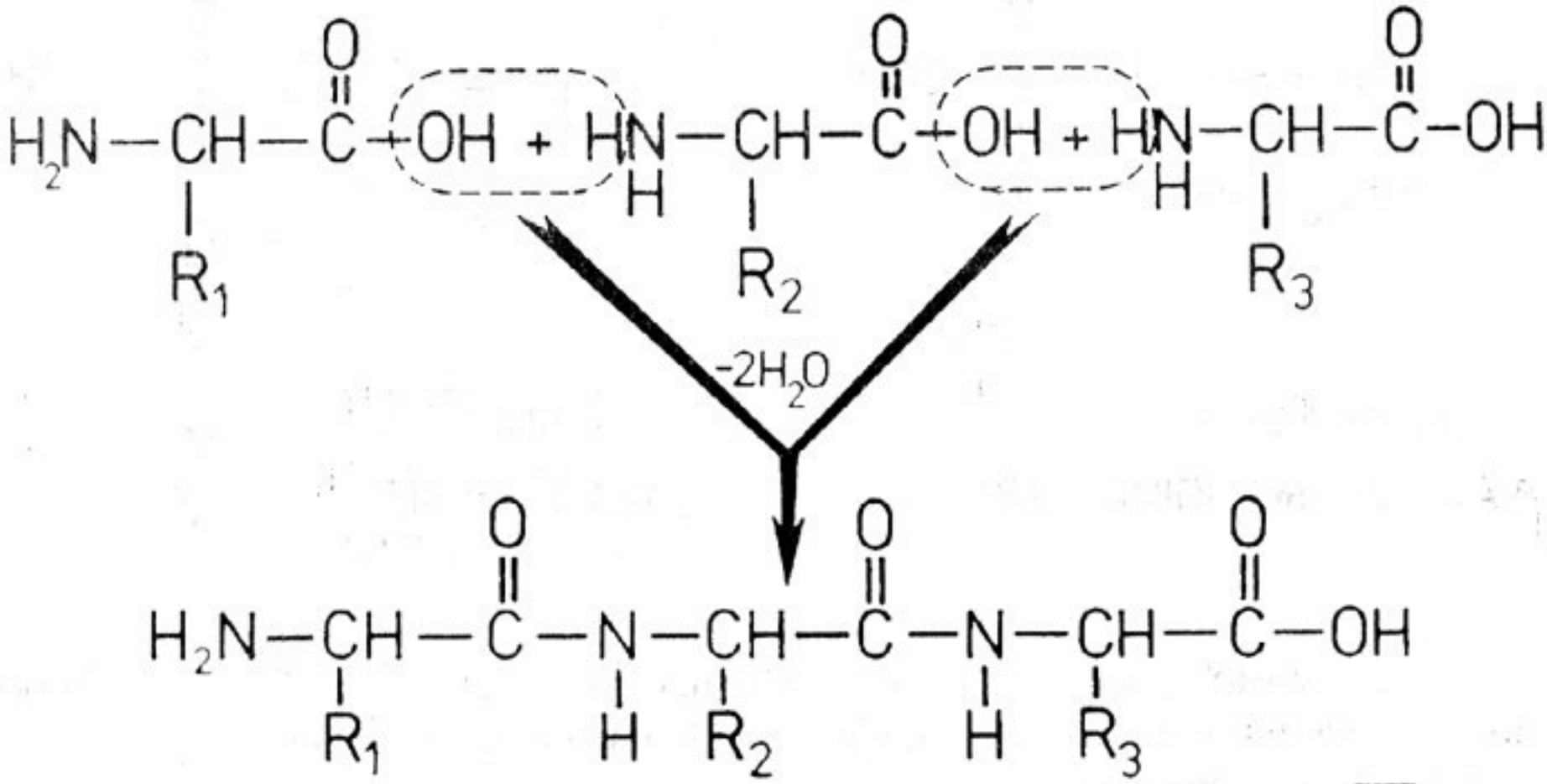
1.3. Peptide

1.3.1 Caracterizare generală

Datorită prezenţei simultane a grupărilor -COOH şi -NH_2 a fost posibilă formarea legăturii peptidice specifică peptidelor, polipeptidelor şi proteinelor.

Peptidele sunt substanţe naturale şi sintetice constituite dintr-un număr restrâns de aminoacizi 2 -50 care se condensează intermolecular la nivelul grupării carboxil a unui aminoacid şi gruparea α amino a altei molecule de aminoacid.

Constituirea moleculelor de peptide se bazează pe capacitatea aminoacizilor de a se lega covalent unul de altul.



Peptidele reprezintă compuşi intermediari între aminoacizi şi proteine. Peptidele constituite din 2 până la 10 aminoacizi se definesc ca **oligopeptide**; peptidele a căror structură este formată din 10 până la 50 de resturi de aminoacizi se definesc ca polipeptide. Pentru a denumi un peptid se specifică în ordinea de succesiune, începând cu restul de aminoacid-NH_2-terminal - numele radicalilor aminoacizilor, iar la sfârşit se adaugă numele întreg al aminoacidului care reprezintă restul cu gruparea -COOH - terminală.

De exemplu denumirea unei tetrapeptide ipotetice cu structura: H_2N - Arg - His - Glu - Ala - COOH se numeşte: Arginil - Histidil - Glutamil - Alanină.

Peptidele formate din mai mult de trei molecule de aminoacizi, care au deci cel puţin două legături peptidice, dau pozitivă reacţia biuretului, evidenţiind prezenţa lor în lichide biologice.

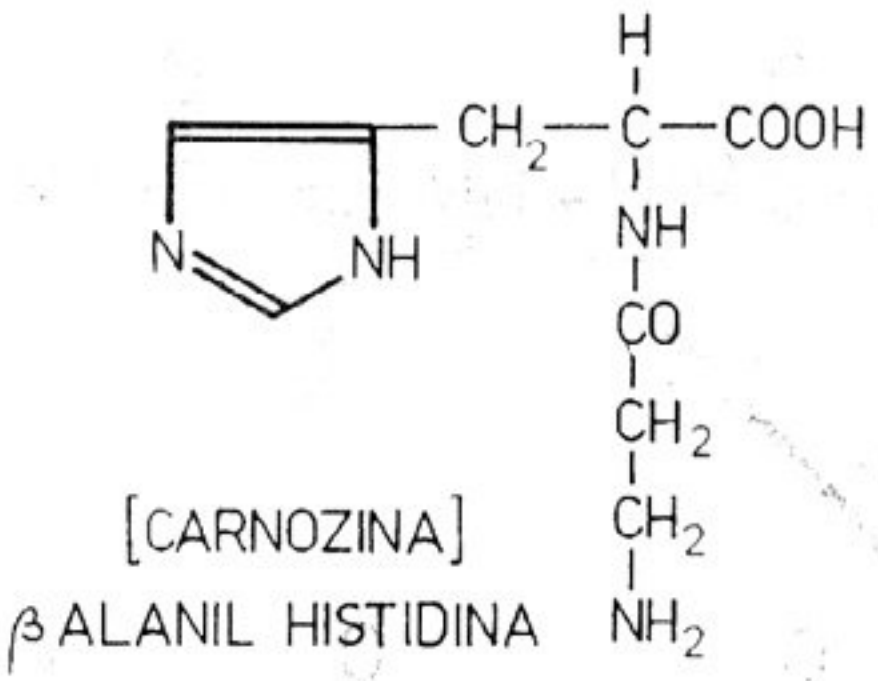
Ca origine, peptidele prezente în organismul uman pot proveni prin biosinteză din aminoacizi - cum este în general cazul peptidelor cu funcţii biologice - fie ca produşi intermediari în procesele biochimice de degradare şi biosinteză a macromoleculelor proteice.

1.3.2 Dipeptide

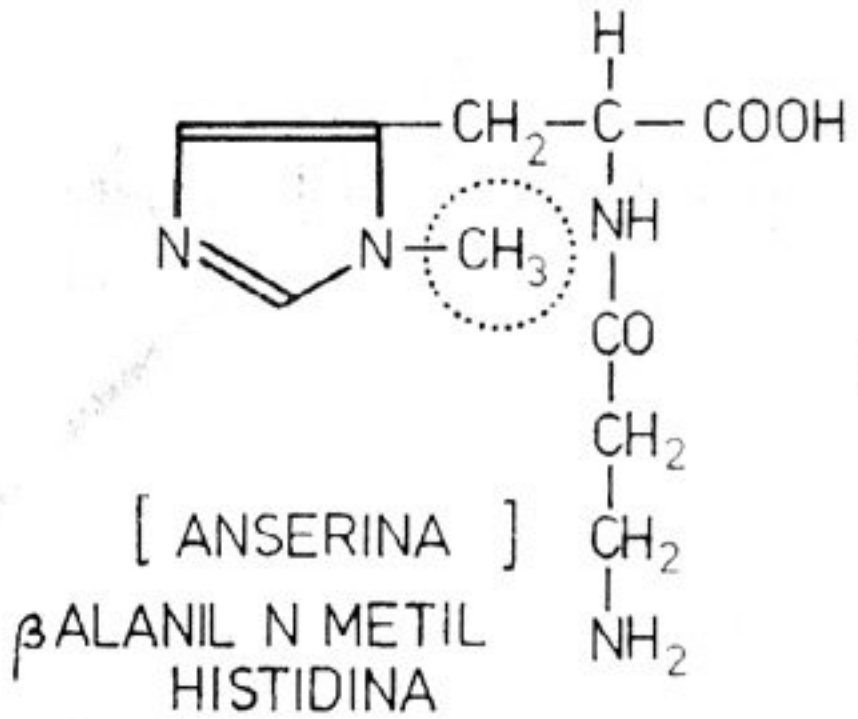
In organismul animal şi uman au fost identificate şi caracterizate peptide ce îndeplinesc importante funcţii biochimice.

Principalele dipeptide naturale sunt **carnozina** şi **anserina** cu structuri asemănătoare amândouă fiind componente specifice ale muşchilor; **carnozina** fiind prezentă în muşchiul **mamiferelor**, iar anserina în muşchiul pectoral al păsărilor.

Atât carnozina, cât şi anserina, iau naştere prin condensarea histidinei cu ß alanina, diferenţa constând în faptul că anserina conţine o grupare metil în ciclul imidazolic, care provine de la metionina activată (S-adenozil metionina).



[CARNOZINA]
βALANIL HISTIDINA



[ANSERINA]
βALANIL N METIL HISTIDINA

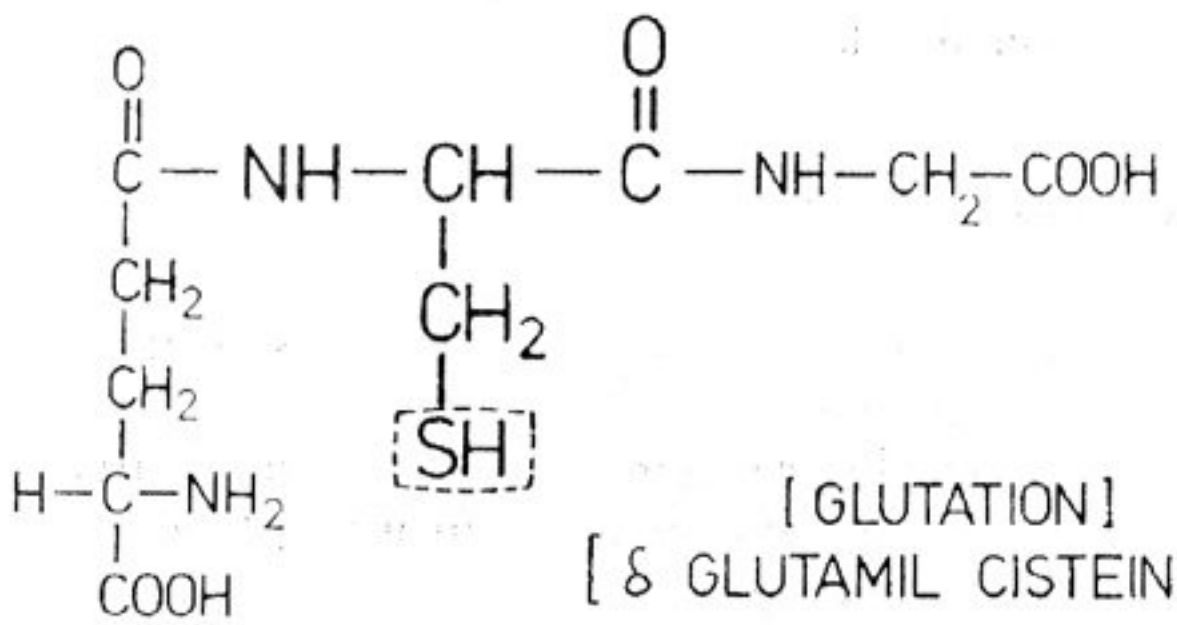
Ambele dipeptide sunt considerate **atipice** nefiind constituite numai din α aminoacizi; fiecare cuprinde un α aminoacid - histidina şi un ß aminoacid - ß alanina.

Roluri biologice

- carnozina exercită acţiune hipertensivă;
- carnozina este un stimulator al secreţiei glandelor;
- joacă un rol activ în transportul acidului fosforic în cursul procesului de glicoliză şi în formarea creatinfosfatului;
- sub formă de **carnozinfosfat** este donor de grupări fosfat în contracţia musculară;
- au rol de substanţe tampon în menţinerea pH-ului fiziologic în contracţia musculară.

1.3.3 Tripeptide

Glutationul este un tripeptid descoperit de Hopkins (1921) în celulele de drojdie, dar este prezent în toate celulele de origine vegetală şi animală. Este constituit prin condensarea a trei aminoacizi: **acidul glutamic, cisteină** şi **glicocol**.

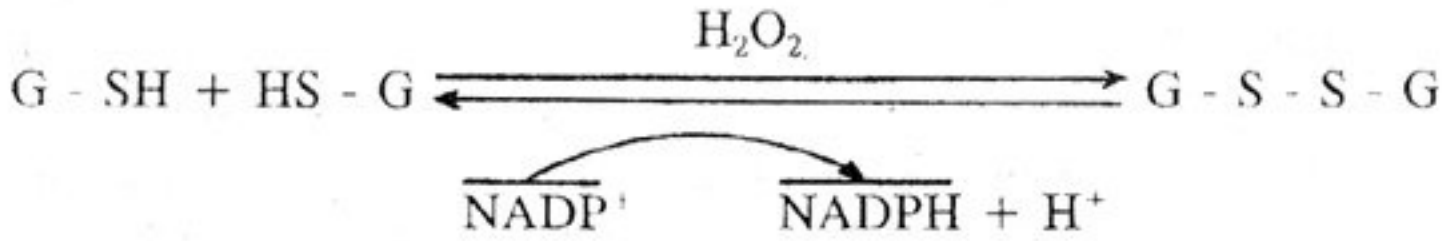


[GLUTATION]
[δ GLUTAMIL CISTEINIL GLICINA]

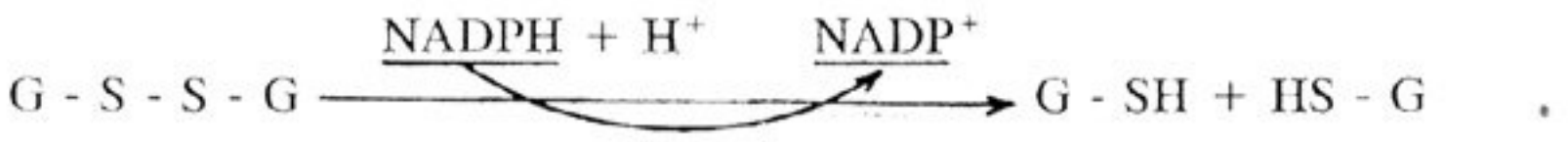
Glutationul este considerat un tripeptid atipic deoarece prima din legăturile sale peptidice s-a format prin eliminarea de apă între grupul amino al cisteinei şi carboxilul din poziţia δ al acidului glutamic (nu cel din poziţia α).

Prezenţa grupării tiolice libere, provenite de la cisteină, conferă glutationului o serie de proprietăţi aparte. Hidrogenul grupării tiolice poate fi cedat unei substanţe acceptatoare

de hidrogen cu unirea a două molecule de glutation redus, formându-se o moleculă de glutation oxidat, proces catalizat de **glutation peroxidază** (enzimă $NADP^+$ dependentă) localizată în eritrocitele umane.



Reacţia inversă este catalizată de **glutation reductază** (enzimă NADPH dependentă) localizată în ficat, rinichi şi drojdie de bere.



Cuprul şi fierul stimulează procesul de oxidare reversibil al glutationului redus (G-SH) în glutation oxidat (G - S - S - G).

Una din căile de catabolism ale glutationului constă în desprinderea glutationului şi în hidroliza cisteinil-glicinei la glicină şi cisteină, în prezenţa unei enzime ribozomale; glutationul poate fi convertit la glutamină sau transferat unei peptide, proces catalizat de enzima γ glutamil transpeptidaza.

Roluri biologice

◆ Glutationul face parte din categoria transportorilor neenzimatici de hidrogen, ca şi acidul ascorbic.

◆ Funcţia de sistem redox a glutationului este catalizată de două enzime ($NADP^+$) dependente: **glutation reductaza** şi **glutation peroxidaza**.

◆ Glutationul are rol de protecţie al enzimelor -SH dependente. Intensifică acţiunea a numeroase enzime, cum ar fi: pepsină, catepsină, hexokinază, alcooldehidrogenază, arginază etc., participă la gruparea prostetică a enzimei glicolitice **triozofosfatdehidrogenaza**.

◆ Protejează punţile disulfitice ale hormonului insulină.

◆ La animale cu diabet experimental cărora li s-a administrat glutation, dezechilibrul glicemic este corectat parţial.

◆ Participă în reglarea şi stimularea biosintezei proteice.

◆ Glutationul redus reacţionează ca antioxidant intervenind în protejarea anumitor substanţe contra oxidării: acidul ascorbic, adrenalina, hemoglobina.

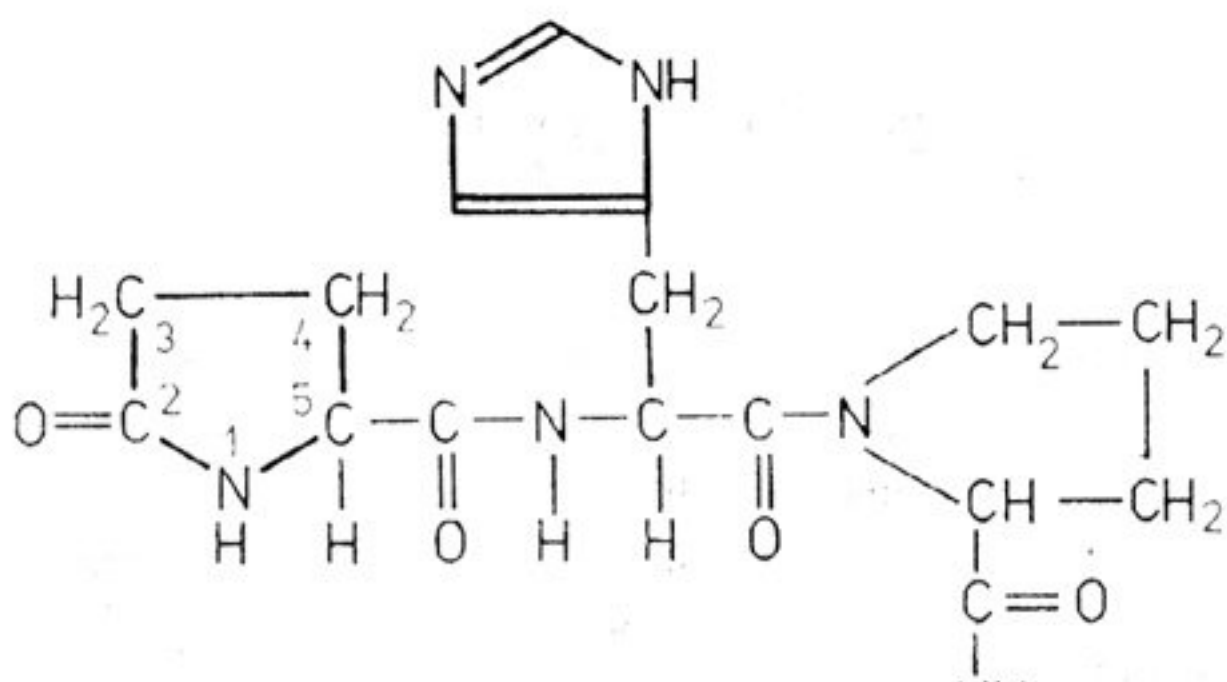
◆ Concepţia modernă asupra procesului de îmbătrânire presupune o acumulare a grupărilor -S-S-şi, prin urmare, glutationul participă la acest proces prin menţinerea unui echilibru -S-S- $\rightleftarrows$ -SH.

◆ Conţinutul în glutation redus (G-SH) al pupilei descreşte cu vârsta; cataracta senilă este însoţită şi de o scădere a glutationului redus.

◆ Are efect antiinfecţios şi antitoxic.

1.3.4 Polipeptide cu activitate biologică

Tehnicile moderne de investigare biochimică au permis să se separe şi să se stabilească structura unor peptide formate dintr-un număr restrâns de aminoacizi şi cu activitate biologică importantă. Hormonii hipofizotropi numiţi şi **"factori de eliberare hipotalamici'** (releasing factors) îndeplinesc rolul de stimulare a hormonilor propriu zişi. Aceştia acţionează direct la nivelul adenohipofizei prin reglarea secreţiei hormonilor adenohipofizari. A fost confirmată prezenţa mai multor hormoni hipofizotropi dintre care au fost obţinuţi în stare pură şi caracterizaţi din punct de vedere chimic. Primul studiat şi caracterizat a fost factorul de eliberare a hormonului de stimulare al tiroidei (TRF) format din acid glutamic ciclizat, histidină şi prolinamidă.



[2-PIROLIDON-5 HISTIDINIL-PROLINAMIDA]

Acest factor a putut fi obţinut într-o cantitate de 2 mg,pornindu-se de la 750.000 fragmente de hipotalamus.

In tabela 1.7 sunt consemnate o serie de polipeptide cu roluri biologice foarte diverse, în special cu activitate hormonală: hormoni propriu zişi, hormoni tisulari, hormoni digestivi, asupra cărora vom reveni într-un studiu aprofundat în capitolul Hormoni (vezi vol.II).

Există polipeptide naturale elaborate de microorganisme (**origine bacteriană**), dintre care unele manifestă acţiune **antibiotică**, prezentând un larg interes în chimioterapia modernă.

Din aceasta categorie fac parte: **gramicidine, tirocidine, bacitracine, polimixine, actinomicine, kapreomicine, walinomicine, etamicine, stafilomicine** a căror caracteristică esenţială, este prezenţa în lanţul polipeptidic al acestora, al aminoacizilor din **seria D** alături de aminoacizi din **seria L**, formând uneori o structură ciclică. Frecvent în structura acestor antibiotice întâlnim acidul Łaspartic şi acidul L-glutamic.

Actinomicetele produc nu numai antibiotice macromoleculare, dar şi polipeptide cu efect **anticanceros**, ca de exemplu, **carcinomicina, carcinomidina** aplicate în clinica umană.

Tabela 1.7 **Alte polipeptide cu activitate biologică**

Denumirea	Număr de aminoacizi	Roluri biologice
1. Ocitocina	8	Stimulează contracţia muşchiului neted
2. Vasopresina	8	Acţiune hipertensivă. Antidiuretic
3. Angiotensina I	10	Creşterea presiunii sanguine
4. Angiotensina II	8	Creşterea presiunii sanguine
5. Bradikinina	9	Determină contracţia muşchilor netezi. Efect vasodilatator
6. Insulina	51	Acţiune hipoglicemiantă
7. Glucagon	29	Acţiune hipoglicemiantă
8. Corticopropina	39	Stimulează biosinteza hormonilor corticosteroizi
9. Gastrina I	17	Stimularea secreţiei gastrice
10. Gastrina II	17	Stimularea secreţiei gastrice
11. Secretina	27	Controlează secreţia pancreasului
12. Hormonul melanocit(α)	13	Stimulează producerea de pigment în celulele melanocite ale pielii
13. Hormonul melanocit(ß)	18	Stimulează producerea de pigment în celulele melanocite ale pielii

1.4 Structura proteinelor

Numărul izomerilor posibili ai polipeptidelor, ca şi cel al proteinelor rezultate din unirea mai multor aminoacizi este imens.

Numai în cazul unor polipeptide rezultate din unirea unui număr restrâns de aminoacizi pot rezulta teoretic:

4 aminoacizi N = 4! = 4*3*2*1 = 24 izomeri
5 aminoacizi N = 5! = 5*4*3*2*1 = 120 izomeri
6 aminoacizi N = 6! = 6*5*4*3*2*1 = 720 izomeri
7 aminoacizi N = 7! = 7*6*5*4*3*2*1 =5040 izomeri
.....
10 aminoacizi N = 10! = 10*9*8*7*6*5*4*3*2*1 = 3.628.800 izomeri

Intr-o singură bacterie se apreciază că există 3000 de proteine, în timp ce omul are $5*10^6$ proteine diferite.

Proteinele diferă de la o specie la alta şi se apreciază că există peste un milion de organisme diferite.

Din cele 5 milioane de proteine existente în organismul uman este cunoscută numai structura câtorva zeci de proteine. Pe baza observaţiilor asupra proteinelor cunoscute, s-au putut generaliza şi legifera cunoştiinţele despre structura altor proteine.

Complexitatea structurală a proteinelor rezultă din faptul că sunt macromolecule şi din aranjamentul lor spaţial configuraţional.

Noţiunea de "**Configuraţie**" reprezintă orientarea în spaţiu, respectiv dispunerea tridimensională a atomilor sau grupărilor de atomi ai moleculei în raport cu un anumit centru

de referinţă sau cu o anumită componentă a structurii considerată ca rigidă.

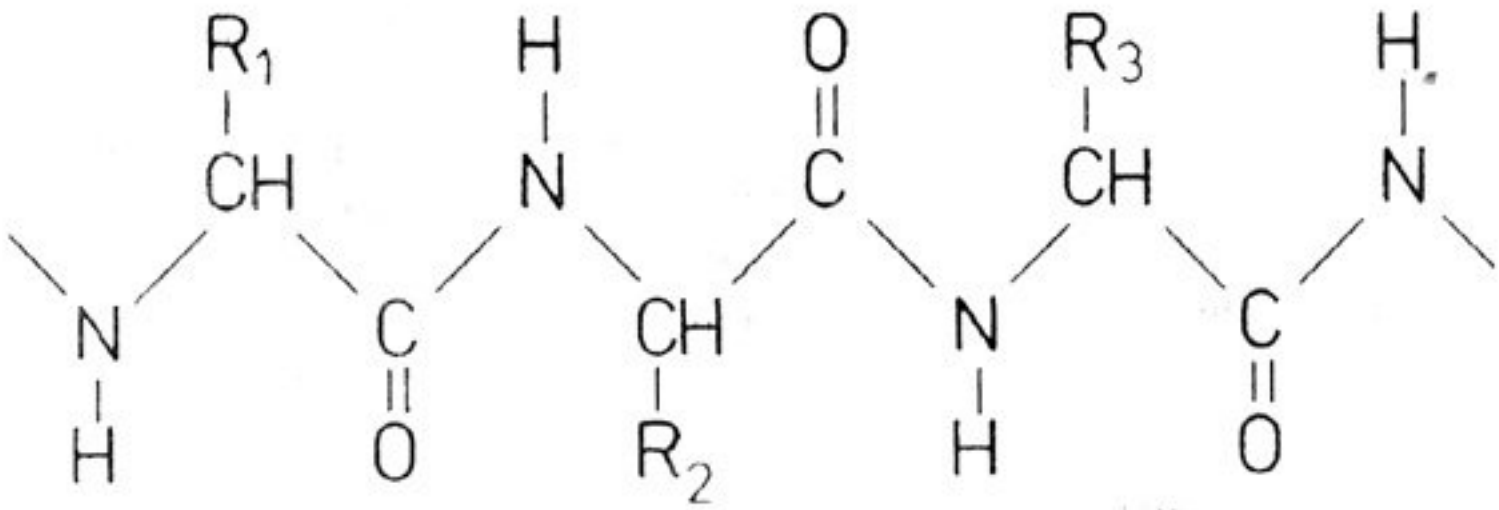
Proteinele se caracterizează printr-o arhitectură spaţială bine definită care reflectă organizarea lor conformaţională stereospecifică.

Structura de ansamblu a macromoleculelor proteice se manifestă ca rezultanta coexistenţei şi interacţiunii mai multor tipuri de structuri sau niveluri de organizare şi anume: **primar, secundar, terţiar** şi **cuaternar**. Intre aceste niveluri de organizare structurală nu există delimitări precise, ele interacţionând în cadrul unei structuri generale unice.

Interdependenţa între aceste structuri defineşte arhitectura de ansamblu a macromoleculelor proteice manifestată prin existenţa unor particularităţi structurale şi funcţionale.

1.4.1 Structura primară

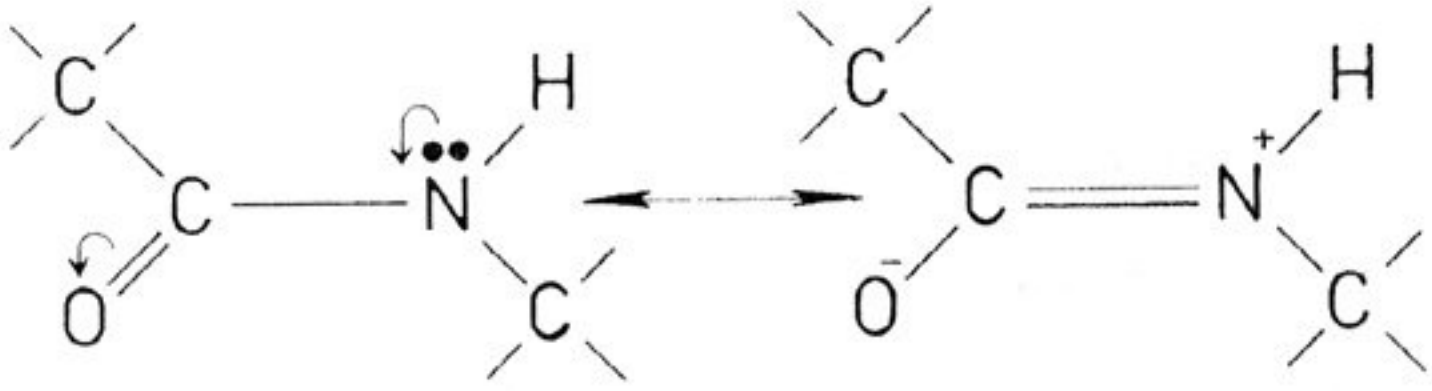
Acest nivel de organizare constituie structura de bază a oricărei proteine. Asamblarea aminoacizilor cu formarea de lanţuri polipeptidice desemnează structura primară:



Legătura peptidică - legătură de tip covalent este cea mai importantă din structura proteinelor.

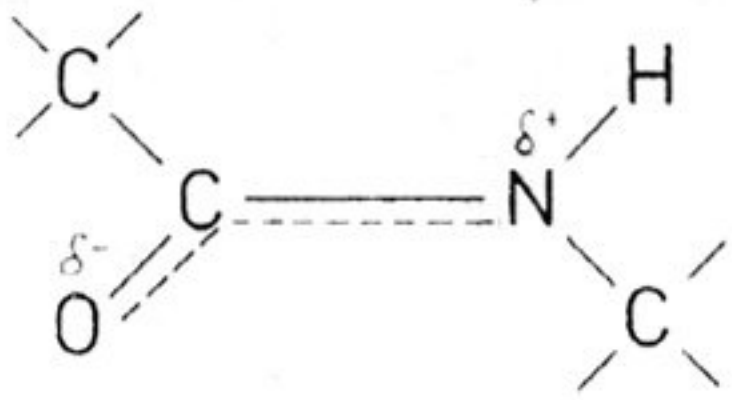
Caracterul legăturii peptidice. Legătura peptidică manifestă un caracter apreciabil de dublă legătură covalentă de tip C-N.

Acest caracter se explică prin următoarele structuri limită de rezonanţă ale legăturii peptidice:



Prin delocalizarea electronilor legătura covalentă C-N dobândeşte un caracter de dublă legătură.

Legătura peptidică devine coplanară şi poate fi reprezentată prin următoarea structură globală, ca exprimare a celor două structuri limită de rezonanţă:



Geometria legăturii peptidice. Legătura peptidică având caracter parţial de dublă legătură, planul relativ rigid în care se află legătura C-N nu permite o rotaţie liberă, ci numai o rotaţie restrânsă a atomilor de C şi N în jurul axei legăturii coplanare C-N.

Orientarea geometrică a celor doi C α adiacenţi legăturii peptidice, ca şi a atomilor de O şi H ataşaţi la legătura peptidică este în poziţia **trans** stabilă din punct de vedere energetic.



Ca o consecinţă a acestei orientări spaţiale precum şi a configuraţiei L a aminoacizilor constituenţi, catenele laterale R ale acestor aminoacizi grefate la fiecare atom C α sunt dispuse într-un aranjament **trans repetabil**.

Organizarea intracatenară este determinată de: numărul, natura şi ordinea aminoacizilor care diferă de la o proteină la alta şi formează **secvenţa proteică**. Structura primară constituie coloana vertebrală a oricărei proteine, determină configuraţia specifică şi activitatea biologică a fiecărei proteine.

Argumente în favoarea structurii polipeptidice.

- nu există decât un număr foarte mic de grupări -COOH şi -NH_2 libere faţă de numărul mare de aminoacizi, deci sunt angajate;
- hidroliza lanţurilor polipeptidice determină apariţia unui număr egal de grupări -COOH şi -NH_2 libere;
- reacţia biuretului caracteristică pentru substanţa numită **biuret**, dar şi pentru produşii care au în structura lor gruparea peptidică (-CO-NH-) repetată este pozitivă deci pentru toate polipeptidele şi proteinele, confirmând astfel prezenţa legăturii peptidice repetate;
- spectrul în UV şi IR, ca de altfel şi studiile difracţiei cu raze X, care permit caracterizarea exactă a structurii diferiţilor compuşi, dovedesc existenţa legăturii covalente -CO-NH- ca formă de unire a aminoacizilor în lanţul polipeptidic.

Tabela 1.8 **Comppoziţia în aminoacizi a unor proteine globulare şi fibrilare (unităţi per moleculă)**

Aminoacidul	Proteine globulare albumină	pepsină	Proteine fibrilare elastină	colagen
Ala	3	18	56	107
Val	45	21	118	29
Leu	58	28	56	28
Ileu	9	27	26	15
Pro	31	15	136	131
Phe	33	14	29	15
Try	1	6	0	0
Met	6	5	0	5
Cly	15	38	376	363
Asp - NH_2	46	44	4	47
Glu	80	27	22	77
Lys	58	1	3	31
Arg	25	2	6	49
Ser	22	44	9	32
Thr	27	28	10	19
Cys	20	4	0	0
Tyr	18	18	8	5
His	16	1	0	5
Radicali nepolari %	55	50	93	72

Operaţiile analitice necesare elucidării structurii primare a proteinelor sunt extrem de complexe, laborioase şi de mare fineţe din care cauza au fost stabilite structurile unui număr restrâns de proteine. Prima secvenţă proteică care a fost stabilită este insulina (Sanger 1953); 10 ani mai târziu trei echipe de cercetători din S.U.A., R.F.G. şi China realizează concomitent sinteza insulinei în laborator, confirmând descoperirea lui Sanger.

După aceasta a urmat ribonucleaza (124 aminoacizi), citocrom C (104 aminoacizi), mioglobina (153 aminoacizi), chimotripsinogenul (245 aminoacizi), tripsinogenul (229 aminoacizi) etc. Cunoaşterea secvenţei proteice ne permite să deducem proprietăţile biologice ale proteinei respective (vezi tabela 1.8).

Proteinele globulare au peste 50% aminoacizi cu grupări polare fiind deci hidrosolubile. Proteinele fibrilare au peste 70-90% aminoacizi cu grupări nepolare hidrofobe, proteinele fiind insolubile în apă şi având o mare rezistenţă mecanică.

Prin compararea structurilor primare ale proteinelor care îndeplinesc funcţii biologice omoloage la organisme diferite se poate stabili gradul de varietate structurală, compatibilă cu o anumită funcţie şi aceste comparaţii permit urmărirea istorici evolutive a proteinei la mai multe specii animale.

Sinteza proteinelor este comandată de un **cod genetic** memorizat în structura acizilor nucleici şi deci secvenţa lor aminoacidă reprezintă expresia unui mesaj genetic. Prin dereglarea sintezei proteice, datorită unei cauze genetice, în cadrul proteinelor cu activităţi biologice înlocuirea unui singur aminoacid în secvenţa proteică are consecinţe metabolice deosebit de grave.

Dacă în hemoglobina umană, în unul din cele patru lanţuri ($2\alpha+2ß$) un singur

aminoacid, **acidul glutamic** (poziţia 6 din catena ß) este înlocuit cu valină duce la apariţia în eritrocitele umane a **hemoglobinei S** care caracterizează **"anemia falciformă"**.

1.4.2 Structura secundară

Proteinele native nu reprezintă simple catene polipeptidice, ci ele se constituie într-o organizare spaţială tridimensională.

Aranjamentul spaţial unic pe care un lanţ polipeptidic îl adoptă în mediul intern al organismului este coordonat de cerinţe termodinamice şi este rezultanta tuturor **interacţiunilor necovalente** care se pot stabili în ansamblul moleculei, astfel ca nivelul său energetic să fie minim.

Structura secundară reprezintă organizarea spaţială a catenelor polipeptidelor, organizare generată şi stabilizată datorită legăturilor de hidrogen care se stabilesc: **intracatenar** şi **intercatenar** între grupările -NH- şi -CO- ale legăturii peptidice.

Deşi legăturile de hidrogen sunt relativ slabe, totuşi stabilitatea structurii secundare este asigurată prin posibilitatea formării acestor legături într-un număr mare şi prin repartizarea lor uniformă de-a lungul catenelor polipeptidice.

Aceste interacţiuni necovalente de energie joasă au energii de activare mici, se stabilesc cu viteze foarte mari, fără intervenţia unor factori externi şi sunt eficiente prin însumarea efectelor unui număr mare de legături.

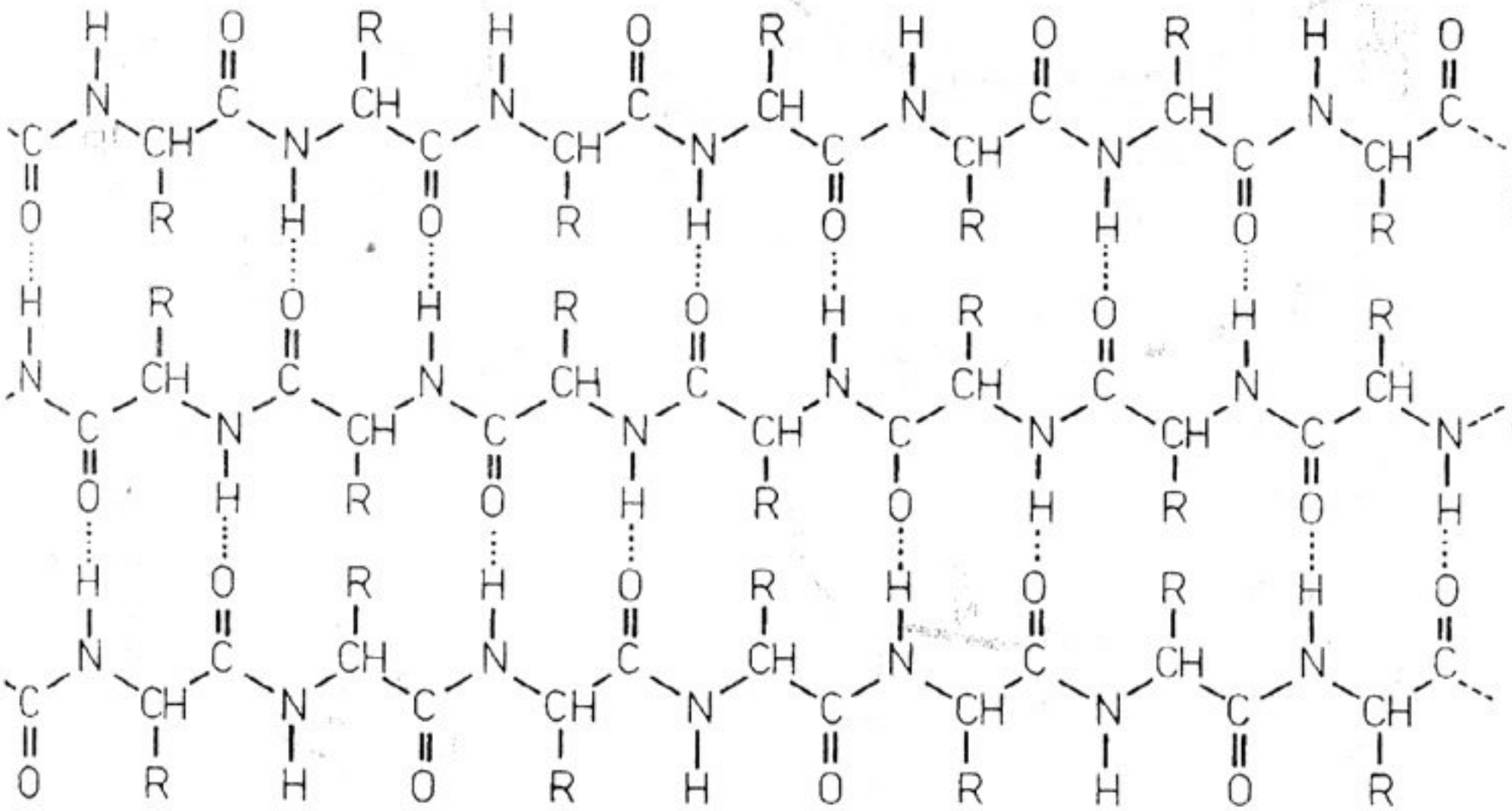


Fig.1.2 **Legături de hidrogen între trei catene polipeptidice**

Structura secundară se reprezintă în trei modele sau variante structurale: A - Modelul α helix; B - Modelul în planuri pliate; C - Modelul de tip colagen.

1.4.2.1 Modelul α helix

Acest model prevede faptul că lanţurile polipeptidice sunt dispuse sub forma unei

conformaţii elicoidale denumite α helix **cu înşurubare spre dreapta**. Lanţul polipeptidic se răsuceşte la nivelul legăturilor simple pentru ca grupările -CO şi -NH să devină adiacente stereochimic pentru a forma punţi de hidrogen:

Această orientare este favorizată din punct de vedere energetic, are o stabilitate mai mare în raport cu orientarea spre stânga şi este predominantă în structura proteinelor native.

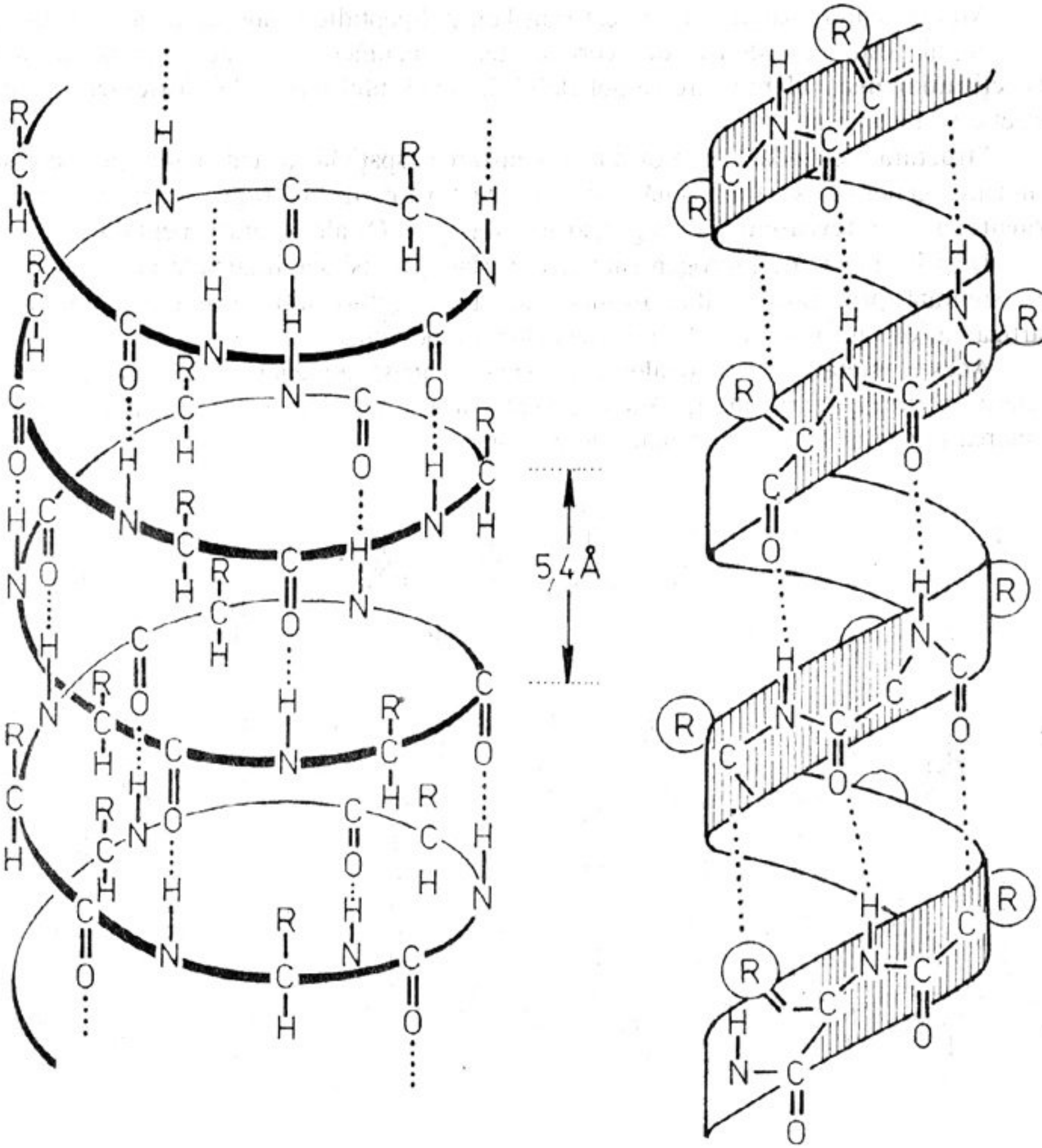


Fig.1.3.-Reprezentări ale conformației ∝-helix

Prin difracţia cu raze X s-a stabilit că α helixul se caracterizează prin următoarele trăsături:

- cu fiecare rest aminoacidic se avansează pe verticală cu 1,47 A; **pasul elicei**, distanţa dintre două puncte echivalente pe verticală este de 5,4 A şi cuprinde 3,6 resturi aminoacidice;

- radicalii R ai tuturor aminoacizilor sunt orientaţi spre exteriorul elicei, configuraţia atomilor C α fiind aceiaşi pentru toţi aminoacizii;

- spirele formate au un ax de simetrie longitudinal;

- o grupare -NH- formează legătură de hidrogen cu gruparea -CO- aparţinând celui de-al patrulea rest aminoacidic din secvenţa lineară, aşa încât toate grupările -NH- şi -CO- formează legături de hidrogen.

Proteinele native nu sunt alcătuite din conformaţii α helix regulate decât în anumite proporţii, structura lor conţinând şi regiuni neelicoidale, intercalate între regiuni elicoidale. Gradul de spiralare al proteinelor globulare variază de la o proteină la alta, majoritatea reprezentând atât porţiuni α helix, cât şi porţiuni răsucite neelicoidale.

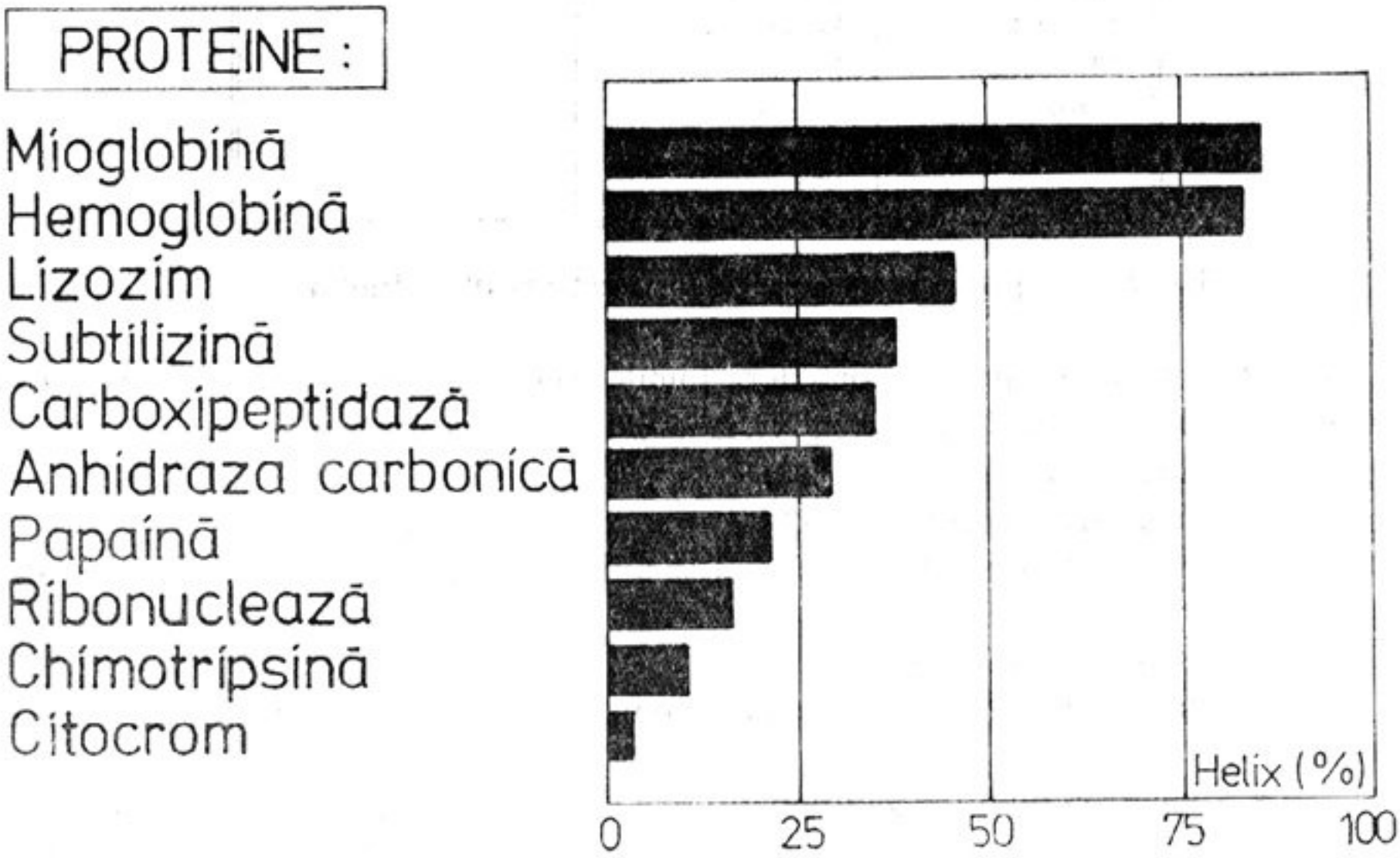


Fig. 1.4 **Conţinutul în α helix al unor proteine**

Există unele proteine fibrilare, ca α keratina din lână care sunt constituite numai din α helixuri regulate. α keratina din lână este formată din trei catene elicoidale (α helix) întrepătrunse şi stabilizate prin punţi disulfurice care alcătuiesc o **protofibrila**; ansamblul a 11 protofibrile formează **microfibrila** de lână.

Discontinuitatea produsă în conformaţia α helix a catenelor plopeptidice este datorată existenţei unor radicali ai aminoacizilor care pot acţiona ca factori **stabilizatori** sau **destabilizatori** ai elicei respective.

Dezorganizarea α helixului în zonele în care apare **prolina** sau **hidroxiprolina**, se explică prin faptul că având gruparea amino mascată nu pot participa la formarea legăturilor de hidrogen şi prin urmare se întrerupe răsucirea elicoidală a lanţurilor polipeptidice, configuraţie incompatibilă cu geometria elicei.

Efectul destabilizator al altor aminoacizi ca valină, izoleucină şi treonină, se datoresc radicalilor voluminoşi de lângă C α care determină o împiedicare sterică a α helixului. Serina destabilizează elicea prin capacitatea de a forma legături de hidrogen la gruparea alcoolică, iar resturile de cisteină formează legături disulfurice, legând rigid porţiuni ale lanţului polipeptidic, făcând imposibilă răsucirea elicoidală.

Dependent de natura radicalului, precum şi a legăturilor pe care le pot genera,

aminoacizii au fost clasificaţi în funcţie de capacitatea lor de a forma α helix (vezi tabela 1.9).

Tabela 1.9 **Aminoacizii care influenţează stabilitatea helixului**

Stabilizează	Labilizează	Rup α helixul
Alanină	Acid glutamic	Prolina
Asparagină	Acid aspartic	Hidroxiprolina
Fenilalanină	Arginină	
Glutamină	Cisteină	
Histidină	Glicocol	
Leucină	Izoleucină	
Metionină	Lizină	
Tirozină	Serină	
Triptofan	Treonină	
	Valină	

1.4.2.2 Tipuri de legături din structura proteinelor

In cazul structurii proteinelor interacţiunile care se produc între diverşi radicali ai aminoacizilor pot conduce la formarea următoarelor tipuri de legături:

A - **Legături covalente**

◆ - **legătură peptidică** (CO-NH-) specifică structurii primare;

◆ - **legătură disulfurică** (-S-S-) stabilite între radicalii de cisteină - specifică structurii terţiare;

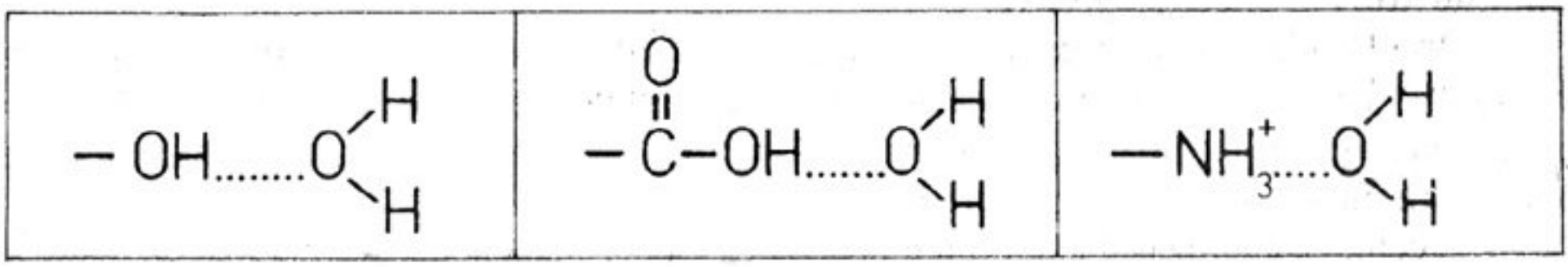
B - **Legături necovalente**

◆ - **legături de hidrogen intracatenare** - între gruparea CO-de pe o spiră şi -NH- de pe altă spiră;

◆ - **legături de hidrogen nepeptidice** - datorită grupărilor alcoolice (din resturi seril, treonil), fenolice (din resturi tirozil), amidice (din resturi glutaminil şi asparaginil);

◆ - **forţe Van der Waals** (legături apolare) şi **interacţiuni hidrofobe** mai slabe decât cele de hidrogen, la care participă aminoacizii cu grupări nepolare: valină, leucină, izoleucină, fenilalanină; regiunile hidrofobe constituite numai din aminoacizi cu catene nepolare **hidrofobe** se găsesc localizate spre interiorul moleculei proteice globulare (**miezul moleculei**) exercitând o funcţie esenţială de stabilizare a componentei structurale şi interne, în timp ce **regiunile hidrofile** se găsesc dispuse spre **exteriorul** moleculei;

◆ - **forţe de interacţiune hidrofile** se stabilesc între radicalii care tind să formeze legături de hidrogen cu molecula apei;



◆ - **legături ionice** - implică forţele de atracţie ce se stabilesc între atomii sau grupările încărcate cu sarcini electrice de semn contrar şi anume, grupările -COOH ale aminoacizilor, aspartic şi glutamic cu grupările NH_2 ale lisinei şi argininei.

1.4.2.3 Modelul în "planuri pliate"

Acest model,denumit şi modelul în "foaie pliată", reprezintă o conformaţie ordonată şi stabilizată prin legături de hidrogen în care se realizează potenţialul maxim de legare al grupărilor >C=O şi -NH- din legăturile peptidice.

In acest caz legăturile de hidrogen se stabilesc **intercatenar**, realizând cea mai stabilă interacţiune dacă lanţurile evoluează antiparalel, unul de la capătul N-terminal spre cel C-terminal şi celălalt în sens invers.

Spre deosebire de modelul α helix, în cel al "planurilor pliate" legăturile de hidrogen intercatenare sunt dispuse aproape perpendicular pe axa catenei polipeptidice.

Prototipul modelului în "**foaie pliată**" îl reprezintă **ß-keratina** - proteina fibrilară din lână, păr, unghii şi fibroina secretată de viermele de mătase **Bombyx mori**.

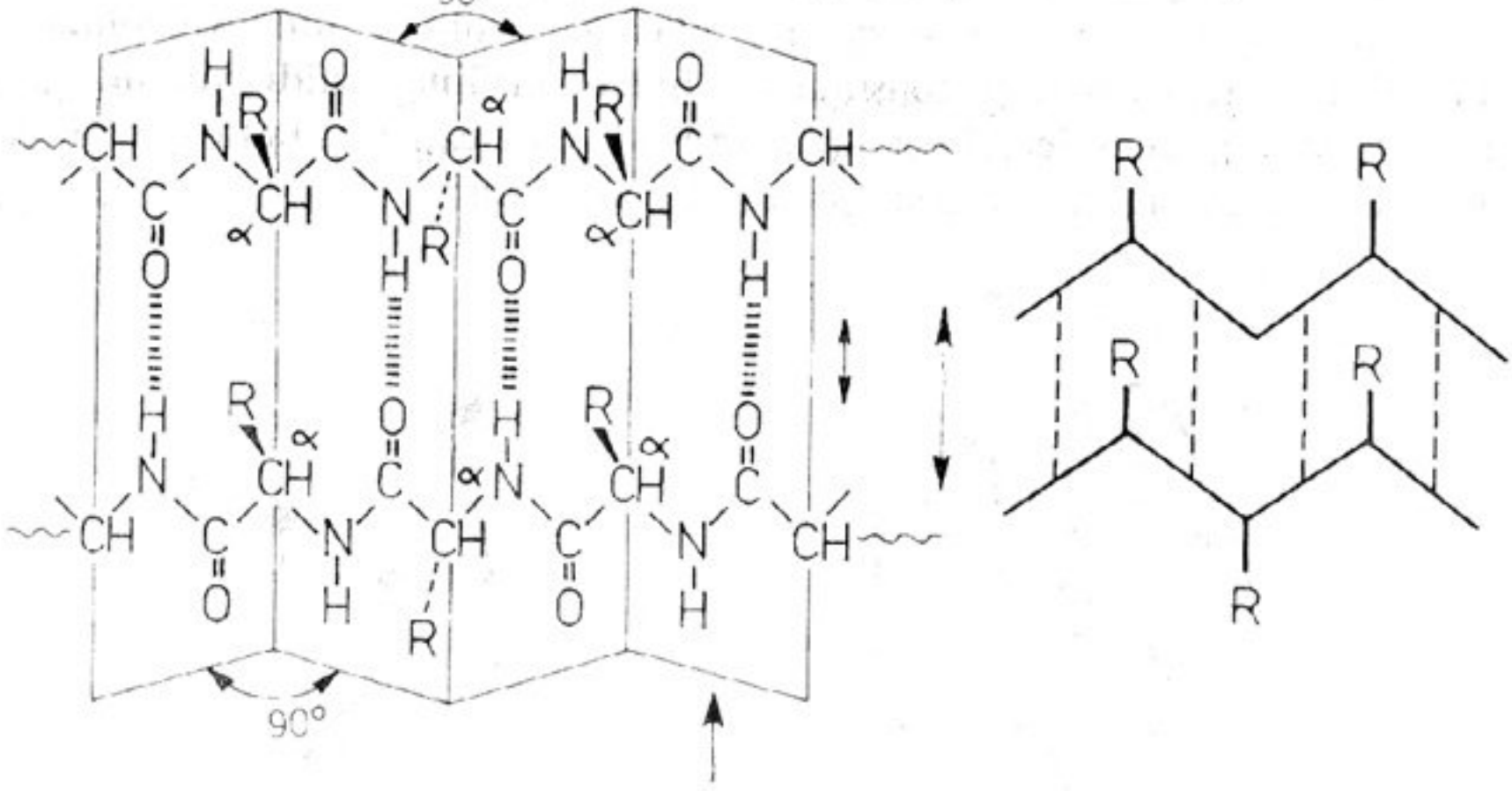


Fig.1.5 a) **Reprezentarea modelului în "planuri pliate" cu evidenţierea legăturilor de hidrogen intercatenare;b) reprezentarea simplificată a modelului.**

Reprezentarea spaţială a ß - keratinei se caracterizează prin următoarele:

- conformaţie "destinsă" în "zig zag" a catenelor polipeptidice;
- catenele polipeptidice sunt dispuse antiparalel între ele stabilindu-se legături de hidrogen intercatenare;
- la constituirea unei asemenea conformaţii participă toate legăturile peptidice care sunt implicate în formarea legăturilor de hidrogen intercatenare, condiţie care conferă o mare stabilitate acestui tip de structură secundară;
- radicalii R ai aminoacizilor sunt dispuşi alternativ **deasupra** şi **dedesubtul** planurilor în zig zag ale catenelor polipeptidice;
- în cele mai multe tipuri de ß-keratină aminoacizii frecvent întâlniţi sunt glicocolul şi alanina având grupele R relativ mici, deoarece un R voluminos sau încărcat electric poate destabiliza structura în foaie pliată.

In anumite condiţii experimentale, **α keratina** - proteină nativă cu structură secundară de tip **α helix** - supusă acţiunii căldurii, umezelii şi a unei tracţiuni se transformă **reversibil** în **ß keratină** proteină cu structură secundară de tip "**planuri pliate**".

α - Keratină ⟷ ß - Keratină

Această conversie este însoţită de o desfacere a **legăturilor** de hidrogen **intracatenare** ale **α keratinei** şi de stabilirea concomitentă a unor legături de hidrogen **intercatenare**; catenele polipeptidice vor suferi o ß - pliere, organizându-se astfel într-un model structural de tip "planuri pliate" caracteristic ß-keratinei.

In acest proces α-keratina se transformă reversibil dintr-o structură secundară **constrânsă** (α helix) într-o structură secundară **relaxată** (planuri pliate).

1.4.2.4 Modelul tip colagen

Colagenul este un alt tip de proteină fibrilară cu o largă răspândire în majoritatea ţesuturilor animale: oase, cartilagii, tendoane, piele, cornee şi membrana bazală.

Rolul său în organism este atât structural, cât şi funcţional, fiind implicat în mecanisme complexe de reglare în timpul creşterii şi refacerii ţesuturilor. Constituie 30% din totalul proteinelor animale şi este bogat în: **glicină, prolină, hidroxiprolină, 5 - hidroxilizină.** Doi dintre aminoacizii constituenţi - **hidroxiprolina** şi **hidroxilizina** - nu pot fi încorporaţi ca atare în lanţurile polipeptidice formatoare de colagen; hidroxilarea are loc numai după încorporarea prolinei şi lizinei în lanţul polipeptidic.

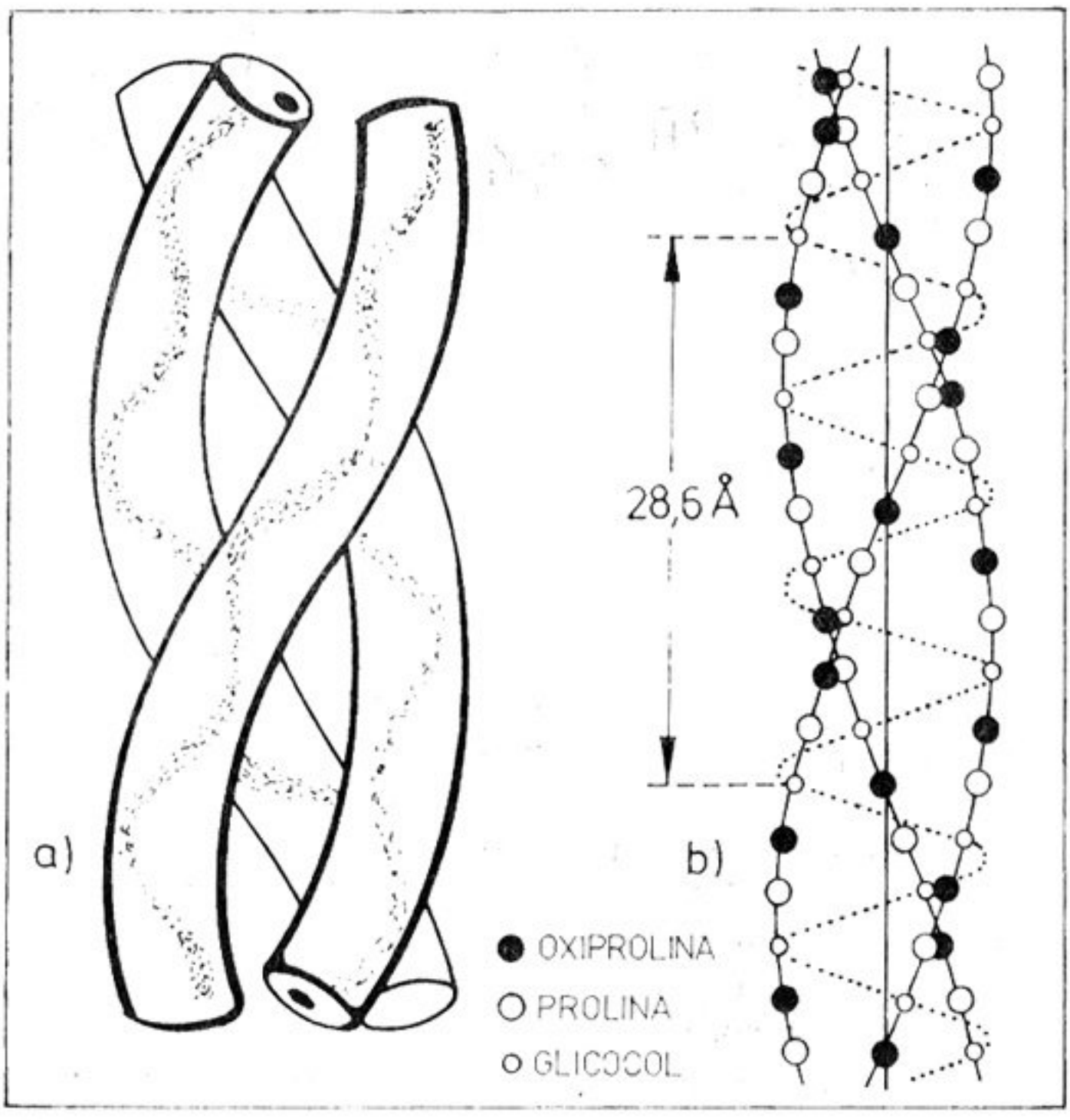


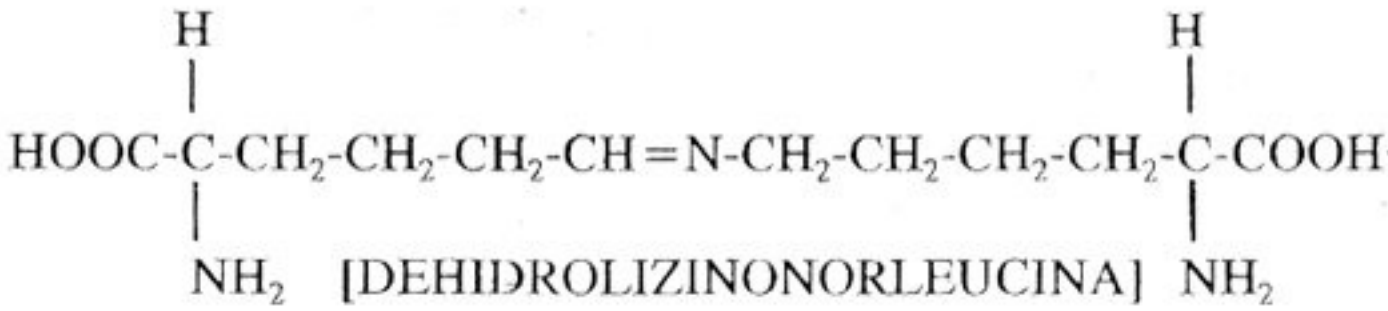
Fig. 1.6 **Molecula de tropocolagen triplu elicoidală.**

Aceşti aminoacizi fac imposibilă formarea legăturilor de hidrogen şi din această cauză molecula de colagen este multiplu spiralată, prezentându-se ca un "**superhelix**" format din

trei catene polipeptidice spiralate care constituie un "**triplu helix**" (vezi figura 1.6).

Colagenul este constituit din unităţi care se repetă, molecule tricatenare de **tropocolagen** (monomeri), având capete distincte.

Tropocolagenul este considerat a fi unitatea fundamentală în structura colagenului, reprezentată de molecule care alcătuiesc fibrele de colagen. Lanţurile polipeptidice ale tropocolagenului sunt legate covalent între ele prin resturi de **dehidrolizinonorleucină** rezultate din reacţia enzimatică a două resturi de lizină din două molecule de tropocolagen alăturate.



Stabilitatea structurii colagenului este asigurată şi de formarea unor legături **ester** între grupările ω carboxilice ale acizilor dicarboxilici şi grupările -OH ale hidroxilizinei.

Colagenul datorează funcţiile sale unei configuraţii moleculare distincte care cuprinde întreaga gamă de nivele de organizare:

- structura **primară** a colagenului este determinată de secvenţa aminoacizilor care compun lanţurile polipeptidice ale moleculei;
- structura **secundară** se referă la organizarea şi structura spaţială a lanţurilor polipeptidice;
- structura **terţiară** reflectă natura legăturilor intercatenare a celor trei lanţuri polipeptidice;
- aranjarea macromoleculelor în spaţiu şi conformaţia lor în fibra de colagen constituie **structura cuaternară**.

Procesul de biosinteză al colagenului are loc în **fibroblaşti** şi **osteoblaşti**, desfăşurîndu-se în două faze:

I. **Fază intrafibroblastică** şi II. **Fază extrafibroblastică.**

I. **Faza intrafibroblastică** are următoarele etape:

a) Transcrierea; b) Translaţia; c) Hidroxilarea prolinei şi a lizinei; d) Transglicozilarea.

Iniţial biosinteza colagenului debutează ca o sinteză a unei proteine obişnuite, dar începe să se deosebească, pe de o parte datorită hidroxilării prolinei şi lizinei, aminoacizi ce nu există în stare liberă în citoplasma celulară, iar pe de altă parte datorită formării la nivelul microzomilor a celor trei lanţuri polipeptidice.

Prezenţa **hidroxiprolinei** şi **hidroxilizinei** este o caracteristică metabolică a ţesutului conjunctiv. Hidroxilarea prolinei şi lizinei are loc simultan cu încorporarea acestor aminoacizi în lanţurile colagenului. Hidroxilarea prolinei şi lizinei are loc sub acţiunea a două enzime: **colagenprolinhidroxilaza** şi **colagenlizinhidroxilaza**.

La hidroxilul hidroxilizinei se fixează unităţi glicozidice sub acţiunea unor transglicozilaze (colagenul fiind o glicoproteidă).

II. **Faza extrafibroblastică** care constă din următoarele etape:

a) - expulzia tropocolagenului;
b) - asocierea moleculelor de tropocolagen;
c) - formarea legăturilor încrucişate;
d) - gruparea moleculelor de colagen.

Legăturile încrucişate se realizează cu concursul lizinei şi hidroxilizinei care sunt oxidate de către o aminooxidază specifică colagenului - **lizinoxidaza**.

Un colagen cu cât are în structura sa mai multe legături încrucişate, cu atât viteza sa de reînnoire va fi mai mică şi invers.

In procesele de cicatrizare elemente ale tropocolagenului sunt transportate pe cale sanguină şi încorporate rapid în colagenul neoformat.

1.4.3 Structura terţiară

Structura primară şi secundară a proteinelor nu pot explica proprietăţile fizico - chimice şi biologice ale proteinelor fibrilare sau globulare.

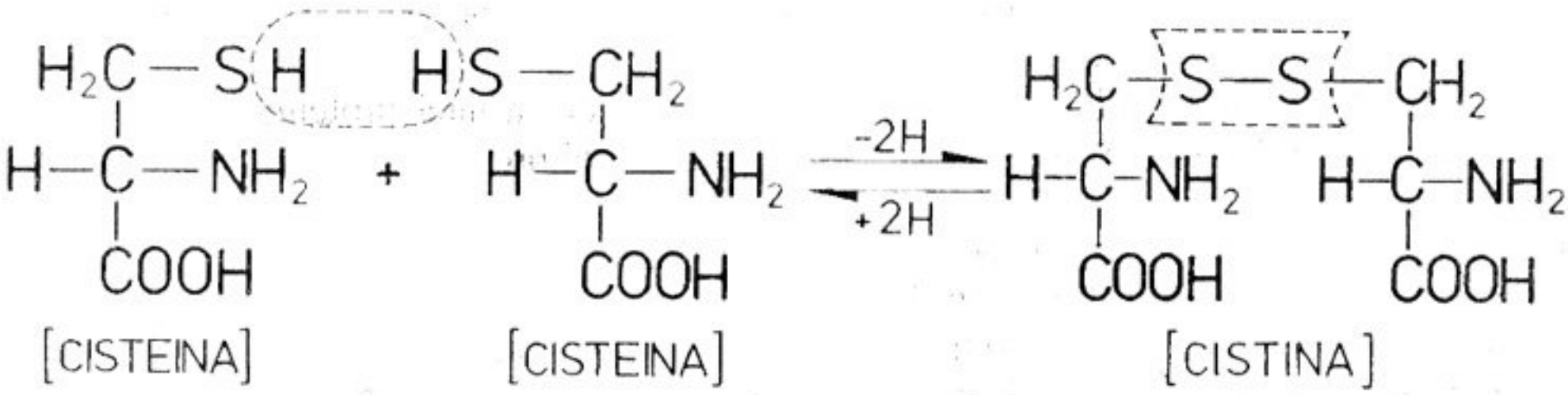
Structura terţiară reprezintă un stadiu avansat de organizare spaţială a structurii proteinelor şi constă în replierea catenelor polipeptidice elicoidale asupra lor înşile. In structura terţiară catena polipeptidică manifestă tendinţa de a suferi o înfăşurare spontană într-o organizare spaţială complexă, cu pliuri ce nu sunt ordonate regulat în spaţiu.

Structura secundară, dar mai ales cea terţiară, induc moleculelor o **stereospecificitate** care este responsabilă de reactivitatea chimică şi biologică a proteinelor.

In cazul proteinelor fibrilare conformaţia proteinelor este ordonată pe întreaga dimensiune a moleculei, ceea ce le va conferi un grad de rezistenţă mecanică deosebit de mare.

In cazul proteinelor globulare zonele ordonate elicoidale vor alterna cu zonele în care lanţurile polipeptidice sunt încolăcite în aparenţă dezordonat.

Forţele de interacţiune care intervin în structura terţiară sunt identice cu cele întîlnite în structura secundară şi în plus, apare legătura covalentă de tip disulfuric -S-S- formată între două molecule de cisteină, caracteristică structurii terţiare.



Resturile cisteinil formează legături disulfurice, care leagă covalent regiuni mai depărtate ale lanţurilor polipeptidice.

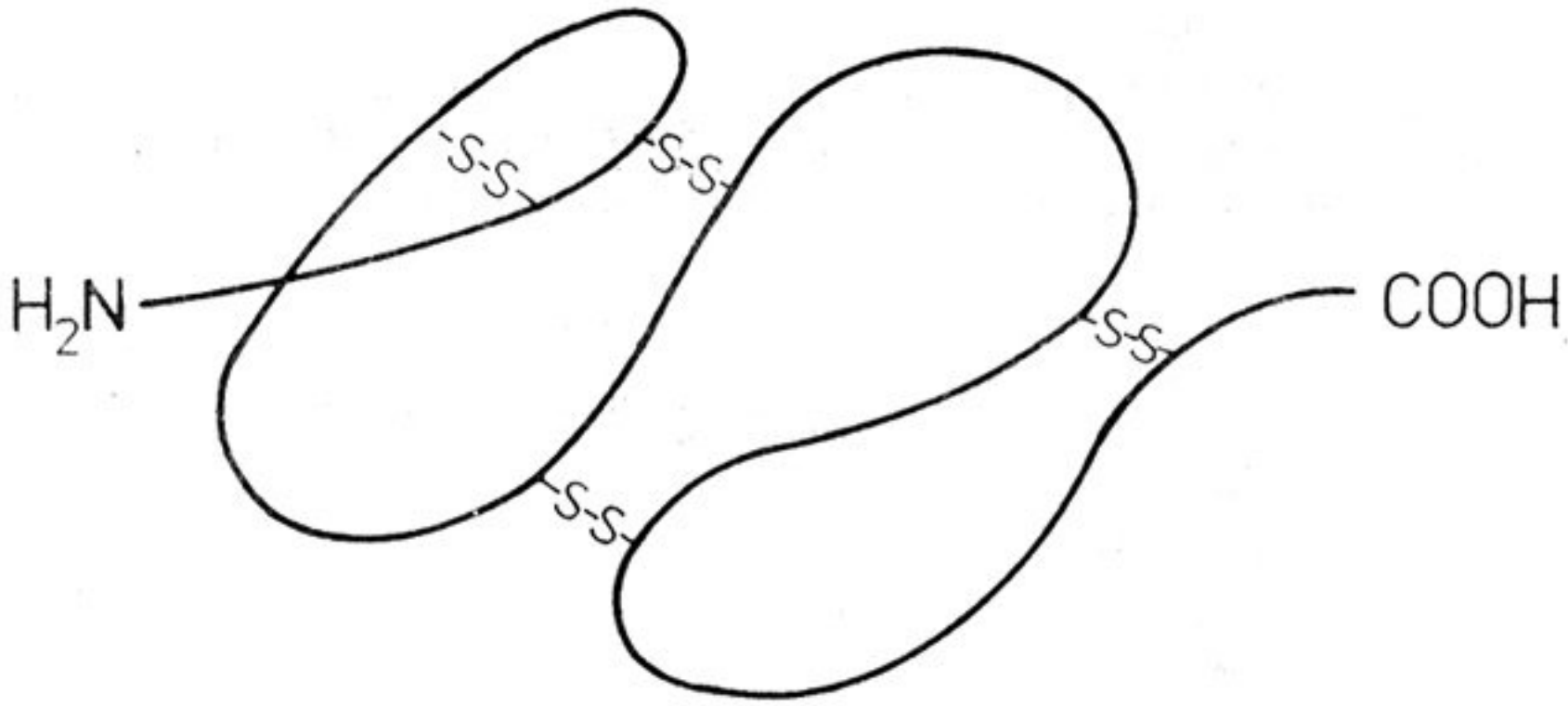


Fig. 1.7 **Reprezentarea punţilor disulfurice în structura terţiară**

Structura terţiară prezintă un grad mare de labilitate în raport cu diferiţii factori fizici şi chimici; desfacerea legăturilor implicate în organizarea structurii terţiare (legăturile disulfurice) determină **denaturarea** proteinelor, proces însoţit de regulă, de pierderea proprietăţilor biologice.

Prima proteină a cărei structură terţiară a fost stabilită în cele mai mici detalii, precizându-se poziţia în spaţiu a tuturor atomilor componenţi este **mioglobina**. Mioglobina este o proteină abundentă în ţesutul muscular al mamiferelor şi este constituită dintr-un lanţ polipeptidic conţinând 153 de resturi de aminoacizi şi o grupare prostetică denumită "Hem".

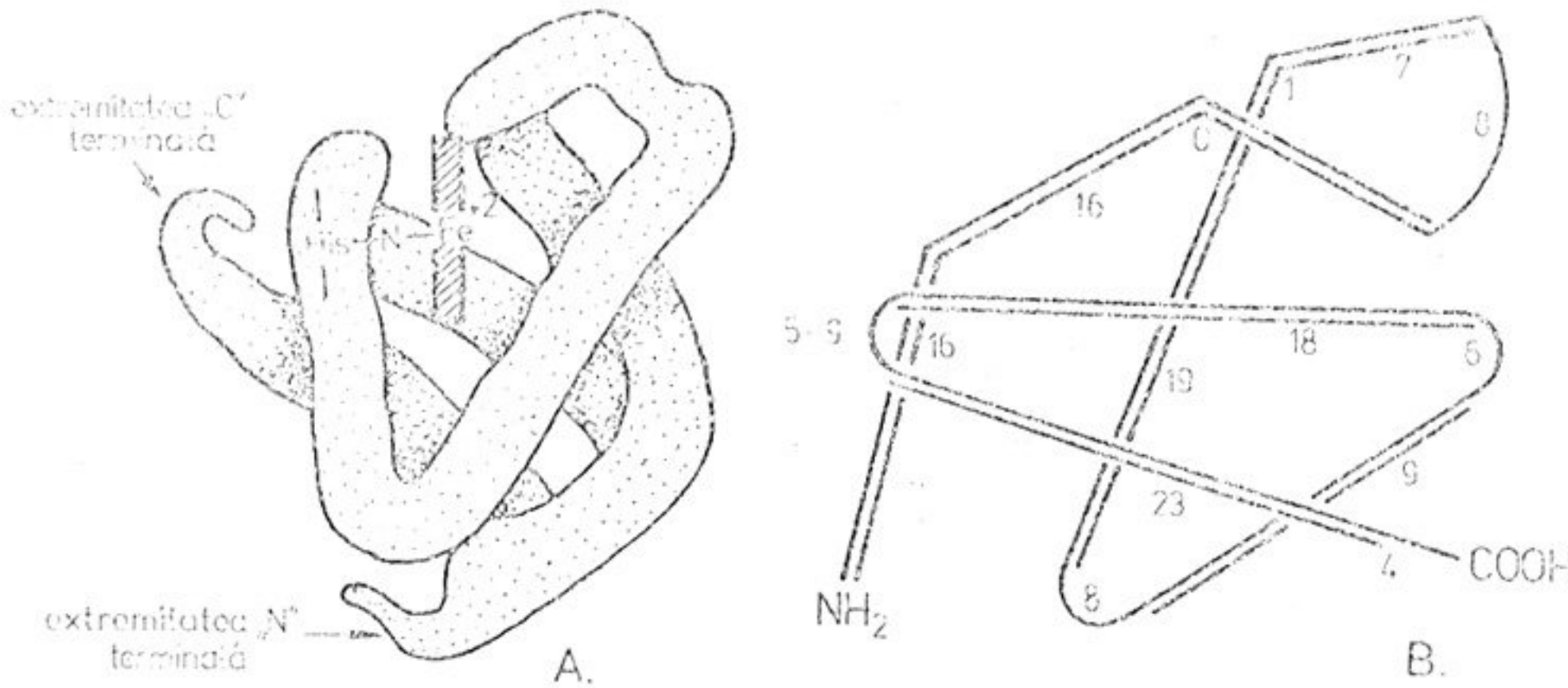


Fig. 1.8 **Structura terţiară a mioglobinei** (A)
Reprezentarea schematică a mioglobinei (B)
(Liniile duble indică segmentele cu α helix, iar cifrele numărul resturilor de aminoacizi)

In general proteinele intracelulare, solubile, au scoase în evidenţă pe suprafaţa moleculei grupările polare şi încărcate electric. Forma sferică sau elipsoidală a moleculei depinde de raportul dintre numărul resturilor aminoacide cu radical polar şi numărul

resturilor cu radical hidrofob.

Dacă raportul **nr Rp/nr Rh** este cuprins între **0,9 - 1,4** se favorizează adoptarea unei **forme alungite** a proteinelor, în timp ce o valoare a raportului de **0,3 - 0,6** face ca proteina să adopte o formă **sferoidală**, deoarece resturile hidrofobe se acomodează mai uşor în centrul unei structuri globulare.

La proteinele membranare înglobate în stratul dublu lipidic repartizarea radicalilor polari şi nepolari ai aminoacizilor este inversă; partea exterioară a moleculelor în contact cu lipidele membranare cuprinde radicalii hidrofobi, iar în interiorul moleculei se delimitează zona cu radicali polari şi încărcaţi electric.

In cazul enzimelor, structura terţiară asigură plasarea în anumite puncte la suprafaţă a radicalilor polari, care au şi calitatea de a fi centrii activi ai enzimei şi vor putea acţiona asupra unui substrat adecvat.

1.4.4 Structura cuaternară

Reprezintă cea mai complexă organizare structurală a proteinelor şi este specifică doar **proteinelor globulare**.

A fost descoperită şi descrisă de Jacob şi Monod (premiul Nobel 1965 - pentru studiul "enzimelor allosterice cu rol de reglare în metabolismul intermediar").

Suprastructura cuaternară reprezintă asocierea unor catene polipeptidice denumite "**protomeri**" într-un ansamblu sau agregat denumit "**oligomer**".

In funcţie de numărul protomerilor constituenţi, structura cuaternară este frecvent formată din dimeri, tetrameri etc.

Funcţia specifică a unei proteine oligomere care prezintă subunităţi protomere, de regulă un număr par, se manifestă numai la nivelul structurii cuaternare, protomerii separaţi fiind inactivi.

Interacţiunile prin care se realizează agregatul molecular şi care stabilizează structura cuaternară se realizează numai prin forţe slabe necovalente:

- ♦ - legături electrostatice;
- ♦ - legături de hidrogen;
- ♦ - legături Van der Waals.

Tabela 1.10 **Proteine oligomere**

Proteina	Masa proteinei Kdaltoni	Număr protomeri	Masa protomerilor Kdaltoni
Miozină	468	2	212
Creatin kinază	80	2	40
Fosfatază alcalină	80	2	40
Hemoglobină	64,5	4	16
Lactat dehidrogenază	150	4	35
Aldolază	160	4	40
Glicogen fosforilază	270	4	92,5
Piruvat Kinază	237	4	57,2
Ceruloplasmină	151	8	18
Glutamin sintetază	592	12	48,5

Un exemplu tipic de organizare structurală îl constituie **hemoglobina**, pigment sanguin

cu rol în transportul O_2.

Structura cuaternară a hemoglobinei reprezintă un tetramer constituit din 2 catene α identice (141 resturi de aminoacizi) şi 2 catene ß identice (146 resturi de aminoacizi).

Asocierea celor patru protomeri pentru formarea structurii cuaternare a hemoglobinei poate fi redată prin relaţia:

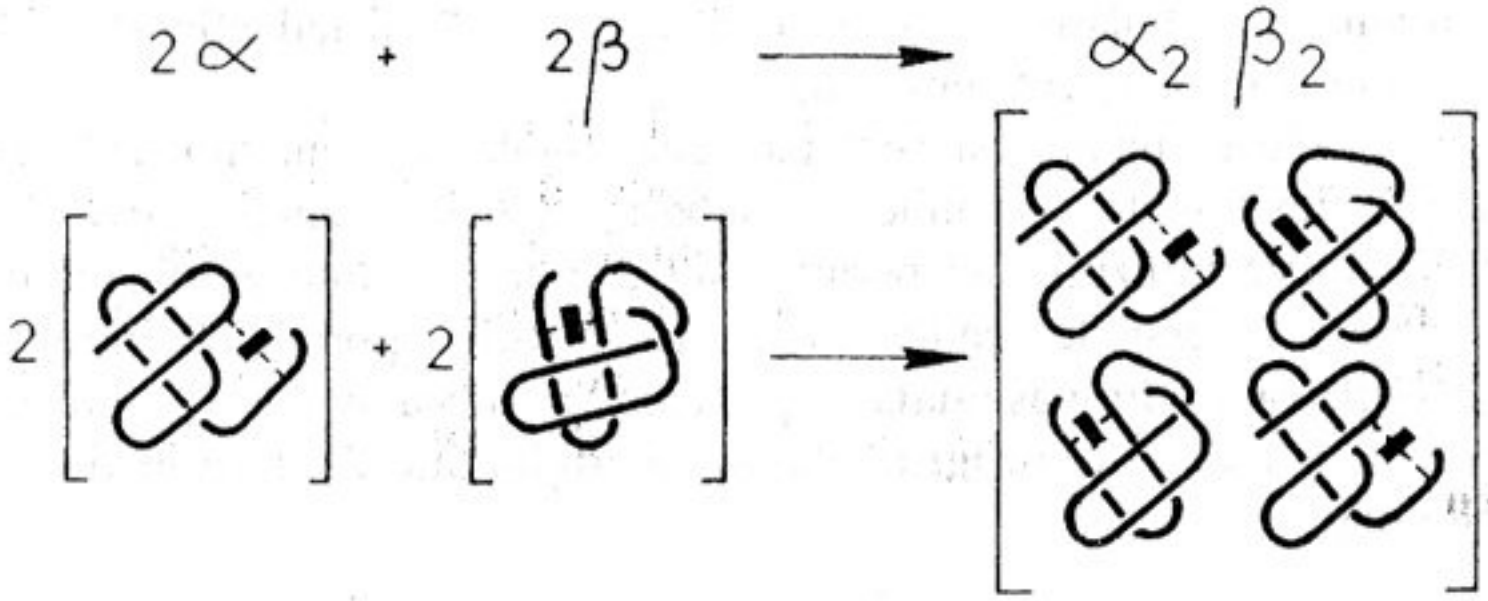


Fig.1.9 **Asocierea protomerilor structurii cuaternare a hemoglobinei**

Această asamblare corespunde necesităţilor **termodinamice** de realizare a unor sisteme stabile. Structurile cuaternare permit funcţionarea unor mecanisme fine de reglare a activităţii proteinenzimelor - **reglare allosterică** - caracteristică enzimelor allosterice (vezi cap.3.5.7.4).

1.4.5 Morfologia moleculelor proteice

In funcţie de forma şi aspectul lor, precum şi pe baza diferenţelor în structura tridimensională şi a solubilităţii în apă, proteinele se încadrează în două categorii: proteine **fibrilare** şi proteine **globulare**.

I. - **Proteinele fibrilare** se caracterizează prin:

◆ - au aspect **filiform** fiind compuse din catene polipeptidice lungi în formă de filament;

◆ - catenele sunt unite lateral prin **legături încrucişate** pentru a forma o structură stabilă;

◆ - această morfologie conferă proteinelor fibrilare **rezistenţă mecanică** şi insolubilitate în apă;

◆ - prezintă structură primară, secundară şi terţiară;

◆ - prezintă conformaţii: α helix, planuri pliate, triplu helix care se caracterizează prin faptul că sunt **ordonate** şi prezintă axe sau planuri de simetrie;

◆ - au mase moleculare mari şi structură repetitivă;

◆ - îndeplinesc roluri biologice specifice: elasticitate, rezistenţă mecanică, şi intervin în exercitarea unor importante funcţiuni fiziologice: contracţia musculară, coagularea sângelui.

II. - **Proteinele globulare** se caracterizează prin:

◆ - posedă o structură tridimensională mult "înfăşurată" care rezultă din încolăciri

ale lanţului polipeptidic într-o formă nefibrilară, elipsoidală sau aproape sferică;

◆ - proteinele globulare au un aspect compact şi sunt solubile în apă, deoarece posedă radicali polari într-o mare proporţie;

◆ - prezintă proporţii diferite în α helix;

◆ - prezintă toate cele patru nivele de organizare structurală a proteinelor: primar, secundar, terţiar şi cuaternar;

◆ - proteinele globulare există într-o mare varietate şi îndeplinesc multiple roluri biologice în organism inclusiv cele enzimatice;

◆ - proteinele globulare nu sunt molecule rigide, ci sunt molecule caracterizate printr-o anumită flexibilitate, capabile să suporte tranziţii semnificative la alte stări conformaţionale; aceste tranziţii sunt permise numai între anumite limite, fiind însoţite de modificări discrete şi reversibile denumite **tranziţii conformaţionale** ale întregii molecule;

◆ - **structura tridimensională** a proteinelor, adică nivelul secundar, terţiar şi cuaternar al proteinelor, este **programată şi condiţionată** de informaţia conţinută în **structura primară**.

1.5 Proprietăţi generale ale proteinelor

Proteinele se caracterizează printr-un ansamblu de proprietăţi fizico - chimice şi biologice. Cercetarea proprietăţilor proteinelor în scopul caracterizării lor impune existenţa acestora în stare pură, ceea ce necesită extracţia prin metode şi tehnici foarte laborioase şi de mare fineţe.

In cele ce urmează vom prezenta o parte din cele mai importante caracteristici ale proteinelor.

1.5.1 Proprietăţi electrochimice. Electroforeza

Proteinele sunt amfoliţi macromoleculari, posedând un caracter amfiionic datorat unui număr variabil de aminoacizi care cuprind grupări polare disociabile cu caracter acid sau bazic.

Contribuţia cea mai importantă o au resturile glutamil, aspartil, lizil, arginil şi histidil.

Datorită acestor grupări libere ionizabile proteinele se comportă ca **anioni (în mediu bazic)** sau **cationi (în mediu acid)**, în funcţie de pH; la pH - ul fiziologic toate aceste funcţii acide sau bazice sunt ionizate complet.

Datorită caracterului lor amfoter proteinele se comportă ca sisteme tampon participând la menţinerea valorii constante a pH - ului mediului biologic.

Există o valoare a pH - ului la care proporţia sarcinilor electropozitive ale moleculei de proteină este egală cu cea a sarcinilor electronegative, caz în care sarcina electrică netă a moleculei devine nulă; această valoare a pH - ului poartă denumirea de **punct izoelectric** al proteinei (pI).

Valoarea pI este independentă de concentraţia proteinei şi depinde de compoziţia sa aminoacidă, de predominanţa resturilor acide sau a celor bazice (vezi tabela 1.11).

Tabela 1.11 **Valorile pI pentru unele proteine**

Proteine	pI	Proteine	pI
Pepsină	1,00	Serum γ globulină	6,4 - 7,2
Cazeină	4,60	Mioglobină	6,99
Ovalbumină	4,60	Hemoglobină	7,07
Serumalbumină	4,90	Citrocrom C	10,60
Miozină	5,20	Lizozim	11,00
Insulină	5,35	Histonă	10,80
Fibrinogen	5,50	Salamină	12,10

O proteină cu pI > 7 conţine un exces de lizină şi/sau arginină în timp ce o proteină cu pI < 7 are un conţinut mare de aminoacizi dicarboxilici.

La pH - ul izoelectric (pI) solubilitatea şi mobilitatea proteinelor în câmpuri electrice este minimă, în timp ce la pH - uri depărtate de pI aceste proteine au încărcătură netă (+) sau (-).

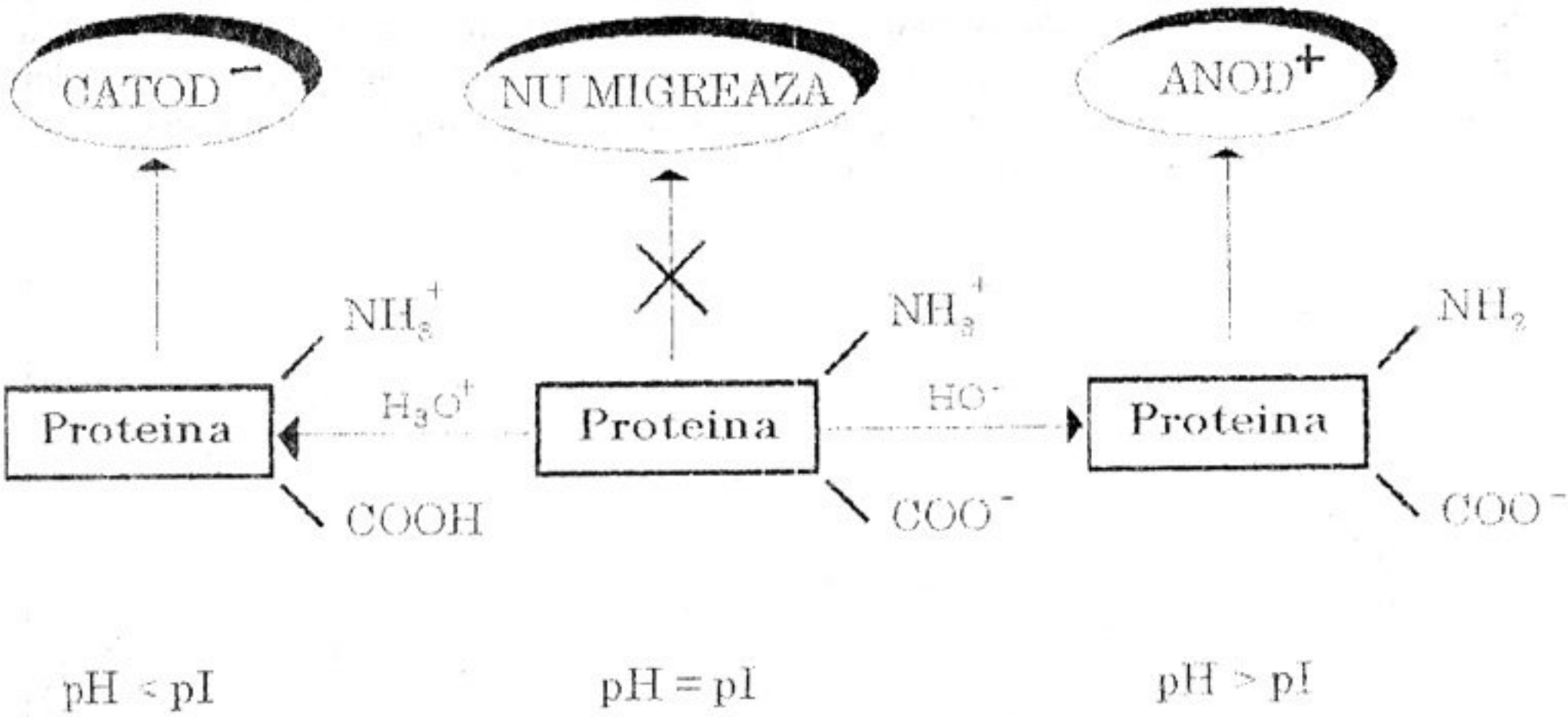


Fig. 1.10 **Comportarea proteinelor în câmpul electric la pH - uri diferite de pI**

Sub formă ionizabilă, de anioni şi cationi, proteinele au proprietatea de a migra într-un câmp electric. Această proprietate denumită **electroforetică** stă la baza tehnicilor electroforetice de separare a proteinelor dintr-un amestec eterogen.

Migrarea unei proteine sub acţiunea unui câmp electric se exprimă printr-o mărime caracteristică şi anume **mobilitatea electroforetică** (u) care reprezintă viteza de deplasare a unei particule corespunzătoare unui câmp de un volt/cm.

Mobilitatea electroforatică este direct proporţională cu viteza (v) şi invers

proporţională cu intensitatea câmpului (E).

$$u = \frac{V}{E} = cm^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$$

Separarea fracţiunilor proteice şi mobilitatea electroforetică a acestora este dependentă de pH - ul soluţiei tampon în care se efectuează electroforeza, deoarece disocierea grupărilor ionizabile şi repartizarea sarcinilor electrice ale proteinei sunt influenţate de valoarea pH - ului.

Datorită faptului că proteinele diferă prin pI şi valoarea globală a sarcinilor electrice, mobilităţile lor electroforetice vor diferi la o anumită valoare de pH şi pe această bază ele pot fi fracţionate electroforetic în scop analitic sau preparativ.

1.5.2 Denaturarea proteinelor

Prin expunerea soluţiilor proteice la condiţii incompatibile cu condiţiile necesare menţinerii integrităţii structurale a proteinelor se produce denaturarea acestora. Denaturarea poate fi: a) **reversibilă**; b) **ireversibilă**.

In cazul denaturării reversibile sunt afectate interacţiunile necovalente de energie joasă din structura proteinelor, dar la înlăturarea factorului denaturant proteinele îşi revin la starea lor nativă. In cazul denaturării ireversibile au loc modificări profunde în structura spaţială a proteinelor, acestea suferă o depliere, o dezorganizare, ca rezultat al desfacerii diferitelor legături ce menţin structura secundară şi terţiară şi în primul rând a legăturilor disulfurice, fără a se scinda legăturile peptidice cu eliberare de aminoacizi.

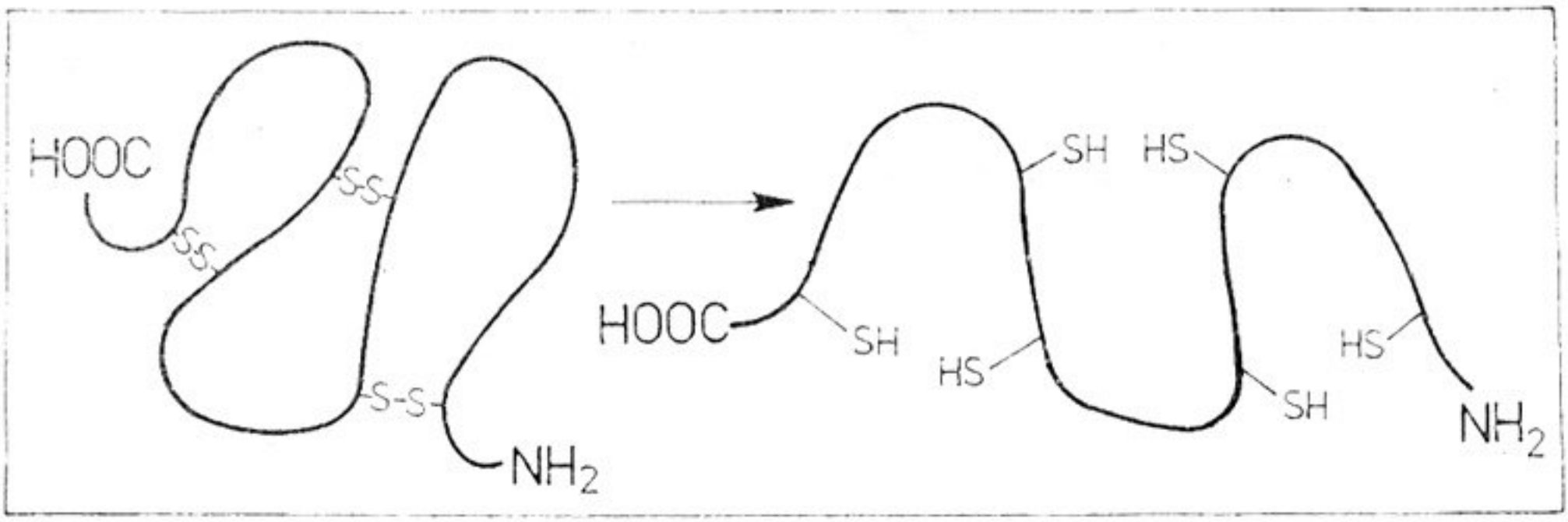


Fig.1.11 **Denaturarea proteinelor**

Denaturarea ireversibilă implică deci trecarea de la o conformaţie spaţială ordonată a moleculelor proteice la o stare dezordonată însoţită de creşterea entropiei.

Consecinţele denaturării sunt:

- ◆ - pierderea activităţii biologice;
- ◆ - diminuarea solubilităţii:
- ◆ - creşterea numărului de grupări -SH libere;
- ◆ - pierderea capacităţii de a se combina cu apa;
- ◆ - modificarea vâscozităţii şi a presiunii osmotice;

◆ - creşterea susceptibilităţii la hidroliza enzimatică.

Agenţii care provoacă denaturarea proteinelor sunt de natură **fizică** (temperaturi de peste 60°C, agitare, raze X şi γ, radiaţii ultraviolete, ultrasunete) şi **chimică** (acizi, baze, săruri ale metalelor grele, solvenţi organici, agenţi tensioactivi).

Denaturarea proteinelor sub acţiunea agenţilor tensioactivi sau a solvenţilor organici demonstrează rolul interacţiunilor hidrofobe în realizarea conformaţiei native a unei proteine.

Denaturarea proteinelor are şi importanţă teoretică pentru elucidarea structurii şi a forţelor implicate în diferitele niveluri de organizare structurală.

1.5.3 Proprietăţile imunologice

Una din manifestările specificităţii proteinelor este reprezentată prin proprietăţile lor imunologice la baza căreia stă reacţia **antigen - anticorp**.

Procesele imunologice se definesc ca **reacţii de apărare** ale organismului, reacţii prin care se realizează neutralizarea toxinelor, a microorganismelor, sau chiar ale celulelor organismului care au dobândit caractere anormale.

Antigenii - reprezintă proteine care sunt **străine** pentru organismul în care au pătruns pe **cale naturală** sau prin **injectare** şi care declanşează elaborarea sau biosinteza unor proteine de apărare denumite **anticorpi**. Antigenul reacţionează cu anticorpii formaţi determinând reacţia **antigen - anticorp**, reacţie prin care acţiunea nocivă a antigenului este anihilată.

Conceptul de antigen prezintă o dublă semnificaţie:
- desemnează o substanţă **străină** organismului care reacţionează cu anticorpii corespunzători;
- reprezintă o substanţă **imunogenă** care provoacă reacţia imunitară prin formarea de anticorpi.

Molecula de antigen prezintă mai multe zone de combinare denumite **determinanţi antigenici**. Determinanţii antigenici sunt reprezentaţi prin diferite grupări: -NH_2, -OH, -SH sau radicali de aminoacizi ciclici (Phe, Tir, Trp). Structura unui antigen polivalent poate fi astfel schematizată (fig.1.12).

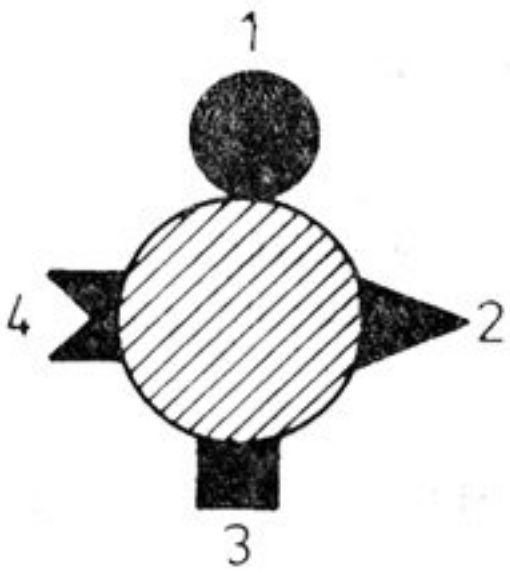


Fig.1.12 **Structura stilizată a unui antigen (1;2;3;4 - determinanţi antigenici)**

Anticorpii sunt substanţe de natură proteică cu rol de apărare, a căror biosinteză este declanşată de către antigen şi care posedă capacitatea de a reacţiona specific cu antigenul.

Anticorpii aparţin categoriei γ globulinelor şi se mai numesc **imunoglobine** (Ig), datorită proprietăţilor lor imunologice.

Imunoglobinele se clasifică în trei clase majore: IgG, IgA şi IgM, fiecare în parte se divide în mai multe subgrupe produse de celule specializate (splină, măduvă, celule limfatice) şi sunt eliberate în ser.

Anticorpii spre deosebire de antigeni sunt "**bivalenţi**" având două situsuri sau zone

de combinare la nivelul cărora se leagă antigenii şi care se caracterizează printr-o organizare spaţială **complementară** determinanţilor antigenici.

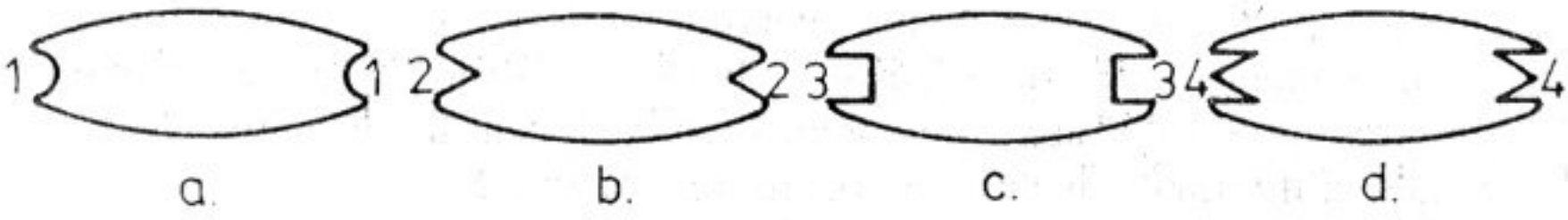


Fig.1.13 **Reprezentarea zonelor specifice de combinare ale anticorpilor**

Molecula de imunoglobină apare constituită din două lanţuri polipeptidice "grele" (H) (M=52.000) şi din două lanţuri "uşoare" (L) (M=23.000); aceste lanţuri polipeptidice sunt legate prin legături disulfurice intercatenare (vezi fig.1.14).

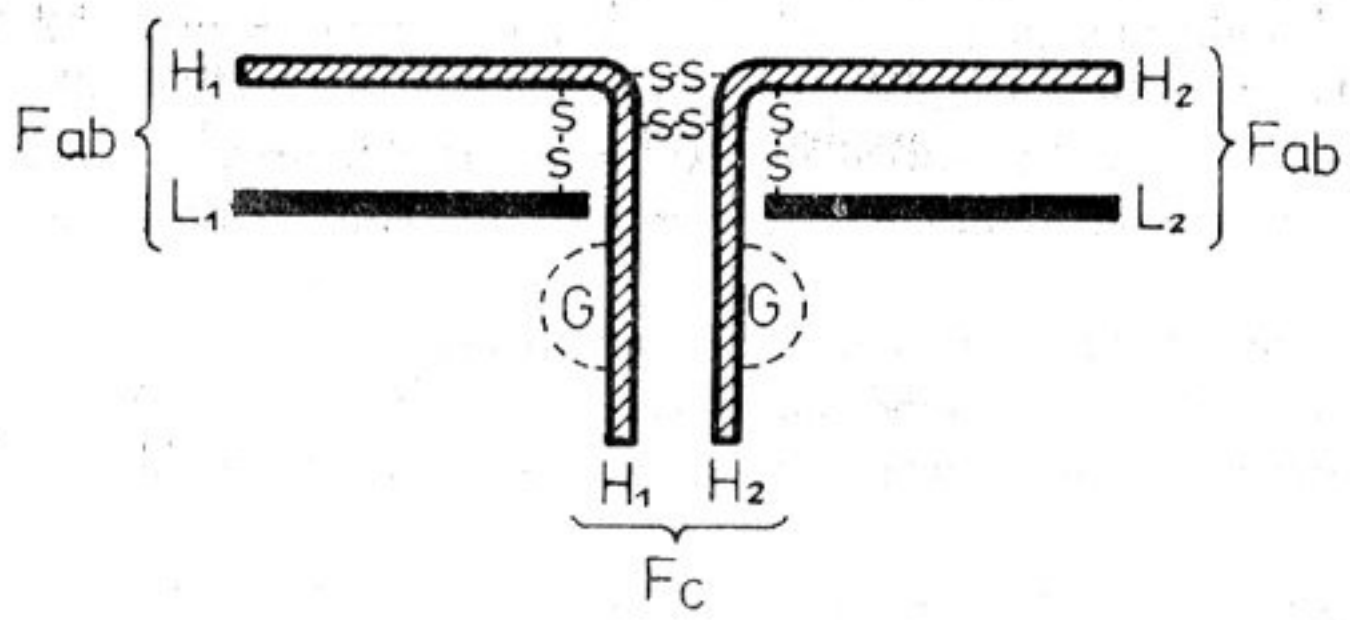


Fig.1.14 **Structura unei molecule de imunoglobulină**

Reacţia **antigen - anticorp** constituie un proces imunologic de apărare a organismului şi se manifestă prin blocarea, respectiv neutralizarea antigenilor pătrunşi în organism a căror acţiune nocivă este astfel anihilată.

Reacţia **antigen - anticorp** (Ag - Ac) are la bază existenţa unei complementarităţi structurale între situsul Ac şi determinanţii antigenici, fiind astfel **stereospecifică**.

O schemă intuitivă a reacţiei antigen - anticorp cu formarea unei reţele este prezentată în fig.1.15.

Reacţia antigen - anticorp este însoţită de formarea de precipitate sau de aglutinare, care determină o stare de rezistenţă specifică a organismului - **starea de imunitate**. Imunitatea creată se datoreşte unei **"memorii imunitare"** a anticorpilor biosintetizaţi de către organism în cadrul răspunsului imun.

◆ Intoleranţa organismului uman faţă de ţesuturile de provenienţă străină, este cea mai importantă barieră în **transplantarea** unor organe importante ca **rinichi, ficat** şi **cord**. Transplantările cu efect durabil au reuşit numai între indivizii prezentând compatibilitate **ereditar-genetică**.

◆ Incompatibilităţile la transfuzii de sânge se datoresc reacţiei imunologice de aglutinare a hematiilor străine, deoarece **izoaglutininele α şi ß** cu rol de anticorpi în reacţie,

se produc în mod spontan şi permanent în sângele uman.

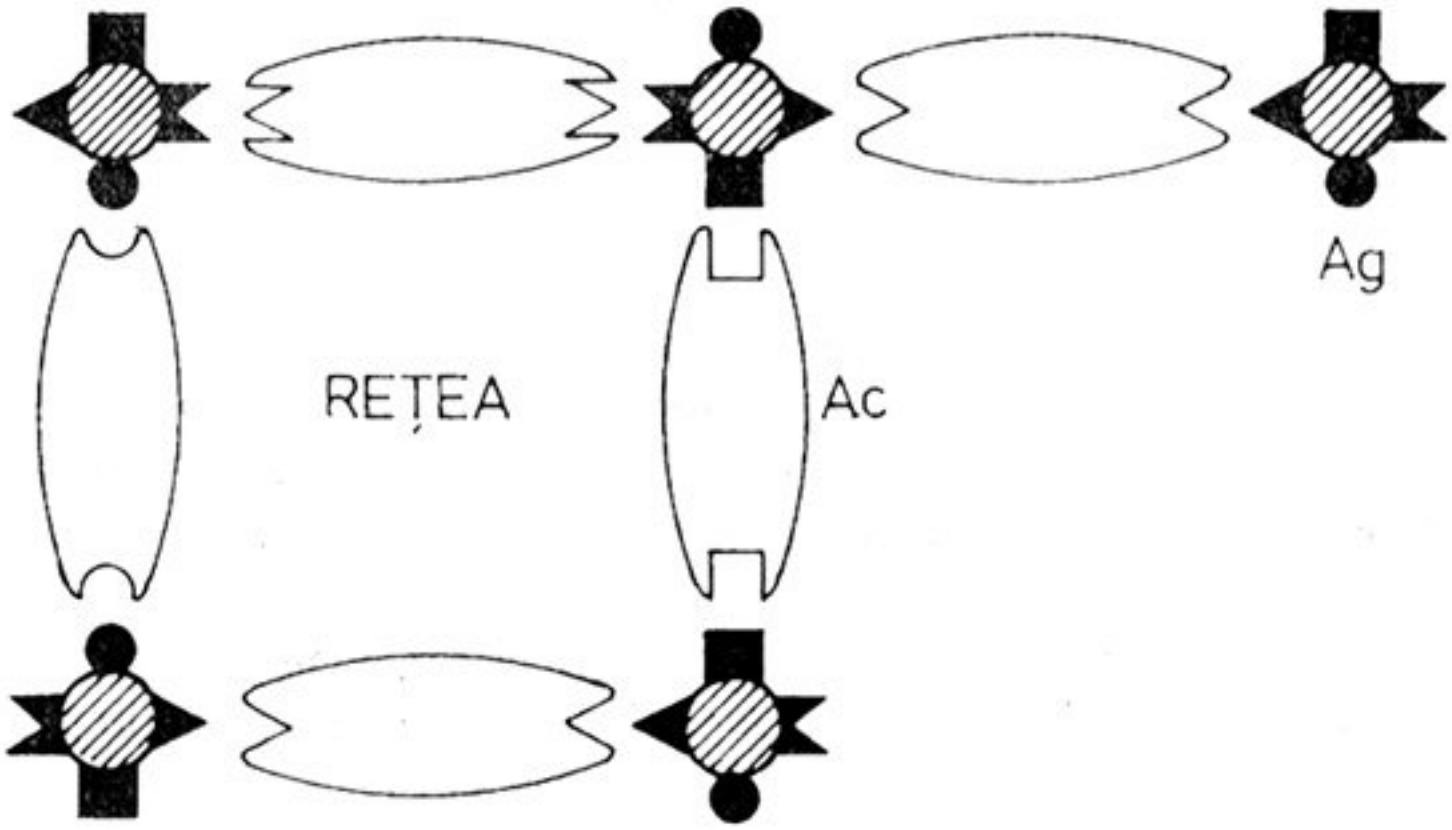


Fig.1.15 **Mecanismul reacţiei antigen-anticorp**

◆ **Imunoelectroforeza** reprezintă încă una din aplicaţiile practice ale imunologiei, de importanţă majoră pentru laboratorul clinic.

Imunoelectroforeza este o metodă foarte sensibilă de identificare a proteinelor şi fracţiunilor proteice bazată pe reacţia antigen-anticorp şi capacitatea proteinelor de a migra în câmpul electric.

Prin imunoelectroforeză se pot astfel izola fracţiuni inseparabile electroforetic şi se pot pune în evidenţă schimbări minime ale structurii spaţiale şi denaturări ale proteinelor, greu sesizabile cu alte mijloace.

(*) Daltonul este unitatea de masă moleculară folosită pentru caracterizarea biopolimerilor; 1 dalton = masa unui atom de hidrogen = $1{,}67*10^{-24}$g.

2 HETEROPROTEIDE

Diversitatea structurală a proteinelor permite legarea unei varietăţi de compuşi chimici, formând ansambluri moleculare eterogene ca structură.

Heteroproteidele reprezintă proteine conjugate care rezultă din asocierea unei componente proteice şi a unei componente neproteice, denumită componentă sau **grupare prostetică**.

Componenta prostetică este de natură chimică foarte diversă şi se leagă de componenta proteică - **apoproteina** - prin legături covalente sau interacţiuni slabe de tip necovalent (ionic sau apolar).

In funcţie de natura componentei prostetice, heteroproteidele se clasifică în: cromoproteide, nucleoproteide, metalproteide, fosfoproteide, glicoproteide, proteoglicani şi lipoproteide.

2.1 Metalproteide

Metalproteidele sunt heteroproteide care conţin ioni metalici sau combinaţii simple ale metalelor asociate direct cu apoproteine conferind acestora proprietăţi funcţionale deosebite. Metalele care au fost puse în evidenţă freevent în structura metalproteidelor sunt: Fe, Cu, Mn, Zn, Co, Mg. Legătura dintre metal şi apoproteină se realizează prin intermediul grupărilor polare libere (R) ale aminoacizilor din molecula proteică.

Se consideră că apoproteina prezintă o anumita regiune din moleculă susceptibilă de a stabili legături cu metalul, în conformitate cu distribuţia spaţială a grupărilor capabile să formeze asemenea legături.

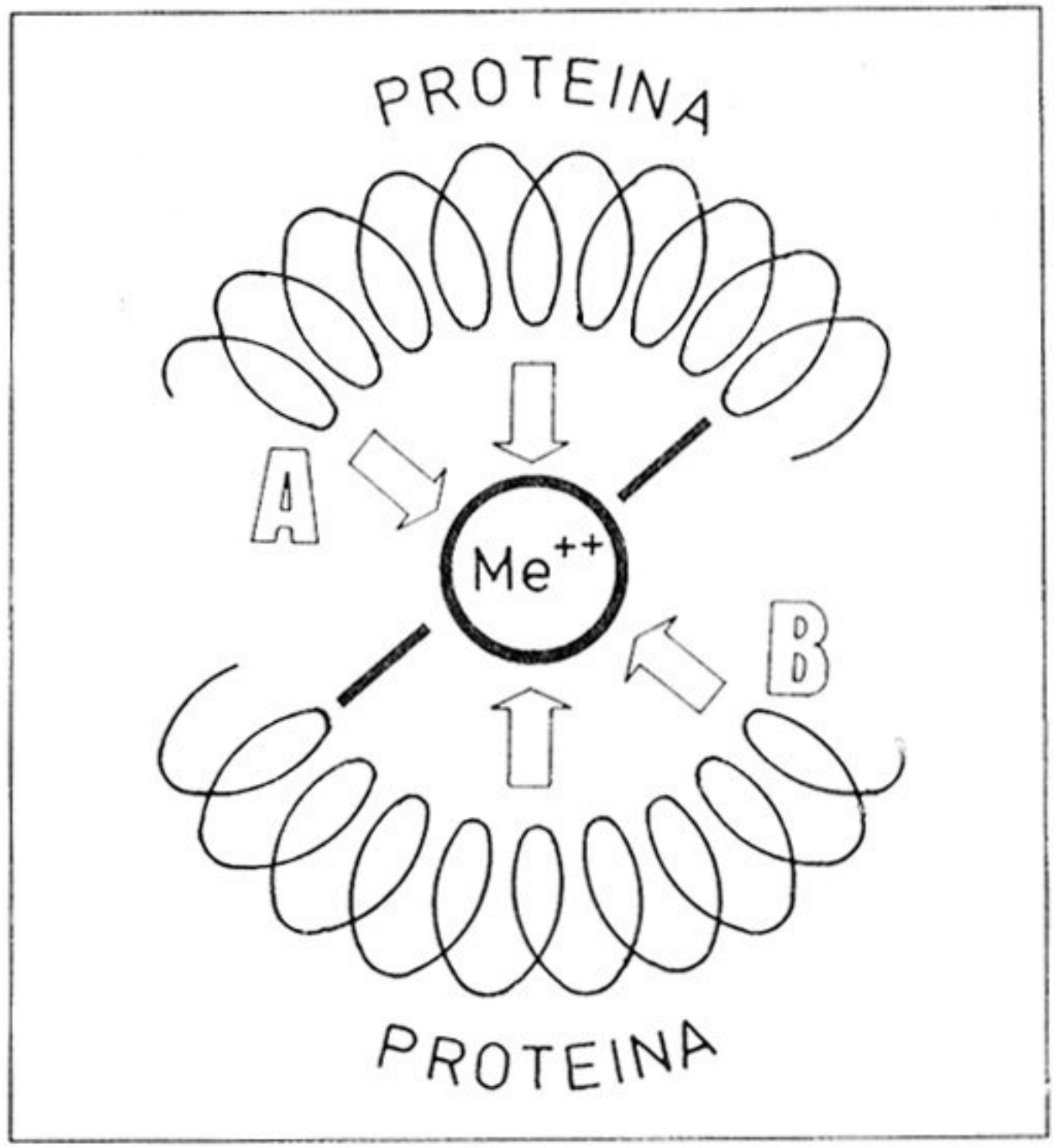


Fig.2.1 **Structura generală a unei metalproteide (A,B - liganzi)**

Metalul (Me^{2+}) se fixează de apoproteină prin anumite grupări chimice denumite

liganzi, grupări care pot dona electroni metalului, stabilindu-se astfel legături **covalente coordinative**, metalul devenind coordinat. Prin intermediul liganzilor,metalul fixat pe apoproteină, formează un complex intern numit **chelat** care se caracterizează prin existenţa unui **ciclu** în care se stabilesc covalenţe coordinative între atomii N sau O ai ligandului şi ionul metalic (Me^{2+}) coordinat (vezi fig.2.1).

Existenţa acestor structuri cu caracter de chelat sunt posibile în **metalenzime**, structuri care explică mecanismul funcţional al acestora în procesele biochimice la care intervin.

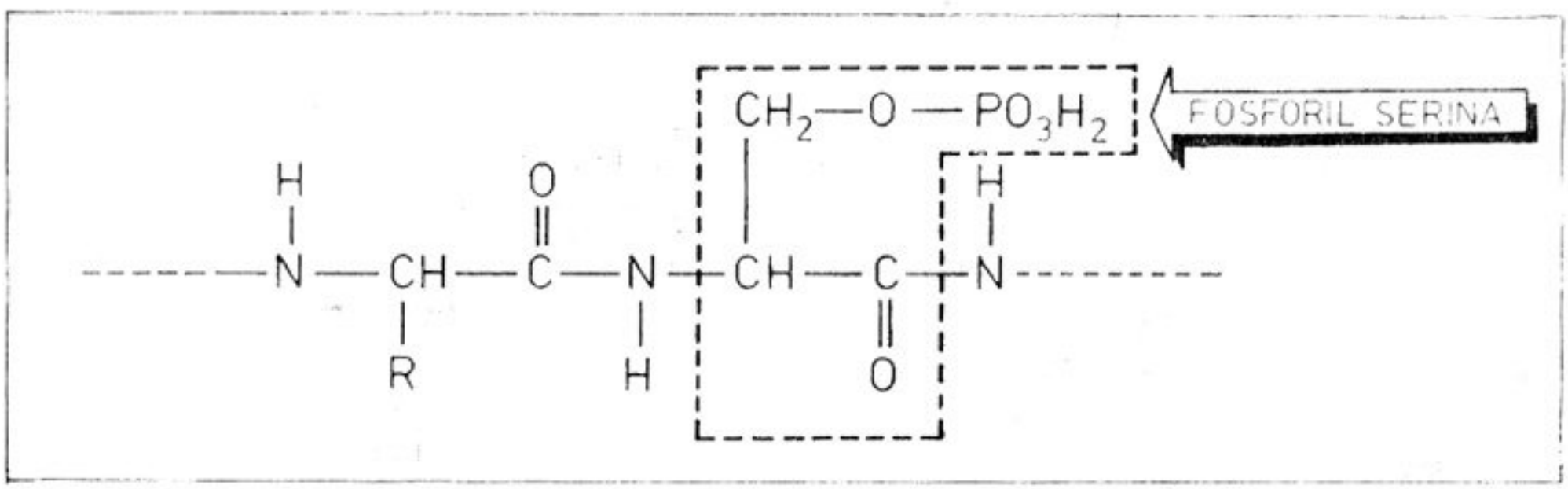
In tabela 2.1 sunt consemnate câteva exemple de metalproteide şi unele caracteristici ale lor (după M. Şerban).

Tabela 2.1 **Metalproteide importante pentru organismul uman**

Metalproteide	Metal	Sediul	Funcţia
Hemoglobină	Fe	Hematii	Transportor de O_2
Mioglobină	Fe	Muşchi	Transportor şi rezervă de O_2 în muşchi
Feritină	Fe	Ficat	Depozit de Fe
Hemosiderină	Fe	Măduvă	Depozit de Fe
Siderofilină	Fe	Splină,plasmă	Transportor de Fe
Transferină	Cu/Zn,Fe	Plasmă	Transportor de Fe
Ovotransferină	Fe	Albuş de ou	Transportor de Fe
Lactotransferină	Fe	Lapte	Transportor de Fe
Xantinoxidază	Fe,Mo	Ficat,lapte	Transportor de e^-
Ceruloplasmină	Cu	Plasmă	Transportor deCu
Carbonic anhidrază	Zn	Hematii	Hidratarea CO_2
Carboxipeptidaze	Zn	Pancreas	Digestia proteinelor

2.2 Fosfoproteide

Fosfoproteidele sunt heteroproteide în care componenta prostetică este constituită din **restul fosforil** ($-PO_3H_2$) legat esteric la grupările hidroxilice ale serinei (cel mai frecvent), treoninei sau tirozinei. In general un fragment din structura fosfoproteidelor poate fi prezentat astfel:



Aşa dar, componenta care introduce eterogenitatea în structura catenei polipeptidice a fosfoproteidelor este acidul ortofosforic sub forma **fosforil serinei**.

Fosforul din fosfoproteide poate fi eliberat sub acţiunea unor enzime specifice - **fosfoproteinfosfatazei**.

Prezenţa acidului fosforic în molecula fosfoproteidelor le conferă acestora un **caracter acid** şi în consecinţă, proprietatea de a forma săruri de calciu sau potasiu fiind predominante în lapte şi ouă. Principalele tipuri de fosfoproteide sunt: cazeinele, ovovitelinele, fosfovitelinele, serinenzime (pepsina,hexokinaza, fosfoglucomutaza).

a) - **Cazeine.** Sunt fosfoproteide cel mai mult studiate, localizate în lapte, unde se găsesc sub formă de **cazeinat de calciu** solubil; cazeinele constituie 80% din totalul proteinelor din lapte (4%).

Cazeinele sunt substanţe eterogene, constituind un ansamblu format din 3 fracţiuni denumite generic (α, ß şi γ cazeine).

Aceste fracţiuni diferă între ele prin mobilitatea electroforetică, prin conţinutul în fosfor şi raportul cantitativ al acestora 75:20:5. Masa moleculară a cazeinei este 75.000 - 100.000 daltoni şi fosforul este prezent în proporţie de 40% sub formă de monoesteri, 40% sub formă de diesteri, iar 20% sub formă de pirofosfat fiind legat de resturile de serină şi treonină.

Prin fierberea laptelui cazeinele nu coagulează şi exercită un rol de protecţie asupra albuminelor şi globulinelor din lapte pe care le menţine necoagulate. Cazeinele sunt însă coagulate şi parţial hidrolizate sub acţiunea unor enzime proteolitice ca chimozina şi pepsina. In procesul de coagulare care necesită şi prezenţa ionilor de Ca^{2+} se formează un produs denumit **paracazeinat de calciu** care rezultă prin scindarea enzimatică a cazeinei, paracazeinatul de calciu este insolubil şi digerat ulterior de diferite enzime proteolitice până la stadiul de aminoacizi.

De mare importanţă biologică este coagularea laptelui în stomac,întrucât permite utilizarea eficientă de către organism a proteinelor conţinute în lapte; în absenţa coagulării, tranzitul laptelui sub formă lichidă ar fi prea rapid, caz în care cazeinele nu ar putea fi utilizate prin degradarea lor până la stadiul de aminoacizi.

Deoarece cazeinele conţin practic toţi aminoacizii esenţiali, se poate acorda laptelui atributul unui aliment cu valoare nutritivă completă.

b) - **Ovoviteline** şi **fosfoviteline** - sunt fosfoproteide existente în gălbenuşul de ou asociate cu lecitinele. Rolul lor fiziologic este de a furniza **fosforul şi aminoacizii** necesari în alimentaţia raţională a sugarilor după primele 6 luni de viaţă.

2.3 Glicoproteide.Proteoglicani

Glicoproteidele şi proteoglicanii sunt heteroproteide în care componenta prosteică este reprezentată de substanţe din clasa glucidelor. Diferenţa esenţială dintre aceste două clase de substanţe constă în aceea că în glicoproteide predomină **componenta proteică**, iar în proteoglicani predominantă este **componenta glucidică**.

Componenta glucidică din glicoproteide prezintă grade variate de complexitate structurală, monoglucide, diglucide, poliglucide eterogene.

Glicoproteidele au o largă răspândire în toată lumea animală şi vegetală, ceea ce evidenţiază importanţa lor pentru organismele vii. Locul secreţiei şi eliminării glicoproteidelor la mamifere este extrem de divers şi multiplu, sub raport structural şi funcţional - plasma sanguină, mucoasa gastrică şi duodenală, bilă, lichid amniotic, secreţii vaginale,

secreţii ale glandelor submaxilare, plasma seminală, glanda mamară, ficat, pancreas, placentă, hipofiză, tiroidă, etc. Funcţiile glicoproteidelor sunt dintre cele mai diverse: protecţia mucoaselor gastrointestinale, ale aparatului respirator şi urogenital faţă de acţiunea enzimelor proteolotice, a unor compuşi chimici sau agenţi mecanici; factori de coagulare ai sângelui; constituienţi structurali ai membranelor celulare; substanţe transportoare şi componente specifice de grup sanguin; participă la asigurarea imunităţii organismului faţă de diverşi agenţi patogeni; hormoni, enzime etc.

Acestor substanţe, le vom acorda un spaţiu amplu în capitolul 5.7 odată cu precizarea noţiunilor generale privind structura glucidelor componente.

2.4 Lipoproteide

Datorită caracterului hidrofob al lipidelor, acestea nu sunt vehiculate ca atare de către sânge, ci sub forma unor complexe solubile cu proteinele serice denumite **lipoproteide**.

Lipoproteidele sunt asociaţii între proteine (apolipoproteine) şi una sau mai multe grupe de lipide amfipatice: acizi graşi, triacilgliceroli, fosfolipide, colesterol liber sau esterificat.

Legăturile dintre componenta proteică şi cea lipidică se realizează prin:

- **interacţiuni de tip hidrofob**, datorită existenţei în structura apoproteinelor a unei proporţii relativ mari de aminoacizi nepolari;
- forţe Van der Waals şi
- legături ionice care se stabilesc între grupările ionizate ale fosfolipidelor (colină, colamină) şi ionii $-COO^-$ şi $-NH_3^+$ din structura proteinelor.

Lipoproteidele plasmatice pot fi separate prin ultracentrifugare şi prin electroforeză. Prin ultracentrifugări în medii cu densităţi potrivite au fost separate din ser patru fracţiuni lipoproteice majore:

- ♦ - chilomicronii;
- ♦ - lipoproteidele cu densitate foarte mică (VLDL de la very low density lipoproteins);
- ♦ - lipoproteidele cu densitate mică (LDL de la low density lipoproteins);
- ♦ - lipoproteidele cu densitate mare (HDL de la high density lipoproteins).

Datorită componentelor proteice, lipoproteidele poartă sarcini electrice şi pot fi separate prin electroforeză pe geluri de agaroză, de poliacrilamidă etc. Cele patru fracţiuni separate prin această tehnică sunt:

- ♦ - chilomicronii la linia de start;
- ♦ - pre ß lipoproteidele;
- ♦ - ß lipoproteidele;
- ♦ - α lipoproteidele.

Intre aceste fracţiuni există următoarea corespondenţă:

- pre ß lipoproteide = VLDL
- ß lipoproteide = LDL
- α lipoproteide = HDL

In organismul animal lipoproteidele prezintă o largă distribuţie, fiind componente structurale ale membranelor celulare, mitocondriale, reticulului endoplasmatic, tecilor de mielină ale neuronilor etc.

Lipoproteidele intervin în permeabilitatea biomembranelor, participă la transportul lipidelor şi a altor substanţe liposolubile (steroli, caroteni, unii hormoni, medicamente etc.).

Caracteristicile generale şi compoziţia fracţiunilor lipoproteidice vor fi prezentate în

capitolul "Metabolismul lipidic" (vol.II).

2.5 Cromoproteide

Cromoproteidele sunt heteroproteide care conţin drept componentă prostetică o substanţă care absoarbe anumite radiaţii din spectrul vizibil al spectrului şi face ca întreaga moleculă să fie colorată.

Tabela 2.2 **Clasificarea cromoproteidelor**

Cromoproteide porfirinice	Cromoproteide neporfirinice
I. - **Cu rol respirator**	I. - **Cu rol respirator**
- hemoglobină	- hemeritrine (nevertebrate)
- mioglobină	- hemocianine (moluşte)
- citocromi b,c,a	II. - **Fără rol respirator**
- citocromoxidază	- purpură retiniană
- catalaze	- feritină
- peroxidaze	- siderofilină
II. - Fără rol respirator	- hemocupreină
- cloroplastine (plante)	- ceruloplasmină
- ficocianine (alge)	- zinc proteine
- ficoeritrine (alge)	- flavoproteine
- transmetilaze (B_{12})	- carotenoide

In funcţie de natura chimică a componentei prostetice, cromoproteidele se clasifica în două grupe mari: cromoproteide porfirinice şi cromoproteide neporfirinice, având sau nu rol respirator (vezi tabela 2.2).

Unele cromoproteide (hemoglobina, mioglobina, citocromii, feritina, siderofilina, ceruloplasmina) sunt şi metalproteide.

2.5.1 Hemoglobinele

Hemoglobinele (deoarece au fost identificate mai multe hemoglobine diferite din punct de vedere cantitativ, structural şi funcţional) sunt cromoproteide porfirinice, componente ale hematiilor din sângele vertebratelor şi deci şi al omului.

Roluri biologice ale hemoglobinelor:

◆ - transportul oxigenului molecular de la plămâni până la cele mai îndepărtate ţesuturi pentru alimentarea arderilor tisulare:

◆ - participarea la transportul CO_2 în sânge;

◆ - participarea la menţinerea echilibrului acido-bazic şi a concentraţiei de H^+ în spaţiul extracelular.

2.5.1.1 Structura hemoglobinei

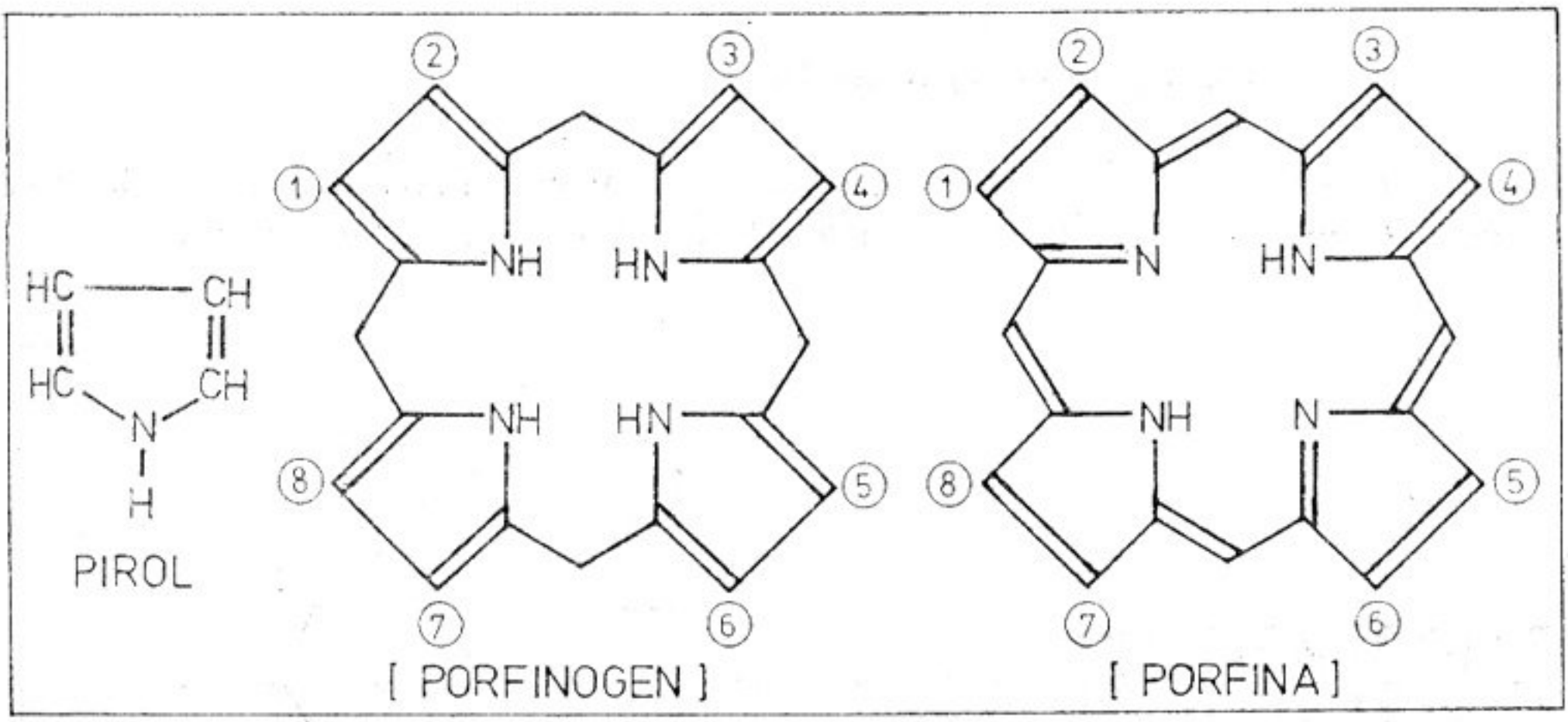
Hemoglobina este formată din următoarele componente:
a) - o grupare proteică cu proprietăţi bazice - **globina**,
b) - o grupare prostetică constituită din protoporfirină - **Hemul**, în centrul căreia se află un atom de fier în stare bivalentă Fe^{2+} (Protoporfirină IX + Fe^{2+} ⟶ Hem).

In structurile de bază ale Hemului şi derivaţiilor acestuia, patru molecule ale unui heterociclu simplu cu azot, pirolul sunt legate între ele prin punţi metilenice sau metinice, astfel încât formează sisteme ciclice complexe.

Punţile metilenice sau metinice fac joncţiunea între atomii de carbon α ai nucleelor pirolice; compuşii ciclici nesubstituiţi sunt porfinogenul, dacă punţile sunt metilenice şi porfina, dacă punţile sunt metinice.

Porfirinogenul şi porfirina nu apar în stare liberă în organismele vii, deoarece în cursul biosintezei se formează direct derivaţii substituiţi ai acestora; substituienţii pot fi: ($-CH_3$), hidroxietil ($-CH_2-CH_2-OH$), vinil ($-CH=CH_2$) sau propionil ($-CH_2-CH_2-COOH$).

In organismul uman au fost identificate următoarele porfirine: etio, mezo, deutero, copro, uro, hemato şi protoporfirina. Aceste porfirine care diferă între ele prin natura radicalilor, constituie nu numai etape intermediare ale biosintezei hemului, dar şi etapele sale de degradare. Derivaţii substituiţi cu diverşi radicali ai porfinei se numesc porfirine, iar cei ai porfinogenului se numesc porfirinogeni.

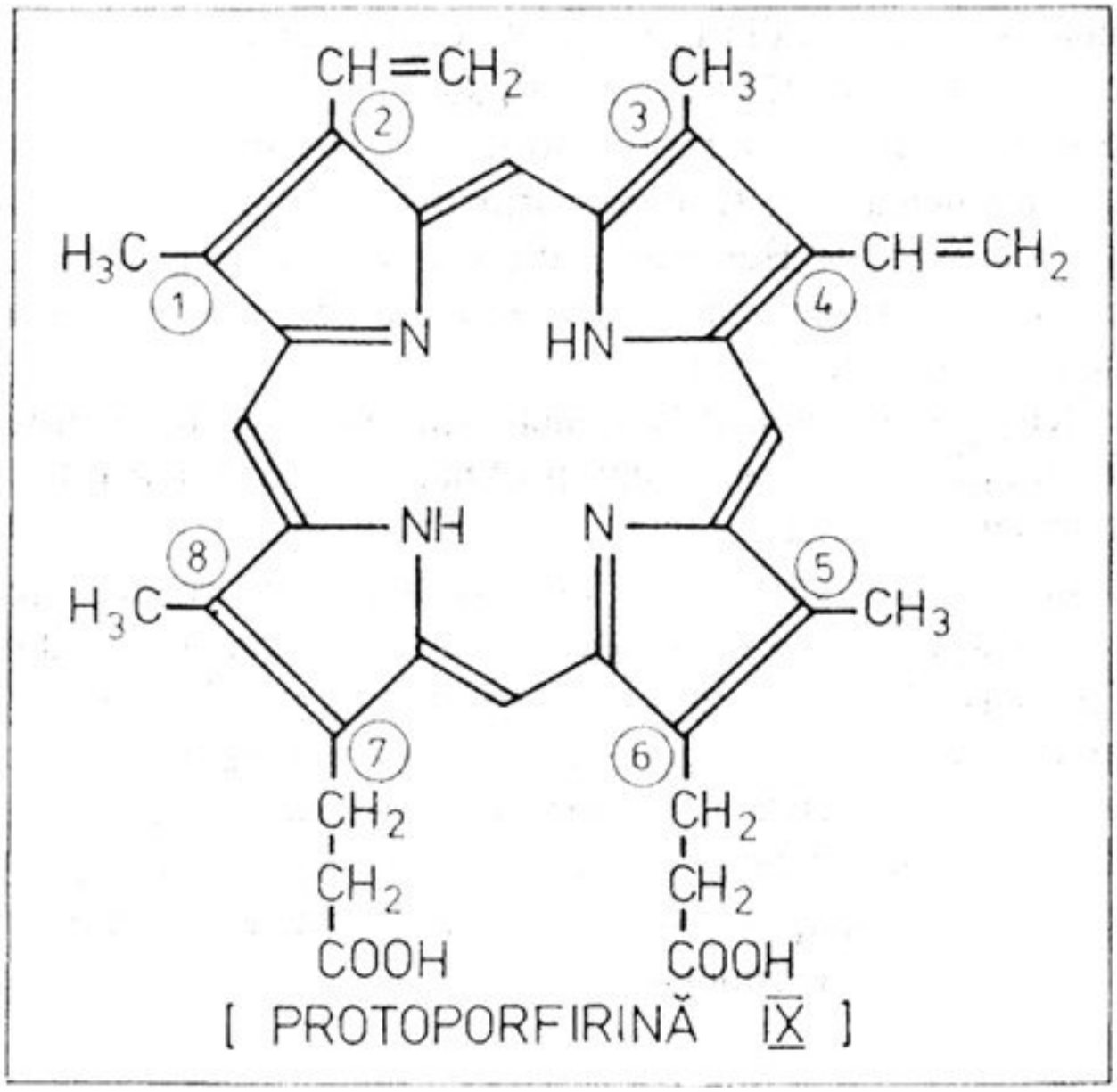


Porfina care intră în structura hemului este protoporfirina care are trei radicali: **metil, vinil, propionil**. Deşi sunt 15 izomeri, cu toţii sintetizaţi în laborator, în organismul uman şi al animalelor superioare nu este întâlnit decât un singur izomer denumit "**protoporfirina IX**" care în poziţiile 1,3,5,8 are radicali metil, în poziţiile 2,4 are radicali vinil, iar în poziţiile 6 şi 7 are radicali propionil (conform numerotării lui H. Fischer).

In protoporfirina IX (şi în general în toate porfirinele) legăturile simple alternează cu cele duble pe întreg sistemul format din nuclee pirolice legate prin punţi metinice.

Conjugarea continuă a legăturilor în nucleul porfirinic determină planaritatea porfirinei şi o mare stabilitate a acestui sistem (**energie minimă**); tot conjugarea explică şi capacitatea

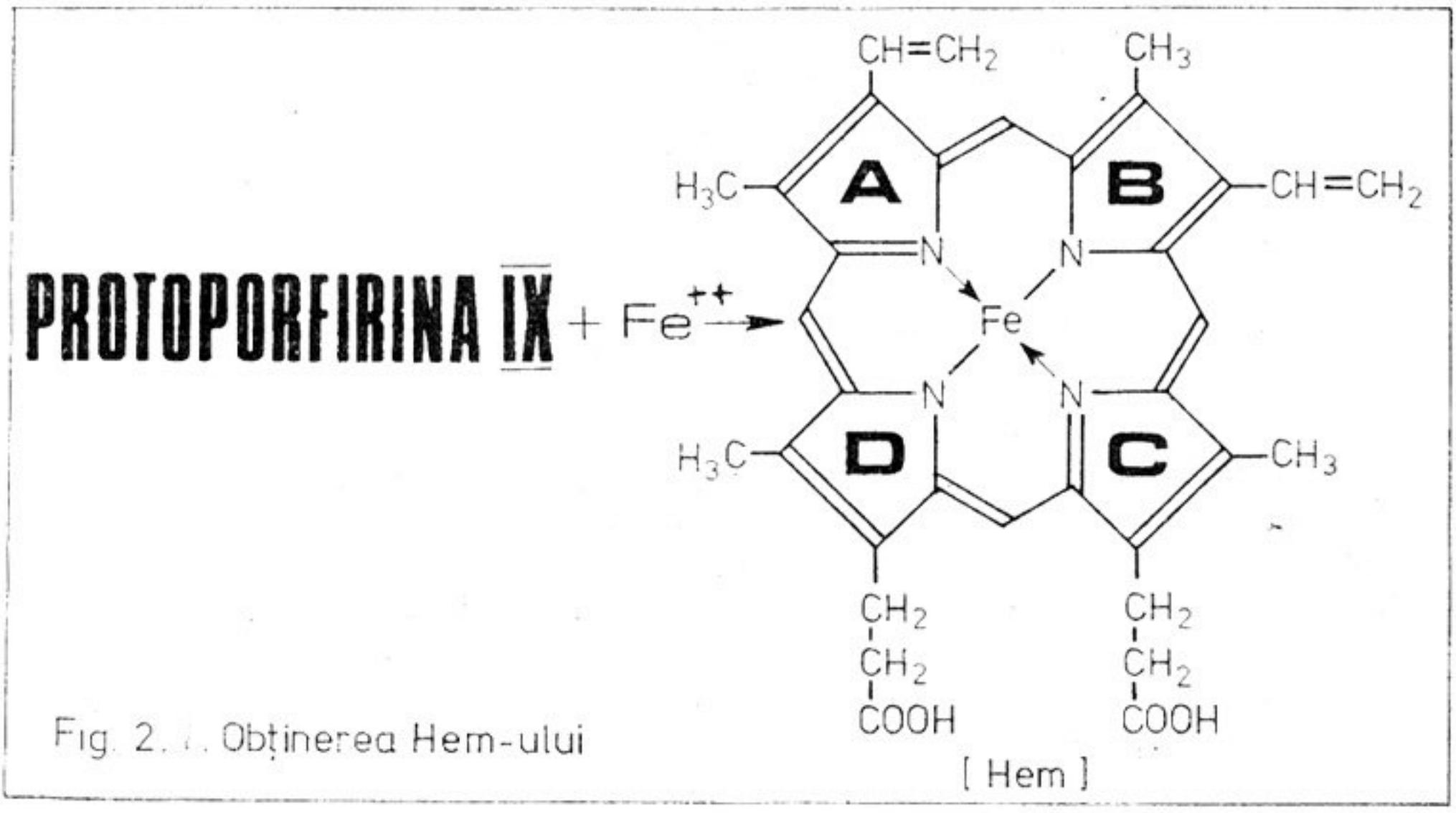
ridicată de absorbţie a unor radiaţii din spectrul vizibil pe care o prezintă porfirinele.



[PROTOPORFIRINĂ IX]

Fig.2.3 **Structura protoporfirinei IX**

Porfirinele absorb în special radiaţiile cu $\lambda = 400$ nm, iar această bandă de absorbţie se numeşte **"banda lui Sorét"**; pe baza intensităţii ei diversele porfirine pot fi dozate.



[Hem]

Fig. 2. . Obţinerea Hem-ului

Prin iradierea porfirinelor cu radiaţii situate în banda lui Sorét se obţine o puternică fluorescenţă roşie, care la rândul ei, poate fi utilizată ca mijloc de dozare.

Lipsa conjugării continue cum este în cazul copro şi uroporfirinelor se traduce prin lipsa culorii.

Hemul rezultă prin unirea ionului feros Fe^{2+} cu protoporfirina IX - un chelat de culoare roşie care este gruparea postetică a tuturor cromoproteinelor porfirinice.

Structura hemului prezintă următoarele caracteristici:

- ♦ - conţine 4 cicluri pirolice legate prin grupări metinice =CH- ;
- ♦ - în poziţiile 1,3,5 şi 8 sunt grefaţi radicalii metil;
- ♦ - conţine 11 duble legături conjugate;
- ♦ - în poziţiile 2 şi 4 sunt grefaţi radicalii vinil;
- ♦ - în poziţiile 6 şi 7 sunt grefaţi radicali ai acidului propionic;
- ♦ - atomul de Fe în stare bivalentă este legat central de atomii de N ai ciclurilor pirolice B şi D prin legături coordinative de ciclurile pirolice A şi C;
- ♦ - cele patru cicluri pirolice, ca şi atomul de Fe, sunt coplanare.

Globina componenta proteică a hemoglobinei este o proteină oligomeră constituită prin asocierea a patru catene polipeptidice asamblate într-o structură cuaternară. Globina este un tetramer format din două perechi de catene identice (2 alfa şi 2 beta).

Structura de ansamblu a globinei se caracterizează printr-o proporţie apreciabilă de α - helix (75 - 80%) care alternează cu porţiuni nespiralate. Structurile primare ale celor două tipuri de lanţuri au fost stabilite de Perutz, Kendrew şi Ingram (catena **α are 141** resturi de aminoacizi, iar catena **ß are 146** resturi de aminoacizi).

Fiecare subunitate a tetramerului are compoziţia $[\alpha_2ß_2]$, iar stabilitatea ansamblului macromolecular este asigurată prin:

a) - **legături electrostatice** în care sunt implicate grupările $-COO^-$ şi $-NH_3^+$ ale acizilor monoaminodicarboxilici; b) - **legături de hidrogen**; c) - **forţe Van der Waals**.

In interiorul fiecăreia dintre aceste catene polipeptidice există o cavitate în care este amplasată molecula Hem-ului.

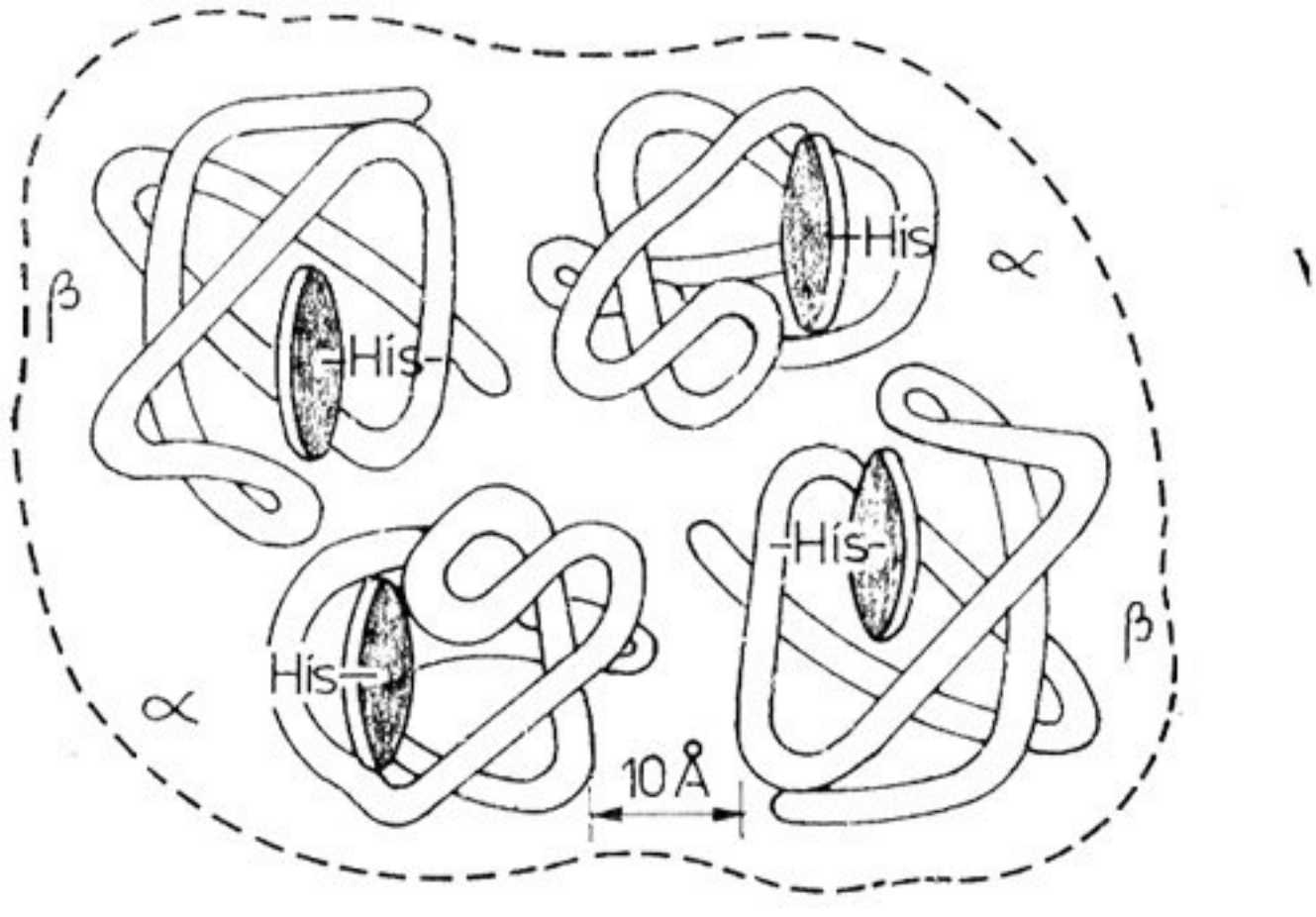


Fig.2.4 **Organizarea cuaternară a structurii globinei**

Prin legarea coordinativă a celor patru lanţuri polipeptidice se creează o conformaţie care:

a) - acceptă cu uşurinţă O_2 la nivelul plămânilor;
b) - este mai solubilă decât monomerii;
c) - datorită solubilităţii ei hemoglobina se poate concentra în eritrocit.

Molecula tetramer de hemoglobină conţine patru molecule de hem, deoarece fiecare din cele patru catene polipeptidice leagă câte o moleculă de Hem (vezi fig.2.4).

Structura hemoglobinei rezultă prin cuplarea globinei cu hemul. De menţionat că globina conţine un număr mare de unităţi de histidină şi anume aproximativ **10%** din totalul aminoacizilor care o compun.

Asamblarea structurală a globinei cu fierul se realizează prin intermediul unor legături de tipuri diferite:

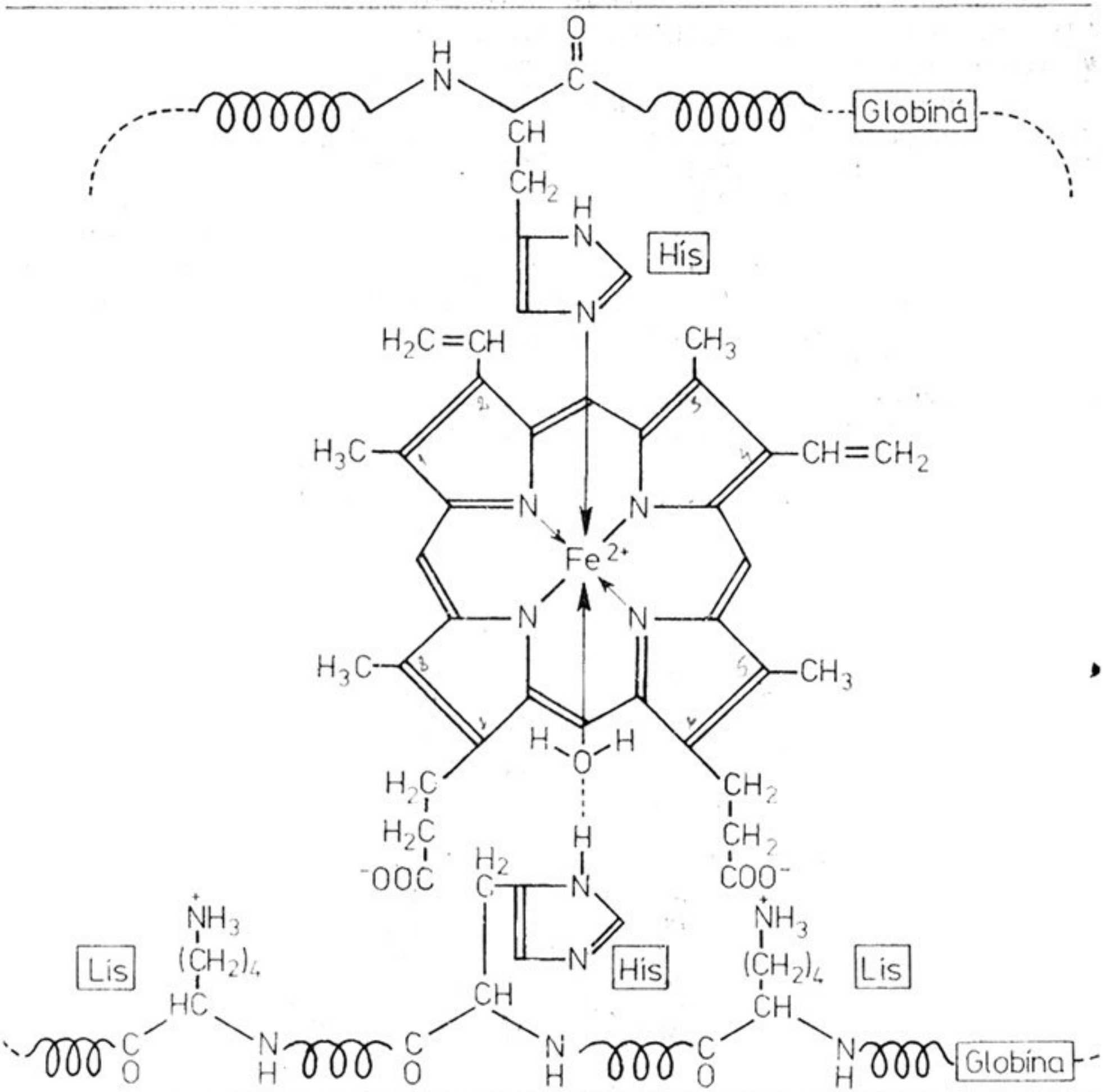


Fig.2.5 **Structura hemoglobinei**

◆ între atomul de fier din Hem şi doi radicali de histidină (cicluri imidazol) aflaţi în poziţii diferite ale catenei polipeptidice (unul din radicalii de histidină - **histidina proximală** - se leagă direct de atomul de fier printr-o covalenţă coordinativă, iar celălalt radical de histidină
◆ **histidina distală** - se va lega direct prin intermediul unei molecule de apă care stabileşte - pe de o parte - o legătură de hidrogen cu radicalul histidinei - iar pe de altă parte - o legătură covalent coordinativă cu atomul de fier al Hemului).

◆ între grupările carboxil ale radicalilor propionil din poziţiile 6 şi 7 ale hemului şi grupările amino ale unor aminoacizi bazici (lizina) din catenele polipeptidice ale globinei, realizându-se astfel două **legături electrovalente**;

◆ între radicalii metil şi vinil ai Hemului şi radicalii unor aminoacizi cu catene apolare (triptofan, alanină, fenil alanină, valină, leucină) prin forţe Van der Waals.

Structura hemoglobinei este prezentată în figura 2.5.

Hemoglobinele sunt substanţe cristalizabile; forma cristalelor este însă caracteristică fiecărei specii, ceea ce permite diferenţierea şi stabilirea provenienţei hemoglobinei. Componenta proteică - globina - conferă specificitatea de specie hemoglobinelor diferind de la o specie la alta. Hemul este componenta invariabilă având aceeaşi structură pentru hemoglobina tuturor speciilor.

2.5.1.2 Hemoglobinele fiziologice

In eritrocitele umane s-au identificat următoarele tipuri de hemoglobină a căror prezenţă este constantă şi anume: Hb A_1, Hb A_2 (adulte), Hb F (fetală) şi Hb E (embrionară).

La modul general - ţinând cont de compoziţia tetramerică a moleculei de hemoglobină formula sa poate fi exprimată astfel: $[X_2\ Y_2]$ în care X_2 desemnează o pereche de lanţuri ß (beta), γ (gama), δ (delta) sau ϵ (epsilon).

Hb A_1 $[\alpha_2\ \beta_2]$	Hb F $[\alpha_2\ \gamma_2]$
Hb A_2 $[\alpha_2\ \delta_2]$	Hb E $[\alpha_2\ \epsilon_2]$

Hemoglobina E se sintetizează în primele luni după concepţie şi dispare după 3-4 luni de viaţă intrauterină.

Hemoglobina F reprezintă tipul de hemoglobină adaptat condiţiilor de oxigenare din uter şi care reprezintă între lunile a 3-a şi a8-a de viaţă intrauterină aproximativ 80% din totalul hemoglobinelor din sângele fătului. După naştere Hb F este înlocuită cu HbA_1 şi Hb A_2 adulte, astfel încât într-un ml de sânge adult se găsesc 0,15 g Hb A_1; 0,04 g Hb A_2 şi numai 0,0007 g Hb E.

Evoluţia tipurilor de hemoglobină din faza **intrauterină** până în cea **extrauterină** este prezentată în fig.2.6.

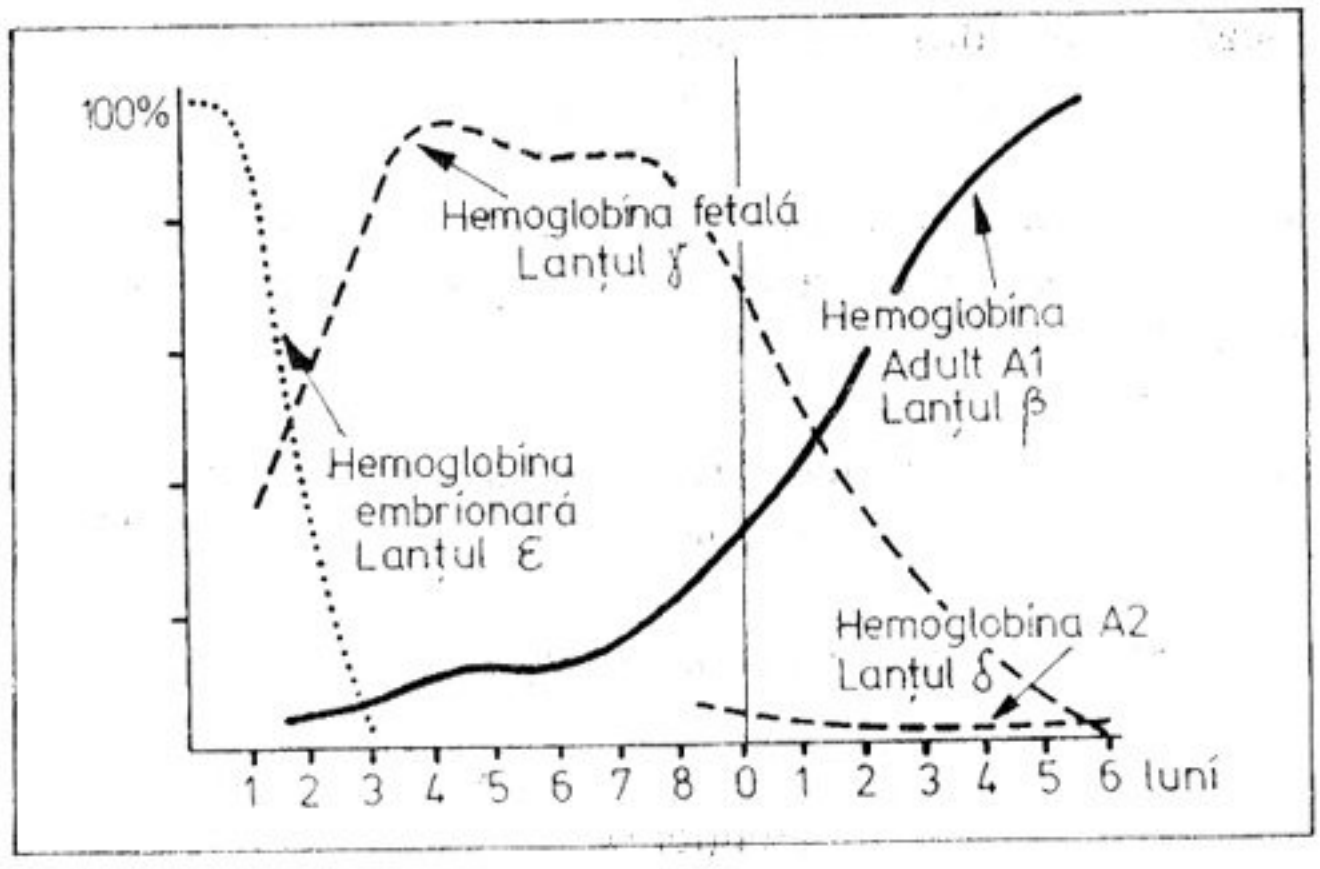


Fig.2.6 **Evoluţia în timp a hemoglobinelor fiziologice**

Fiecare din formele de Hb fiziologice se caracterizează prin:

- ◆ - mobilitate electroforetică;
- ◆ - punct izoelectric:
- ◆ - viteza de denaturare în mediu alcalin sau acid;
- ◆ - au secvenţa lanţurilor α identice;
- ◆ - au secvenţa lanţurilor ß diferite;
- ◆ - fiecare reprezintă adaptări ale organismului faţă de diverse condiţii de viată.
- ◆ - hemoglobina umană cristalizează în **bipiramide ortorombice simetrice**, ceea ce permite diferenţierea sângelui de om de celelalte feluri de sânge, observaţie utilizată în laboratoarele criminalistice.

2.5.1.3 Hemoglobine anormale şi patologice

In literatura de specialitate sunt menţionate peste 150 de tipuri diferite de hemoglobină, denumite după **literele alfabetului latin**, iar ulterior după localitatea unde au fost descoperite, sau **numele propriu** al pacienţilor la care s-a făcut prima oară descrierea anomaliei.

Este ştiut faptul că secvenţa aminoacizilor în lanţurile polipeptidice este codificată în structurile ADN; înlocuirea uneia sau mai multor baze azotate în structura ADN care codifică secvenţa unei proteine, va determina o secvenţă modificată a aminoacizilor.

Tabela 2.3 **Câteva hemoglobine anormale**

	A.CATENA ALFA MODIFICATĂ	NATURA SI POZITIA RESTURILOR DE AMINOACIZI SUBSTITUITI										
		2	16	30	47	57	58	68	87	116	120	127
	TIPUL DE HEMOGLOBINĂ	His	Lys	Glu	Asp	Gly	His	Asn	His	His	Ala	Lis
1	Deer Lodge	Arg										
2	I		Asp									
3	GH			Gln								
4	Hasharon				His							
5	Manitoba				His							
6	Norfolk					Asp						
7	Boston						Tir					
8	G.Philadelphia							Lys				
9	Iwate								Tir			
10	O. Indonezia									Lys		
11	J. Meerut										Glu	
12	St. Claude											Tre
	B.CATENA BETA MODIFICATA	2 His	6 Glu	22 Ala	26 Glu	32 Leu	63 His	67 Val	92 His	98 Val	117 His	121 Glu
1	Sphakia	Arg										
2	C		Lys									
3	S		Val									
4	Flatbush			Glu								
5	E				Lys							
6	Abraham Lincoln					Pro						
7	Saskatoon						Tir					
8	Zürich						Arg					
9	Milwaukee							Glu				
10	Hyde Park								Tir			
11	Koln									Met		
12	Malta										Arg	
13	D-Punjab											Gln

Consecinţa, va fi sinteza unor globine cu o structură primară diferită de cea a globinelor din hemoglobinele normale, puse în evidenţă prin electroforeză şi electrocromatografie (Ingram).

Hemoglobinele anormale pot persista mai multe generaţii, altele se elimină prin faptul că nu permit condiţii de oxigenare optime şi în consecinţă va surveni moartea, eliminându-se aşadar perpetuarea defectului de sinteză, prin transmiterea sa urmaşilor.

Nu toate hemoglobinele anormale sunt şi patologice, deoarece există şi hemoglobine modificate care pot să transporte oxigenul în condiţii optime.

Menţionăm că au fost puse în evidenţă o serie de variante transmise genetic descendenţilor, tipice anumitor populaţii care trăiesc în anumite zone şi pot constitui criterii de puritate rasială; hemoglobinele din Africa de sud, Africa de vest, HbO şi HbD din Asia (vezi tabela 2.3).

Categoria hemoglobinelor patologice nu este dependentă de criterii geografice şi rasiale; ele prezintă modificări ale secvenţelor ambelor lanţuri, sau secvenţa unui singur lanţ.

In cazul hemoglobinei S (HbS) în lanţurile de tip beta locul acidului glutamic din poziţia 6 este luat de valină; prezenţa în sânge a acestui tip de Hb face ca hematiile să se deformeze căpătând aspectul unei seceri (sickle-cell) ceea ce duce la o anemie gravă (anemia falciformă).

Studiul teoretic al diverselor variante de hemoglobină a permis înţelegerea rolului *fiecărui aminoacid din ambele lanţuri (de tip alfa sau beta) precizându-se care dintre ei*

participă la legarea globinei de fier, la legarea celor patru lanţuri polipeptidice, la legarea oxigenului.

Hemoglobinopatiile se împart în două categorii:

a) - **calitative** - în care anomalia genetică determină structura chimică anormală a moleculei de hemoglobină - vezi tabela 2.3.

In aceste cazuri, se înlocuiesc aminoacizi polari cu nepolari sau invers, ceea ce va conduce la modificări ale interacţiunilor dintre Hem şi globină, care au drept consecinţă perturbări în legarea şi transpotul oxigenului la ţesuturi.

b) - **cantitative** - în care anomalia priveşte doar rata de sinteză a unuia sau mai multor lanţuri polipeptidice dintre care unele sunt prezente în structura normală.

Aceste hemoglobinopatii cantitative se numesc **talasemii** caracterizate la nivel molecular prin încetinirea biosintezei unuia din cele două tipuri de lanţuri ale Hb în eritroblaştii măduvei osoase (anomalii prezente în bazinul mediteranean).

2.5.1.4 Combinarea hemoglobinei cu gazele

Funcţia esenţială a hemoglobinei este de a accepta oxigenul, de a-l transporta de la plămâni la ţesuturi şi posibilitatea de eliberare treptată a acestuia uşurată de structura sa tetramerică. Acest transport se realizează pe baza capacităţii hemoglobinei de a forma un compus disociabil - oxihemoglobina - (HbO_2).

$$\underset{\text{ţesuturi}}{Hb} + O_2 \rightleftharpoons \underset{\text{plămâni}}{HbO_2}$$

Sensul acestei reacţii reversibile este dependent de presiunea parţială a oxigenului. Se defineşte ca "**putere oxiforică**" a hemoglobinei volumul de oxigen pe care Hb îl poate lega de 100 ml sânge.

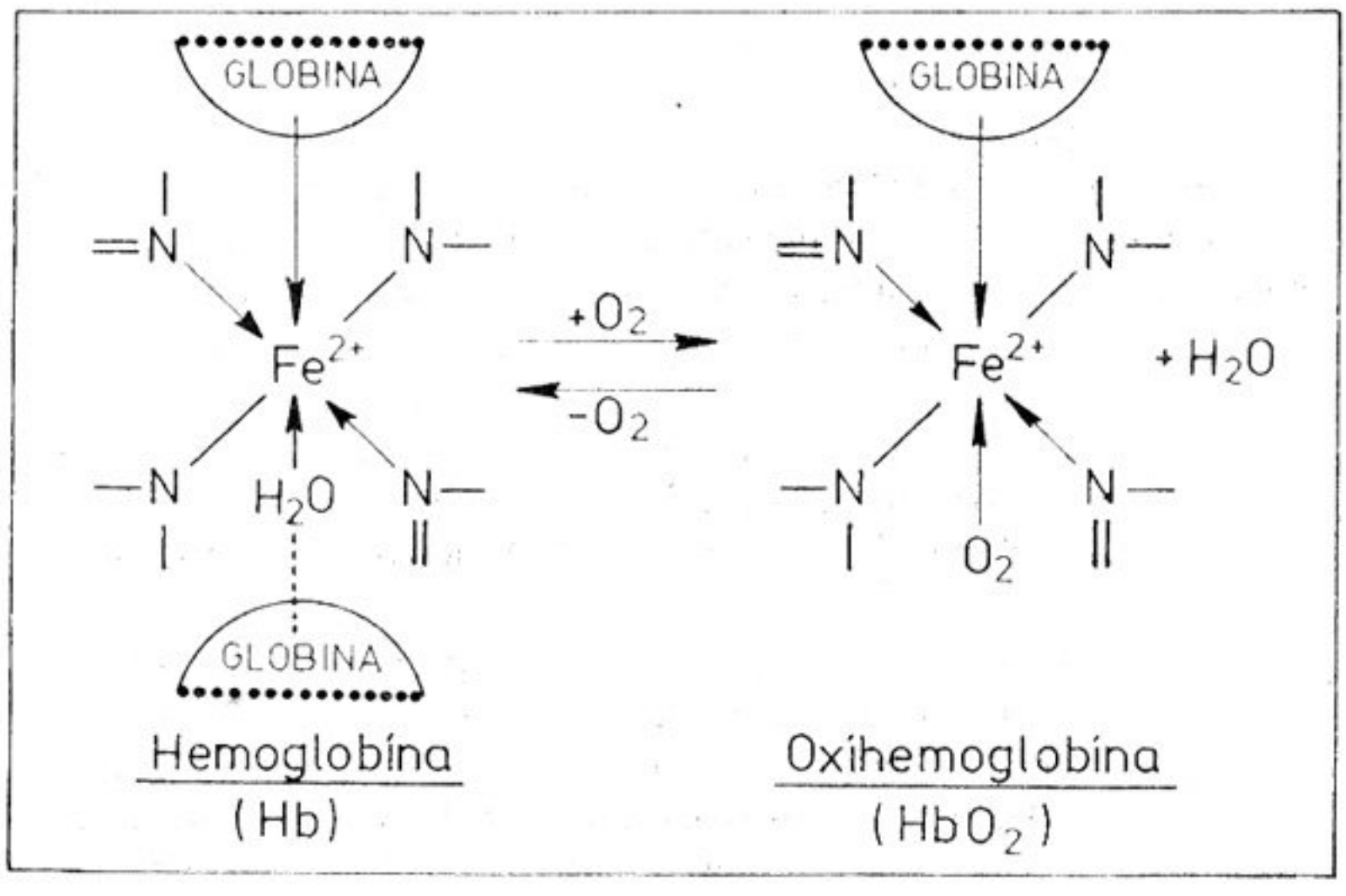


Fig.2.7 **Mecanismul formării oxihemoglobinei**

Legarea oxigenului de hemoglobină se face la nivelul celor patru atomi de fier din Hem, este potenţată de globină şi se realizează fără modificarea stării de valenţă a Fe care rămâne bivalent.

Fixarea reversibilă a O_2 la atomul de fier (Fe) s-ar realiza prin eliberarea uneia din legăturile pe care Hemul le stabileşte cu globina prin intermediul moleculei de apă, respectiv prin eliberarea unui radical de histidină conform mecanismului (figura 2.7).

Capacitatea de legare a oxigenului de către hemoglobină se reprezintă printr-o curbă de saturare cu oxigen.

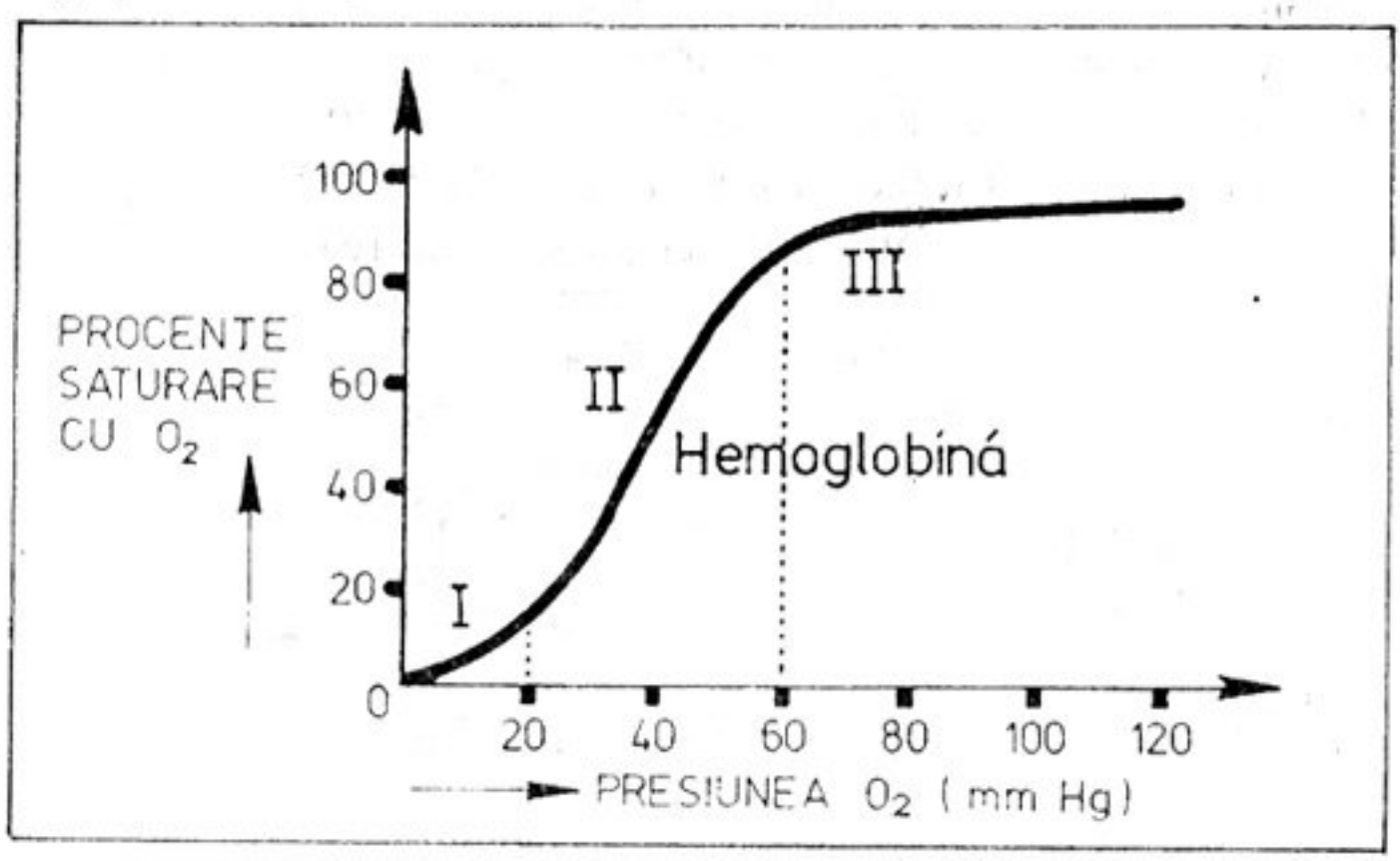


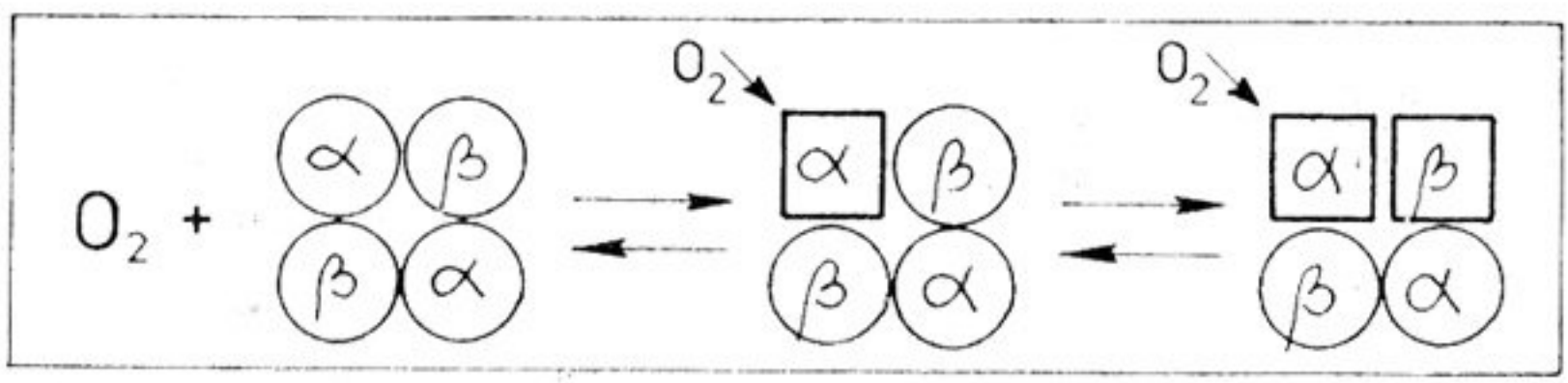
Fig.2.8. **Curba de saturare cu oxigen a hemoglobinei**

Procesul de saturare al Hb cu O_2 are un aspect sigmoid datorită faptului că Hb este o proteină oligomeră formată din patru lanţuri polipeptidice şi patru molecule de Hem, fiecare putând să lege o moleculă de Hem.

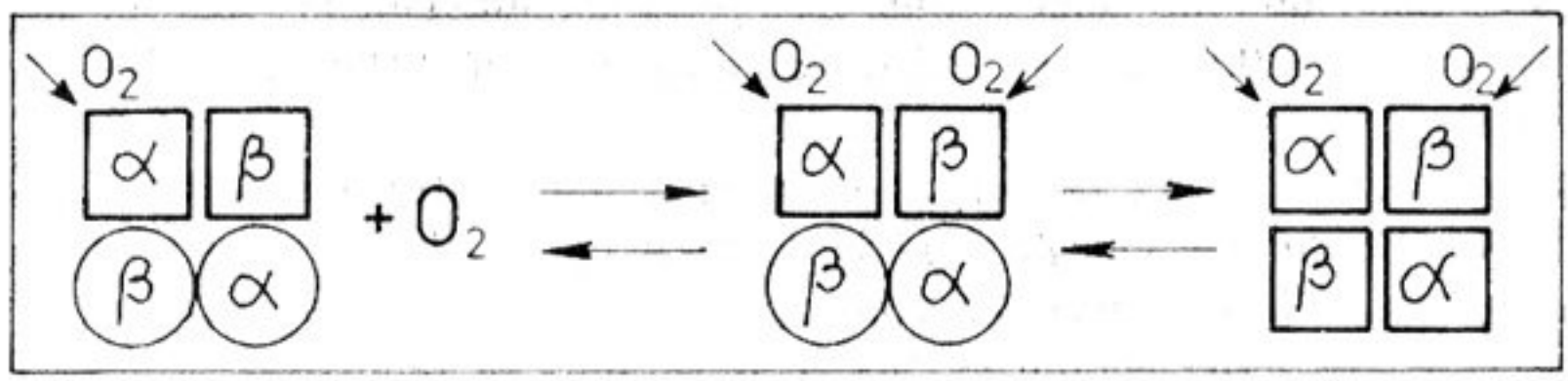
Fenomenul de oxigenare al hemoglobinei se manifestă ca un **"plămân molecular"**, molecula de hemoglobină schimbându-şi configuraţia cu fixarea şi eliberarea oxigenului.

Fixarea O_2 pe un lanţ alfa determină modificări conformaţionale discrete şi printr-o anumită orientare a sarcinilor determină o labilizare a lanţului imediat învecinat care este pregătit pentru a accepta o moleculă de oxigen.

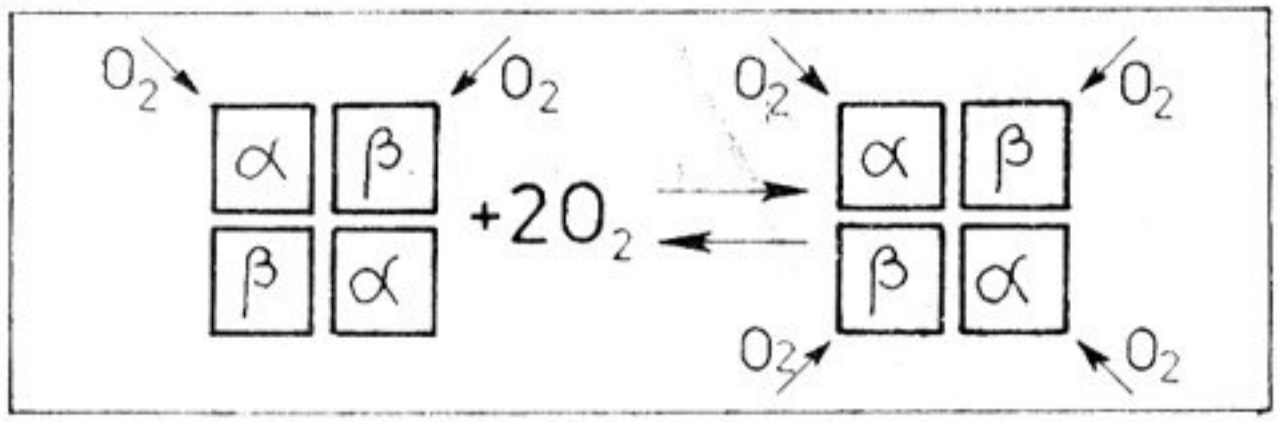
Vom ilustra modificarea conformaţională prin trecerea de la forma indicată prin ○ la forma indicată prin □.



Fixarea O_2de către un lanţ α conduce la o modificare dicretă, conformaţională care la rândul ei determină modificarea celuilalt lanţ - lanţul ß.



Modificarea conformaţiei catenei α creşte afinitatea acesteia pentru O_2, Hemul catenei ß fixând o a doua moleculă de O_2. Oxigenarea completă a subunităţii αß asociată cu modificările conformaţionale respective, va determina o modificare conformaţională şi a celorlalte două lanţuri ale celuilalt dimer, care va deveni apt pentru acceptarea a încă două molecule de oxigen, ceea ce va duce în ultima etapă la saturarea hemoglobinei.



Reacţia globală poate fi privită în cele patru etape succesive având constante de echilibru de oxigenare diferite:

$$Hb \rightleftharpoons HbO_2 \rightleftharpoons HbO_4 \rightleftharpoons HbO_6 \rightleftharpoons HbO_8$$

Din interpretarea acestui proces cooperativ s-a ajuns la concluzia că prima moleculă de oxigen se reţine lent, a doua şi a treia mai uşor, iar a patra de câteva sute de ori mai rapid.

Combinarea gradata şi controlată a hemoglobinei cu O_2, precum şi existenţa unor forme parţial saturate cu oxigen, permite oxigenarea tuturor celulelor indiferent de presiunea de oxigen existentă la nivelul lor. Acest mecanism secvenţial este în concordanţă cu profilul sigmoidal al curbei de saturare a Hb cu O_2.

In afară de O_2, Hb se mai poate uni reversibil şi cu CO cu care se combină de 220 de ori mai uşor decât cu oxigenul, formând **carboxihemoglobina**, mai stabilă decât **oxihemoglobina**. Daca 50% din hemoglobina eritrocitară se află sub formă de carboxihemoglobină apar ameţeli, cefalee, iar dacă procentul de carboxihemoglobină creşte în continuare apar intoxicaţii mortale, deoarece funcţia respiratorie a hemoglobinei este blocată.

Datorită faptului că fixarea CO pe componenta porfirinică a hemoglobinei este reversibilă, oxihemoglobina poate fi refăcută prin ridicarea presiunii oxigenului; aşa se explică aplicaţia terapeutică în intoxicaţii cu oxid de carbon prin **terapie cu oxigen**, la presiune ridicată.

Importantă pentru acţiunea de prevenire primara a unor procese degenerative este şi observaţia că la fumători concentraţia CO în sânge poate determina formarea de până la 10% carboxihemoglobină în sânge.

Ambele combinaţii, oxi şi carboxihemoglobina, se pot transforma prin desfacerea oxigenului, respectiv oxidului de carbon, simultan cu o oxidare a ionului feros la feric, într-un compus denumit **methemoglobină (hemiglobină)** ce nu mai poate exercita funcţia

capitală a hemoglobinei - transportul de oxigen.

In eritrocitul normal hemoglobina atinge concentraţia medie de 1% fiind menţinută la acest nivel în special prin acţiunea NADH methemoglobin reductazei (NADH diaforazei). Deficienţa enzimei produce **methemoglobinemia familială**.

O serie de medicamente aparţinând celor mai diferite clase farmacodinamice, pot produce la persoanele normale o cantitate de methemoglobină care depăşeşte capacitatea reductazelor existente de a menţine Hb în stare redusă:

- ♦ - **antipiretice** şi **analgezice**: paracetamol, fenazol, chinină;
- ♦ - **agenţi antibacterieni**: sulfamide, cloramfenicol;
- ♦ - **agenţi antimalarici**: primachina, pamachina, chinina;

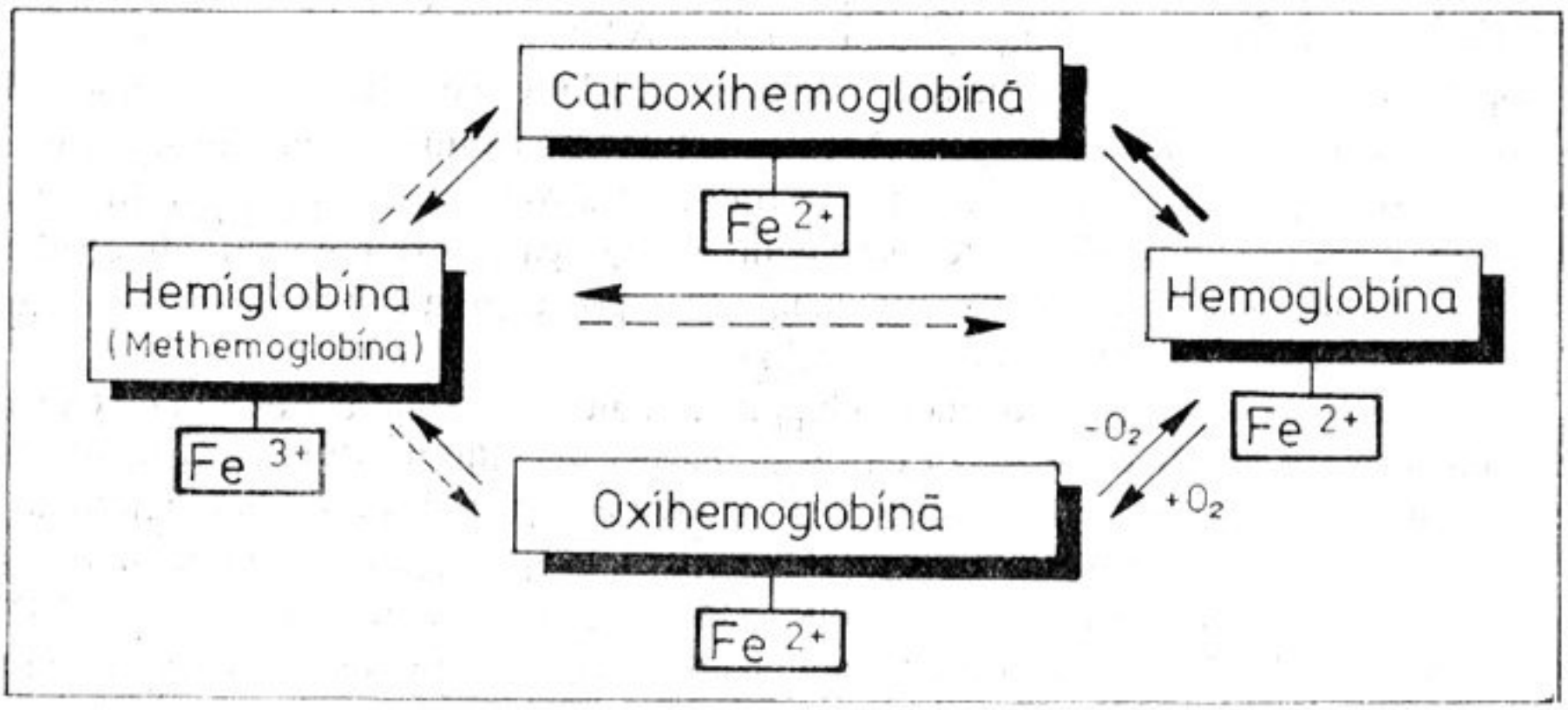


Fig.2.9 **Combinaţiile hemoglobinei cu gazele**

- ♦ - **dermo preparate**: $KMnO_4$, pirogalol, benzocaină.

Combinaţiile dintre hemoglobină şi gaze sunt prezentate în figura 2.9.

Prin fixarea CO_2 la o grupare $-NH_2$ liberă a globinei cu formarea unui compus disociabil de tip carbaminoderivat:

$$R - NH_2 + CO_2 \rightleftharpoons R - NH - COO^- + H^+$$

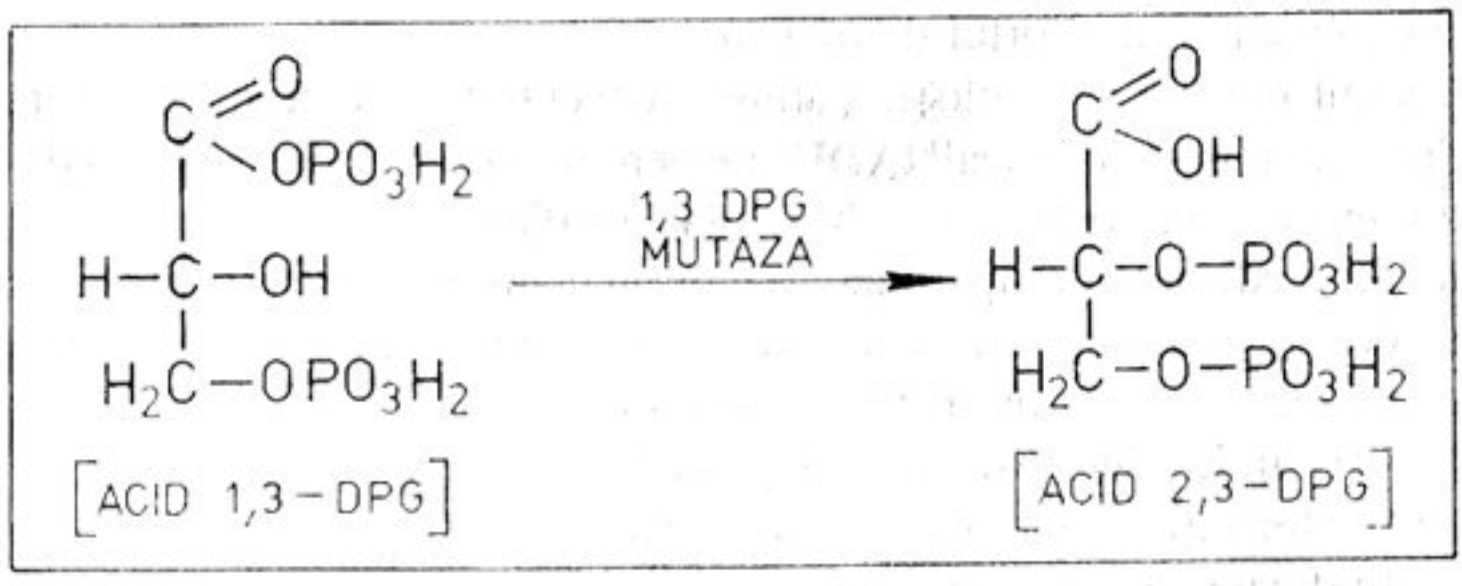
Pe această reacţie reversibilă se bazează proprietatea Hb de a transporta CO_2 de la ţesuturi unde presiunea parţială a acesteia este mare - la plămâni unde CO_2 este expirat.

Eliminarea prin plămâni a CO_2 va determina o creştere a acidităţii ceea ce va face ca afinitatea Hb pentru oxigen să crească. Acest proces este strict dependent de intensitatea proceselor oxidative din organism, deci de consumul de oxigen. Bioxidul de carbon format în timpul catabolismului glucidic reacţionează spontan cu apa formând acidul carbonic (H_2CO_3) proces catalizat de anhidraza carbonică (Zn^{2+} dependentă).

2.5.1.5 Interacţiunea reglatorie dintre acidul 2,3 - DPG şi Hemoglobină

Afinitatea hemoglobinei pentru oxigen este dependentă şi de concentraţia unor compuşi fosforici ca ATP şi în special acidul 2-3-difosfogliceric (2,3 - DPG).

Sinteza de acid 2,3-DPG implică acţiunea enzimei 1,3 bisfosfoglicerat mutaza care transformă ireversibil acidul 1,3-bisfosfogliceric în acid 2,3-DPG.



In eritrocitele umane acest ultim compus are aceeaşi concentraţie moleculară cu Hb reprezentând de cca. 4 ori concentraţia moleculară a ATP.

Prin fixarea în eritrocitele umane a acidului 2,3-DPG pe molecula de hemoglobină scade afinitatea acesteia pentru oxigen. Această acţiune constituie un mecanism prin care eritrocitul îşi reglează activitatea şi funcţia de transport a oxigenului asigurând alimentarea ţesuturilor cu acest gaz în condiţii exterioare defavorabile, ca de exemplu altitudine ridicată, sau scăderea numărului de eritrocite circulante. In hipoxie pH-ul eritrocitar joacă un rol important în reglarea nivelului acidului 2,3-DPG.

Hipoxia (lipsa de oxigen) conduce la hiperventilaţie cu eliminare crescută de CO_2 ceea ce are drept urmare starea de alcaloză cu creşterea pH-ului intraeritrocitar şi concomitent scade concentraţia acidului 2,3-DPG liber prin legarea acestuia cu dezoxihemoglobina.

Alcalinizarea intraeritrocitară duce la o creştere a ratei glicolitice preponderent prin acţiunea fosfofructokinazei (PFK) care conduce la ridicarea concentraţiei de acid 2,3-DPG. Deoarece enzima 2,3-DPG - fosfataza este inhibată prin creşterea pH-ului, această modificare constituie încă un factor de creştere a rezervei de acid 2,3-DPG în hipoxie. Creşterea concentraţiei de 2,3-DPG, ce nu trece prin membrana eritrocitară ca şi scăderea pH-ului intracelular determină schimbări ionice prin echilibrul de membrană Donnan (fig 2.10).

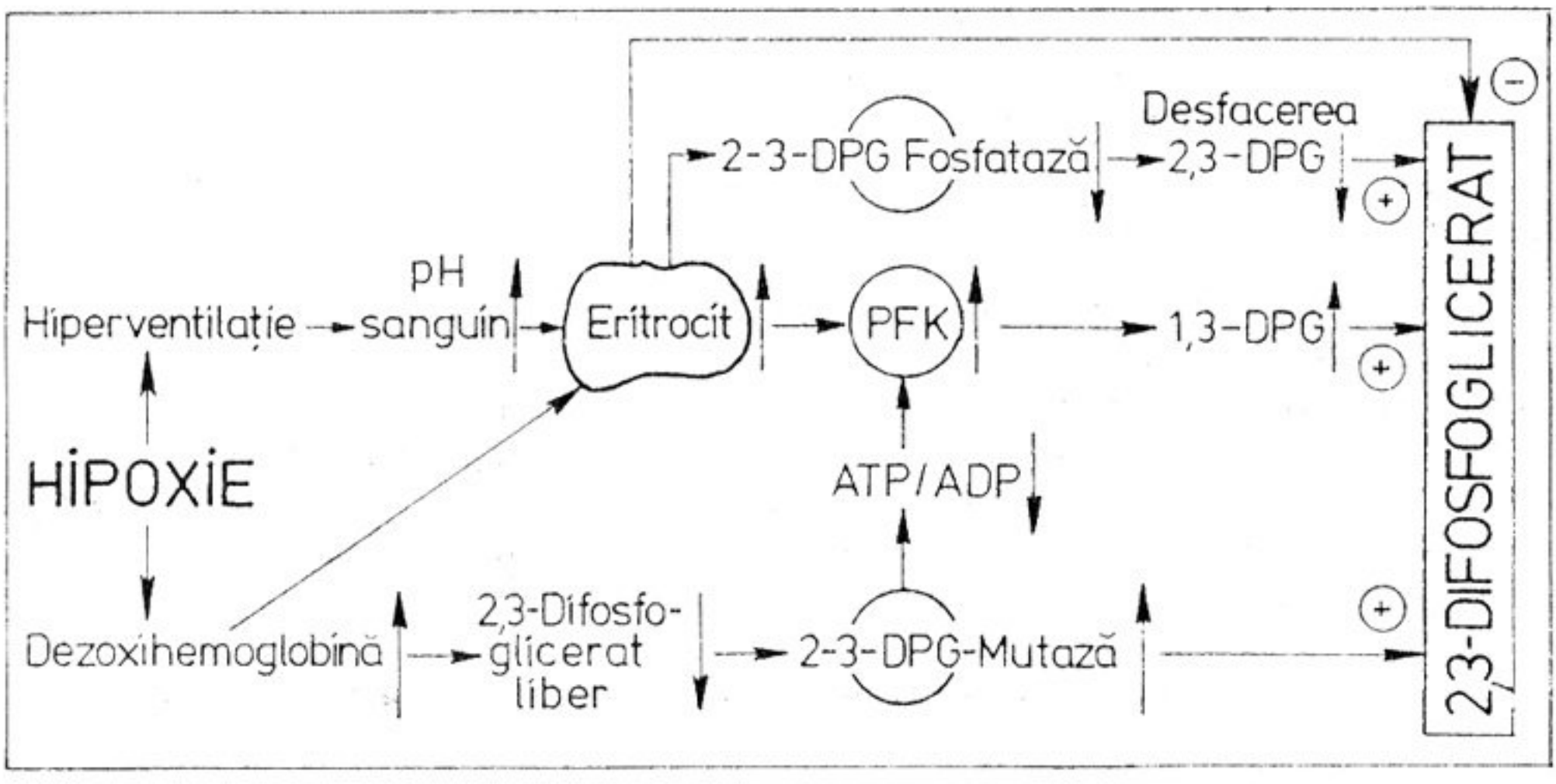


Fig.2.10 **Inducţia prin hipoxie a acidului 2,3-DPG eritrocitar**

Rata de sinteză a 2,3-DPG revine la normal, iar variaţiile de pH eritrocitar influenţează totodată şi afinitatea pentru oxigen a hemoglobinei.

Creşterea pH-ului intraeritrocitar deplasează curba de saturare cu oxigen la stânga în timp ce creşterea concentraţiei de 2,3-DPG determină însă o deplasare a curbei de saturare spre dreapta.

Efectul 2,3-DPG prezintă un mare interes pentru o serie de procese fiziologice, patologice şi în conservarea sângelui, ca de exemplu comparativ cu HbA, hemoglobina fetală HbF leagă mai puţin 2,3-DPG. O problemă interesantă în fiziologia respiraţiei, este mecanismul de adaptare al persoanelor care îşi schimbă locul de la o altitudine la alta. Deplasarea de la nivelul mării la altitudine ridicată este însoţită de o scădere a afinităţii faţă de oxigen concomitent cu creşterea nivelului acidului 2,3-DPG din eritrocite şi invers în cazul coborârii locuitorilor de la munte la nivelul mării.

2.5.1.6 Mioglobina

Mioglobina este cromoproteida care colorează în roşu muşchii striaţi, fiind denumită şi pigmentul respirator al muşchilor.

Ca structură şi funcţie prezintă similitudini cu Hb de care se deosebeşte prin faptul că este formată dintr-o singură catenă polipeptidică şi o singură grupare Hem.

Catena polipeptidică a mioglobinei conţine 153 resturi de aminoacizi şi are o masă moleculară de 17.000.

Studiile cristalografice au permis elaborarea unui model al mioglobinei care relevă faptul că lanţul polipeptidic este pliat într-o formă de ghem compact (Kendrew) care se aseamănă cu a lanţurilor **alfa** sau **beta** ale hemoglobinei (vezi fig 2.11 A). In cadrul moleculei există 8 segmente majore dispuse în alfa helix spre dreapta (75%); liniile duble indică segmentele cu structură alfa helix, iar cifrele arată numărul resturilor de aminoacizi din fiecare segment (vezi fig.2.11 B).

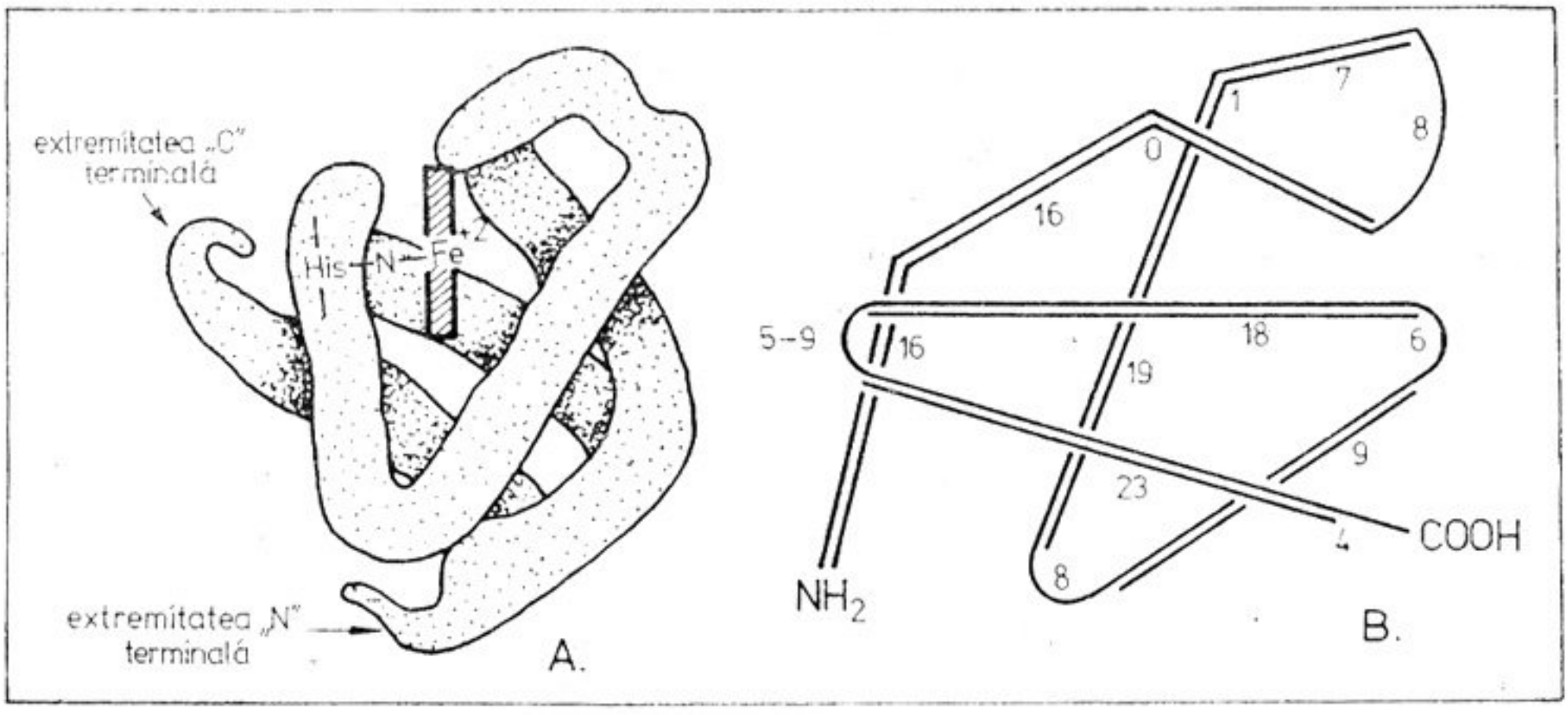


Fig.2.11 **Structura mioglobinei A - Structura tridimensională; B -Structura schematică a mioglobinei**

Deoarece conţine o singură moleculă de Hem, mioglobina are o capacitate limitata de a accepta oxigen, din care cauză principalul rol al mioglobinei este acela de a constitui un depozit de oxigen în muşchi, care se utilizează în cursul unui efort fizic prelungit.
Curba de saturare cu oxigen a mioglobinei are aspectul unei **hiperbole** datorită faptului că mioglobina spre deosebire de Hb are un singur lanţ polipeptidic.

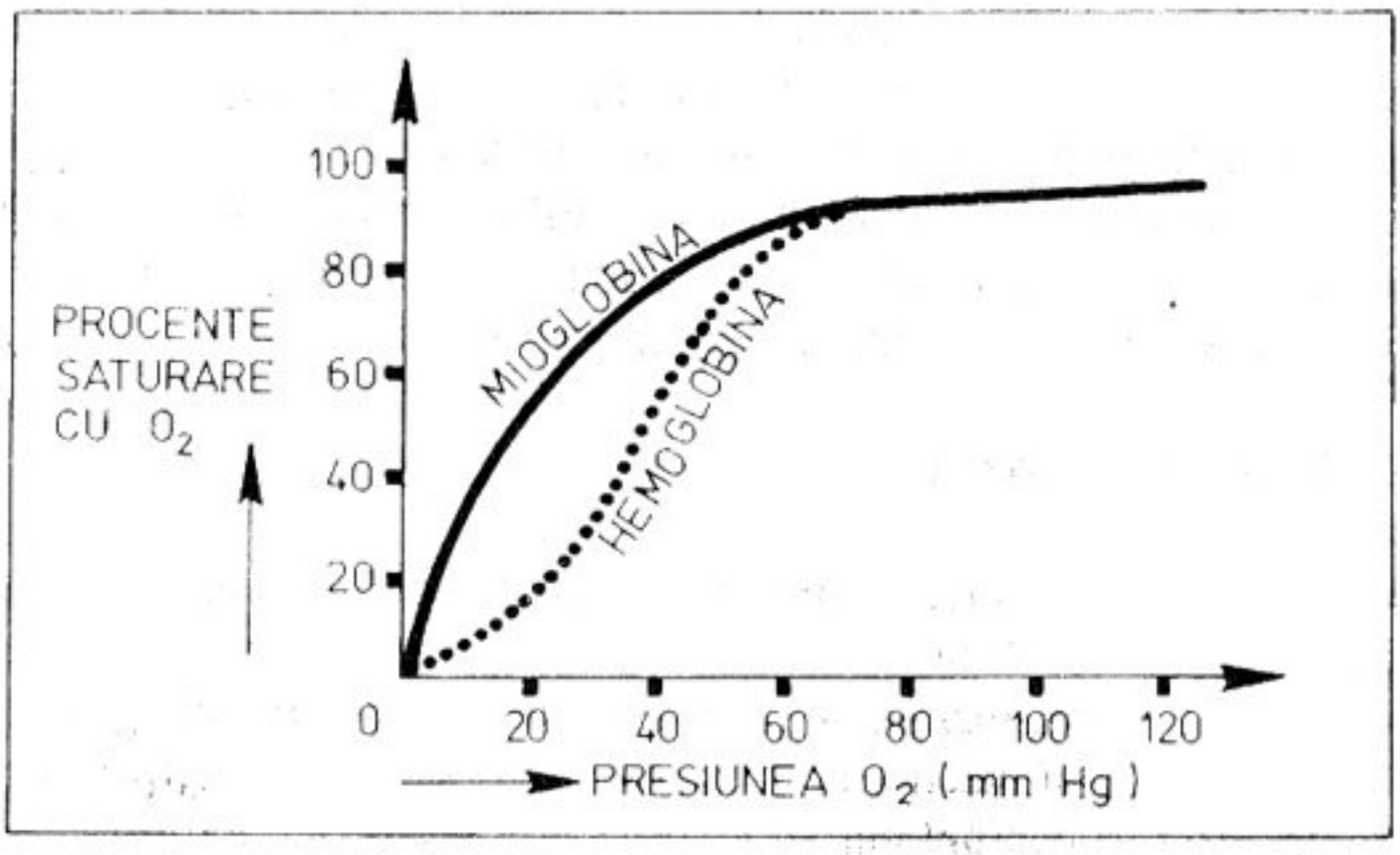


Fig.2.12 **Curba de saturare cu oxigen ale mioglobinei şi hemoglobinei privite comparativ**

2.5.1.7 Citocromii

Citocromii fac parte din categoria cromoproteidelor porfirinice cu rol respirator. Au fost puşi în evidenţă de Mac-Munn (1866) şi caracterizaţi de Lord Keilin (1926) care a corelat funcţia lor cu procesul de **respiraţie celulară**.

Citocromii participă la reacţiile biochimice de oxido-reducere prin transfer de electroni.

Citocromii au proprietatea de a absorbi radiaţiile luminoase de diferite lungimi de undă şi după dispoziţia benzilor de absorbţie între 549-599 nm, au fost clasificaţi în a, b şi c. Se consideră că sunt citocromi acele substanţe care au ca grupare prostetică Hem şi al căror mecanism de acţiune se bazează pe posibilitatea de a-şi schimba reversibil valenţa fierului, din ion feros în ion feric şi invers (în lanţul respirator).

$$Fe^{3+} \underset{-e^-}{\overset{+e^-}{\rightleftharpoons}} Fe^{2+}$$

Toţi au activităţi enzimatice fiind citocromoxidaze, oxigenaze sau hidrolaze, iar funcţia lor este în majoritatea cazurilor, aceea de transportori de electroni sau hidrogen.

Citrocromul C este cel mai cunoscut - are funcţia de a reoxida coenzima Q din lanţul transportorilor de hidrogen şi electroni. Este singurul în care legătura dintre proteină şi Hem se face covalent prin intermediul cisteinei.

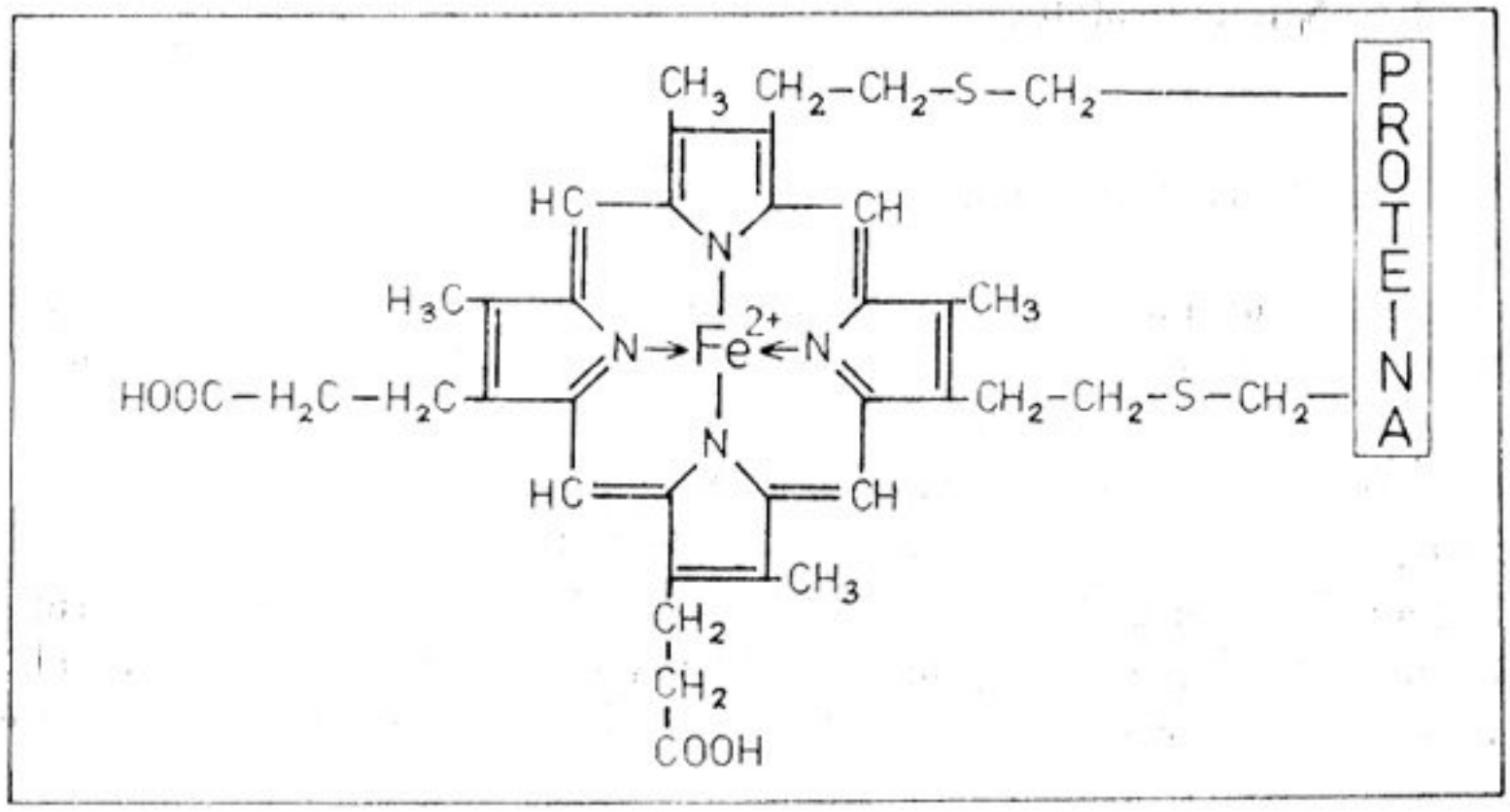


Fig.2.13 **Structura citocromului C**

Inima este organul cu cel mai ridicat conţinut în citocrom C,procentul descrescând în ordinea: rinichi, ficat, muşchi.

Tabela 2.4 **Compuşi heminici**

Nr	Compuşii	M	Localizare	Funcţie biologică
1.	Hemoglobină	68.000	Eritrocite	Transportor de O_2
2.	Mioglobină	17.000	Muşchi	Depozit de O_2
3.	Citrocrom a_3	180.000	Membrană mitocondrială	Reoxidează citocromul C
4.	Citrocrom b	28.000	Mitocondrii	Transport de electroni
5.	Citrocrom c	12.000	Mitocondrii	" " "
6.	Citocrom P_{450}	40.000	Reticul endoplasmatic	" " "
7.	Catalază	240.000	Peroxizomi	Degradare H_2O_2
8.	Peroxidaze	44.000	Peroxizomi	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + 1/2\ O_2$

In tabele 2.4 sunt prezentaţi principalii compuşi heminici, localizarea şi funcţia lor biologică.

Citocromul P-450 îşi datoreşte numele absorbţiei sale caracteristice la lungimea de undă de 450 nm. Este localizat în microzomi şi are o participare directă în procesele de oxidare şi de hidroxilare a sterolilor, acizilor biliari şi medicamentelor cu nucleu aromatic.

Citocromul a_3 - sau **citrocromoxidaza** este componentul final al lanţului respirator, cu cel mai ridicat potenţial redox, ceea ce îi permite să reacţioneze cu O_2 molecular şi să oxideze citocromul C redus.

Citocromoxidaza este singurul citocrom care necesită **cupru** legat covalent de apoproteină şi nu poate fi îndepărtat fără denaturarea reversibilă a proteinei.

2.6 Nucleoproteide

2.6.1 Caracterizare generală

Nucleoproteidele sunt heteroproteide alcătuite dintr-o componentă de natură proteică cu proprietăţi bazice şi o componentă prostetică constituită din acizii nucleici. Dintre tipurile de heteroproteide, nucleoproteidele prezintă cea mai mare masă moleculară datorită caracterului macromolecular al componentei prostetice - acizii nucleici.

Au fost extraşi din puroiul chirurgical de către Miescher (1868), dar sunt întâlnite în absolut toate celulele de origine animală, vegetală, bacteriană, precum şi în viruşi.

După natura chimică a grupării prostetice nucleoproteidele se clasifică în **ribonucleoproteide** dacă gruparea prostetică este ARN şi **deoxiribonucleoproteide** dacă gruparea prostetică este ADN.

Ribonucleoproteidele sunt localizate în citoplasma celulară cu precădere la nivelul ribozomilor şi într-o anumită proporţie, în nucleul celular; **deoxiribonucleoproteidele** sunt localizate în nucleul tuturor celulelor şi reprezintă componente structurale ale cromozomilor.

Acizii nucleici sunt biomacromolecule de importanţă biologică fundamentală, care deţin un loc aparte în organizarea, funcţionarea materiei vii şi prezintă următoarele caracteristici generale:

- ♦ - Acizii nucleici şi proteinele constituie pivotul întregii biologii, care polarizează şi determină ansamblul activităţilor biochimice şi funcţionale caracteristice manifestărilor vitale;
- ♦ - Acizii nucleici deţin o dublă funcţie biologică esenţială deoarece constituie:
  - a) suportul molecular pentru păstrarea şi transmiterea informaţiei genetice;
  - b) mecanismul prin care controlează şi direcţionează biosinteza proteinelor;
- ♦ - Acizii nucleici reprezintă baza moleculară pentru:
  - a) diferenţierea şi reglarea celulară;
  - b) constanţa replicării celulare;
  - c) modificările naturale sau induse în constituţia genetică a unui organism;
  - d) reglarea schimburilor metabolice ale unei celule datorate unei necesităţi fiziologice sau unei variaţii a mediului ambiant;
  - e) menţinerea şi perpetuarea unui organism viabil;
- ♦ - Acizii nucleici sunt biomacromolecule ubicuitare ale materiei vii;
- ♦ - In acidul deoxiribonucleic (ADN) se află înscris programul genetic al dezvoltării oricărui organism şi constituie baza biochimică moleculară a evoluţiei, deoarece mutaţiile reprezintă alterări precis localizate în structura ADN;
- ♦ - Acizii nucleici sunt biomacromolecule care posedă mase moleculare ce acoperă un spectru larg cuprins între 10^4 şi 10^{12} daltoni;
- ♦ - Fluxul de informaţie în lumea vie, esta exprimat prin "**dogma centrală a geneticii moleculare**" care redă relaţia celor trei procese fundamentale (**replicare, transcripţie, translaţie**) prin care se asigură continuitatea genetică a organismelor.

In studiul acizilor nucleici şi-au înscris numele o serie de cercetători cum ar fi: Casperson, Brachet, Davidson, Chargraff, Crick, Watson, Holley, Sutherland, George Palade (laureat al premiului Nobel - 1975).

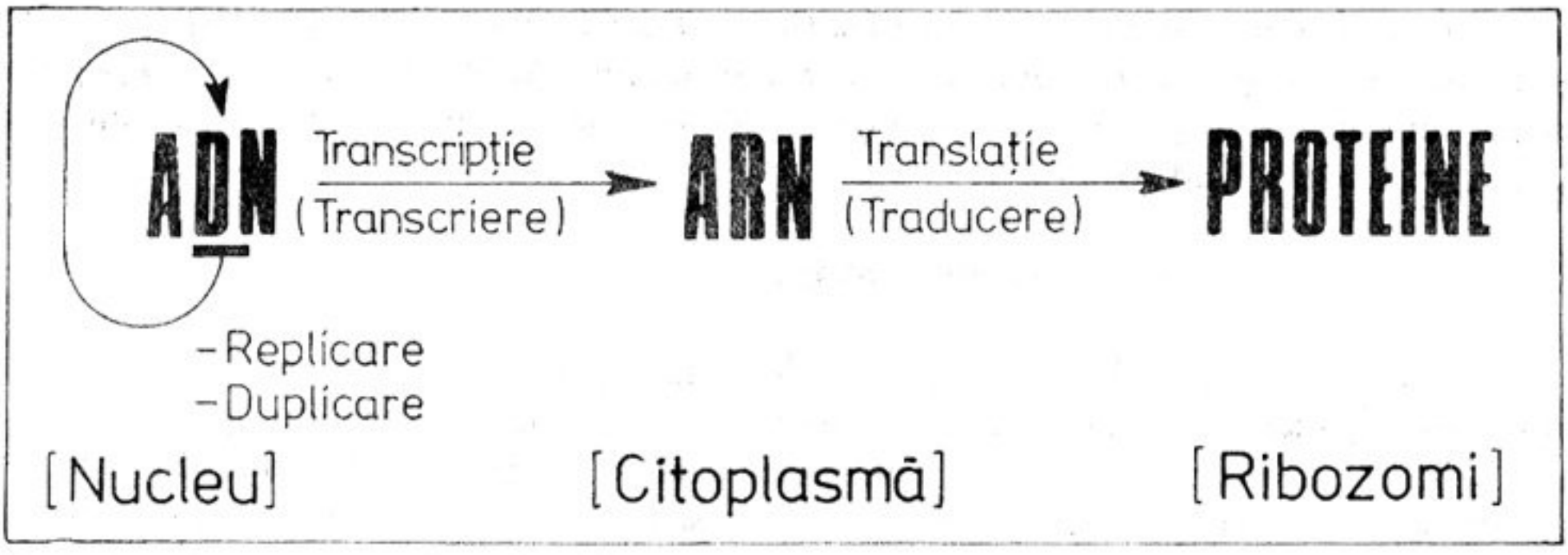


Fig.2.14 **Dogma centrală a geneticii moleculare**

2.6.2 Componenţii structurali ai acizilor nucleici

Prin hidroliză acidă sau enzimatică au fost izolaţi şi identificaţi componenţii nucleoproteidelor.

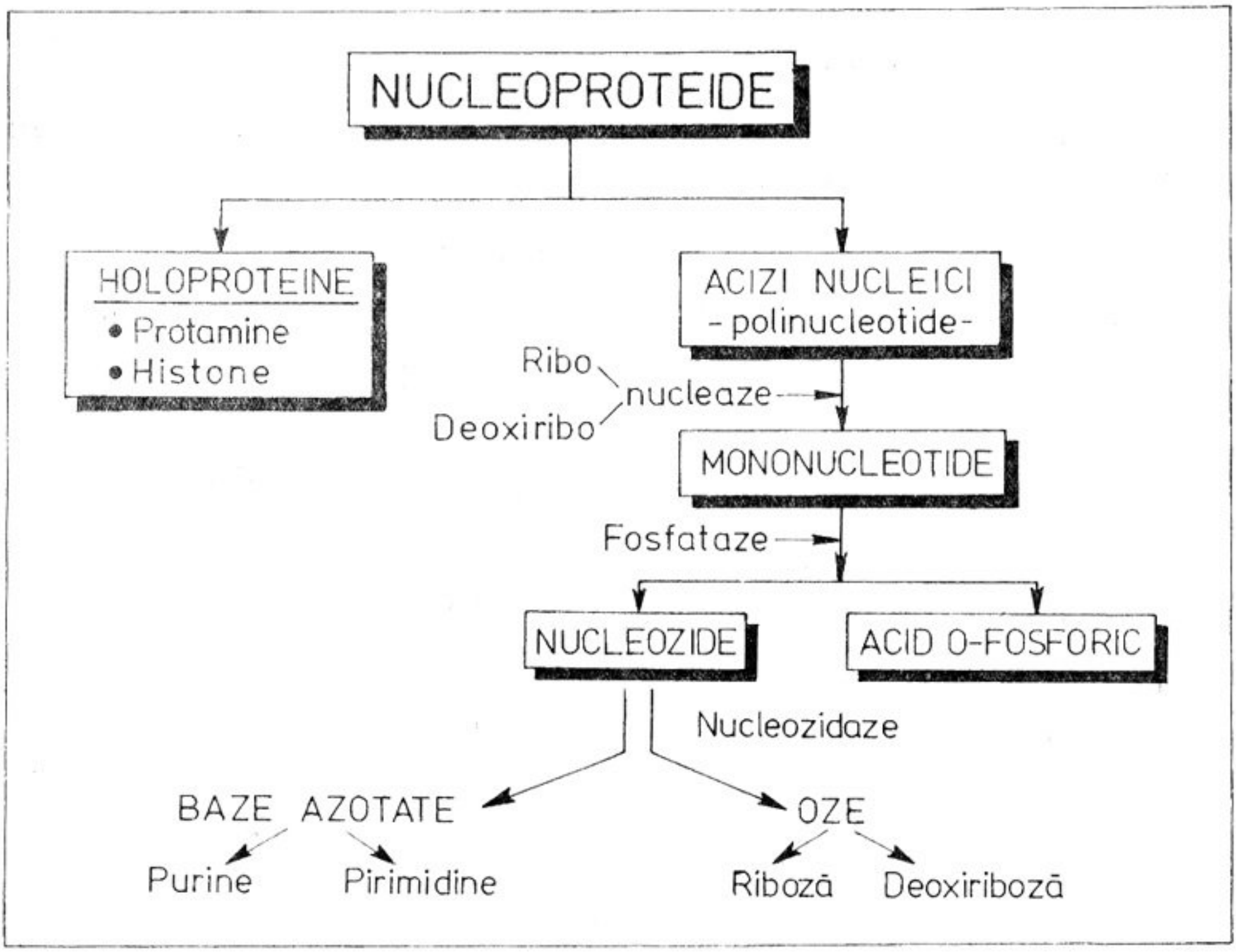


Fig.2.15 **Degradarea nucleoproteidelor pe cale chimică**

Din schema de degradare se constată că cele două componente de bază ale nucleoproteidelor sunt **acizii nucleici** şi o **holoproteină**. Acizii nucleici sunt biopolimeri formaţi din unirea unui mare număr de nucleotide care la rândul lor sunt formate din baze azotate pentoze şi acid fosforic.

2.6.2.1 Componenta proteică

Componenta proteică a nucleoproteidelor face parte din grupa proteinelor bazice: **protamine** şi **histone**. Caracterul bazic pronunţat este datorat conţinutului lor în arginină, lizină, histidină. Protaminele au o masă moleculară de 5000 şi un pH situat în domeniul puternic alcalin. Catena polipeptidică a proteinelor se formează prin repetarea unui tetrapeptid al argininei între care se includ resturi de aminoacizi neutri. Acest lanţ polipeptidic înfăşoară în aşa fel elicea ADN încât arginina formează legături de tip salin cu grupările fosfat ale ADN. **Histonele** s-au identificat în nucleoproteinele din nucleii celulelor. Se cunosc două tipuri de histone:

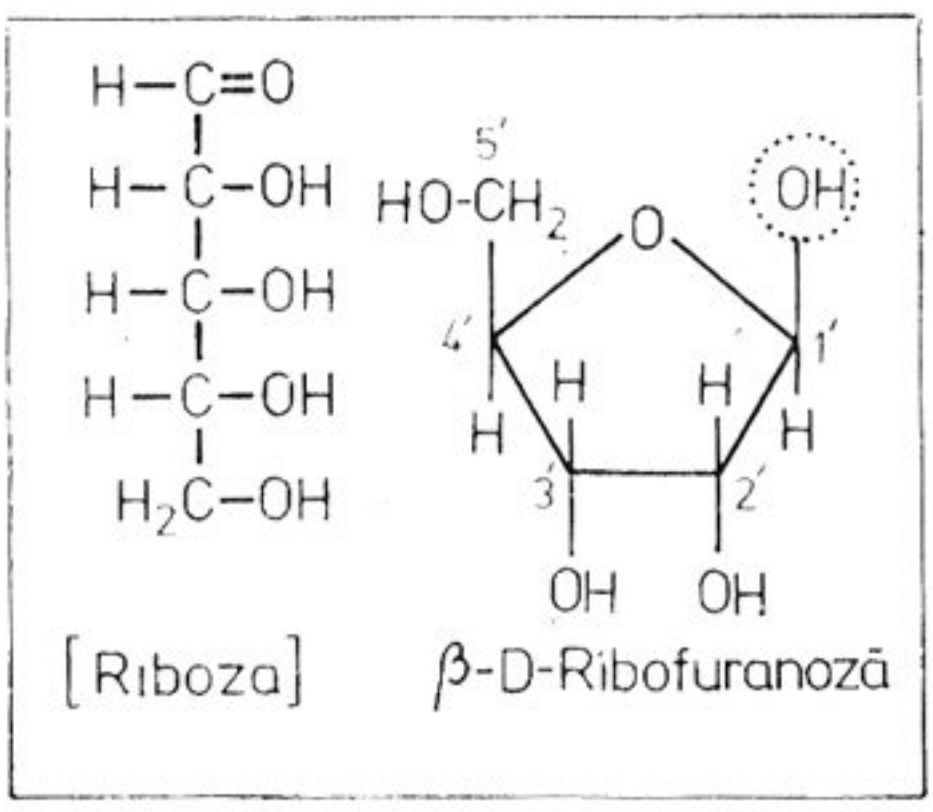
a) unele cu masă moleculară 10000 bogate în lizină şi arginină fiind lipsite de metionină şi histidină;

b) altele cu masă moleculară 20000 bogate în lizină şi arginină, dar conţin metionină şi histidină.

Legătura care se stabileşte cu acizii nucleici este o legătură de tip salin ca şi la proteine.

2.6.2.2 Pentoze

Pentozele care intră în structura acizilor nucleici sunt reprezentate de riboza în ARN şi 2-deoxiriboză în ADN care se găsesc în forma ciclică ß furanozică.

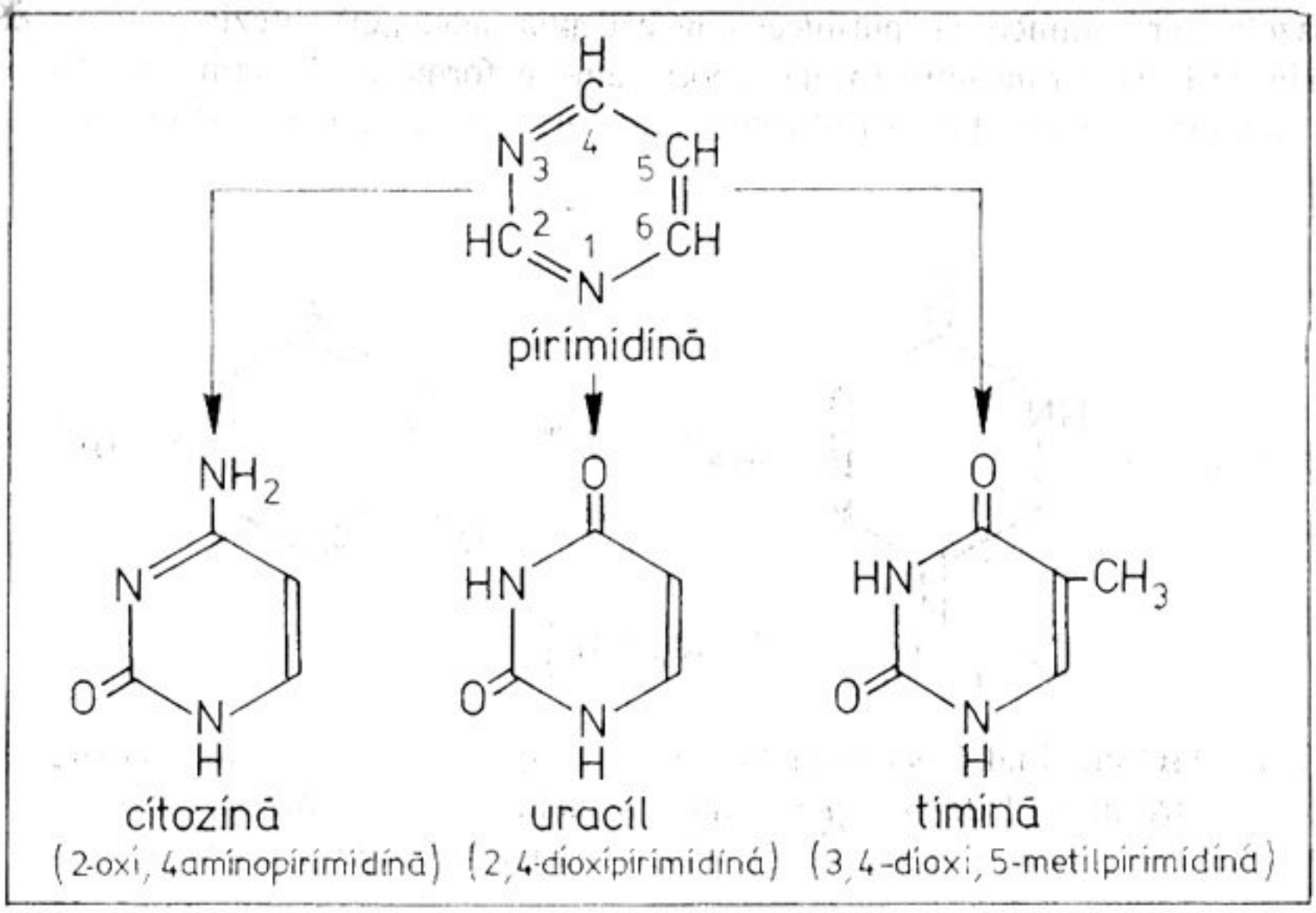


Legarea cu bazele azotate se realizează prin -OH semiacetalic din poziţia 1.

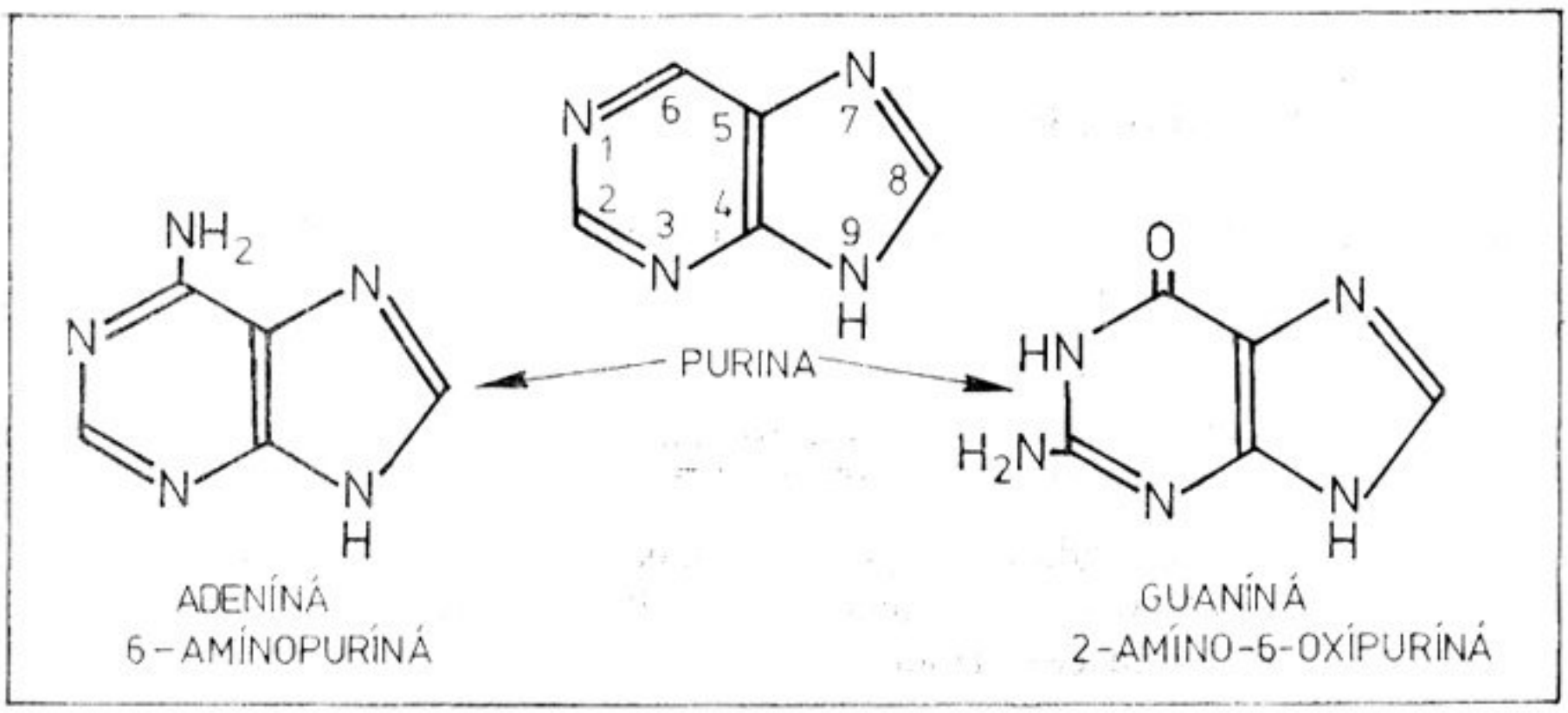
2.6.2.3 Baze azotate

In constituţia chimică a acizilor nucleici intră diferite baze azotate care derivă de la două tipuri de heterocicluri: **pirimidină** şi **purină**.

Bazele pirimidinice principale prezente în mod frecvent în structura acizilor nucleici sunt: Citozina (C), Uracil (U), Timina (T).



Bazele purinice principale sunt: Adenina (A) şi Guanina (G).



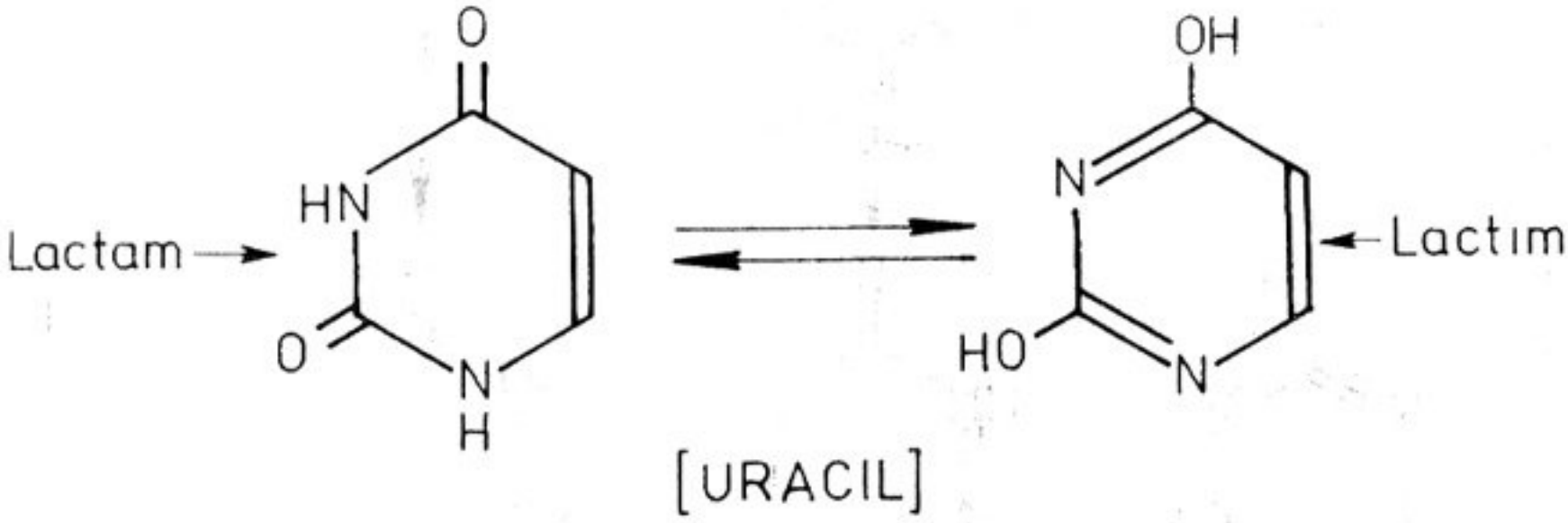
Distribuţia bazelor azotate în structura acizilor nucleici este prezentată în tabela 2.5.

Tabela 2.5 **Bazele azotate din acizii nucleici**

ARN	ADN
Uracil	Timină
Citozină	Citozină
Adenină	Adenină
Guanină	Guanină

Se observă că citozina, adenina şi guanina sunt comune structurii ambelor tipuri de acizi nucleici, **uracilul** se găseşte numai în **ARN**, iar **timina** numai în **ADN**.

Bazele pirimidinice şi purinice (cu excepţia adeninei) prezintă fenomenul de **tautomerie** pe baza căruia între forma ceto(lactam) şi forma enol(lactim) se stabileşte un echilibru care este dependent de pH-ul mediului; la pH-ul fiziologic este predominantă forma **lactam**.



[URACIL]

Forma **lactam** fiind predominantă, bazele azotate stabilesc legături covalente de tip N-glicozodic între atomul de N din poziţia 1 a ciclului pirimidinic sau atomul de N din poziţia 9 a ciclului purinic şi hidroxilul semiacetalic C_1 al ribozei şi respectiv al 2-deoxiribozei.

Bazele azotate prezintă un maxim de absorbţie în **ultraviolet** între 251-271 nm (**260** nm) ceea ce permite determinarea cantitativă prin spectrofotometrie în ultraviolet a acizilor nucleici.

2.6.2.4 Nucleozide

Nucleozidele sunt combinaţii constituite din două unităţi chimice, o bază azotată şi o pentoză (riboză sau deoxiriboză).

Nucleozid = Bază azotată + Pentoză

Nucleozidele sunt considerate N-glicozide ale bazelor pirimidinice sau purinice în care se stabileşte o legătură N-Glicozidică între hidroxizilul semiacetalic al ozei şi azotul din poziţia 1 al bazelor pirimidinice şi azotul din poziţia 9 al bazelor purinice.

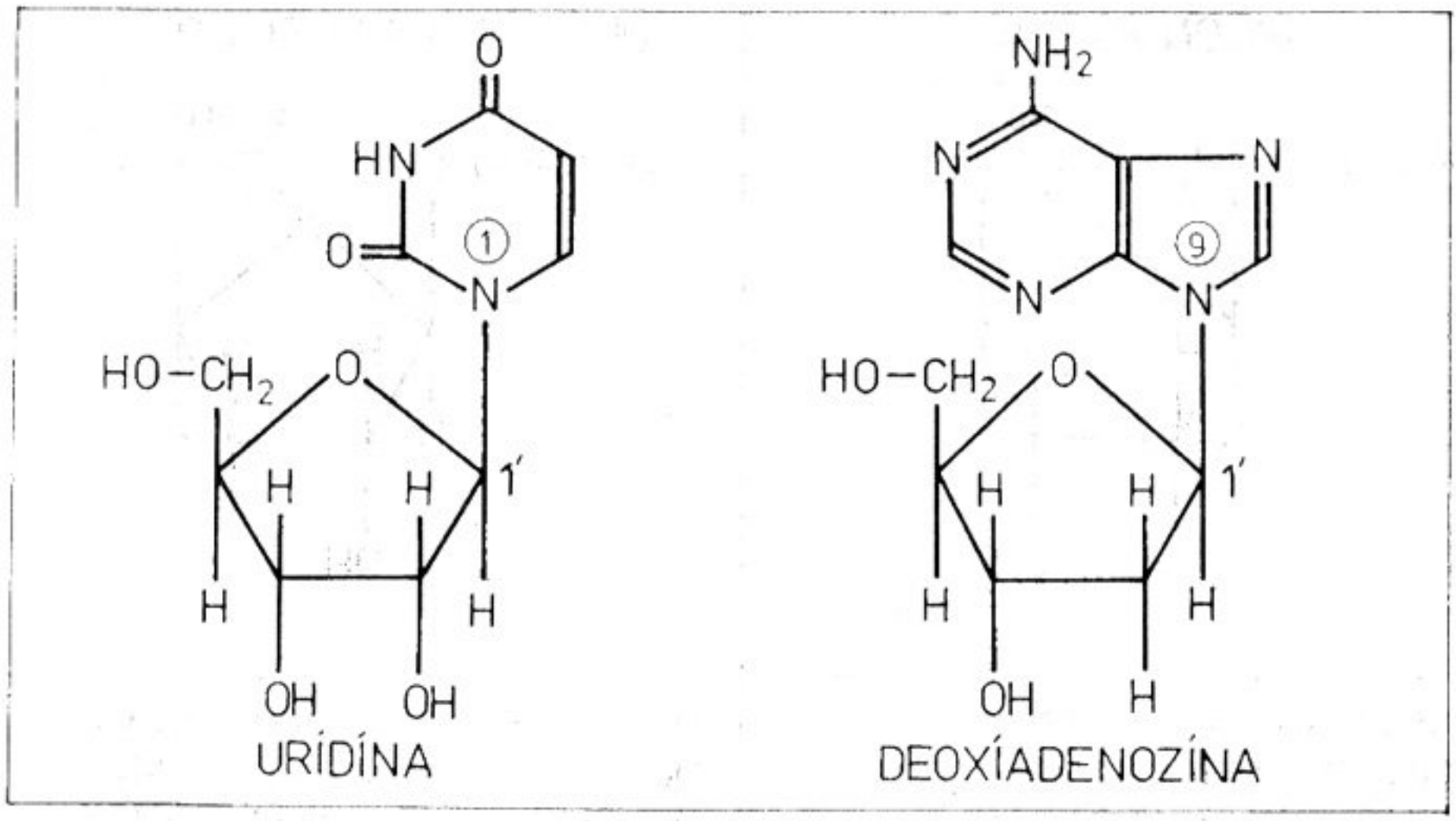
Tabela 2.6 **Exemple de nucleozide**

Bază azotată	Ribonucleozide	2-deoxiribonucleozide
Uracil	Uridină	-
Timină	-	Deoxitimidină
Citozină	Citidină	Deoxicitidină
Adenină	Adenozină	Deoxiadenozină
Guanină	Guanozină	Deoxiguanozină

Nucleozidele pot fi considerate ca produşi de hidroliză parţială a nucleotidelor şi se clasifică în două categorii: **ribonucleozide** şi **deoxiribonuclozide**.

Datorită prezenţei ozelor, nucleozidele au o solubilitate în apă mai mare decât bazele

respective: pot fi hidrolizate chimic sau enzimatic sub acţiunea unor nucleozidaze eliberând componentele lor. Reprezentanţii principali ai fiecărei categorii sunt indicaţi în tabela 2.6.



2.6.2.5 Nucleotidele

Nucleotidele sunt unităţile monomere structurale ale polinucleotidelor respectiv ale macromoleculelor de acizi nucleici.

Nucleotidele rezultă prin hidroliza parţială a acizilor nucleici sub acţiunea enzimelor denumite - **nucleaze**. Nucleotidele pot fi definite ca esteri fosforici ai nucleozidelor, în care acidul fosforic poate fi esterificat cu una din grupările OH ale pentozei.

Deci în structura nucleotidelor intră trei componenţi:

Nucleotid = Bază azotată + Pentoză + Acid fosforic

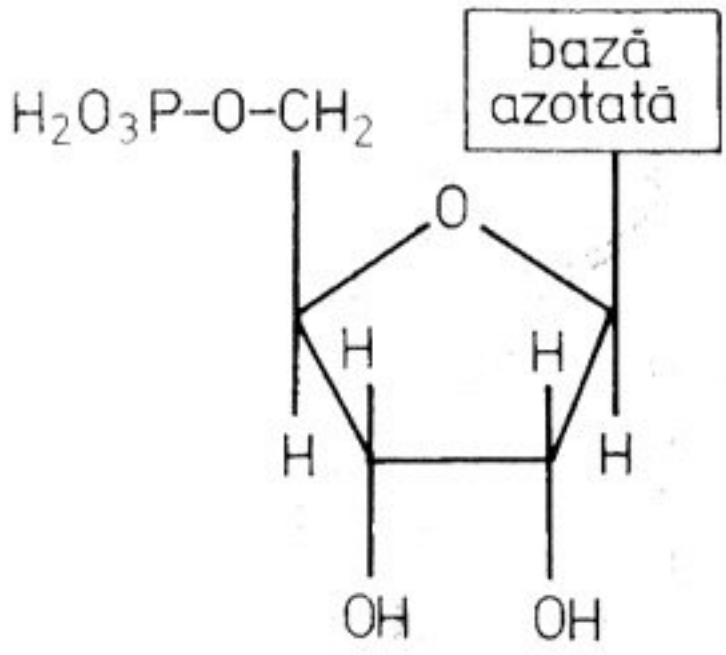
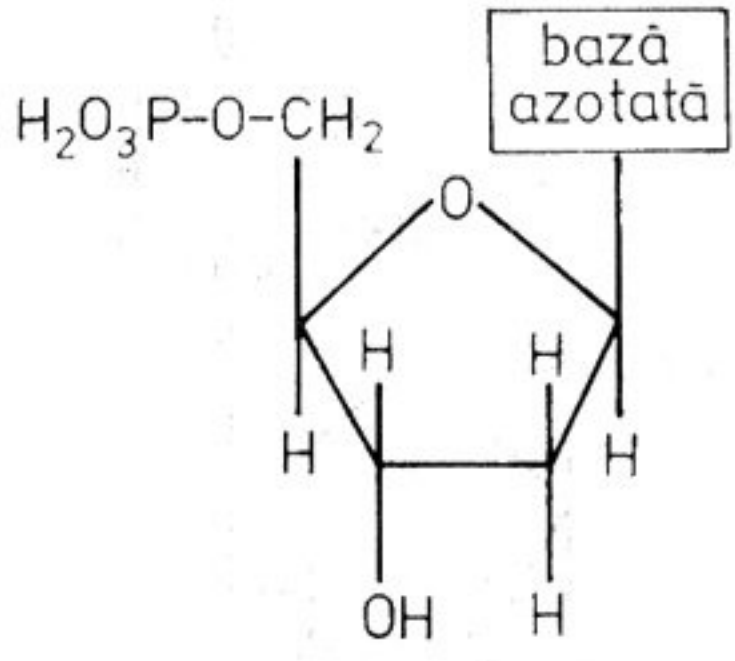
In nucleotide distingem două tipuri de legături: **N- glicozidică** şi **legătură esterică**. Natura pentozei este criteriul de clasificare al nucleotidelor în două categorii: ribonucleotide care conţin D-riboza şi deoxiribonucleotide care conţin 2-deoxi-ß-D-riboza.

In ribonucleotide, acidul fosforic poate fi esterificat la grupările -OH ale ribozei din poziţiile 2',3' şi 5', iar în deoxiribonucleotide la grpările -OH din poziţiile 3' şi 5' ale ß-deoxiribozei.

In urma hidrolizei menajate a ADN sau ARN se obţin atât nucleozid-5'-monofosfaţi, cât şi nucleozid-3'-monofosfaţi, fapt care demonstrează că aceştia sunt unităţile structurale ale acizilor nucleici. Nucleotidele predominante în celulă în stare liberă sunt **nucleozid-5'-fosfaţii** care îndeplinesc importante roluri metabolice.

Structura generală şi nomenclatura principalelor ribonucleotide şi deoxiribonucleotide sunt consemnate în tabela 2.7.

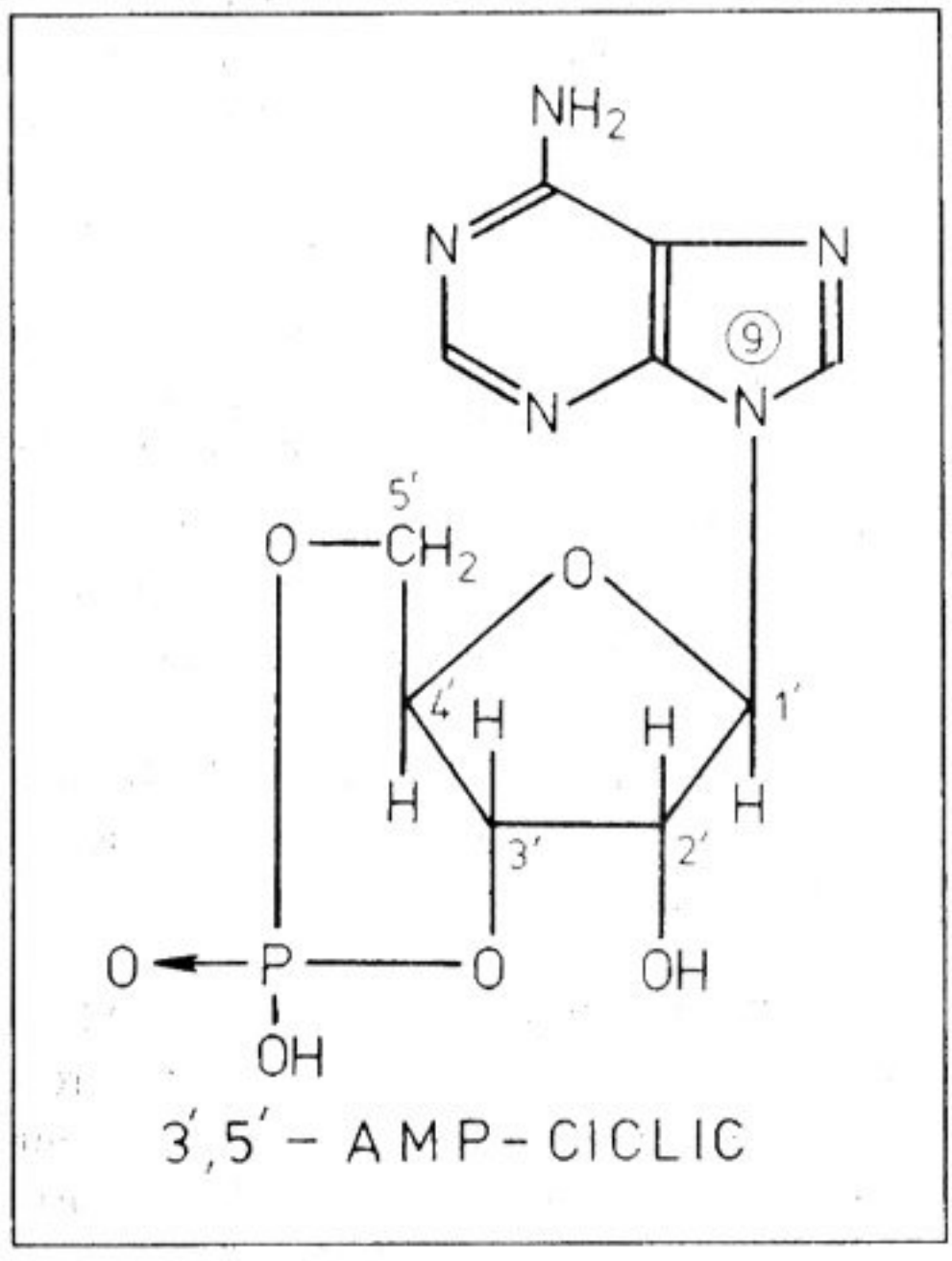
Tabela 2.7 **Principalele ribonucleotide şi deoxiribonucleotide**

RIBONUCLEOTIDE	DEOXIRIBONUCLEOTIDE
	
Uridin-5'-monofosfat UMP Citidin-5'-monofosfat CMP Adenozin-5'-monofosfat AMP Guanozin-5'-monofosfat GMP	Deoxitimidin-5'-monofosfat, dTMP Deoxicitidin-5'-monofosfat,dCMP Deoxiadenozin-5'-monofosfat,dAMP Deoxiguanozin-5'-monofosfat,dGMP

2.6.2.6 Nucleotide naturale libere

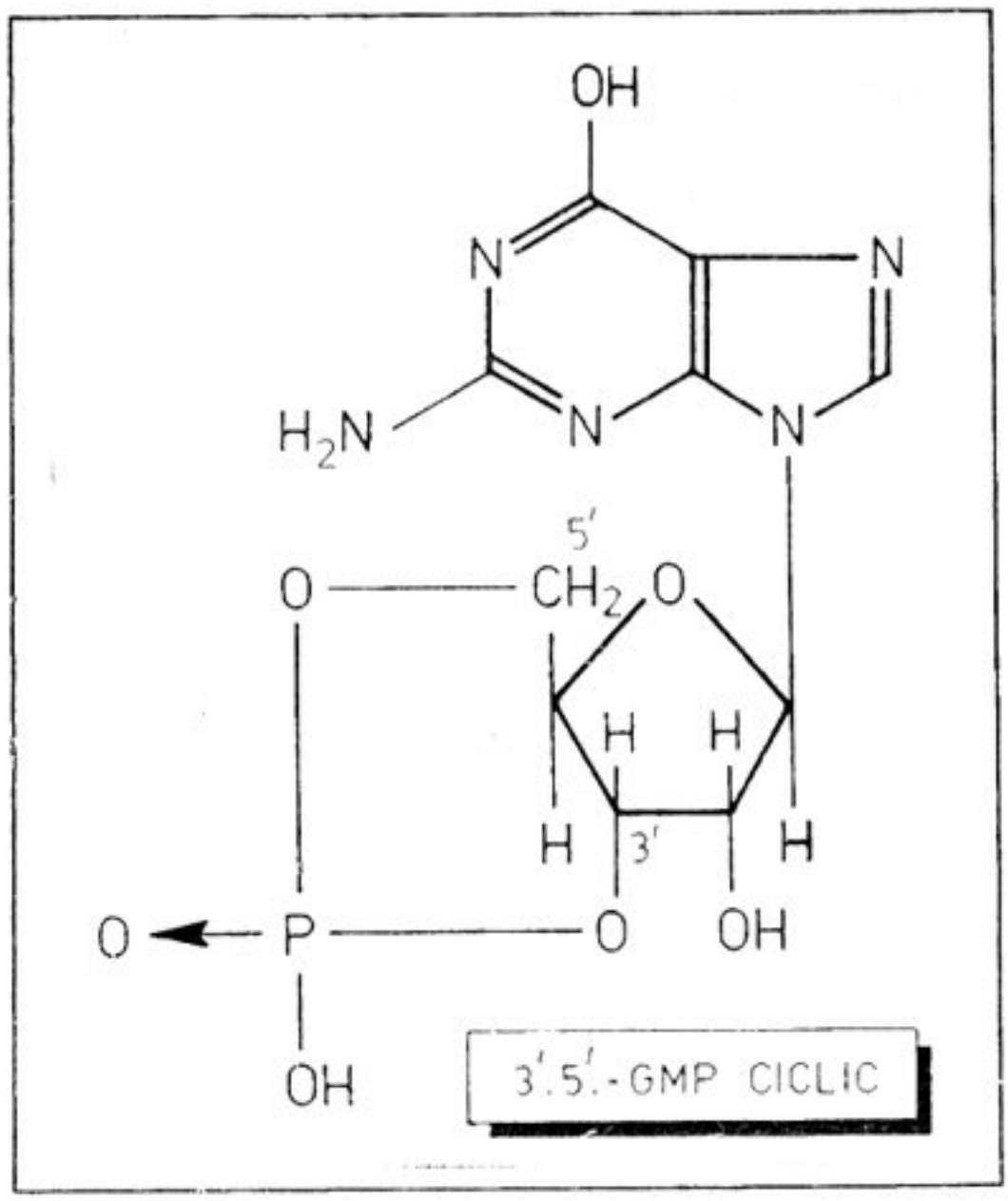
Un nucleotid important care nu face parte din structura acizilor nucleici este 3'5'-AMP-ciclic (acid adenozin-3',5'-monofosfat ciclic) care prezintă o legătură **fosfodiester internă** (3'—5').

Nucleotidul Adenozin -3',-5,monofosfatul ciclic (AMP ciclic, AMPc) mediază acţiunea a numeroşi hormoni (**mesageri primi**) care nu traversează membrana celulară. Prin interacţiunea primului mesager (hormonul) cu enzima membranară adenilat ciclaza, asupra căreia acţionează, din ATP ia naştere adenozin monofosfatul ciclic) AMPc care este considerat mesagerul secund al acţiunii hormonilor respectivi în celulă, el realizând prin fosforilarea reversibilă a unor enzime activarea sau inactivarea acestora (teoria lui **Sutherland**). Acţiunea hormonului (mesagerul prim) poate fi suprimată prin hidroliza AMPc sub acţiunea fosfodiesterazei.

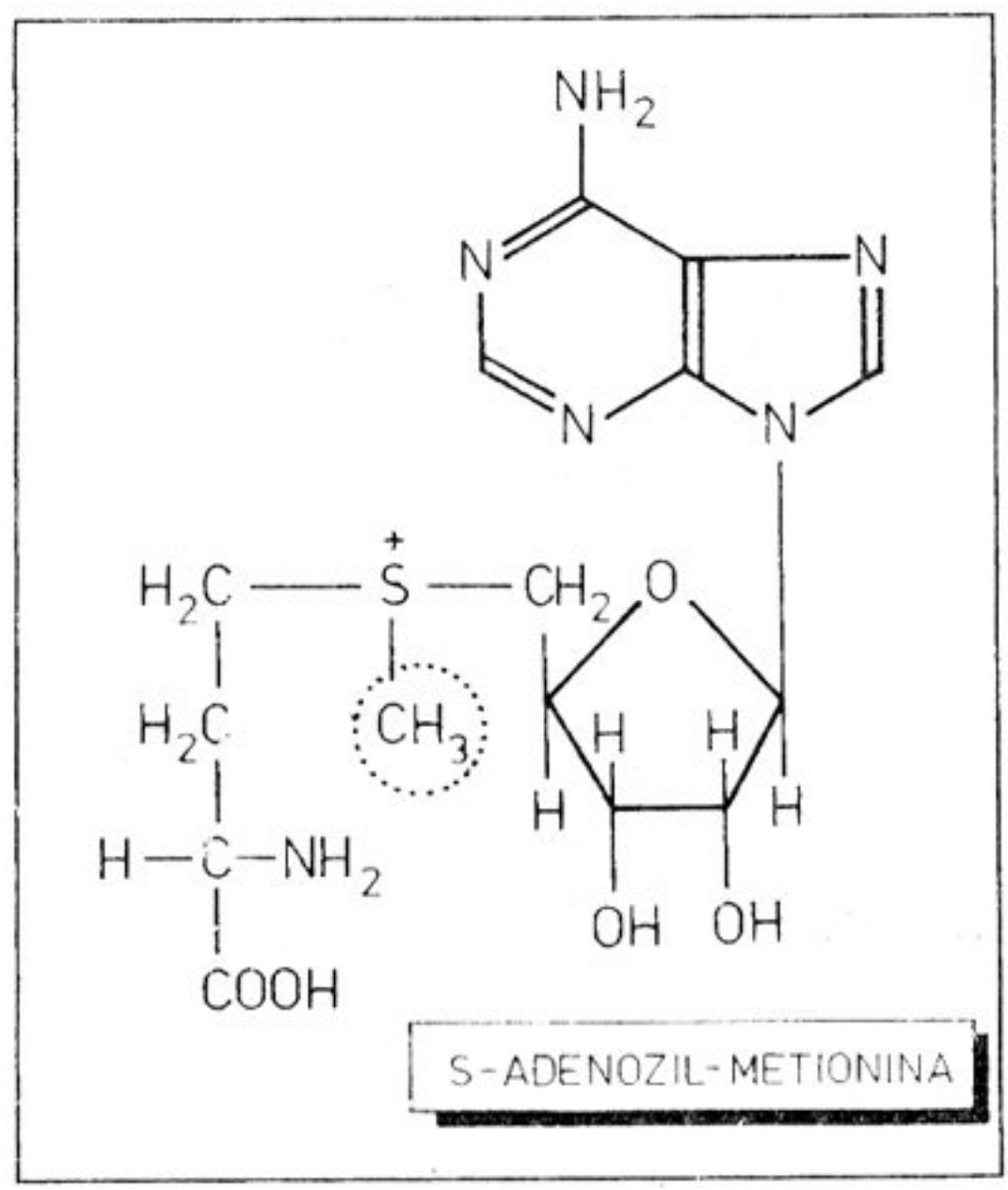


3',5' – AMP – CICLIC

Guanozin -3',5'-monofosfatul (GMPc)se comportă de asemenea ca un important **mesager secund**.



In vederea efectuării unor reacţii de transfer, este necesară activarea prealabilă a unor molecule ceea ce se realizează prin cuplarea acestora cu un nucleozid; astfel **metionina** este activată ca S-Adenozil, metionina (SAM), glucoza ca uridin-difosfat glucoză (UDP - glucoză), diacilglicerolul ca citidindifosfat diacilglicerol (CDP - diacilglicerol).

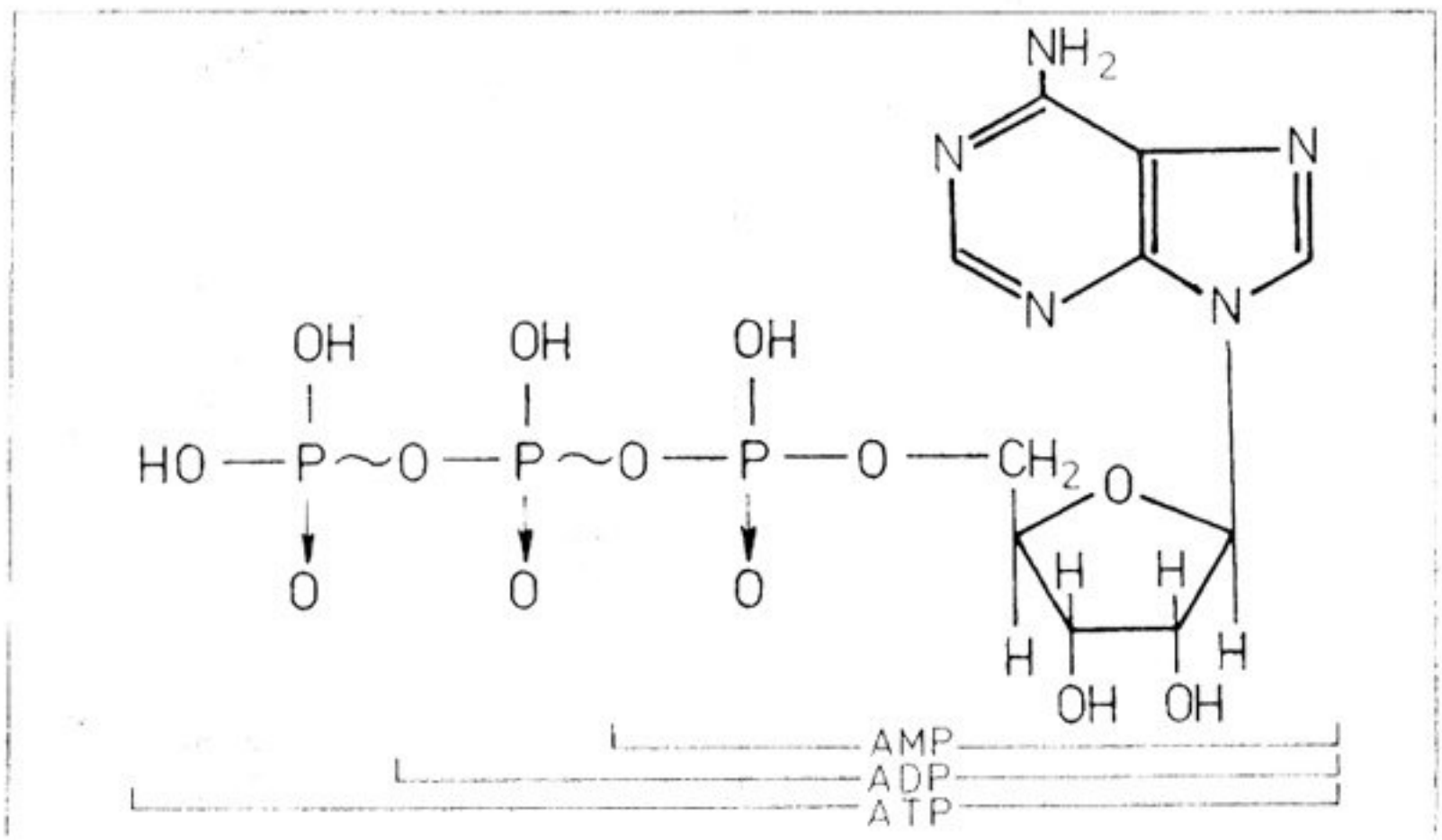


2.6.2.7 Nucleotid trifosfaţi cu rol de compuşi macroergici

Nucleotidele pot conţine în molecula lor unul sau mai mulţi radicali ai acidului ortofosforic, numărul acestor radicali constituind un criteriu de sub clasificare a nucleotidelor

în: nucleotide monofosfat XMP, nucleotide difosfat XDP, nucleotide trifosfat XTP (X reprezinta diferite nucleotide).

Exemplul tipic pentru acest tip de nucleotide îl constituie AMP (adenozin -5'-monofosfat), ADP (adenozin-5'-difosfat), ATP (adenozin-5'-trifosfat) prezentate alăturat.

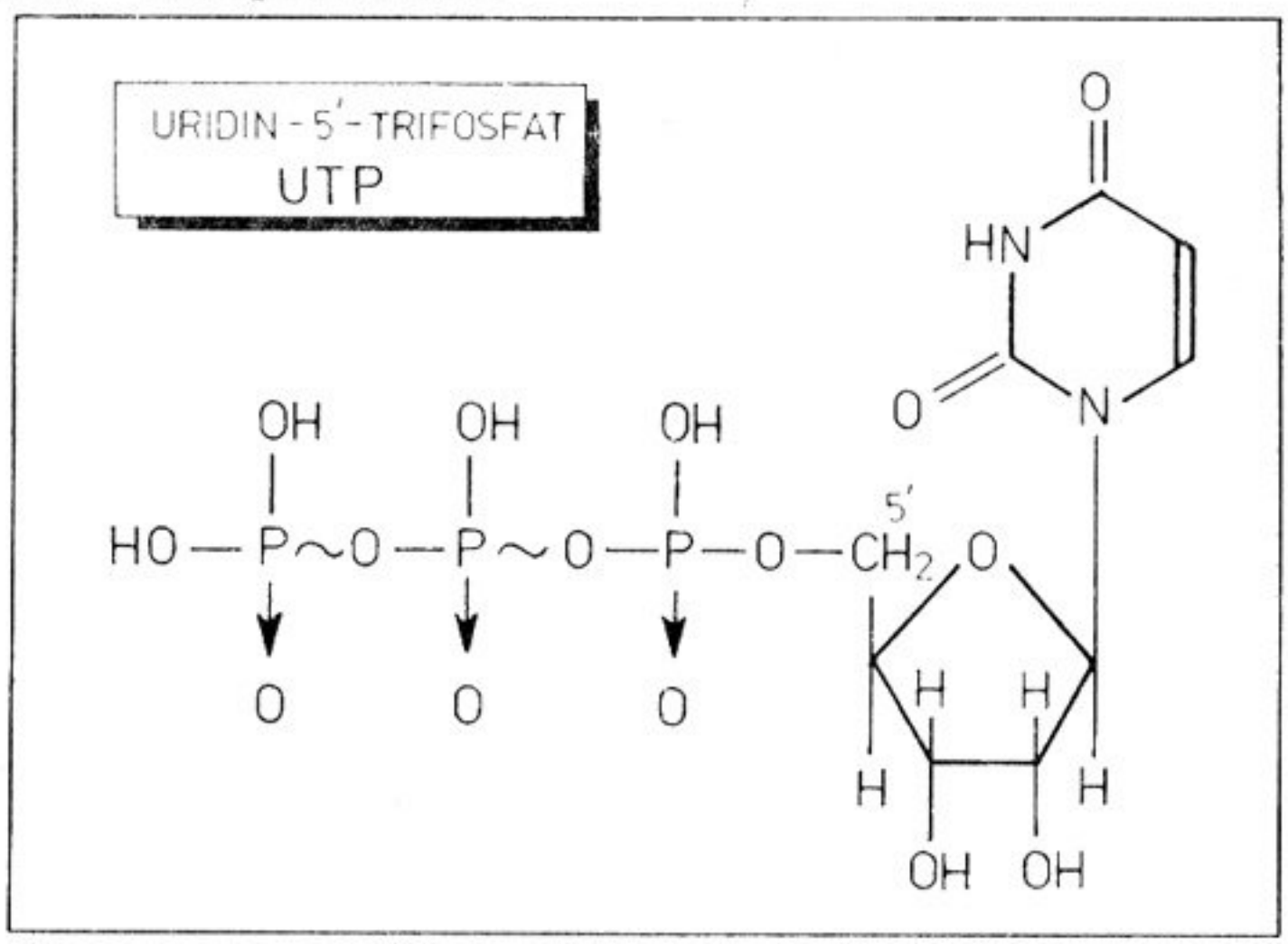


Scindarea hidrolitică a ATP în dependenţă de enzimele respective poate avea loc în două moduri:

$$ATP \longrightarrow ADP + Pi \quad (\Delta G = -7300 \text{ cal/mol})$$
$$ATP \longrightarrow AMP + PPi \quad (\Delta G = -7300 \text{ cal/mol})$$

Pi = acid fosforic; PPi = acid pirofosforic.

Intrucât scindarea hidrolitică a celor două legături fosfat din ATP este însoţită de o scădere a energiei libere ΔG = -7300 cal/mol, se poate considera că legăturile fosfat 2 şi 3 precum şi 1 şi 2 sunt legături macroergice şi se notează prin simbolul ~.



Toate procesele bioenergetice se realizează în strânsă corelaţie cu intervenţia unui grup de biomolecule specializate, denumite **compuşi macroergici** care participă la evoluţia fluxului de energie în cadrul celulei vii.

Hidroliza acestor compuşi caracterizaţi printr-un înalt potenţial energetic este însoţită

de o descreştere a energiei libere $\Delta G > -7000$cal/mol

ATP-ul poate transfera acidul fosforic ribonucleotiddifosfaţilor uridilici, citidilici şi guanilici de tipul:

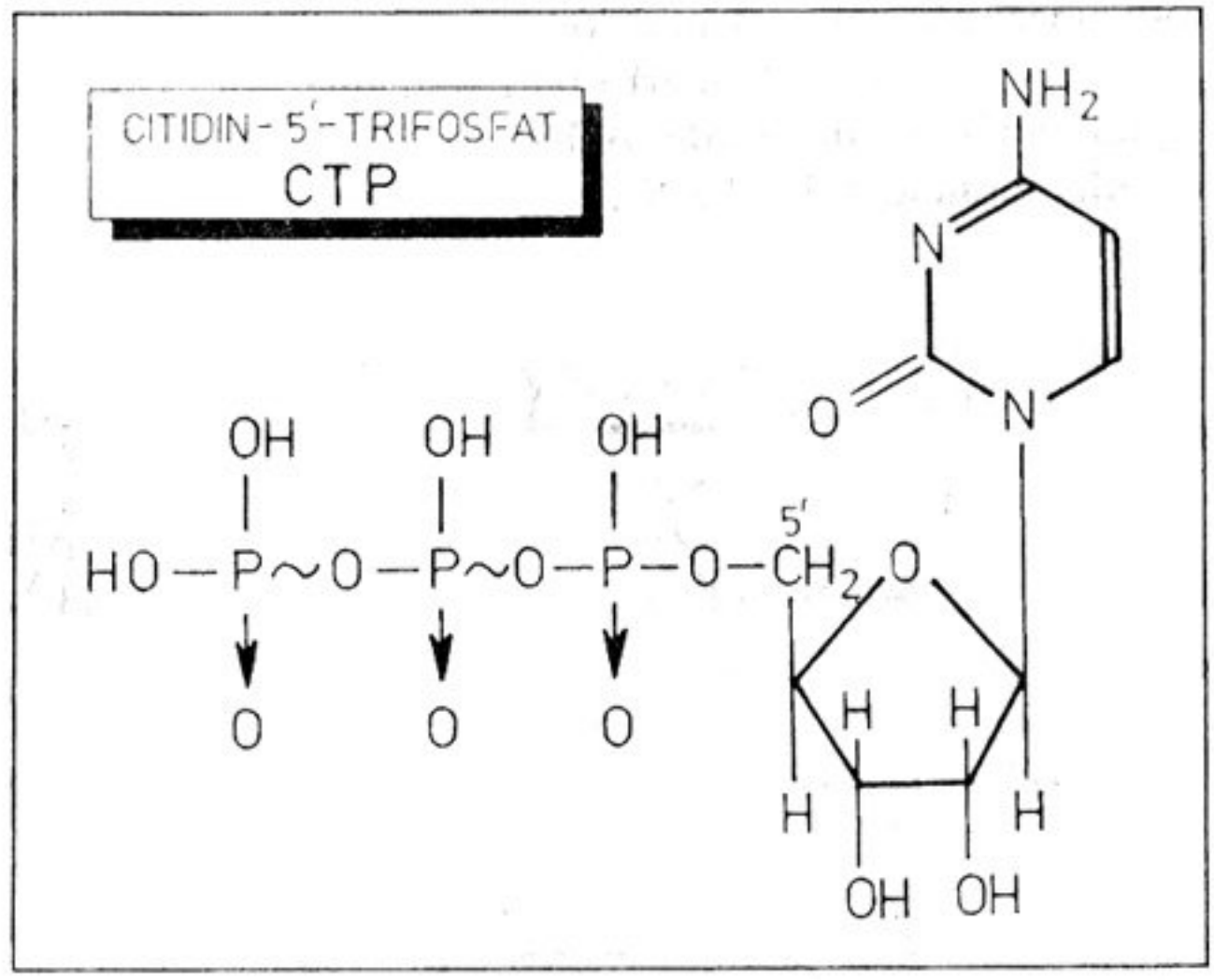
$$ATP + XDP \rightarrow ADP + XTP$$

unde X poate fi deci uridină,citidină sau guanozină.

Ribonucleotid trifosfaţii (UTP, CTP şi GTP) servesc nu numai în calitate de monomeri pentru sinteza ARN ci şi în calitate de compuşi macroergici.

UTP transferă restul fosfat glucozei cu formare de UDP-glucoza care intervine în anabolismul glucidic.

CTP activează diacilglicocerolul cu formare de CDP-diacilglicerol care intervine în biosinteza glicerofosfolipidelor.



2.6.2.8 Caracterizare generală a nucleotidelor

◆ - Ribonucleotidele şi deoxiribonucleotidele sunt componente ale acizilor nucleici şi au un caracter acid datorită disocierii protonilor din radicalul acidului fosforic;

◆ - Bazele purinice şi pirimidinice conferă nucleotidelor proprietatea de a absorbi în lumină ultravioletă având un maxim de absorbţie la $\lambda = 260$ nm.

◆ - Nucleotidele pot fi hidrolizate de enzima 5'-Nucleotidaza cu eliberarea acidului fosforic.

◆ - Derivaţi ai adenozin-5'-difosfatului intră în structura unor coenzime importante: NAD^+, $NADP^+$,FAD, FMN, CoA ~SH.

◆ - Nucleotid polifosfaţii sunt precursorii pentru biosinteza acizilor nucleici şi participă în procesele de biosinteză ale diferitelor clase de compuşi biologic activi: UTP pentru biosinteza glicogenului, CTP pentru biosinteza glicerofosfolipidelor.

◆ - Nucleotid polifosfaţii sunt compuşi macroergici fiind donatori universali de energie în ansamblul reacţiilor şi proceselor metabolice. Acidul adenozintrifosforic (ATP) reprezintă placa turnantă a energeticii materiei vii care funcţionează ca un acumulator şi generator de energie în ambianţa metabolică a organismelor.

◆ - Influenţează şi coordonează activitatea unor enzime şi hormoni (3',5'-AMP-ciclic şi 3',5'-GMP-ciclic) teoria lui Sutheriand 1972.

2.6.2.9 Polinucleotide. Structura primară a ADN

Acizii nucleici sau **polinucleotidele** sunt substanţe macromoleculare rezultate din condensarea unui mare număr de mononucleotide care constituie unităţile structurale monomere ale polinucleotidelor.

Aceştia sunt de două tipuri şi anume:

- **polideoxiribonucleotide (ADN)**
- **poliribonucleotide (ARN).**

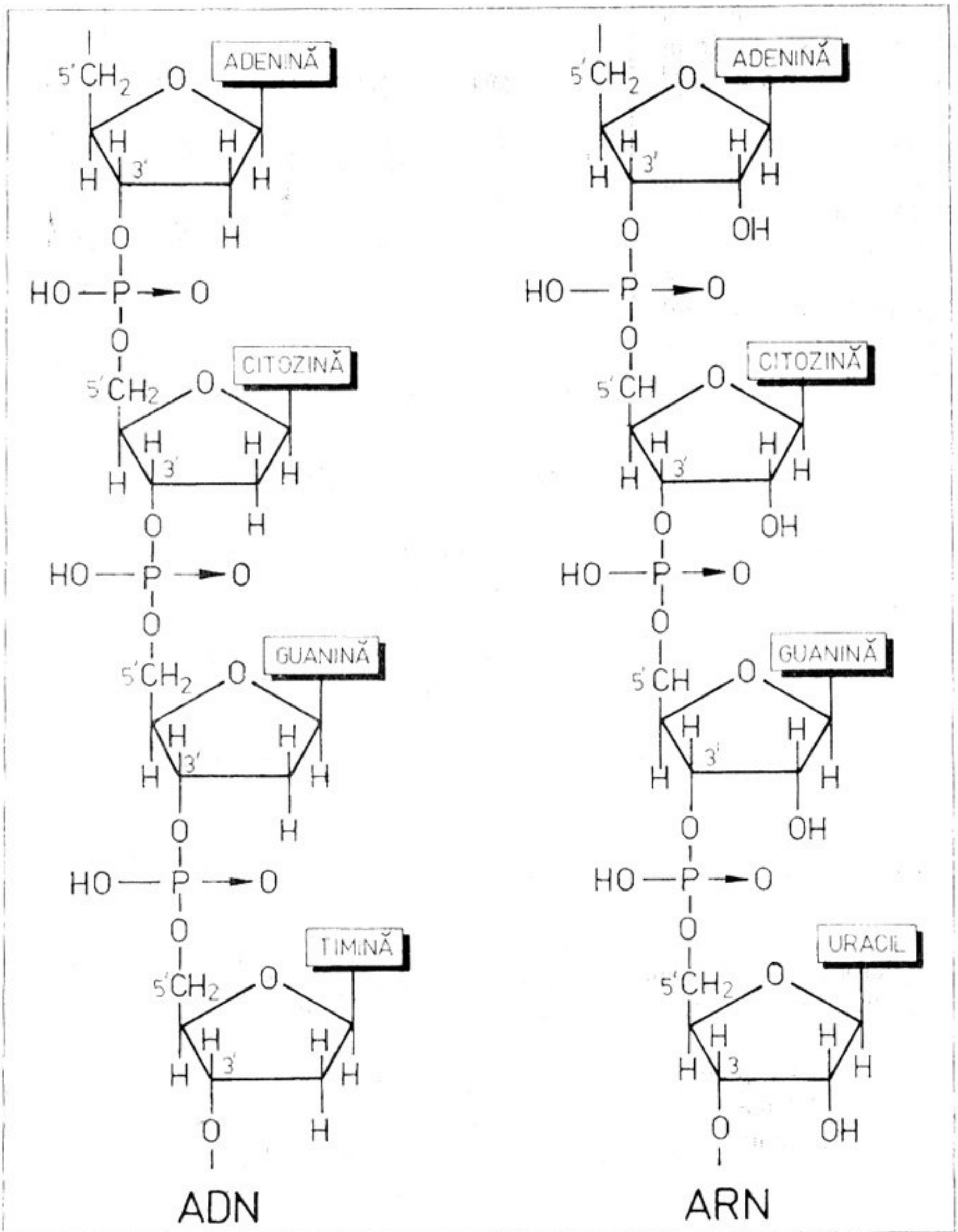


Fig.2.16 **Structura unor fragmente din macromolecula de ADN şi ARN**

Datorită complexităţii structurale a acizilor nucleici precum şi caracterului lor extrem de labil, determinarea secvenţei bazelor azotate a fost o problemă extrem de laborioasă şi a implicat o ingenioasă strategie experimentală.

Structura primară a acizilor nucleici rezultă prin stabilirea între mononucleotidele adiacente a unor legături covalente 3'-5' fosfodiester; aceste legături se stabilesc între o grupare -OH din poziţia 3' a deoxiribozei (în ADN) aparţinând unui mononucleotid şi gruparea -OH din poziţia 5' a deoxiribozei sau ribozei aparţinând mononucleotidului învecinat.

Structura **polideoxiribonucleotidelor (ADN)** şi a **poliribonucleotidelor (ARN)** este prezentată în figura 2.16 sub forma unor fragmente din macromoleculele respective cu evidenţierea legăturilor 3',5'- fosfodiester.

Structura polinucleotidelor mai poate fi redată şi prin prezentarea simbolică din fig.2.17. In această reprezentare linia verticală indică pentoza (deoxiriboza sau riboza) pe care sunt marcate poziţiile 3' şi 5' ale grupărilor -OH care participă prin intermediul radicalului acidului fosforic la stabilirea legăturilor 3',5'- fosfodiester dintre nucleotide. Bazele azotate ale fiecărui mononucleotid sunt codificate prin literele A,C,G,T,U situate în poziţia C_1 ale pentozei respective.

Fig.2.17 **Reprezentarea simbolică a structurii polinucleotidelor**

Aşadar nivelul de organizare primar al ADN sau ARN indică **natura, proporţia** şi **secvenţa** bazelor azotate purinice şi pirimidinice.

2.6.2.10 Structura secundară şi terţiară a ADN

Structura macromoleculei de ADN se caracterizează printr-o organizare tridimensională care îi conferă proprietăţi moleculare şi biologice distincte.

Una din marile realizări ştiinţifice ale secolului XX care a constituit actul de naştere al biologiei moleculare a fost elaborarea în anul 1953 a modelului de structură spaţială a ADN de către J.D.Watson şi F.H.Crick.

Primele precizări în legătură cu structura ADN au fost aduse de Chargraff care a observat o serie de regularităţi matematice în succesiunea bazelor azotate şi anume:

$$\frac{\text{ADENINĂ (A)}}{\text{TIMINĂ (T)}} = \frac{\text{GUANINĂ (G)}}{\text{CITOZINĂ (C)}} = 1$$

sau

$$\frac{A + G}{T + C} = 1$$

respectiv numărul bazelor purinice este egal cu numărul bazelor pirimidinice fapt confirmat prin **difracţia de raze X**.

Perechile de baze **adenina-timina** şi **guanina-citozina** au fost denumite **baze complementare**. Adenina şi timina din nucleotide se pot împerechea spaţial prin stabilirea a două legături de hidrogen, iar guanina şi citozina din nucleotide se pot împerechea într-un aranjament spaţial prin stabilirea a trei legături de hidrogen conform modelului de structură ilustrat în fig.2.18.

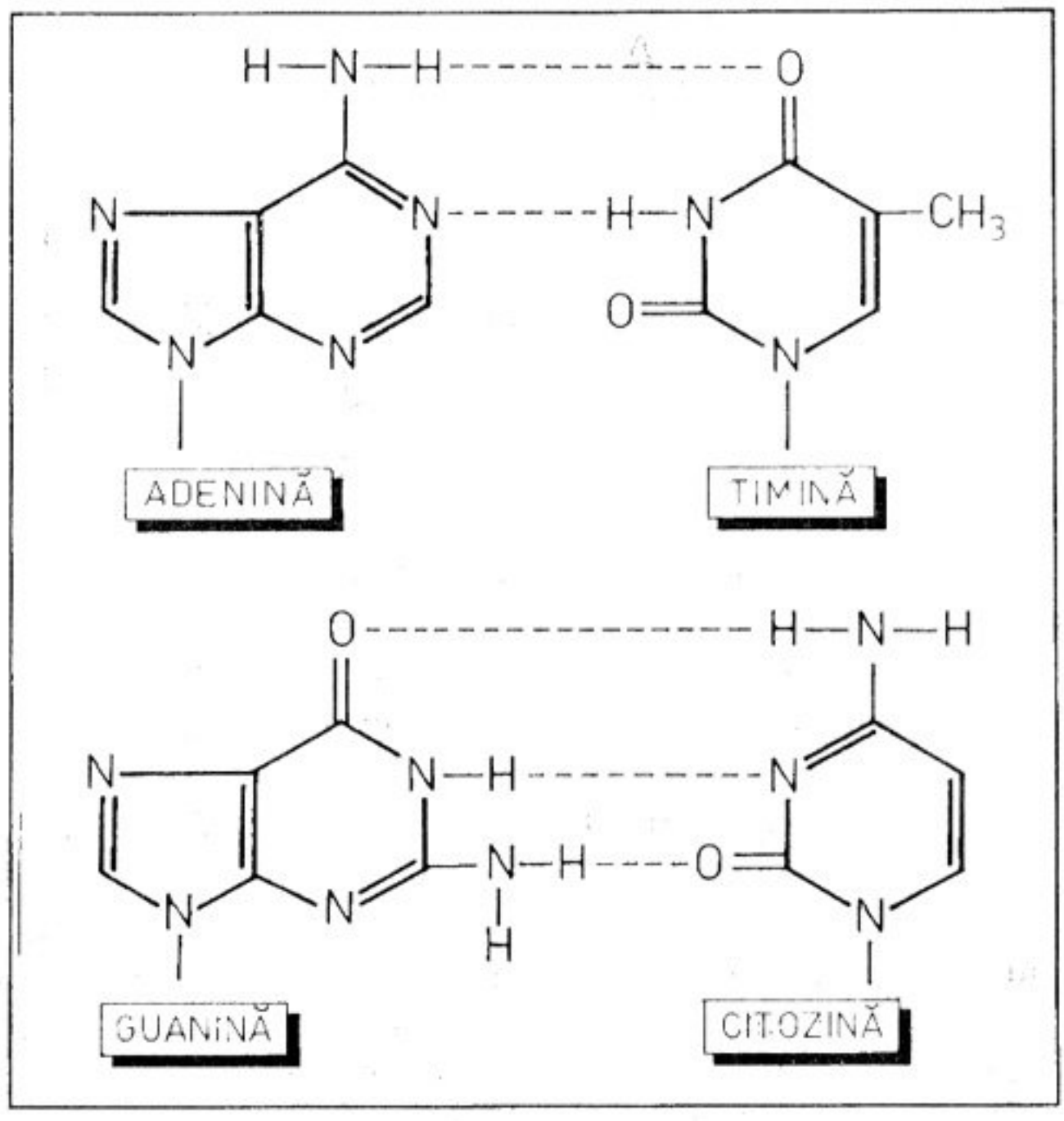


Fig.2 18 **Ilustrarea legăturilor de hidrogen între bazele azotate complementare**

In conformitate cu modelul elaborat, macromolecula de ADN este constituită din două catene polinucleotidice răsucită într-o spirală dublă (**dublu helix**), orientată spre dreapta.

Cele două catene polinucleotidice sunt înfăşurate în jurul unei axe comune (teoretică)

şi orientate **antiparalel**, în direcţii opuse. Această arhitectură spaţială este menţinută şi stabilizată prin legături de hidrogen intercatenare care se stabilesc între perechile de baze azotate complementare existente între cele două catene polinucleotidice care au sensuri opuse de derulare, interacţiunile electronice dintre bazele azotate suprapuse, precum şi interacţiunile hidrofobe (fig.2.19).

Ca efect al complementarităţii bazelor azotate din cele două catene polinucleotidice, legăturile de hidrogen stabilite între perechile de baze azotate complementare dictează asocierea specifică a acestor catene într-o structură tridimensională compactă.

Catenele polinucleotidice ale ADN nu sunt identice,dar datorită împerecherii bazelor azotate, fiecare devine **replica complementară a celeilalte**.

Cele două catene polinucleotidice ale ADN nu sunt orientate în aceeaşi direcţie ci în direcţii opuse, adică antiparalele, evidenţiată prin reprezentările din fig.2.19.

Stabilitatea structurală a ADN este asigurată şi prin caracterul polianionic al macromoleculei, caracter datorat disocierii grupărilor -OH ale radicalului acidului fosforic din fiecare mononucleotid. Ca polianion macromolecula de ADN poate stabili interacţiuni electrostatice cu proteinele bazice (histone) care conţin aminoacizi încărcaţi electropozitiv sau cu anumiţi cationi (Mg^{2+}).

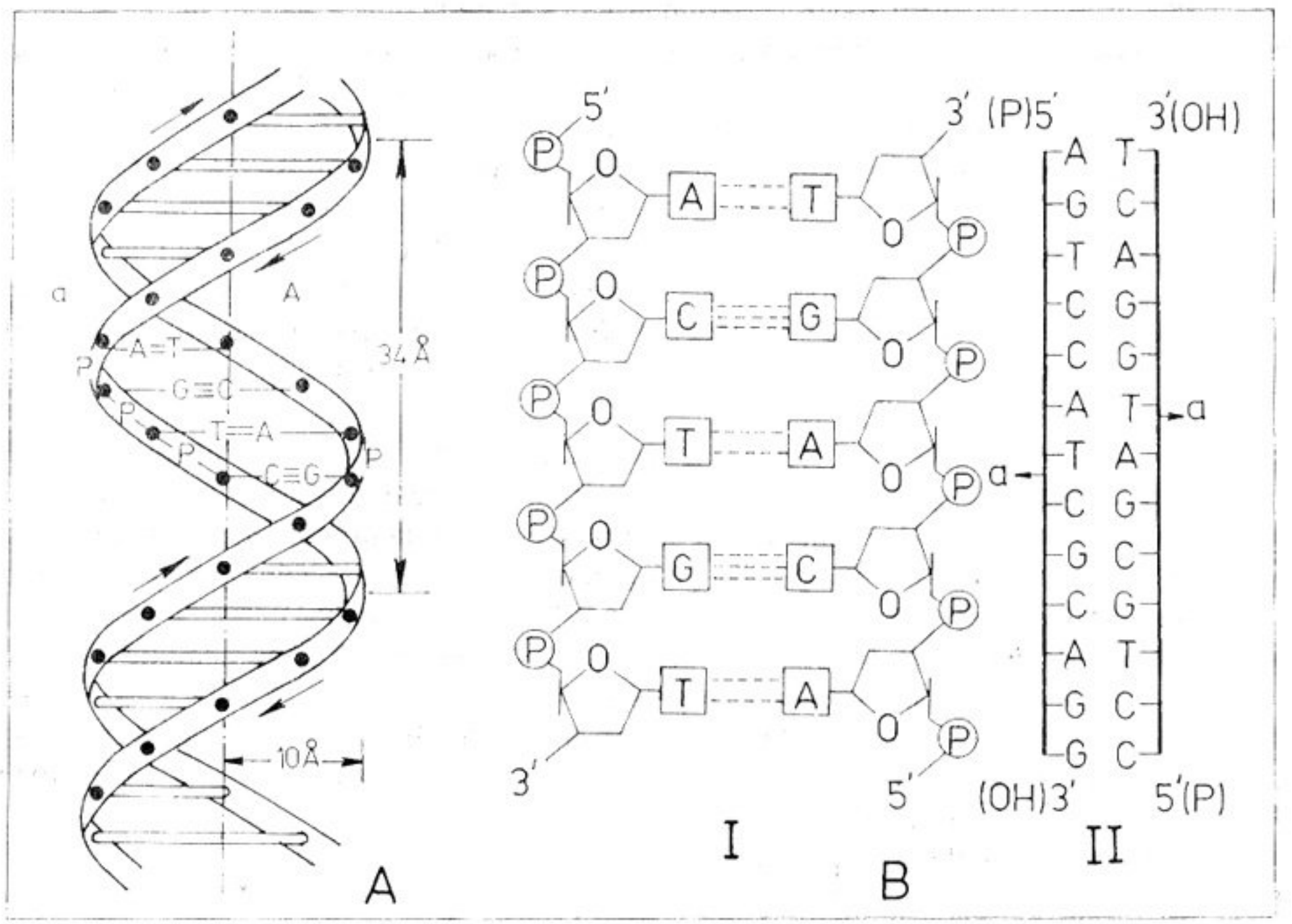


Fig.2.19 **(A) Modelul structurii spaţiale dublu elicoidale a ADN**
(B) Orientarea antiparalelă I,II a celor două catene polinucleotidice în structura ADN

Structura dublu helicoidală a ADN a condus şi la alt element al ipotezei Watson-Crick şi anume la mecanismul prin care informaţia genetică poate fi replicată fidel întrucât cele două catene ale ADN sunt complementare.

2.6.2.11 Funcţiile biologice ale ADN. Localizare. Tipuri de ADN

Modelul Watson-Crick al ADN oferă elementele pentru explicarea capacităţii de a stoca şi transmite informaţia genetică de-a lungul generaţiilor. **Dublul helix** şi complementaritatea structurii bicatenare constituie baza moleculară a fenomenului de **autoduplicare** sau **autoreplicare** a ADN.

ADN-ul prin structura sa reprezintă **unicul substrat chimic al eredităţii** şi prin acest mecanism de replicare se asigură **constanţa conservării şi transmiterii** caracterelor ereditare. Funcţiile biologice ale ADN-ului reprezintă o reflectare a acestui principiu general şi pot fi astfel enunţate:

◆ - ADN constituie baza moleculară a conservării şi trsnsmiterii informaţiei genetice din generaţie în generaţie;

◆ - ADN asigură şi **controlează biosinteza proteinelor** şi enzimelor;

◆ - programul genetic al dezvoltării, menţinerii şi perpetuării oricărui organism **se află** înscris **în ADN**;

◆ - ADN-ul unui spermatozoid şi cel al unui ovul - după fuziunea acestor celule - iniţiază şi controlează producerea unui organism adult care primeşte informaţii genetice din ambele părţi;

◆ - ADN asigură constanţa replicării celulare precum şi diferenţierea şi reglarea celulară;

◆ - ADN reprezintă baza moleculară a **mutaţiilor naturale** sau **induse**.

Gradul de evoluţie al sistemului biologic coordonează localizarea şi tipul de structură al ADN. Astfel la **eucariote** (organisme superioare şi unele microorganisme) aproximativ 88% din totalul ADN celular se află localizat într-o formaţiune intracelulară bine individualizată, **nucleul**.

La organismele superioare volumul imens al informaţiei ereditare transmis prin ADN necesită localizarea acestor macromolecule în anumite formaţiuni ale nucleului denumite **cromozomi**. In nucleu ADN se află cuplat cu proteine bazice de tipul **protamine** sau **histone** care sunt repartizate uniform de-a lungul dublului helix; acest complex este denumit **cromatina** In **nucleol** ADN este asociat cu ARN (heterocromatină). ADN mitocondrial reprezintă un ADN satelit localizat în matricea mitocondriilor. In comparaţie cu ADN nuclear, ADN mitocondrial prezintă următoarele particularităţi:

◆ - poate adopta o structură în **elice circulară simplă** sau o structură în **elice circulară dublă împletită** (vezi fig.2.20);

◆ - nu formează complexe cu proteinele;

◆ - are o masă moleculară mult mai mică ($1\text{-}5*10^5$).

Rolurile biologice ale ADN mitocondrial sunt:

◆ - participă la susţinerea edificiului mitocondriilor;

◆ - conţine informaţia genetică necesară pentru biosinteza unor anumite proteine intra şi extra mitocondriale;

◆ - poate dirija sinteza ribozomilor cu o structură şi compoziţie proprie mitocondriilor;

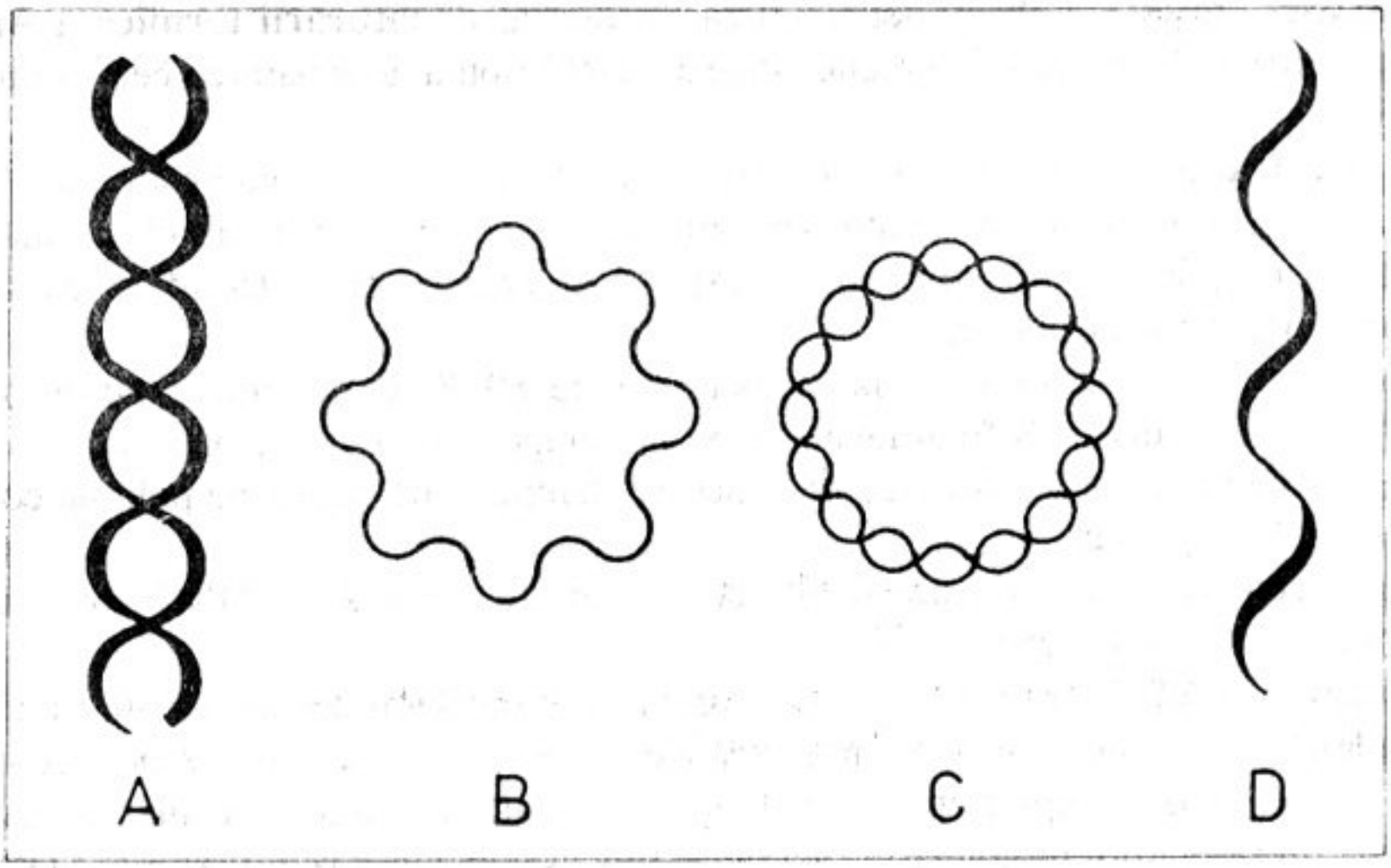


Fig.2.20 **Structura schematică a diferitelor tipuri de ADN**
A - dublă elice deschisă (nucleu, eucarotide);
B - elice simplă circulară (mitocondrii);
C - elice dublă circulară (mitocondrii, procarotide);
D - elice simplă monocatenară (bacteriefag cu cca.5000 nucleotide)

- este sediul mutaţiilor şi poate fi apt pentru procesele de recombinare genetică.

Structura schematică a diferitelor tipuri de ADN apare în figura 2.20.

2.6.2.12 Proprietăţi generale ale ADN

a) **Efectul hipocrom.** Bazele pirimidinice şi purinice existente în structura ADN îi conferă proprietatea de a absorbi radiaţia ultravioletă, având un maxim de absorbţie la 260 nm. Nivelul absorbţiei ADN la 260 nm este cu 35-40% mai mică decât cea pe care o prezintă bazele azotate individuale.

Acest fenomen constituie **efectul hipocrom** şi se datoreşte faptului că în structura dublu elicoidală a ADN, bazele azotate sunt strâns suprapuse "stivuite" una peste alta ceea ce determină o mascare a lor; electronii π de la atomii de azot din ciclurile bazelor azotate interacţionează şi determină o descreştere a absorbţiei în ultraviolet. Efectul **hipocrom** este utilizat pentru calcularea gradului de spiralare a macromoleculei de ADN.

b) **Denaturarea termică. Efectul hipercrom.** ADN-ul prezintă o stabilitate remarcabilă, dar poate fi **denaturat termic**. Denaturarea ADN este însoţită de următoarele fenomene:
- separarea celor două catene ale dublului helix;
- înjumătăţirea masei moleculare;
- diminuarea vâscozităţii şi a rotaţiei optice;
- **creşterea absorbţiei în ultraviolet (260 nm)**.

Această creştere a absorbţiei (DO) ca rezultat al **denaturării termice** a ADN este datorată modificării structurii dublu elicoidale a ADN însoţită de separarea celor două catene polinucleotidice.

Efectul hipercrom este o consecinţă a destabilizării legăturilor de hidrogen intercatenare, ceea ce are ca rezultat o **tranziţie** de la conformaţia dublu elicoidală a ADN la o stare de **despiralare** de **disociere**, a celor două catene polinucleotidice, cu separarea acestora din structura bicatenară.

Acest fenomen se produce la temperatura de 80-90°C denumită **temperatură de tranziţie** (Tt) sau **punctul de fuziune al ADN**. La temperatura de tranziţie macromoleculele de ADN sunt pe jumătate denaturate; peste această temperatură, catenele polinucleotidice se separă complet şi spontan.

Reprezentarea grafică a procesului de denaturare termică a ADN însoţit de efectul hipercrom este redată în figura 2.21.

c) **Renaturarea şi hibridarea.** Dacă soluţia de ADN în prealabil denaturată suferă un proces de **răcire lentă** cele două catene polinucleotidice disociate în prealabil, se pot recombina şi astfel se reconstituie complet structura dublu elicoidală a macromoleculei de ADN, cu conservarea proprietăţilor biologice ale acesteia. Procesul denumit **renaturarea ADN** implică **recombinarea** corectă a bazelor complementare şi restabilirea orientării antiparalele a catenelor polinucleotidice.

Dacă însă soluţia de ADN denaturată este supusă unei **răciri rapide** catenele polinucleotidice separate sub efectul temperaturii **nu se** mai **pot recombina**, iar macromoleculele de ADN rămân **ireversibil denaturate**.

Proprietatea ADN de a se renatura stă la baza tehnicii de **hibridare**; una din cele două catene ale ADN separate prin denaturare termică se pot recombina cu o catenă de ARN obţinându-se astfel o macromoleculă **hibridă ADN-ARN** cu o structură dublu elicoidală.

Condiţia necesară şi suficientă pentru realizarea macromoleculei hibride este ca secvenţa de baze azotate din catena ADN monocatenar să fie strict **complementară** cu secvenţa de baze azotate din catena ARN iniţial, cu precizarea că **uracilul** din ARN va ocupa poziţia corespunzătoare **timinei** din catena ADN. In procesul replicării ADN se formează un asemenea hibrid cu viaţă scurtă.

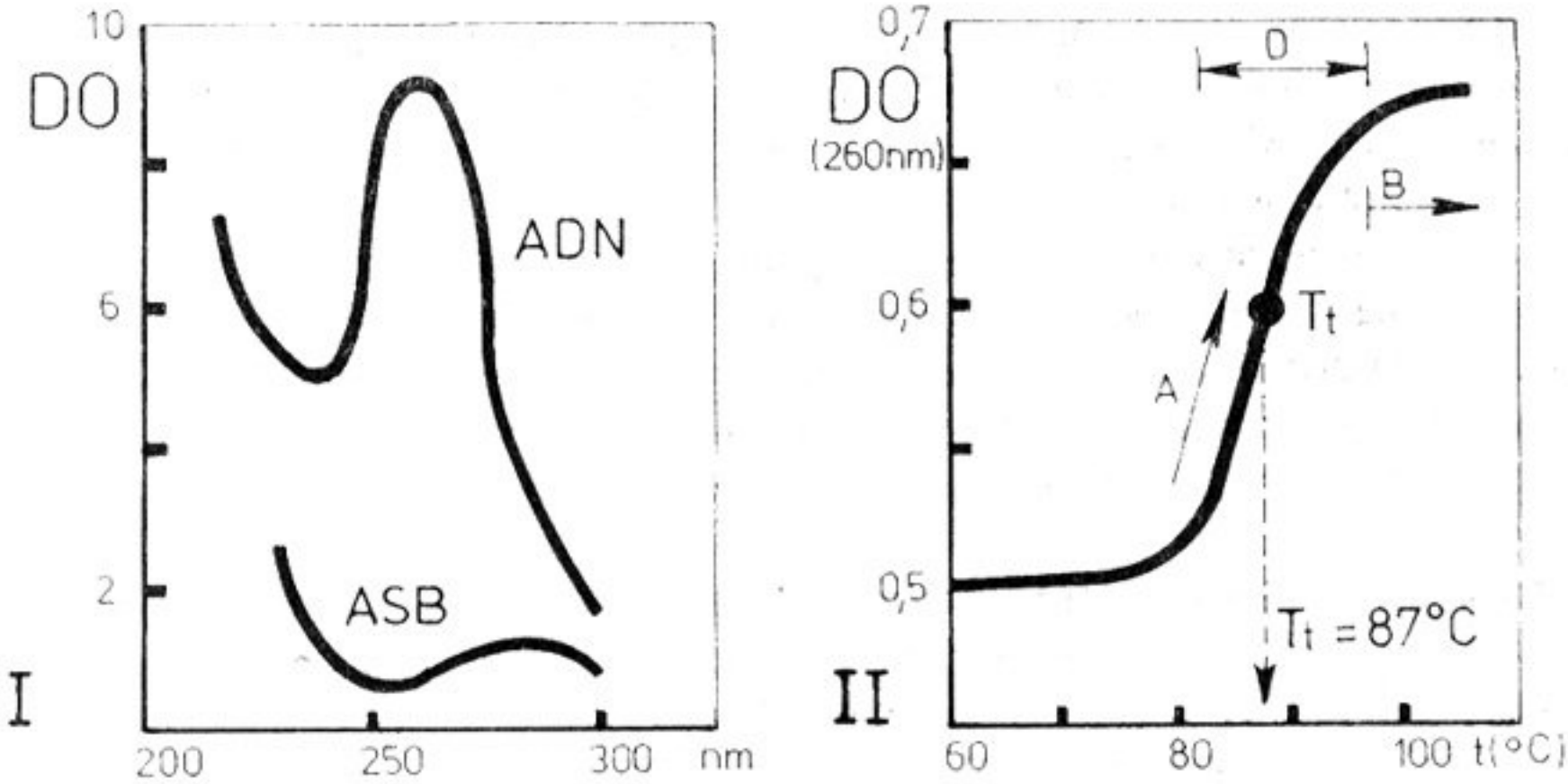


Fig.2.21 **Ilustrarea efectului hipocrom şi hipercrom al ADN**

Procesul de hibridare poate avea loc şi între macromoleculele de ADN având proveniențe diferite, cu condiţia strictă să fi fost în prealabil denaturate termic şi ulterior supuse unei răciri lente.

Acest tip de hibridizare a permis posibilitatea testării experimentale a gradului de complementaritate între diferite molecule de ADN, precum şi evaluarea relaţiilor dintre diferite organisme. Hibridarea între catena de ADN se realizează numai dacă acestea provin de la acelaşi organism sau de la organisme mai mult sau mai puţin înrudite filogenetic.

d) **Dimensiuni moleculare ale ADN.** Masa moleculară şi lungimea macromoleculelor de ADN se caracterizează prin valori remarcabil de mari. Masa moleculară a ADN variază în funcţie de proveniență:
- este de ordinul 10^6-10^9 la virusuri şi bacterii;
- în celulele eucariote atinge valori până la 10^{12}.

Se consideră că la celulele eucariote corespund 2-3 milioane de gene diferite, fiecare genă reprezentând un fragment (~ 1000 perechi de mononucleotide) precis delimitat şi localizat în catenele polinucleotidice ale ADN.

Lungimea macromoleculelor de ADN diferă în funcţie de originea ADN. Astfel bacteria Escherichia are un ADN cu perimetrul de 1,2 mm, în timp ce moleculele de ADN existente în nucleul unei celule animale formează puse cap la cap o panglică lungă de 1 m.

La numărul total de celule existent într-un organism superior (10^{13}) se estimează că lungimea ADN-ului total ar depăşi distanţa Terra - Soare ($14*10^7$ km)(după M.Şerban). Aceste dimensiuni cosmice demonstrează gradul extraordinar de **compactizare** al **materialului genetic** în nucleul unei celule.

e) **Hidroliza enzimatică a ADN.** Catenele nucleotidice ale ADN pot fi scindate prin hidroliză enzimatică sub acţiunea unor **endo** şi **exonucleaze**. Produşii de hidroliză ai endonucleazelor sunt oligodeoxiribonucleotidele.

Hidroliza enzimatică completă a acestora se realizează în prezenţa unor exonucleaze denumite **fosfodiesteraze**; produşii de scindare rezultaţi sunt deoxiribonucleotide.

2.6.2.13 Acizii ribonucleici

Acizii ribonucleici sunt polinucleotide care iau naştere prin policondensarea ribonucleotidelor (oza componentă fiind riboza).

Structura primară a ARN este similară celei a ADN, rezultând prin asamblarea celor patru ribonucleotide principale: AMP, GMP, CMP şi UMP. Pe lângă bazele clasice în compoziţia tipurilor de ARN intră o serie de baze atipice **minore**, rezultate prin metilări, tiolări, hidrogenări, izomerizări ale bazelor majore.

Conţinutul în adenină, este diferit de cel de uracil şi de asemenea nici cel de guanină nu este egal cu cel de citozină, astfel încât moleculele de ARN sunt **monocatenare** dar prezintă şi **porţiuni dublu helicoidale** acolo unde o permite complementaritatea bazelor azotate. Porţiunile de baze necomplementare din structura ARN sunt expulzate ca bucle în afara zonelor de dublu helix, ceea ce conferă moleculei aspectul de **"ac de păr"**.

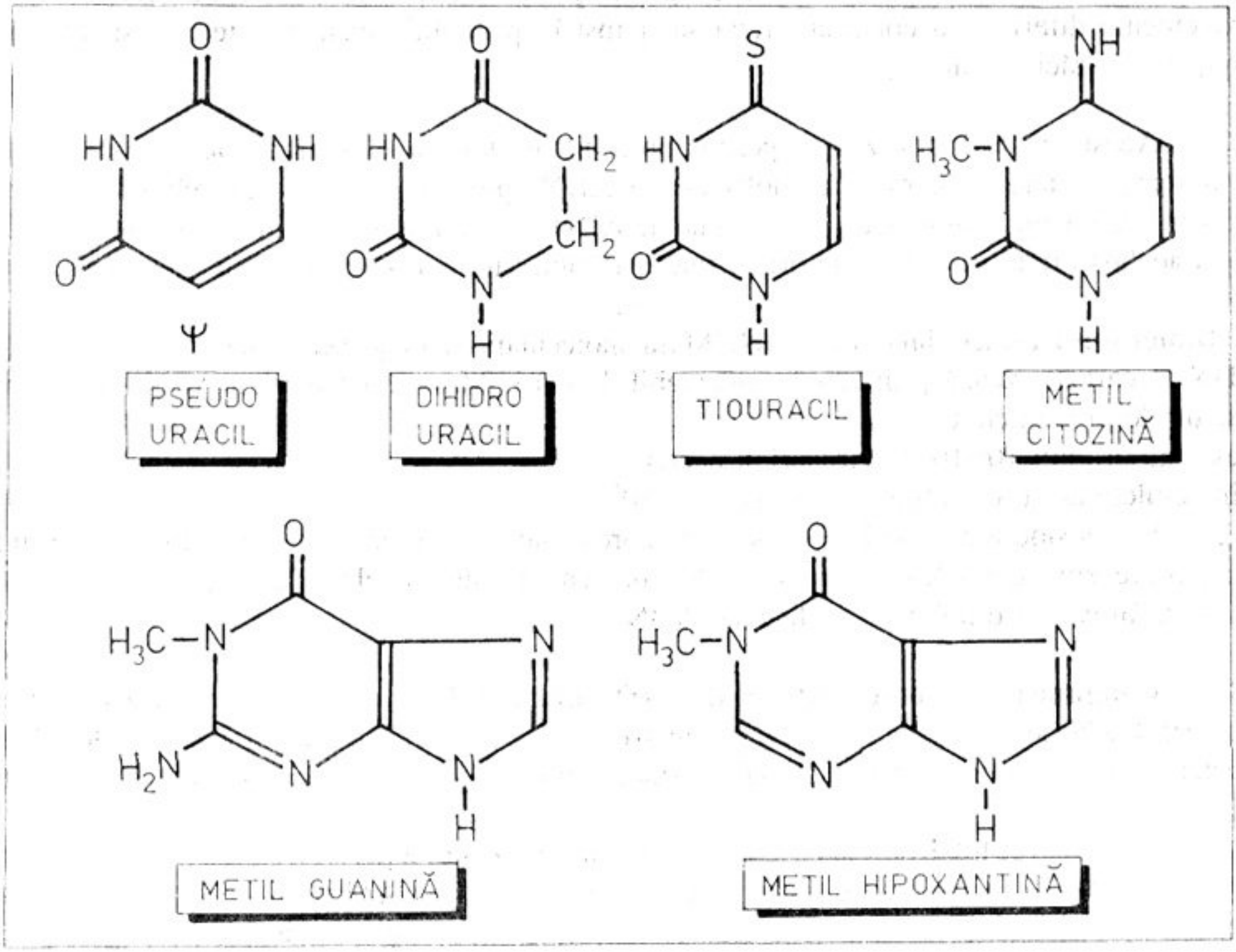


Fig.2.22 **Structura unor baze minore din compoziţia ARN**

In funcţie de intensitatea procesului de biosinteză a proteinelor, cantitatea de ARN spre deosebire de cea de ADN, variază de la o celulă la alta şi chiar în cadrul aceleiaşi celule. Orice tip de celulă, dispune de trei tipuri majore de ARN, care rezultă din copierea integrală sau parţială a secvenţei de ADN, pe baza unui mecanism molecular denumit **transcripţie**. Aceste tipuri de ARN sunt considerate ca **elemente de legătură informaţională** între ADN şi proteine din care cauză au fost denumiţi după rolul pe care-l au în procesul de biosinteză a proteinelor:

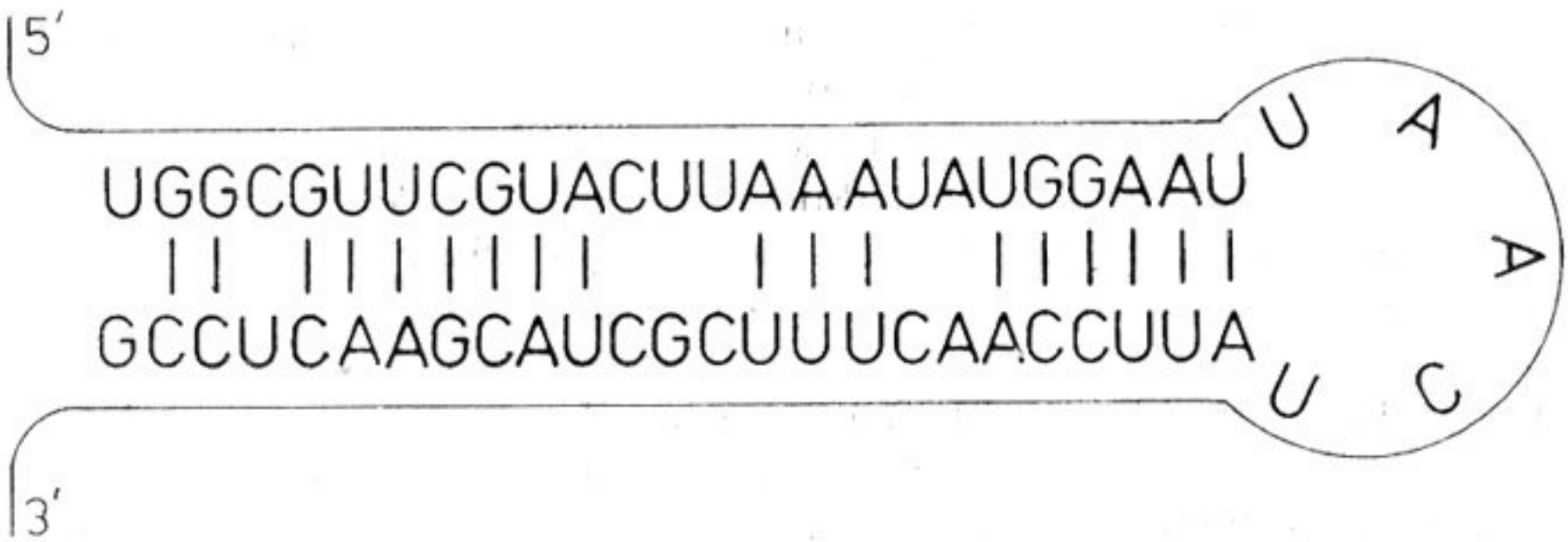


Fig.2.23 **Structura ARN monocatenar**

- ARN mesager (ARNm);
- ARN de transfer sau solubil (ARNt);
- ARN ribozomal (ARNr).

Aceste tipuri de ARN se deosebesc prin anumite caracteristici generale: masă moleculară (M), coeficient de sedimentare (S), compoziţia în baze azotate şi numărul de nucleotide şi procentul de reprezentare.

1 **ARN-mesager (ARNm).** Luând în considerare faptul că molecula de **ADN** este localizată în **nucleu**, iar procesul de biosinteză al proteinelor se desfăşoară în citoplasmă Jacob şi Monod au postulat existenţa unui intermediar care **transmite** mesajul genetic **din nucleu în citoplasmă**. Acest intermediar este un tip de ARN denumit ulterior ARN-mesager, care este sintetizat în nucleu pe matriţa de ADN.

Moleculele de ARNm sunt molecule monocatenare liniare, rezultatul unui proces enzimatic de **transcriere** a secvenţei nucleotidice de pe ADN, cu deosebirea că **timina** din ADN este înlocuită cu **uracil** în ARNm. Rezultă astfel că bazele azotate din secvenţa ARNm sunt complementare cu bazele azotate ale uneia din catenele ADN care funcţionează ca un tipar pentru sinteza din ARNm.

Genele care codifică proteinele sunt întrerupte de secvenţe de ARN **necodificatoare** numite **introni**; secvenţele codificatoare separate prin introni poartă numele de **exoni**.

Segmentul de ADN compus din **exoni** şi **introni** care este transcris într-un ARNm nuclear constituie o **unitate de transcriere**.

Prin procesul de **transcripţie** informaţia genetică codificată în secvenţa de nucleotide a ARN, este transmisă în secvenţa de nucleotide a ARNm.

Funcţia biochimică majoră a ARNm este aceea de a transmite la nivelul ribozomilor citoplasmatici **mesajul** preluat de la **ADN** şi de a servi ca **tipar** (matrice,model) pentru biosinteza proteinelor.

Timpul de supravieţuire a ARNm în celulă este variabil; astfel ARNm bacterian are o viaţă scurtă (2-3 minute), în timp ce ARNm la eucariote are o viaţă de ordinul orelor. După ce serveşte la sinteza câtorva zeci de proteine este degradat de nucleaze.

ARN de transfer (ARNt). Acizii ribonucleici de transfer sunt poliribonucleotide cu molecule mai mici decât ARNm (70-90 nucleotide) sunt monocatenare şi au un procent de **baze complementare** mai mare decât alte specii de ARN. Raportul A + G/U + C este aproximativ egal cu 1.

Speciile moleculare de ARNt sunt solubile în citoplasmă şi neasociate cu proteinele. O trăsătură caracteristică tipurilor de ARNt este existenţa unui număr mare de baze atipice "**baze minore**".

Se presupune că aceste baze intervin în stabilizarea conformaţiei ARNt favorizând interacţiunile între acele segmente ale catenei poliribonucleotidice care sunt complementare şi care apar ca regiuni spiralate.

ARNt prezintă o conformaţie lobată de "**foaie de trifoi**" având patru zone de perechi complementare şi patru necomplementare, expulzate ca bucle (vezi fig.2.24).

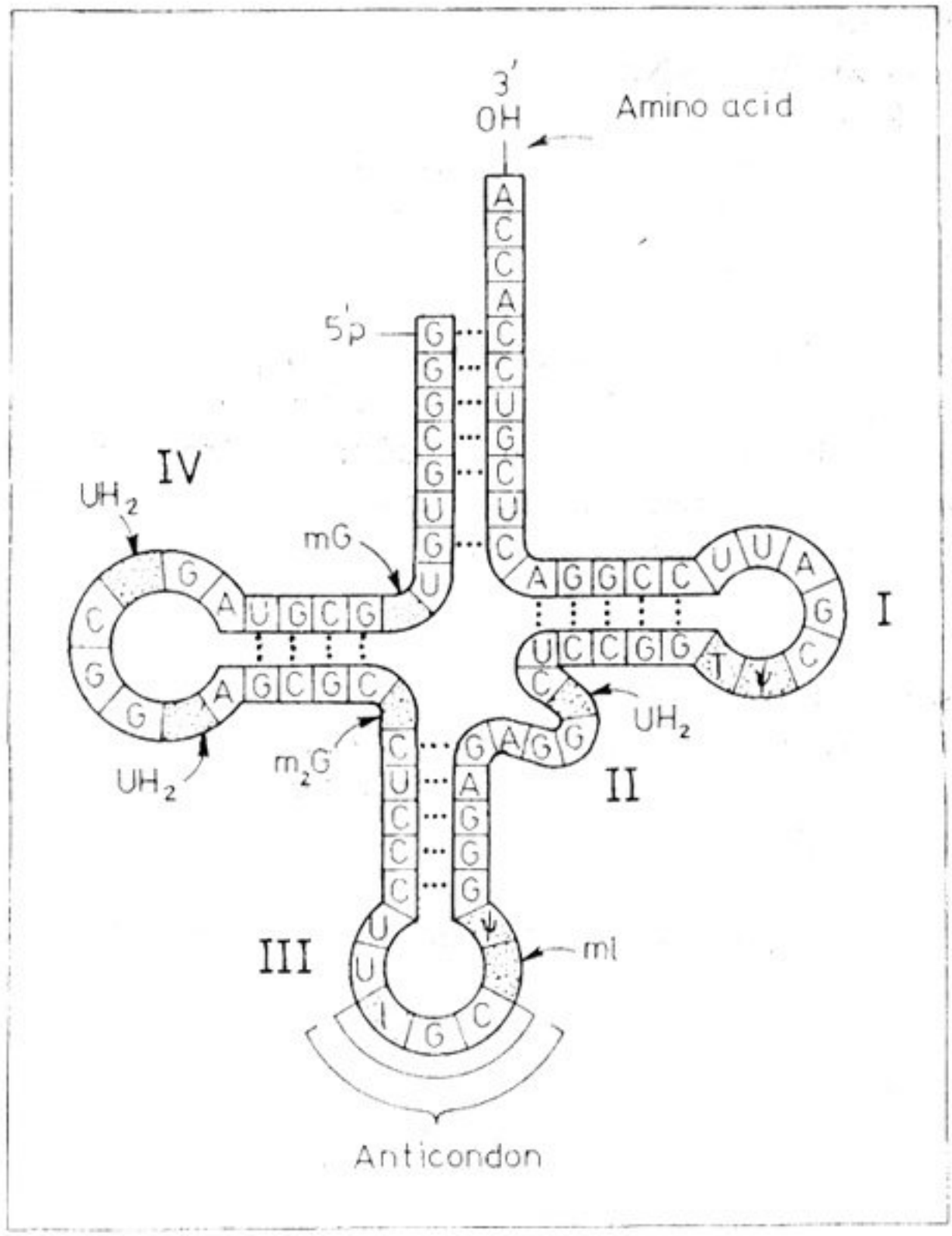


Fig.2.24 **Structura tridimensională a ARNt**

La capătul 5'terminal cei mai mulţi ARNt au restul **acid guanilic**, iar la capatul 3' toţi au secvenţa nucleotidică **-CCA**.

Funcţia biochimică a ARNt constă în legarea specifică a diferiţilor aminoacizi liberi din citoplasmă şi transferul individual al acestora la nivelul ribozomilor.

Pentru fiecare din cei 22 de aminoacizi din molecule de peoteine există cel puţin un ARNt specific. ARNt funcţionează ca **izoacceptori** pentru diferiţi aminoacizi şi totodată ca molecule **adaptor** care ordonează fiecare aminoacid într-o secvenţă precisă în molecule de proteine pe baza recunoaşterii mesajului genetic **(informaţional)** conţinut în secvenţa de nucleotide a ARNm.

Legarea aminoacidului se face la restul adenilic din secvenţa CCA şi constă în stabilirea unei legături esterice formând **complexul aminoacil- ARNt**.

La capătul buclei inferioare se găseşte aşa numita zonă **anticodon** (o secvenţă de trei nucleotide) care variază în funcţie de natura ARNt. Porţiunea **anticodon** din ARNt este complementară succesiunii de nucleotide din ARNm denumită **codon** ce codifică aminoacidul transportat de ARNt şi ca atare cele două regiuni pot stabili legături de hidrogen.

In lobul I există o anumită secvenţă nucleotidică care asigură legarea la ribozom a complexului Aminoacil-ARNt. In lobul IV există o secvenţă nucleotidică care recunoaşte şi se leagă specific la **aminoacil-ARNt-sintetază** enzimă care **încarcă** ARNt cu un aminoacid specific activat.

ARN ribozomal constituie tipul de ARN cel mai abundent (75% din totalul ARN celular) şi cel mai stabil din punct de vedere metabolic. Macromoleculele de ARN sunt flexibile şi deformabile care conţin zone **dublu catenare** întrerupte de zone **monocatenare**.

Acizii ribonucleici ribozomali nu se găsesc în stare liberă ci agregaţi cu proteine diverse şi lipide constituind particule ribonucleoproteice denumite **ribozomi** (descoperiţi de George Palade laureat al Premiului Nobel 1975). Aceştia sunt particule citoplasmatice (agregate multimoleculare) localizate pe reticulul endoplasmatic şi conţin 65% acizi ribonucleici şi 35% proteine.

Ribozomii constituie sediul biosintezei proteinelor; aceste unităţi mecanochimice permit conlucrarea ARNm, ARNt, ARNr în vederea desfăşurării procesului de sinteză a proteinelor. Astfel ribozomii au rolul de a contribui la traducerea mesajului adus de la ADN de către ARNm, mesaj care comandă modul de înlănţuire a aminoacizilor în proteinele biosintetizate.

Structural, fiecare ribozom este un dimer format din două subunităţi care diferă între ele prin coeficientul de sedimentare (S). Ansamblul format din mai mulţi ribozomi la care se află ataşat ARNm constituie un **polizom**. Legarea subunităţii mari (60S) la complexul ARNm-subunitate mică (40S) determină formarea **ribozomului funcţional**. ARNm şi ribozomii se pot deplasa unul în raport cu celălalt, ribozomul glisând pe ARNm.

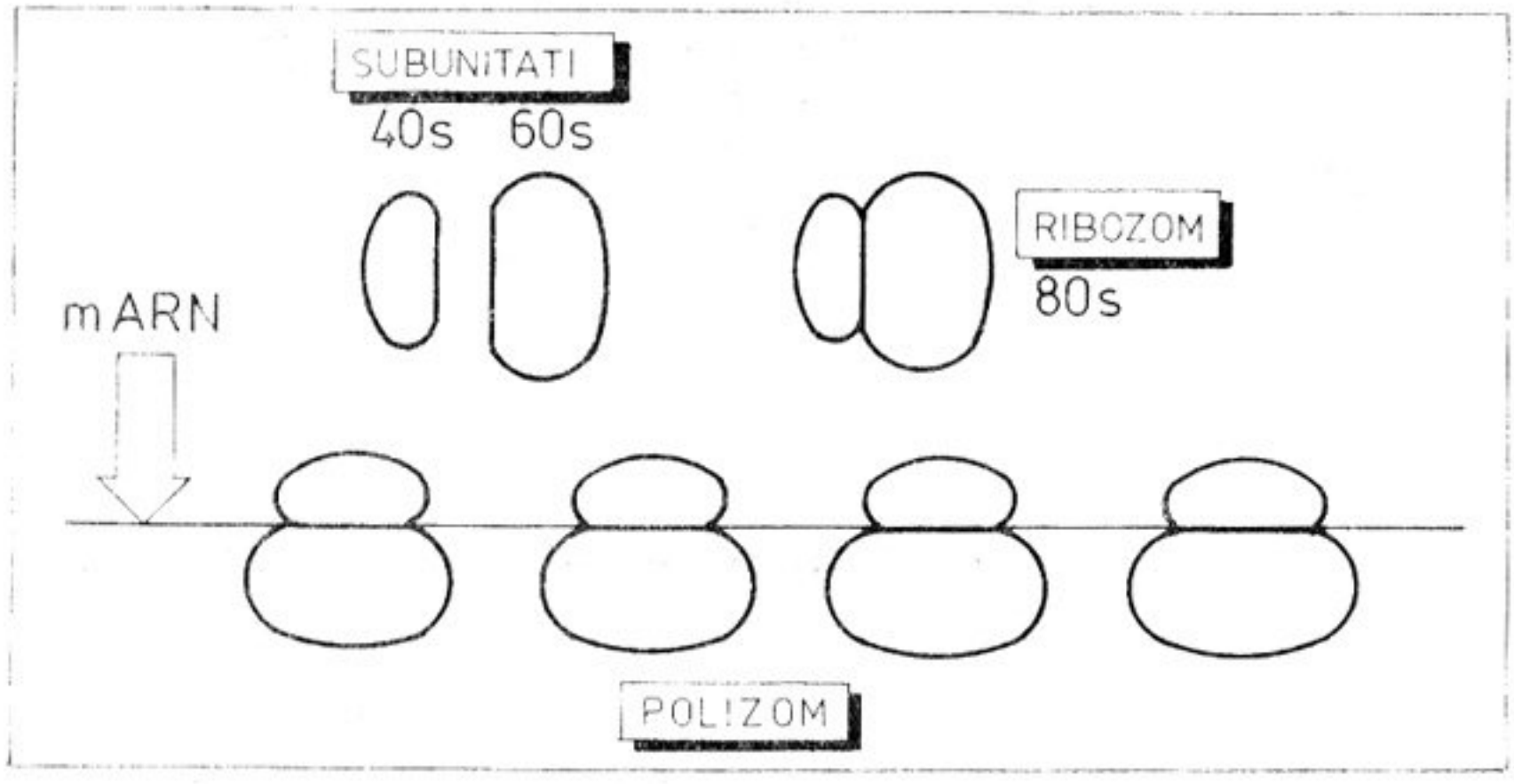


Fig.2.25 **Reprezentarea schematică a subunităţilor unui ribozom 80S şi ale unui polizom**

Ribozomii din celulele eucariote au mase moleculare de ordinul 10^6 şi un coeficient de sedimentare de 80S; disociază în două subunităţi (40S şi 60S) care constau din specii moleculare diferite de ARNr.

ARNr din fiecare unitate ribozomală este combinat cu un număr diferit de tipuri de proteine (fig.2.26).

Subunităţile ribozomale se află într-un echilibru de **asociere-disociere** reglat la nivel celular de factori de natură proteică:

$$80S \underset{Mg^{2+}}{\overset{Na^+\ K^+}{\rightleftharpoons}} 40S + 60S$$

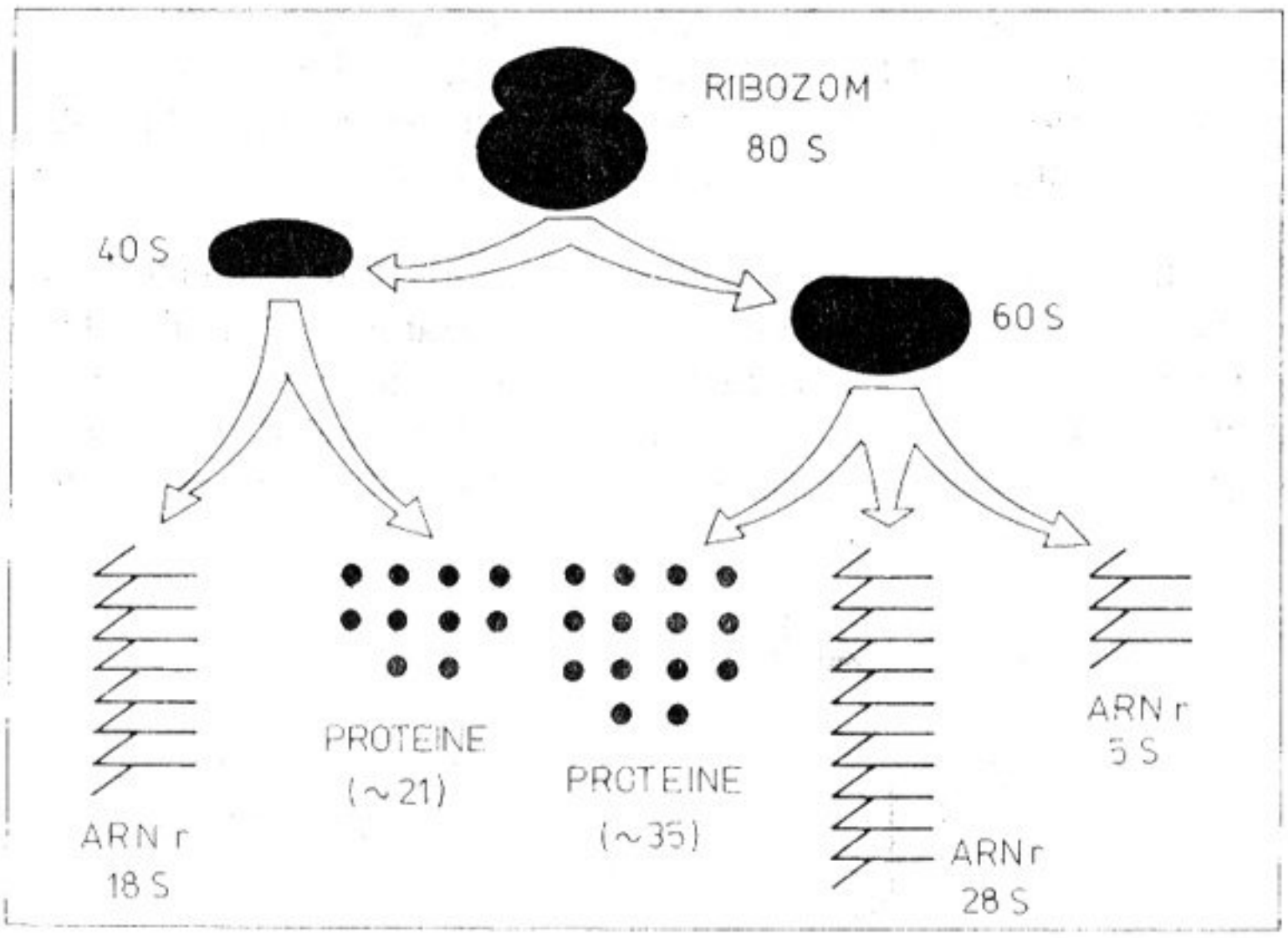


Fig.2.26 **Schema combinării speciilor moleculare din ARNm cu diferite proteine** (după M.Şerban)

Astfel ARNr din subunitatea 40S este combinat cu **21** tipuri de **proteine**, iar ARNr din subunitatea 60S este combinat cu **35** tipuri de **proteine** diferite şi toate au un **caracter bazic**.

Acestor proteine ribozomale li se atribuie un rol în mecanismul de traducere a mesajului genetic adus de ribozomi de către ARNm precum şi asigurarea funcţionalităţii şi conformaţiei fiecărui ribozom.

Proteinele ribozomale participă la modificările conformaţionale în cursul biosintezei proteice, proces în care atât lanţul polipeptidic format cât şi catena ARNm trebuie să fie translocate de-a lungul ribozomului.

Din acest punct de vedere, ribozomii pot fi consideraţi ca **sisteme mecanochimice** din aceeaşi categorie de biostructuri ca actomiozina din muşchi.

Tabela 2.8 **Caracteristici generale ale tipurilor de ARN**

Caracteristica	ARNm	ARNt	ARNr		
			I	II	III
Coeficient de sedimentare	6-25	4	5	18	28
Masă moleculară	$25*10^3$-$1*10^6$	$20-30*10^3$	$3,5*10^4$	$5,5*10^5$	$1,1*10^6$
Număr de nucleotide	75-3000	75-90	100	1500	3100
Specii moleculare	10^2-10^3	60	3		
Structură	Monocatenă liniară	Monocatenă parţial dublu elicoidală	Monocatenă pliată neordonată		
Repartiţie celulară	Citoplasmă	Citoplasmă	Citoplasmă		
% din total ARN	5	10-20	75-80		

2.6.2.14 Acizii nucleici virali

Baltimore, Dulbeco şi Temin au primit premiul Nobel pentru medicină în anul 1973 pentru studiul virusurilor.

Virusurile sunt considerate **complexe supramoleculare** cu o organizare tridimensională, constituite din **acizi nucleici** şi **proteine specifice**.

Considerate a fi situate la limita dintre viu şi neviu, nu posedă un metabolism propriu care să le poată conferi atributul de organism viu.

Toate virusurile inclusiv bacteriofagii (virusuri ale bacteriilor) sunt nucleoproteine formate dintr-o componentă **ADN** sau **ARN** ca material genetic şi o **componentă proteică**. Acizii nucleici virali sunt înconjuraţi de un înveliş (capsida) constituit din agregate de subunităţi proteice specifice numite **capsomere**; componenta proteică reprezintă astfel o anvelopă al cărui miez îl formează ADN sau ARN.

Acidul nucleic specific fiecărui tip de virus prezintă două caracteristici:
- este purtătorul proprietăţii **infectante potenţiale**;
- este **purtătorul informaţiei genetice** responsabilă pentru autoreplicarea virusului în celula infectată.

Acidul nucleic viral este codificat atât pentru replicarea sa cât şi pentru sinteza învelişului său specific de molecule proteice, înveliş care este esenţial pentru completarea structurii particulei virale.

In funcţie de tipul acidului nucleic pe care îl conţin, virusurile se clasifică - din punct de vedere chimic - în două categorii: **virusuri ADN** (herpes, tumori maligne) şi **virusuri ARN** (gripă, poliomielită,SIDA). Acizii nucleici virali - fie ADN, fie ARN - conţin codificat programul informaţiei genetice şi se comportă ca nişte cromozomi virali.

Având un aparat genetic propriu, virusurile pătrunse într-o celulă gazdă, pot deturna cursul normal al proceselor de biosinteza ale celulei, pe care o obligă astfel să sintetizeze cu precădere componentele moleculare ale particulei virale invadate, în detrimentul componentelor specifice ale celulei. In asemenea condiţii ADN sau ARN virali se ataşează la ribozomii celulei gazdă, manifestând prioritate în competiţia cu ARNm al acestei celule.

Acidul nucleic viral, care a ocupat la concurenţă cu ARNm al celulei gazdă, situsurile active de pe suprafaţa ribozomilor, acţionează ca un tipar pentru biosinteza proteinelor învelişului viral, precum şi a unor enzime necesare pentru părţile componente ale virusului.

Prin acest mecanism, acidul nucleic viral induce transcripţia secvenţei sale într-un ARNm complementar, determinând ulterior traducarea mesajului viral pentru formarea de proteine specifice virusului, aceste proteine se asamblează cu acidul nucleic viral producând noi particule virale. In acest fel, virusul se replică de multe ori într-un ritm rapid acţionând în celula respectivă ca un cromozom de control.

Procesul biochimic al multiplicării virale în celula infectată şi al dereglării functionării normale a acesteia se desfăşoară în trei etape:

1 - biosinteza acidului nucleic viral;
2 - biosinteza proteinelor virale specifice;
3 - autoasamblarea structurii virusului.

Aceste procese sunt reglate de însăşi cromozomul viral.

Structura virusurilor a fost stabilită prin microscopie electronică şi difracţia cu raze X. Studiul virusurilor şi mecanismul multiplicării virale au permis alegerea şi aplicarea unei chimioterapii antivirale adecvate şi eficiente.

3 ENZIME

3.1 Consideraţii generale

3.1.1 Generalităţi. Istoric

Toate procesele biochimice care au loc în organismele vii sunt guvernate de substanţe de natură proteică - **enzime** care au rolul de **catalizatori**.

Aceşti catalizatori biologici - **biocatalizatori** - se încadrează în definiţia clasică dată de Ostwald, conform căreia "catalizatorii" sunt agenţi care afectează viteza unei reacţii chimice şi care rămân neschimbaţi la sfârşitul reacţiei.

Dată fiind importanţa acestor substanţe, se poate spune că foarte mult din istoria biochimiei reprezintă istoria concepţiilor despre enzime.

Principiile esenţiale ale catalizei enzimatice sunt cunoscute şi utilizate de mai bine de două milenii. Obţinerea vinului, înăcrirea laptelui, macerarea cărnii -acestea sunt doar câteva procese care au loc sub acţiunea unei forţe magice, pe care alchimiştii arabi o numeau "**aliksir**".

Prima relatare despre enzime ne parvine din sec. XVII, când Van Helmont descoperă că la arderea cărbunelui, fermentarea mustului şi respiraţie se degaje acelaşi gaz, pe care-l denumeşte "gaz silvestrae", iar agentul care provoacă transformarea substanţelor în cursul acestui proces a fost numit "**fermentus**".

Un secol mai târziu, Rëaumur şi Spallanzani (1762) fac primele observaţii cu privire la acţiunea sucului gastric asupra cărnii. Lavoisier şi Gay Lussac au arătat că din fermentaţia glucozei, un alt proces enzimatic complex, rezultă numai alcool etilic si CO_2.

Enzimologia constituie un domeniu al biochimiei care se ocupă cu studiul enzimelor sub raportul structurii, mecanismelor de acţiune şi al participării lor la procesele metabolice.

Un lung şir de cercetători şi-au înscris numele în descoperirea, separarea şi caracterizarea a peste 2000 de enzime şi care au făcut din Enzimologie, unul din marile capitole ale biochimiei moderne (vezi tabela 3.1).

3.1.2 Caracteristici generale ale enzimelor

Denumirea de cataliză a fost introdusă în ştiinţă de Berzelius şi dezvoltată apoi de către Ostwald. Cataliza reprezintă fenomenul de modificare a vitezei de reacţie accelerându-i desfăşurarea prin introducerea în sistemul de reacţie a unor substanţe numite catalizatori, care deşi participă în proces şi influenţează viteza lui, rămân nemodificate chimic la sfârşitul reacţiei. Din punct de vedere al naturii fazei sau a sistemului pe care-l formează reactanţii şi catalizatorul se disting două tipuri principale de cataliză: omogenă şi heterogenă.

Cataliza omogenă se caracterizează prin faptul că atât reactanţii, cât şi catalizatorul constituie împreună o fază omogenă şi este caracteristică mediilor biologice.

Cataliza heterogenă se caracterizează prin aceea că reactanţii şi catalizatorii constituie un sistem polifazic heterogen. In general enzimele se încadrează în grupa **catalizatorilor microeterogeni**.

1.01.129

Tabela 3.1 **Date importante în istoria Enzimologiei**

Anul	Numele cercetătorilor	Descoperirea, observaţia
1833	Payen şi Persoz	Descoperă diastaza capabilă să hidrolizeze amidonul.
1834	Th. Schwann	Descoperă pepsina în stomacul animalelor.
1837	J. Liebig şi F. Wöhler	Descoperă emulsina care hidrolizează amigdalina.
1856	Claude Bernand	Descoperă tripsina în sucul pancreatic.
1860	Louis Pasteur	Prezintă teoria vitalistă. Cercetează fermentaţia alcoolică, fermentaţia acetică, oţeţirea vinului.
1878	W. Kühne	Introduce termenul de enzime.
1894	Emil Fischer	Descoperă specificitatea enzimatică.
1897	E. H. Büchner	Extrage zimaza din Sacharomyces cerevisiae
1902	Brown şi Henry	Studiul cineticii enzimatice.
1913	Michaelis - Menten	Cinetica enzimatică.
1926	J. B. Summer	Separă ureaza cristalizată din soia.
1929	Fiske - Subarow	Izolează fosfocreatina din muşchi.
1937	G. Cori	Studiază glicogen fosforilaza.
1943	A. Green, G. Cori	Cristalizează fosforilaza musculară.
1951	Lynen, Ochoa	Izolează enzimele complexului acid gras sintetaza.
1961	Jacob, Monod, Changeux	Studiază enzimele allosterice.
1965	D. C. Phillips	Stabileşte modelul spaţial al lizozimului.
1969	Merrfield, Gutte	Sinteza în laborator a primei enzime: ribonucleaza.
1971	Lynen, Stadtman	Sisteme multienzimatice în reglarea metabolismului intermediar.

Din punctul de vedere al teoriei catalizei, enzimele se pot caracteriza prin următoarele trăsături generale:

◆ - acţionează în cantităţi extrem de mici, dar manifestă o acţiune extrem de intensă, fiind cei mai eficienţi catalizatori;

◆ - nu se consumă şi nu se transformă în reacţiile catalizate;

◆ - catalizează numai reacţii termodinamic posibile, adică reacţii care corespund unei diminuări a energiei libere;

◆ - orientează şi măresc viteza reacţiilor biochimice determinând scăderea energiei de activare a moleculelor de substrat asupra cărora acţionează;

◆ - nu modifică starea finală de echilibru a reacţiilor, ci măresc numai viteza cu care se

realizează această reacţie;

♦ - într-o reacţie reversibilă care conduce la o stare de echilibru, enzima accelerează numai cele două viteze de reacţie (1 şi 2) care evoluează simultan şi în sens invers determinând astfel atingerea mai rapidă a stării de echilibru;

$$A + B \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} C + D$$

♦ - enzimele se disting printr-o specificitate a funcţiei catalitice, determinând atât mecanismul de producere a unui anumit tip de reacţie, cât şi capacitatea de a recunoaşte un substrat sau o grupă limitată de substanţe;

♦ - asigură coordonarea, reglarea şi controlul proceselor biochimice şi participă la reglarea metabolismului celular.

3.1.3 Nomenclatura şi clasificarea enzimelor

Nomenclatura şi clasificarea enzimelor au fost precizate pe baza criteriilor stabilite de către Comisia de enzime a Uniunii Internaţionale de Biochimie (I.U.B.).

Clasificarea enzimelor se bazează pe un sistem numeric codificat, fiecare enzimă fiind identificată printr-un număr de ordine şi un nume sistematic.

Conform acestei clasificări, sistemele enzimatice cunoscute până în prezent, pot fi împărţite în funcţie de tipul reacţiilor pe care le catalizează, în şase clase; **prima cifră** indică deci **clasa** de care aparţine o enzimă.

1. Oxidoreductaze
2. Transferaze
3. Hidrolaze
4. Liaze
5. Izomeraze
6. Ligaze (Sintetaze)

Fiecare din aceste clase are un număr mai mare de subclase, care la rândul lor se vor diviza în clase secundare (sub - subclase) după specificul de cataliză şi după natura substratului catalizat.

A doua cifră indică deci **subclasa** care furnizează unele detalii asupra mecanismului de reacţie la care participă o anumită enzimă.

A treia cifră indică **sub-subclasa** şi furnizează detalii suplimentare asupra reacţiei catalizate de o anumită enzimă.

A patra cifră indică **poziţia** pe care o deţine o enzimă în subclasa respectivă.

Numele sistematic indică: a) natura donatorului; b) natura acceptorului; c) tipul de reacţie catalizată.

Codul este precedat de abrevierea EC (Enzyme Comission); ex: alcool dehidrogenaza EC 1.1.1.1.

Notarea cu patru cifre serveşte ca sistem de codificare pentru aparatele de calcul electronic.

I - **Oxidoreductazele** - sunt sisteme enzimatice care catalizează reacţii de tip redox, caracterizate prin transfer de hidrogen sau electroni.

II - **Transferazele** - catalizează reacţii de transfer prin care o parte din molecula unui substrat numit donor, este cedată unui alt substrat numit acceptor.

$$R_1 - A + R_2 - B \rightleftharpoons R_1 - B + R_2 - A$$

III - **Hidrolazele** - sunt enzime care catalizează scindarea hidrolitică a substratului sub acţiunea apei.

Tabela 3.2 **Clasificarea enzimelor (extras orientativ)**

1. **Oxidoreductaze**
   - 1.1 - Acţionează asupra grupării >CH - OH
   - 1.2 - Acţionează asupra grupării >C = O
   - 1.3 - Acţionează asupra grupării >CH - CH<
   - 1.4 - Acţionează asupra grupării >CH - NH_2
   - 1.5 - Acţionează asupra grupării >C = NH
   - 1.6 - Acţionează asupra NADH sau NADPH

2. **Transferaze**
   - 2.1 - Transferă grupări monocarbonate.
   - 2.2 - Transferă grupări aldehidice sau cetonice.
   - 2.3 - Transferă grupări acil.
   - 2.4 - Transferă grupări glicozil.
   - 2.5 - Transferă grupări alchil.

3. **Hidrolaze**
   - 3.1 - Hidrolizează esterii carboxilici.
   - 3.2 - Hidrolizează tioesterii.
   - 3.3 - Hidrolizează esterii monofosforici.
   - 3.4 - Hidrolizează legături peptidice.
   - 3.5 - Hidrolizează alte legături C - N

4. **Liaze**
   - 4.1 - Scindează legături >C - C<
   - 4.2 - Scindează legături >C = C<
   - 4.3 - Scindează legături >C = N-
   - 4.4 - Scindează legături >C - S-
   - 4.5 - Scindează legături >C - X
   - 4.6 - Scindeaza legături P - O

5. **Izomeraze**
   - 5.1 - Racemaze şi epimeraze.
   - 5.2 - Izomeraze cis-trans.
   - 5.3 - Oxidoreductaze intramoleculare.
   - 5.4 - Transferaze intramoleculare.
   - 5.5 - Liaze intramoleculare.

6. **Ligaze**
   - 6.1 - Formare de legături C - O
   - 6.2 - Formare de legături C - S
   - 6.3 - Formare de legături C - N
   - 6.4 - Formare de legături C - C
   - 6.5 - Formare de legături esterice fosfat

IV - **Liazele** - catalizează scindarea moleculelor de substrat la nivelul legăturilor C-C, C-O, C-N, -C-S, fără intervenţia moleculelor de apă.

$$R_1 - C - C - R_2 \rightleftharpoons R_1 - C - + - C - R_2$$

V - **Izomerazele** - catalizează reacţiile de transformare dintr-o formă izomeră în alta, anumite rearanjări interne în molecula substratului.

$$\text{D - Alanina} \xrightleftharpoons{\text{Alanin racemaza}} \text{L - Alanina}$$

VI - **Ligazele** - enzime care catalizează sinteza a doi reactanţi utilizând ca sursă de energie ATP.

$$A + B + ATP \longrightarrow A - B + AMP + PPi$$

Acest sistem de clasificare are marele avantaj că o enzimă nou descoperită poate fi încadrată şi codificată fără a modifica esenţial poziţia celorlalte enzime.

In tabela 3.2 sunt prezentate clasele şi principalele subclase ale clasificării actuale ale enzimelor.

In terminologia internaţională, pe lângă denumirea ştiinţifică impusă prin sistemul de clasificare internaţională, pentru diferite enzime se utilizează denumiri empirice uzuale. Astfel, denumirea multor enzime rezultă prin adăugarea sufixului - ază la numele substratului asupra căruia acţionează enzima. De exemplu, enzima arginază are ca substrat arginina, ureaza are ca substrat ureea, lactaza are ca substrat lactoza, etc.

Aceste denumiri comune sunt utilizate în paralel cu denumirile ştiinţifice stabilite prin sistemul actual de clasificare.

3.1.4 Localizarea intracelulară a enzimelor

In interiorul celulei, enzimele prezintă o distribuţie topografică specifică, fiind localizate în diferite compartimente - organite celulare şi citoplasmă.

Separarea prin ultracentrifugare a organitelor celulare, urmată de identificarea prin tehnici histochimice a constituit metodologia de bază, prin care s-a putut stabili localizarea intracelulară a enzimelor.

Deoarece unele căi metabolice au loc în toate tipurile de celule, enzimele corespunzătoare au o răspândire generală.

Anumite procese biochimice, cum ar fi biosinteza proteinelor şi a acizilor nucleici, glicoliza şi ciclul acizilor tricarboxilici, sunt universal prezente în celulă, deoarece fiecare celulă îşi sintetizează proteinele şi acizii nucleici proprii producând în acelaşi timp energia necesară tuturor activităţilor. In toate aceste procese intervin seturi de enzime care au răspândire ubiquitară.

Pe de altă parte, fiecare tip de celule dispune de seturi de enzime care catalizează procese metabolice specifice: biosinteza hormonilor tiroidieni are loc numai în tiroidă, biosinteza ureei are loc numai în ficat.

La nivel intracelular, localizarea enzimelor coincide cu locul de desfăşurare al căii metabolice pe care o catalizează.

Astfel, în citoplasmă sunt localizate enzimele care participă în glicoză şi sinteza acizilor graşi. Ureogeneza se desfăşoară parţial în citoplasmă şi parţial în mitocondrie, deci unele enzime ale acestei căi sunt citoplasmatice şi altele mitocondriale.

Mitocondriile care sunt înzestrate cu două membrane se caracterizează printr-o distribuţie foarte complexă a enzimelor (tabela 3.3).

Tabela 3.3 **Localizarea unor enzime în mitocondriile hepatocitelor**

Membrana externă	Membrana internă	Matrix
-Monoaminooxidaza, -Acil C_0A sintetaza, -Fosfolipaza A_2, -Nucleozid difosfat Kinaza.	-NADH dehidrogenaza, -Citocromi(b,c,a_3) -Succinat dehidrogenaza.	-Citrat sintetaza -Izocitrat dehidrogenaza. -Glutamat dehidrogenaza.
Spaţiul dintre membrane	Adenilat ciclaza	

Există şi enzime cu localizare mixtă: aspartat aminotransferază (ASAT = GOT) este localizată 70% în mitocondrie şi 30% în citoplasmă; malat dehidrogenaza (40% în mitocondrie şi 60 în citoplasmă).

Uneori enzimele care catalizează reacţiile unei căi metabolice sunt organizate în complexe multienzimatice: complexul piruvat decarboxilazei, complexul multienzimatic al lanţului respirator, complexul acid gras sintetazei, complexul enzimatic al ureogenezei.

In sistemele multienzimatice, enzimele componente ale sistemului constituie un mozaic organizat, în cadrul căreia fiecare enzimă are o anumită localizare secvenţială, catalizând o reacţie şi permiţând totodată cuplarea reacţiilor care compun secvenţa respectivă.

3.2 Structura enzimelor

3.2.1 Enzime monocomponente şi bicomponente

Enzimele sunt biocatalizatori a căror natură proteică s-a dovedit a fi universală. Singura excepţie o constituie o enzimă din grupul ribonucleazelor - **ribonucleaza P** - care constă din două subunităţi, un ARN şi o proteină, subunitatea catalitică fiind ARN - ul.

Dializa a stabilit că enzimele sunt formate din o parte nedializabilă (proteină) şi o parte dializabilă (grup prostetic).

Conform formulării lui Van Euler:

Holoenzimă = Apoenzimă + Cofactor

Apoenzima şi cofactorul - inactive catalitic ca entităţi separate - formează un complex molecular enzimă-cofactor denumit **holoenzimă**.

Manifestarea proprietăţilor catalitice este rezultanta interacţiunii şi cooperării dintre componenta proteică şi componenta prostetică (**cofactori sau coenzime**).

Aceste enzime sunt heterogene şi bicomponente. Componenta de natură proteică din structura enzimelor conferă acestora specificitatea de substrat, iar gruparea prostetică determină tipul şi viteza de reacţie.

Apoenzima are următoarele caracteristici generale:

◆ - este de natură proteică, termolabilă şi nedializabilă;

- ♦ - în structura sa este localizat situsul catalitic şi situsul allosteric (la enzimele allosterice);
- ♦ - determină legarea substratului la situsul catalitic sau a efectorului la situsul allosteric;
- ♦ - formează complexe enzimă-substrat şi enzimă-cofactor;
- ♦ - imprimă specificitatea de substrat în reacţia catalizată;
- ♦ - manifestă grade diferite de afinitate pentru cofactor;
- ♦ - este susceptibilă de modificări conformaţionale între anumite limite.

Există enzime care reprezintă proteine omogene (holoproteine) fără a avea cofactor sau coenzimă; proprietăţile catalitice sunt exercitate în exclusivitate numai de componenta proteică pe care este localizat situsul catalitic (enzime **monocomponente**).

Aşadar, se poate considera că structura dualistă a enzimelor, deşi foarte larg răspândita, nu poate fi generalizată.

Din categoria enzimelor monocomponente fac parte un număr restrâns de enzime cum ar fi: pepsina, tripsina, chimotripsina, ribonucleaza şi lizozimul.

3.2.2 Situs catalitic. Situs allosferic.

Situsul catalitic - reprezintă o zonă specifică şi delimitată constituită dintr-un număr mic de radicali de aminoacizi.

Aceştia formează o geometrie spaţială perfect ordonată şi structural asimetrică la nivelul căreia se exercită activitatea catalitică a enzimei, prin capacitatea de a interacţiona cu moleculele de substrat asupra cărora acţionează.

Situsul catalitic este localizat în porţiunea internă hidrofobă a moleculei de protein enzimă, iar conformaţia sa structurală caracteristică este determinată şi stabilizată de către conformaţia întregului edificiu molecular al enzimei.

Situsul catalitic include grupări chimice active din radicalii unor aminoacizi (-OH, SH, $-NH_2$, -COOH, imidazol,etc.) care în mod individual sau grupaţi - participă la stabilirea legăturii dintre enzimă şi substrat, determinând reacţia catalitică specifică.

Funcţionalitatea aminoacizilor care constituie situsul catalitic este consecinţa structurii spaţiale a moleculei proţein enzimei, care, prin înfăşurarea sa spaţială, aduce anumiţi radicali ai unor aminoacizi (A,B,C) distanţaţi în secvenţa structurii primare, într-o anumită poziţie apropiată spaţial (2A); această dispunere permite realizarea unui ansamblu de grupări ale aminoacizilor care participă la constituirea situsului catalitic.

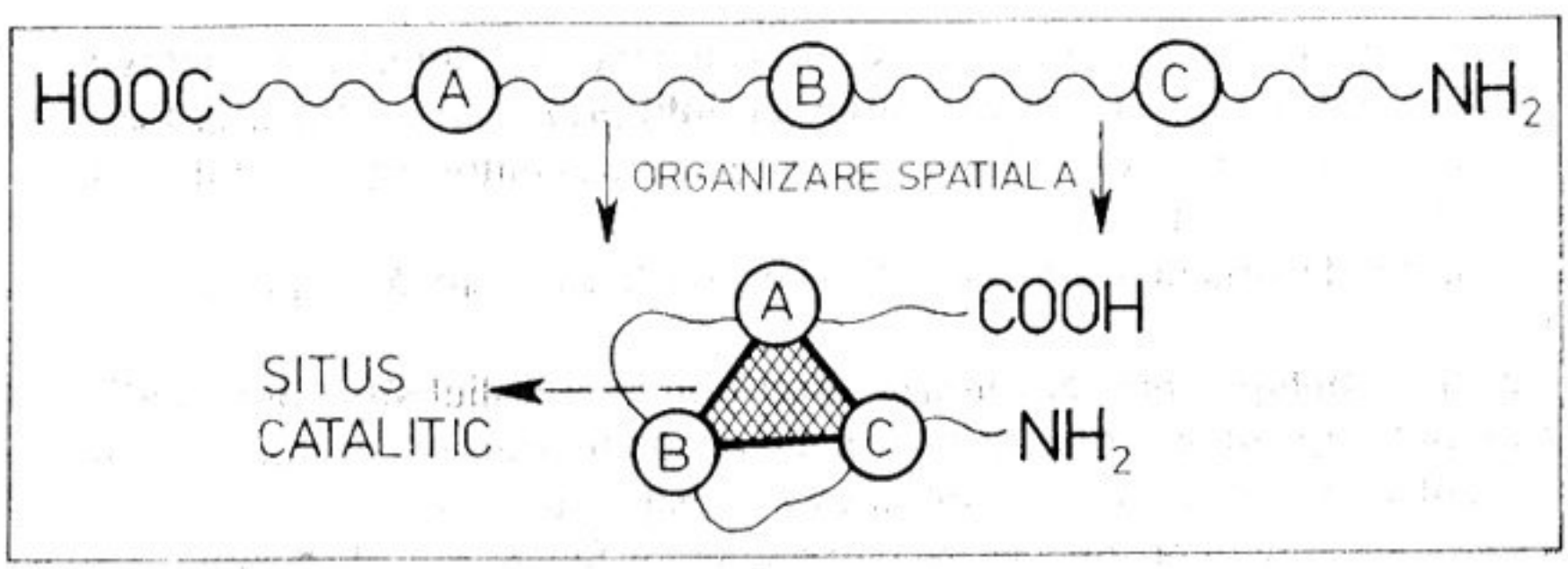


Fig.3.1 **Constituirea situsului catalitic** (după M. Şerban)

Astfel în cazul particular al chimotripsinei - enzimă cu acţiune proteolitică - esenţiale pentru situsul său catalitic sunt ciclul **imidazol** al **histidinei** din poziţia 57, gruparea carboxil

a acidului aspartic din poziţia 102 şi gruparea -OH (a **serinei**) din poziţia 195 a lanţului polipeptidic; ele sunt foarte apropiate în spaţiu ca urmare a configuraţiei specifice a chimotripsinei care realizează un contact intim între gruparea -OH şi nucleul imidazolic prin intermediul unei legături de hidrogen.

Aminoacizii din situsul catalitic deţin un rol decisiv în legarea directă a substratului şi în transformarea sa catalitică.

Radicalii acestor aminoacizi conţin grupări chimice reactive care intervin:

◆ - ca agenţi de **complexare** a substratului cu care stabilesc interacţiuni ionice sau covalente;

◆ - ca **donatori** sau **acceptori** de electroni şi de protoni în mecanismul catalitic de reacţie;

◆ - în stabilirea unei **topografii adecvate** în molecula de enzimă necesară pentru interacţiunea substratului şi coenzimei, ambele fixate la un moment dat pe molecula enzimei.

Geometria spaţială a situsului catalitic este asigurată şi menţinută prin interacţiunea aminoacizilor **structurali** (care determină menţinerea unei conformaţii stabile) şi a celor **auxiliari** care permit o anumită flexibilitate a regiunilor limitrofe situsului catalitic.

Situsul allosteric apare la enzimele oligomere constituite din două sau mai multe unităţi oligomere, denumite enzime **allosterice** şi care au rol de reglare enzimatică. Aşadar în cazul enzimelor allosterice apar două situsuri, unul **catalitic** şi altul **allosteric** (fig.3.2).

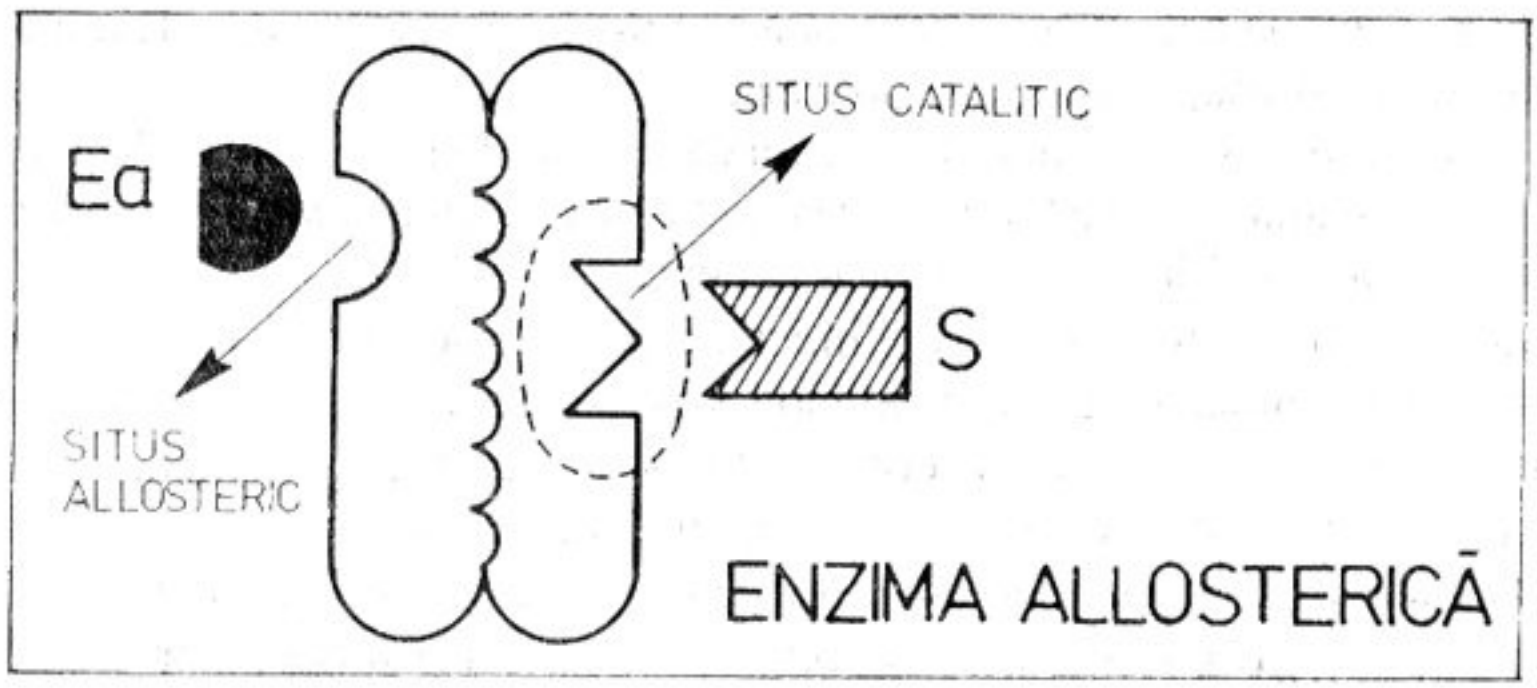


Fig.3.2 **Structura enzimelor allosterice**

In aceste mecanisme de reglare prin interacţiuni allosterice intervine cu rol determinant un **efector allosteric** (**activator** sau **inhibitor**) care se leagă la locul allosteric şi modulează tranziţiile moleculei de enzimă între diferite conformaţii posibile pe care acesta le poate lua (vezi cap.3.3).

In funcţie de structura lor moleculară, enzimele îşi exercită proprietăţile catalitice în mod diferit.

Enzimele **holoproteine** acţionează direct prin intermediul **situsului catalitic**, în timp ce enzimele **heteroproteine** vor acţiona prin intermediului situsului catalitic şi al unor factori enzimatici indispensabili pentru manifestarea activităţii catalitice.

Centrul catalitie reprezintă ansamblul regiunilor funcţionale ale enzimei care participă efectiv la reacţia catalitică.

In cazul enzimelor holoproteine ce nu necesită pentru activitatea lor catalitică prezenţa unui factor, centrul catalitic este sinonim cu situsul catalitic.

centrul catalitic = situsul catalitic

In cazul enzimelor heteroproteine, care necesită pentru activitatea lor catalitică şi prezenţa unor cofactori:

Centrul activ = situs catalitic + cofactor

3.2.3 Cofactorii enzimatici

Cofactorii enzimatici sunt micromolecule de natură chimică foarte diferită şi indispensabili pentru manifestarea activităţii catalitice a enzimelor bicomponente. Deoarece adeseori în loc de cofactor se utilizează termenii de coenzimă sau grupare prostetică s-au făcut recent următoarele precizări:

- termenul "**cofactor**" se va utiliza pentru totalitatea compuşilor neproteici din structura heteroenzimelor;
- termenul "**coenzimă**" se va utiliza numai pentru componentele neproteice de natură organică care se leagă prin legături foarte slabe de apoenzime;
- termenul "**grupare prostetică**" este utilizat tot pentru cofactori de natură organică, dar care se leagă de apoenzime prin legături puternice.

Cofactorii pot fi deci: a) **derivaţi de la vitamine**; b) **derivaţi de la hem**; c) **trifosforibonucleotide**; d) **ioni metalici**.

Cofactorii prezintă următoarele caracteristici generale:

- ♦ - sunt termostabili şi dializabili;
- ♦ - unii sunt uşor disociabili de apoenzimă şi alţii sunt legaţi intim de apoenzimă;
- ♦ - determină specificitatea de reacţie, respectiv tipul mecanismului de reacţie pe care o catalizează enzima.

Cofactorii intervin în mecanismul general de acţiune astfel:

- ♦ prin introducerea unei conformaţii optime, necesare interacţiunii enzimei cu substratul;
- ♦ asigurarea dispunerii enzimei şi substratului într-un aranjament spaţial adecvat, prin situarea cofactorului în vecinătatea situsului catalitic şi a substratului;
- ♦ participarea cofactorului la reacţia enzimatică prin acceptare şi transfer de electroni, atomi sau grupări chimice de la un substrat la altul.

Coenzimele (vezi tabela 3.4) reprezintă micromolecule organice care se ataşează temporar la enzime şi sunt uşor disociabile de acestea.

Principalele tipuri de coenzime sunt:

- ♦ coenzime derivate de la vitamine,
- ♦ coenzime de tip heminic,
- ♦ coenzime de tip nucleozid polifosfaţi.

Există câteva sute de hidrogenaze - dehidroganaze a căror coenzimă este NAD^+. Datorită legăturilor foarte slabe între coenzima NAD^+ şi diversele apoenzime, un număr mare de hidrogenaze - dehidrogenaze pot acţiona simultan într-un compartiment celular utilizând o cantitate restrânsă de coenzimă, chiar în condiţiile în care coenzima se consumă în fiecare reacţie în proporţie egală cu substratul (coenzimele se numesc "al doilea substrat").

Trecerea cu uşurinţă a coenzimei de pe o apoenzimă pe alta asigură vitezele corespunzătoare pentru un număr important de oxido-reduceri celulare: este explicabil de ce în celule, cantităţile de NAD^+ sunt reduse, în raport cu multitudinea şi intensitatea reacţiilor care au loc.

Un exemplu similar îl reprezintă piridoxal fosfatul (PALPO) care este coenzimă a

TABELA Nr.3.4.

EXEMPLE DE COENZIME SI FUNCTIILE LOR

COENZIMĂ	TIPUL DE REACTIE	GRUPARE TRANSFERATĂ	PRECURSOR
I. COENZIME TRANSPORTOARE DE HIDROGEN SI ELECTRONI			
-Nicotinamid Adenin Dinucleotid (NAD^+)	Oxidoreducere	H	Vitamină PP
-Nicotinamid Adenin Dinucleotid Fosfat ($NADP^+$)	Oxidoreducere	H	Vitamină PP
-Flavin Mononucleotid (FMN)	Oxidoreducere	H	Vitamina B_2
-Flavin Adenin Dinucleotid(FAD)	Oxidoreducere	H	Vitamină B_2
-Coenzime heminice	Oxidoreducere	Electroni	Citocromi
II. COENZIME TRANSPORTOARE DE GRUPARI FUNCTIONALE			
-Tiamin Pirofosfat (TPP)	Transfer acil	$R-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$	Vitamină B_1
-Piridoxal Fosfat (PALPO)	Transaminare	$-NH_2$	Vitamină B_6
-Biotină	Transfer CO_2	CO_2	Biotină
-Acid Tetrahidrofolic (FH_4)	Transfer unitati monocarbonate		Acid Folic
-Coenzimă A	Activare Acil	$R-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$	Acid pantotenic
-Acidul Lipoic	Transfer Acil	$R-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$	Acid Lipoic
-Deoxiadenozil Cobalamina	Izomerizari	$-CH_3$	Vitamină B_{12}
-Dolicolfosfat	Transfer grupari monozaharidice	Manoză Glucoză Glucozamină	-
III. NUCLEOZID POLIFOSFATI			
-Adenozin trifosfat (ATP)	Fosforilare	$-OPO_3H_2$	-
-Uridin difosfat (UDP)	Biosinteza Glucidelor	Glicozil	-
Citidin trifosfat (CTP)	Biosinteza fosfolipidelor	Gliceridă conjugată	-

aminotransferazelor şi care în cursul reacţiilor îşi revine la forma iniţială după parcurgerea secvenţelor corespunzătoare transformării a două substrate.

La multe enzime cofactorii sunt ioni metalici (metalo enzime) care se leagă de componenta proteică (apoenzima) prin legături electrostatice. S-a ajuns la concluzia că resturile aminoacizilor care eliberează protoni (acizii aspartic, glutamic şi serina) sau care au atomi de azot cu electroni neparticipanţi constituie liganzii pentru ionii metalici.

In reacţiile catalizate de metaloenzime, ionii metalici îndeplinesc de la caz la caz următoarele roluri:

- stabilizează structura enzimei,
- participă la legarea substratului,
- induc unele modificări în conformaţia enzimei,
- participă nemijlocit în cataliză (unele reacţii de oxido-reducere).

Există enzime omoloage localizate în compartimente diferite ale aceluiaşi tip de celule care conţin ioni diferiţi, exemplu superoxiddismutaza extrasă din mitocondrii conţine Mn^{2+}, iar cea extrasă din citosol conţine Cu^{+}, Zn^{2+}.

Unele enzime necesită pentru activitatea lor simpla prezenţă în mediu a anumitor ioni; exemplu Ca^{2+} este utilă pentru activitatea lipazelor.

Există şi enzime a căror activitate este dependentă de prezenţa unor anioni: amilaza salivară necesită prezenţa ionilor de Cl^{-}.

In tabela 3.5 sunt prezentate unele enzime cu ionii pe care îi conţin sau ionii a căror prezenţă este necesară activităţii lor.

Tabela 3.5 **Enzime metal dependente**

Enzime	Ioni
Citocromi Peroxidaze Catalaze	Fe^{2+}, Fe^{3+}
Alcooldehidrogenaza Anhidraza carbonică Carboxipeptidaza	Zn^{2+}
Citocromoxidaza Tirozinaza Ascorbicoxidaza	Cu^{+}, Cu^{2+}
Fosfataze Fosfotransferaze	Mg^{2+}
Peptidaze Arginaza	Mn^{2+}
Xantinoxidaza Nitratreductaza	Mo^{2+}
Piruvatfosfokinaza Adenozintrifosfataza Piruvat Kinaza	K^{+} Na^{+} K^{+}, Mg^{2+}

3.2.4 Mecanismul de acţiune al enzimelor

Referitor la mecanismul interacţiunii dintre enzimă şi substrat, s-au emis mai multe ipoteze dintre care vom prezenta următoarele:

3.2.4.1 Ipoteza tip "lacăt-cheie"

Modelul clasic al structurii spaţiale a centrului activ în raport cu structura substratului este acela de "lacăt-cheie", propus de Emil Fischer. Modelul postulează existenţa unei **complementarităţi** reciproce între geometria moleculei de substrat (S) şi geometria situsului catalitic al enzimei (E).

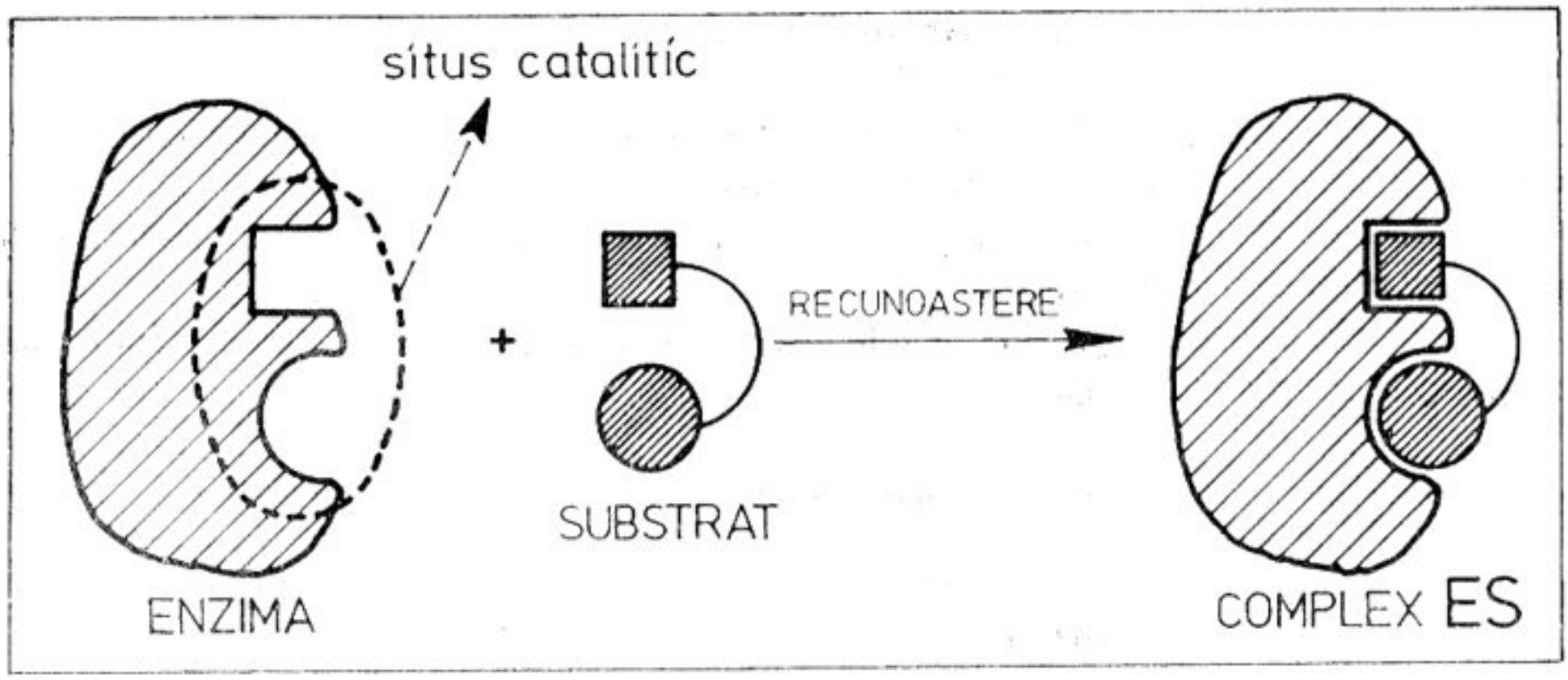


Fig.3.3 **Compatibilitatea dintre enzimă (E) şi substrat (S)**

Dispunerea riguroasă a substratului (S) la situsul catalitic creează o compatibilitate prin care se favorizează recunoaşterea de către enzimă a substratului său specific şi formarea complexului binar de tranziţie ES. Molecula de substrat este potrivită riguros în spaţiul situsului catalitic în conformitate cu topografia şi orientarea sa sterică.

Legarea temporară a substratului la situsul catalitic se realizează prin intervenţia a trei tipuri de radicali de aminoacizi care intră în constituţia situsului catalitic şi anume:

- un radical care asigură legarea;
- un radical care induce orientarea sterică;
- un radical care determină activarea substratului.

Astfel, în cazul chimotripsinei: histidina prin nucleul imidazolic asigură **legarea** substratului; serina prin gruparea -OH induce **orientarea** substratului; acidul aspartic produce **activarea** substratului.

Modelul "lacăt-cheie" este rigid, dar plastic şi confirmat pentru cazul specificităţii absolute a unei enzime pentru un anumit substrat; ipoteza nu este adecvată pentru explicarea specificităţii relative a unei enzime pentru un grup mai larg de substraturi.

3.2.4.2 Teoria "ajustării" induse (Koshland)

Modelul lui Koschland este unul din cele mai actuale modele care a primit numeroase confirmări experimentale.

Modelul presupune existenţa unei anumite flexibilităţi a zonei în care se află centrul activ.

Interacţiunea dintre enzimă şi substrat este un proces dinamic şi cooperant, deoarece aproprierea substratului poate induce modificări fine, discrete în conformaţia situsului catalitic care îşi orientează grupările active ale aminoacizilor, astfel încât se realizează configuraţia optimă necesară pentru legarea corectă a substratului.

Inainte de legarea substratului, situsul catalitic se găseşte într-o formă relaxată, iar grupările sale active nu se găsesc în poziţia optimă de fixare a substratului; odată cu legarea substratului, acesta induce o ajustare a situsului catalitic care capătă o poziţie geometrică favorabilă pentru formarea complexului intermediar ES şi transformarea ulterioară a substratului (S) în produs (P).

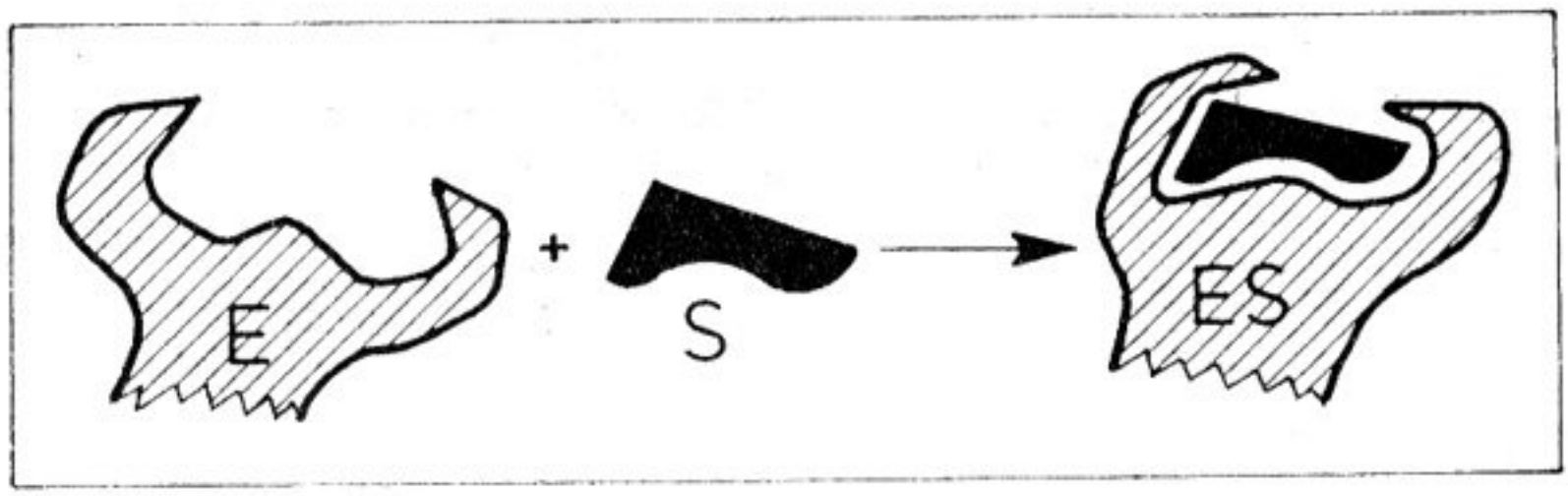


Fig.3.4 **Modelul centrului activ indus al lui Koschland**

Din punct de vedere termodinamic, dispunerea cea mai potrivită a substratului în raport cu enzime, reduce la minimum gradele de libertate în ceea ce priveşte translaţia şi rotaţia substratului, proces care are loc cu **scăderea entropiei**, ceea ce favorizează atingerea uşoară a stării de tranziţie.

Specificitatea sterică şi, în special, inhibiţia competitivă a enzimelor pot fi explicate cu uşurinţă pe baza modelului lui Koschland.

3.2.4.3 Cataliza covalentă

Legarea reversibilă a substratului (S) la situsul catalitic al unor enzime, se poate realiza prin stabilirea de legături covalente cu formarea unui intermediar enzimă - substrat (ES), instabil şi foarte reactiv, care se poate transforma în produsul de reacţie (P) prin scăderea energiei de activare.

Formarea compuşilor intermediari covalenţi devine posibilă prin intermediul unor grupări chimice nucleofile (capabile să doneze electroni) ale următorilor aminoacizi din constituţia situsului catalitic: serina, histidina, lizina, cisteina. Legăturile covalente se stabilesc între aceşti aminoacizi şi substratul de reacţie pe baza unui mecanism care implică atacul nucleofil al grupărilor active din constituţia situsului catalitic la un atom de carbon electrofil din molecula substratului.

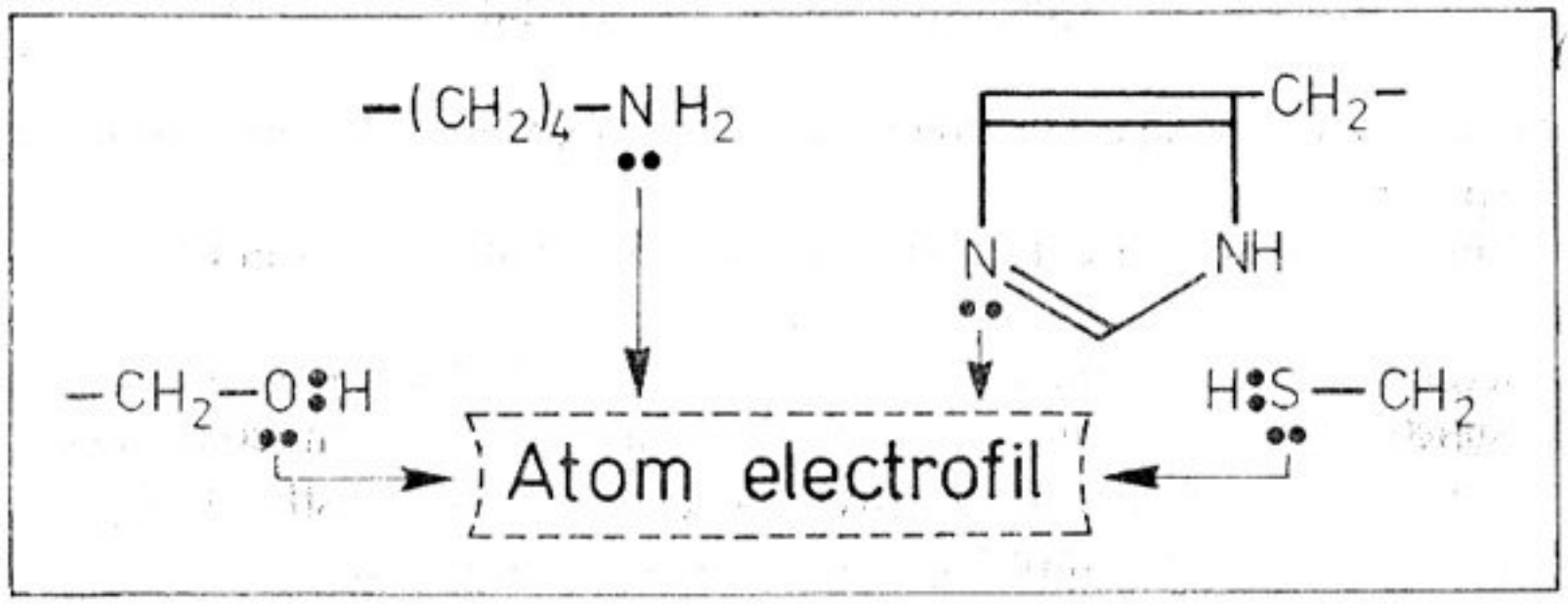


Fig.3.5 **Atacul grupărilor nucleofile din molecula enzimei asupra grupărilor electrofile din molecula substratului**

Mecanismul intim de acţiune al enzimelor bazat pe interrelaţiile substratului cu centrul activ al enzimei,este cunoscut pentru un număr important de enzime.

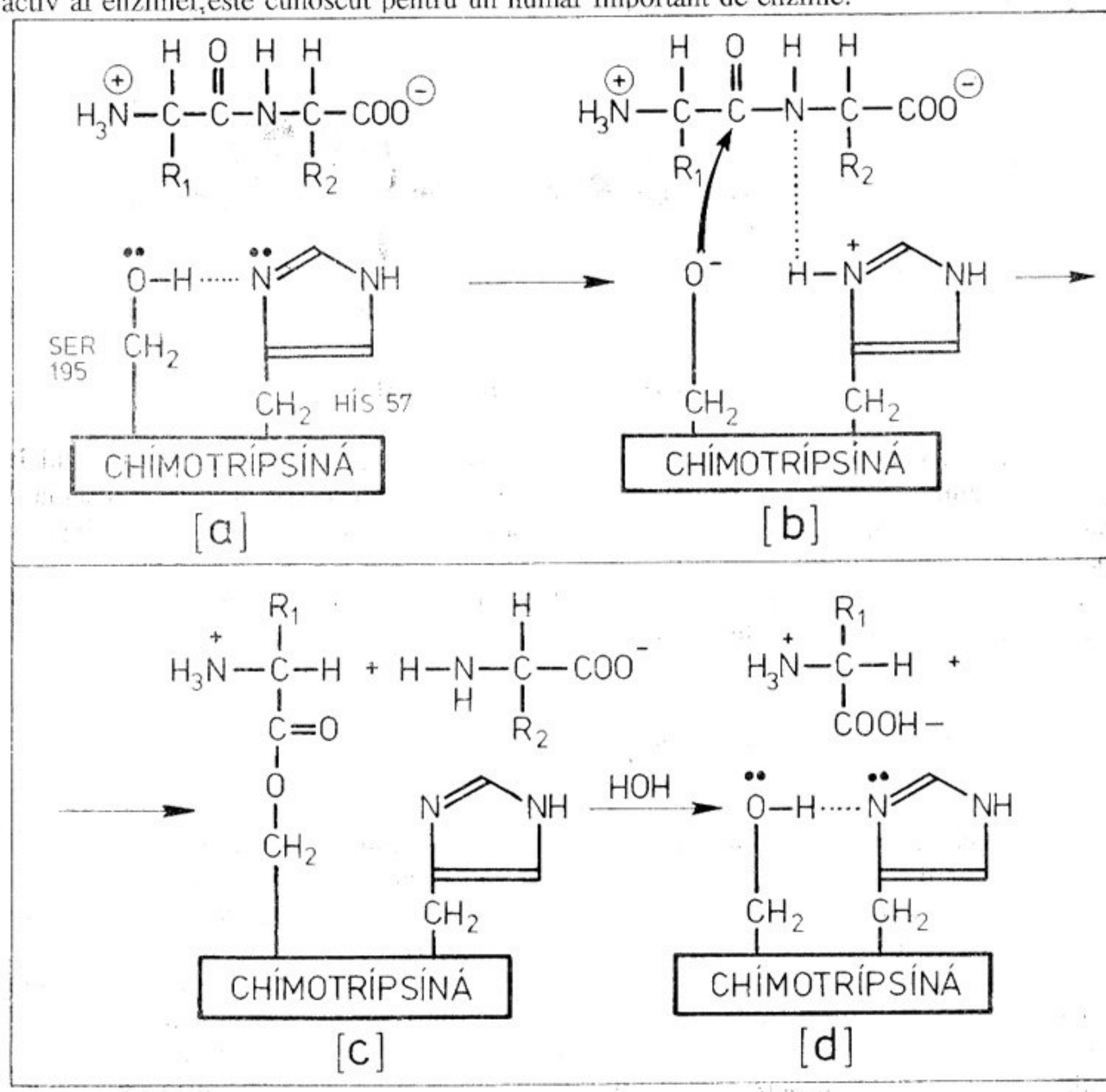


Fig.3.6 **Mecanismul de acţiune al chimotripsinei pentru scindarea hidrolitică a legăturilor peptidice**

Astfel în centrul activ al chimotripsinei sunt implicate restul de **histidină 57** şi restul de **serină 195**, care deşi depărtaţi în lanţul polipeptidic sunt apropiaţi unul de celălalt, având în vedere structura spaţială a enzimei.

Activitatea proteolitică a chimotripsinei este absolut dependentă de prezenţa în centrul catalitic al resturilor de **histidină** şi **serină**, aceşti aminoacizi fiind necesari şi altor enzime cu acţiuna proteolitică (tripsina, pepsina).

Restul moleculei proteice, deşi nu participă direct în procesul de cataliză, are un rol decisiv deoarece acest edificiu există ca o entitate bine conturată.

Formarea intermediarilor covalenţi este posibilă prin intermediul grupărilor nucleofile (-OH serinic şi N- imidazolic) capabile să doneze electroni.

Mecanismul scindării unei legături peptidice sub acţiunea chimotripsinei este prezentat în figura 3.6 şi include următoarele etape:

◆ Hidrogenul de la gruparea -OH a serinei 195 este rapid transferat ca proton pe azotul radicalului imidazolic al histidinei 57.

◆ Protonul formează o legătură de hidrogen cu azotul grupării peptidice a substratului în timp ce -O⁻ al restului de serină atacă nucleofil atomul de carbon al grupării peptidice reprezentând restul carboxilic al aminoacidului angrenat în legătura peptidică.

◆ Intr-o fază intermediară gruparea carbonil a legăturii peptidice (cu restul proteic de care este ataşată) se leagă covalent de serină, în timp ce gruparea îndepărtată este aminoacidul O-terminal al substratului.

◆ Final, restul proteic de la gruparea -OH a serinei este deplasat de apă regenerându-se enzima liberă în starea ei iniţială.

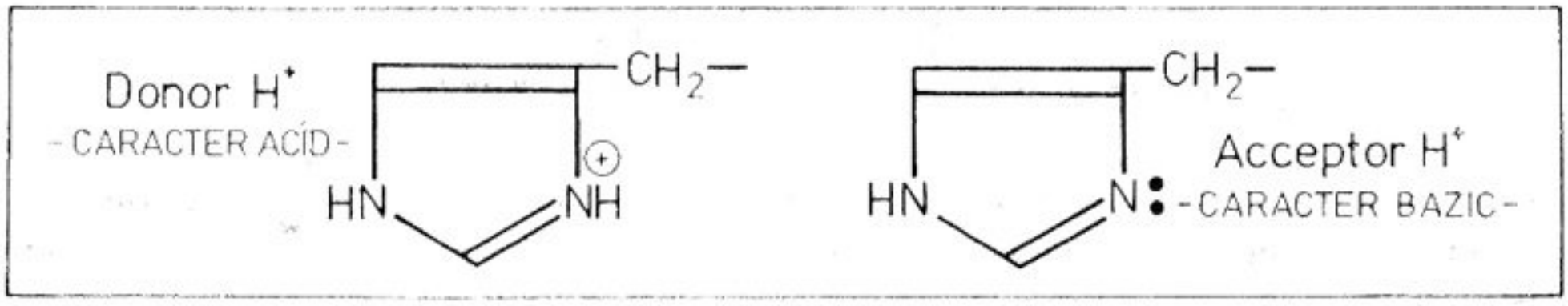
3.2.4.4 Cataliza acido - bazică generală

Majoritatea relaţiilor biochimice care au loc în organismele vii, implică transferări de protoni, fie de la un atom la altul în cadrul aceleiaşi structuri chimice, fie de la un substrat la altul, în cazul reacţiilor bimoleculare.

Deci, în reacţiile catalizate de acizi sau baze generale, catalizatorii funcţionează într-o anumită etapă a ciclului catalitic ca nişte acceptori sau donori de protoni.

Cataliza prin acizi sau baze determină o accelerare a vitezei de reacţie.

Mecanismul catalizei acido-bazice constă în capacitatea enzimelor ca, prin anumite grupări chimice (-COOH, -NH_2, -OH, -SH, ciclul imidazolic) să funcţioneze ca acizi sau ca baze, prin cedare sau acceptare de protoni. De exemplu ciclul imidazolic din histidină prezintă viteze de protonizare şi deprotonizare foarte rapide şi se comportă (la pH adecvat) ca un donor sau acceptor de H^+ participând astfel la cataliza prin acizi şi baze.



Deoarece cele mai multe proteine conţin relativ puţine resturi de histidină, acest aminoacid a fost selecţionat în cursul evoluţiei biologice pentru a juca un rol important în cataliza enzimatică.

Factorii care influenţează eficienţa unui catalizator acido-bazic sunt următorii:

- mărimea vitezei transferului de protoni între catalizator şi substrat;
- gradul de polarizare a legăturii formate între enzimă şi substratul a cărei transformare o catalizează;
- constanta de echilibru pentru formarea complexului ES.

Reacţiile biochimice care decurg prin cataliză generală acido-bazică includ hidroliza unor esteri carboxilici şi fosforici, tautomerizări, izomerizări etc.

3.2.5 Izoenzime

Există enzime care prezintă fenomenul de **polimorfism enzimatic**, existând în mai multe varietăţi sau specii moleculare.

Izoenzimele reprezintă forme moleculare multiple ale unei enzime care catalizează aceeaşi reacţie chimică şi care se întâlnesc nu numai în ţesuturi şi organe diferite, ci chiar în acelaşi organ, ţesut sau lichid biologic dintr-un anumit organism.

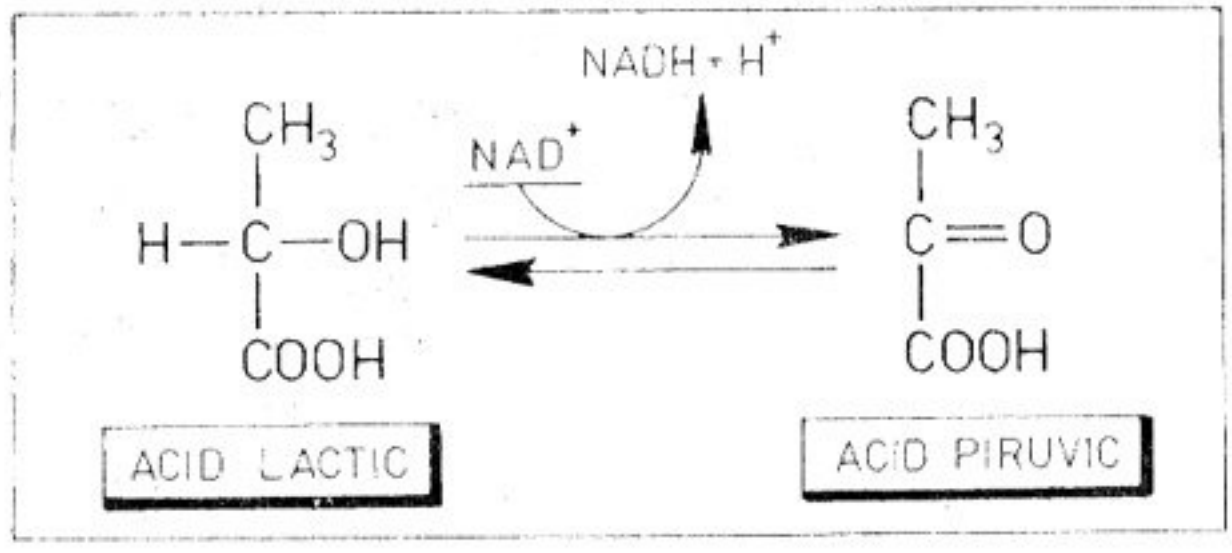
Izoenzimele se pot separa prin mai multe metode, dar în special prin **metoda electroforetică** în gel de agar, agaroză sau poliacrilamidă. Izoenzimele, deşi posedă o activitate catalitică identică manifestând aceeaşi specificitate de substrat, prezintă însă configuraţii spaţiale diferite şi se deosebesc între ele printr-o serie de proprietăţi fizico - chimice diferite:

- - mobilitatea electroforetică;
- - secvenţă aminoacidă;
- - cinetică de reacţie;
- - stabilitate la căldură;
- - comportare faţă de diverşi efectori enzimatici etc.

Izoenzimele sunt considerate ca proteine oligomere, fiind constituite prin asocierea unui număr par de subunităţi analoge denumite protomeri.

Lactat dehidrogenaza (LDH) este una din primele enzime la care s-a constatat existenţa **polimorfismului enzimatic**.

LDH catalizează reacţia de oxido-reducere reversibilă:



LDH se prezintă ca un ansamblu de cinci tipuri de izoenzime separabile electroforetic şi denumite în ordinea descrescătoare a mobilităţilor electroforetice -LDH_1, LDH_2, LDH_3, LDH_4, LDH_5.

S-a stabilit că cele cinci izoenzime sunt tetrameri rezultaţi prin asocierea în moduri diferite a două lanţuri polipeptidice de bază, notate M (de la **muscle** = muşchi scheletic) şi H (de la **heart** = inimă), care sunt determinate genetic, sinteza lor fiind realizată de către două gene distincte.

Prin asocierea tetrametrică în proporţii diferite care compun formele izoenzimatice parentale "pure" $H_4(LDH_1)$ şi $M_4(LDH_5)$, asociere care urmează o distribuţie binominală, se generează trei forme hibride de izoenzime desemnate ca LDH_2, LDH_3, LDH_4 (vezi figura 3.7).

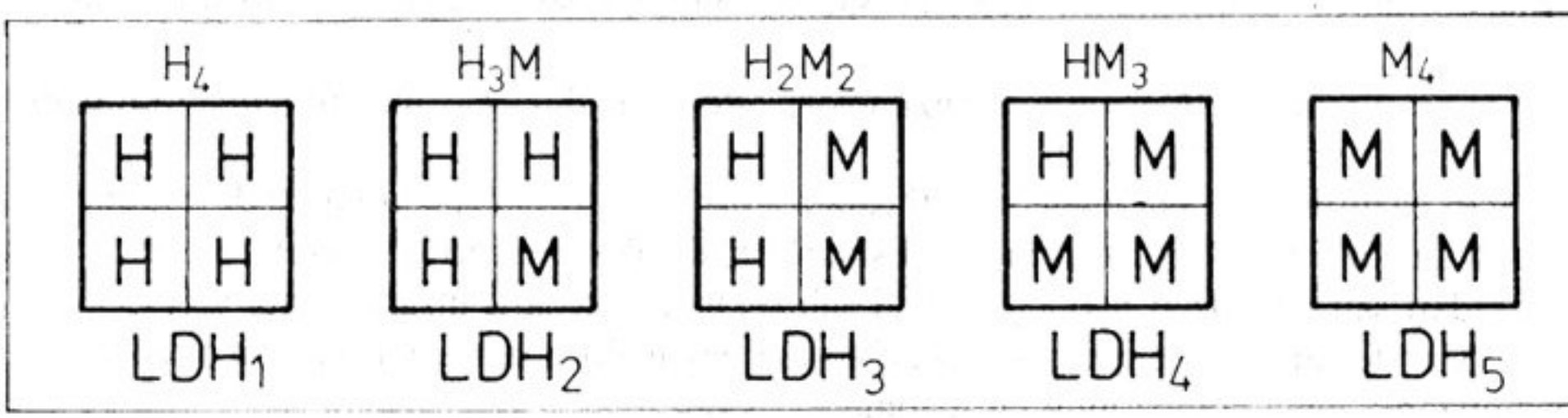


Fig.3.7 **Izoenzimele lactat dehidrogenazei**

Aceste izoenzime pot fi separate electroforetic, obţinându-se zimograme de felul prezentat în figura 3.8.

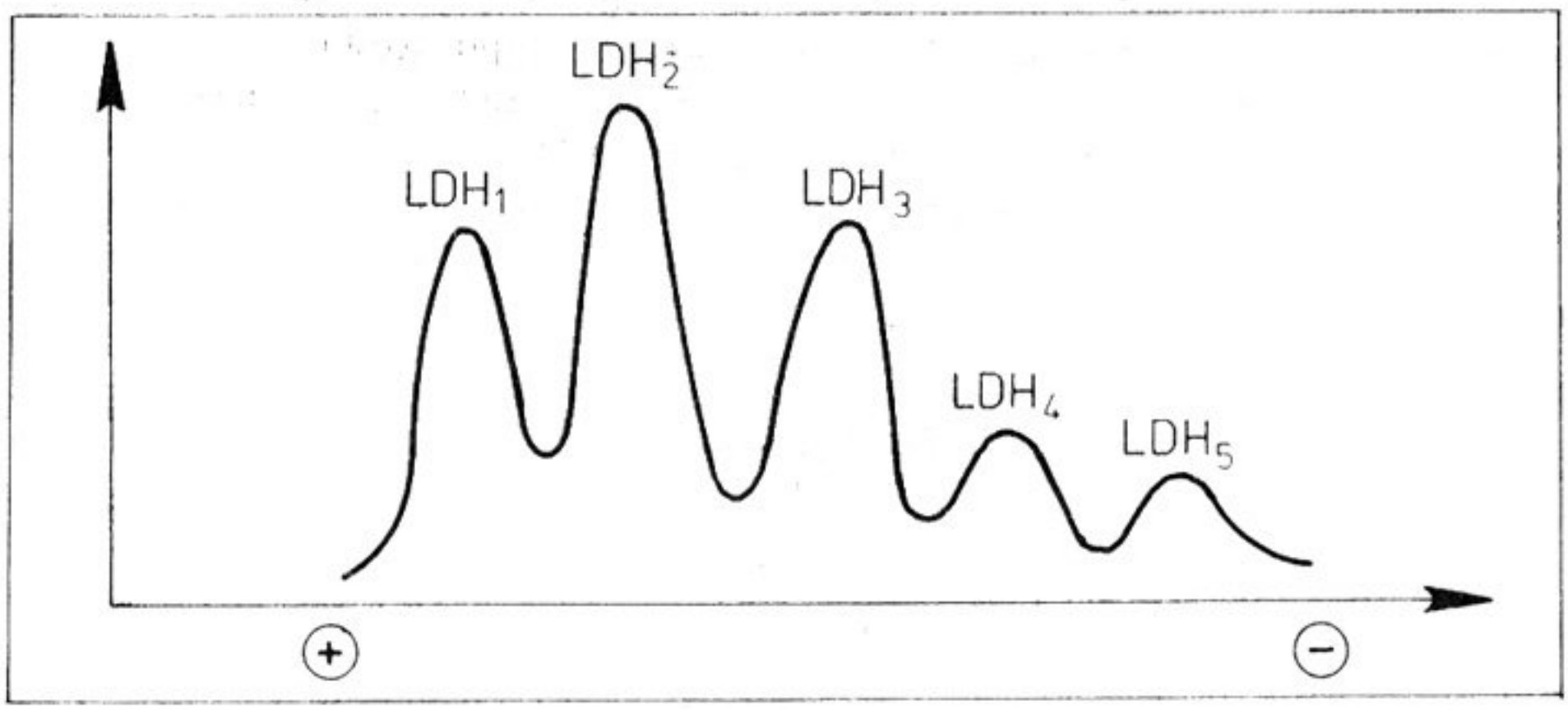


Fig.3.8 **Zimograma lactat dehidrogenazei serice**

In ţesuturile cu profil metabolic aerob (creier, inimă, rinichi) este favorizată sinteza izoenzimelor de tip H(LDH_1 şi LDH_2) în timp ce în ţesuturile cu metabolism anaerob accentuat (muşchi scheletic, ficat) este favorizată sinteza izoenzimelor de tip M(LDH_4, LDH_5).

O altă enzimă care prezintă polimorfism enzimatic este **creatinkinaza** (CK sau CPK) implicată în fosforilarea creatinei; enzima are trei izoenzime care sunt dimeri (M_2, MB, B_2) rezultaţi prin asocierea a două lanţuri de bază **M** şi **B**.

Izoenzimele au o semnificaţie deosebită în reglarea căilor metabolice, în cunoaşterea bazelor moleculare ale morfogenezei şi diferenţierii celulare. Pe lângă această importanţă, determinarea raportului în care se află în ser (zimograma serică) este extrem de utilă în precizarea unor afecţiuni ale ficatului şi inimii.

3.3 Specificitatea enzimelor

Specificitatea de acţiune constituie o caracteristică esenţială a enzimelor care este conferită de partea sa proteică (apoenzima).

Enzimele posedă o înaltă specificitate de substrat deoarece majoritatea lor participă la transformarea unui anumit substrat sau a unui număr limitat de substrate înrudite structural.

Specificitatea de substrat a enzimelor, este unul din cele mai remarcabile atribute biologice care stau la baza vieţii.

In cazul în care enzimele n-ar fi catalizatori cu o strictă specificitate de acţiune şi de substrat, înalta ordine specifică metabolismului ar dispărea, diferiţii constituienţi celulari ar fi degradaţi sau sintetizaţi haotic, punând sub semnul întrebării însăşi esenţa vieţii.

Manifestarea proprietăţilor specifice ale enzimelor, la nivelul celular face posibilă metabolizarea lentă compatibilă cu fenomenele vitale.

Multitudinea formelor de manifestare a specificităţii enzimelor poate fi încadrată în două categorii: **specificitatea de reacţie** şi **specificitatea de substrat**.

3.3.1 Specificitatea de reacţie

Enzimele catalizează un anumit tip de reacţie bine determinată, în funcţie de specificitatea lor faţă de substrat şi de modul de acţiune asupra acestuia.

Specificitatea de reacţie este capacitatea fiecărei enzime de a cataliza un anumit tip de reacţie şi acest criteriu stă la baza clasificării enzimelor.

De exemplu, un α aminoacid poate constitui substrat de reacţie pentru mai multe enzime care catalizează reacţii diferite de transformare a aceluiaşi substrat cu formare de produşi diferiţi de reacţie:

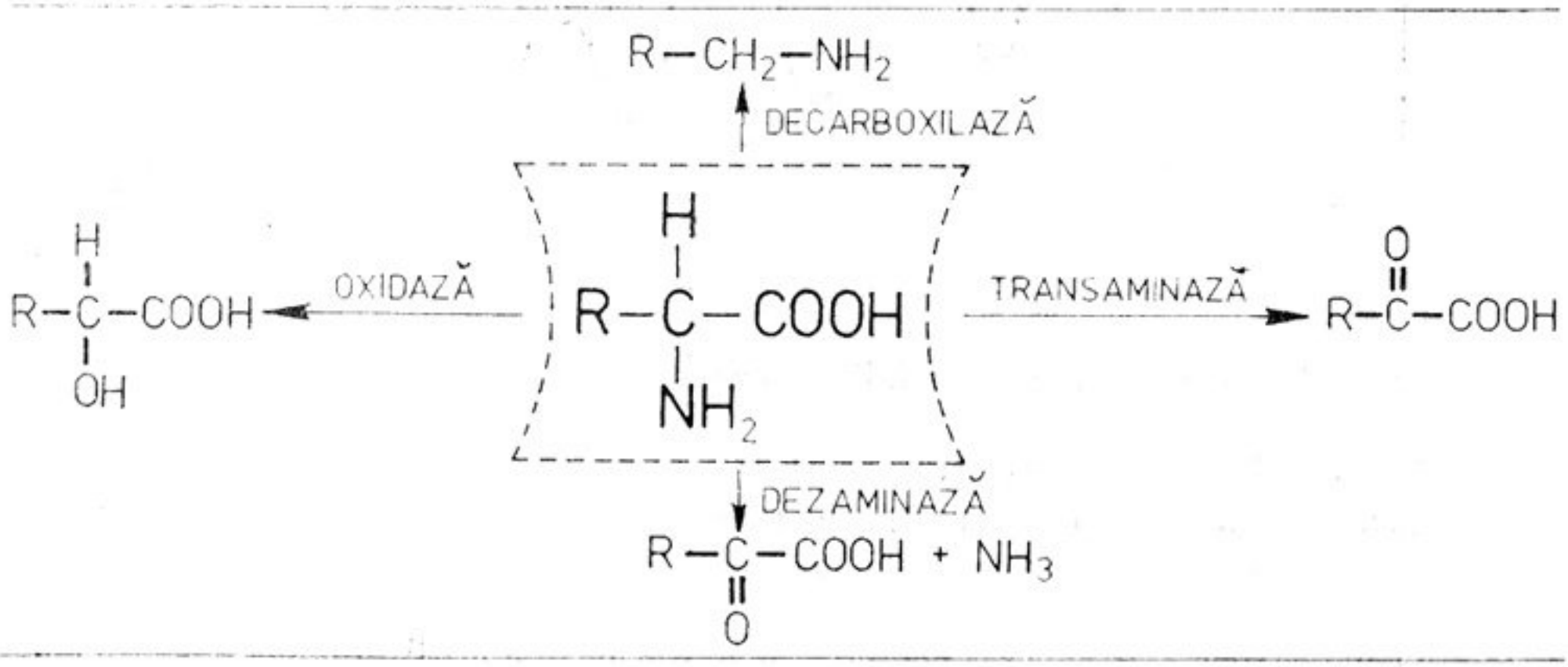


Fig.3.9 **Enzime diferite acţionează asupra aceluiaşi substrat**

Specificitatea de acţiune este imprimată de componenta sa proteică.

In cazul în care o enzimă poate cataliza două sau mai multe reacţii diferite, se poate admite faptul că aceasta posedă centre active distincte pentru fiecare tip de reacţie.

3.3.2 Specificitatea de substrat

Gradul specificităţii de substrat variază de la o enzimă la alta, în funcţie de natura acesteia şi de mecanismul de reacţie. Enzimele prezintă trei tipuri distincte de specificităţi:

- ◆ - specificitatea geometrică sau stereochimică,
- ◆ - specificitatea relativă de grup,
- ◆ - specificitatea absolută.

Clasificarea are un caracter convenţional, deoarece între aceste tipuri de specificitate nu se poate face o delimitare absolută.

In cazul reacţiilor bimoleculare, enzima poate fi absolut specifică numai pentru unul din cele două substraturi; în cazul reacţiilor reversibile, enzima poate fi specifică pentru substraturi şi în nici un caz pentru produşii de reacţie.

3.3.2.1 Specificitatea optică sau stereochimică

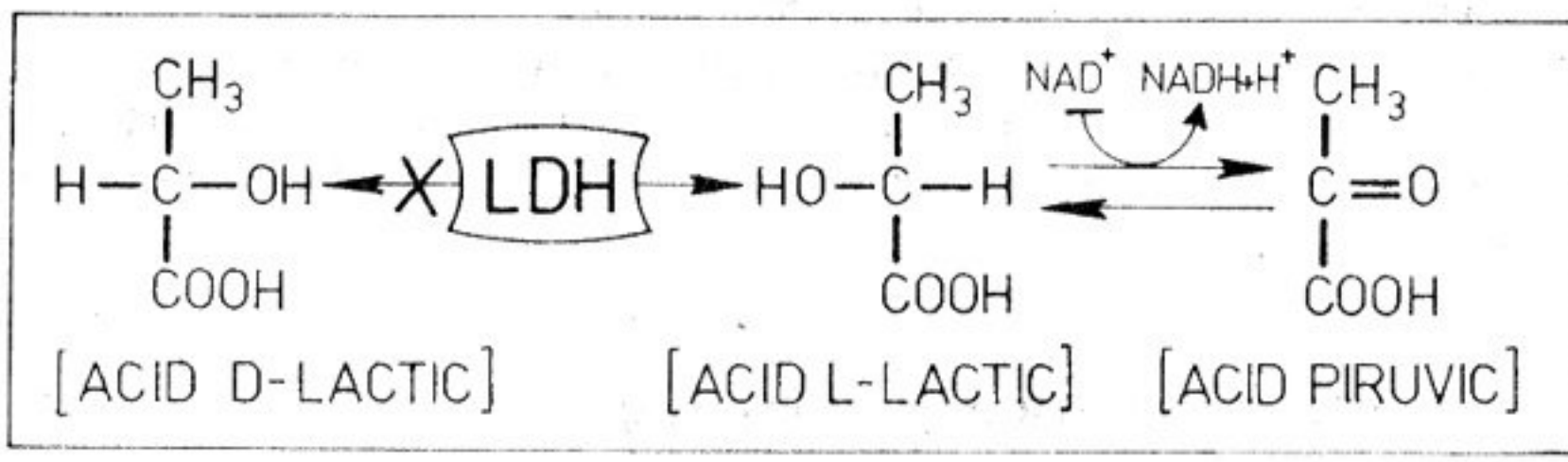
Asimetria structurala este o particularitate generală a sistemelor biologice şi deci, enzimele existente în organismele vii, prezinta adeseori specificitate optică sau stereochimică.

Enzimele din aceasta categorie acţionează:

- ◆ - asupra unei serii optice **D** sau **L**;
- ◆ - asupra unui anumit izomer **cis** sau **trans**;
- ◆ - formeaza **un** anumit **izomer geometric** sau **optic**.

$$\alpha\text{ - Aminoacid} \xrightarrow{\text{Aminoacid oxidaza} + O_2} \alpha\text{ - Cetoacid} + NH_3 + H_2O_2$$

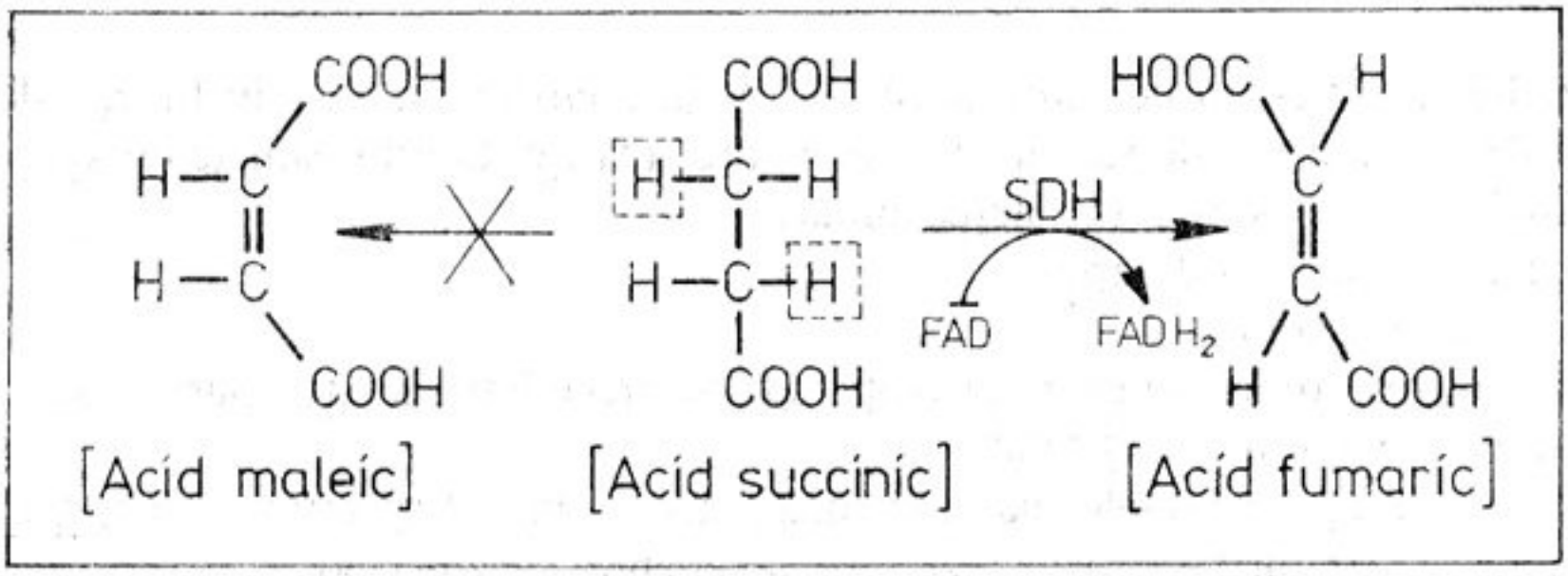
Lactat dehidrogenaza (LDH) acţioneaza asupra acidului L - lactic pe care îl transformă în acid piruvic şi niciodată nu va acţiona asupra acidului D - lactic.



In aceste cazuri, substratul optic activ este transformat în produs de reacţie care poate fi optic activ sau nu. Există şi situaţia inversă când substratul este optic inactiv, dar este optic activ produsul de reacţie.

Reacţia catalizată de lactat dehidrogenază fiind reversibilă, poate servi ca astfel de exemplu, considerata ca o "sinteză asimetrică".

Succinat dehidrogenaza (SDH) catalizează preferenţial dehidrogenarea substratului său - acidul succinic - prin eliminarea a 2H în poziţia trans cu formarea izomerului trans (acidul fumaric); izomerul cis, acidul maleic nu se poate forma.



Specificitatea optică sau **stereochimică** poate fi explicată prin faptul că enzima leagă substratul prin **trei puncte** (centrii activi) pe care le considerăm coplanare.

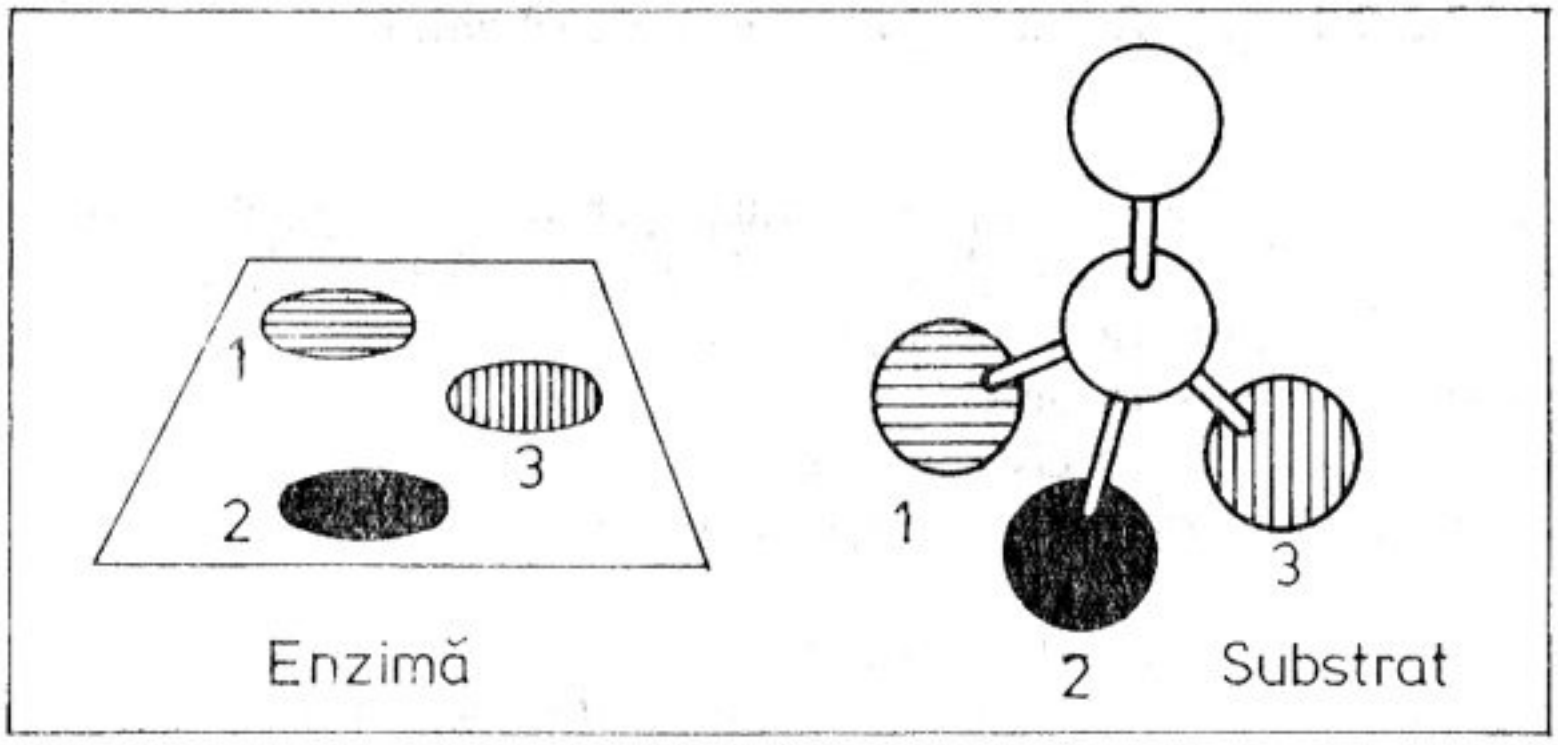


Fig.3.10 **Ilustrarea simplificată a stereospecificităţii**

In acest fel trei substituienţi ai atomului de carbon asimetric al substratului sunt fixaţi pe suprafaţa enzimei, pe centrii activi complementari lor.

Aşadar, pentru un substrat ce are doi enantiomeri (un carbon asimetric) numai unul din aceştia va putea fi legat şi deci supus transformării chimice catalizată de enzime; antipodul optic nu corespunde poziţiei centrilor activi şi în consecinţă, nu poate fi atacat de către enzimă.

3.3.2.2 Specificitatea relativă de grup

In acest caz enzima manifestă un spectru larg de activitate, acţionînd asupra unui grup de substraturi care prezintă o constituţie chimică asemănătoare.

a) **Alcooldehidrogenaza** catalizează transformarea prin dehidrogenare a unui grup de alcooli monohidroxilici cu număr mic de atomi de carbon.

$$R\text{-}CH_2\text{-}OH \xrightarrow{ADH} R\text{-}CHO$$

$$NAD^+ \quad NADH + H^+$$

Viteza de reacţie este funcţie de alcoolii care servesc ca substrat, cea mai rapidă transformare fiind a alcoolului etilic.

b) **Hexokinaza** catalizează fosforilarea unei serii de hexoze (glucoza, fructoza, manoza, galactoza) ca substraturi, în prezenţa ATP.

$$\text{Hexoză} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinază}} \text{Hexoză-fosfat} + \text{ADP}$$

In cadrul acestui grup de substraturi, hexokinaza are o afinitate mare pentru glucoză.

c) **Glicozidazele** acţionează asupra unui tip de legătură glicozidică (alfa sau beta).

d) **Fosfatazele** catalizeaza hidroliza esterilor fosforici având o gamă largă de acţiune - de la un grup de substraturi (fosfomonoesteraze) până la un anumit substrat (glucozo-6-fosfataza, adenozin trifosfataza).

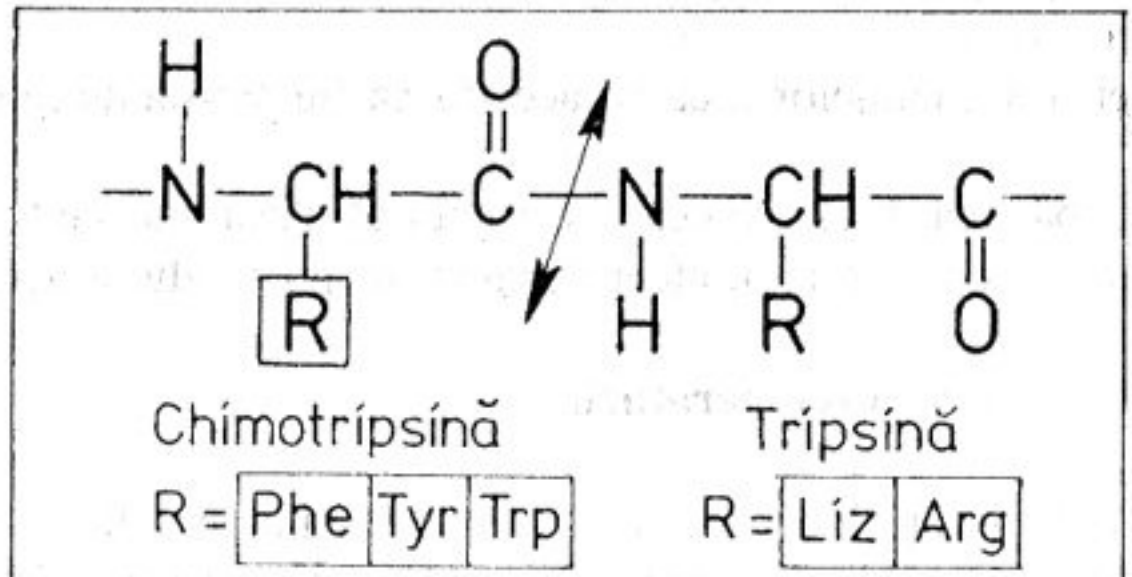


Fig.3.11 **Specificitatea enzimelor proteolitice**

e) Enzimele proteolitice hidrolizează legături peptidice din peptide şi proteine. Actiunea lor este diferenţiată în funcţie de resturile aminoacizilor care formează aceste legături. Astfel chimotripsina catalizează hidroliza legăturilor peptidice la a căror formare au participat cu gruparea carboxil aminoacizii fenilalanină, tirozină, triptofan; tripsina are specificitatea de acţiune pe legăturile peptidice (formate prin grupările carboxil) ale lizinei şi argininei.

f) Specificitatea lipazelor digestive este corelată cu poziţia legăturii esterice între glicerină şi acizii graşi; astfel **lipaza** de origine **pancreatică** hidrolizează numai legăturile esterice α şi α' în timp ce **lipaza intestinală** hidrolizeaza numai **ß-monogliceride**.

3.3.2.3 Specificitatea absolută

Enzimele din această categorie acţionează strict asupra unui anumit substrat şi nu recunosc nici-o modificare la nivelul substratului respectiv. In acest caz particular, enzimele recunosc întreaga arhitectură a substratelor şi nu sunt specifice numai pentru o anumită legătură sau grupare din structura lor.

a) - Anhidraza carbonică intervine în procesul de biosinteză a acidului carbonic.

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

b) - Arginaza acţionează asupra argininei şi nu va acţiona asupra derivaţilor metilaţi la nivelul

grupei amine.

c) - Ureaza catalizează reacţia de hidroliză a ureei.

$$H_2N\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-}NH_2 + HOH \xrightarrow{\text{UREAZĂ}} CO_2 + 2\ NH_3$$

Ureaza nu acţionează asupra derivaţilor N-metilaţi ai ureei.

In cazul enzimelor care prezintă specificitate absolută, substanţele înrudite cu substratul reacţiei enzimatice pot fi legate la situsul activ al enzimei, fără a fi transformate, acţionând astfel ca inhibitori enzimatici competitivi.

3.4 Influenţa factorilor fizico - chimici asupra activităţii enzimelor

Natura proteică a enzimelor face ca acestea să fie substanţe labile la acţiunea unor factori de mediu.

Enzimele îşi păstrează activitatea lor catalitică dacă nu sunt denaturate, ceea ce înseamnă că orice factor de mediu cu efect denaturant, poate altera activitatea enzimatică.

3.4.1 Influenţa temperaturii

Datorită termolabilităţii lor, enzimele îşi manifestă activitatea între anumite limite de temperatură, în cadrul acestor limite prezentând o valoare optimă.

Efectul temperaturii asupra vitezei unei reacţii enzimatice este rezultanta interacţiunii a doi factori opuşi şi dependenţi de temperatură:

- ♦ - creşterea vitezei de reacţie,
- ♦ - denaturarea termică a anzimei.

Ramura ascendentă (A) a curbei evidenţiază faptul că până la valoarea t_1 care, pentru enzimele din organismul uman, este 37-40°C, viteza de reacţie creşte regulat cu temperatura atingând o valoare maximă care corespunde la temperatura optimă a enzimei.

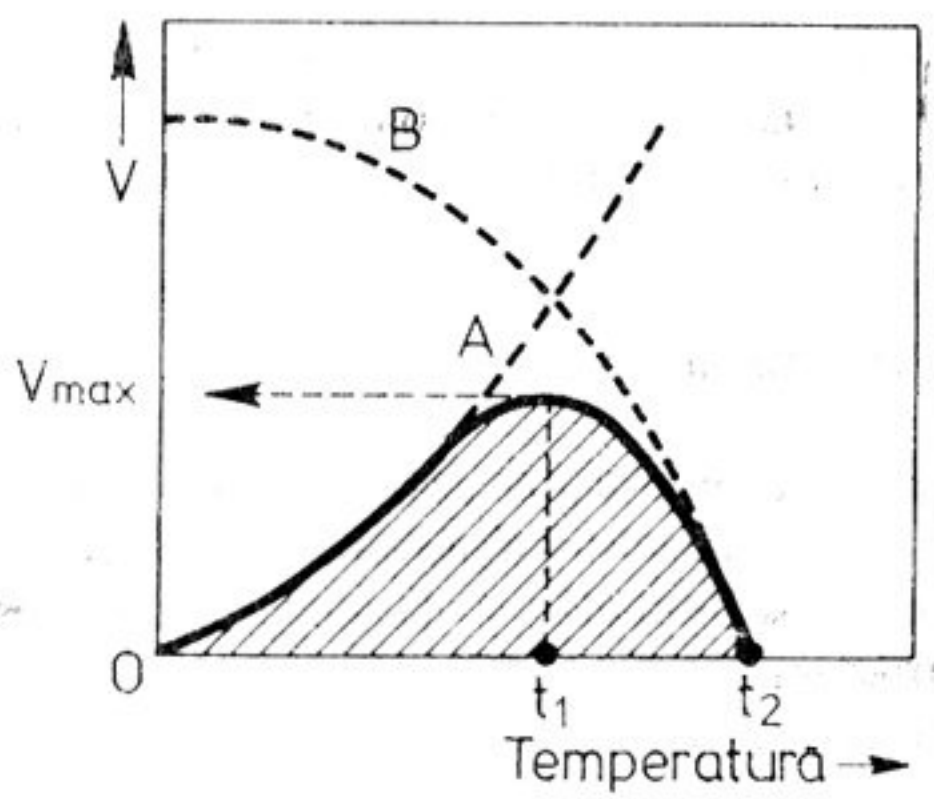


Fig.3.12 **Efectul temperaturii asupra activităţii enzimelor**

Pentru fiecare enzimă se poate stabili (în condiţiile menţinerii constante a celorlalţi parametri un **"coeficient termic al reacţiei"** (Q_{10}) dat de raportul vitezelor de reacţie la o temperatură Kt + 10°C faţă de cea la Kt.

$$Q_{10} = \frac{Kt + 10°C}{Kt}$$

Valoarea $\mathbf{Q_{10}}$ pentru reacţiile enzimatice este cuprinsă între 1 şi 2 fiind mai mică decât pentru reacţiile chimice necatalizate (Q_{10} între 2-4). Relaţia este valabilă până la o temperatură numită **temperatură optimă**, pentru care viteza de reacţie atinge valoarea maximă.

Ramura descendentă (B) a curbei $t_1 \longrightarrow t_2$ indică o diminuare rapidă a vitezei de reacţie, odată cu creşterea temperaturii şi corespunde cu **inactivarea** progresivă prin denaturarea termică a enzimei, al cărei edificiu molecular se alterează. Valoarea t_2 indică temperatura de inactivare la care viteza de reacţie este nulă, funcţia catalitică a enzimei fiind anulată.

Dacă la organismul uman temperatura optimă a enzimelor este cuprinsă între 37-40°C, la enzimele din plante este 50-60°C şi poate ajunge la temperatura de 80-100°C la enzimele din microorganisme care trăiesc în ape termale.

3.4.2 Influenţa pH-ului

Influenţa pH-ului asupra enzimelor este mult mai complexă şi mai variată. Enzimele sunt active într-un domeniu limitat de pH, în majoritatea cazurilor efectul catalitic fiind maxim la o anumită valoare de pH denumit **pH optim de acţiune**. Influenţa pH-ului asupra activităţii enzimelor se reprezintă după o curbă în formă de **"clopot"** al cărei maxim constituie pH-ul optim de acţiune al enzimei respective (vezi fig.3.13).

Valoarea pH-ului optim este determinată de:

◆ - gradul de ionizare al radicalilor aminoacizilor implicaţi în activitatea enzimatică,

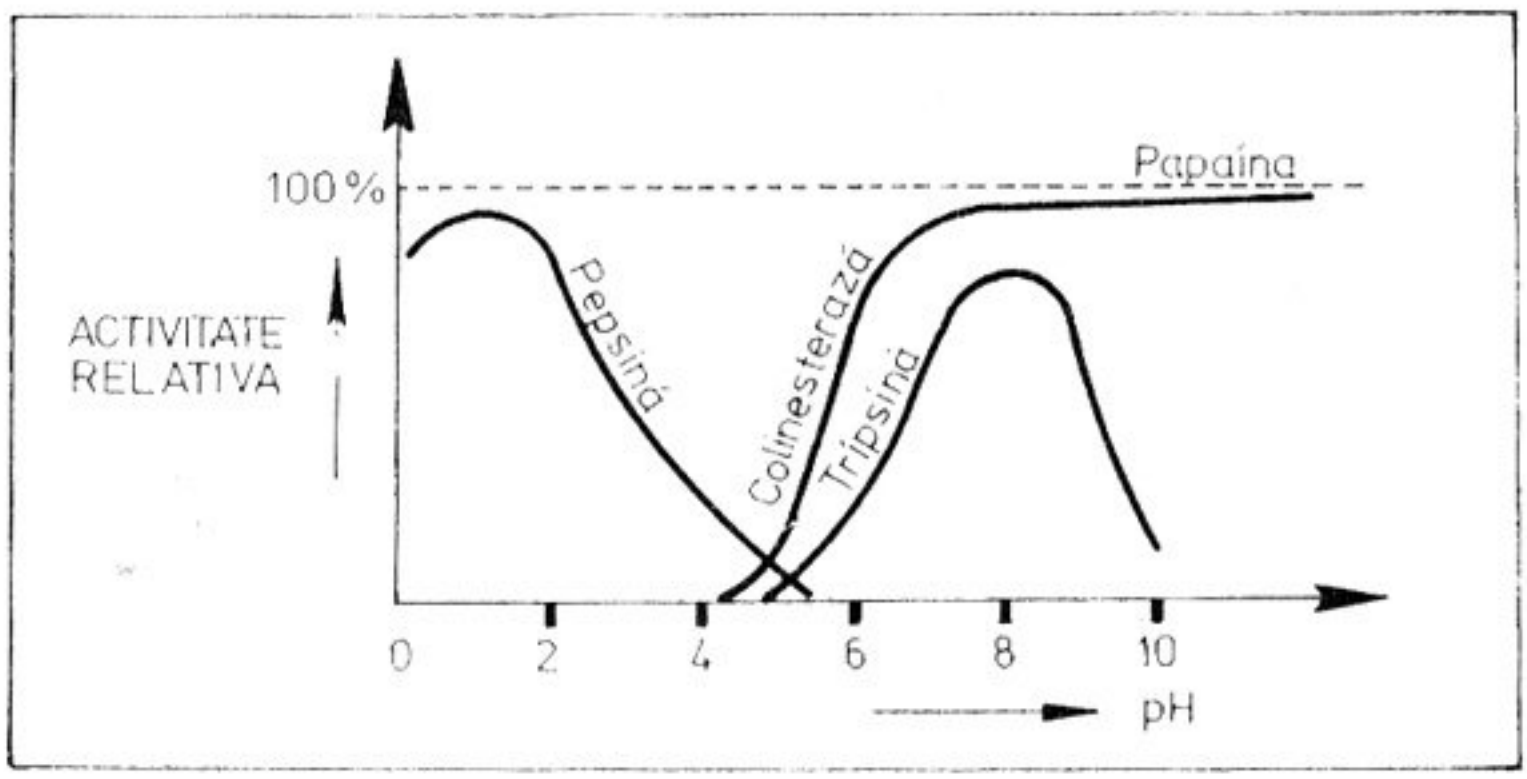


Fig.3.13 **Efectul pH-ului asupra activităţii enzimelor**

- ◆ - natura şi originea enzimei,
- ◆ - mediul de reacţie şi forţa sa ionică.

In general activitatea enzimelor din organismul uman este optimă între pH 5,0 şi 9,0 şi reprezintă chiar pH-ul normal al mediului în care ele îşi îndeplinesc funcţia catalitică. Există şi enzime care prezintă activitate optimă în afara acestui interval, spre exemplu pepsina are pH optim 1,5.

Trebuie însă remarcat că există şi situaţii în care două enzime cu aceeaşi specificitate, dar provenind din două ţesuturi diferite au pH-uri optime diferite; este cazul fosfatazei alcaline hepatice cu pH optim apropiat de 9 şi al fosfatazei acide din prostată cu pH optim 5.

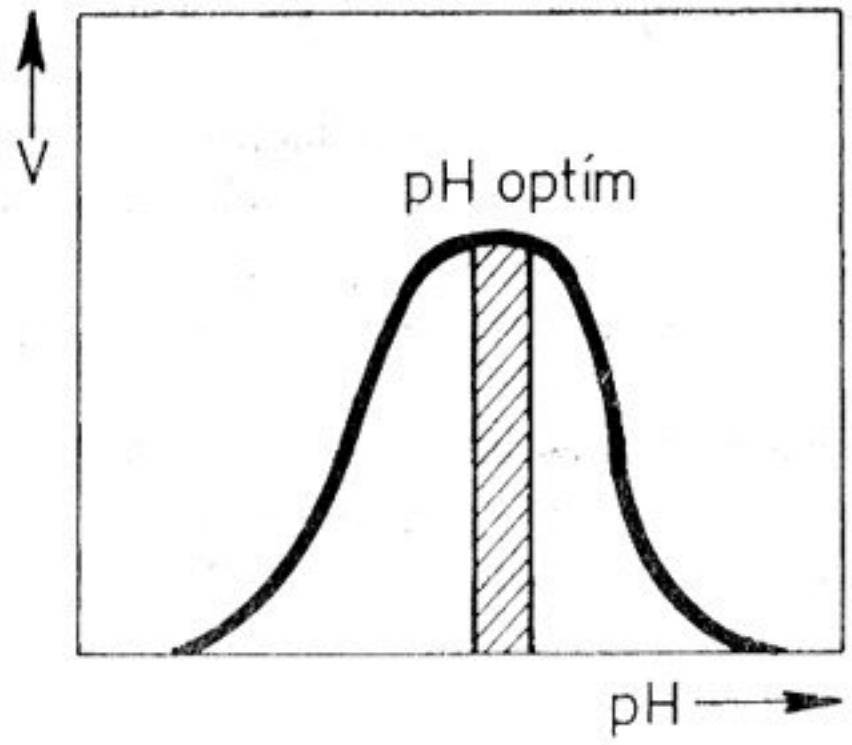


Fig.3.14 **Variaţia activităţii unor enzime în funcţie de pH**

Uneori activitatea enzimei nu se schimbă pe un interval larg de pH; ex: colinesteraza şi papaina (vezi fig.3.13).

Scăderea activităţii enzimatice la valori de pH mai mici sau mai mari decât cel optim, se realizează în mod diferit pentru fiecare enzimă în parte. Ionii H^+ şi HO^- au efecte multiple asupra enzimelor şi în primul rând un efect denaturant. Spre deosebire de efectul denaturant al temperaturii, în acest caz se rup mai ales legăturile disulfurice caracteristice structurii terţiare (denaturare ireversibilă).

Enzimele al căror centru activ cuprinde grupări ionizabile acide sau bazice interacţionează direct cu ionii H^+ şi HO^- rezultatul fiind creşterea sau scăderea gradului lor de disociere.

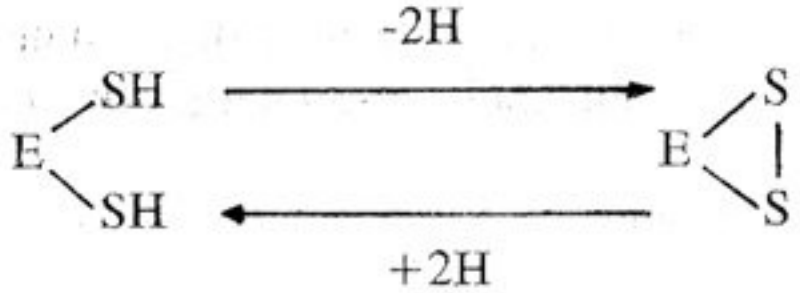
Se poate considera că în cazul unui amestec de enzime aşa cum există în fiecare celulă, pH-ul celular şi extracelular poate constitui un factor important de reglare al proceselor metabolice.

Acidul lactic - factorul de oboseală rezultat al unei activităţi musculare intense, duce la acea stare de epuizare prin acidifierea celulei (modificarea pH-ului) şi blocarea proceselor de sinteză a ATP, deoarece sunt inhibate enzimele din întreg fluxul glicolitic.

3.4.3 Alţi factori care influenţează activitatea enzimatică

Potenţialul redox al mediului influenţează starea grupărilor din constituţia enzimelor care pot suferi oxidări sau reduceri. Această influenţă se exercită în special asupra

grupărilor -SH.



Aceste modificări determină schimbări conformaţionale ale enzimei care vor influenţa activitatea enzimatică. Oxidarea grupărilor -SH antrenează inactivitatea enzimelor şi de aceea pentru menţinerea activităţii se adaugă uneori în mediu reductori fiziologici de tipul cisteinei sau glutationului care fiind compuşi cu grupări tiol (-SH) reduc grupul -S-S-inactiv al enzimei, iar ei se consideră trecând în forma oxidată.



Aceşti compuşi sulfhidrilici cu potenţial oxidoreducător scăzut acţionează deci ca protectori ai enzimelor -SH dependente.

Radiaţiile ionizante (raze X,radiaţii radiactive, α, ß, sau γ în doze mici formează substanţe oxidante prin descompunerea apei şi a oxigenului dizolvat parţial în apă; aceste substanţe inactivează enzimele şi în special acele enzime care au grupe -SH în centrul activ. Efectul acestor radiaţii poate fi şi direct prin producerea ionizării moleculelor de enzimă.

Vibraţiile sonore şi ultrasunetele provoacă reacţii multiple în macromoleculele enzimelor cum ar fi: **oxidarea** nucleelor aromatice, **eliberarea** grupelor **-SH**, **depolimerizarea**.

Acţiunea presiunilor înalte. Presiuni de peste 10.000 atmosfere determină următoarele modificări asupra: - gradului de **ionizare** al proteinei; - **derulării lanţului polipeptidic**; - structurii solventului şi gradului de ionizare al tamponului.

Acţiunea presiunilor înalte provoacă deci, o denaturare reversibilă a enzimei.

3.5 Cinetica enzimatică

Mecanismul general al reacţiilor enzimatice comportă interacţiunea a două categorii de fenomene: unul **termodinamic** şi altul **cinetic**.

3.5.1 Energia de activare

O reacţie de tipul S→P poate avea loc numai în cazul când o parte din moleculele lui A posedă mai multă energie decât restul moleculelor, o energie ce trebuie să atingă o **stare activată**.

In această stare se pot **forma** sau se pot **rupe** legături chimice. Aşadar, pentru ca moleculele substratului (S^*) să reacţioneze şi să se transforme în produsul (P) este necesar ca specia de molecule S să posede la un moment dat o stare activată (S^*). Atingerea acestei stări activate (şocuri intermoleculare eficace) conferă moleculelor respective capacitatea de a reacţiona determinând formarea produsului de reacţie şi atingerea stării finale.

Energia de activare (E) - reprezintă o valoare termodinamică ce exprimă cantitatea de energie necesară pentru a aduce toate moleculele până la **starea de activare**. Moleculele trebuie să depăşească o anumită barieră energetică, care împiedică transformarea lui

S——→P. Prin energie de activare se desemnează astfel cantitatea de energie (în calorii şi la o temperatură dată) necesară pentru ca toate moleculele dintr-un mol de substanţă să atingă o **stare activată**. Ca orice catalizator, **enzimele scad energia de activare** a moleculelor de substrat.

Mecanismul reacţiilor enzimatice prin scăderea energiei de activare este ilustrat, conform teoriei lui Eyring, în fig.3.15.

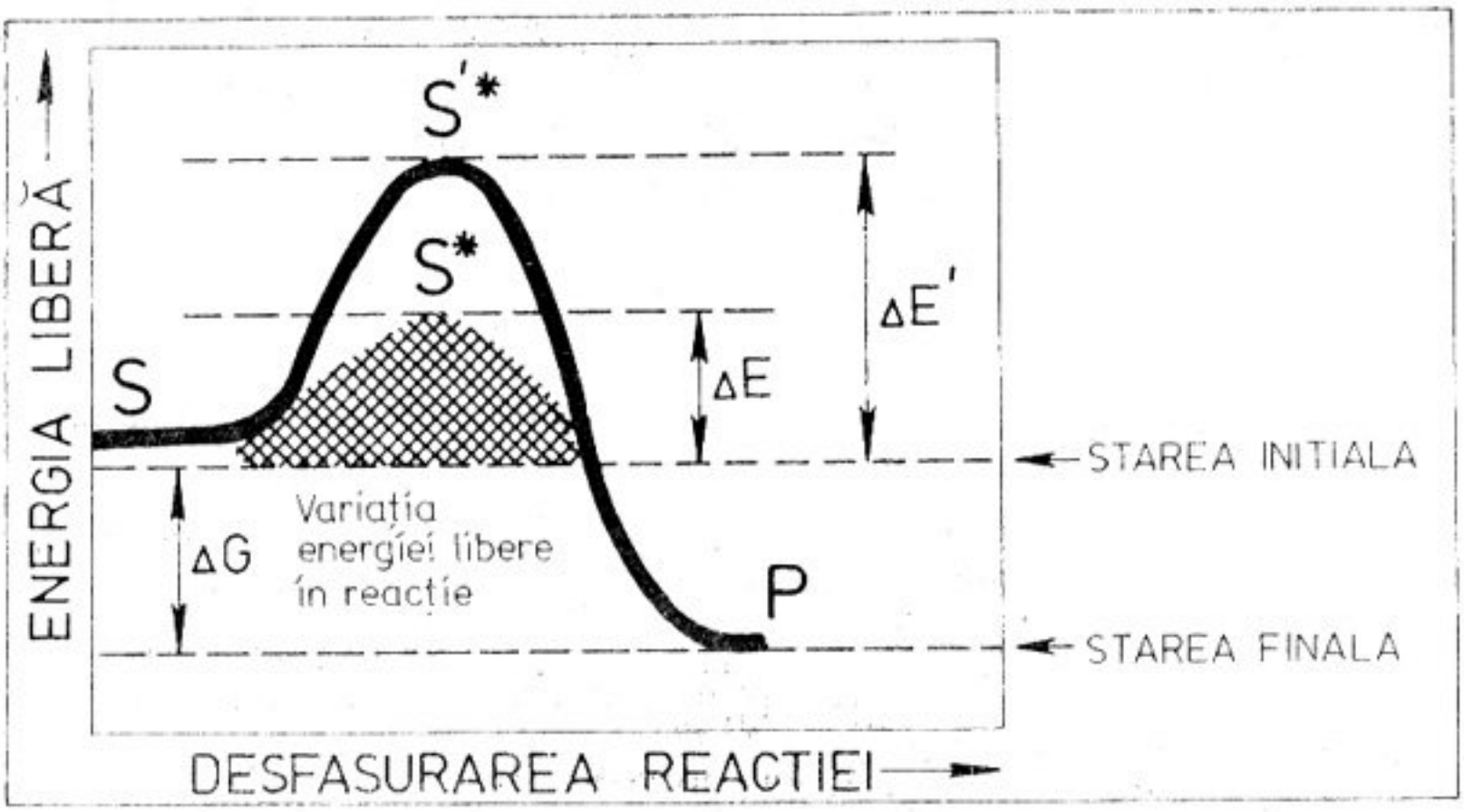


Fig.3.15 **Scăderea energiei de activare în reacţiile catalizate**

De exemplu, în cazul reacţiei: H_2O_2——→H_2O+ 1/2 O_2, valoarea energiei de activare ΔE este:

ΔE = 18.000 calorii/mol în **absenţă** de catalizator,

ΔE = 12.000 calorii/mol în **prezenţă** de catalizator metalic (Pt),

ΔE = 6.000 calorii/mol în prezenţa enzimei **catalaza**.

Procesul de scădere a energiei de activare a moleculelor S în prezenţa enzimelor are consecinţe extrem de importante:

◆ - creşterea vitezei de producere a stării de tranziţie;

◆ - creşterea coliziunilor intermoleculare, a numărului de molecule activate şi implicit a potenţialului lor reactiv;

◆ - accelerarea vitezei de reacţie a moleculelor activate pentru transformarea lor în produs de reacţie;

◆ - scăderea energiei de activare permite ca reacţia enzimatică să se desfăşoare cu un randament bun la temperatura de 37°C.

3.5.2 Ordinul de reacţie

Cinetica enzimatică studiază procesele care au loc sub acţiunea enzimelor în funcţie de evoluţia în timp a transformărilor caracteristice unei reacţii chimice.

Intr-o reacţie de tip general:

$$aA + bB + \ldots + cC \longrightarrow dD + eE + \ldots + fF$$

A,B,C reprezintă substanţele iniţiale şi D,E,F substanţele rezultate din reacţie;

a,b,c,d,e,f coeficienţii stoechiometrici ai reactanţilor şi produşilor de reacţie.

Viteza de reacţie va fi dată de formula:

$$V = K(A)^a * (B)^b * (C)^c$$

în care K este constanta vitezei de reacţie.

Suma exponenţilor concentraţiilor din formula vitezei notate cu **n** reprezintă ordinul acestei reacţii.

Dacă A = B = C = q expresia vitezei devine:

$$V = K * q^n$$

Sub raport cinetic, reacţiile chimice, inclusiv cele enzimatice, se diferenţiază printr-un anumit ordin cinetic de reacţie care exprimă dependenţa vitezei de reacţie de concentraţia reactanţilor care pot reacţiona sub influenţa biocatalizatorilor există:

- reacţii de ordin 0 n = 0; - reacţii de ordin 1 n = 1;
- reacţii de ordin 2 n = 2; - reacţii de ordin 3 n = 3.

Reacţiile de ordin 0 sunt independente de concentraţia reactanţilor indiferent câţi ar fi ei. In acest caz viteza de reacţie depinde de concentraţia enzimei.

Reacţiile de ordin 1 cele mai frecvente sunt de forma:

$$\text{Substrat} \xrightarrow{\text{Enzimă}} \text{Produs}$$

Viteza de reacţie creşte linear cu concentraţia. In funcţie de timp concentraţia substratului scade direct proporţional cu apariţia produsului respectiv (vezi fig.3.16).

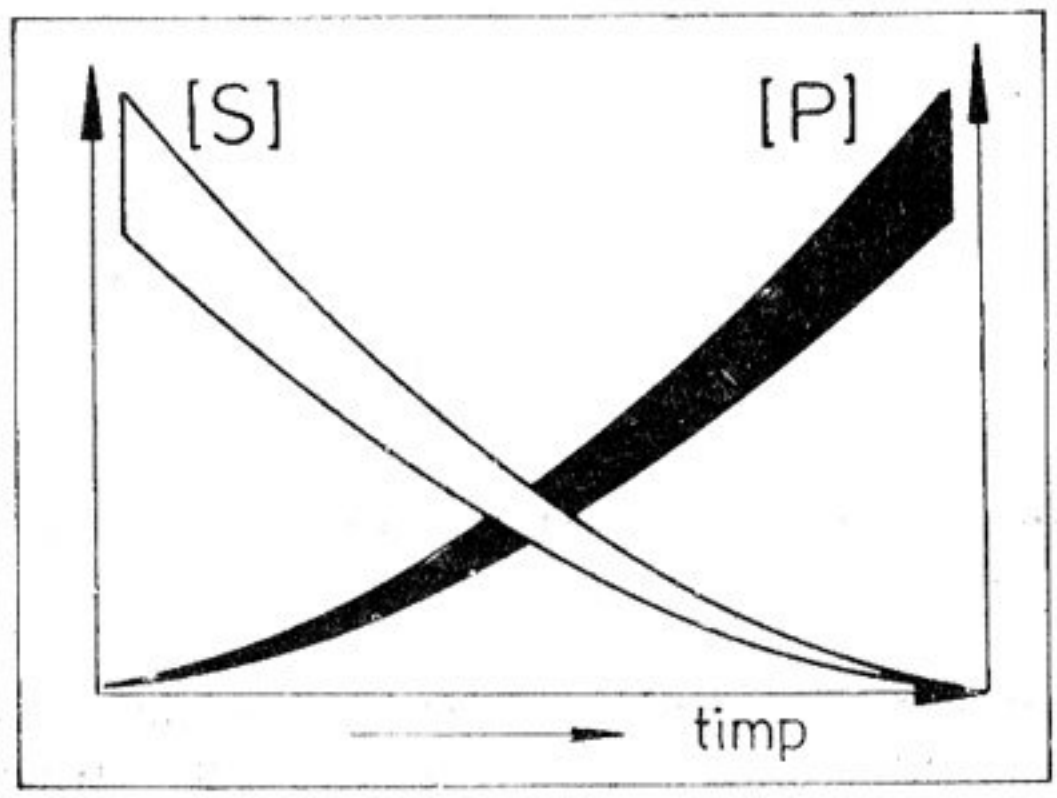


Fig.3.16 **Scăderea în funcţie de timp a concentraţiei substratului**

In acest caz intervine viteza de reacţie mărime cu care operează cinetica enzimatică, care se defineşte ca fiind cantitatea de substrat (S) care se transformă în unitatea de timp şi se exprimă prin relaţia:

$$V = -\frac{dS}{dt}$$

Reacţiile de ordin 2. In acest caz participă doi reactanţi pentru a forma produsul: $S_1 + S_2 \longrightarrow P$. Când unul din reactanţi tinde către zero atunci reacţia se reduce la o reacţie de prim ordin.

Reacţiile enzimatice cele mai frecvent întâlnite sunt de ordinul zero şi de ordinul întâi.

3.5.3 Curba de saturare cu substrat

Un fenomen caracteristic enzimelor este curba de saturare cu substrat.

In condiţiile în care concentraţia enzimei este menţinută constantă, iar concentraţia substratului [S] creşte, viteza reacţiei enzimatice variază după o curbă care corespunde unei **hiperbole echilatere** ce tinde asimptotic la valoarea maximă a vitezei (vezi fig.3.17).

In faza I-a în care viteza iniţială variază linear cu concentraţia substratului - **reacţii de ordinul întâi** -, fapt ce denotă că la concentraţii mici de substrat situsurile catalitice ale moleculelor nu sunt saturate de substrat.

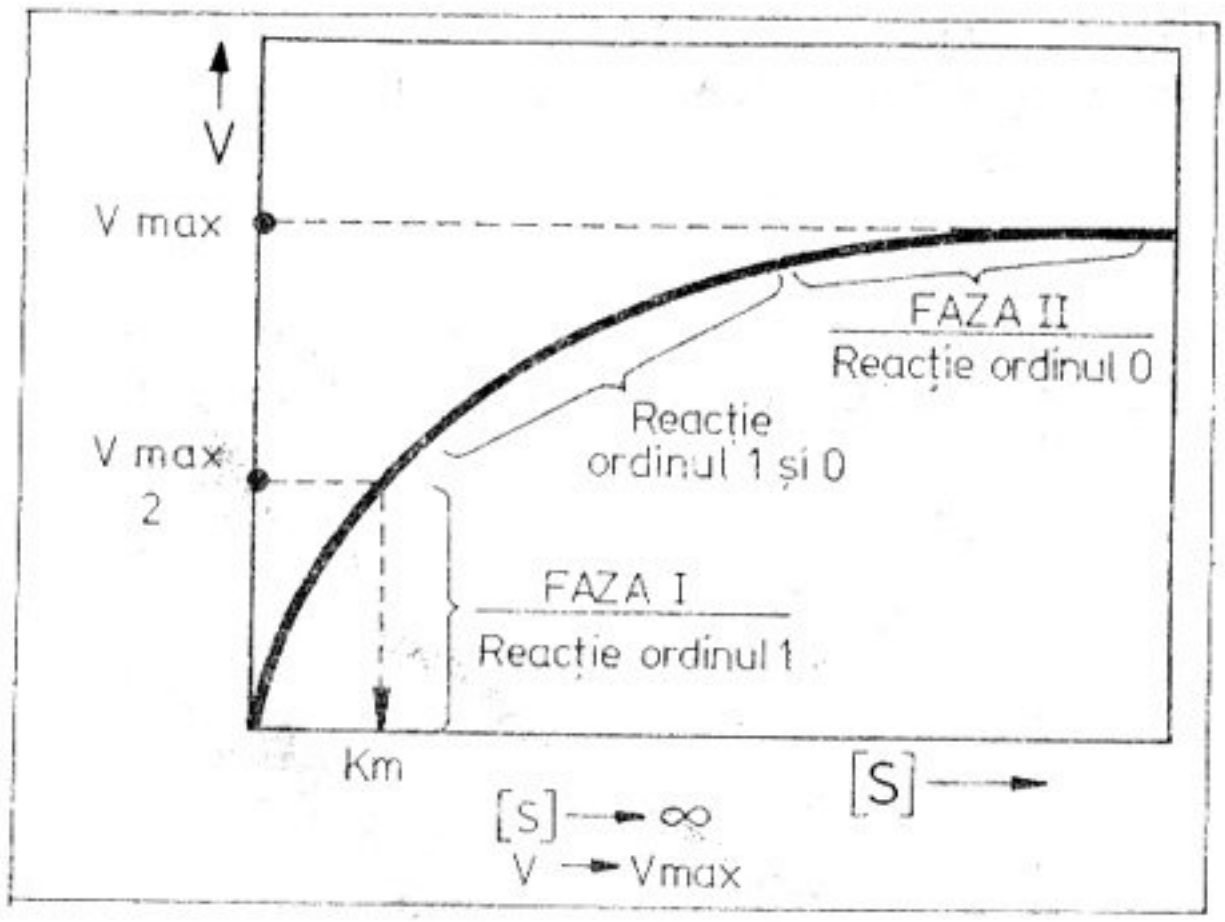


Fig.3.17 **Influenţa concentraţiei substratului asupra vitezei de reacţie**

In faza intermediară, viteza de reacţie nu mai variază direct proporţional cu concentraţia substratului [S], şi înregistrează o creştere lentă - **reacţie de ordinul întâi şi zero.**

In faza a II-a, la concentraţii mari de substrat, viteza de reacţie devine maximă căpătând o valoare constantă şi devine independentă de concentraţia substratului - **reacţii de ordin zero** -în aceste condiţii factorul care determină viteza de reacţie este concentraţia enzimei.

In faza II-a toate situsurile catalitice ale moleculei de enzimă devin complet saturate cu substrat, iar enzima acţionează la capacitatea maximă.

O reprezentare intuitivă a efectului diferitelor concentraţii de substrat asupra capacităţii moleculelor de enzimă de a lega moleculele de substrat este redată în fig.3.18.

Din această reprezentare rezultă că randamentul de formare a produşilor de reacţie este acelaşi, atât în condiţiile de saturare completă a enzimei cu substrat, cât şi în exces de substrat.

Cinetica reacţiei enzimatice reprezentată prin curba hiperbolică tipică indică - după Michaelis şi Menten - o tranziţie de la o **fază dependentă** de concentraţia substratului (faza I-a) la o **fază independentă de concentraţia substratului** (faza II-a).

Corespunzător fazei II-a se deduce - din curba respectivă - că, pe măsură ce concentraţia substratului tinde către infinit, viteza reacţiei enzimatice tinde către valoarea maximă.

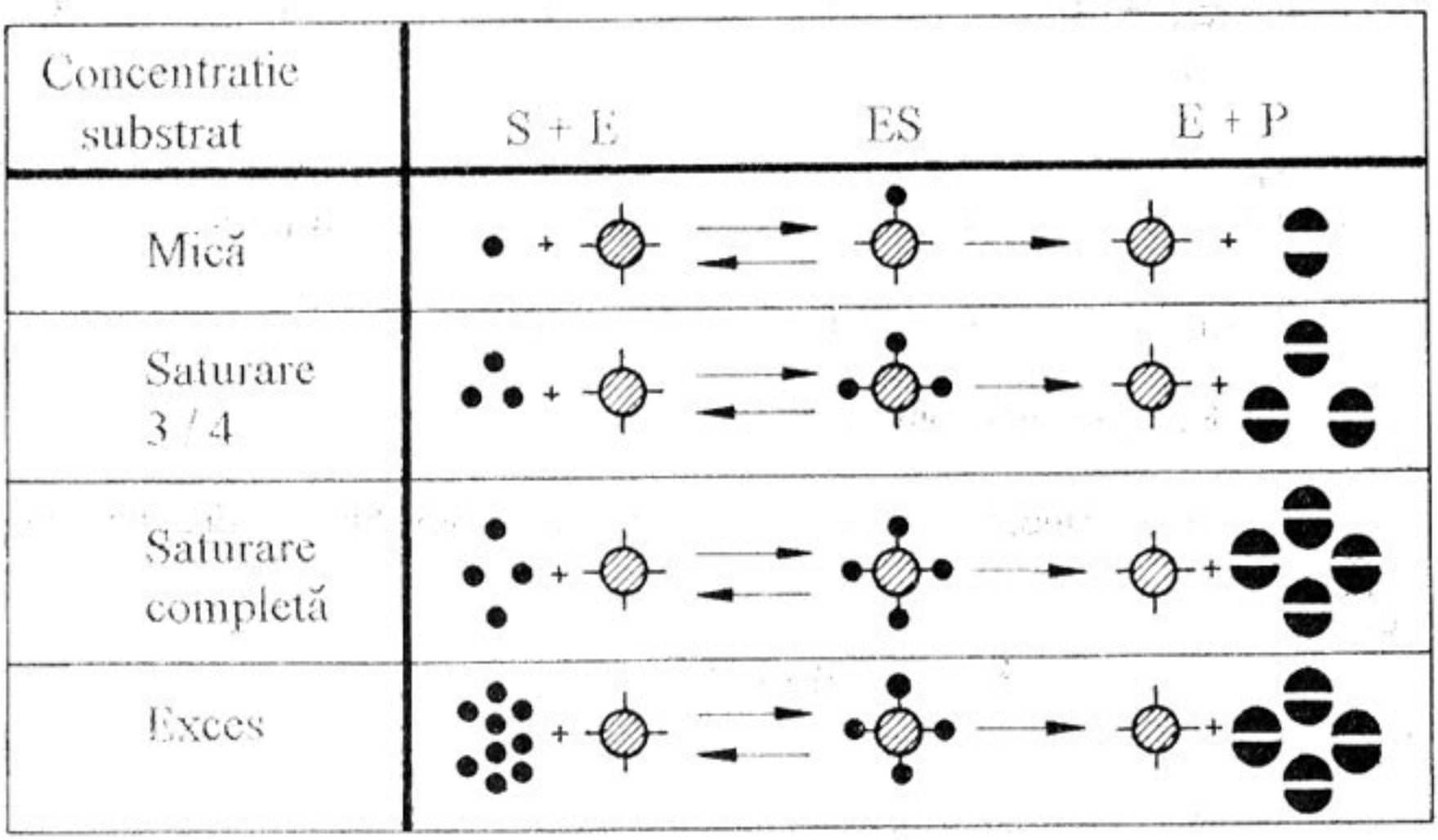


Fig.3.18 **Efectul diferitelor concentraţii de substrat asupra capacităţii enzimelor de legare a substratului**

3.5.4 Ecuaţia Michaelis - Menten

Dintre factorii care determină viteza unei reacţii enzimatice, **concentraţia substratului** este de o importanţă deosebită.

Efectul de saturare cu substrat a făcut ca Michaelis şi Menten să conceapă în 1913, o teorie generală a acţiunii enzimelor privitoare la aspectele cantitative ale dependenţei vitezei de reacţie de concentraţia substratului.

Această teorie se bazează pe ipoteza confirmată experimental că în cazul unei reacţii enzimatice între enzima şi substratul ei se formează complexe intermediare activate, **enzimă substrat** (ES) care apoi se scindează, punând în libertate produşii de reacţie şi enzima liberă, aceasta fiind capabilă să se combine cu o altă moleculă de substrat.

Formularea generală a unei reacţii enzimatice poate fi redată prin următoarea reacţie:

$$E + S \underset{V_2}{\overset{V_1}{\rightleftharpoons}} ES \overset{V_3}{\dashrightarrow} E + P \qquad (1)$$

Vom face următoarele notaţii:

[E] - concentraţia totală a enzimei libere;
[ES] - concentraţia complexului Enzimă - Substrat;
[E] - [ES] - concentraţia enzimei libere necombinate;
[S] - concentraţia substratului care este mult mai mare decât E.

Reacţia (1) include următoarele două reacţii parţiale:

$$E + S \underset{V_2}{\overset{V_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad (2); \qquad ES \overset{V_3}{\dashrightarrow} E + P \qquad (3)$$

Sub aspect cinetic, fiecare reacţie se caracterizează printr-o viteză de reacţie, respectiv printr-o constantă de viteză specifică. Astfel din ecuaţiile (2) şi (3) rezultă:

$$V_1 = K_1[E]^*[S] \; ; \quad V_2 = K_2[ES] \; ; \quad V_3 = K_3[ES] \qquad (4)$$

unde K_1, K_2, şi K_3 reprezintă constantele de viteză.

Vom lua în considerare reacţia de formare a complexului ES (Enzimă - Substrat) - reacţia (2).

$$-\frac{d[ES]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = K_1 \; [E] - [ES] \; [S] \qquad (5)$$

Similar viteza de desfacere a complexului ES esta dată de:

$$-\frac{d[ES]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = K_2[ES] + K_3[ES] \qquad (6)$$

Condiţia stării staţionare de echilibru reflectă faptul că viteza de dispariţie a substratului este egală cu viteza de formare a produsului de reacţie:

$$-\frac{dS}{dt} = +\frac{dP}{dt} \qquad (7)$$

$$K_1\{[E] - [ES] \; [S]\} = K_2[ES] + K_3[ES] \qquad (8)$$

$$K_1\{[E] - [ES] \; [S]\} = (K_2 + K_3)[ES] \qquad (9)$$

$$\{[E] - [ES] \; [S]\} = \frac{K_2 + K_3}{K_1}[ES] \qquad (10)$$

Vom nota $\frac{K_2 + K_3}{K_1} = K_m$ - constanta lui Michaelis -reprezintă constanta de disociere a complexului Enzimă-Substrat.

$$\{[E] - [ES]\}[S] = K_m[ES] \qquad (11)$$

desfacem paranteza în termenul întâi:

$$[E]\,[S] - [ES]\,[S] = K_m[ES] \qquad (12)$$

regrupând termenii vom avea:

$$[E]\,[S] = K_m[ES] + [S][ES] \qquad (13)$$

sau:
$$[E]\,[S] = [ES](K_m + [S]) \qquad (14)$$

$$[ES] = \frac{E\,[S]}{K_m + [S]} \qquad (15)$$

Deoarece viteza iniţială V a unei reacţii enzimatice este proporţională cu [ES] putem scrie:

$$V = K_3[ES] \qquad \text{de unde:} \qquad [ES] = \frac{V}{K_3} \qquad (16)$$

Inlocuind în relaţia (15) vom avea:

$$\frac{V}{K_3} = \frac{[E]\,[S]}{K_m + [S]} \qquad (17); \qquad V = \frac{K_3\,[E]\,[S]}{K_m + [S]} \qquad (18)$$

Deoarece concentraţia substratului este atât de mare, încât **toată enzima** din sistem se găseşte sub formă de **complex ES**. Dar viteza de reacţie ($\mathbf{V_{max}}$) va fi atinsă când concentraţia [ES] devine maximă; când totalitatea enzimei este combinată cu substratul putem considera:

$$V_{max} = K_3[E] \qquad (19)$$

Inlocuind în relaţia (19) se obţine ecuaţia Michaelis - Menten:

$$V = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]} \qquad (20)$$

Ecuaţia Michaelis - Menten este expresia matematică ce defineşte relaţia cantitativă dintre viteza de reacţie enzimatică, concentraţia substratului şi valoarea K_m şi care îndeplineşte condiţiile unei curbe hiperbolice.

3.5.5 Constantele cinetice ale enzimelor

Constanta lui Michaelis (Km) reprezintă un indicator al afinităţii enzimei pentru substrat. Dacă în ecuaţia (20) vom înlocui

$$V = \frac{V_{max}}{2}$$ vom avea:

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]}{Km + [S]} \qquad (21)$$

Folosind legile proporţiilor vom avea: $v_{max}(K_m + [S]) = 2v_{max}[S]$ (22)

operând şi grupând termenii vom avea: $v_{max}K_m + v_{max}[S] = 2v_{max}[S]$ (23)

$$v_{max}K_m = v_{max}[S] \; ; \; \mathbf{K_m = [S]} \qquad (24)$$

Prin urmare, constanta K_m reprezintă o concentraţie de substrat (exprimată în moli/litru) care este necesară pentru a satura jumătate din moleculele de enzimă prezente în soluţie (vezi figura 3.19).

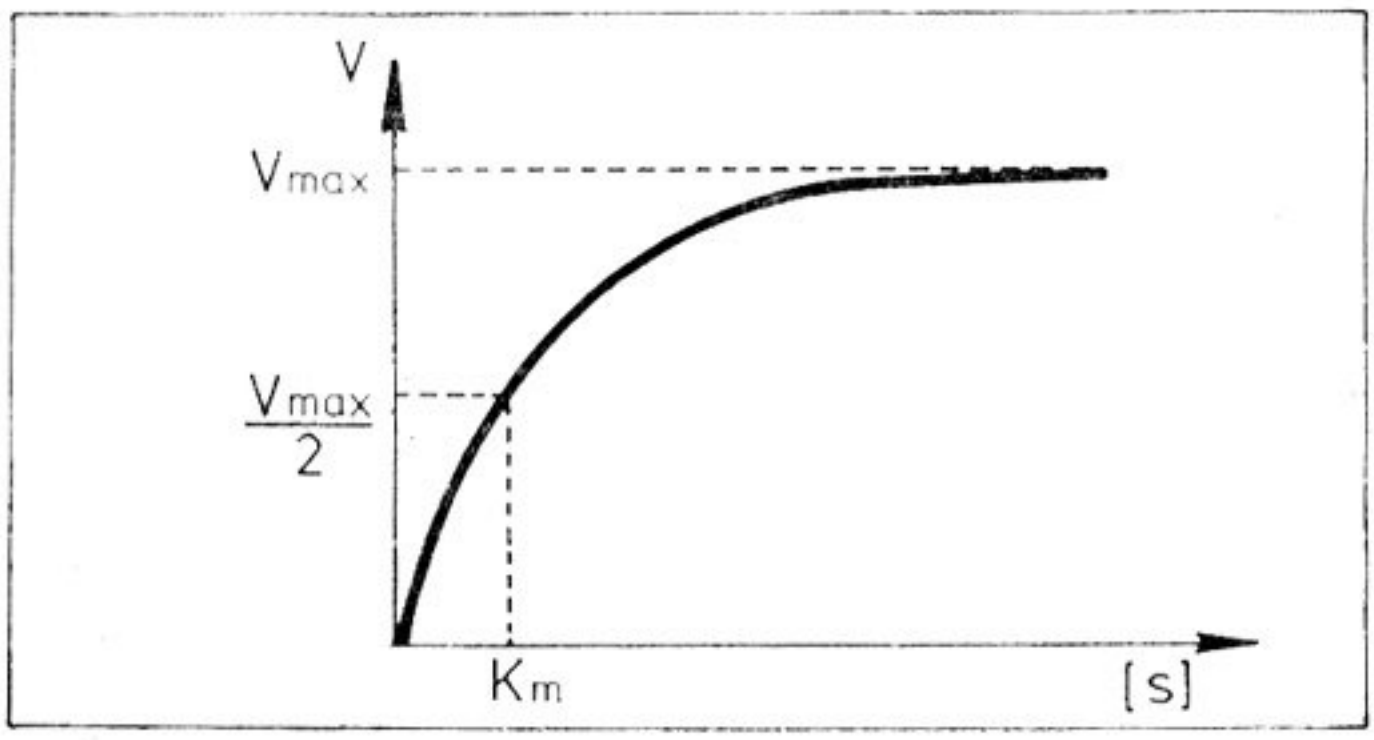


Fig 3.19 **Dependenţa vitezei de reacţie enzimatice de concentraţia substratului**

Constanta lui Michaelis, K_m, reprezintă un indicator al afinităţii enzimei pentru substrat; cu cât K_m are o valoare mai mare, cu atât afinitatea enzimei pentru substrat este mai scăzută şi invers.

$\mathbf{V_{max}}$ şi $\mathbf{K_m}$ definesc capacităţile cinetice ale enzimelor şi sunt caracteristice acestora.

Aceste noţiuni nu se întâlnesc "in vivo", dar "in vitro" pot caracteriza o enzimă cu aceeaşi precizie cu care constantele fizice caracterizează substanţele minerale şi organice. In general, valorile K_m sunt cuprinse între 10^{-1} - 10^{-6}M. In tabela 3.6 sunt prezentate valorile Km pentru câteva enzime sau substratele asupra cărora acţionează.

Tabela 3.6 **Valorile K_m ale câtorva enzime**

Enzima	Substratul	Km (moli/l)
Catalază	H_2O_2	25×10^{-3}
Anhidraza carbonică	CO_2 şi H_2O	9×10^{-3}
Hexokinază	Glucoză	15×10^{-5}
Hexokinază	Fructoză	15×10^{-4}
Glutamat dehidrogenază	Acid glutamic	12×10^{-5}
Aspartat amino transferază	Acid aspartic	9×10^{-4}

3.5.6 Ecuaţia Lineweaver - Burk

Ecuaţia Michaelis - Menten poate fi transformată algebric în forme care să redea reprezentări mult mai sugestive ale activităţii enzimatice.

Lineweaver - Burk au propus pentru simplificare să se utilizeze forma reciprocă a ecuaţiei Michaelis - Menten.

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad ; \quad \frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]} \qquad (25)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad (26)$$

Aceasta reprezintă ecuaţia Lineweaver - Burk (26).

Din geometria analitică ne reamintim că aceasta este ecuaţia unei drepte de forma $y = ax + b$ (dreapta intersectează cele două axe). Ecuaţia Lineweaver - Burk reprezintă o funcţie

$\frac{1}{V} = f(\frac{1}{[S]})$ şi are următoarea reprezentare grafică în

sistemul de axe de coordonate:

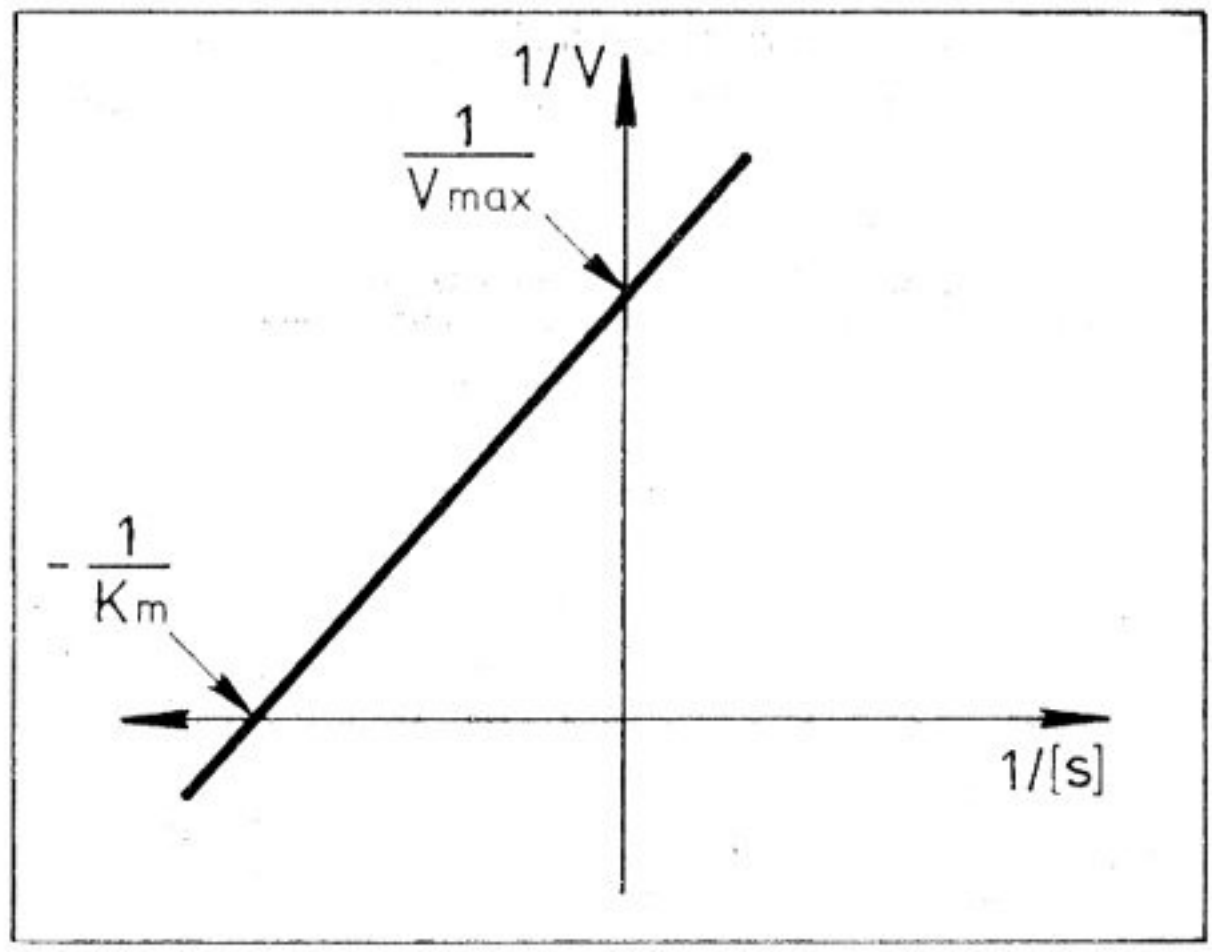


Fig 3.20 **Reprezentarea grafică a ecuaţiei Lineweaver - Burk**

Pentru a afla punctele de intersecţie, vom face următoarele artificii de calcul:
a) - punctul de intersecţie de pe axa y (1/V) se află atunci când x = 0; respectiv pe axa x toate coordonatele y = 0

$$x = 0;\ \ y = ax0 + b;\ \ y = b;\ \ y = 1/V_{max} \qquad (27)$$

b) - punctul de intersecţie de pe axa x (1/[S]) se află atunci când y = 0; respectiv toate coordonatele y = 0

$$y = 0;\ \ ax + b = 0;\ \ ax = -b;\ x = -b/a;\ \ x = -1/k_m \qquad (28)$$

Constanta K_m poate fi determinată trasând dreapta Lineweavver - Burk prin măsurarea experimentală a vitezei de reacţie 1/V corespunzătoare la cel puţin trei valori cunoscute ale concentraţiei substratului 1/[S].

Constantă K_m poate fi determinată şi prin calcularea pantei dreptei obţinute:

$$a = \frac{K_m}{V_{max}}$$

3.5.7 Efectori enzimatici

Activitatea enzimelor mai poate fi influenţată într-un sens sau altul de către diferite substanţe denumite **efectori**. Efectorii enzimatici sunt substanţe de natură foarte diferită care acţionează asupra enzimelor modificând cinetica reacţiilor enzimatice. După modul în care acţionează, efectorii enzimatici se clasifică în: **activatori, inhibitori** şi **allosterici**.

3.5.7.1 Activatori enzimatici

Activatorii enzimatici influenţează în sens pozitiv activitatea enzimelor pe care o favorizează sau o stimulează. In funcţie de natura lor, activatorii enzimatici îşi pot exercita acţiunea în mod diferit:

1. - **Activatori ai unor proenzime.** Forma inactivă a enzimelor poartă denumirea de **zimogen**, **proenzimă**, **precursor**. In starea inactivă centrii activi ai enzimelor sunt **mascaţi**. Trecerea în stare activă constă în eliminarea unei părţi din moleculă şi astfel **centrii activi** ai moleculei sunt **demascaţi**. Exemple:

$$\text{Tripsinogen} \xrightarrow{\text{Enterochinază}} \text{Tripsină}$$

$$\text{Chimotripsinogen} \xrightarrow{\text{Tripsină}} \text{Chimotripsină.}$$

2. - **Activare prin antiinhibiţie**. Există activatori care acţionează asupra enzimelor prin protejarea acestora faţă de anumiţi inhibitori şi se numesc protectori. Exemple: - vitaminele E, K, C - protejează enzimele de acţiunea peroxizilor.

3. - **Activatori propriu-zişi.** Activarea are loc în acest caz prin efectul unor ioni sau metaboliţi care favorizează activitatea catalitică a enzimelor sau fixarea moleculei de substrat de enzimă. Exemple: ionii de Mg^{2+} sunt activatori ai fosfatazelor, Mn^{2+} şi Co^{2+} ai peptidazelor, Zn^{2+} ai alcooldehidrogenazei şi ai unor peptide, Cl^- ai amilazei etc.

4. - **Substanţe cu caracter reducător.** In acest caz activarea are loc prin protejarea grupărilor tiol (-SH) active de la situsul catalitic al enzimelor, grupări necesare pentru activitatea enzimatică, de exemplu: cisteina, glutationul redus (G-SH) exercită un rol protector.

3.5.7.2 Inhibiţia competitivă

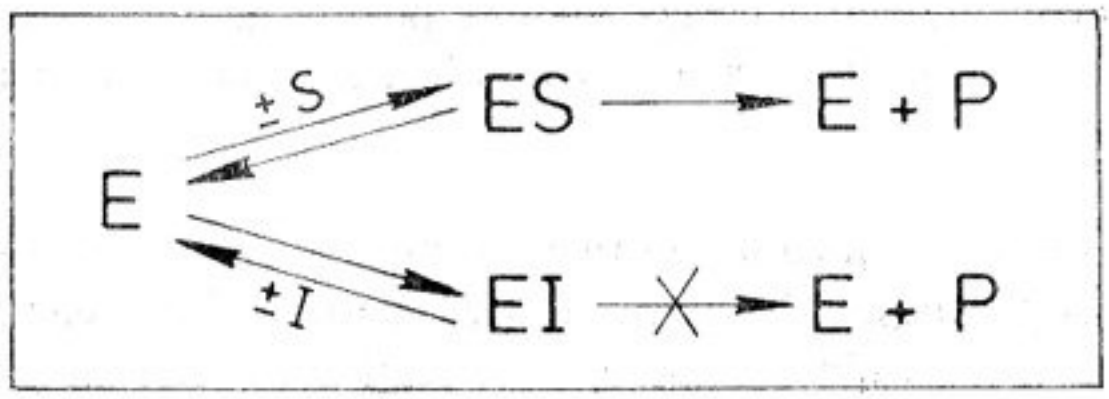
Inhibitorii enzimatici influenţează negativ activitatea enzimatică pe care o pot anula definitiv, ireversibil sau temporar, reversibil.

Inhibitorii enzimatici pot afecta fie situsul catalitic, fie oricare altă regiune a moleculei de enzimă, în ambele cazuri fiind influenţată legarea substratului.

Inhibiţia competitivă a enzimelor este determinată de acţiunea inhibitorilor care prezintă o analogie structurală cu substratul şi în consecinţă, manifestă o anumită afinitate pentru situsul catalitic.

Inhibiţia competitivă este rezultanta competiţiei moleculare dintre substrat şi inhibitorul competitiv pentru ocuparea situsului catalitic.

Legăturile dintre enzimă şi inhibitor fiind de aceeaşi natură cu legăturile enzimă-substrat, înseamnă că inhibitorul şi substratul se pot substitui reciproc. Reacţiile care au loc sunt următoarele:



Ca rezultat al inhibiţiei competitive, formarea complexului EI determină, prin scăderea situsurilor catalitice, o reducere a numărului de molecule de enzime libere disponibile pentru a reacţiona cu substratul; în aceste condiţii proporţia moleculelor de substrat care mai poate fi convertită în produs de reacţie se micşorează considerabil.

Aşa dar inhibitorul competitiv se leagă reversibil de situsul catalitic al enzimei şi diminuează accesul moleculelor de substrat; astfel situsul catalitic nu mai poate acţiona asupra substratului pentru a-l transforma în produs de reacţie. Această inhibiţie competitivă poate fi anulată prin creşterea concentraţiei de substrat, caz în care creşterea populaţiei de molecule de substrat favorizează formarea în proporţie mai mare a complexului ES cu transformarea ulterioară a substratului în produs. Creşterea concentraţiei de substrat deplasează inhibitorul competitiv de la situsul catalitic pe care-l ocupă. Din punct de vedere cinetic, se poate considera că inhibitorul competitiv modifică afinitatea enzimei pentru substratul său de reacţie şi, deci, valoarea K_m.

Reprezentarea grafică a cineticii procesului de inhibiţie competitivă a enzimelor apare în fig.3.21.

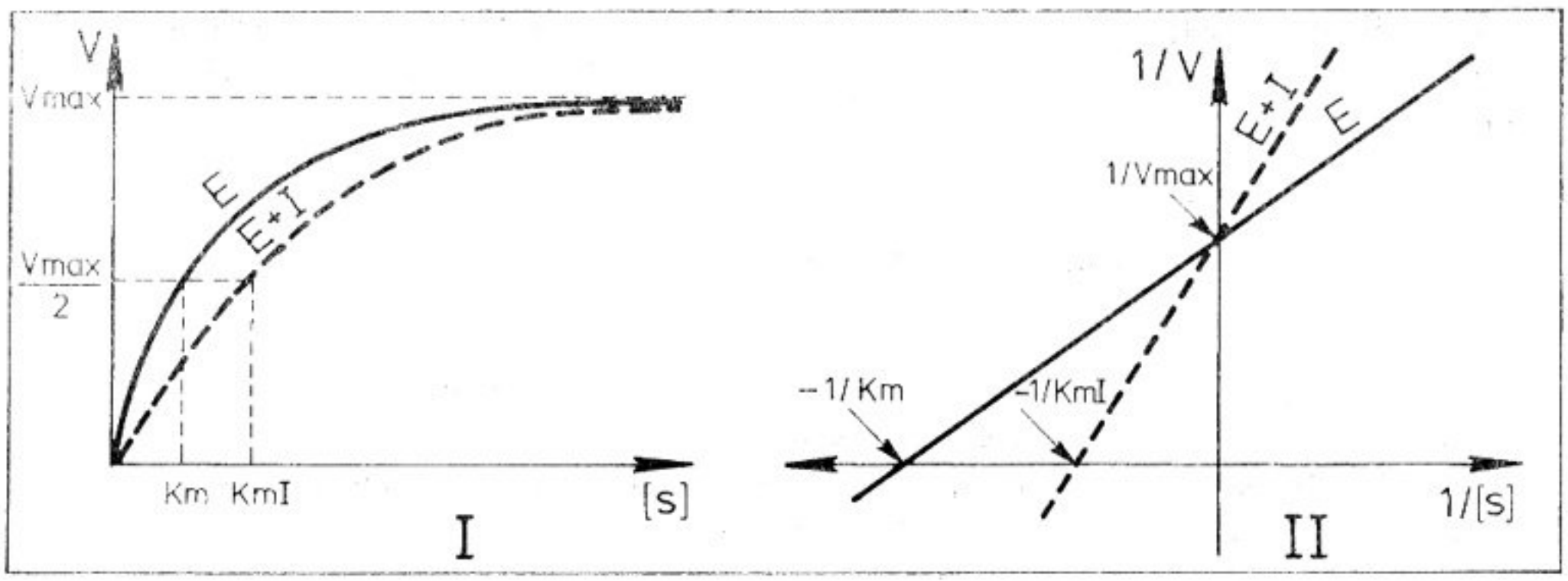


Fig.3.21 I. - **Curba de saturare de substrat**
II. - **Graficul Lineweaver - Burk**

Din analiza cineticii celor două reacţii se constată:

a) - în reacţia inhibată competitiv valoarea Km creşte;

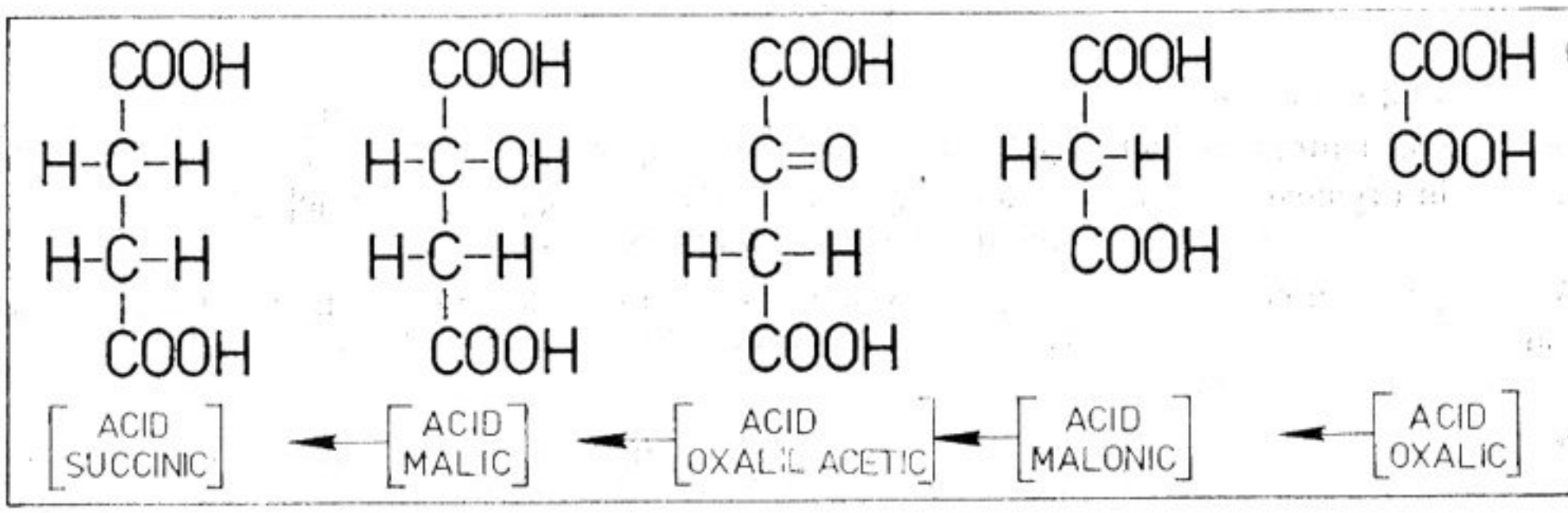
b) - viteza maximă rămâne neschimbată pentru ambele reacţii;

c) - deoarece moleculele de inhibitor acţionează competitiv cu substratul pentru ocuparea

situsului catalitic al enzimei, rezulta că o cantitate mai mare de substrat va fi necesară pentru semisaturarea enzimei, ceea ce va determina o creştere a Km.

Exemple de inhibiţie competitivă

a) - Enzima **succinatdehidrogenaza (SDH)** care are drept coenzima FAD şi catalizează reacţia de transformare a acidului succinic în acid fumaric, va fi inhibată competitiv de o serie de acizi dicarboxilici care au analogie structurală cu acidul succinic.



b) - Enzima **aconitaza** catalizează conversia acidului citric în acid izocitric şi cis aconitic. Aceasta enzimă este inhibată competitiv de **acidul florcitric**.

c) - O serie de substanţe cu **acţiune chimioterapică** pot acţiona ca **inhibitori competitivi**. Astfel sulfonamidele îşi exercită acţiunea lor bacteriostatică printr-un proces de inhibiţie competitivă. Acidul tetrahidrofolic (FH_4) biosintetizat de către bacterii are un rol esenţial în activitatea unor enzime care participă la biosinteza bazelor purinice şi deci, a acizilor nucleici, fiind şi un factor de creştere al unor bacterii. Sulfanilamida este un compus de sinteză cu o structură asemănătoare PAB, aceste două substanţe fiind izostere (fig.3.22 după M. Şerban).

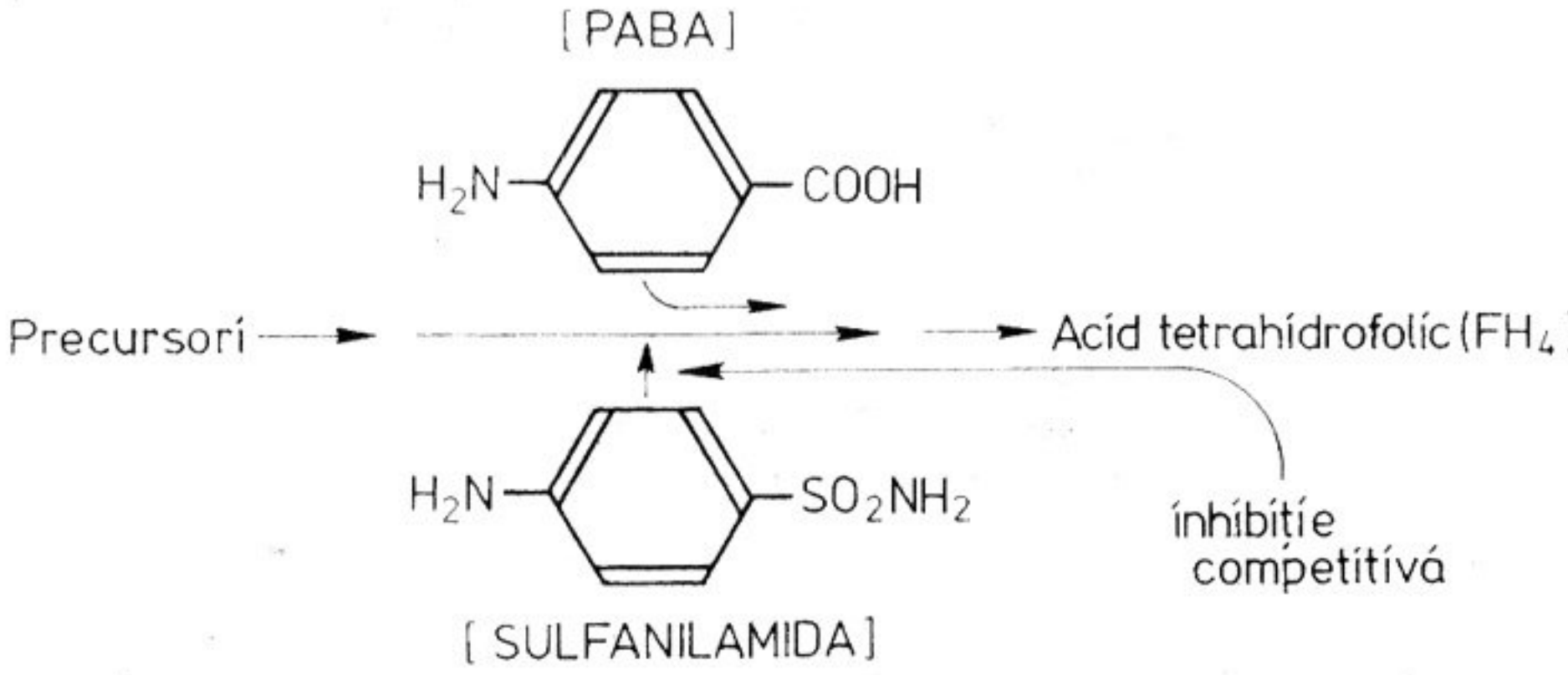


Fig.3.22 **Efectul bacteriostatic prin inhibiţie competitivă**

Sulfanilamida se va comporta ca un inhibitor competitiv ocupând prin concurenţă situsul

catalitic al enzimelor care au ca substrat PAB. Ca urmare, încorporarea PAB în structura coenzimei FH_4 este inhibată, biosinteza acesteia fiind diminuată sau blocată.

In absenţa producerii acidului folic sau coenzimei FH_4, multiplicarea bacteriilor încetează prin afectarea biosintezei acizilor nucleici.

Pe acest mecanism de inhibiţie competitivă se bazează **efectul bacteriostatic** al unor substanţe cu acţiune chimioterapică. In procesul de biosinteză a proteinelor, antibioticul **puromicina** acţionează ca un **inhibitor competitiv**.

3.5.7.3 Inhibiţia necompetitivă

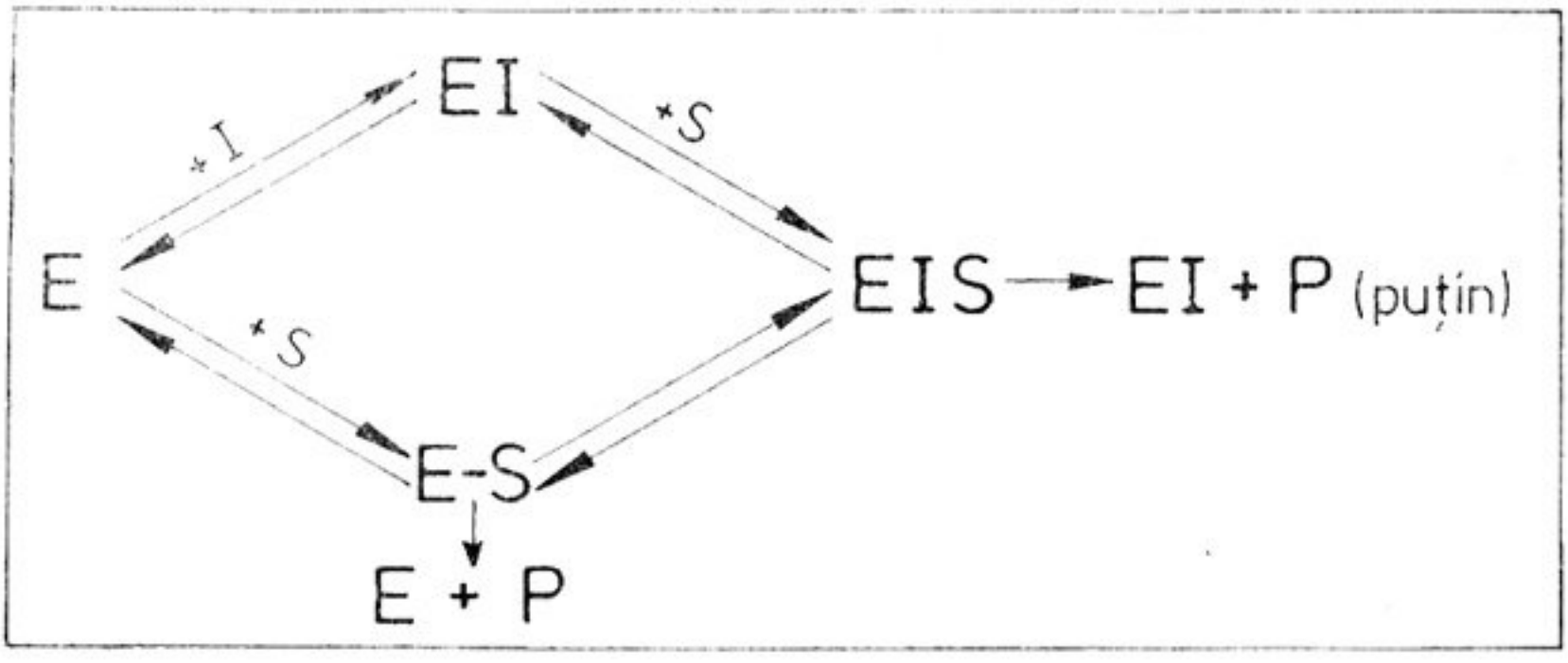
Inhibiţia necompetitivă este determinată de acţiunea unor inhibitori care nu prezintă analogie structurală cu substratul şi în general, nu sunt substanţe care se găsesc în mod normal în organism, având o **origine exogenă**. Inhibitorul necompetitiv acţionează:

◆ - asupra enzimei într-o altă regiune a moleculei, diferită de situsul catalitic, formând un complex enzimă- inhibitor (EI);

◆ - asupra complexului enzimă- substrat formând un complex inactiv enzimă-substrat-inhibitor (EIS);

◆ - concomitent asupra enzimei şi a complexului ES.

Reacţiile care au loc în sistemul ce conţine enzima, substratul şi inhibitorul sunt prezentate schematic astfel:



Spre deosebire de inhibiţia competitivă, cea necompetitivă nu este dependentă de concentraţia substratului, deoarece inhibitorul necompetitiv nu poate fi deplasat prin creşterea concentraţiei de substrat. Ambele complexe la care participă inhibitorul necompetitiv (EI şi EIS) sunt combinaţii inactive.

Reprezentarea grafică a cineticii procesului de inhibiţie necompetitivă a enzimelor este prezentat în fig.3.23.

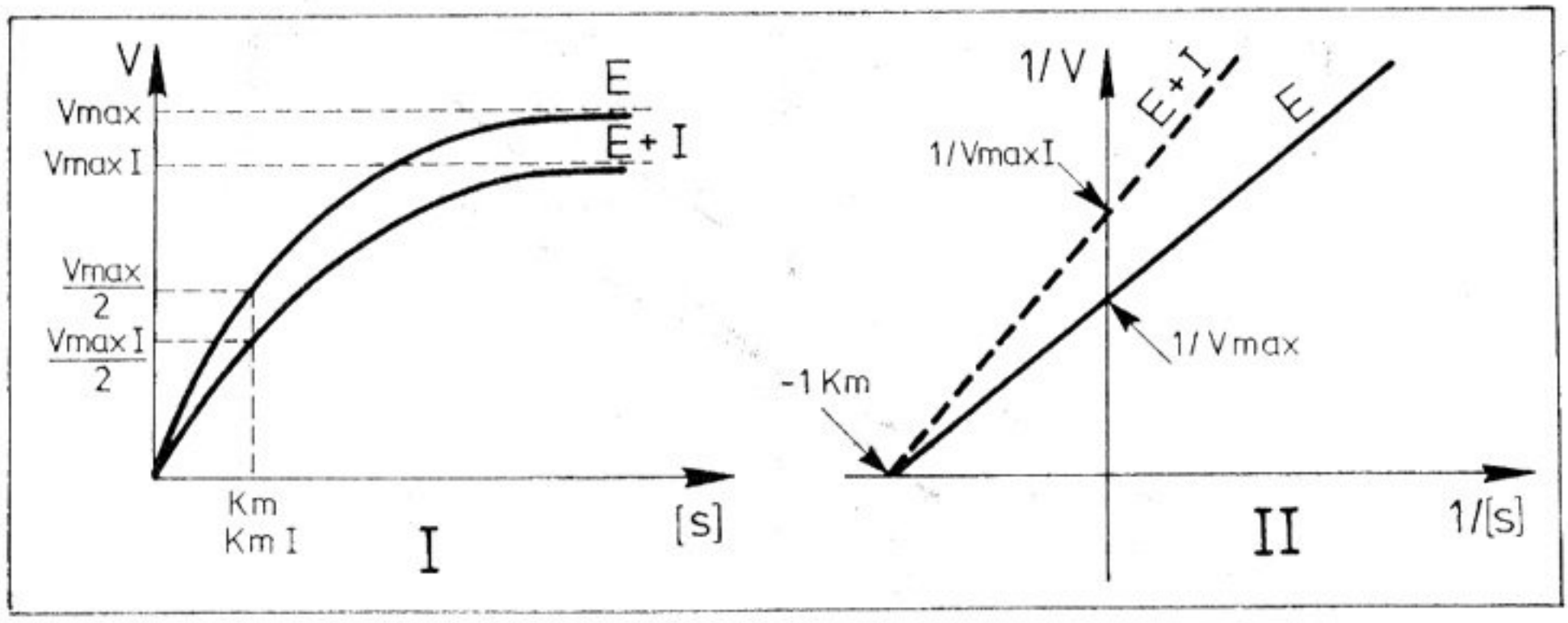


Fig.3.23 I. - **Curba de saturare cu substrat în inhibiţia necompetitivă**
II. - **Graficul Lineweaver - Burk în inhibiţia necompetitivă**

Din analiza cineticii de reacţie se constată:

◆ - în reacţia inhibată necompetitiv valoarea K_m nu se modifică;

◆ - **viteza maximă** a reacţiei enzimatice inhibată necompetitiv se micşorează, comparativ cu reacţia neinhibată.

Deci

$$K_m = K_m\ I_n$$

şi

$$V_{max} \neq V_{max}\ I_n$$

In comparaţie cu inhibiţia competitivă, în inhibiţia necompetitivă se produce concomitent o modificare a vitezei maxime de reacţie, precum şi a valorii Km deoarece însăşi afinitatea enzimei pentru substrat se modifică. Cinetica de reacţie în inhibiţia necompetitivă este net deosebită de cinetica reacţiei enzimatice fără inhibitor şi de cinetica reacţiei enzimatice în prezenţa unui inhibitor competitiv (fig.3.24).

Tipuri de inhibitori necompetitivi

a) - Inhibitorii care acţionează la nivelul cofactorilor, de obicei Fe^{2+}; H_2S; CN^-; CO.

b) - Inhibitori ai grupărilor -SH libere ale enzimelor: acidul iodacetic, iodacetamida, paracloromercuribenzoat (PCMB);

c) - Metale grele care vor acţiona asupra grupelor -SH libere ale enzimelor: Ag, Hg, Pb.

d) - Agenţi de chelare: EDTA care formează complexe cu cofactorii.

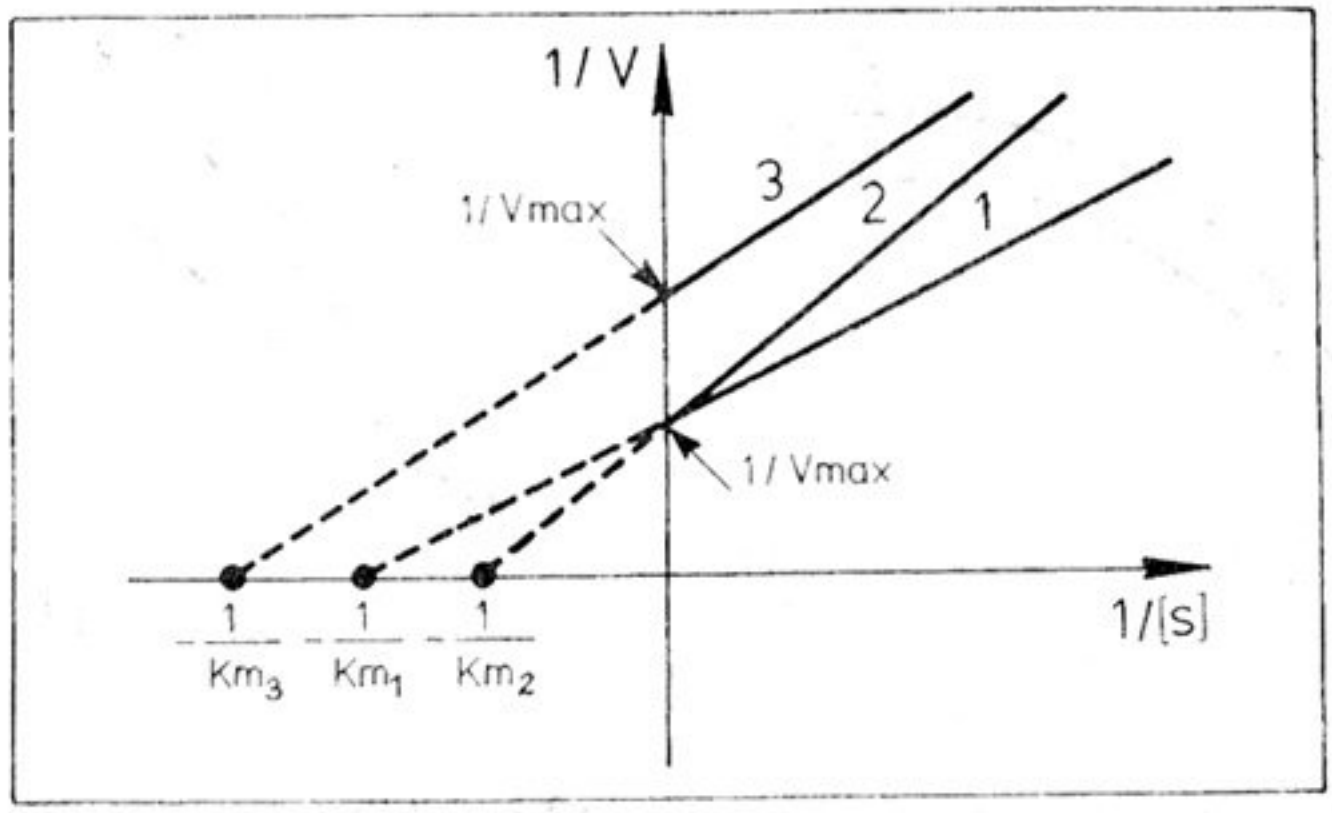


Fig.3.24 **Reprezentarea cineticii de reacţie în absenţa catalizatorului (1); în prezenţă de inhibitor competitiv (2) şi în prezenţă de inhibitor necompetitiv (3)**

3.5.7.4 Inhibiţia allosterică

Autocoordonarea activităţii celulare pentru menţinerea unui echilibru dinamic între procesele de catabolism şi cele de anabolism, reprezintă una din cele mai remarcabile proprietăţi ale organismelor vii.

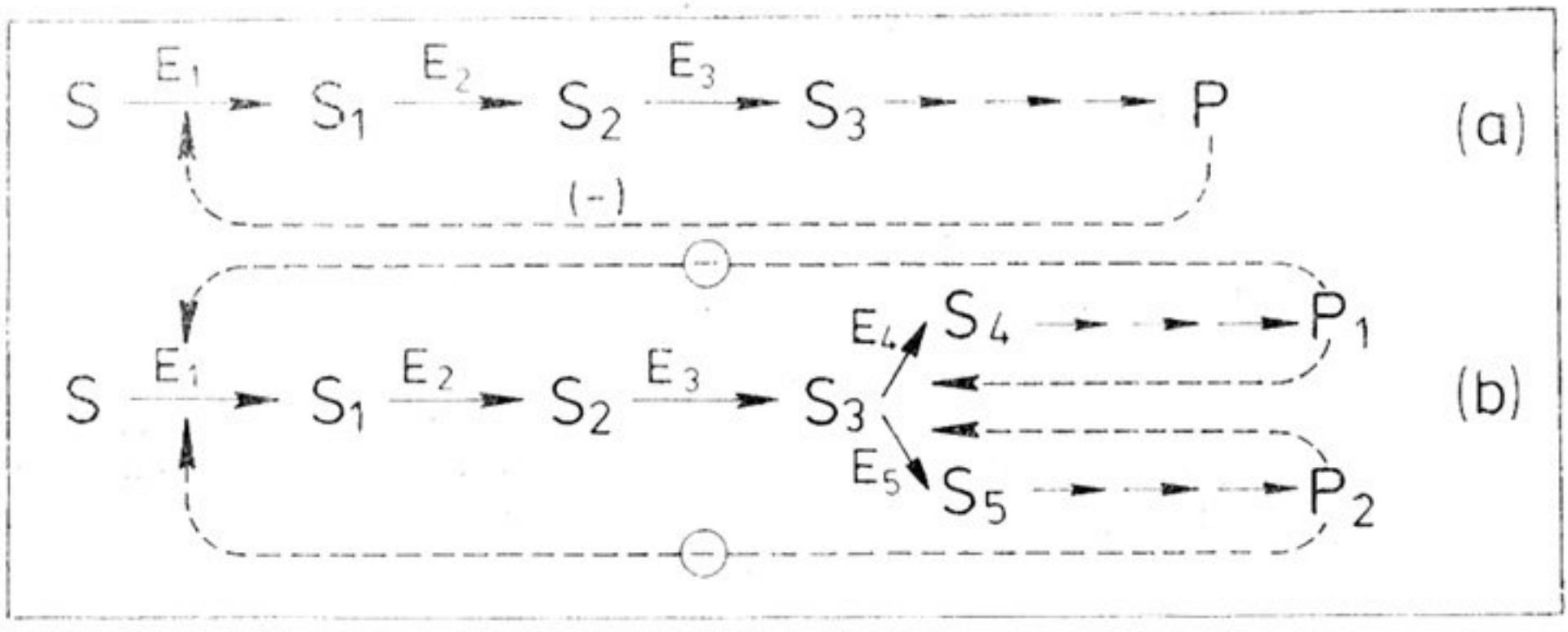


Fig.3.25 **Modularea activităţii enzimelor allosterice**

- ◆ - inhibiţie feed-back într-o cale metabolică lineară;
- ◆ - inhibiţii feed-back în căi metabolice cu ramificaţii.

Inhibiţia prin intermediul produşilor finali de reacţie, care intervine în toate etapele de biosinteză a compuşilor de importanţă biologică, este unul din multiplele mecanisme care acţionează în reglarea metabolismului intermediar.

Acest tip de inhibiţie s-a numit inhibiţie prin produs final, **inhibiţie de tip feed-back**

sau **retroinhibiţie**; enzimele inhibate au fost denumite "**enzime allosterice**".

Enzimele allosterice intervin în controlul şi reglarea diferitelor secvenţe dintr-un lanţ metabolic, ceea ce constituie un fenomen necesar în evoluţia proceselor metabolice. Participarea enzimelor allosterice în mecanismele de reglare şi control ale diferitelor căi metabolice se încadrează în **teoria allosterică** (Jacob - Monod -Changeux, premiul Nobel 1965) ce se bazează pe interacţiuni care se manifestă prin procese de **activare** şi de **inhibiţie.**

Termenul "**allosterism**" desemnează proprietatea caracteristică a enzimelor allosterice de a funcţiona prin variaţii (**allo-**) în anumite limite, ale conformaţiei lor tridimensionale (**-sterism**). Efectorul allosteric care se leagă la situsul allosteric modulează anumite **tranziţii** între diferite conformaţii pe care le poate lua molecula de enzimă.

3.5.7.5 Postulatele structurii enzimelor allosterice

Enzimele allosterice se caracterizează prin următoarele:

a) - Reacţiile catalizate de enzimele allosterice au un Δ G negativ, fiind deci **ireversibile**;

b) - Enzimele allosterice sunt proteine **oligomere** cu structură **cuaternară**, având un număr par de protomeri (2, 4, 6 etc.) care ocupă poziţii echivalente şi prezintă o structură simetrică;

c) - Enzimele allosterice posedă două situsuri de legare, un **situs catalitic** la care se leagă substratul care este responsabil de activitatea catalitică, şi un **situs allosteric** la care se leagă selectiv şi reversibil - **efectorii allosterici**; aceste situsuri pot fi ocupate simultan;

d) - Comportarea cinetică a enzimelor allosterice este diferită de cea postulată prin teoria Michaelis - Menten. Relaţia dintre concentraţia substratului şi viteza de reacţie (curba de saturare cu substrat) indică pentru enzimele allosterice o curbă cu aspect **sigmoid**, spre deosebire de celelalte enzime pentru care curba are aspect **hiperbolic**.

Aspectul sigmoidal al curbei la enzimele allosterice este datorat structurii oligomere a acestora, respectiv existenţei mai multor situsuri într-o moleculă în care se exercită efecte de **cooperare**.

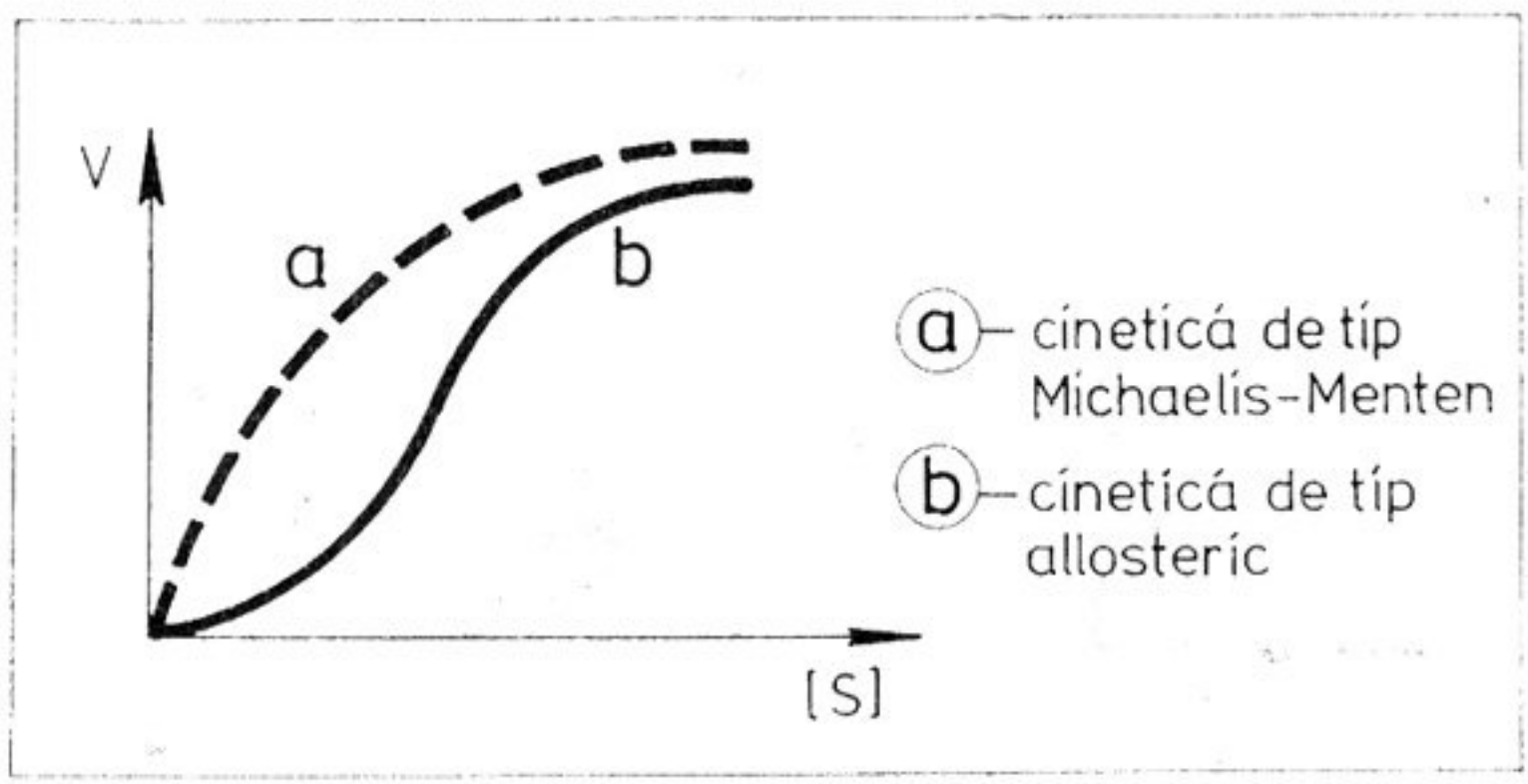


Fig.3.26 **Curba de saturare cu substrat**
a) - pentru enzime obişnuite
b) - pentru enzime allosterice

e) - Intre situsul catalitic şi situsul allosteric există interrelaţii mutuale, deşi legarea efectorului allosteric este independentă de legarea substratului.

3.5.7.6 Mecanismul de acţiune al enzimelor allosterice

Asemănarea funcţională dintre enzimele allosterice şi hemoglobină, sau mai precis relaţia sigmoidală dintre concentraţia substratului şi viteza iniţială la enzimele allosterice cu cea dintre presiunea parţială a oxigenului şi legarea lui de hemoglobină a dus la apariţia a două modele în legătură cu modul de acţiune al enzimelor allosterice.

1) - **Modelul concertat simetric** dat de Monod - Wyman - Changeux (MWC)
2) - **Modelul secvenţial** propus de Koshland - Nemethy - Filmer (KNF).

Cele două modele au câteva elemente comune:

a) - Monomerii "cooperează" în fixarea substratului şi, deci, în desfăşurarea procesului catalitic; prin cooperare se înţelege că la fixarea substratului monomerii se influenţează reciproc.

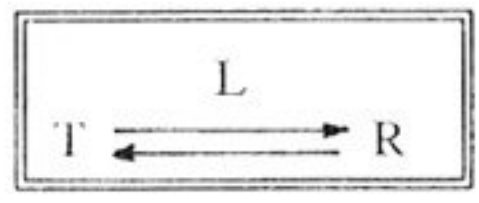
Fixarea substratului de un monomer poate să mărească capacitatea de fixare a acestuia de către ceilalţi monomeri (**cooperare pozitivă**) sau poate diminua capacitatea de fixare a acestuia de către ceilalţi monomeri (**cooperare negativă**).

Cooperarea se referă atât la interacţia centrelor active (centre de acelaşi tip) fiind **cooperare homotropă**, ca şi între centrele active şi locusurile allosterice fiind interacţii de tip **heterotrop**. Cele mai multe enzime allosterice sunt de tip mixt **homotrop-heterotrop**.

b) - Interacţiunile între monomerii oligomerului nu implică modificări profunde (formare sau rupere de legături covalente).

Din acest motiv şi pentru faptul că modulatorii allosterici sunt compuşi chimici, în fondul metabolic celular reglarea allosterică se face cu **consum minim de energie**.

c) - Oligomerul poate exista numai în două conformaţii: conformaţia **T (tensionată, constrânsă)**, cu afinitate mică faţă de substrat şi conformaţia **R (relaxată)** cu afinitate mare pentru substrat. Cele două stări se află în echilibru, constanta de echilibru fiind L (constantă allosterică).



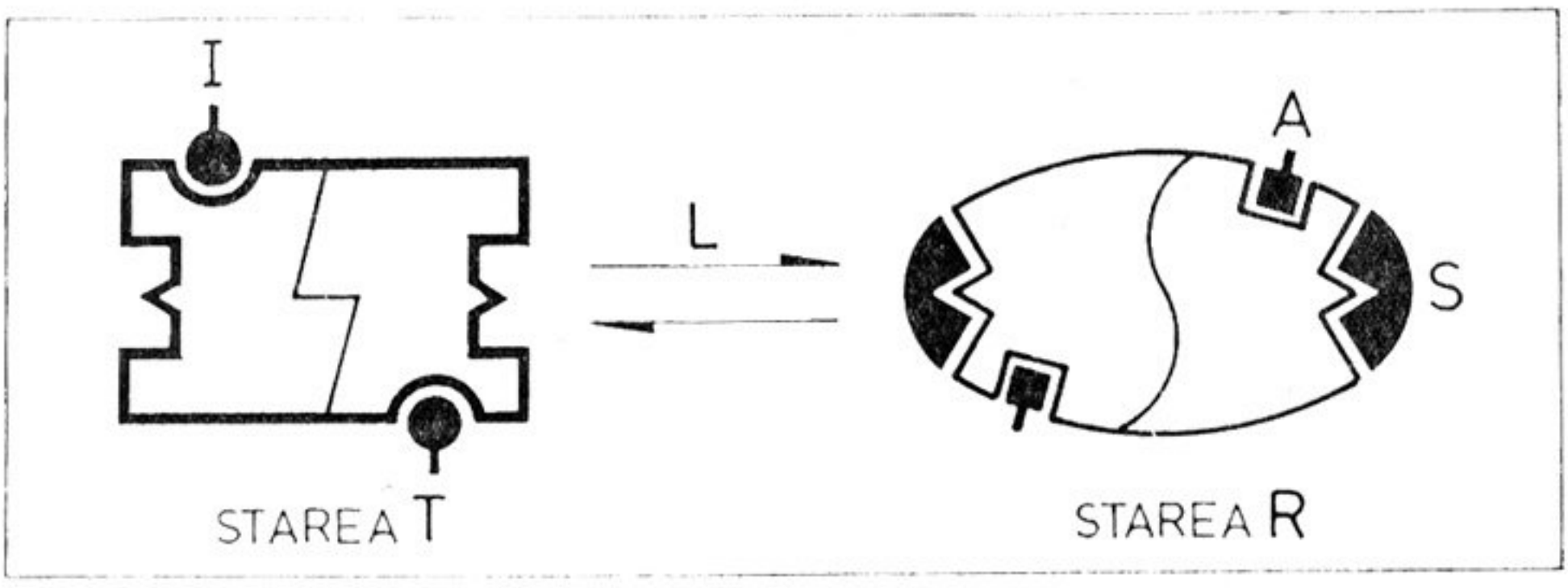


Fig.3.27 **Starea T şi starea R**

In cazul unei interacţii de tip homotrop, fixarea substratului la starea T a unui singur

monomer induce o modificare conformaţională **concertată** a tuturor monomerilor (pentru a se păstra simetria). Cu cât echilibrul T $\rightleftharpoons$ R este mai deplasat spre R, cu atât fixarea substratului se produce mai uşor justificându-se astfel cooperativitatea.

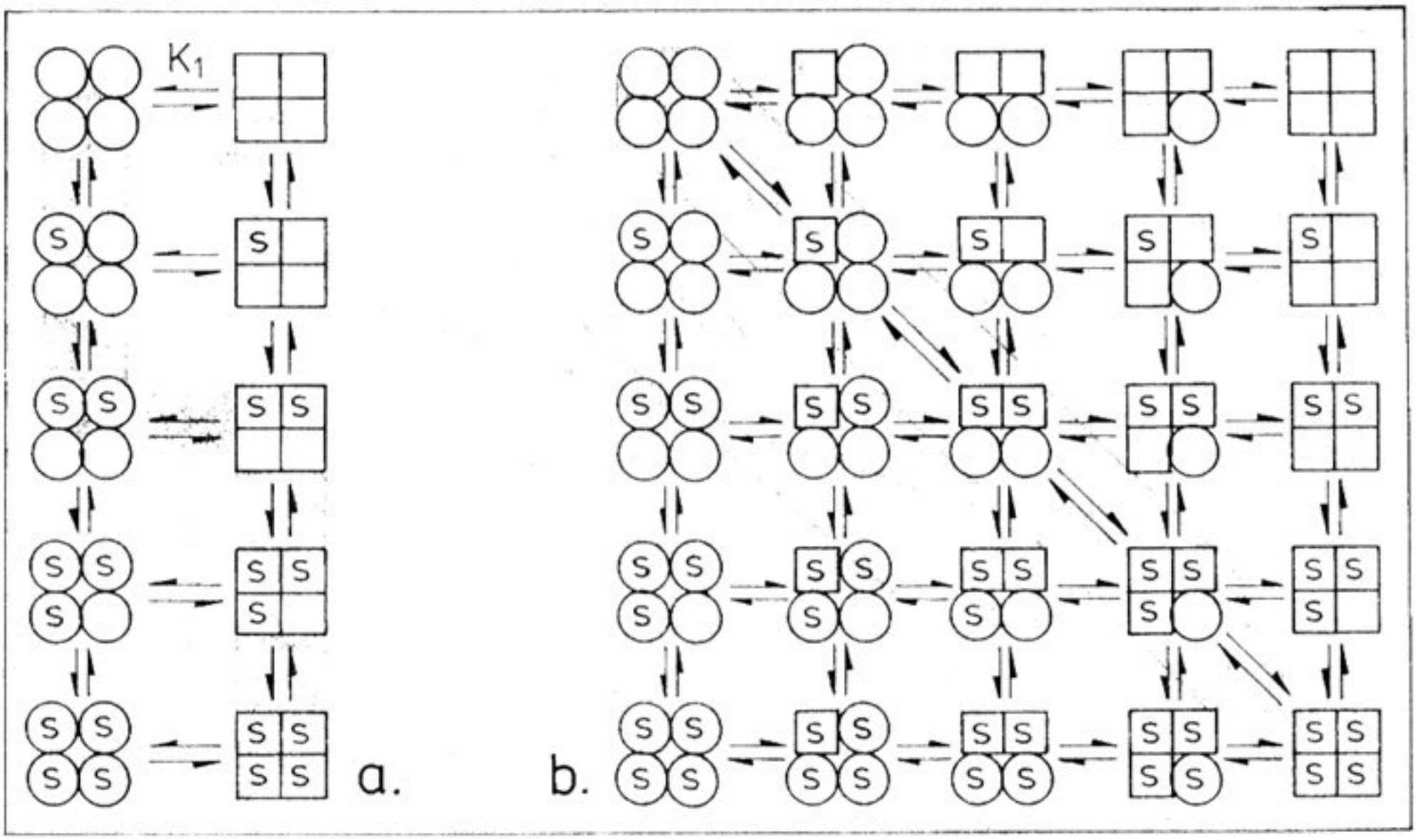


Fig.3.28 **a) Modelul simetric MWC; b) Modelul secvenţial KNF**

La o enzimă allosterică formată din patru monomeri stările posibile şi legarea substratului sunt reprezentate în figura 3.28; probabilitatea maximă de existenţă o au stările din zona haşurată.

Modelul secvenţial este mai elastic în raport cu modelul simetric, căruia i s-a imputat o anume rigiditate (prin postularea obligativităţii simetriei oligomerului), cât şi faptul că nu oferă o interpretare pentru cooperativitatea negativă.

Modelul secvenţial postulează şi el existenţa celor două stări conformaţionale (R,T), dar spre deosebire de modelul simetric, subunităţile pot suferi schimbări secvenţiale individuale ale conformaţiei. Intre stările funcţionale sau nefuncţionale există stări conformaţionale intermediare ale moleculei de enzimă, fiecare având propria-i activitate catalitică. Legarea de către primul monomer a substratului se face cu dificultate datorită stării T a tuturor monomerilor enzimei. Modificarea conformaţiei acestui monomer va induce modificarea corespunzătoare numai a monomerului vecin, care va fixa substratul cu mai multă uşurinţă. In felul acesta modelul secvenţial, în comparaţie cu cel simetric, oferă posibilitatea unei reglări sau modulări mai fine a activităţii enzimelor allosterice.

Eigen consideră cele două modele ca fiind cazuri particulare ale unei scheme mult mai complexe; dependent de particularităţile structurii terţiare şi cuaternare unele enzime acţionează după modelul simetric, altele după modelul secvenţial.

Sub aspect cinetic, **Hill** a stabilit o ecuaţie cu valabilitate generală atât pentru enzimele Michaeline, cât şi pentru cele allosterice.

$$\log \frac{V_0}{V_{max} - V_0} = n_H \log [S] - \log K$$

unde V_0, V_{max} şi [S] au semnificaţiile cunoscute; K - este constantă specifică pentru interacţiunea enzimă ligand; n_H este "**coeficientul Hill**" o constantă empirică ce reflectă atât numărul locusurilor de fixare a liganzilor, cât şi intensitatea interacţiunii acestora.

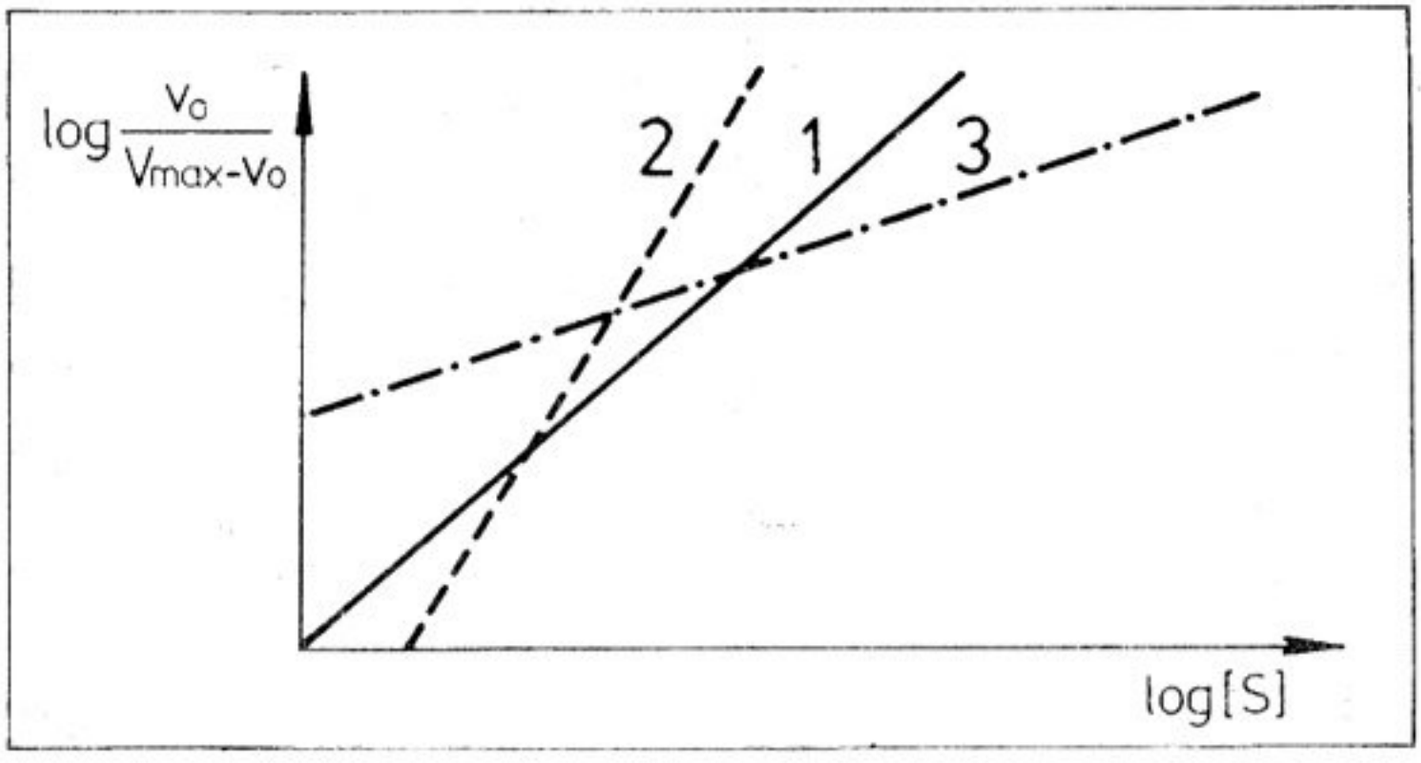


Fig 3.29 **Reprezentarea grafică a ecuaţiei Hill**

1. **pentru enzime lipsite de cooperativitate (pornind din origine)**
2. **pentru enzime cu cooperativitate pozitivă (intersecţie abscisă)**
3. **pentru enzime cu cooperativitate negativă (intersecţie ordonată)**

4 VITAMINE SI COENZIME

4.1 Consideraţii generale

4.1.1 Istoric. Generalităţi

Vitaminele sunt substanţe naturale, diferite ca structură chimică şi proprietăţi, cu activitate biologică în doze foarte mici; nu constituie pentru organism o sursă energetică sau plastică, dar sunt absolut necesare pentru asigurarea funcţiilor vitale. Aceste substanţe de **origine animală, vegetală, microbiană** pătrund în organism prin alimentaţie. In general, cu mici excepţii, organismul animal nu este capabil să elaboreze aceste substanţe din compuşi simpli şi într-o mică măsură la nivelul florei intestinale.Incă din antichitate se ştia că între alimentaţie şi profilaxia anumitor boli există o corelaţie directă. Vitaminele se găsesc răspândite, în special, în regnul vegetal fie ca atare, fie sub formă de **polivitamine**, precursori inactivi care prin diverse transformări se transformă în vitamine. Lipsa vitaminelor din alimentaţie conduce la **boli carenţiale - hipovitaminoze** -determinate de carenţe vitaminice parţiale şi, în fine, **avitaminoze** - determinate de lipsa totală a vitaminelor din alimentaţie. Avitaminozele se manifestă prin anumite "**leziuni biochimice**" asociate cu disfuncţii metabolice, modificări structurale la nivelul unor ţesuturi, îmbolnăviri severe şi infertilitate. Aceste boli pot fi cauzate şi de absorbţia defectuasă la nivelul intestinului, de consumul sporit (graviditate, efort fizic intens, boală etc.), sau de existenţa unor inhibitori specifici. Pentru vitaminele care se găsesc în mai multe variante structurale cu aceleaşi efecte biologice, s-a introdus termenul de **vitamere.**

Istoria vitaminelor, unul din cele mai importante episoade din istoria biochimiei, a avut un impact profund asupra sănătăţii şi a stării de confort, ca şi asupra înţelegerii proceselor catalitice ce au loc în metabolismul organismelor vii. Câteva momente din istoria acestor descoperiri sunt prezentate în tabela 4.1.

Tabela 4.1 **Date importante în istoria vitaminelor**

Anul	Numele (sursa)	Descoperirea. Observaţia.
1500 î.e.n.	Papirusul Eber	Menţionează şi descrie scorbutul.
1750	G.Casal	Semnalează pelagra în Spania.
1887	A.Huber	Izolează vitamina PP.
1897	C.Eijkman	Provoacă experimental boala "beri-beri".
1912	Kazimir Funck	Sugerează denumirea de vitamină.
1912	F.G.Hopkins	Vitaminele nu sunt sintetizate în organismul uman.
1913	Mac Collum	Identifică vitamina A în alimente.
1914	K.Funck	Izolează vitamina B_1.
1916	Mac Collum	Desemnează vitaminele cu litere majuscule latine.

Tabela 4.1 (continuare)

1921	Mac Collum	Izolează vitamina D_2.
1922	Mc Lean Evans	Descoperă vitamina E.
1928	Albert Szent-Györgyi	Izolează vitamina C.
1931	A.Windaus	Sintetizează vitamina D_2.
1932	A.Windaus,D.Wiliams	Determină structura vitaminei B_1.
1933	R.Ruhn	Izolează vitamina B_2.
1934	C.P.Damm şi Mc.Farlane	Descoperă vitamina K în spanac.
1934	P.Györgyi	Descoperă vitamina B_6.
1935	Van Euler,O.Warburg	Descoperă corelaţia vitamine-enzime.
1936	E.Kogl	Descoperă vitamina K în ou.
1936	H.Evans	Izolează vitamina E.
1940	V.Du Vigneaud	Izolează vitamina H.
1953	L.J.Reed,L.C.Gunzalus	Izolează acidul lipoic.
1958	Dorothy Hodgkin	Stabileşte structura vitaminei B_{12}.
1960	Ernest Lester	Extrage vitamina B_{12} din ficat de bou.
1972	Robert Woodward	Sinteza în laborator a vitaminei B_{12}.

4.1.2 Clasificare. Corelaţia vitamine - enzime. Antivitamine

Din punct de vedere structural, vitaminele aparţin unor clase de substanţe foarte diferite şi singurul criteriu de diferenţiere arbitrar al acestora este **solubilitatea**. Se disting:

I. **Vitamine liposolubile** (solubile în lipide şi în solvenţi organici): Vitaminele A, D, E, K.

II. **Vitamine hidrosolubile** (solubile în apă): Vitaminele B (B_1, B_2, B_6, B_{12}, B_{15}), acidul pantotenic, biotina, nicotinamida, acidul lipoic, acidul folic, acidul para-aminobenzoic, vitaminele P, vitamina C.

Majoritatea vitaminelor hidrosolubile deţin un rol major în reacţiile biochimice catalizate de enzime, funcţionând în calitate de **coenzime**.

Vitaminele cu rol de coenzime participă direct la manifestarea activităţii enzimelor respective, fie ca vitamine propriu-zise, fie ca derivaţi ai acestora sub formă de esteri fosforici, esteri pirofosforici şi nucleotide; aceste vitamine cu funcţii de coenzime intervin în reacţii de oxidoreducere şi de transfer al unor grupări chimice.

Exista unele vitamine care acţionează şi în procesele de **oxidoreducere** din organism (vitamina C, E, K, Biotina).

Există compuşi de constituţie foarte asemănători cu vitaminele, analogi structurali ai acestora - **antivitamine** - care prin inhibiţie competitivă împiedică încorporarea vitaminelor în sistemele enzimatice în care joacă rolul de coenzime; afectează sistemele enzimatice, la care participă vitaminele, deturnează evoluţia normală a anumitor procese biochimice cu repercusiuni nefavorabile pentru buna funcţionare a organismului.

Ca antivitamine se comportă antibioticele, sulfonamidele şi chiar unele enzime care inactiveaza diferite vitamine cum ar fi **ascorbaza** care acţionează asupra vitaminei C, **tiaminaza** care acţioneaza asupra vitaminei B_1, **lipoxigenaza** oxidează provitaminele A.

Nomenclatura vitaminelor este eterogenă, coexistând atât denumiri chimice, cât şi denumiri empirice uzuale.

Denumirea uzuală a diferitelor vitamine poartă indicativul unor litere sau derivă de la efectele fiziologice pe care le determină şi, respectiv, de la efectele produse prin carenţa

lor (vezi tabela 4.3).

In tabela de mai jos sunt prezentate câteva din exemplele mai reprezentative ale corelaţiei **vitamine-enzime**.

Tabela 4.2 **Vitamine cu funcţii de coenzime şi tipurile de reacţii enzimatice la care participă**

Nr. crt.	Vitamină.	Coenzimă.	Tipul de reacţie.	Gruparea transferată.
1.	Riboflavină (B_2).	Flavin adenin dinucleotid(FAD).	Oxido-reducere.	H
2.	Nicotinamidă (PP).	Nicotinamid adenin dinucleotid (NAD).	Oxido-reducere.	H
3.	Tiamină (B_1).	Tiamin pirofosfat.	Transfer, grupare acil.	O || R - C-
4.	Acid lipoic.	Acid lipoic.	Transfer grupare acil.	O || R - C-
5.	Acid pantotenic.	Coenzimă A.	Activare şi transfer grupare acil.	O || R - C-
6.	Piridoxal (B_6).	Piridoxalfosfat.	Transaminarea aminoacizilor.	$-NH_2$
7.	Biotină.	Biotină.	Fixare CO_2.	CO_2
8.	Acizii folici.	Tetrahidrofolat (FH_4).	Transfer fragmente monocarbonate	$-CH_2-OH, CO_2$ $-CH_3$, -CHO
9.	Corinoide (B_{12}).	Coenzimă (B_{12}).	Conversia metil-malonil CoA.	Rearanjare intramolecula-ră.

4.2 Vitamine liposolubile.

Din această categorie fac parte vitaminele A, D, E, K, având ca o caracteristică esenţială insolubilitatea în apă şi solubilitatea în solvenţi organici.

Catena laterală a vitaminelor din această categorie este formată din resturi de izopren sau izopentan şi reprezintă faze intermediare în sinteza de colesterol.

Tabela 4.3 **Vitamine, roluri principale şi efecte carenţiale**

Vitamine	Rol biologic principal	Efecte carenţiale principale
Retinoli (A)	Chimism vizual	Hemeralopie Xeroftalmie Keratomalacie
Calciferoli (D)	Metabolismul fosfocalcic	Rahitism
Tocoferoli (E)	Antisterilic Antioxidant	Sterilitate Miodistrofie
Menaftone (K)	Biosinteza protrombinei	Hemoragii
Tiamine (B_1)	Decarboxilare	Polinevrită
Riboflavina (B_2)	Transfer H	Dermatite
Nicotinamida (PP)	Transfer H	Pelagră şi dermatite
Piridoxina (B_6)	Metabolism aminoacizi	Dermatite
Biotina	Carboxilare	Dermatite
Acizi folici	Transfer unităţi monocarbonate	Anemie
Acid pantotenic	Transfer grupări acil	Dermatite
Acid p.amino benzoic	Formarea acizilor folici	Tulburări de creştere
Corinoide (B_{12})	Biosinteza Hem Biosinteza ADN	Anemie pernicioasă
Acid ascorbic	Oxido-reducere	Scorbut
Bioflavonoide	Permeabilitate	Fragilitatea vaselor sanguine

4.2.1 Vitaminele A

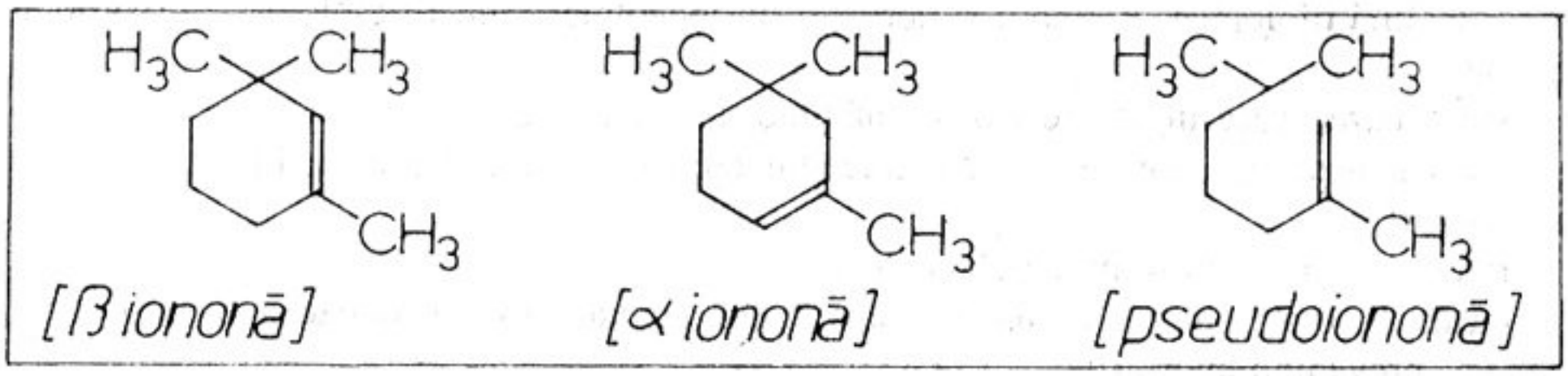
Vitaminele A sau **retinolii** se găsesc raspândite în natură sub formă de provitamine, făcând parte din clasa **carotenilor**, care sunt de origine exclusiv vegetală.

Plantele nu sintetizează retinoli, prezenţa acestora în diferitele ţesuturi animale rezultând din transformarea provitaminelor ingerate.

Carotenii sunt pigmenţi nesaturaţi polienici, cu catene constituite din 20-50 atomi de carbon, derivaţi ai condensării izoprenului, prezentând o largă răspândire în toate plantele (unde se găsesc în asociere cu clorofila), în alge şi microorganisme. Carotenii se caracterizează din punct de vedere structural printr-un sistem de duble legături conjugate şi prin prezenţa la capetele catenei a unor cicluri iononice: α, ß şi γ pseudoiononice.

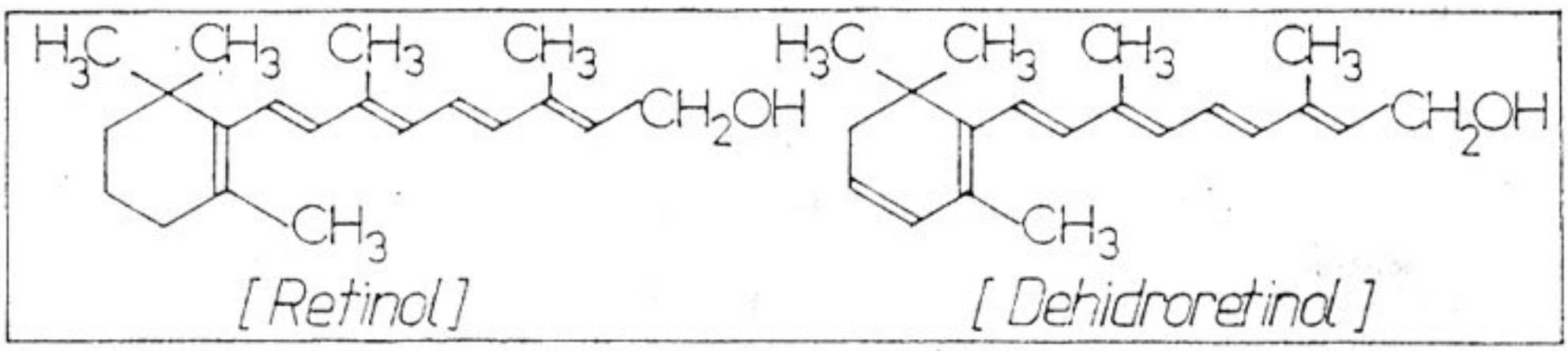
Carotenii ingeraţi se absorb prin peretele intestinal în prezenţa lipazelor şi a sărurilor biliare: absorbţia este însoţită de reacţii de oxidare şi izomerizare.

Carotenoidele absorbite se acumulează în diferite organe, mai ales în ficat, ovare, lapte şi gălbenuşul de ou sub formă de esteri cu acizii graşi superiori.

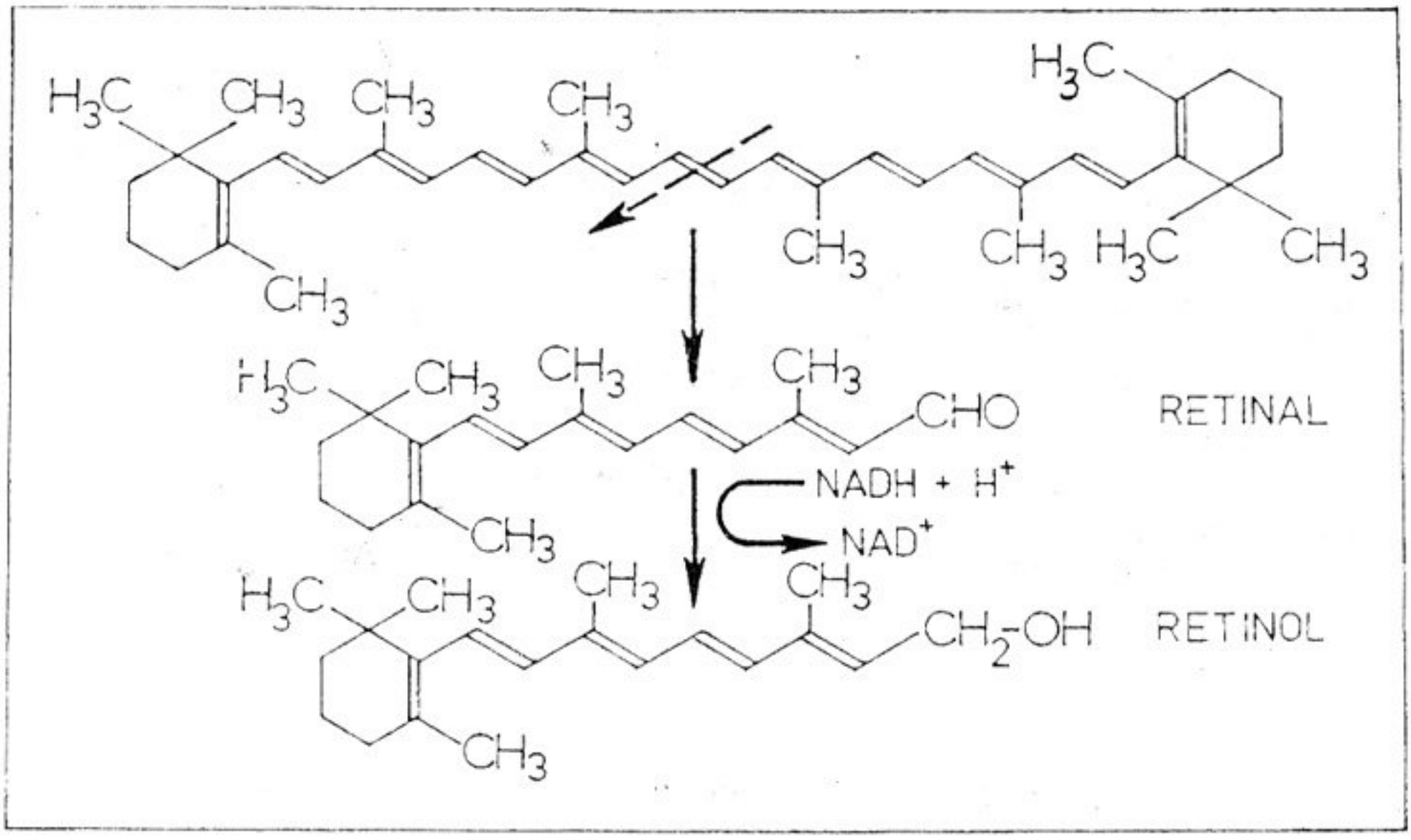


Transformarea carotenilor în vitamina A se face la nivelul ficatului sau peretelui intestinal.

Structură şi proprietăţi. Retinolii sau vitamina A se prezintă în două forme structurale denumite **retinoli** (vitamina A_1) şi **dehidroretinoli** (vitamina A_2), ambele forme sunt alcooli primari nesaturaţi conţinând un ciclu beta-ononic, care le conferă activitatea biologică şi o catenă laterală cu 9 atomi de carbon.



Formarea retinolilor în organismul animal se produce prin scindarea oxidativă a carotenilor în prezenţa enzimei **carotenaza**. Cel mai important dintre caroteni este beta-carotenul din care se obţin prin hidroliză enzimatică doi moli de vitamina A_1.



Retinolul manifestă cea mai intensă activitate vitaminică, iar produsul de oxidare al acestuia (acidul retinoic) are numai 40% activitate, iar dehidroretinolul 60% din cea a retinolului.

Roluri biologice. Retinolii şi derivaţii lui îndeplinesc funcţii biologice şi fiziologice multiple:

- ♦ - stimulează procesul de creştere în înălţime şi în greutate;
- ♦ - previn apariţia unor leziuni ale tractului epitelial, keratinizarea epidermei şi a mucoaselor;
- ♦ - intervin în biosinteza proteoglicanilor;
- ♦ - asigură funcţionarea normală a aparatului genital, spermatogeneza şi reproducţia normală, prevenind avorturile;
- ♦ - stimulează organele hematopoetice;
- ♦ - protejează epiteliile, cu activitate antiinfecţioasă şi conferă rezistenţă organismului;
- ♦ - intervin în funcţionarea normală a ochiului, cu rol în biochimia procesului vizual.

Biochimia procesului vizual. Procesul vederii se realizează în cadrul unui "**ciclu vizual**" la care participă retinalul, retinolul şi pigmenţii fotosensibili de natură proteică: **rodopsină** şi **porfiropsină** - în celule din retină tip "**bastonaşe**" şi **scotopsină** şi **idopsină** - în celule de retină tip "**conuri**". Retinolul şi retinalul intervin în ciclul vizual ca stereoizomeri.

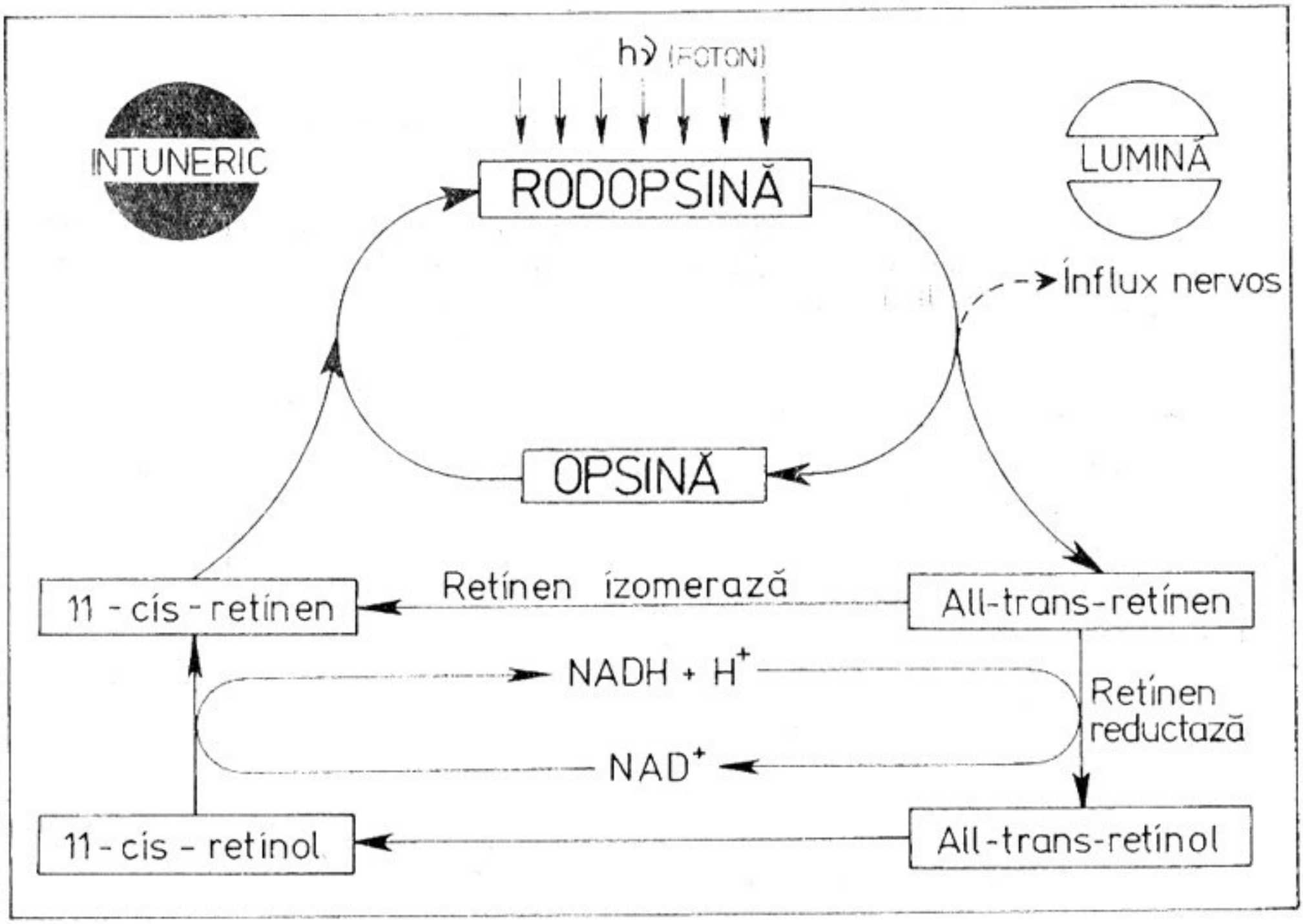


Fig. 4.1 **Ciclul rodopsinei**

Senzaţia luminoasă, mediată de bastonaşe, ia naştere în urma absorbţiei cuantelor de lumină de către rodopsină. Absorbţia de lumină determină însă descompunerea rodopsinei în opsină şi retinen (all-trans); aceste transformări sunt asociate cu producerea **influxului nervos.** Pentru recepţia unei noi cuante de lumină este necesară refacerea rodopsinei. Refacerea rodopsinei are loc relativ încet la întuneric şi în stratele profunde ale bastonaşelor (unde lumina nu pătrunde), proces catalizat de enzima **retinen-izomeraza**. O mare parte din retinen (all-trans) este redus sub influenţa unei dehidrogenaze alcoolice (NADH dependentă) transformându-se în vitamina A care trece în sânge; rezultă că refacerea rodopsinei va depinde de cantitatea de vitamină aflată în circulaţie.

Se admite că forma cis a retinenului are o configuraţie care se potriveşte mai bine decât cea a formei trans cu dispoziţia spaţială şi suprafaţa exterioară a opsinei. De aceea între grupul aldehidic al 11-cis-retinenului şi un grup amino liber dintr-un aminoacid diaminomonocarboxilic cuprins în opsină are loc o condensare cu formarea unei baze Schiff de tipul R-CH=N-opsină (în care R = radicalul 11-cis-retinen).

Efectele carenţei vitaminei A. Carenţa în retinol poate fi consecinţa unei alimentaţii sărace în provitamine, a unor defecte de absorbţie a vitaminelor respectiv a provitaminelor, sau imposibilităţii conversiei provitaminelor în vitamine. La om carenţa în vitamina A se manifestă prin mai multe semne clinice, care după gravitatea lor au fost denumite: **hemeralopie, xeroftalmie** şi **keratomalacie**. **Hemeralopia**, sau "orbul găinilor", se manifestă prin aceea că bolnavii nu mai sunt capabili să se orienteze la lumina crepusculară. Dacă avitaminoza A este accentuată sau de lungă durată, edemului retinian îi urmează modificări degenerative mai mult sau mai puţin grave: uscarea conjunctivei, sclerozarea corneei, orbirea; această stare este cunoscută sub denumirea de **xeroftalmie**. **Keratomalacia** este determinată de o avitaminoză A avansată şi se manifestă prin înmuierea şi sclerozarea corneei, concomitent cu o atrofie şi o regresiune a globului ocular. Keratomalácia este o afecţiune acută care progresează rapid şi de obicei, afectează ambii ochi.

La nivelul aparatului urogenital apar modificări ale epiteliilor germinative ale testicululi, mucoasei uterine şi vaginale; prezenţa celulelor keratinizate în lichidul vaginal duce la un estru prelungit denumit **colpokeratoză**.

Surse de vitamina A. Atât în organismul animal cât şi în plante se pot găsi diverşi carotenoizi, dintre care unii sunt dotaţi cu proprietăţi de provitamine A. La animale, este probabil să fie de origine exogenă alimentară.

Tabela 4.4 **Conţinutul în vitamina A a unor alimente**

Sursa.	UI/100 g.	Sursa.	UI/100 g.
Unt	2400	Tomate	1100-3000
Ouă	1100-1140	Banane	500
Lapte	70-230	Cartofi	3800-7700
Brânză	1200-1740	Ulei de peşte	40000-400000
Ficat	4000-45000	Somn	80-25000
Carne de vită	0-50	Sardele	136-290
Ulei de palmier	100000	Ton	70-200
Morcovi	10000-20000	Zarzavat	80-1200

UI/100 g. - Unităţi internaţionale la 100 g aliment.

In tabela 4.4 sunt prezentate date privind conţinutul în vitamina A al unor alimente (după Matilda Rosetti Colţoiu, 1980).

4.2.2 Vitaminele D

Mai întâi a fost cunoscută la copii maladia datorită carenţei vitaminei D, **rahitismul infantil** caracterizată printr-o mineralizare întârziată a oaselor; oasele nu ajung să-şi fixeze **hidroxilapatita** în cantitate suficientă şi, de aceea ele sunt relativ moi şi flexibile. La adulţi boala carenţială corespondentă rahitismului se numeşte **osteomalacie**, caracterizată printr-un bilanţ negativ al calciului. Ambele boli se datoresc unei scăderi a conţinutului scheletului în substanţe minerale.

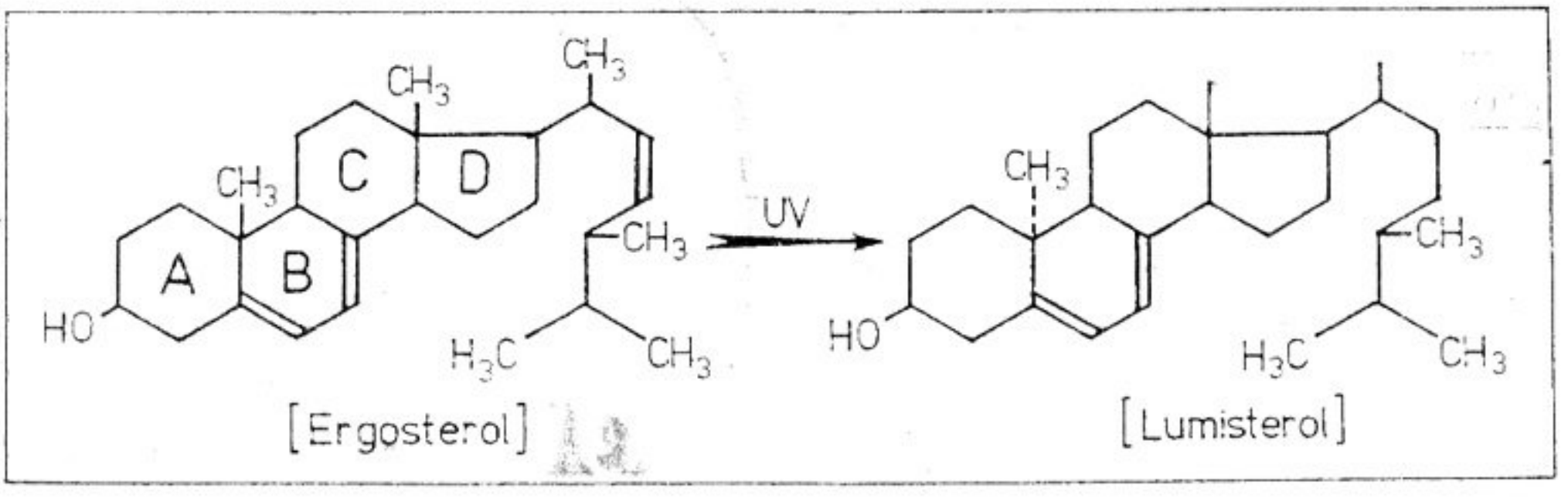
Faptul că vitamina D poate să vindece rahitismul, administrată ca atare sub formă de **untură de peşte** (bogată în vitamina D), a făcut ca această vitamină să fie considerată ca vitamină **antirahitică**.

Vitaminele D se găsesc răspândite în cantităţi mici sub formă de **provitamine** derivând de la **micosteroli**, **fitosteroli** şi **zoosteroli**. Pe lângă aportul exogen relativ scăzut în calciferoli, omul şi animalele beneficiază de căi naturale de obţinere a acestora sub acţiunea **radiaţiilor ultraviolete** ale luminii solare asupra provitaminelor de natură sterolică din piele.

Mecanismul de formare al vitaminelor D. Sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete se realizează deschiderea ciclului B din structura sterolilor cu rol de provitamine şi se constituie un sistem de duble legături conjugate în ciclul B deschis.

Acest proces de transformare a vitaminelor în vitamina D a fost studiat în special la **ergosterol**. Transformarea ergosterolului în vitamina D_2 este unproces fotochimic ireversibil care se produce în funcţie de energie şi de lungimea de undă a luminii absorbite (275-300 nm) şi în care apar ca produşi intermediari: **lumisterolul** şi **tahisterolul**.

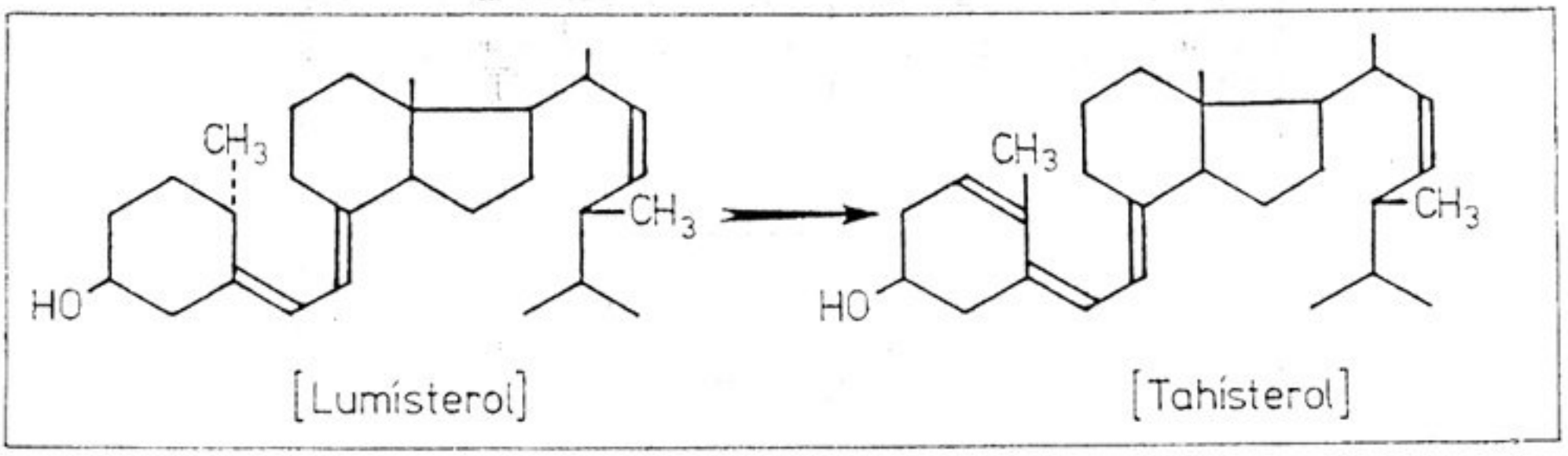
a) Intr-o primă etapă, ergosterolul în care gruparea metil din poziţia 18 se află în faţa ciclurilor A şi B, deci unit prin legătură ß, trece în lumisterol la care acelaşi metil se află în spatele ciclurilor A şi B, deci unit prin legătură α.

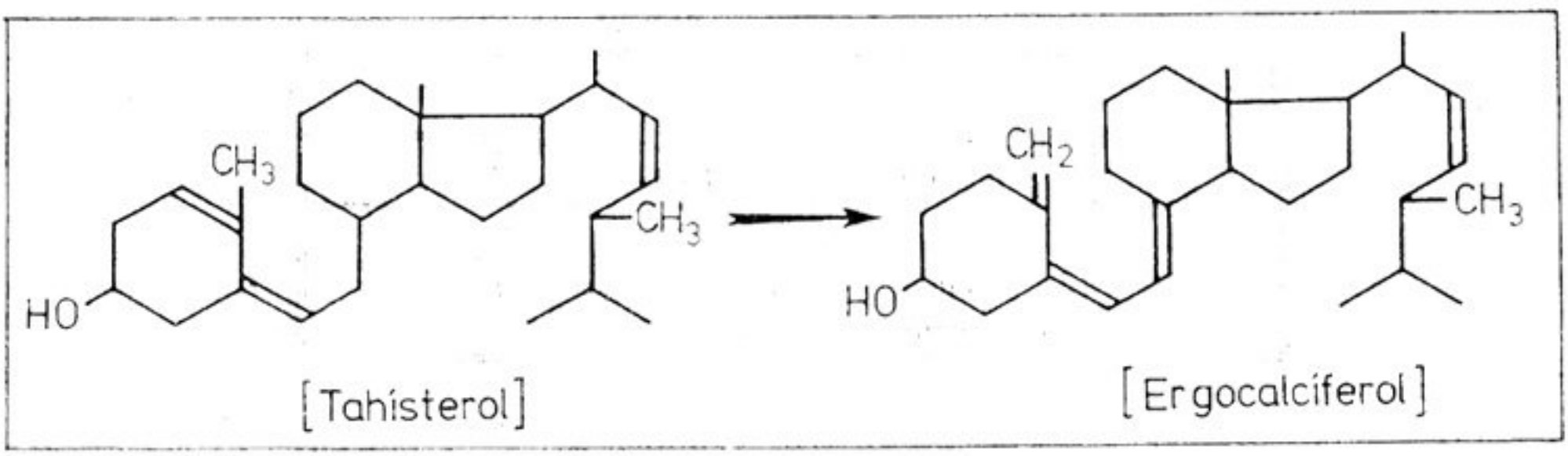


b) In etapa secundară, se rupe legătura între C_9 şi C_{10} din ciclul B, concomitent cu stabilirea unei duble legături între C_1 şi C_{10}. Substanţa rezultată se numeşte **tahisterol** (deşi nu mai este sterol).

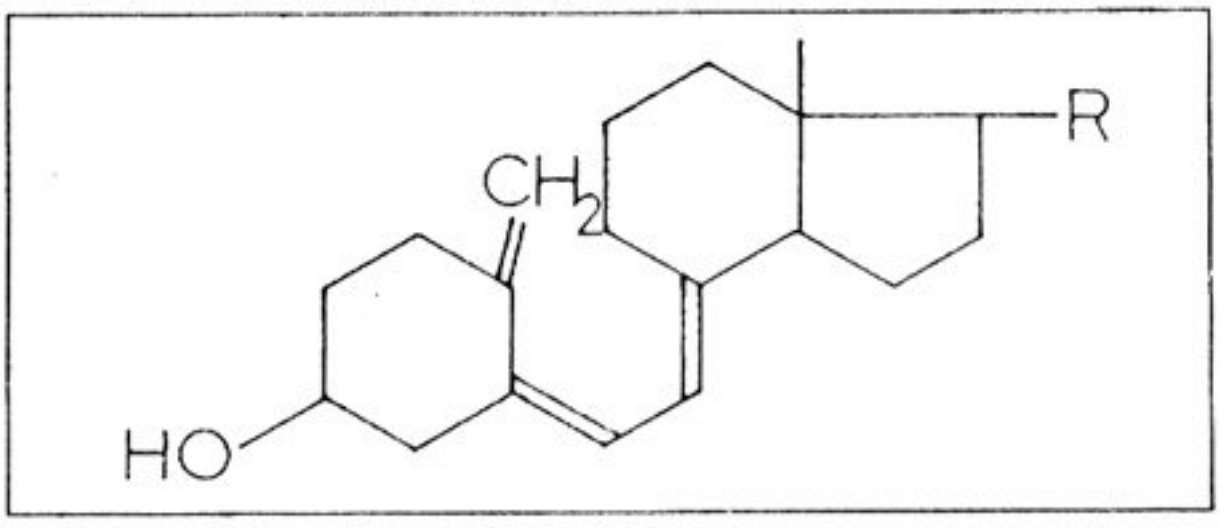
c) In următoarea etapă are loc o rearanjare a dublelor legături care ajung să formeze un

sistem cu trei duble legături. In urma acestei rearanjări, tahisterolul trece în **ergocalciferol**.





Structura generală a vitaminelor D este:



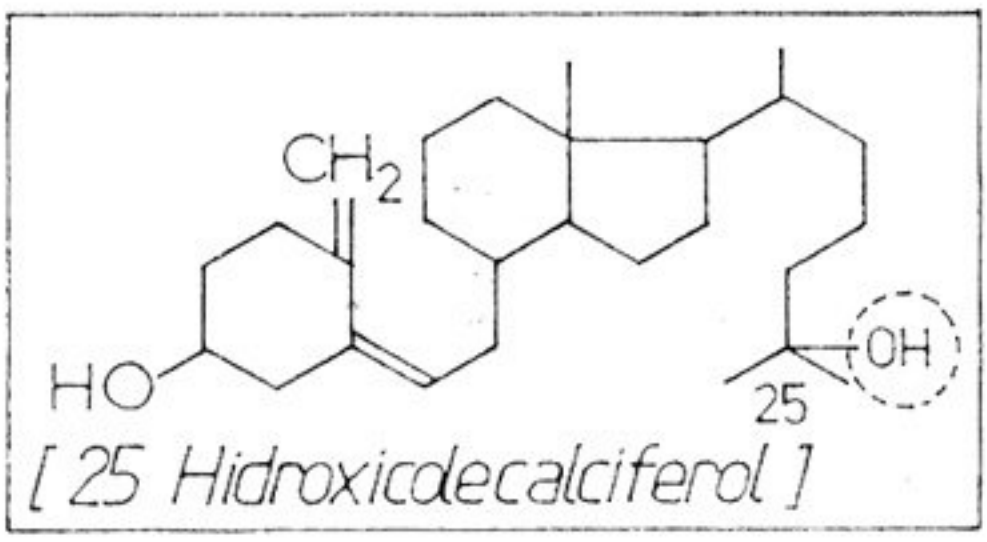
Pentru activitatea biologică este necesară:

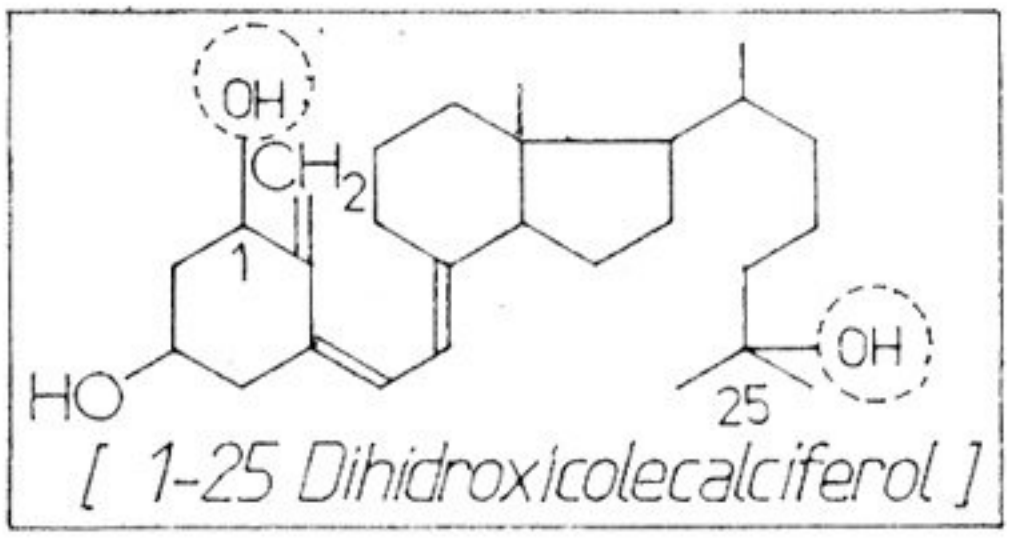
- prezenţa grupei OH în poziţia 3;

-ciclul B deschis;

-prezenţa a trei duble legături conjugate.

Rol biologic. Surse. Pentru organismul animal cei mai importanţi calciferoli sunt: **ergocalciferolul** (vitamina D_2) şi, mai ales, **colecalciferolul** (vitamina D_3). Date recente au demonstrat că vitamina D participă la procesele metabolice sub două forme active obţinute prin hidroxilarea sa suplimentară în poziţiile 1 şi 25.





Formarea acestor compuşi are loc în ficat şi rinichi conform schemei din fig.4.2.

Tabela 4.5 **Structura şi denumirea calciferolilor**

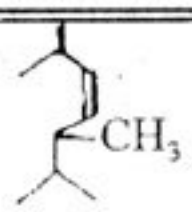
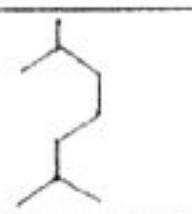
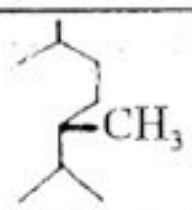
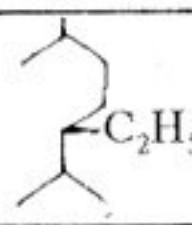
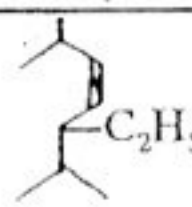
Vitamina	Provitamina	Denumirea	Structura R
D_2	Ergosterol.	Ergocalciferol	
D_3	7-Dehidro-colesterol.	Colecalciferol	
D_4	22-Dihidro-ergosterol.	Dihidro ergocalciferol	
D_5	7-Dehidro-sitosterol.	Dehidro sitocalciferol	
D_6	7-Dehidro stigmasterol.	Dehidro stigmacalciferol	

Fig 4.2 **Circulaţia vitaminei D în organism**

1,25-DHCC se comportă ca un **hormon**. Activitatea sa se manifestă la nivelul intestinului subţire unde controlează şi absorbţia calciului, la nivelul nucleilor celulari unde influenţează transcripţia ARN mesager; participă la formarea sistemelor de transport al calciului, inclusiv a celor controlate de către parathormon.

Calciferolii şi 1,25 DHCC exercită următoarele funcţii:

- ◆ - previn şi vindecă rahitismul;
- ◆ - măresc permeabilitatea celulelor mucoasei intestinale pentru ionii Ca^{2+} şi acţionează ca factori de reglare a calciului în organism;
- ◆ - induc formarea şi controlează producerea unei proteine specifice care leagă calciul în mucoasa intestinală (aceasta proteină **Calmodulină** - leagă şi transportă calciul în raportul de 4 ioni Ca^{2+} la o moleculă de proteină);
- ◆ - asigură menţinerea în raporturi constante a ionilor de Ca^{2+} şi PO_4^{3-}, prin stimularea absorbţiei calciului în intestin şi a resorbţiei renale a fosfaţilor;
- ◆ - intervin în procesul de **osteogeneză**, determinând osificarea normală;
- ◆ - stimulează glicogenogeneza hepatică şi musculară.

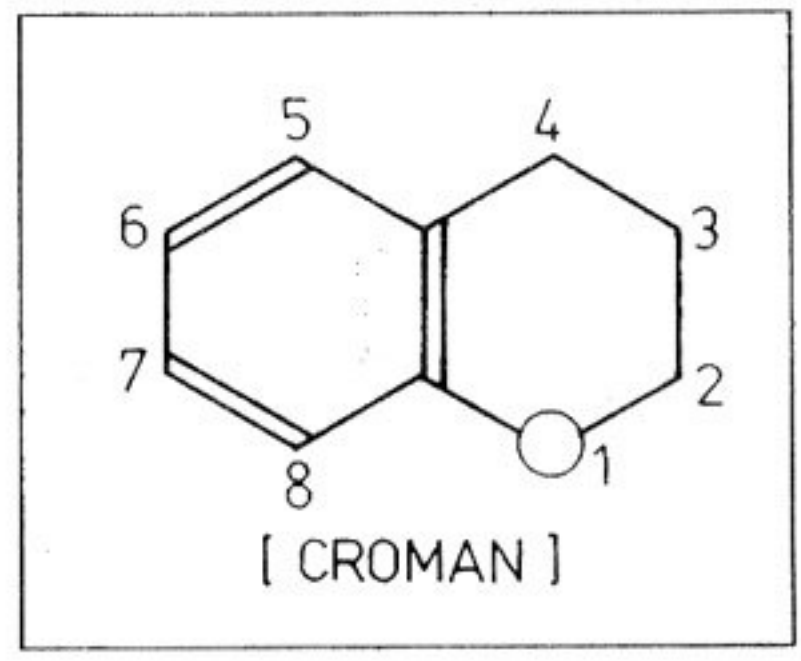
Carenţa vitaminei D determină **rahitismul** la copii, **osteoporoza** şi **osteomalacia** la adulţi, însoţită de o creştere a activităţii fosfatazelor alcaline din ser cu eliberarea consecutivă de fosfor din diferiţii compuşi organici, tetanie datorită scăderii accentuate a calcemiei şi iritabilitate accentuată.

Principalele vitamine D sunt răspândite preponderent în regnul animal (vezi tabela 4.6 - după Matilda Rosetti Colţoiu).

Tabela 4.6 **Conţinutul în vitamina D al unor alimente**

Sursa	UI la 100 g	Micrograme la 100 g
Ulei de ficat de morun	8000 - 12000	200 - 300
Gălbenuş de ou	200 - 500	5 - 12,5
Ficat de vită	20 - 200	0,5 - 5
Unt	40 - 100	1 - 12,5

4.2.3 Vitaminele E



Vitaminele E sau tocoferolii sunt substanţe de origine vegetală care intervin în procesul de fertilitate fiind denumite şi factorii **antisterilităţii**.

Tocoferolii sau vitaminele E reprezintă denumirea generică a unui grup de compuşi chimici derivaţi de la heterocitul **croman** (dihidro benzopiran).

Tocoferolii derivă dintr-o structură de bază comună denumită **tocol** care are grefaţi pe nucleul croman radicalul OH în poziţia 6 şi radicalii metil şi fitol în poziţia 2. In funcţie de natura radicalilor R_1, R_2, R_3, avem toată gama tocoferilor:

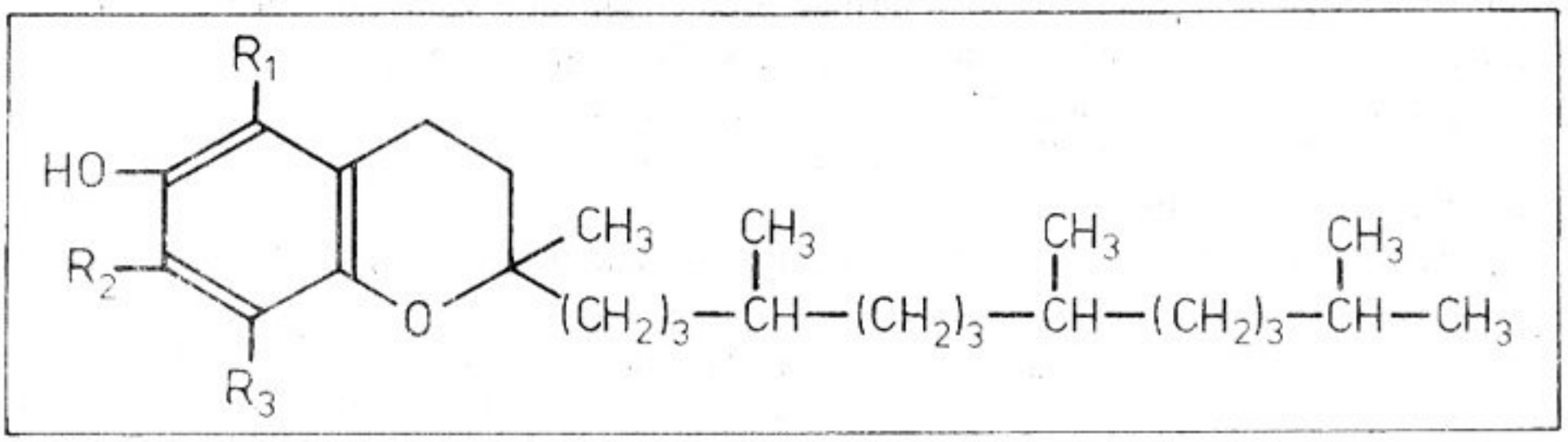
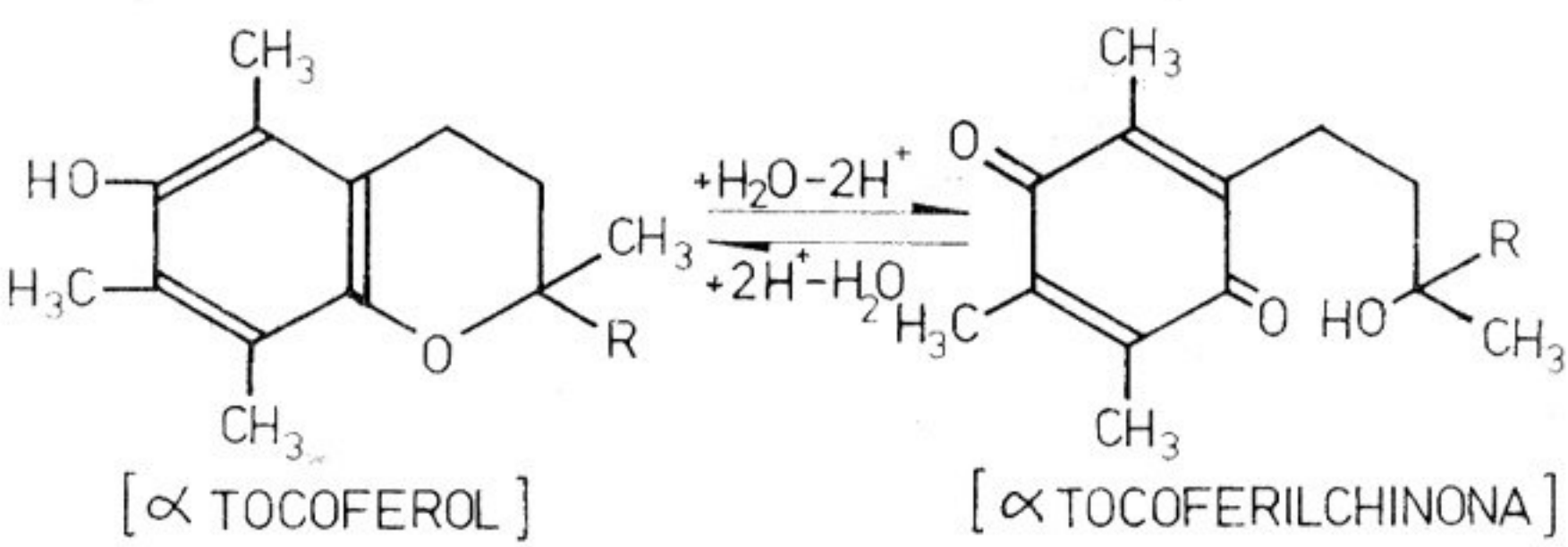


Tabela 4.7 **Constituţia chimică a tocoferolilor**

Tocoferolii	$R_1(5)$	$R_2(7)$	$R_3(8)$	Denumire chimică
Alfa (α)	$-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_3$	5,7,8,- trimetil - tocol
Beta (ß)	$-CH_3$	-H	$-CH_3$	5,8, - dimetil - tocol
Gama (γ)	-H	$-CH_3$	$-CH_3$	7,8, - dimetil - tocol
Delta (δ)	-H	-H	$-CH_3$	8 - metil - tocol
Epsilon (ϵ)	-H	$-CH_3$	-H	7 - metil - tocol
Zeta (ζ)	$-CH_3$	$-CH_3$	-H	5 - metil - tocol

Roluri biologice. Vitaminele E sunt denumite şi vitaminele **antisterilităţii**, deoarece lipsa lor determină la bărbaţi sterilitatea ireversibilă, iar la femei întârzierea dezvoltării embrionului şi avortul. **Activitatea antisterilică** maximă o are α tocoferolul şi scade în sensul $\alpha > ß > \gamma > \delta$.

Tocoferolii manifestă **activitate antioxidantă** protejând contra oxidării şi formării de peroxizi acizi graşi nesaturaţi, retinolii şi carotenii. Proprietatea antioxidantă şi de participare ca transportori de hidrogen în procesele de oxidoreducere se bazează pe următoarea reacţie reversibilă care se petrece cu deschiderea ciclului piranic şi trecerea de la forma croman la forma chinonă.



Activitatea antioxidantă scade în sensul invers activităţii antisterilice (vezi fig.4.3).

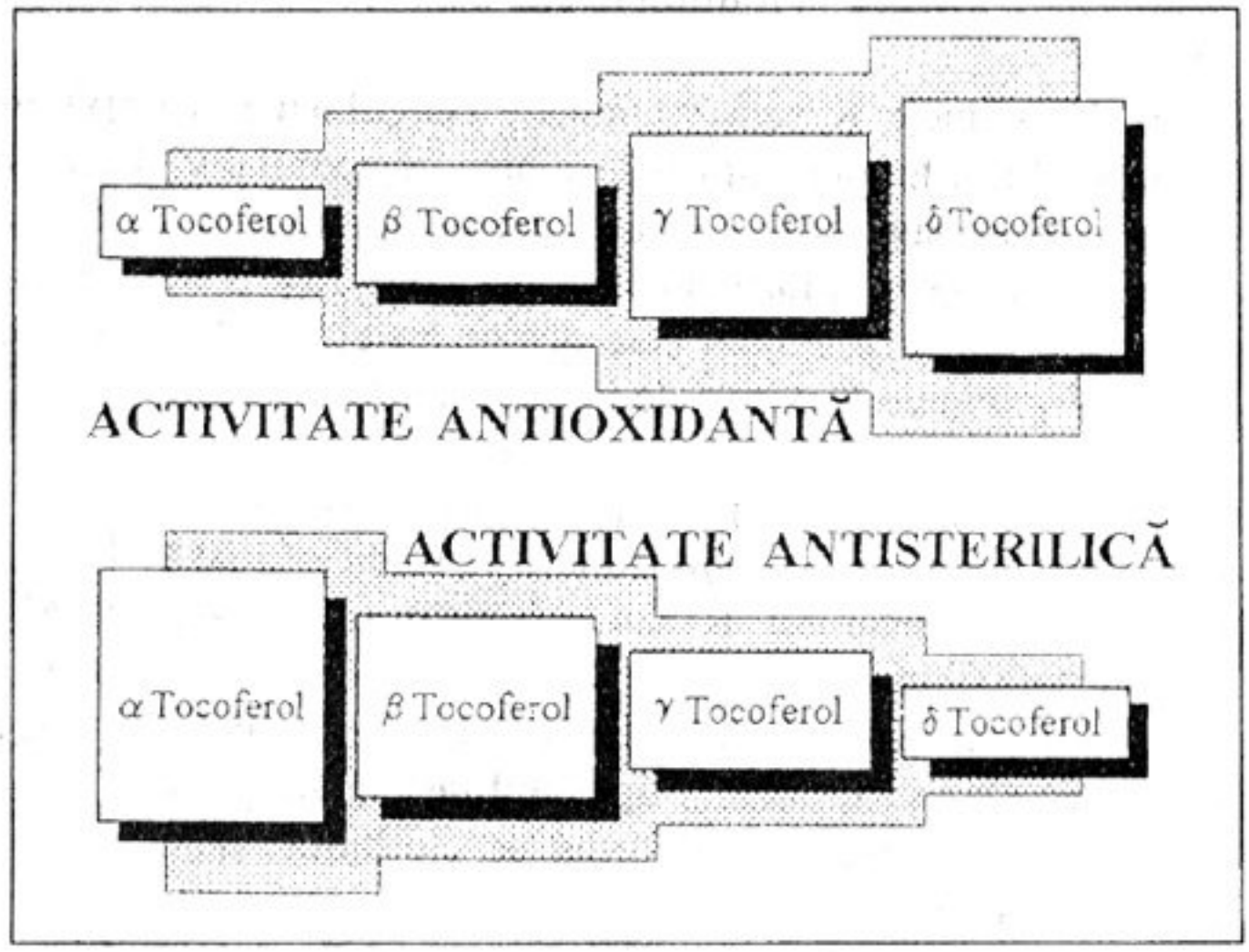


Fig.4.3 **Rolurile biologice ale tocoferolilor**

In celule, tocoferolii sunt localizaţi în **mitocondrii**; aceasta a făcut să se emită ipoteza intervenţiei lor în lanţul respirator prin intermediul sistemului **redox tocoferol - tocoferil chinonă**. De asemenea, tocoferolii protejează anumite enzime care participă în procesul de respiraţie celulară, intervin în controlul vitezei de biosinteză a ADN, favorizează sinteza cromatinei, participă în reglarea consumului de oxigen în ţesutul muscular, cresc rezistenţa organismului faţă de infecţii etc.

Un alt rol specific al vitaminei E în organism este intervenţia sa în metabolismul **seleniului** şi s-a remarcat conlucrarea acestui element cu vitamina E în procese **antioxidante**.

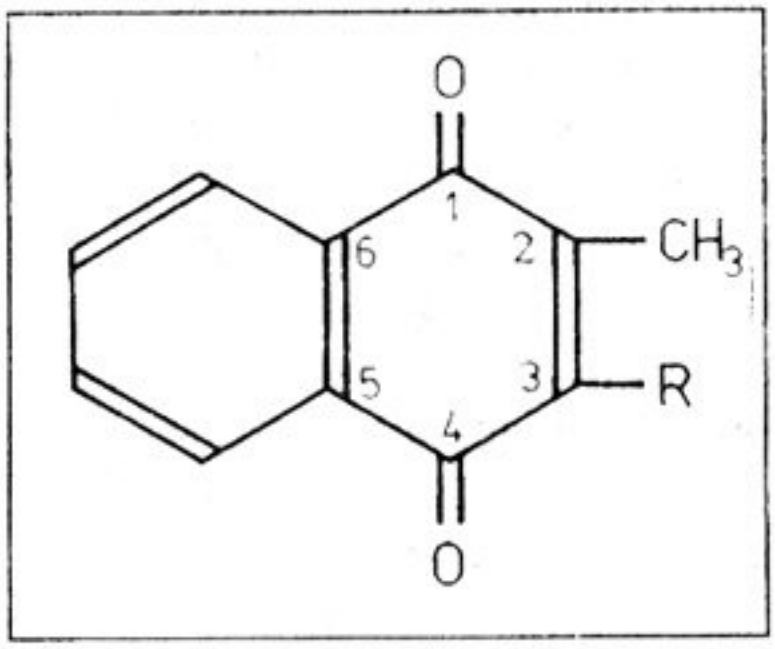
Stare naturală. Vitaminele E sunt foarte răspândite în natură în toate plantele verzi, precum şi în unele microorganisme producătoare de clorofilă. Sursa cea mai bogată în vitamina E o constituie **uleiurile vegetale**, în care conţinutul în vitamina E este proporţional cu cantitatea de acizi graşi nesaturaţi. In organismul animal şi uman tocoferolii provin din alimentaţie, predominând în ţesutul adipos şi în glandele suprarenale; în organismul feminin se găsesc cantităţi globale de tocoferoli mai mari ca în cel masculin.

Tabela 4.8 **Conţinutul în tocoferoli al unor alimente** (După Matilda Rosetti Colţoiu, 1980).

Sursa	mg tocoferol/ 100 g	Sursa	mg tocoferol/ 100 g
Ulei de germen de grâu	225	Salată	3
Ulei de soia	118	Spanac	1,7
Ulei de porumb	100	Usturoi	8
Ulei de floarea soarelui	50	Pătrunjel	5,5
Ulei de arahide	22	Unt	1 - 2
Ulei de germeni de orez	168	Gălbenuş de ou	3 - 5
Ulei de bumbac	92	Rinichi de vită	8 - 13
Ulei de ricin	45	Ulei de ficat de peşte marin	30 - 45

4.2.4 Vitaminele K

Vitaminele K sunt vitaminele **coagulării** sau **antihemoragice**; lipsa lor determină predispoziţii la **hemoragii** (diateze hemoragice) datorită prelungirii timpului de coagulare a sângelui. Sunt sintetizate de către părţile verzi ale plantelor sau de către **flora microbiană** a intestinului gros. **Flora microbiană** constituie o importantă sursă de vitamina K pentru organismul uman şi animal care devine astfel, mai puţin expus carenţei vitaminice K.



Vitaminele K derivă de la **metil naftochinonă**.

Substanţele cu activitate biologică în a căror constituţie intră 2-metil, 1-4 naftochinonă poartă denumirea generică de **menaftone**. Ele se diferenţiază prin natura radicalului R sau a substituenţilor din nucleul naftochinonic.

De precizat că vitaminele K **naturale** fac parte din categoria vitaminelor **liposolubile** în timp ce vitaminele K **sintetice** sub formă de clorhidraţi sunt **hidrosolubile** (vezi tabela 4.9).

Vitaminele K, una în raport cu alta, sunt caracterizate drept **vitamere** (termen introdus pentru vitaminele care prezintă mai multe variante structurale). Ftiocolul (2-metil-3hidroxi-naftochivona), constituent al membranelor lipidice din bacilul Koch, are şi el activitate de vitamonă K.

Tabela 4.9 **Caracteristicile vitaminelor K**

Vitamina.	Solubilitate.	Denumirea ştiinţifică.
Vitamina K_1	Liposolubilă.	Filochinone.
Vitamina K_2	Liposolubilă.	Farnochinone.
Vitamina K_3	Hidrosolubilă.	Menadiona.
Vitamina K_4	Hidrosolubilă.	Diester de menadionă.
Vitamina K_5	Hidrosolubilă.	Clorhidrat de 2-metil 4-amino 1-naftol.
Vitamina K_6	Hidrosolubilă.	Diclorhidratul de 2-metil 1-4 Diamino naftalen.
Vitamina K_7	Hidrosolubilă.	Clorhidratul de 2-metil 1-amino 4-naftol.

Roluri biologice ale vitaminelor K.

Rolul biologic fundamental al vitaminelor K în procesul de coagulare a sângelui este posibil datorită participării acestora în **biosinteza protrombinei**, care intervine în coagularea sângelui, nivelul scăzut al protrombinei (asociat cu diminuarea factorilor VII, IX şi X) determină creşterea **timpului de coagulare** al sângelui (de la 12-15 sec. la 30 sec.) şi fenomene hemoragice (în aceste condiţii protrombina este insuficientă pentru a fi convertită

într-o cantitate corespunzătoare de **trombină**, enzimă proteolitică implicată în etapa finală a procesului de coagulare a sângelui).

Ciroza sau alte afecţiuni hepatice dau efecte de avitaminoză K, deoarece scade capacitatea ficatului de a sintetiza protrombina. Nou născuţii, în primele zile după naştere, nu au vitamină K, din care cauză, hemoragiile sunt extrem de periculoase; din această cauză, preventiv, se administrează vitamina K mamei înainte de naştere, precum şi copilului imediat după naştere. Structurile vitaminelor K sunt prezentate mai jos:

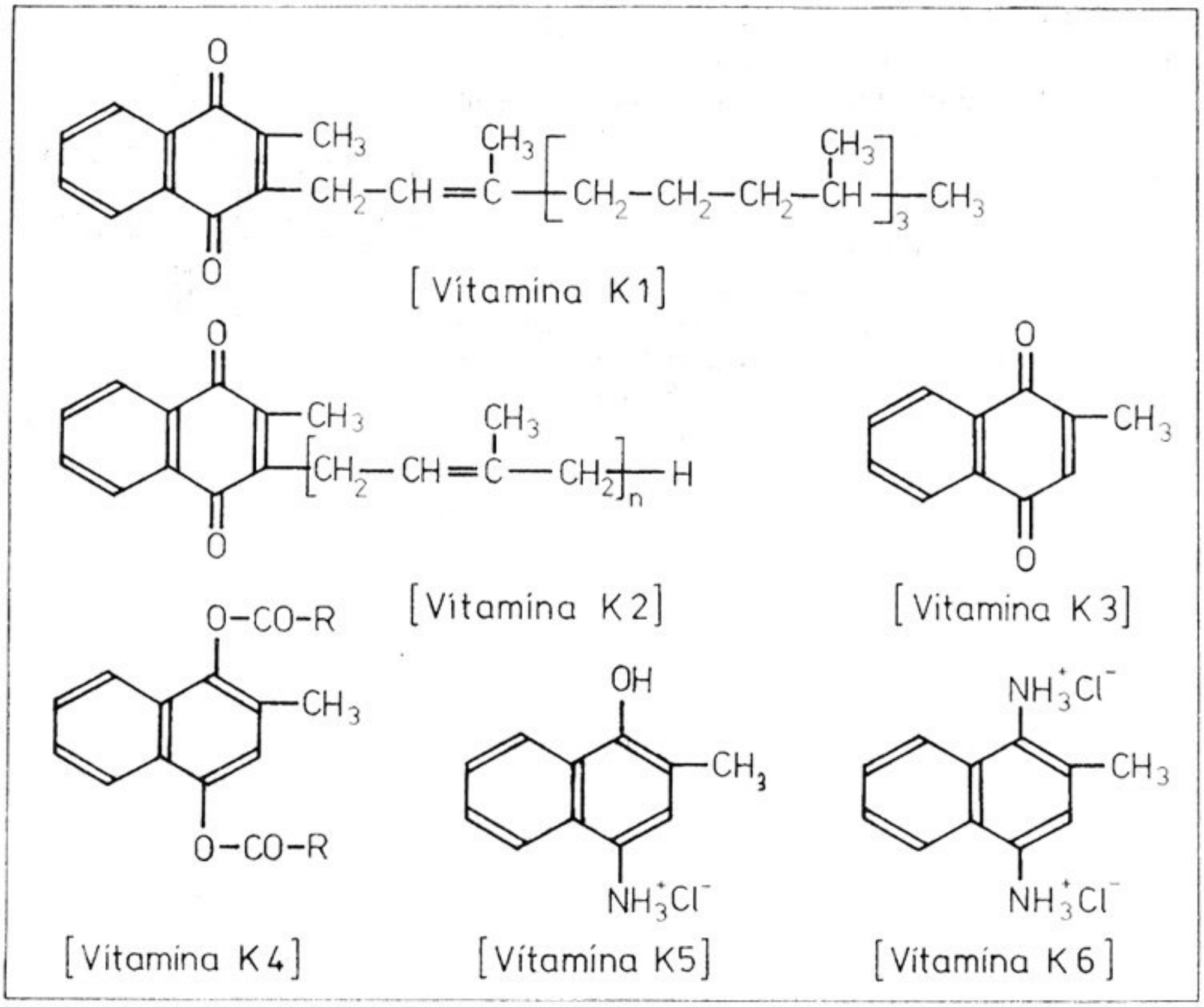
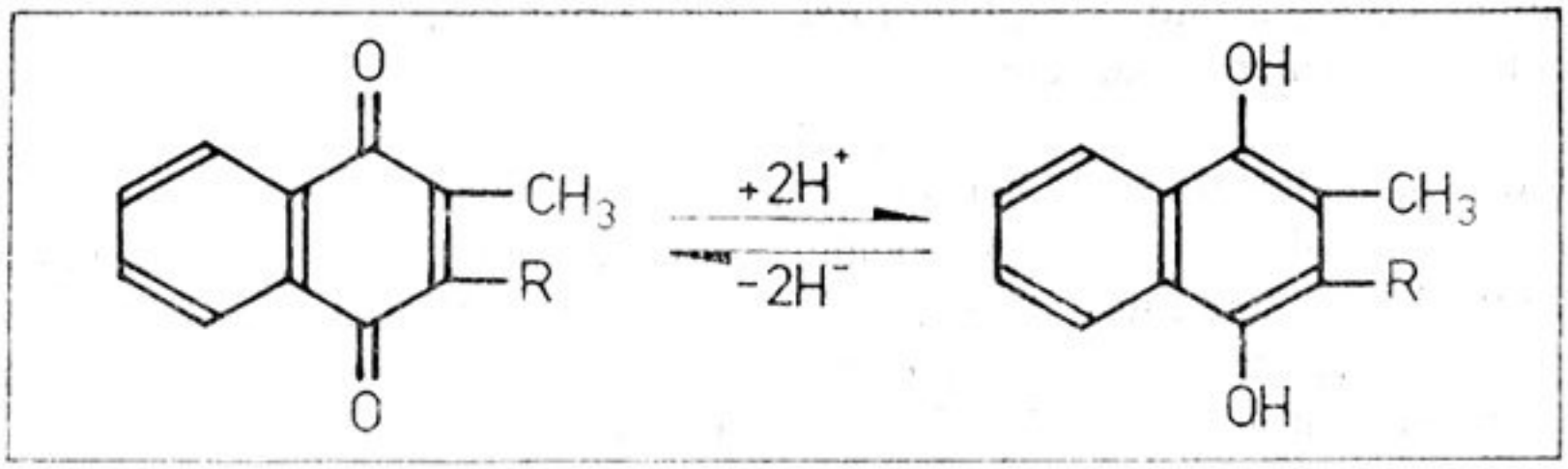


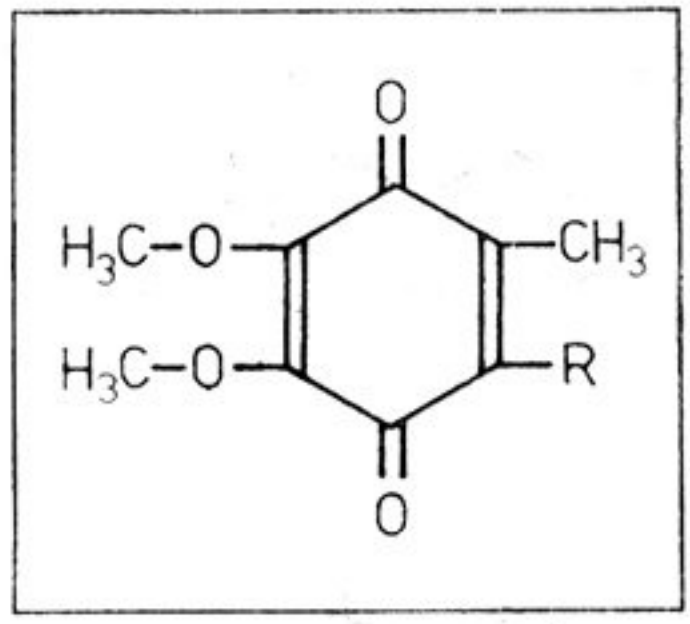
Fig.4.4 **Structurile principalelor vitamine K**

Deoarece **flora intestinală** sintetizează o parte din necesarul de vitamină K, tratamentul cu antibiotice, bacteriostatice, bactericide determină o hipoprotrombinemie; din această cauză tratamentul de mai sus se asociază cu vitamine din complexul B care au rolul de protecţie a florei intestinale.

Pe de altă parte, vitaminele K intervin în reacţii de oxidoreducere şi participă în procesele de respiraţie celulară, funcţionând ca transportor de hidrogen cu localizare între dehidrogenazele NADH-dependente şi citocromi.



Ubichinona sau **coenzima Q** care participă în lanţul respirator are o structură asemănătoare.



In mitocondriile organismelor superioare predomină ubichinona în care numărul radicalilor izoprenoide din catena laterală este egal cu 10(UQ_{10}).

Răspândire. Antivitamine K

In organismul animal, vegetal, ca şi în microorganisme au fost puse în evidenţă numeroase substanţe cu acţiune vitaminică K. In tabela 4.9 sunt consemnate principalele surse alimentare de vitamina K (după Matilda Rosetti).

Tabela 4.9 **Conţinutul în vitamina K al unor alimente**

Aliment (100 g).	mg. vitamină K	Aliment (100 g).	mg. vitamină K
Produse vegetale		Produse animale	
1. Cenopidă	3,2	1. Carne de oaie	0,1 - 0,2
2. Frunze castan	6,4 - 8,0	2. Carne de porc	0,1 - 0,2
3. Lucernă	1,6 - 3,2	3. Carne de vită	0,1 - 0,2
4. Spanac	3,0 - 4,6	4. Ficat de porc	0,4 - 0,9
5. Tomate verzi	cca. 0,8	5. Ficat de vită	0,1 - 0,2
6. Urzică	1,6 - 3,2	6. Lapte de vacă	0,002
7. Varză	3,2	7. Lapte de femeie	0,02

Necesarul zilnic de vitamină K pentru un adult este de **2 mg**.

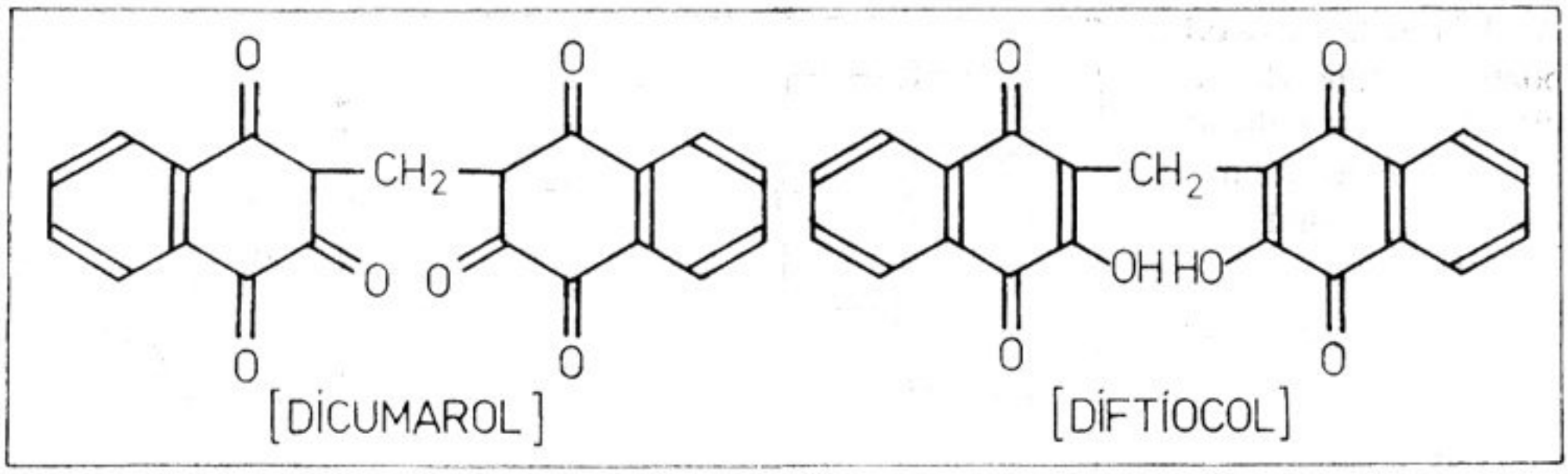
Antivitaminele K sunt substanţe cu structură asemănătoare vitaminelor K, dar care exercită o acţiune fiziologică antagonistă. Principalii compuşi cu acţiune antivitaminică K fac parte din trei grupe mari:

a) derivaţi de la cumarină: dicumarol, warfarina;

b) derivaţi de la indandion: 2 fenil indandiona;

c) derivaţi de sinteză: diftiocolul, 2 clor 1,4-naftochinona.

Aceşti compuşi sunt folosiţi în clinică în cazuri de tromboze (flebite, embolii, etc.), când este necesar să se întârzie coagularea sângelui, deoarece cheagurile formate spontan produc accidente grave, uneori mortale.



4.3 Vitamine hidrosolubile

Aproape toate vitaminele hidrosolubile fac parte din **complexul B**: B_1, B_2, B_6, B_{12}, nicotinamida, acidul pantotenic, biotina, acidul lipoic, PAB, acizii folici; vitaminele C şi P sunt considerate separat.

Datorită progreselor remarcabile ale biochimiei în ultimii ani, în prezent se cunosc şi mecanismele intime ale proceselor în care vitaminele hidrosolubile sunt implicate; astfel vitaminele hidrosolubile ca atare, sau uşor modificate sub formă de coenzime, intră în structura unor enzime ce catalizează reacţii fundamentale în cadrul metabolismului intermediar.

Vitaminele complexului B prezinta următoarele caracteristici:

- ◆ - sunt solubile în apă şi termolabile;
- ◆ - îndeplinesc funcţia de coenzime;
- ◆ - acţioneaza ca activatori stimulând diferite procese metabolice şi intervin în reglarea acestor procese;
- ◆ - constituie factori de creştere pentru microorganisme;
- ◆ - sub formă de coenzime unele vitamine participă în procesele energogeneratoare;
- ◆ - majoritatea pot fi sintetizate de către microflora bacteriană din rumen şi intestinul gros, o parte din necesarul organismului din aceste vitamine fiind furnizată pe aceasta cale.

4.3.1 Vitamina C

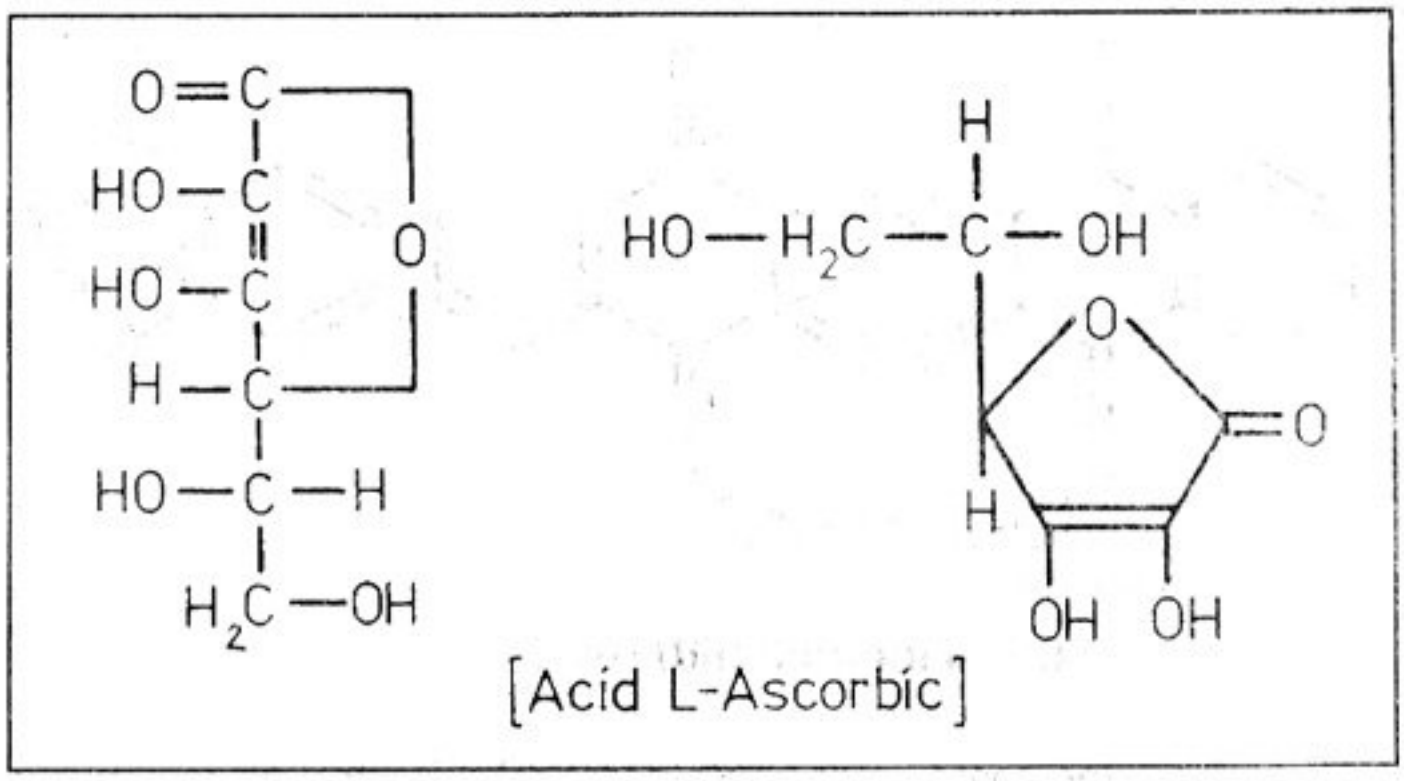
Boala determinată de lipsa vitaminei C - **scorbutul** - se întâlneşte la om, unele maimuţe şi cobai, acestea fiind singurele fiinţe care nu-l pot sintetiza. Incapacitatea acestor mamifere de a sintetiza acidul ascorbic se datoreşte absenţei din ficat a enzimei **L-Gulonoxidaza** care intervine în ultima etapă a sintezei de acid L-ascorbic.

Structură. Proprietăţi. Acidul ascorbic este din punct de vedere structural lactona acidului 2-3 endiol - L gulonic şi îi corespunde formula de mai jos.

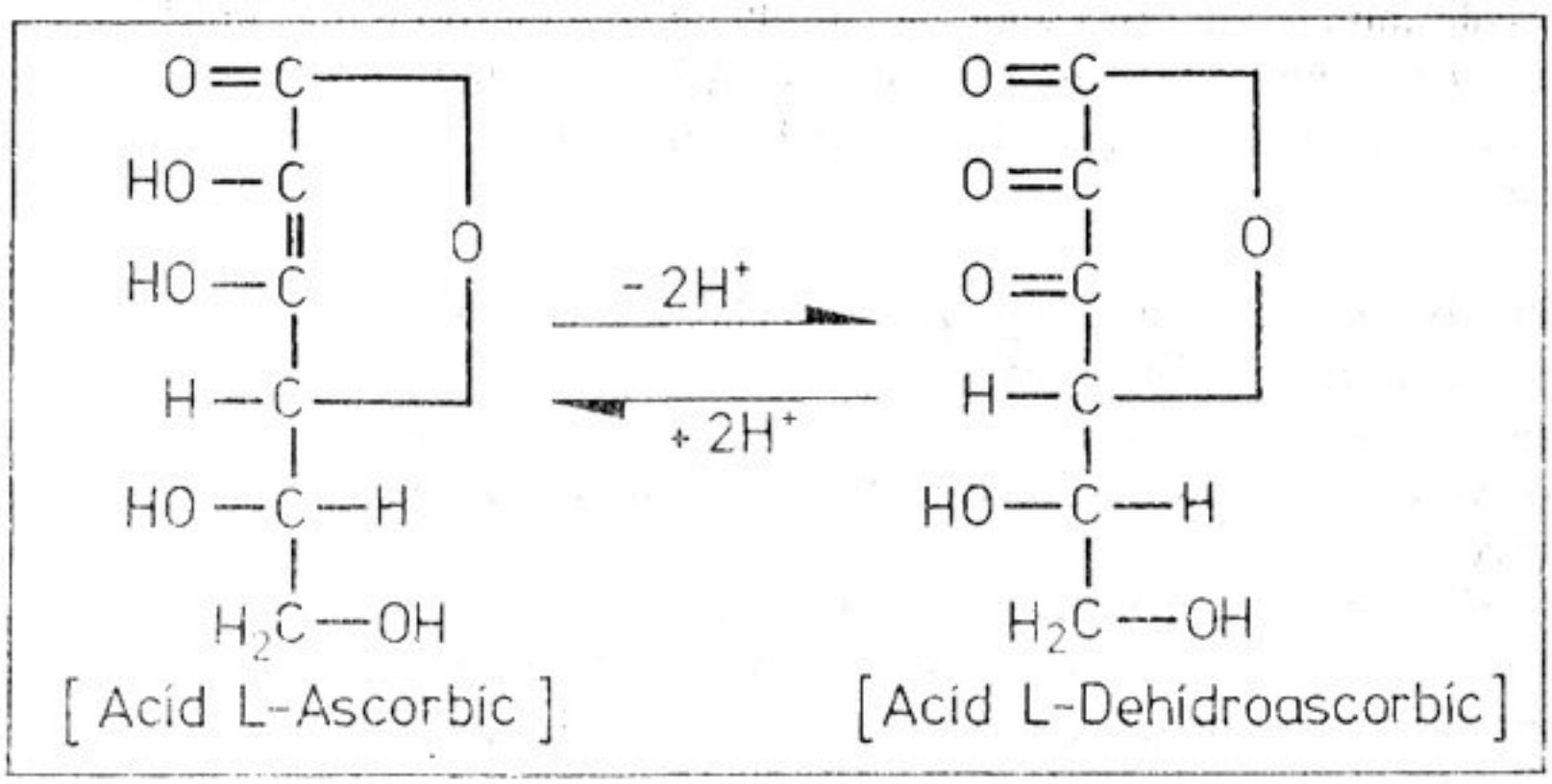
Biosinteza acidului ascorbic la plante are drept precursori monozaharide din seria D; la animale biosinteza constituie o deviaţie a ciclului acizilor uronici.

Caracterul acid îi este conferit de existenţa în molecula sa a grupării endiol care disociază cu punere în libertate de ioni de H^+, acidul **L-ascorbic** transformându-se în forma sa oxidată, acidul **L-dehidroascorbic**.

Acidul L-dehidroascorbic poate fi redus de către diferiţi agenţi reducători şi, în primul rând, de către glutationul redus (G-SH).



Roluri biologice. Participarea acidului ascorbic în diferite procese biochimice este determinată şi corelată de capacitatea sa de a forma un sistem reversibil de oxidoreducere. Intervine ca transportor de hidrogen în reacţiile catalizate de oxidoreductaze (dehidrogenaze, catalaze, peroxidaze, citocromoxidaze).



Ca atare, sau sub formă de acid dehidroascorbic, vitamina C participă la unele transformări pe care le suferă în organism diverse categorii de substanţe: aminoacizi, steroizi, acid folic etc.

In majoritatea cazurilor aceste transformări constau în hidroxilări cu participarea oxigenului molecular şi acidului ascorbic.

$$R\text{-}H + \text{Acid L-ascorbic} \xrightarrow[-H_2O]{O_2} R\text{-}OH + \text{Acid L-dehidroascorbic}$$

Iată câteva exemple de reacţii metabolice în care participă acidul ascorbic (tabela 4.10).

Tabela 4.10 **Procese metabolice în care participă acidul ascorbic**

Nr.	Procesul metabolic.	Tipul de reacţie.
1.	Prolina ⟶ Hidroxiprolină	Hidroxilare-cu acid ascorbic
2.	Tirozina ⟶ DOPA	Hidroxilare-cu acid ascorbic
3.	Dopamina ⟶ Noradrenalina	Hidroxilare-cu acid ascorbic
4.	γ-Butirobetainã ⟶ Carnitinã	Hidroxilare-cu acid ascorbic
5.	Colesterol ⟶ Acizi biliari	Hidroxilare-cu acid ascorbic
6.	Steroid ⟶ Hidroxisteroid	Hidroxilare-cu acid ascorbic
7.	Triptofan ⟶ Hidroxitriptofan	Oxidare-cu acid dihidroascorbic
8.	Acid folic ⟶ Acid tetrahidrofolic	Reducere-cu acid ascorbic
9.	Fe^{3+} ⟶ Fe^{2+}	Reducere-cu acid ascorbic

Formarea colagenului şi a substanţei intracelulare este încă una din funcţiile biologice de baza ale acidului ascorbic.

Cercetările experimentale au arătat rolul acidului ascorbic în producerea fibrelor şi maturaţia reticulului de colagen. Lipsa vitaminei C întârzie cicatrizarea rănilor şi consolidarea fracturilor, datorită faptului că formarea fibrelor este îngreunată.

Cercetări recente au pus în evidenţă posibila intervenţie a acidului ascorbic în activitatea hormonală. Aceasta este evidenţiată dacă se iau în considerare următoarele observaţii:

a) activitatea multor hormoni este mediată de **AMP-ciclic**;
b) formarea AMP-ului ciclic este catalizată de **adenilatciclaza** care la rândul ei este activată de catecolamine;
c) biosinteza catecolaminelor are loc cu participarea acidului ascorbic în procesul de **hidroxilare**.

Deci, un nivel corespunzător de vitamina C în organism, asigură formarea de AMP-ciclic necesar unei bune activităţi hormonale.

Boala determinată de lipsa vitaminei C - **scorbutul** - prezintă următoarele simptome:
◆ - fragilitate capilară cu hemoragii discrete la nivelul pielii, mucoaselor şi articulaţiilor;

◆ - inflamaţii necrotice ale gingiilor, mobilitatea şi căderea dinţilor; alterări în procesul de formare a oaselor şi dinţilor care capătă un caracter spongios;

◆ - scăderea rezistenţei la efort şi infecţii.

In stadiul avansat survin: febra, cangrene, hemoragii viscerale, necroze osoase şi uneori complicaţii pulmonare (pleurezii, pneumonii, tuberculoză etc.).

Acidul ascorbic are o largă răspândire în regnul vegetal, în bacterii şi mucegaiuri. In tabela 4.11 sunt menţionate o serie de alimente de origine vegetală bogate în acid ascorbic.

Tabela 4.11 **Conţinutul în acid ascorbic al unor alimente**
(după Matilda Rosetti Colţoiu, 1980)

Surse	mg Acid ascorbic /100 g	Surse	mg Acid ascorbic /100g
Afine	160	**Măceşe**	400 - 600
Ardei	160	Mazăre	15
Caise	8,5	Mere	5,9
Cartofi	6 - 24	Pătrunjel	180
Castraveţi	10	Ridichi	15
Coacăze	49	Spanac	80
Conopidă	100	Sparanghel	44
Citrice	40 - 60	Tomate	24
Fasole verde	26	Urzici	50
Fragi	58	Varză	180
Gutui	12	Zmeură	28

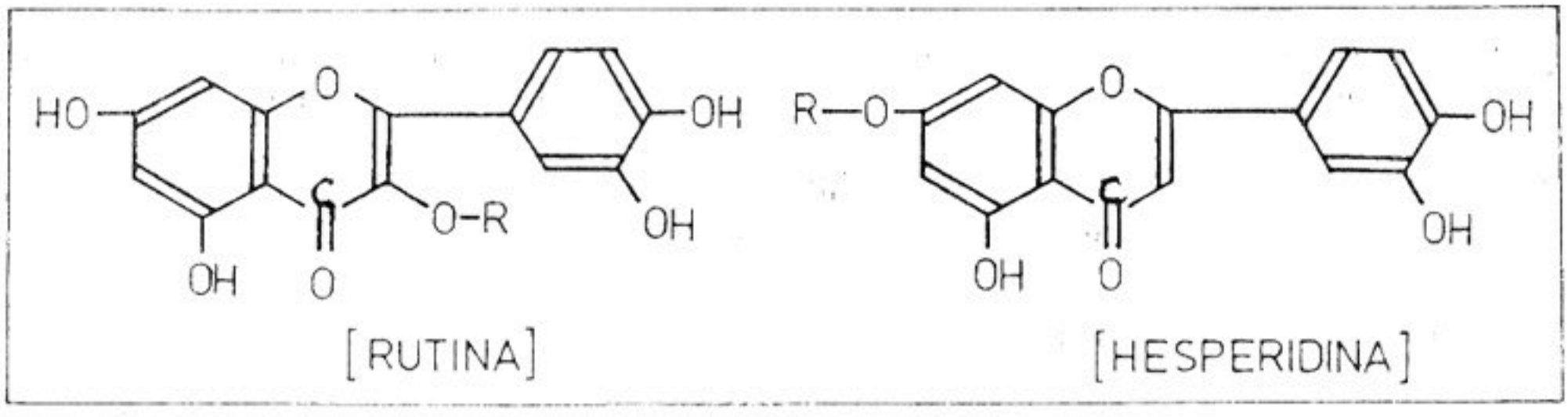
4.3.2 Vitamina P

Albert Szent-Györgyi constată că în produsele naturale, acidul ascorbic este asociat cu o substanţă care îi potenţează acţiunea antiscorbutică. Ulterior s-a demonstrat că această substanţă acţionează asupra **permeabilităţii** vaselor sanguine, de unde şi denumirea de vitamine P (ale permeabilităţii).

Vitaminele P sunt derivaţi de la flavonă (quercitina) şi prezintă constituţia unor glicozizi.

Cele mai răspândite în natură sunt: **rutinul** şi **hesperidina**.

Componenta glucidică a celor doi derivaţi este un dizaharid numit **rutinoza** (R) format din ramnoză şi glucoză.



Flavonoidele sunt foarte răspândite în regnul vegetal, mai ales în flori şi fructe, însoţind acidul ascorbic în citrice, măceş, fructe de pădure.

In organismul uman bioflavonoidele stimulează biosinteza adrenalinei şi asigură permeabilitatea vaselor sanguine şi rezistenţa acestora la rupere, manifestă acţiune

farmacodinamică intensificând tonusul cardiac şi scăzând tensiunea arterială.

Datorită structurii lor, este posibil să participe ca transportori de hidrogen în reacţii de oxido-reducere, activitatea acestora fiind corelată cu cea a acidului ascorbic. Carenţa în vitamina P se manifestă prin fragilitatea vaselor sanguine, tulburări ale permeabilităţii acestora, hemoragii locale etc.

4.3.3 Vitamina B_1

Vitamina B_1 a fost denumită "aneurină" datorită acţiunii sale antinevritice. Denumirea de "**tiamină**" este cea mai nouă şi cea mai utilizată, deoarece molecula sa conţine sulf şi o grupare amino.

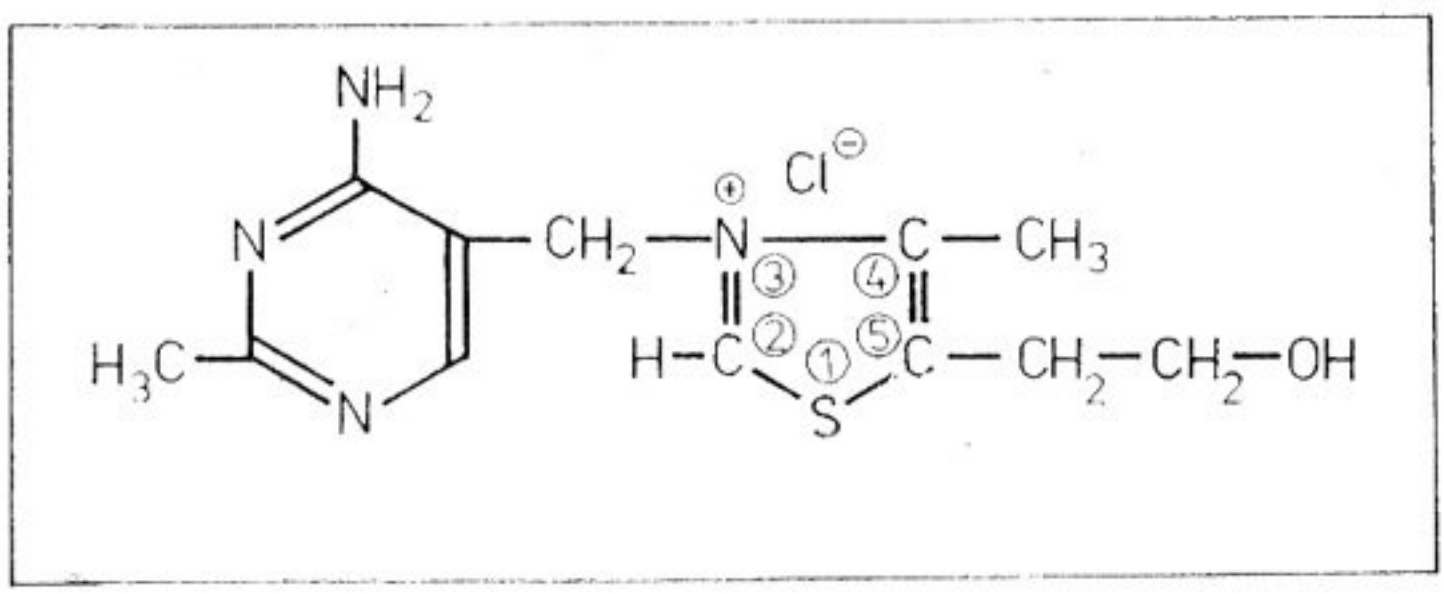
Vitamina B_1 se găseşte predominant în plante, în special în leguminoase, în seminţe şi drojdie, dar este răspândită şi în regnul animal.

In tabela 4.12 este indicat conţinutul în vitamina B_1 pentru o serie de produse alimentare (după Matilda Rosetti Colţoiu).

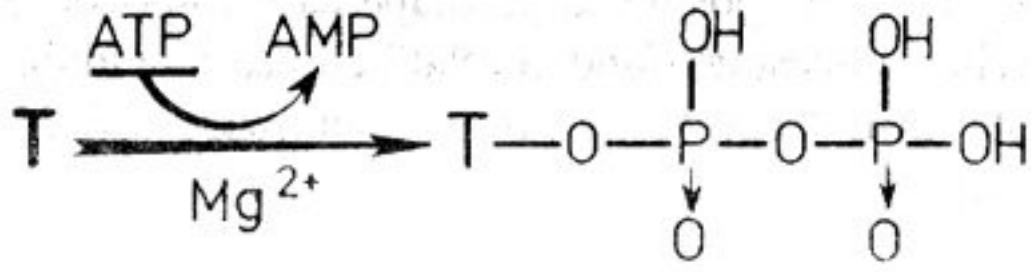
Tabela 4.12 **Conţinutul în vitamina B_1 al unor alimente**

Sursa.	mg Vitamina B_1 la 100g.	Sursa.	mg Vitamina B_1 la 100g.
Arahide	0,5 - 1	Mazăre uscată	0,3 - 0,5
Carne de vită	0,05 - 0,2	Muşchi bovine	0,04 - 0,1
Drojdie uscată	3 - 30	Nuci	0,3 - 0,5
Drojdie de bere	1 - 7	Ou (gălbenuş)	0,05 - 0,15
Ficat de vită	0,2 - 0,4	Ovăz	0,3 - 0,7
Germeni de grâu	1,2 - 3,7	Pâine integrală	0,2 - 0,3
Jambon,rinichi	0,5 - 1	Pâine albă	0,05
Leguminoase	0,5 - 0,9	Seminţe cereale	2,5 - 5,6
Lapte	0,04 - 0,07	Soia	0,3 - 1,2

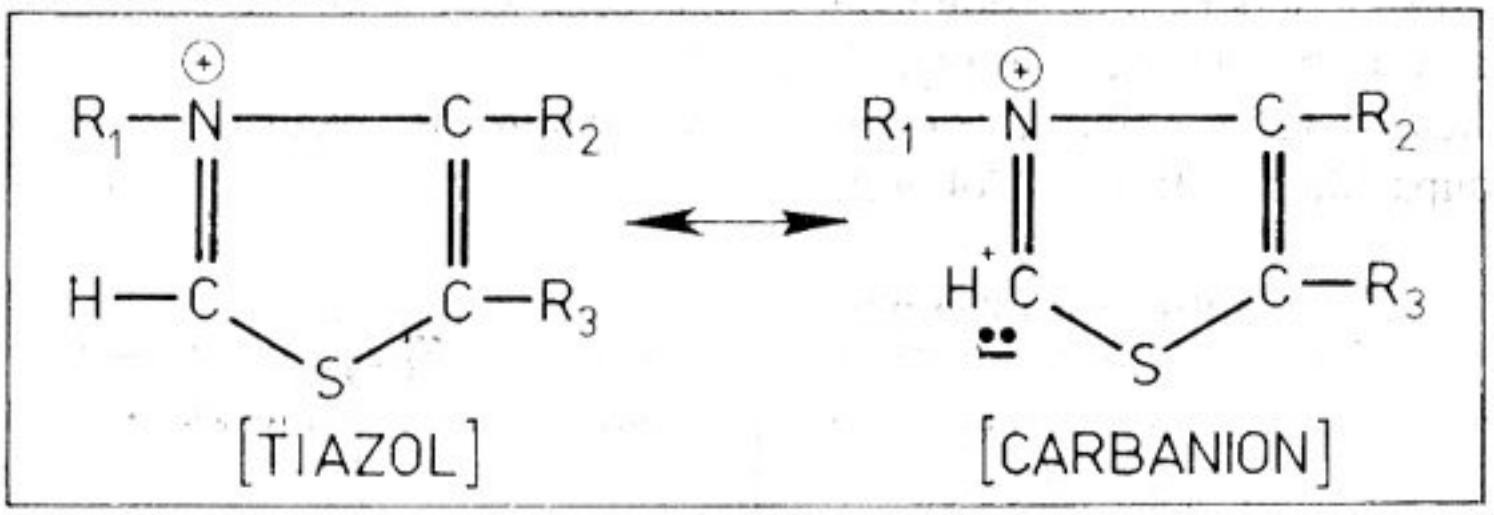
Structură. Roluri biologice. Tiamina este alcătuită dintr-un ciclu pirimidinic şi un ciclu tiazolic legate printr-o punte metilen.



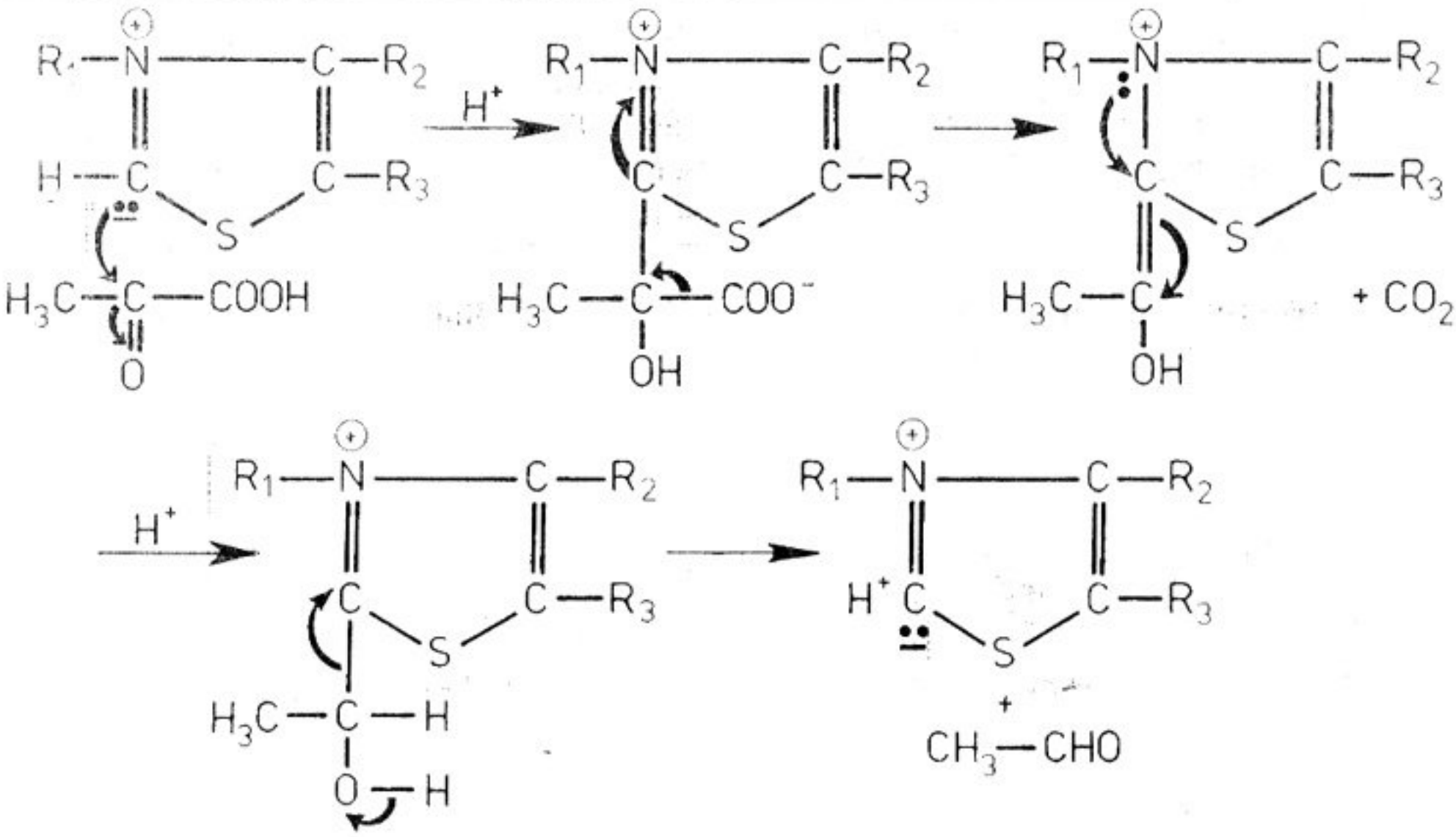
Forma activă a tiaminei o constituie esterul său pirofosforic denumit tiaminpirofosfat (TPP) care se transformă prin fosforilarea vitaminei în prezenţa ATP şi a ionilor Mg^{2+}.



TPP participă cu funcţie de coenzimă în următoarele sisteme enzimatice: α-cetoacid decarboxilaze, α-cetoacid oxidaze, transcetolaze şi fosfocetolaze. In mecanismul acestor reacţii locul de acţiune este C_2 din ciclul **tiazol**, poziţie la care atomul de H disociază ca proton rezultând un carbanion.



Carbanionul format participă în reacţia de decarboxilare a α cetoacizilor. De exemplu, acidul piruvic este decarboxilat până la acetaldehidă după următorul mecanism:



In deficitul de tiamină, metabolizarea acidului piruvic nu se mai produce, fapt care determină acumularea acestuia în lichidele şi ţesuturile organismului, ceea ce antrenează o serie de manifestări patologice, caracteristice bolilor de avitaminoza B_1: crampe musculare, fenomene toxice pentru sistemul nervos, tulburări cardiace, edem, somnolenţă, oboseală,

atonie gastrointestinală, tulburări de resorbţie, pierdere în greutate etc.

Tiamina intervine şi în alte procese biochimice ca: stimularea biosintezei lipidelor din glucide, reglarea metabolismului glucidic şi al unor procese energogeneratoare, stimularea activităţii acetilcolinei- mediator al transmiterii influxului în sistemul nervos vegetativ. In medie omul adult are nevoie de 2 mg vitamina B_1 /24 ore.

4.3.4 Vitamina B_2

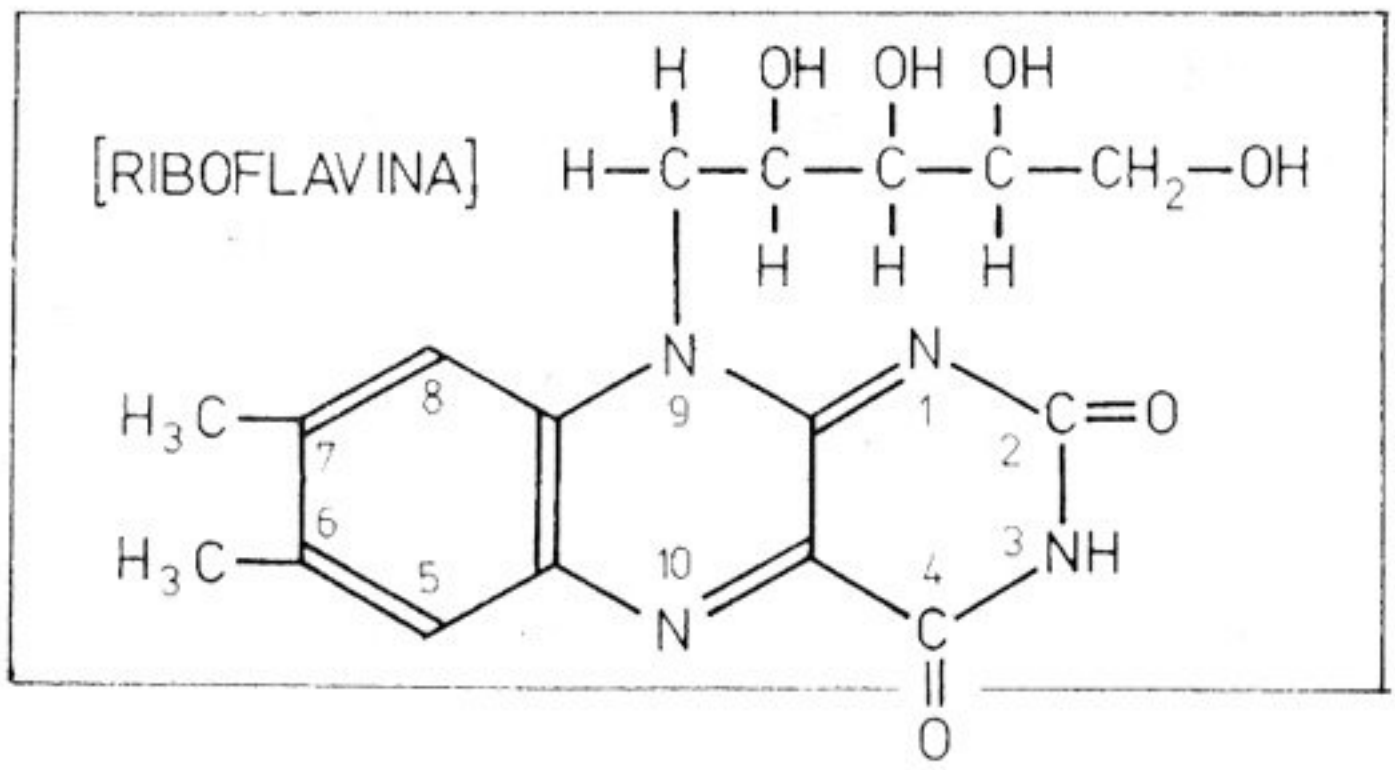
Generalităţi. Răspândire. Vitamina B_2 se mai numeşte şi **riboflavina** potrivit structurii sale de flavină (pigment galben) cu radical ribitil.

I se mai spune şi **lactoflavină**, deoarece a fost identificată în lapte. Riboflavina este foarte răspândită în natură, în bacterii, drojdie de bere, ciuperci şi alimente de origine animală şi vegetală (vezi tabela 4.13, după Matilda Rosetti Colţoiu).

Tabela 4.13 **Conţinutul în vitamina B_2 al unor alimente**

Sursa	mg.vit.B_2/100g	Sursa	mg.vit.B_2/100g
Albuş de ou	0,30 - 0,45	Lapte de vacă	0,1 - 0,2
Gălbenuş de ou	0,20 - 0,60	Mazăre uscată	0,13 - 0,30
Brânză	0,3	Pâine integrală	0,15
Carne	0,1 - 0,4	Rinichi vită	0,8 - 2,5
Drojdie de bere	2,5 - 5,0	Soia	0,13 - 0,30
Ficat de vită	1,7 - 3,0	Varză	0,13 - 0,30

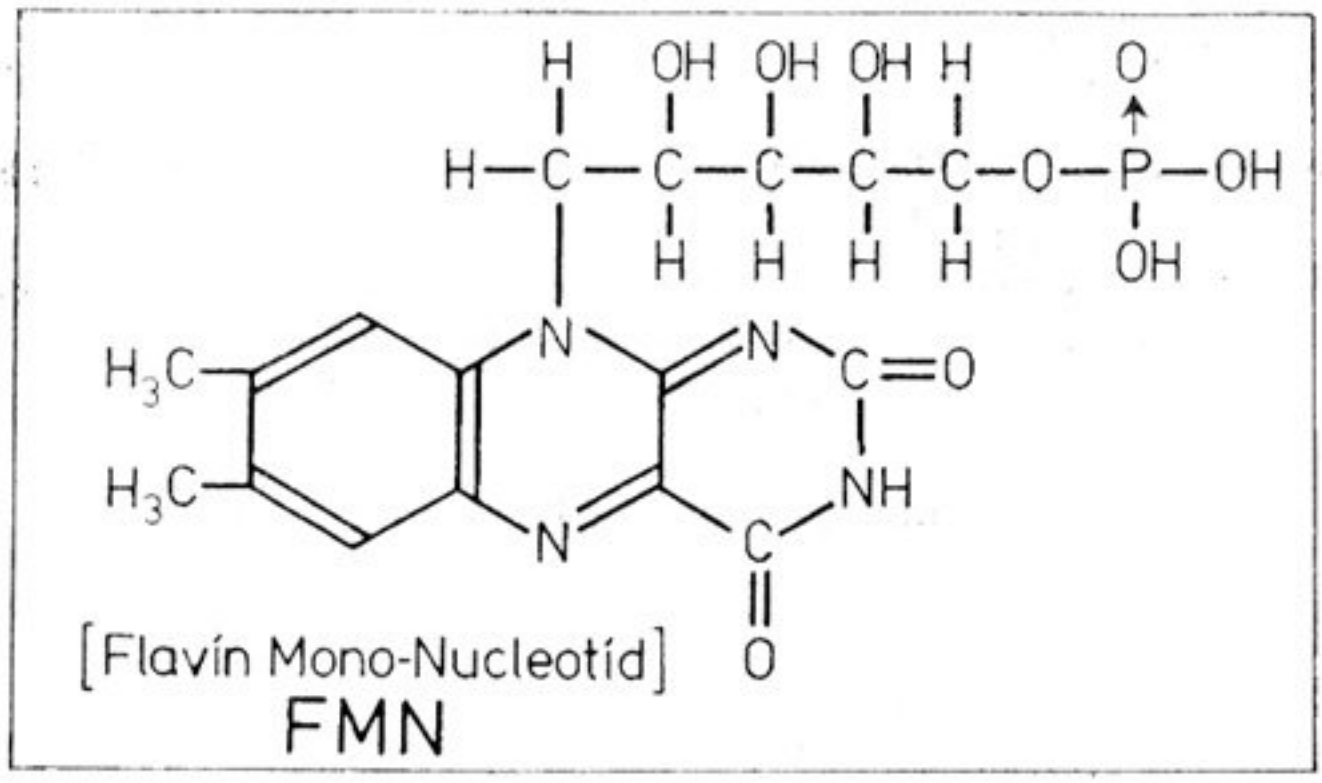
Structura. Roluri biologice. Riboflavina face parte din clasa flavinelor şi este constituită din ciclul **izoaloxazină** pe care sunt grefaţi doi radicali metil şi, în acelaşi timp, este ataşat un radical **ribitil** (derivat de la riboză).

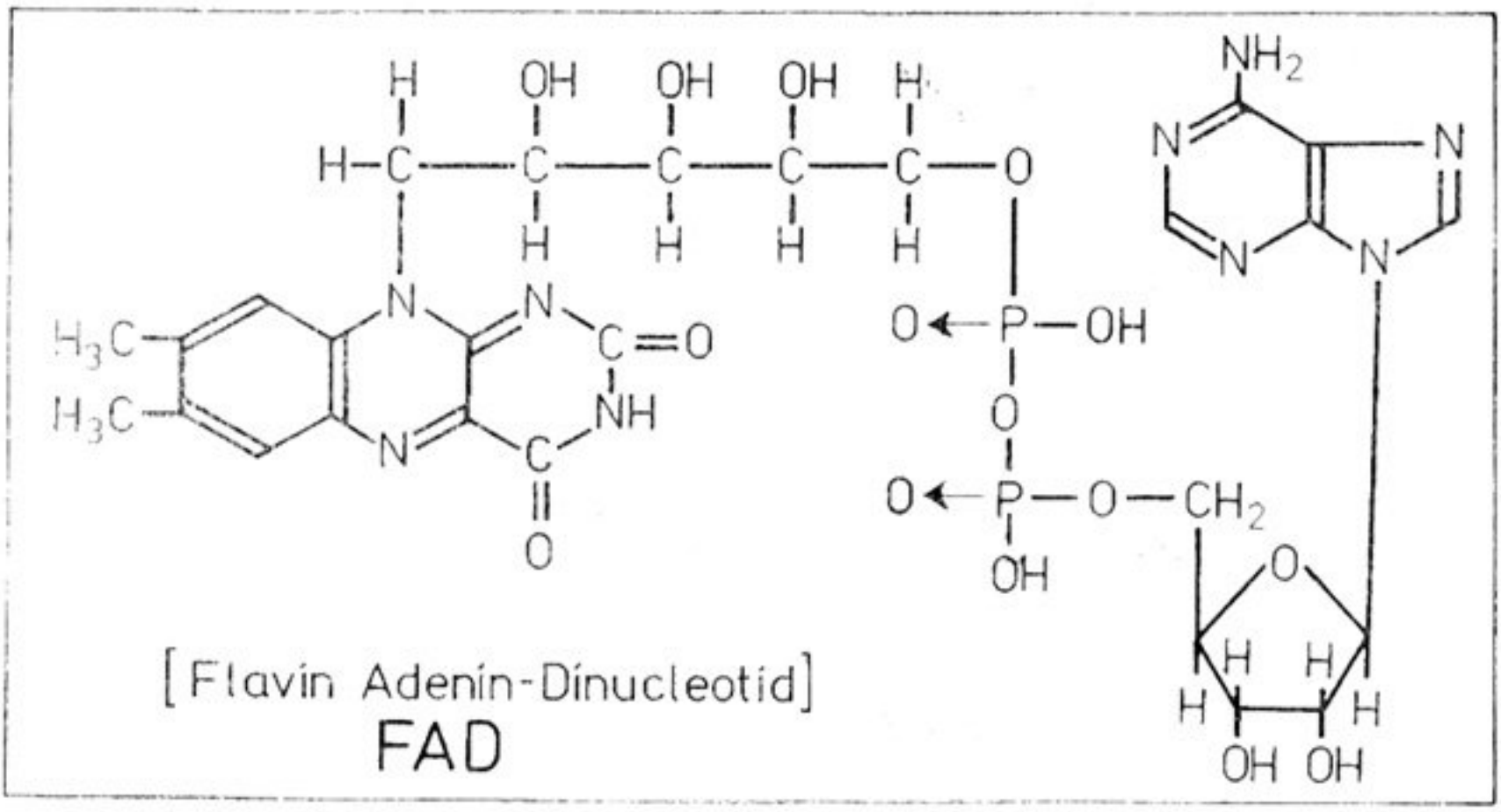


Riboflavina în forma sa liberă se găseşte în lapte, retină, lichidul seminal. In celule, riboflavina se află exclusiv sub forma combinată cu proteinele (flavoproteine sau flavoenzime) fiind un constituient a două coenzime flavinice:

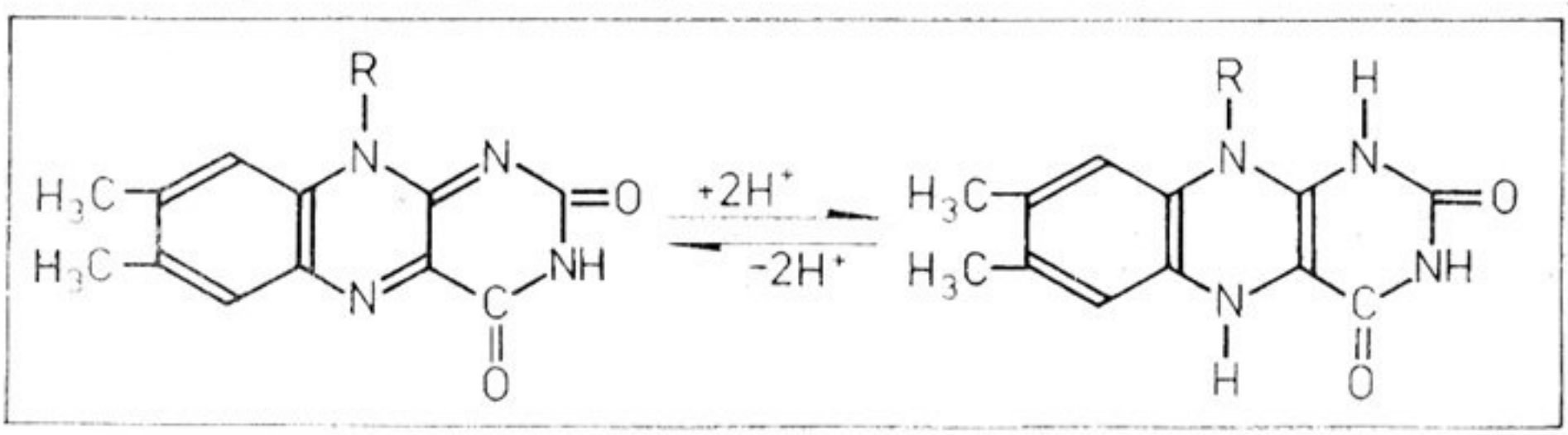
FMN-Flavinmononucleotid;

FAD- Flavinadenin dinucleotid, care funcţionează ca transportori de hidrogen în sistemele de oxidoreducere biologică.

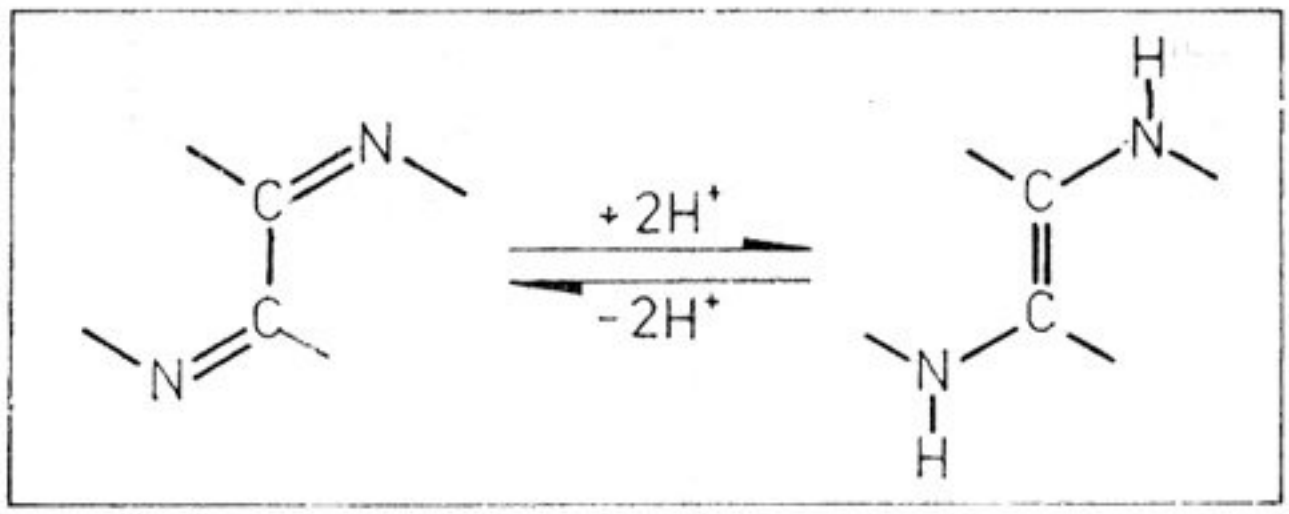




Participarea FMN şi FAD în procesele de oxidoreducere poate fi astfel ilustrată:



sau schematic:



Există peste 40 enzime flavinice oxidoreducătoare.

Rolul riboflavinei se extinde şi asupra altor procese biochimice, cum ar fi: biosinteza hemoglobinei, stimularea producerii de HCl de către mucoasa gastrică, acţionează în procesul vederii transformând radiaţiile luminoase cu lungime de undă mică în lumină cu lungime de undă mare, perceptibilă, pentru care ochiul are o sensibilitate mai mare. Carenţa de riboflavină se manifestă prin: dermatite cheiloză (inflamarea şi fisurarea colţurilor gurii), glosodimie (sensibilitatea dureroasă a limbii), limba magenta (limba devine roşie purpurie şi foarte dilatată), oboseală vizuală, vascularizarea accentuata a corneei etc.

Tabela 4.14 **Enzime flavinice**

Enzime FMN dependente	Enzime FAD dependente
- Citocrom reductaza - L-aminoacid oxidaza - Fermentul galben al lui Warburg	- D-Aminoacid oxidaza - Xantinoxidaza - Glucozooxidaza - Succinatdehidrogenoză - Lipoildehidrogenaza - Acil CoA-dehidrogenaza

4.3.5 Vitamina PP

Generalităţi. Răspândire. Vitamina PP este vitamina care înlătură simptomele pelagrei - **pelagropreventivă**. Pelagra (pella agra - **"piele aspră"** - lb. spaniolă) se întâlneşte în rândul populaţiei consumatoare de porumb şi este cunoscută sub numele de **"maladia celor trei D"**: dermatită, diaree, demenţă.

Vitamina PP sau **nicotinamida** este răspândită în ţesuturile animale şi vegetale, dar mai poate fi furnizată organismului şi de către flora bacteriană din intestin, care are capacitatea de a o sintetiza având ca precursor **ornitina**; nicotinamida poate fi sintetizată şi în diferite ţesuturi animale, precursorul fiind însă **triptofanul**.

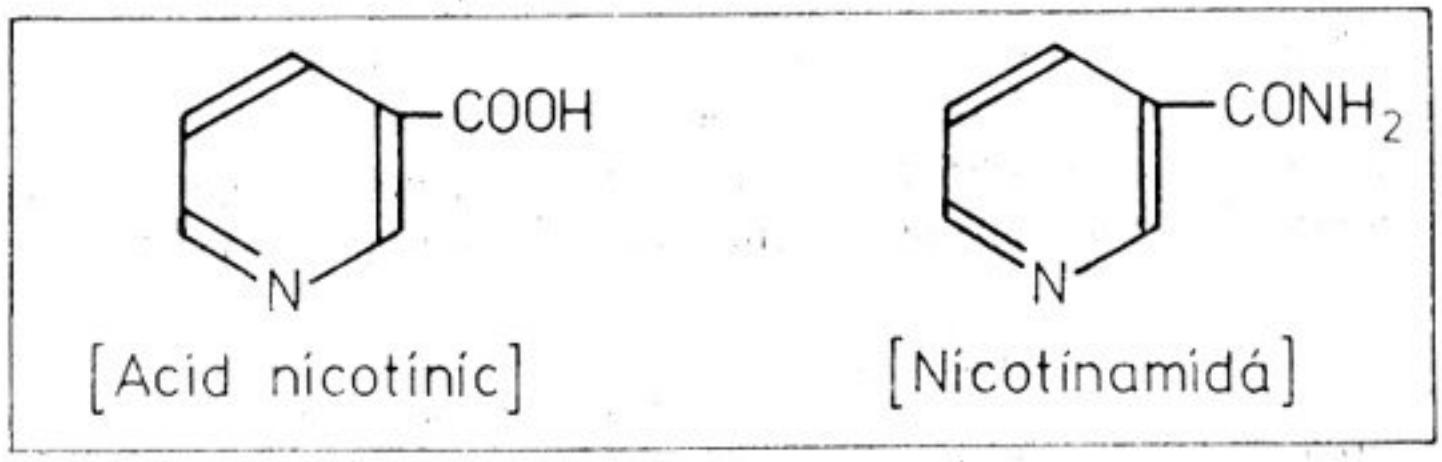
Zeina, proteina din porumb este săracă sau lipsită de triptofan, ceea ce explică prevalenţa bolii la consumatorii de porumb.

In tabela 4.15 este prezentat conţinutul în nicotinamidă al unor alimente (după Matilda Rosetti Colţoiu, 1980).

Tabela 4.15 **Conţinutul unor alimente în nicotinamidă**

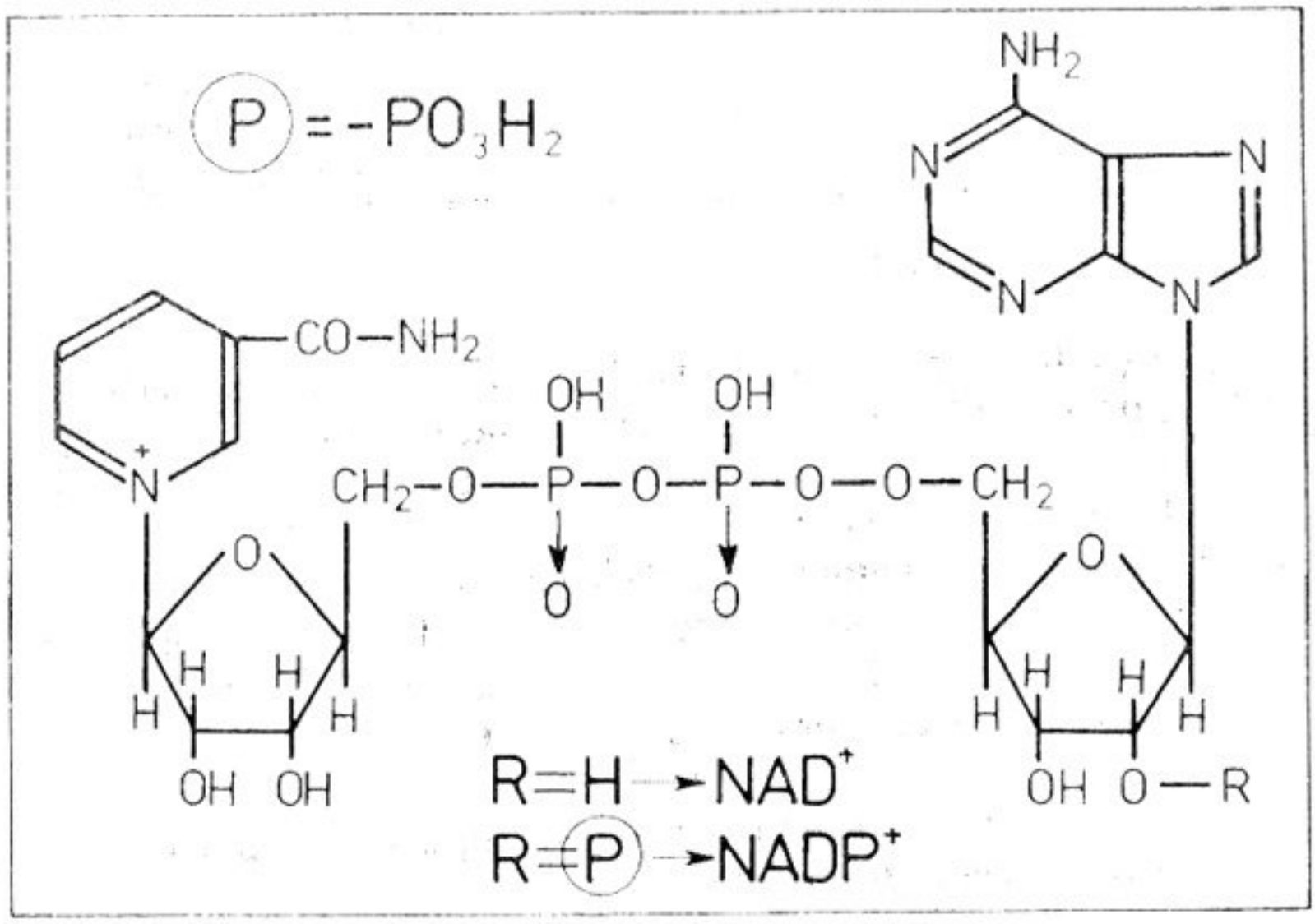
Sursa	mg/100g	Sursa	mg/100g
Drojdie de bere	40 - 62	Ficat	10 - 27
Grâu	2,8 - 5,0	Inimă	5,9
Cartofi	1,0 - 1,2	Rinichi	6 - 10
Ovăz	0,9	Muşchi	3 - 10
Orez nedecorticat	1,6 - 2,4	Carne de vită	4,4 - 4,9
Porumb	1,3 - 1,5	Lapte	0,4 - 1,0

Structură. Rol biologic. Nicotinamida derivă din acidul nicotinic; ambele substanţe posedă activitate vitaminică şi poartă denumirea **generică de niacină**.



[Acid nicotinic] [Nicotinamidă]

Nicotinamida îndeplineşte o funcţie biochimică esenţială în calitate de componentă a



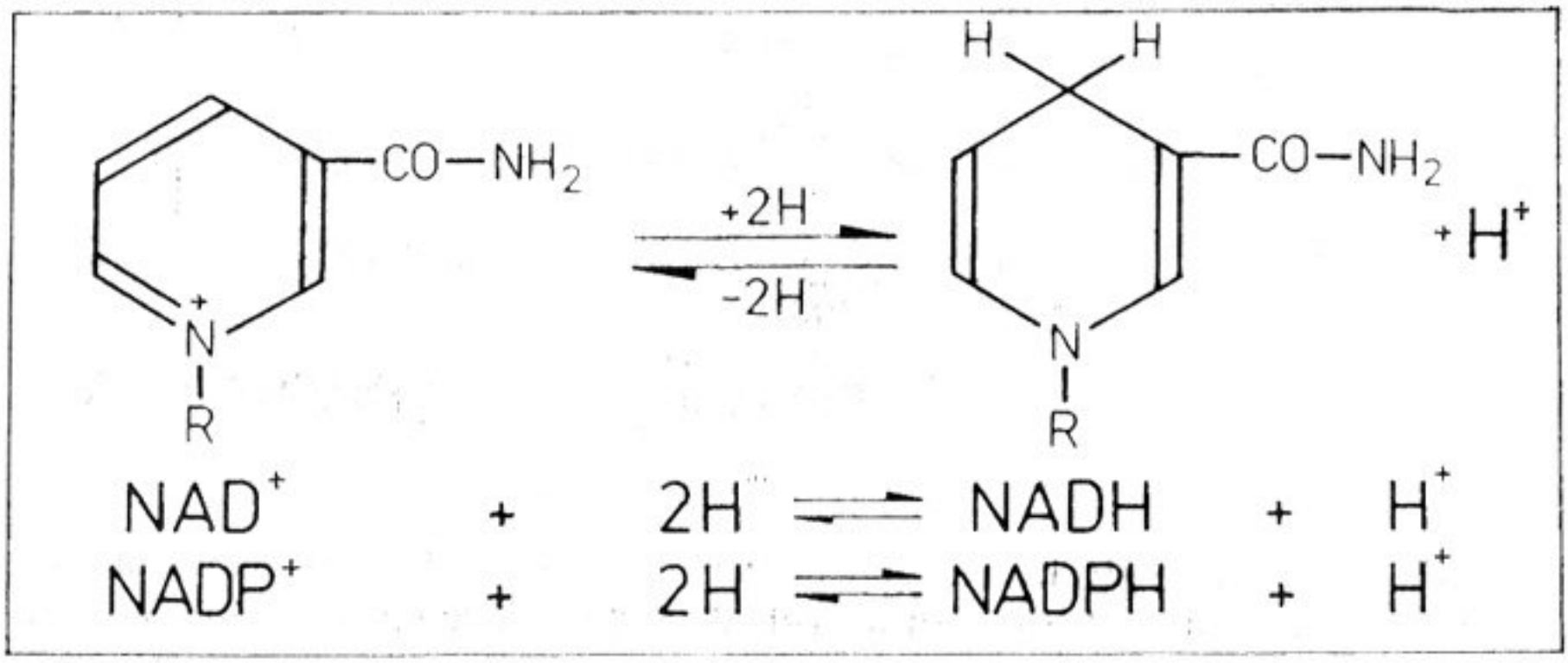
structurii coenzimelor NAD^+ şi $NADP^+$.

NAD^+ - Nicotinamid adenin dinucleotid.

$NADP^+$ - Nicotinamid adenin dinucleotid fosfat.

NAD^+ şi $NADP^+$ funcţionează drept coenzime a numeroase enzime oxido-reducătoare.

Mecanismul de acţiune este următorul:



In general, **NADH** cedează H enzimelor din catena de **respiraţie celulară**, pe când **NADPH** îl cedează sistemelor enzimatice care intervin în reacţiile de **biosinteză**.

Carenţa de nicotinamidă se manifestă prin simptome ca: iritabilitate, anxietate, lipsă de apetit, întărirea şi uscarea pielii. Pelagra se datoreşte şi incapacităţii organismului de a transforma triptofanul în nicotinamidă, cum ar fi în cazuri de: alcoolism cronic, ciroză hepatică etc. De menţionat şi faptul că porumbul conţine analogi structurali ai triptofanului ce acţionează ca inhibitori competitivi, blocând conversia triptofanului în vitamina PP.

4.3.6 Piridoxina (vitamina B_6)

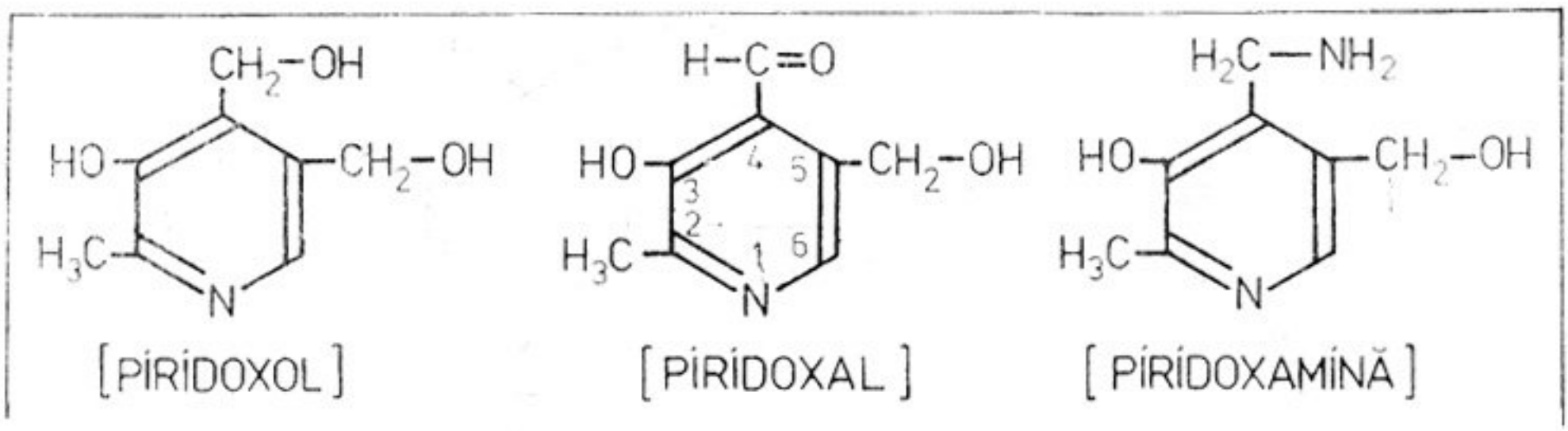
Generalităţi. Răspândire. Descoperirea vitaminei B_6 este legată de numele lui Goldberg şi Lilie (1926), care au stabilit existenţa unui factor,care este eficient în tratamentul unei dermatite caracteristică la şobolanii supuşi unei diete carenţate în vitamina B_6, numită **acrodinie**; boala se caracterizează prin inflamaţia şi descuamarea pielii extremităţilor.

Vitamina B_6 este răspândită în regnul animal şi vegetal, asociată cu celelalte vitamine ale complexului B.

Tabela 4.16 **Conţinutul în vitamină B_6 al unor alimente**
(după Matilda Rosetti Colţoiu,1980)

Sursa	mg/100g	Sursa	mg/100g
Banane	0,50	Carne de viţel	0,57
Cartofi	0,22	Ficat de pui	0,63
Grâu	0,40	Ficat de porc	0,51
Morcovi	0,90	Ficat de vită	0,71
Orez	0,15	Lapte de vacă	0,05
Pâine albă	0,10	Ouă	0,68
Portocale	0,05	Rinichi de porc	0,32

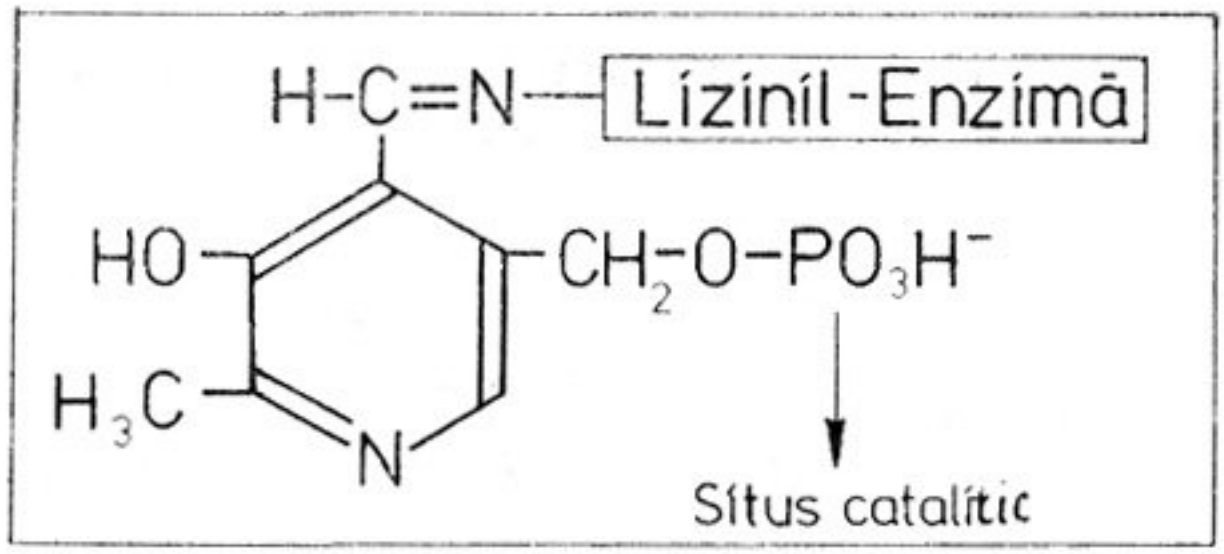
Structură. Rol biologic. Denumirea generică de vitamină B_6 include un număr de trei compuşi derivaţi de la piridină şi anume: **piridoxol, piridoxal** şi **piridoxamină.**



Forma activă este piridoxalul, în care sunt convertite celelalte două forme. Derivatul fosforilat al piridoxalului - **Piridoxalfosfatul (PALPO)** - îndeplineşte rolul de coenzimă în toate transformările neoxidative ale aminoacizilor: transaminarea, decarboxilarea, dezaminarea, racemizarea, precum şi biosinteza sfingofosfolipidelor.

In calitate de coenzimă, piridoxal fosfatul participă şi la alte reacţii specifice ale unor aminoacizi ca: interconversia serinei şi glicocolului, sinteza triptofanului, transformarea triptofanului în acid nicotinic, transulfurarea, biosinteza hemului,stimulează hematopoeza etc.

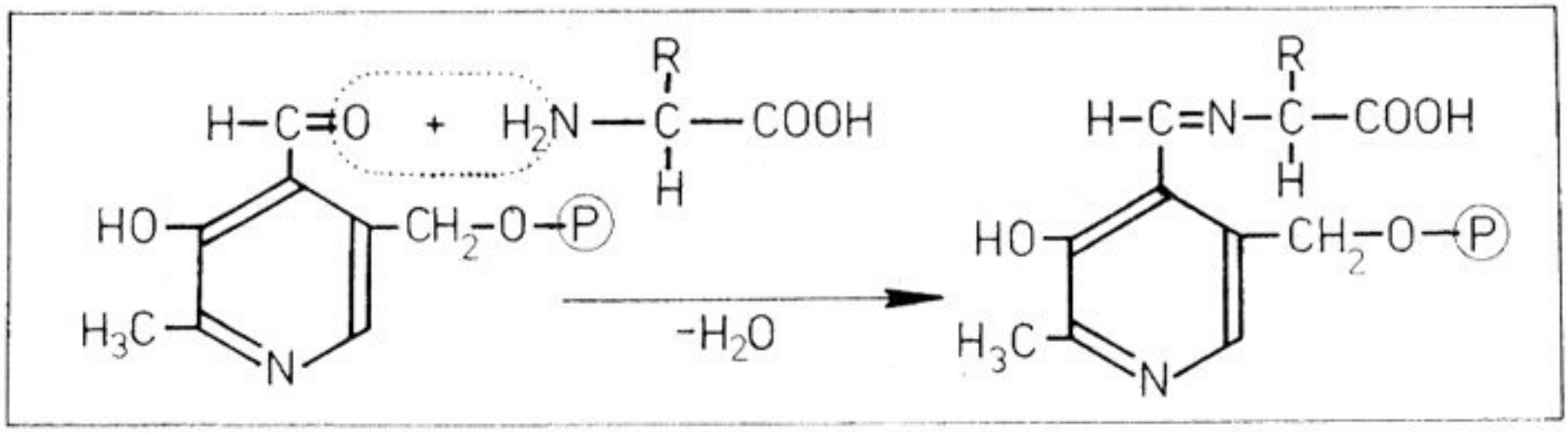
S-a demonstrat că în toate enzimele care implică participarea piridoxalfosfatului drept coenzimă, aceasta se leagă labil de gruparea amină a lizinei (sub formă de aldimină) din structura enzimei respective.



Catabolizarea aminoacizilor sub acţiunea PALPO presupune într-o primă etapă, formarea unei baze Schiff între piridoxal şi aminoacid.

Aceasta determină o deplasare electronică de la carbonul alfa al aminoacidului spre azotul electrofil din ciclul piridinic al piridoxalului.

In acest mod, aminoacidul este activat în vederea transformărilor următoare:



Carenţa în piridoxină produce: dermatite, anemii severe, uneori convulsii asociate cu tulburări profunde ale sistemului nervos central, diminuarea ritmului de creştere,scăderea nivelului hemoglobinei şi colesterolului seric, precum şi creşterea în greutate a unor organe (ficat, rinichi, suprarenale).

4.3.7 Acidul pantotenic

Generalităţi. Răspândire. Acidul pantotenic este un compus universal răspândit, din care cauză simptomele carenţiale apar destul de rar.

Acidul pantotenic se găseşte răspândit ca atare sau sub forma sa activă, Coenzima A, în organele cu un metabolism intens (ficat, rinichi, icrele şi lapţii de peşte), precum şi unele produse biologice, în care se concentrează produşi biologic activi, cum este lăptişorul de matcă, cortexul cerealelor etc. In organismul uman mai este sintetizat şi de către flora intestinală.

Tabela 4.17 **Conţinutul în acid pantotenic al unor alimente**
(după Matilda Rosetti Colţoiu,1980)

Sursa	mg Acid pantotenic /100g	Sursa	mg Acid pantotenic /100g
Ficat de mamifere	40 - 100	Ciuperci	20
Gălbenuş de ou	70	Cereale	10 - 20
Lapte de vacă	2 - 5	Cartofi	6
Lapte de femeie	2 - 4	Fasole	8 - 10
Muşchi de mamifere	10 - 20	Mazăre	8 - 10
Peşte	10	Portocale	1 - 3
Rinichi de mamifere	40	Spanac	2

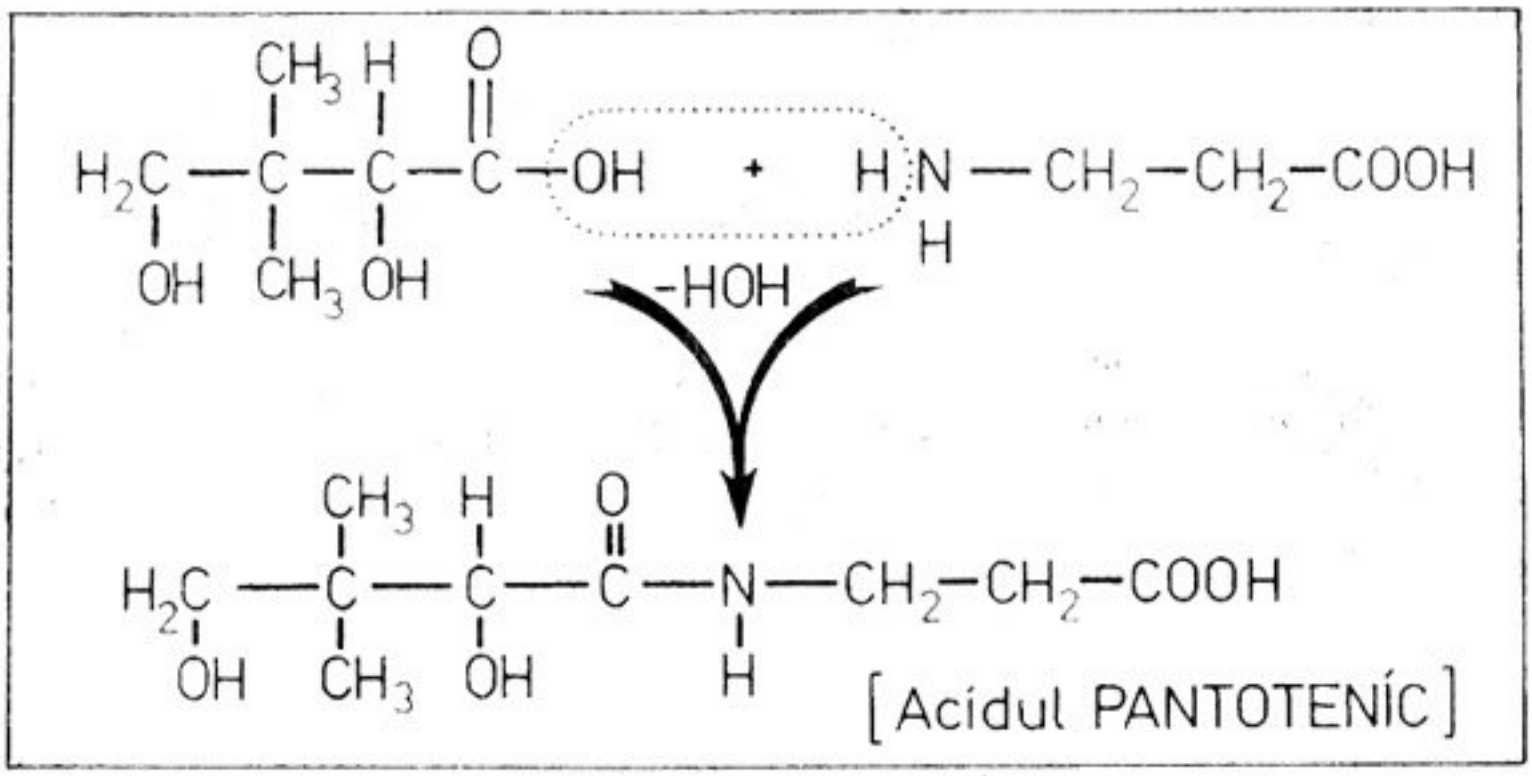
Structură. Rol biologic. Acidul pantotenic este constituit din acidul pantoic ($\alpha\gamma$-dihidroxi-ßß-dimetilbutiric) şi ß-alanină, unite printr-o legătură amidă substituită.

Posedă un atom de carbon asimetric, izomerul natural fiind cel dextrogir. Biosinteza sa este realizată de microorganisme şi are ca precursori **acidul izovalerianic** pentru acidul pantoic şi **acidul aspartic** pentru ß alanină.

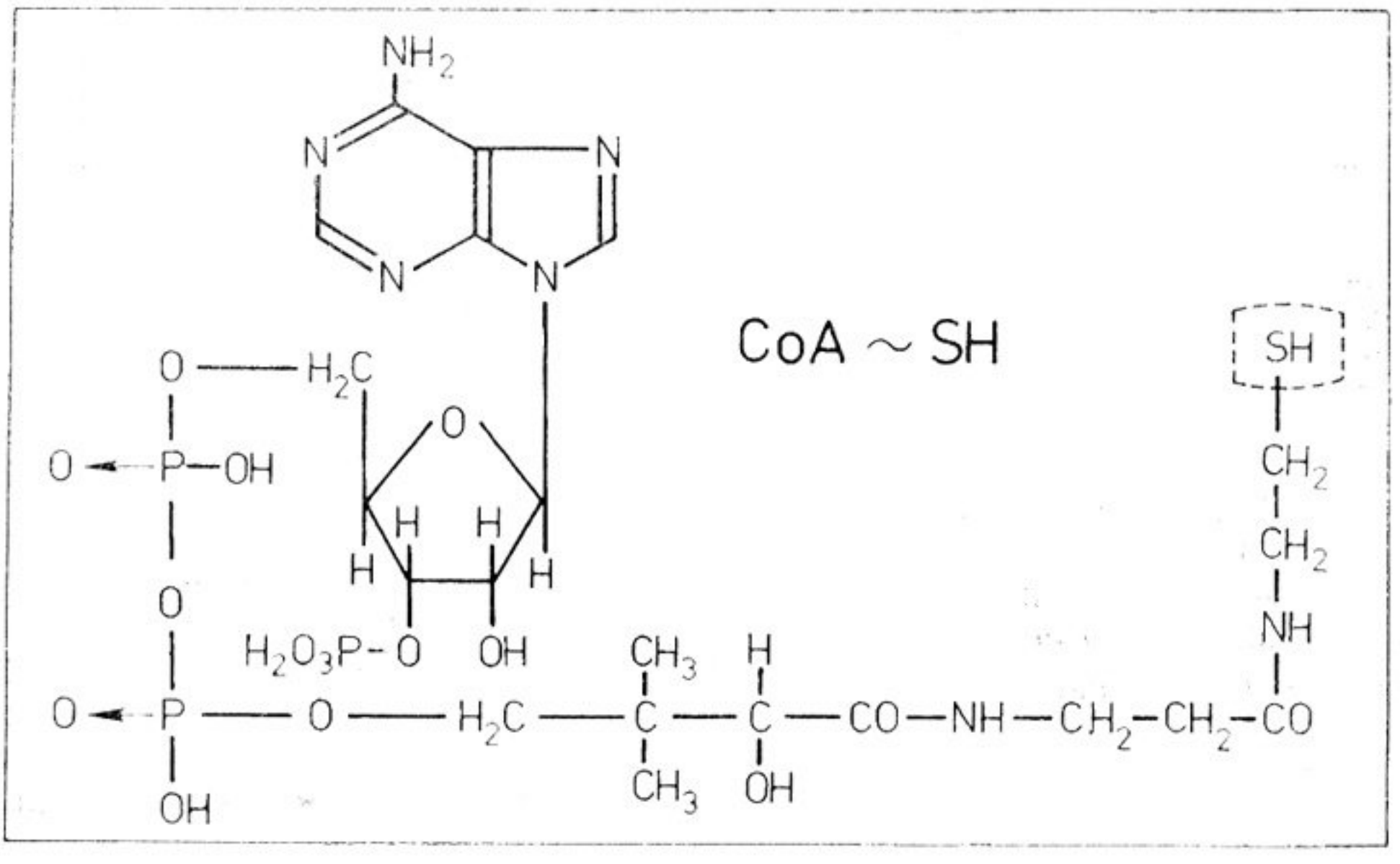
Importanţa biochimică a acidului pantotenic, derivă din faptul că el este constituent structural al **Coenzimei A** (CoA~SH) cu rol determinant în metabolismul glucidic, lipidic şi hormonal.

Participă la metabolismul energetic fiind una din substanţele cu caracter macroergic.

Structura Coenzimei A a fost elucidată de Lippman, iar sinteza sa a fost realizată de Moffat şi Khorana.

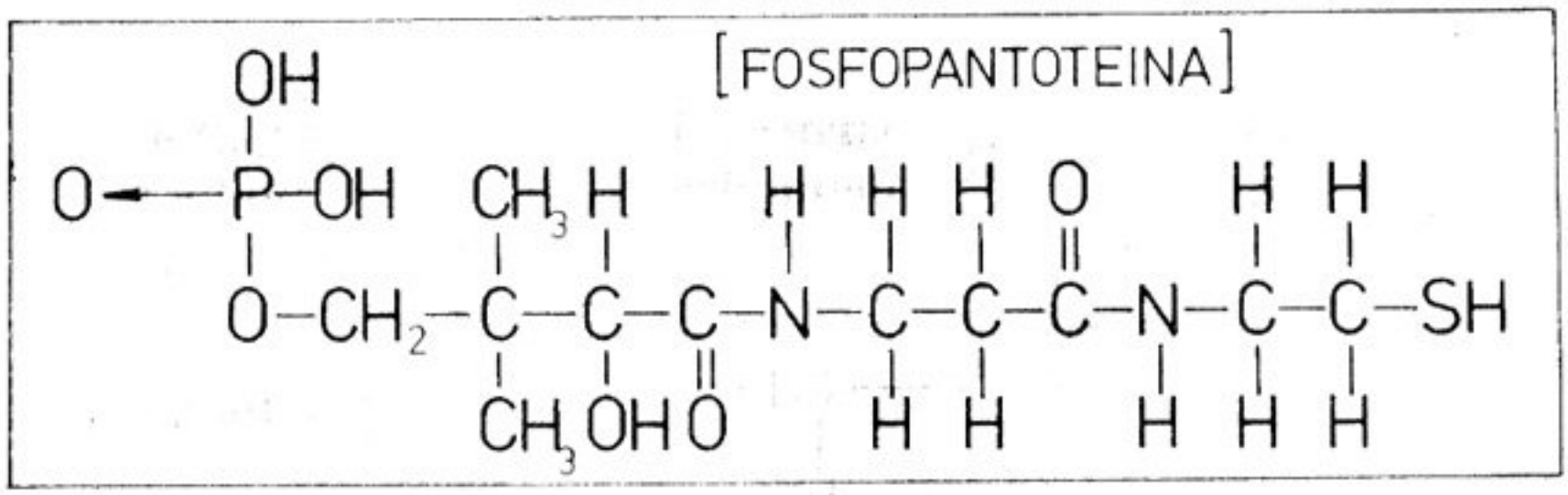


Coenzima A prin gruparea sa tiolică, poate stabili legături macroergice cu majoritatea acizilor graşi existenţi în celule, pe care-i transportă în vederea oxidării enzimatice, participă în decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic, în acetilările biologice şi în biosinteza acizilor graşi.



Structura coenzimei A

Pe de altă parte, în biosinteza acizilor graşi liberi mai intervine o proteină transportoare de grupări ACIL (PTA) sau în terminologia anglo-saxonă **Acyl Carrier Protein (ACP)**, care participă în procesul de transport al acizilor graşi prin membrana mitocondrială; gruparea sa prostetică **fosfopantoteina** conţine acid pantotenic.



Prin gruparea tiol a pantoteinei molecula PTA~SH funcţionează ca un transportor de grupări acil formând tioesteri la gruparea sa tiol, în mod analog cu Coenzima A.

La om nu se cunoaşte un sindrom determinat de carenţa acestei vitamine, deoarece este foarte răspândită în natură şi, pe de altă parte, este sintetizată de către flora intestinală.

Când, din diverse cauze, această deficienţă apare, simptomele carenţei sunt multiple şi variate: vărsături, dureri abdominale, crampe musculare, infecţii ale căilor respiratorii, sensibilitatea organismului la alte infecţii.

Datorită acestui ultim efect se pot produce şi alte tulburări: hipoglicemie, reducerea capacităţii fizice, disfuncţii ale nervilor motori, etc.

4.3.8 Biotina

Generalităţi. Răspândire. In 1940 Albert Szent-Györgyi a arătat că biotina este identică cu vitamina H - factorul care împiedică intoxicarea cu albuş de ou crud. Du Vigneaud, în 1942, stabileşte structura biotinei şi doi ani mai târziu se realizează sinteza sa.

Biotina este universal răspândită în microorganisme, drojdii, organisme animale şi vegetale. Surse bogate în biotină sunt ficatul şi rinichiul mamiferelor (100 -250 mg/100g); gălbenuşul de ou cu un conţinut de cca.50mg/100g, laptele 5-10mg/100g, fructele şi legumele proaspete. Cea mai mare parte din biotină necesară organismului uman şi animal este asigurată de sinteza bacteriană la nivelul intestinului.

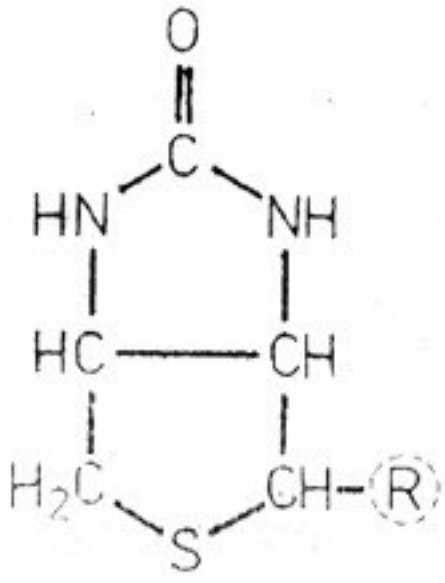
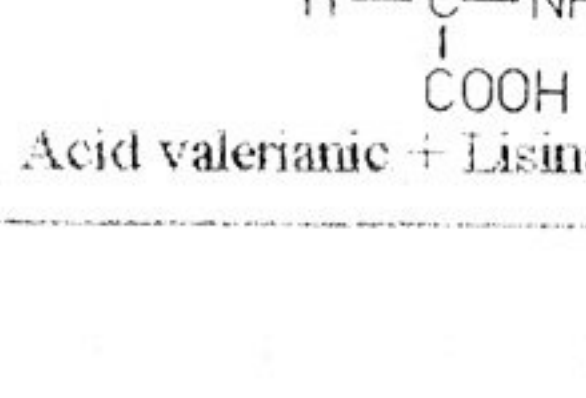
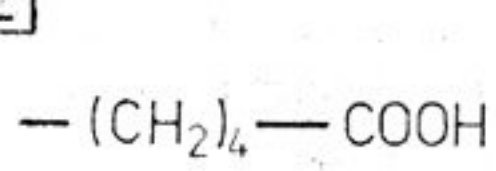
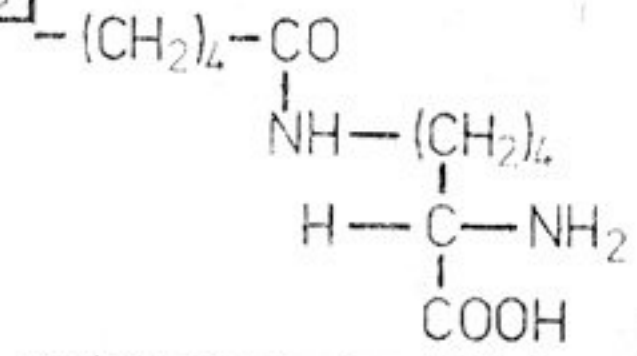
Structură. Rol biologic. Biotina rezultă din condensarea unui ciclu **tetrahidroimidazol** şi un ciclu **tetrahidrotiofenic** substituit.

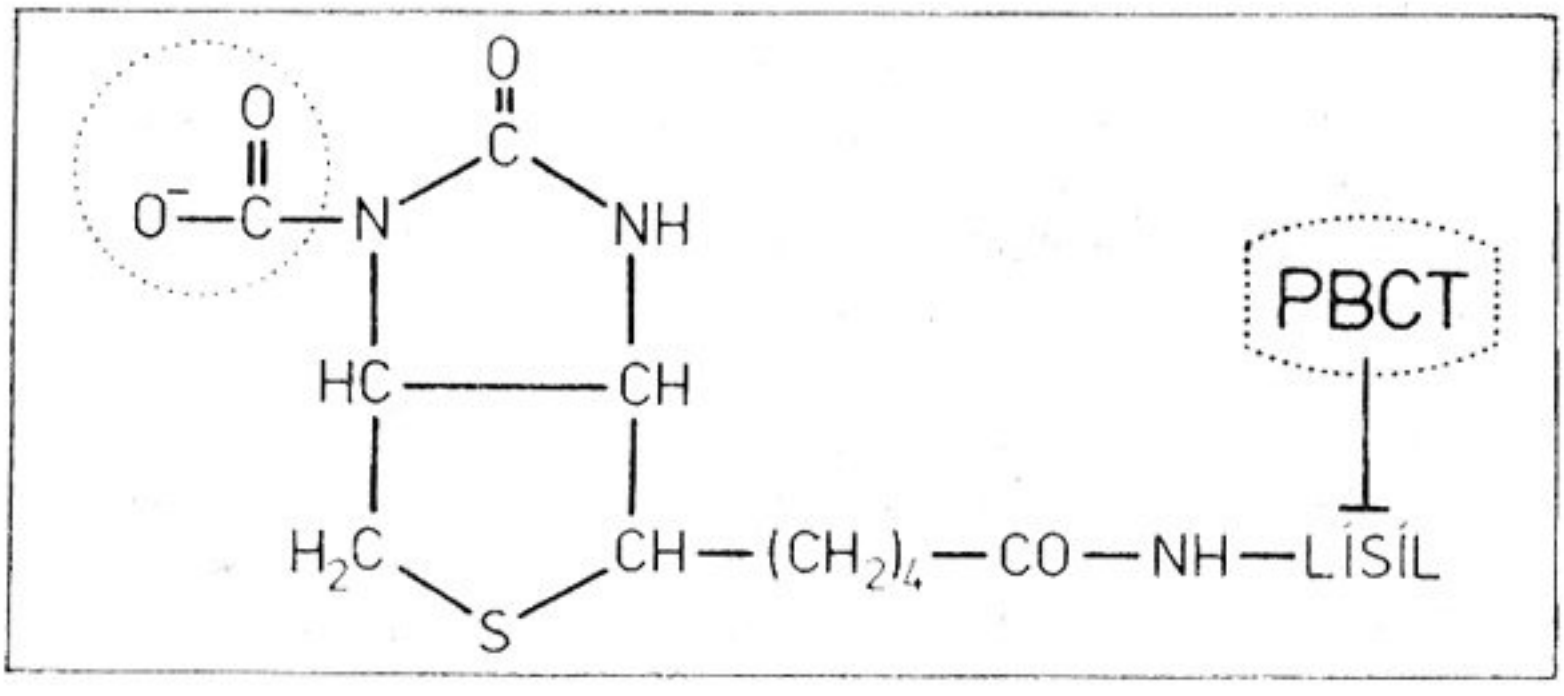
Biotina se găseşte în organism sub formă liberă şi mai ales, sub formă de **biocitină**. Sângele uman prezintă o enzimă **biotinolaza** datorită căreia hidrolizează biocitina la biotină şi lizină.

Rol biologic. Biotina îndeplineşte funcţia de coenzimă, participând în reacţiile enzimatice de transfer al grupării carboxil, respectiv reacţiile de carboxilare şi decarboxilare a cetoacizilor. In reacţiile de carboxilare catalizate, biotina, în calitate de coenzima, funcţionează ca un transportor de $CO_2(COO^-)$. Mecanismul de reacţie implică participarea unei proteine cu masă moleculară mică (20.000) denumită **Proteină-Biotin-Carboxil-**

Transportoare (PBCT), care leagă covalent 1 mol de biotină prin intermediul lizinei. In prezenţa enzimei biotin carboxilaza PBCT este carboxilată prin fixarea CO_2, formând un complex intermediar carboxil - biotinil - proteină.

Tabela 4.18 **Tipurile de biotină**

Formula generala	R – structură demnmire	Tipul de biotina
	1  [Acid izovalerianic]	[α Biotina]
	2  [Acid valerianic]	[β Biotina]
	3  [Acid valerianic + Lisina]	[Biocitina] ε-N-biotinil L-Lisina



In următoarea etapă a reacţiei de carboxilare, gruparea COO^- este transferată pe o

moleculă acceptoare.

In tabela 4.19 sunt prezentate câteva procese în care biotina participă în calitate de coenzimă.

Tabela 4.19 **Enzime biotin dependente**

Enzima	Reacţia catalizată
1) Acetil-CoA-carboxilaza	Acetil~CoA + Co_2 ⇌ Malonil~CoA
2) Propionil-CoA-carboxilaza	Propionil~CoA + CO_2 ⇌ Metil malonil~CoA
3) Piruvat - carboxilaza	Piruvat + CO_2 ⇌ Oxalilacetat
4) Metil malonil-CoA- -carboxitransferaza	Metil malonil~CoA + Piruvat ⇌ Propionil~CoA + Oxalilacetat

Modul cum intervine o enzimă biotin dependentă este prezentat în exemplul de mai jos care ilustrează **carboxilarea acidului piruvic** (etapa cheie din gluconeogeneză).

a). $PBCT + HCO_3^- + ATP \underset{\text{carboxilaza}}{\overset{\text{Biotin}}{\rightleftharpoons}} {}^-OOC-PBCT + ADP + P_i$

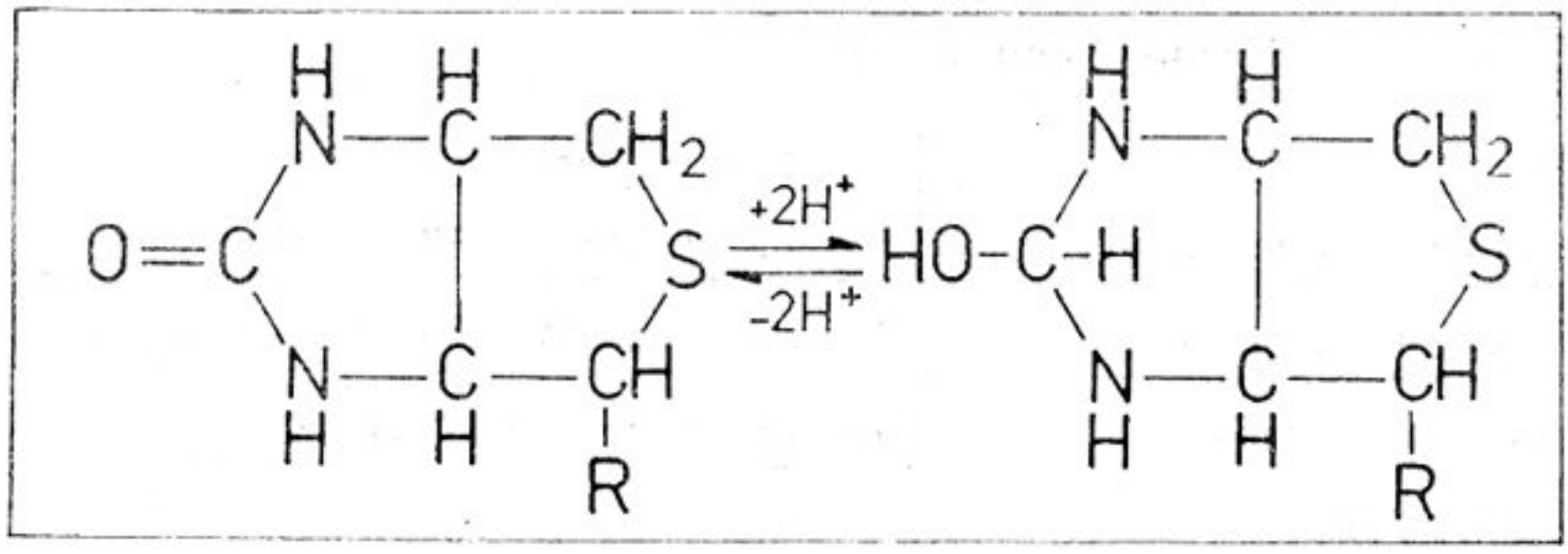
b). $^-OOC-PBCT + CH_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-COOH \underset{\text{carboxilaza}}{\overset{\text{Trans}}{\rightleftharpoons}} \begin{matrix} COO^- \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CO \\ | \\ COOH \end{matrix} + PBCT$

In toate sistemele enzimatice de carboxilare biotina în stare potenţial funcţională se află numai sub formă de complex proteic analog cu PBCT; sub această formă, biotina îşi manifestă capacitatea de a fixa reversibil CO_2 necesar reacţiilor de carboxilare şi, respectiv, transcarboxilare. Biotina este implicată în procese biochimice de o importanţă deosebită:

- ◆ - biosinteza acizilor graşi şi a colesterolului;
- ◆ - biosinteza şi interconversiunea unor aminoacizi;
- ◆ - biosinteza bazelor purinice şi pirimidinice;
- ◆ - biosinteza proteinelor tisulare şi enzimatice;
- ◆ - biosinteza acidului aspartic şi oleic.

Carenţa biotinică este rară, deoarece flora intestinală sintetizează biotină în cantităţi corespunzătoare. Efecte carenţiale s-au constatat la om şi animale hrănite cu ouă crude. Albuşul de ou conţine o proteină bazică - **avidina** - care posedă o afinitate accentuată pentru biotină; avidina blochează biotina sub forma unui compus inactiv, acţionând ca un inhibitor al sistemelor biotin dependente. Simptomele carenţiale se manifestă prin: dermatite la extremităţi, paloarea pielii, somnolenţă, oboseală, dermatită seboreică însoţită de astenie, dureri musculare şi precordiale. Toate aceste tulburări se suprimă prin administrarea parenterală de biotină.

Biotina mai poate funcţiona şi ca transportor neenzimatic de hidrogen conform reacţiei de mai jos:

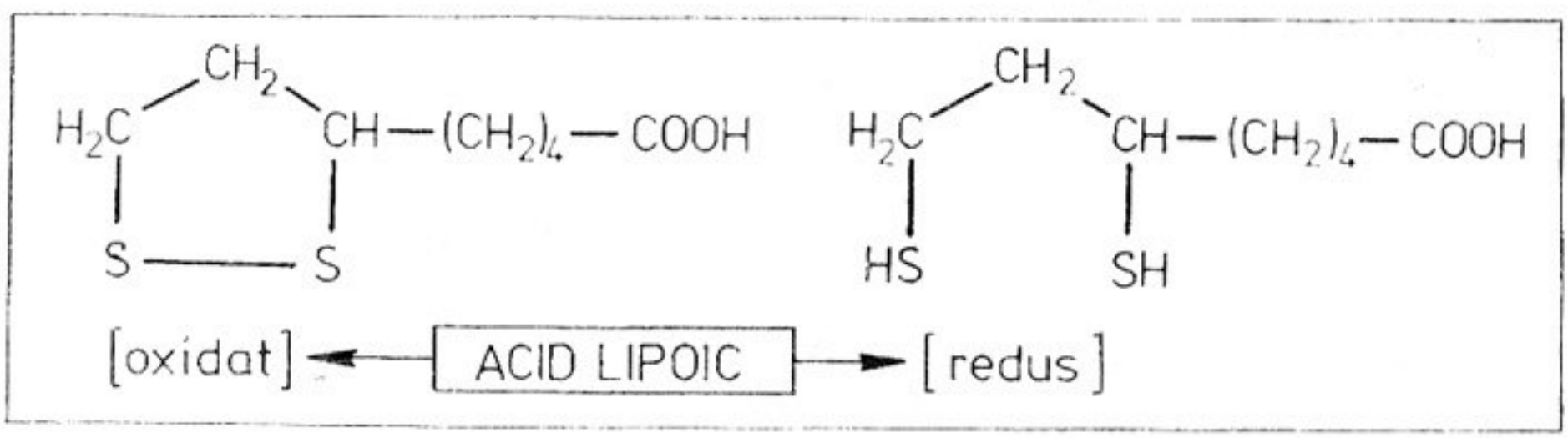


4.3.9 Acidul lipoic

Acidul lipoic sau **acidul tioctic** reprezintă o substanţă căreia i se atribuie caracter de vitamină, deşi nu s-a putut pune în evidenţă o avitaminoză tipică faţă de această substanţă. O justificare pentru includerea sa în grupul vitaminelor o constituie faptul că, în anumite procese enzimatice, esenţiale, pentru metabolismul intermediar, acidul lipoic joacă un rol de coenzimă comparabil şi complementar celui îndeplinit de unele vitamine ale complexului B (tiamina, riboflavina şi niacinamida).

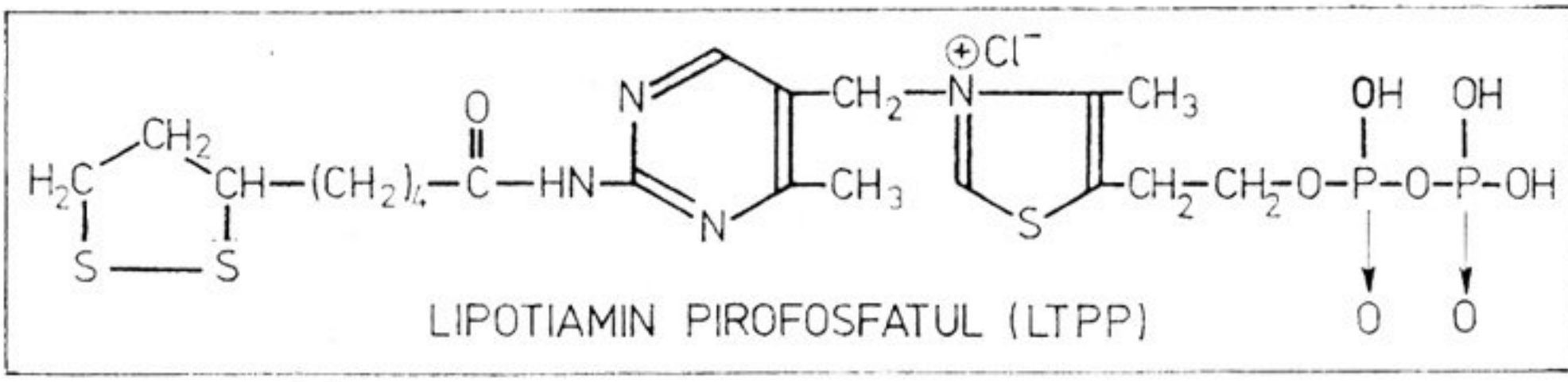
Acidul lipoic se află răspândit în diferite ţesuturi: ficatul şi drojdia constituie surse bogate în acid lipoic. Se găseşte sub formă legată cu proteinele, din care este eliberat prin proteoliză.

Structură. Acidul lipoic are o structură relativ simplă, care constă din opt atomi de carbon şi din doi atomi de sulf, structură care îi conferă şi denumirea de acid **tiotic** (1.2-ditiolan-3-valerianic). In ţesuturi se găseşte atât sub formă oxidată, cât şi redusă (**acid dihidrolipoic**).



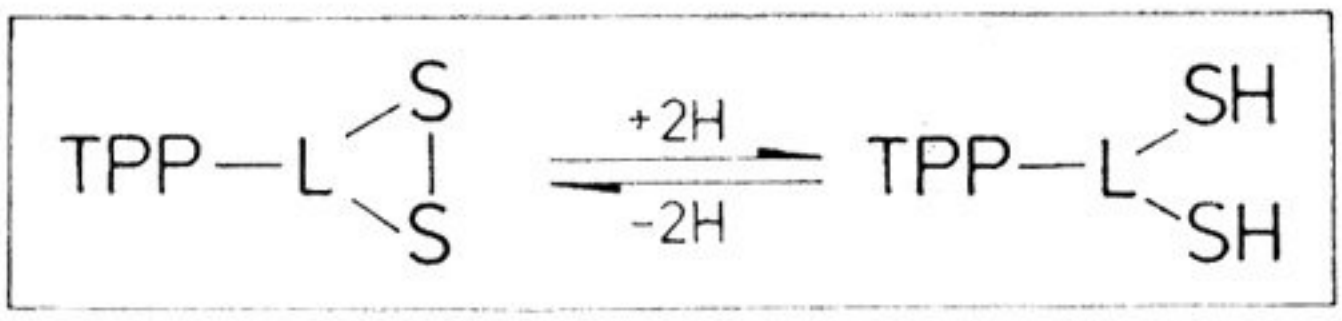
Acidul lipoic a)oxidat; b)redus

Forma biologic activă, cu funcţie de coenzimă, este lipotiaminpirofosfatul (LTPP) produsul de conjugare al acidului lipoic cu esterul pirofosforic al tiaminei; cele două componente se unesc printr-o legătură de tip amidic - CO - NH - care se stabileşte între gruparea carboxil a acidului lipoic şi gruparea aminică fixată de C_5 din ciclul primar al tiaminei.



LIPOTIAMIN PIROFOSFATUL (LTPP)

Lipotiaminpirofosfatul (LTPP) funcţionează ca un sistem oxido-reducător reversibil.

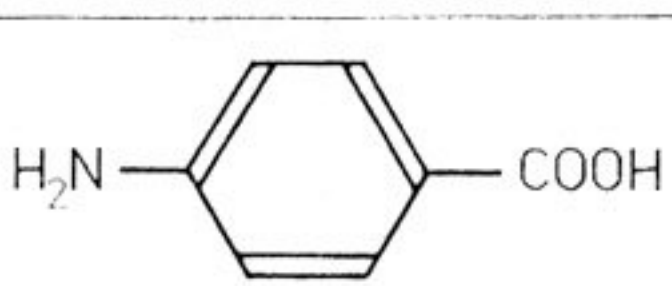


Principala funcţie biologică a acidului lipoic o constituie participarea sa în reacţia de decarboxilare oxidativă a α cetoacizilor (acidul piruvic şi α ceto glutaric), sub acţiunea complexului multienzimatic piruvat dehidrogenaza.

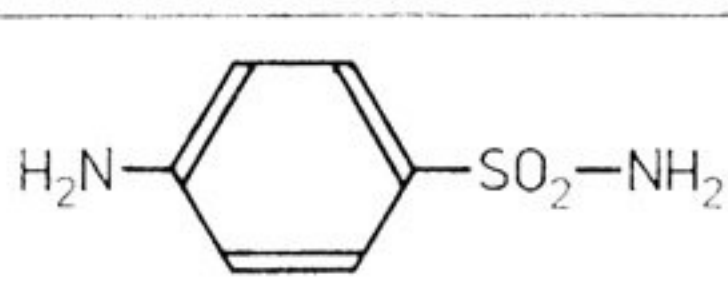
In afecţiunile hepatice care se manifestă cu o dereglare a metabolismului cetoacizilor se administrează acid lipoic.

4.3.10 Acidul para amino benzoic

Acidul p - aminobenzoic (PAB) este cunoscut de mai bine de 100 de ani; este considerat ca vitamină din momentul în care s-a constatat acţiunea sa antagonistă faţă de sulfamide.



[Acid p-amino benzoic]



[Acid p-amino benzsulfonamida]

Este răspândit în plante, ţesuturi animale şi microorganisme sub formă liberă şi combinată fiind constituent al acizilor pteroilglutaminici (acizi folici).

PAB participă la formarea acizilor pteroilglutamici intervenind în procesul de creştere, stimulează biosinteza acidului pantotenic şi a biotinei, intervine în metabolismul fierului, favorizând transportul acestuia la organele hematopoietice, interacţionează cu sulfonamidele administrate, în raport cu care manifestă o acţiune antagonistă. Sulfamidele prezintă analogie structurală cu PAB şi se comportă ca antivitamine; exercită şi un efect bacteriostatic, inhibând creşterea bacteriilor.

Tabela 4.20 **Conţinutul în PAB al unor alimente**(după Matilda Rosetti Colţoiu,1980)

Sursa	PAB/100g	Sursa	PAB/100g
Drojdie uscată	123 - 264	Muşchi	0,6
Drojdie proaspătă	32 - 64	Rinichi	6,6
Gălbenuş de ou	0,6 - 0,8	Tomate	1,0 - 1,9
Ficat	2,6	Zer de lapte	1,9 - 3,8

Mecanismul prin care se realizează acest efect se bazează pe proprietatea sulfonamidelor de a substitui PAB în structara acizilor pteroilglutamici (**acizi folici**); aceşti acizi cu structură astfel modificată nu-şi mai pot exercita acţiunea lor de stimulare a creşterii bacteriilor. Proprietatea sulfamidelor de a se comporta ca inhibitori necompetitivi în biosinteza acizilor folici stă la baza utilizării lor în combaterea unor boli infecţioase.

4.3.11 Acizii folici

Generalităţi. Răspândire. Acidul folic a fost izolat din spanac şi din plantele verzi unde este răspândit foarte mult, deoarece au capacitatea de a-l sintetiza. In organismul animal ficatul este cel mai bogat ţesut în acid folic, iar carenţa în acid folic duce la încetinirea creşterii şi la diferite forme de anemie.

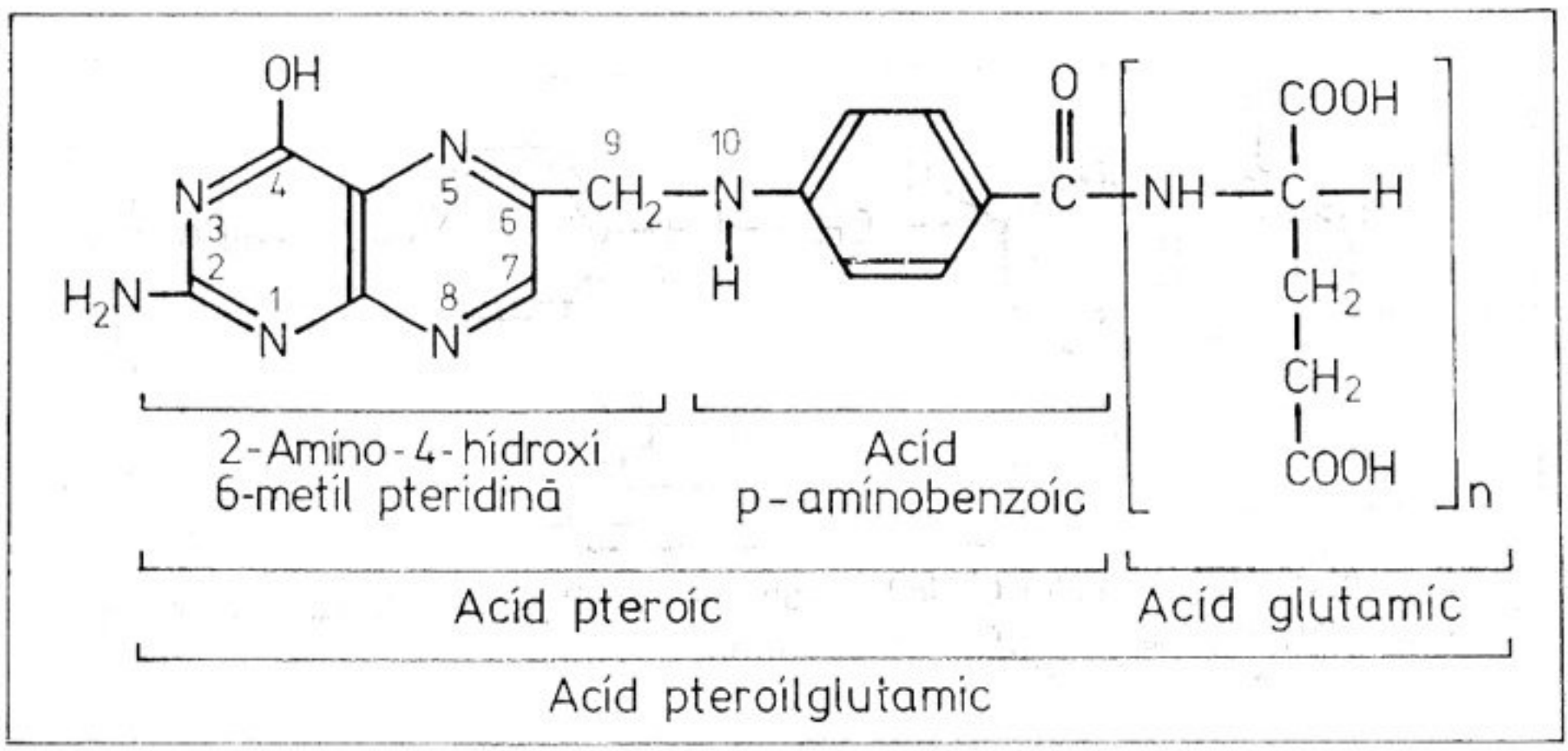
In tabela 4.21 se prezintă conţinutul în acid folic al unor alimente.

Tabela 4.21 **Conţinutul în acid folic al unor alimente**(după Matilda Rosetti Colţoiu,1980).

Sursa	mg Ac.folic /100g	Sursa	mg Ac.folic /100g
Carne de vită	30 - 100	Drojdie	200 - 800
Carne de viţel	20 - 170	Fasole verde	90 - 100
Gălbenuş de ou	30	Germeni de grâu	330 -1100
Ficat de vită	150 - 450	Grâu	50 - 200
Ficat viţel	430 - 880	Grape-fruit	24
Lapte de femeie	33 - 50	Mere	8
Rinichi de vită	30 - 100	Morcovi	60 - 150
Spanac	100 - 300	Piersici	17
Tomate	40 - 110	Varză	90 - 100

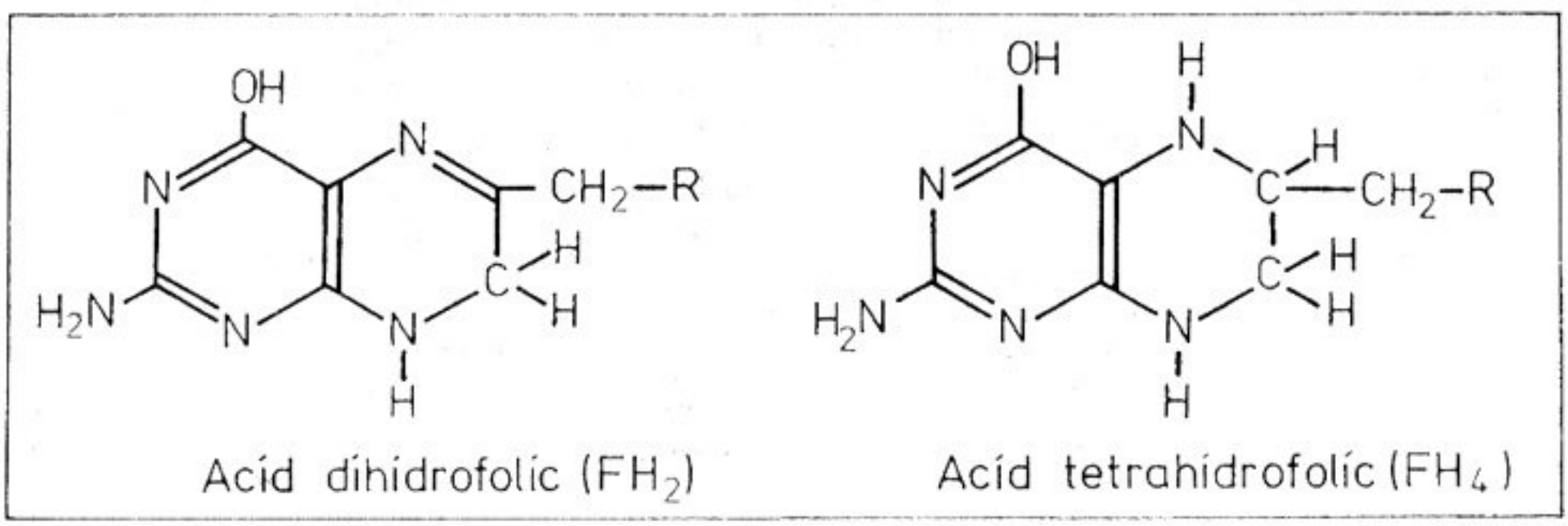
Structuri. Rol metabolic. Acizii pteroilglutamici incluzând acidul folic şi derivaţii săi sunt denumiţi generic **Folacină**.

Acidul folic conţine trei elemente constitutive:
a) - pteridină substituită; b) - acid para - aminobenzoic; c) - acid glutamic, care se condensează.



In ţesuturile vii, acidul pteroil monoglutamic (n=1) este însoţit de derivaţii săi, acidul pteroil glutamic (n=3) şi pteroil hepta glutamic (n=7); sub acţiunea unor enzime denumite **conjugaze**, aceşti derivaţi se transformă în acid pteroilmonoglutamic.

Acidul folic ca atare are rol de vitamină, însă derivaţii rezultaţi prin reducerea sa în celule, şi anume dihidrofolic (FH_2) şi acidul tetrahidrofolic (FH_4) funcţionează în calitate de coenzime.

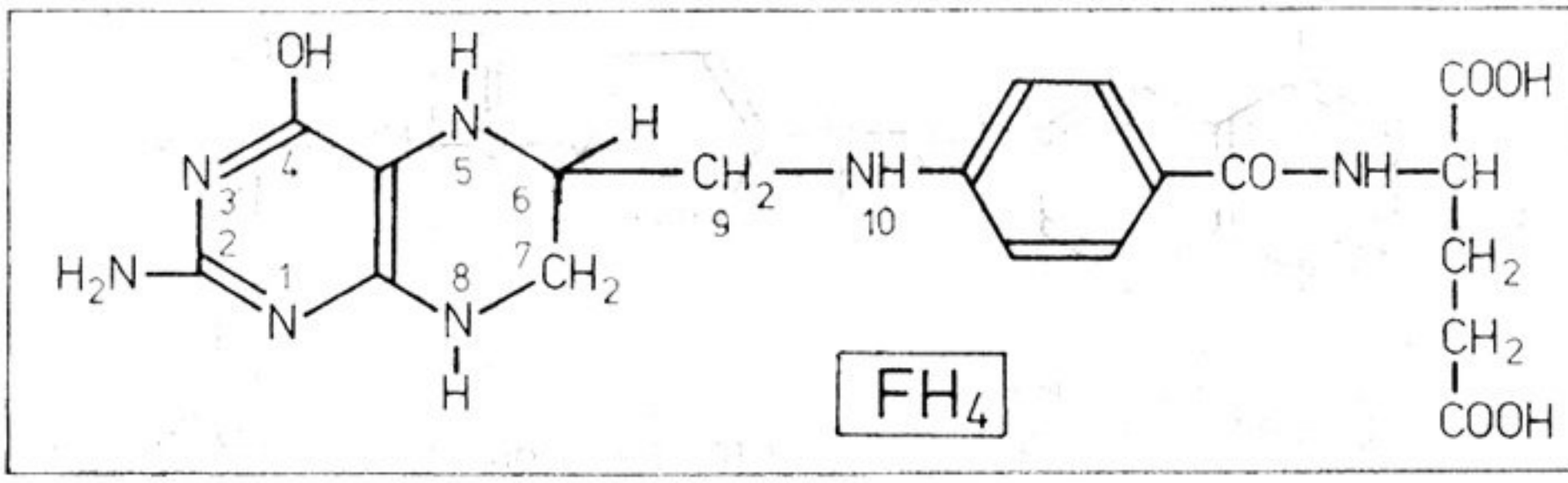


Acidul folic (F) se transformă în acid dihidrofolic (FH_2) sub acţiunea enzimei **folic reductază**; într-o etapă ulterioară intervine enzima **dihidrofolic reductază** care reduce FH_2 la

acid tetrahidrofolic (FH_4), coenzima în ambele cazuri este NADPH.

a) $F + NADPH + H^+ \longrightarrow FH_2 + NADP^+$
b) $FH_2 + NADPH + H^+ \longrightarrow FH_4 + NADP^+$

Acidul tetrahidrofolic, în calitate de coenzimă, îndeplineşte un rol central funcţionând ca transportor al fragmentelor monocarbonate pe care le activează şi le transportă în diferite reacţii de biosinteză.



Transportul fragmentelor C_1 de la o substanţă la alta se realizează de către FH_4, care formează derivaţi N_5, N_{10} sau N_5N_{10} tetrahidrofolici.

Tabela 4.22 **Participarea FH_4 în diverse procese**

Gruparea		N_5	N_{10}	Reacţia catalizată
Formil	-CHO	+	+	Biosinteza purinelor
Formimino	-CH=NH	+		Ac.glutamic-Histidină
Hidroximetil	$-CH_2-OH$	+		Glicocol - Serină
Metil	$-CH_3$	+		Homocisteină-Metionină
Metilen	$-CH_2-$	+	+	Serină - Glicocol
Metenil	-CH=	+	+	Biosinteza purinelor

Astfel FH_4 intervine într-o serie de procese, cum ar fi: biosinteza bazelor purinice şi pirimidinice, conversiunea uracilului în timină (formarea ADN-ului), sinteza N - formil metioninei (implicată în reacţia de iniţiere a biosintezei proteinelor), interconversiunea metionină-colină (participând astfel în metabolismul aminoacizilor şi a fosfaţilor), transformarea glicocolului în serină, în biosinteza Hemului şi a histidinei.

Prin participarea sa la biosinteza bazelor purinice şi pirimidinice, deci la biosinteza acizilor nucleici se subliniază rolul fundamental pe care-l joacă acidul folic în creşterea şi reproducerea celulară. Legând acest rol de faptul că celulele sanguine sunt supuse unui ritm de sinteză şi dislocare, se înţelege uşor de ce deficienţa de acid folic se traduce printr-o anemie caracteristică. Pe de altă parte se înţelege de ce formarea leucocitelor este inhibată imediat de antagoniştii acidului folic, utilizaţi în tratamentul leucemiilor: acidul 4 amino folic (aminopterina) şi acidul 4-amino-10-metil folig(**metotrexatul**).

In celulele neoplazice, aceşti compuşi difuzează pe baza unui transport activ, mai uşor decât acidul folic şi acidul tetrahidrofolic, perturbând procesele în care aceştia iau parte în mod normal.

4.3.12 Vitamina B_{12}

Generalităţi. Răspândire. Descoperirea vitaminei B_{12} a avut ca punct de plecare observaţia, făcută în anul 1926 de Minot şi Murphy că ficatul crud, consumat în cantităţi mari, are acţiune curativă în **anemia pernicioasă** de tip **Biermer**. Această observaţie a constituit punctul de plecare a numeroase cercetări biochimice şi fiziologice întreprinse pe parcursul a 20 de ani, care au condus la izolarea factorului antipernicios din ficat, realizată concomitent de Folkers şi Rickes în SUA şi de Lester Smith în Anglia.

Structura sa complicată a fost elucidată în 1955, printr-un efort comun al unor colective heterogene de cercetători din care au făcut parte: chimişti, fizicieni, biologi, cristalografi, matematicieni, sub îndrumarea lui Dorothy Hodgkin şi E.L.Smith.

Utilizarea vitaminei B_{12} în terapeutică a fost posibilă din punct de vedere economic, după ce s-a observat că unele microorganisme ca **Streptomyces griseus**, Bacillus meghaterius, **Streptomyces olivaceus**, sintetizează şi eliberează în mediu de cultură cantităţi importante de vitamina B_{12}; vitamina B_{12} constituie deci un produs **secundar** al fabricării **streptomicinei**.

Vitamina B_{12} se găseşte răspândită numai în organismul animal şi în microorganisme, pentru care constituie un factor de creştere.

Tabela 4.23 **Conţinutul în vitamina B_{12} al unor alimente**
(după Matilda Rosetti Colţoiu 1980)

Sursa	Micrograme la 100 g	Sursa	Micrograme la 100g
Brânză	20	Lapte de femeie	0,003 - 0,15
Ficat de porc	20 - 180	Lapte de vacă	0,3 - 1,2
Ficat de vită	30 - 150	Ouă întregi	5 - 10
Ficat de viţel	240	Splină de viţel	95
Gălbenuş de ou	10 - 40	Stridii	15 - 280
Heringi	9 - 11	Rinichi de vită	20 - 32

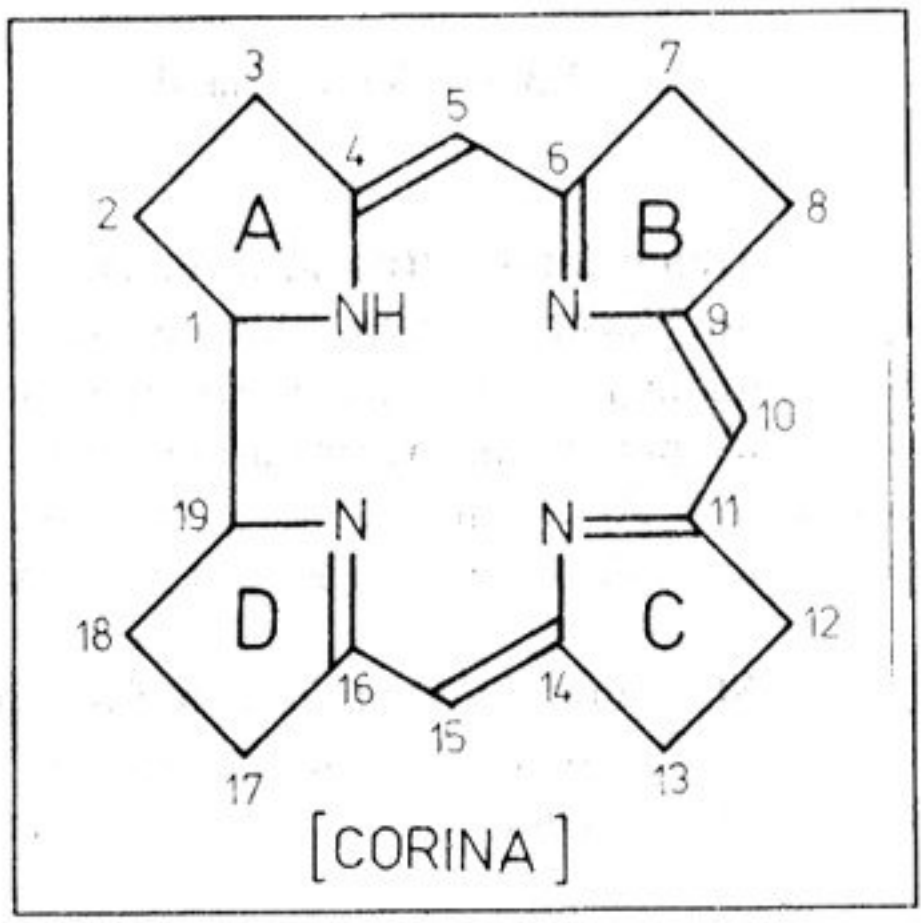
Structura vitaminei B_{12}. Vitamina B_{12} reprezintă un grup de compuşi biologic activi, care conţin în structura lor nucleul corinic. Componentele vitaminei B_{12}sunt următoarele:

a) Un macrociclu derivat de la porfirină (**corina**) format din patru nuclee pirolice (A,B,C,D) cu şase duble legături conjugate, într-o aranjare diferită de aceea din nucleul porfirinic: trei punţi metinice de legătură la trei nuclee pirolice.

La acest nucleu sunt fixate opt grupări metil la atomii de carbon ($C_{1,2,5,7,12,12,15,17}$), trei resturi de acetamidă ($C_{2,3,18}$) şi patru resturi de propionamidă ($C_{3,8,13,17}$).

b) Un nucleotid format din **5,6 dimetil-benzimidazol, ribofuranoză şi acid fosforic**, se

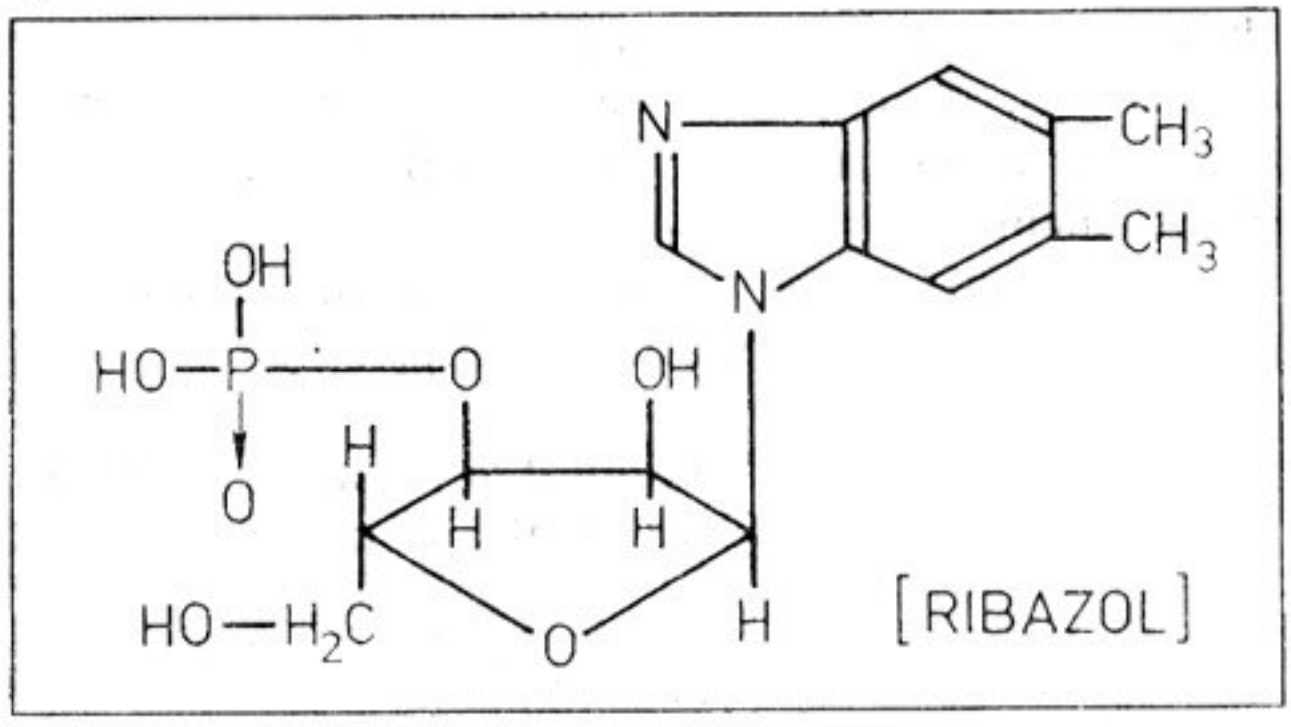
numeşte **Ribazol**.



c) o moleculă de **aminopropanol**:

$$H_2N - CH_2 - \underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}} - CH_3$$

care stabileşte legătura dintre nucleotidul menţionat cu ciclul corinic, prin intermediul acidului fosforic din structura nucleotidului şi un rest de propionamidă din poziţia 17 a ciclului D (legătura se face prin eliminarea unei molecule de amoniac).



d) Un **atom** de **cobalt** trivalent situat în centrul nucleului tetrapirolic fixat prin legături coordinative de atomii de azot ai ciclurilor A,B,D,D şi legat în acelaşi timp de atomul N_3 din ciclul imidazolic al 5,6-dimetil-benzimidazolului.

Datorită prezenţei atomului de cobalt, vitamina B_{12} se mai numeşte şi **cobalamină**.

De atomul de cobalt central se pot lega diferite grupări ca: -CN, -OH sau -NO_2, iar cobalaminele care conţin aceste grupări poartă denumirea de **ciancobalamine, oxicobalamine,** sau **nitrocobalamine**. Cianocobalamina (vitamina B_{12} propriu-zisă) este o substanţă cristalină, constituită din ace roşii rubinii, care se descompun fără topire la temperaturi mai mari de 300°C. Este solubilă în apă, alcool metilic, alcool etilic, insolubilă în acetonă, eter, cloroform. In soluţie apoasă, vitamina B_{12} prezintă un spectru de absorbţie caracteristic cu maxime la 272, 361 şi 560 nm.

Rol biologic. In organismul uman, vitamina B_{12} se găseşte predominant sub formă de coenzimă denumită **coenzima B_{12}**. Aceasta rezultă prin conversia vitaminei B_{12} a cărei grupare **-CN** este înlocuită cu radicalul **5'-adenozil** sub acţiunea enzimei **coenzim-B_{12} sintetaza**.

Coenzima B_{12} intervine într-o serie de procese:

a) - **Catabolismul propionaţilor** - Propionil~CoA apare ca rezultat al catabolismului acizilor graşi cu număr impar de atomi de carbon şi al timinei.

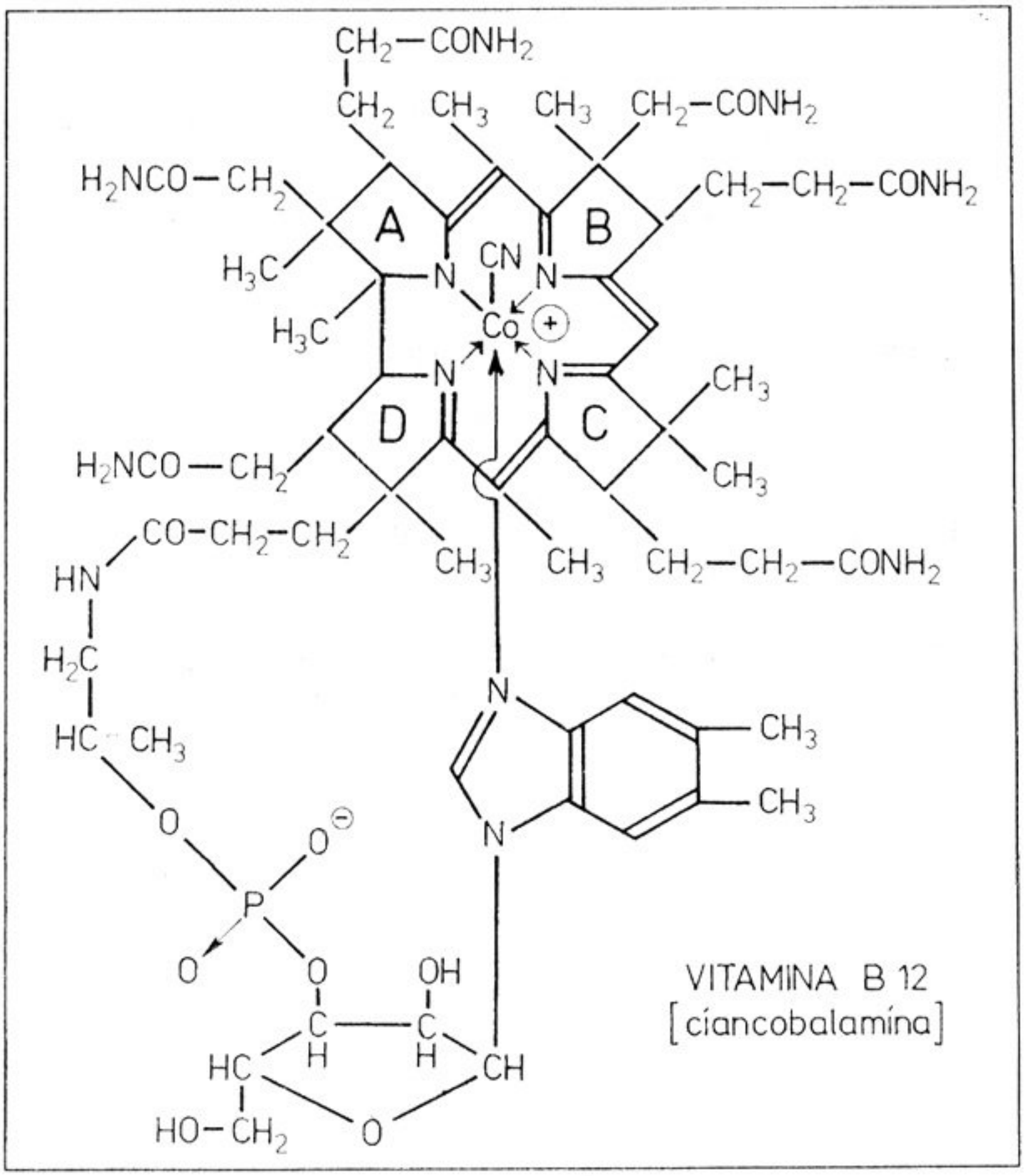
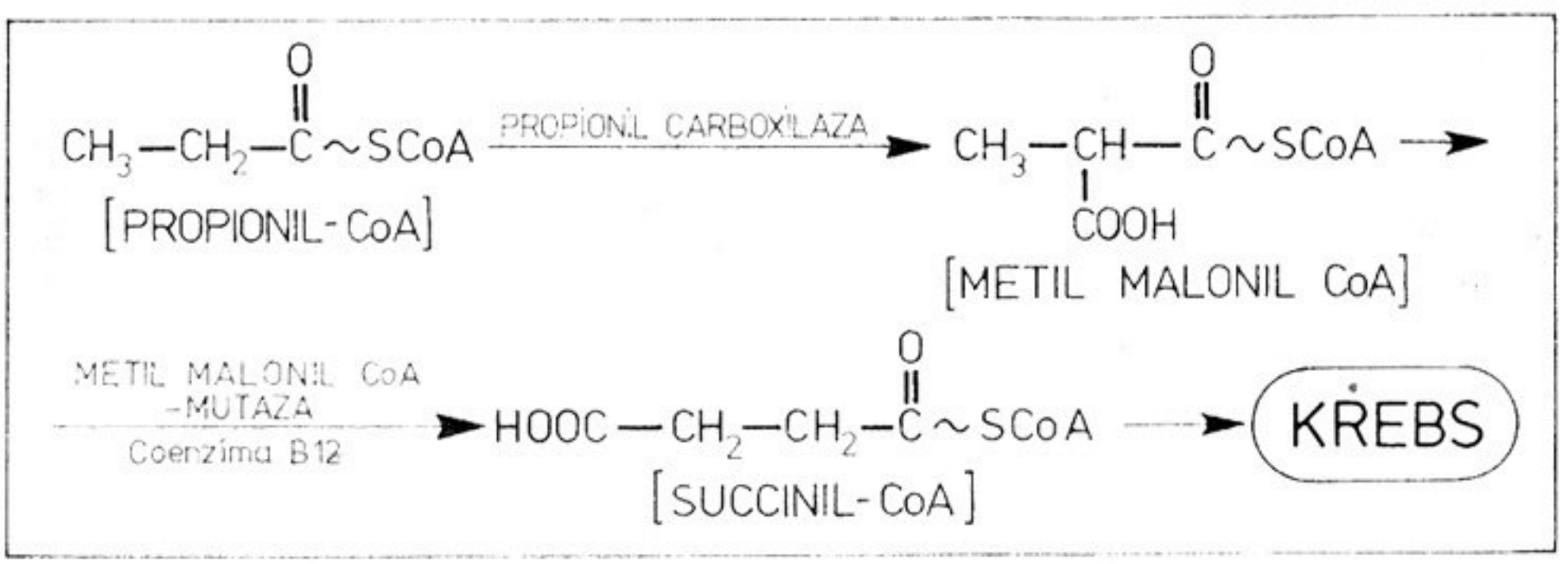
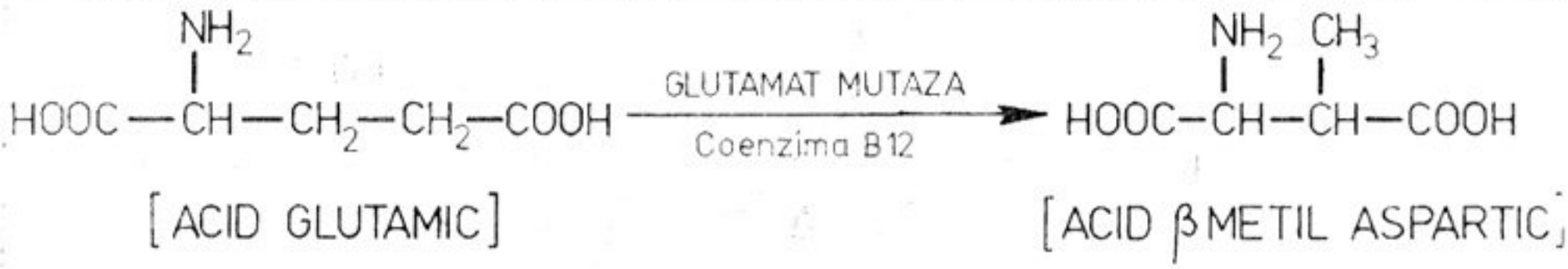


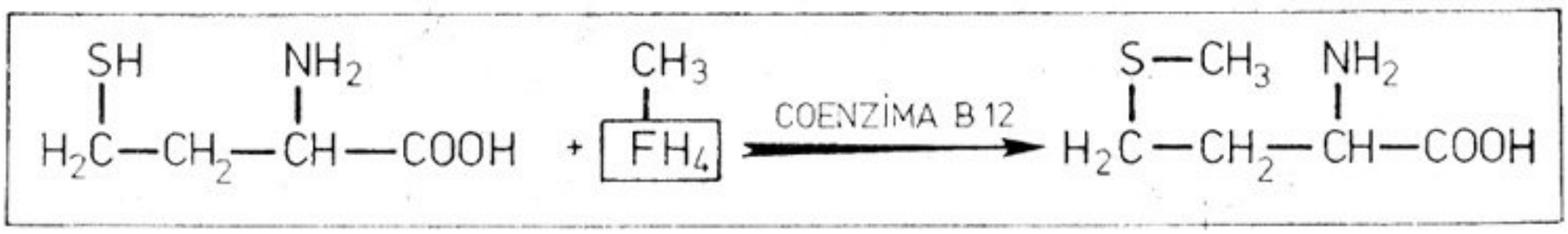
Fig. 4.5 **Structura vitaminei B_{12} (ciano-cobalamina)**



b) - Transformarea **acidului glutamic** în acid **ß-metilaspartic** sub acţiunea glutamatmutazei şi în prezenţa coenzimei B_{12}.



c) - **Metilarea homocisteinei** cu formarea metioninei.



d) - **Reducerea ribonucleozidtrifosfaţilor** la 2'-dezoxiribonucleozidtrifosfaţi. In această reacţie sunt implicate două proteine: **tioredoxina**, conţinând o grupare disulfurică şi **tioredoxin reductaza**, o enzimă ce catalizează în prezenţa NADPH, reducerea legăturii disulfurice din molecula tioredoxinei. Tioredoxina redusă efectuează în prezenţa 5'-deoxiadenozil corinoidului reducerea nucleozidtrifosfaţilor (NTP) la deoxinucleozidtrifosfaţi (d-NTP).

Vitamina B_{12} prezintă un spectru larg de acţiune intervenind în reacţiile de **metilare, carboxilare** şi **biosinteza ADN, biosinteza Hemului, biosinteza proteinelor**, ca şi stimularea anabolismului proteic şi lipidic. Sub aspect fiziologic, manifestă un rol esenţial în procesul de **hematopoeză** prevenind anemia, constituie un factor de creştere pentru organismele tinere, favorizează diviziunea celulară, menţine integritatea celulei nervoase. Carenţa în corinoide provoacă **anemia pernicioasă**; proeritoblaştii măduvei osoase nu se mai pot maturiza în normoblaşti, ci dau naştere unor celule imature deformate de tip megaloblastic. Instalarea anemiei pernicioase poate fi consecinţa unor **defecte de absorbţie**; absorbţia acestor vitamine este condiţionată de existenţa unei **glicoproteide** elaborată de mucoasa gastrică, şi care formează un complex de cobalamine, denumit "**factorul intrinsec al lui Castle**", vitamina B_{12} reprezentând "**factorul extrinsec**".

La bolnavii cu anemie pernicioasă, mucoasa gastrică nu produce "factor intrinsec", astfel încât ei nu-şi pot împlini nevoia de factor antipernicios şi acesta trebuie să fie furnizat ca atare (sub formă de ficat sau extract de ficat). Alături de alterările hematologice (caracteristice) se înregistrează şi alte simptome: astenie, paloare, atrofia mucoaselor digestive, afecţiuni neurologice etc. Administrarea acidului folic concomitent cu vitamina B_{12} face ca toate aceste fenomene să dispară.

◆ Deşi vitaminele sunt considerate ca "**factori exogeni**" se precizează că flora intestinală este specializată în **vitaminogeneză** deoarece unele microorganisme pot produce cantităţi apreciabile de vitamine: K, PAB, biotină, B_1, B_2, B_6, PP, acid pantotenic, acizi folici, care pot acoperi parţial necesităţile normale ale organismului uman. Dintre microorganismele producătoare de vitamine amintim: Pseudomonas fluorescens, Proteus vulgaris, Clostridium butylicum, Aerobacter faecalis etc.

5 GLUCIDE

5.1 Consideraţii generale

5.1.1 Definiţie. Nomenclatură

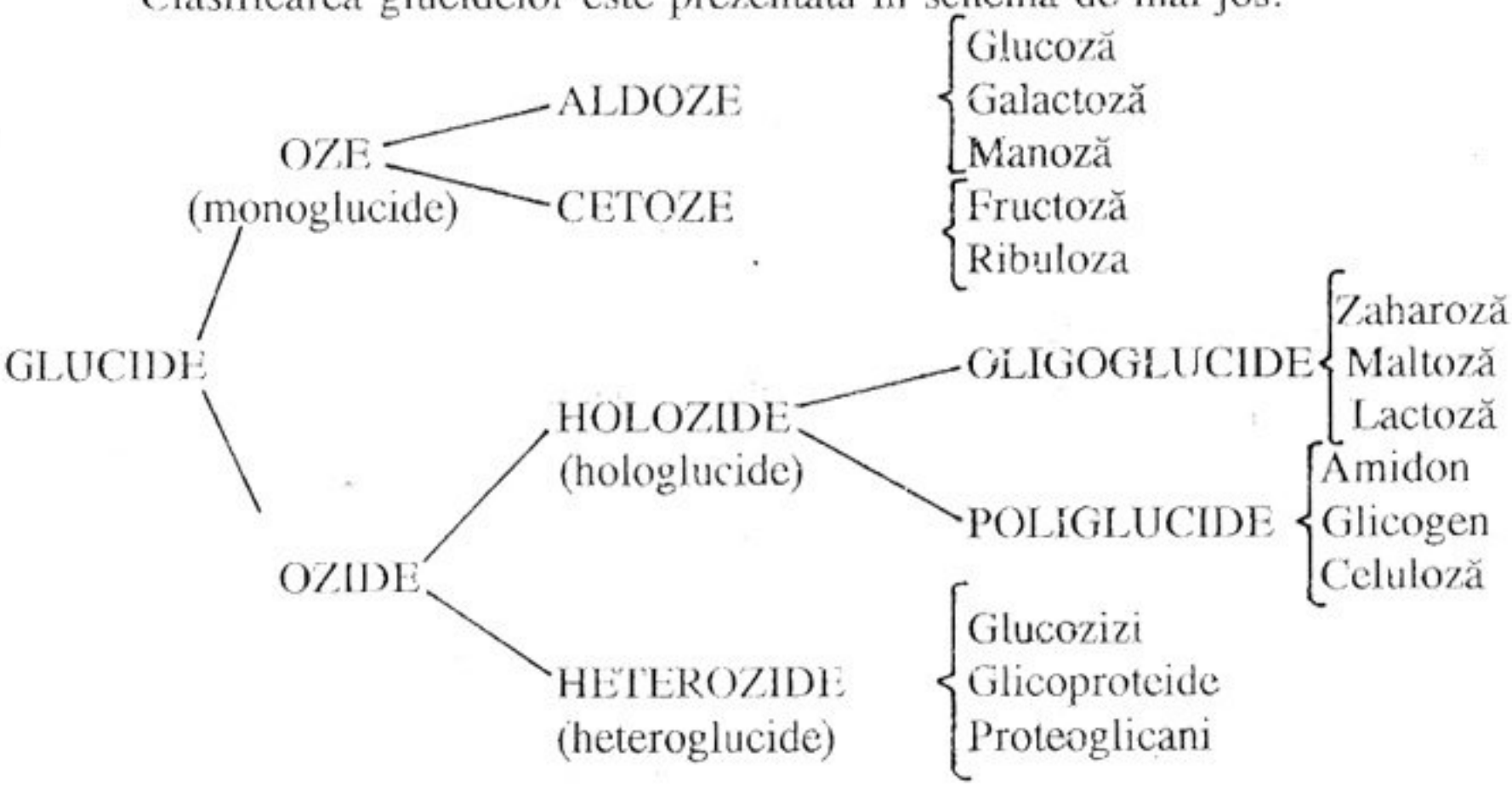
Glucidele sunt biomolecule ternare, foarte răspândite în lumea vie atât în regnul vegetal, cât şi animal, dar cu precădere în regnul vegetal unde sunt rezultatul fotosintezei.

Denumite iniţial "**hidraţi de carbon**", deoarece raportul dintre C, H, O, este identic cu al unor hidraţi $C_n(H_2O)_n$, formulă valabilă pentru cele mai multe substanţe din această clasă, excepţie fac unele substanţe (ramnoză, fucoză, deoxiriboză) care nu corespund formulei de mai sus. Alte substanţe cum ar fi: acid acetic, acid lactic, deşi corespund formulei generale, nu au caracterele acestei clase. In terminologia internaţională există şi denumirea de **zaharuri** de la cuvântul latin "**saccarum**" - substanţă dulce. Denumirea nu a corespuns pe deplin, deoarece exista substanţe din aceasta clasa care nu au gust dulce: celuloza şi amidonul: pe de altă parte există şi substanţe care nu fac parte din această clasă, cum ar fi ciclamatul de sodiu şi zaharina, care sunt mai dulci ca zahărul (prima de 30 de ori, iar cea de-a a doua de 300 de ori). In terminologia actuală s-a atribuit denumirea de **glucide**, de la cuvântul grecesc γλυκός **[glycos]** = dulce, adoptat de Comisia Internaţională de Chimie Biologică. Din punctul de vedere al structurii chimice **glucidele sau zaharurile sunt compuşi polihidroxicarbonilici şi derivaţi ai acestora**.

5.1.2 Clasificare glucidelor. Roluri biologice

In funcţie de comportarea la procesul de hidroliză, glucidele se clasifică în două clase: **oze** şi **ozide**. Ozele sunt glucide nehidrolizabile care conţin un număr mai mic de atomi de carbon (3-7) - se denumesc şi monoglucide. Ozidele sunt glucide care în urma hidrolizei (acide sau enzimatice) dau naştere la **oze** (holozide); altele eliberează pe lângă **oze** şi compuşi de **natură neglucidică** (heterozide).

Clasificarea glucidelor este prezentată în schema de mai jos:



In organismele vii glucidele îndeplinesc funcţii variate:

◆ - **Rol energetic.** In organismul animal şi uman glucidele furnizează până la 70% din energia totală.

◆ - **Rol de substanţe de rezervă.** In organismele animalelor superioare şi al omului, glucoza se depozitează sub formă de **glicogen** hepatic şi muscular. La plante forma majoră de depozit o constituie **amidonul**.

◆ - **Rol plastic.** Glucidele îndeplinesc roluri de substanţe structurale şi de susţinere. Celuloza este principalul component structural din pereţii celulari ai plantelor. Membrana celulară animală conţine glicoproteide, iar substanţa fundamentală intercelulară este formată din proteoglicani.

◆ - **Rol în detoxifiere.** Acizii uronici obţinuţi prin oxidarea menajată a ozelor participă în procesele de detoxifiere la nivelul ficatului.

◆ - **Rolul nuclear.** Riboza şi deoxiriboza sunt componente structurale ale acizilor nucleici (ARN şi ADN).

5.2 Structura monoglucidelor

5.2.1 Caracterizarea monoglucidelor

După numărul de atomi de carbon din moleculă monoglucidele se clasifică în: trioze, tetroze, pentoze, hexoze, etc. (denumirea lor făcându-se prin adăugarea sufixului -ză la rădăcina numărului grecesc al atomilor de carbon). După natura grupării carbonil acestea pot fi aldoze sau cetoze. Exemple:

- Trioze
  - aldotrioze - aldehida glicerică D şi L
  - cetotrioze - dihidroxiacetonă
- Tetroze
  - aldotetroze - eritroză
  - cetotetroze - eritruloză
- Pentoze
  - aldopentoze - riboză, xiloză
  - cetopentoze - ribuloză, xiluloză
- Hexoze
  - aldohexoze - glucoză, galactoză
  - cetohexoze - fructoză, sorboză

Folosind metodologia de studiu a chimiei organice s-a stabilit că glucidele au următoarele caracteristici structurale comune:

◆ - au o catenă **neramificată** de atomi de carbon - excepţie: apioza, streptoza şi hamameloza;

◆ - au o grupare **carbonil** aldehidă sau cetonă;

◆ - au mai multe grupări **hidroxil** secundare şi una primară.

Corelând datele de mai sus se poate afirma că ozele pot fi considerate produşi de oxidare ai poliolilor aciclici, în care o grupă de alcool primar este oxidată la aldehidă, iar una de alcool secundar la cetonă.

5.2.2 Structura şi izomeria ozelor (monoglucidelor)

Principalul reprezentant al acestei clase este **glucoza**. Structura sa lineară a fost

corelată cu datele experimentale:

H-C=O - are compoziţia $C_6H_{12}O_6$
H-C-OH - are o grupare carbonil de tip -CHO evidenţiată prin reacţii de reducere
HO-C-H (Fehling şi Tollens).
H-C-OH - formează derivaţi pentaacetilaţi având cinci grupări hidroxil;
H-C-OH - structura **neramificată** a glucozei a fost precizată prin reducere cu HI cu
H_2-C-OH formare de **iodhexan normal**;

- conform relaţiei lui Van't Hoff, o moleculă care prezintă n atomi de carbon asimetrici poate exista sub forma a 2^n izomeri optici;
- glucoza are patru atomi de carbon asimetrici şi conform relaţiei de mai sus prezintă $2^4 = 16$ izomeri optici.

Formularea lineară sau aciclică a monoglucidelor, scoate în evidenţă prezenţa grupei carbonil. Date experimentale au scos în evidenţă unele neconcordanţe dintre proprietăţile fizico-chimice ale monoglucidelor şi formularea aciclică. Astfel glucoza care este o aldohexoză **nu dă** pozitivă **reacţia Schiff** (nu recolorează în roşu fuxina decolorată cu bioxid de sulf) - una dintre cele mai sensibile reacţii ale aldehidelor. De asemenea glucoza nu formează o combinaţie bisulfitică cu $NaHSO_3$. Toate aceste observaţii experimentale scot în evidenţă faptul că gruparea carbonil din molecula ozelor nu este liberă, ci implicată în legătura semiacetalică. In sfârşit existenţa fenomenului de mutarotaţie şi a izomeriei α/β, manifestată prin variaţia în timp a rotaţiei specifice, nu poate fi explicată decât prin existenţa a doi stereoizomeri cu rotaţii specifice diferite.

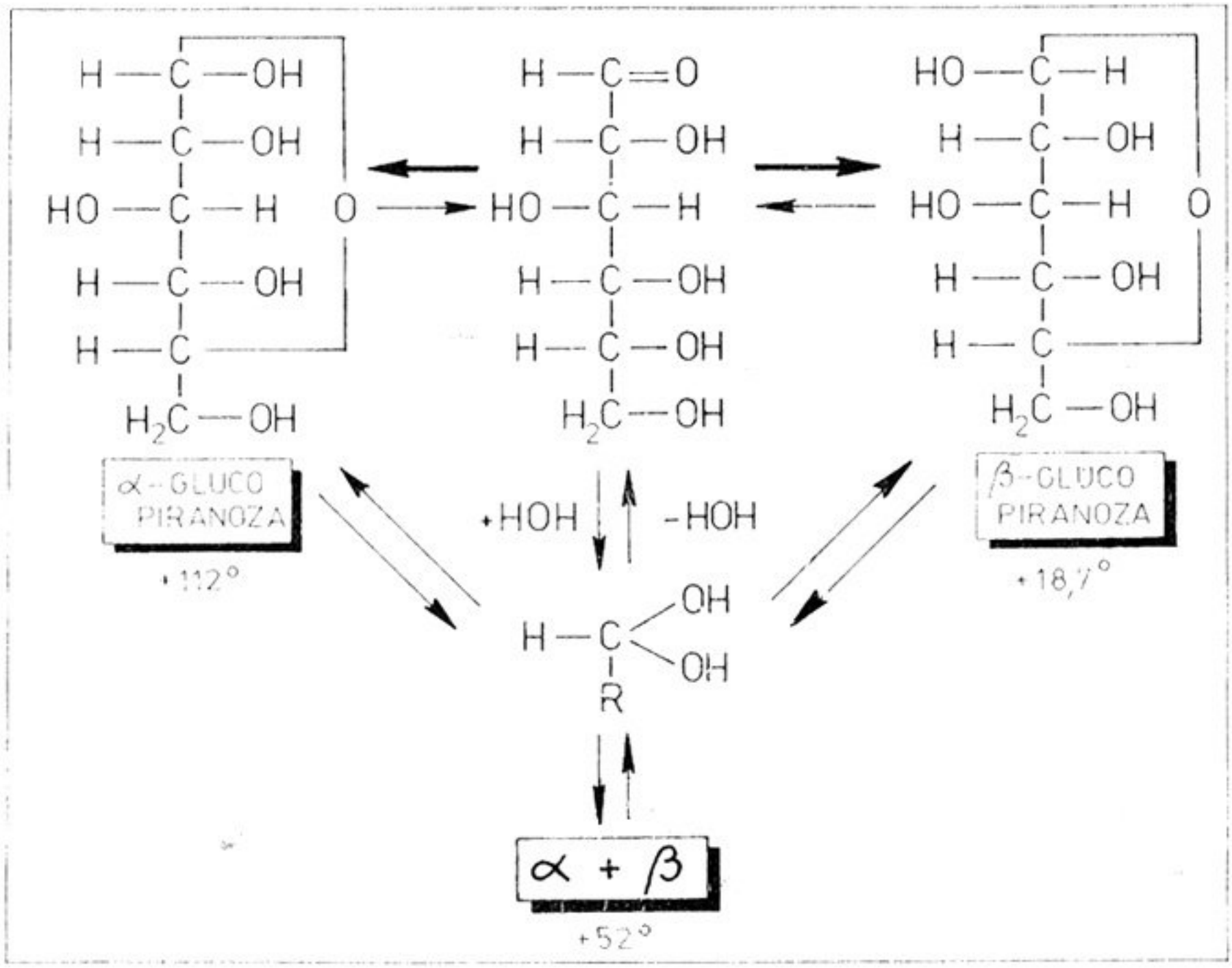


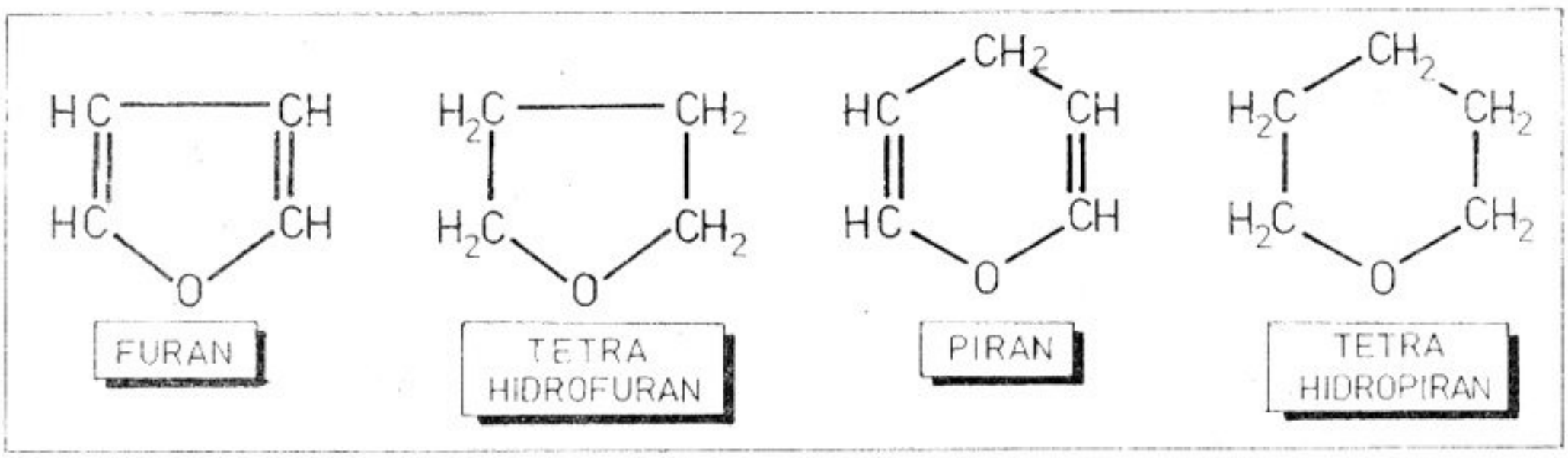
Fig.5.1 **Fenomenul de mutarotaţie**

Soluţia proaspăt preparată de **α-D-glucoză** roteşte planul luminii polarizate cu un unghi de +112° care scade apoi treptat până la +52,5°. Folosind soluţia de ß-D-glucoză, planul luminii polarizate este rotit iniţial cu un unghi de +18,7°, ca după un timp să se stabilizeze la +52,5°. Corelând toate aceste observaţii experimentale, înseamnă că în soluţie coexistă atât forma ciclică cu cei 2 izomeri, cât şi forma liniară liberă într-o proporţie mult inferioară. Ca urmare a reacţiei de ciclizare prin semiacetalizare, atomul de carbon carbonilic devine carbon asimetric putând să adopte două configuraţii sterice diferite. Izomerii α şi ß se numesc forme **anomere** şi au funcţii biologice distincte.

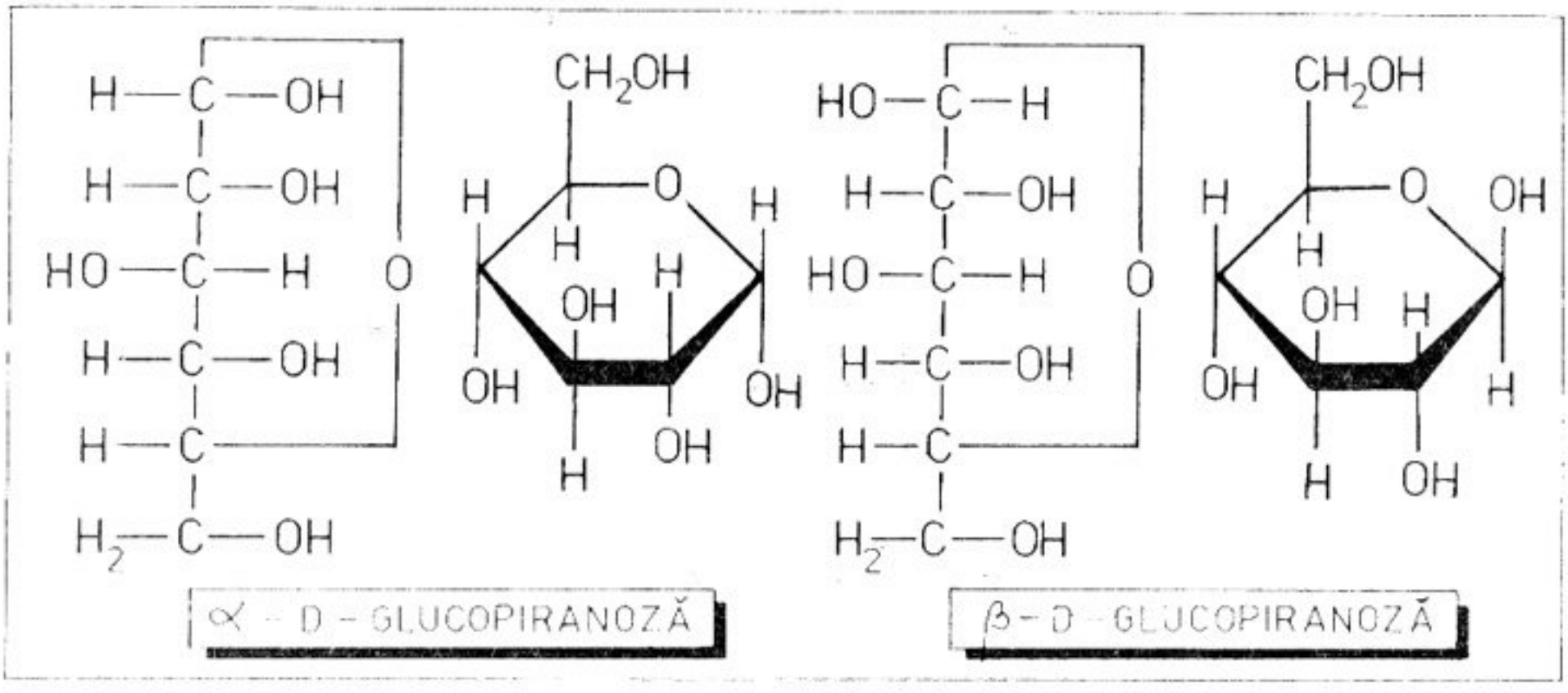
5.2.3 Structura perspectivică tip Haworth

Formularea ciclică semiacetalică Tollens nu redă corect poziţia pe care o ocupă în spaţiu atomii de carbon şi oxigen ai glucozei, fapt confirmat de diagramele de difracţie cu raze X. In reprezentarea Haworth, ciclurile furazonice şi piranozice sunt proiectate ca poligoane regulate perpendiculare pe planul hârtiei şi ţinând seama de valoarea normală a unghiului dintre valenţele carbonului. Latura poligonului apropiată de observator se reprezintă adesea prin linii îngroşate. Substitu enţii care în formulele de proiecţie se găsesc în **stânga** se figurează în formulele tip Haworth **deasupra** planului, iar cei din dreapta **sub** plan.

Ciclizarea pentozelor şi hexozelor se realizează în aşa fel încât să ia naştere un pentaciclu heteroatomic cu un atom de oxigen (ciclu **furanic**) sau un hexaciclu cu un atom de oxigen (ciclu **piranic**), deoarece penta şi hexaciclurile au cele mai mici tensiuni energetice şi deci **stabilitatea** cea mai **mare**.

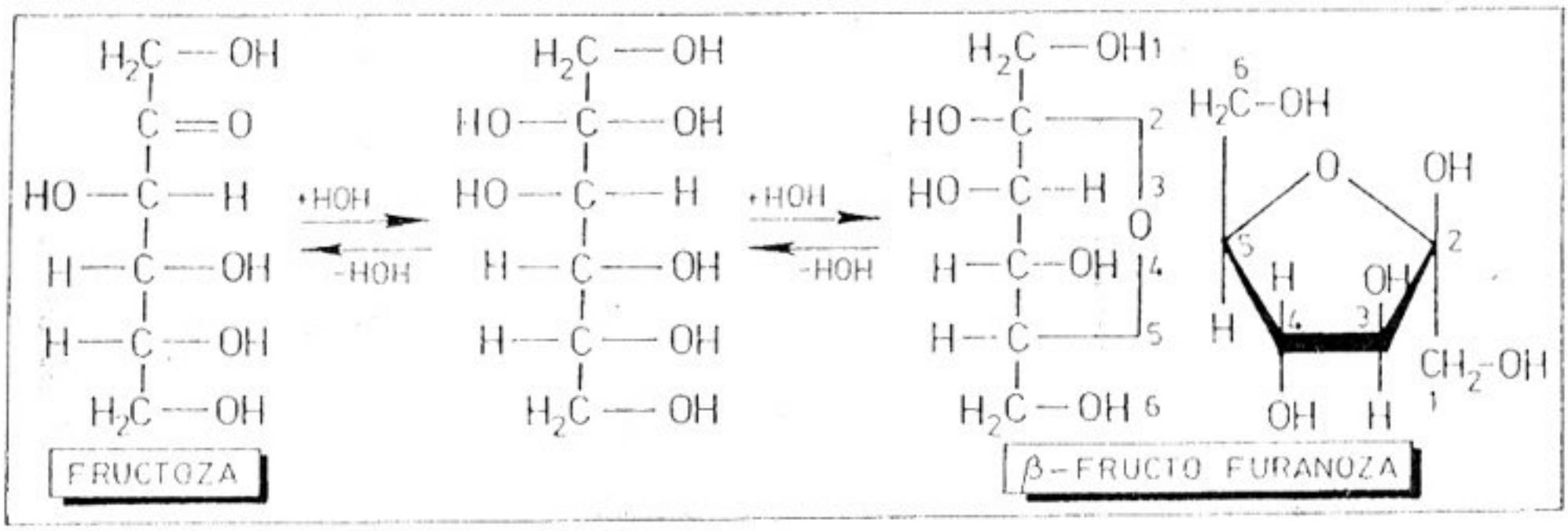


Formele corespunzătoare ale monoglucidelor poartă denumirea de structuri furanozice şi piranozice.



Caracteristică pentru **glucoză** este forma **"piranozică"**, în timp ce pentru **fructoză** este forma "**furanozică**".

In cazul glucozei întâlnim atât forma α, cât şi ß, în timp ce fructoza apare numai în forma ß.



Deoarece s-a constatat că formularea perspectivică nu corespunde întru-totul realităţii, s-a admis existenţa unor conformaţii fără tensiune.

Ciclurile piranozice pot adopta, ca şi ciclohexanul două conformaţii "**scaun**" şi "**baie**".

Diagramele cu raze X au confirmat că hexaciclurile conţinând un atom de oxigen se găsesc exclusiv în conformaţie "**scaun**" - forma cea mai stabilă.

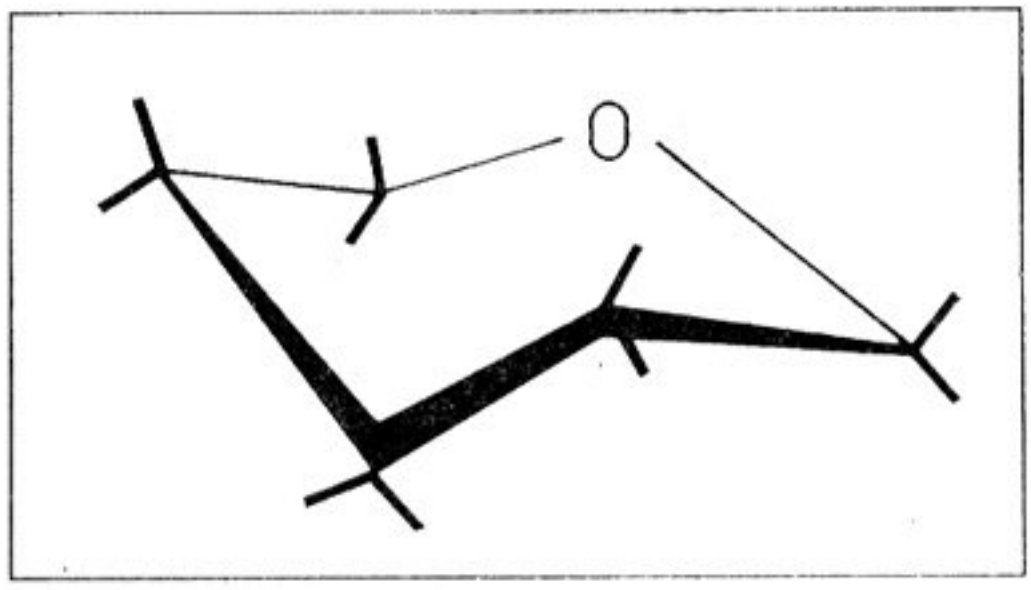


Fig.5.2 **Conformaţia "scaun" a unei piranoze**

Aşadar, în funcţie de proprietăţile care urmează a fi scoase în evidenţă structurile monoglucidelor pot fi prezentate în mod curent linear, ciclic sau perspectivic.

5.2.4 Seriile D şi L ale monoglucidelor

Toate monoglucidele (cu excepţia dihidroxiacetonei) conţin în molecula lor atomi de carbon asimetrici, fiind deci substanţe optic active şi se găsesc fiecare sub forma a doi izomeri optici (enantiomeri sau antipozi optici).

Din motive de sistematizare, compuşii optic activi s-au împărţit în doua serii sterice D şi L, după relaţia configuraţională faţă de un compus de referinţă care este gliceraldehida.

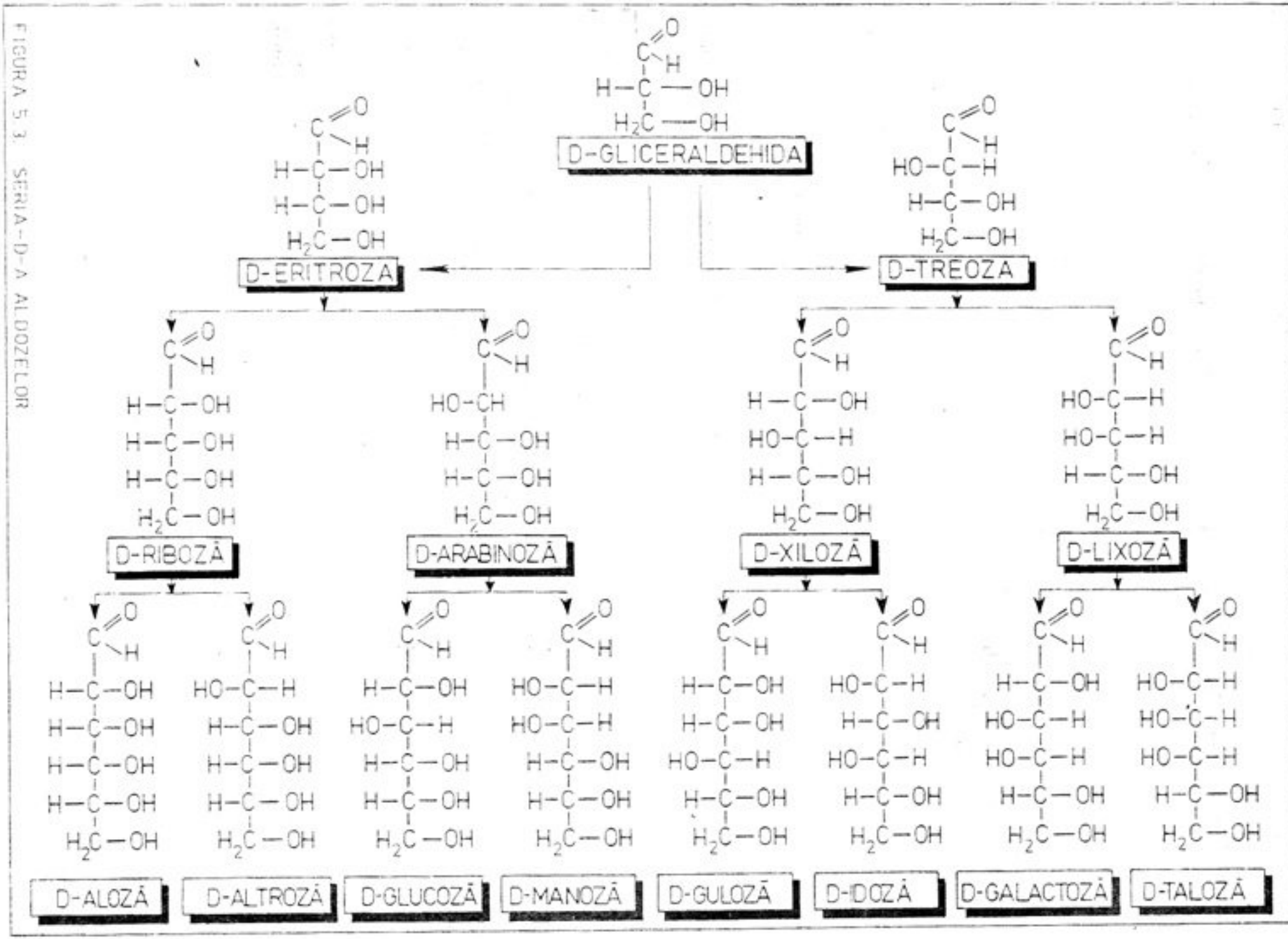


FIGURA 5.3. SERIA D-A ALDOZELOR

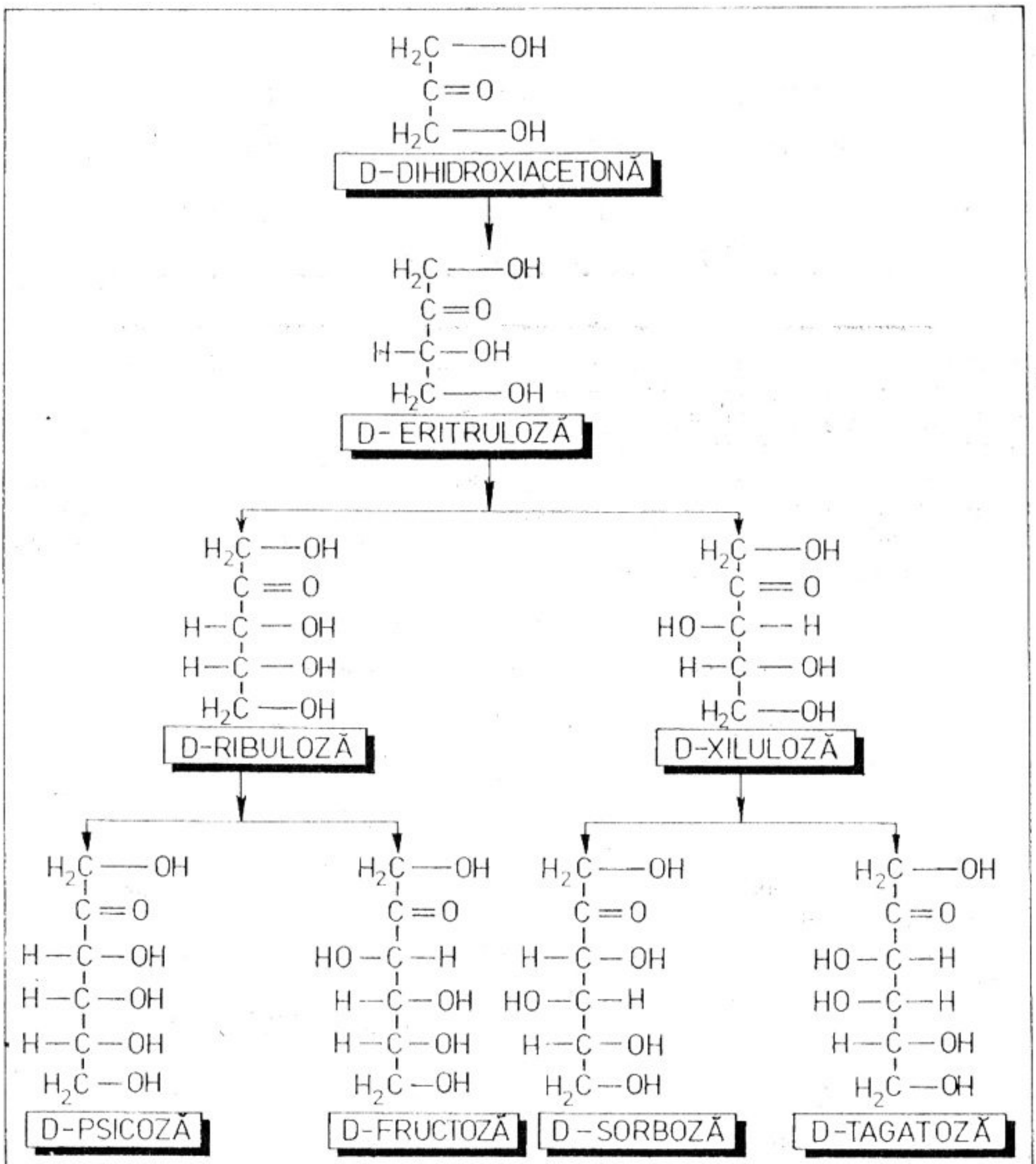
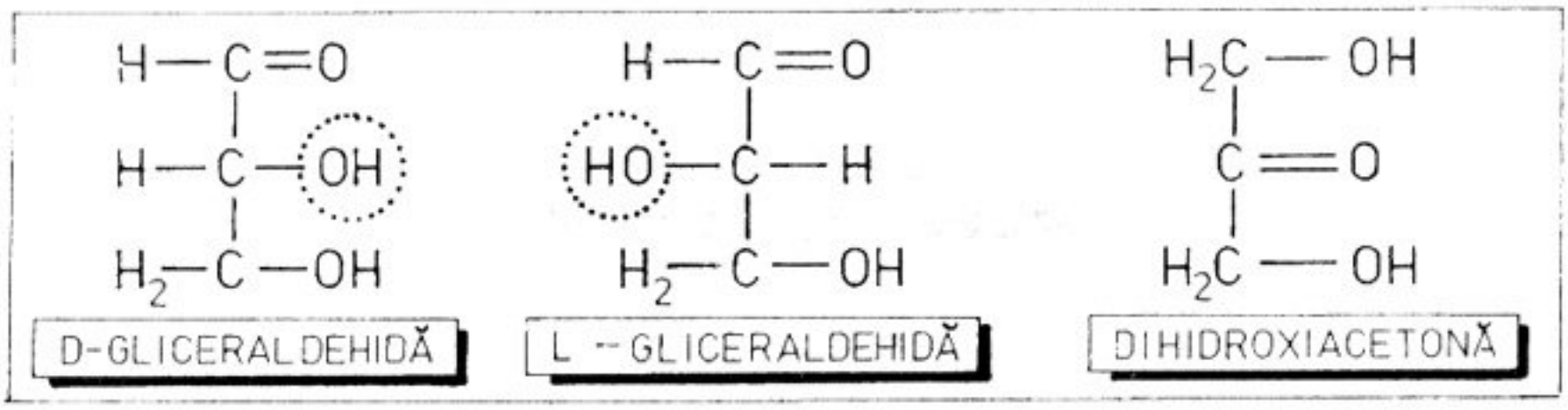


FIGURA 5.4. SERIA-D-A CETOZELOR

Se consideră că ozele care derivă de la **D-gliceraldehidă** şi care au hidroxilul primului carbon asimetric vecin grupării alcoolice primare fixat la dreapta, aparţin **seriei** sterice **D**, iar cele având configuraţia aceluiaşi atom de carbon identică cu cea a carbonului din **L-gliceraldehidă** aparţin **seriei** sterice **L**. In cazul cetozelor substanţa de referinţă este dihidroxiacetona.



In organismul uman şi animal toate glucidele aparţin **seriei D**, deoarece atât enzimele de degradare, cât şi de sinteză a acestei clase de compuşi prezintă o specificitate strictă şi nu recunosc decât reprezentanţii acestei serii.

Seria D a aldozelor se opreşte la **aldohexoze**, deoarece în organismul uman importante sunt pentozele şi hexozele: riboza, arabinoza, glucoza, manoza şi galactoza.

Studiind seria D a cetozelor precizăm că cele mai importante cetoze pentru organismul uman sunt: **dihidroxiacetona, ribuloza** şi **fructoza**.

5.3 Proprietăţile fizice şi chimice ale monoglucozelor

5.3.1 Proprietăţi fizice

◆ Ozele sunt substanţe solide, cristalizate, incolore. Datorită numărului mare de grupări -OH din structura lor, sunt solubile în apă şi în solvenţi polari.

◆ Prezintă o slabă solubilitate în alcool, insolubilitate în eter, cloroform şi alţi solvenţi organici, proprietate utilizată pentru separarea, identificarea şi dozarea lor prin metoda cromatografiei pe hârtie.

◆ Au gust dulce, variabil în funcţie de tipul ozei şi proprietatea de a forma soluţii siropoase.

◆ O proprietate fizică ce diferenţiază ozele între ele este **puterea rotatorie specifică**, datorită faptului că aceste substanţe prezintă activitate optică. Activitatea optică este consecinţă a prezenţei în molecula ozelor a atomilor de carbon asimetrici. Prin activitatea optică se înţelege proprietatea unor substanţe de a devia planul luminii polarizate (lumina în care vibraţiile se propagă într-un singur plan) spre **dreapta** sau spre **stânga**, în funcţie de efectul final dat de suma algebrică a acţiunii fiecărui atom de carbon asimetric. Izomerul care roteşte planul luminii polarizate spre dreapta se denumeşte izomer **dextrogir** şi se notează cu semnul (+), iar cel care roteşte planul luminii polarizate spre stânga poartă denumirea de izomer **levogir** şi se notează cu (-). Amestecul echimolecular al celor 2 izomeri reprezintă **forma racemică**, inactivă din punct de vedere al activităţii optice (datorită compensării activităţii optice opuse de aceeaşi intensitate) şi se notează cu (+,-). Formele dextrogire şi levogire se mai numesc şi forme **enantiomere**. Prin sinteză organică se obţin formele recemice, în timp ce natura sintetizează numai unul sau altul dintre enantiomeri, datorită stereospecificităţii enzimelor implicate în sinteză.

Configuraţia sterică a compuşilor optic activi prezintă un mare interes biologic, deoarece organismul viu are tendinţa de a utiliza selectiv numai una din formele optic active.

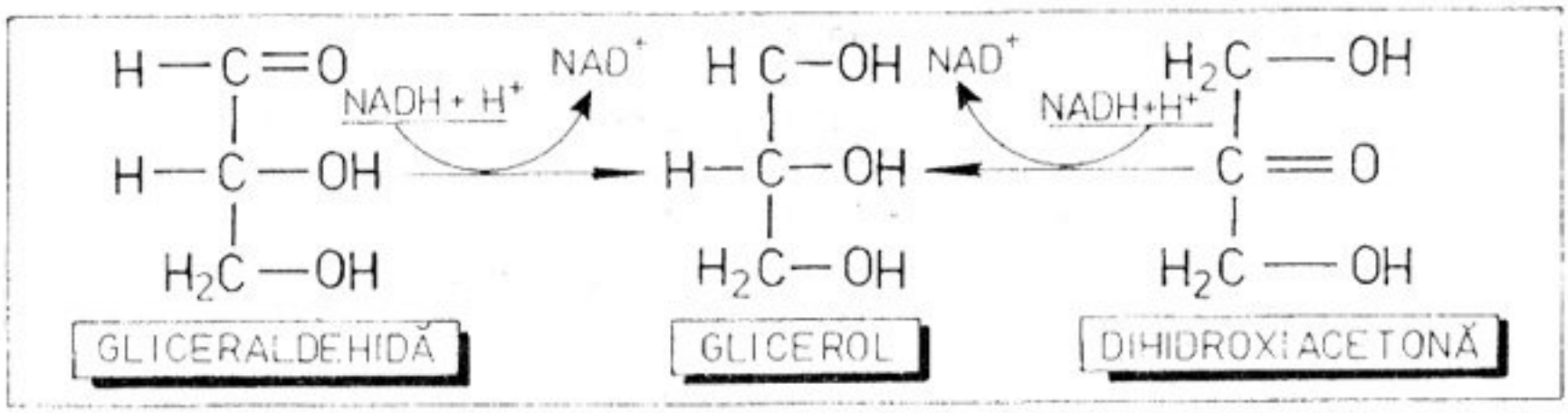
5.3.2 Proprietăţile chimice ale ozelor

Proprietăţile chimice ale ozelor sunt determinate de prezenţa grupărilor funcţionale carbonil, alcool şi datorită prezenţei simultane a ambelor grupări. Se vor prezenta numai acele reacţii semnificative, pentru transformările metabolice atât la organismul sănătos, cât şi bolnav.

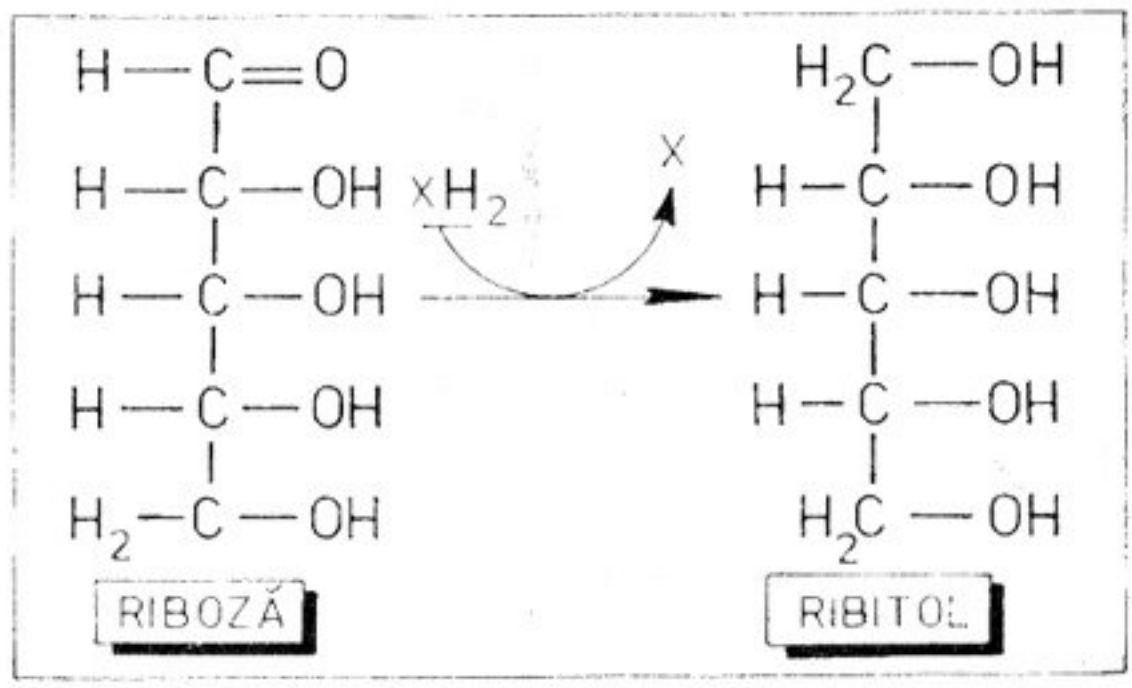
5.3.2.1 Reacţii datorate grupării carbonil

1) **Reducerea.** Gruparea carbonil a ozelor se poate transforma prin reducere într-o grupare hidroxil formându-se polialcooli corespunzători. Procesul are loc "in vitro" sub acţiunea amalgamului de sodiu sau a hidrogenului activat, iar "in vivo" reducerea grupării carbonil se realizează cu ajutorul unor enzime NADH dependente.

Prin reducerea gliceraldehidei sau dihidroxiacetonei se formează **glicerol**, important în sinteza de **triacilgliceroli** şi **glicerofosfolipide**.



Prin reducerea ribozei se obţine ribitolul, poliol care se întâlneşte în structura vitaminei B_{12}.



In aceleaşi condiţii D-glucoza se reduce la D-sorbitol, iar D- fructoza formează doi polioli: D-sorbitol şi D-manitol.

D-sorbitolul reprezintă o substanţă de bază în sinteza vitaminei C, iar pe de altă parte în diabet zaharat formarea de **sorbitol** în **retină**, contribuie la instalarea **retinopatiei diabetice**.

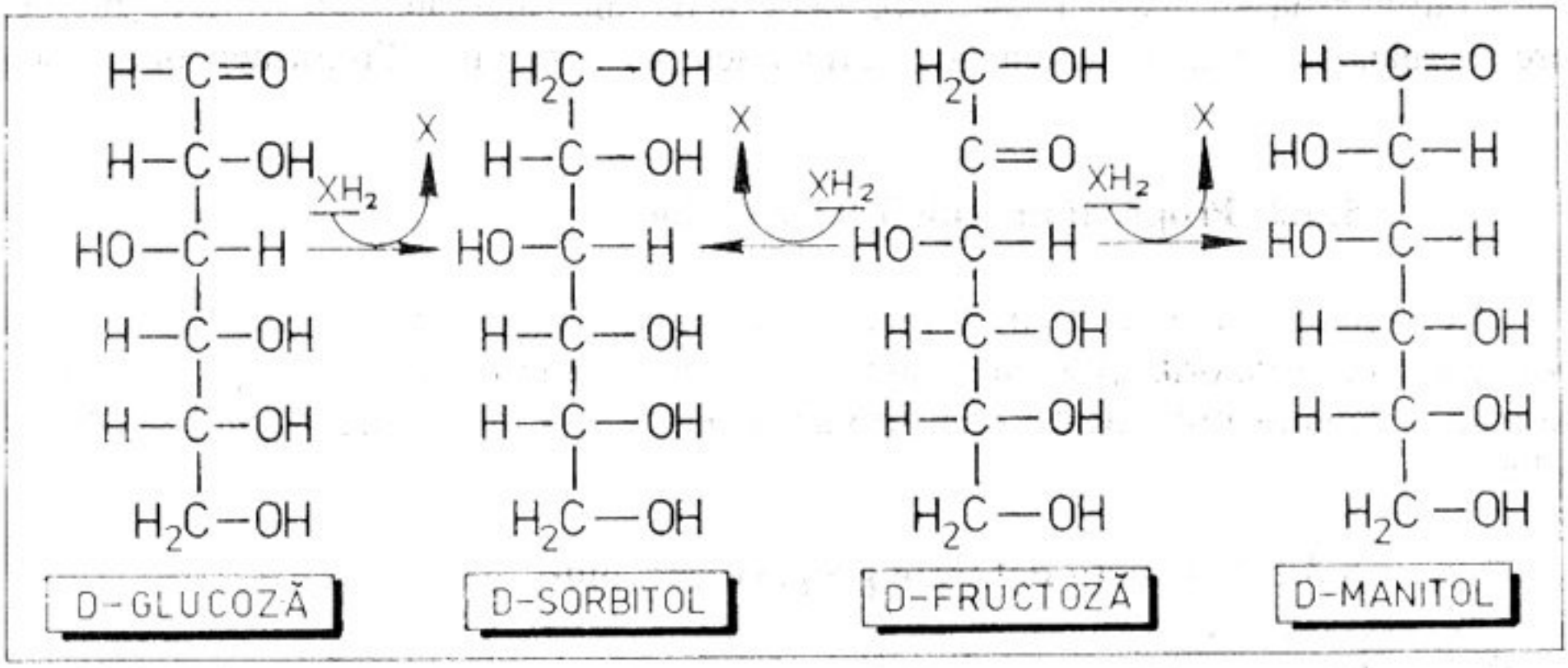


Fig.5.5 **Reducerea glucozei şi fructozei. XH_2 = NADH + H^+; X = NAD^+**

II- **Oxidarea.** Prin oxidarea ozelor se obţin produşi de oxidare care diferă prin gradul de oxidare al grupării carbonil şi al alcoolului primar (C_1, C_6).

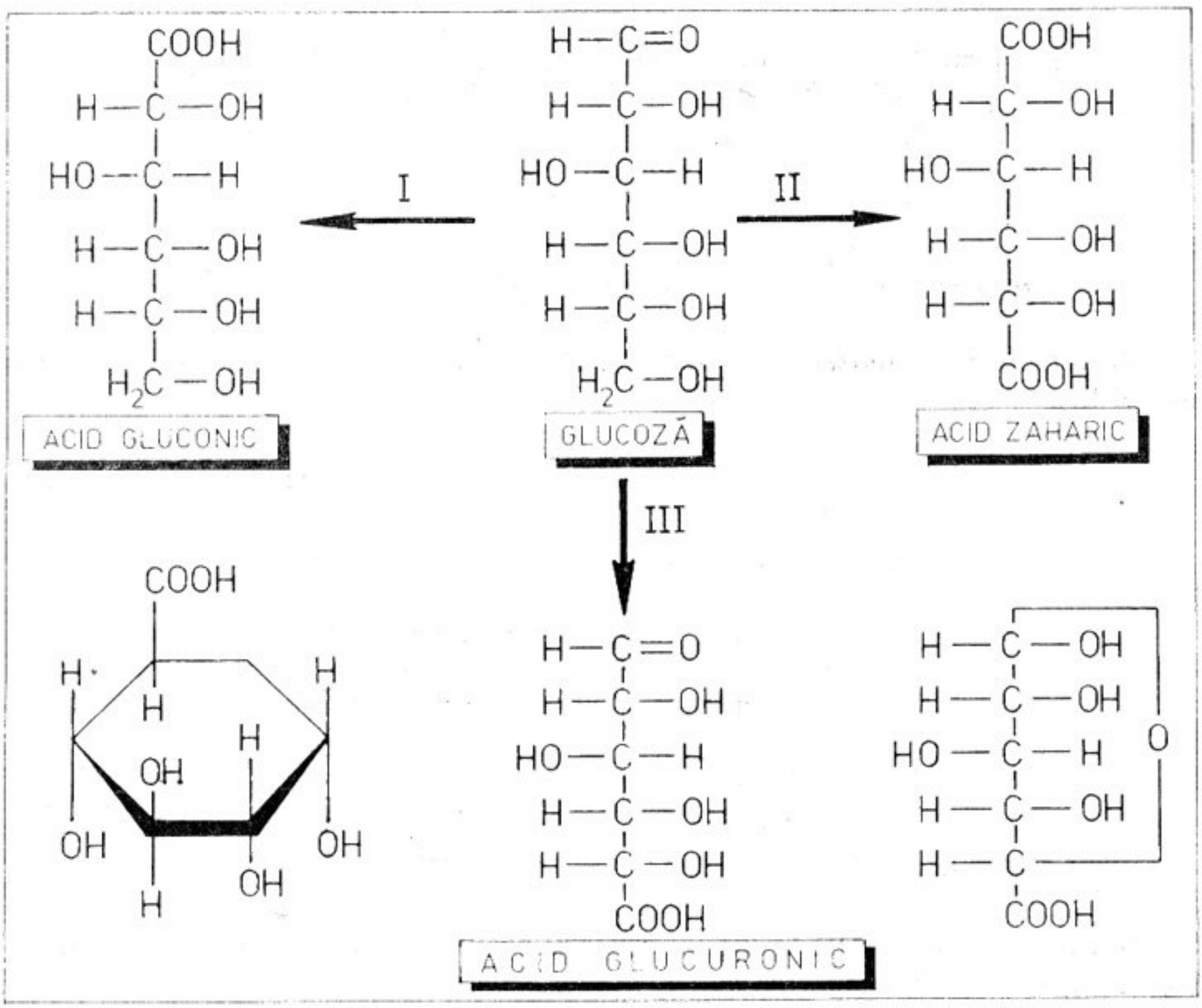
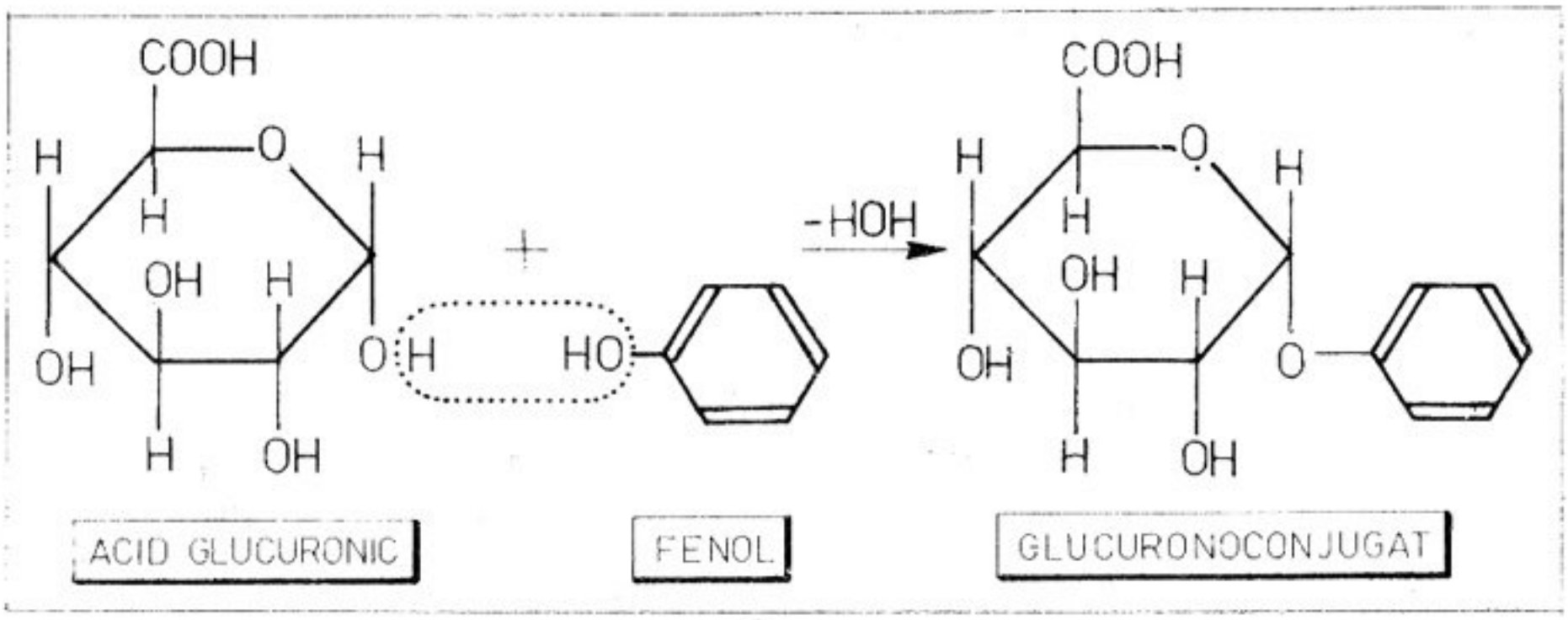


Fig.5.6 **Oxidarea glucozei; I- Oxidarea blândă; II- Oxidarea energică; III- Oxidarea menajată.**

a) - **Oxidarea blândă** "in vitro" cu apă de brom sau de clor a grupării carbonil. Se obţin **acizii aldonici**. "In vivo" oxidarea glucozei existentă sub forma de ester glucozo-6-fosforic până la acid 6-fosfo-gluconic se realizează sub acţiunea catalitică a glucozo-6-fosfat dehidrogenozei (-enzimă $NADP^+$ dependentă) şi reprezintă prima etapă în calea pentozo fosfaţilor. Gluconatul de calciu reprezintă o formă asimilabilă a calciului.

b) - **Oxidarea energică.** Prin oxidare energică (cu HNO_3 concentrat) se oxidează atât gruparea carbonil de la C_1, cât şi gruparea alcool primar C_6 dând naştere acizilor zaharici. Din glucoză se formează **acidul zaharic**, iar din galactoză **acidul mucic**. Acizii zaharici au o mică importanţă pentru organismul uman.

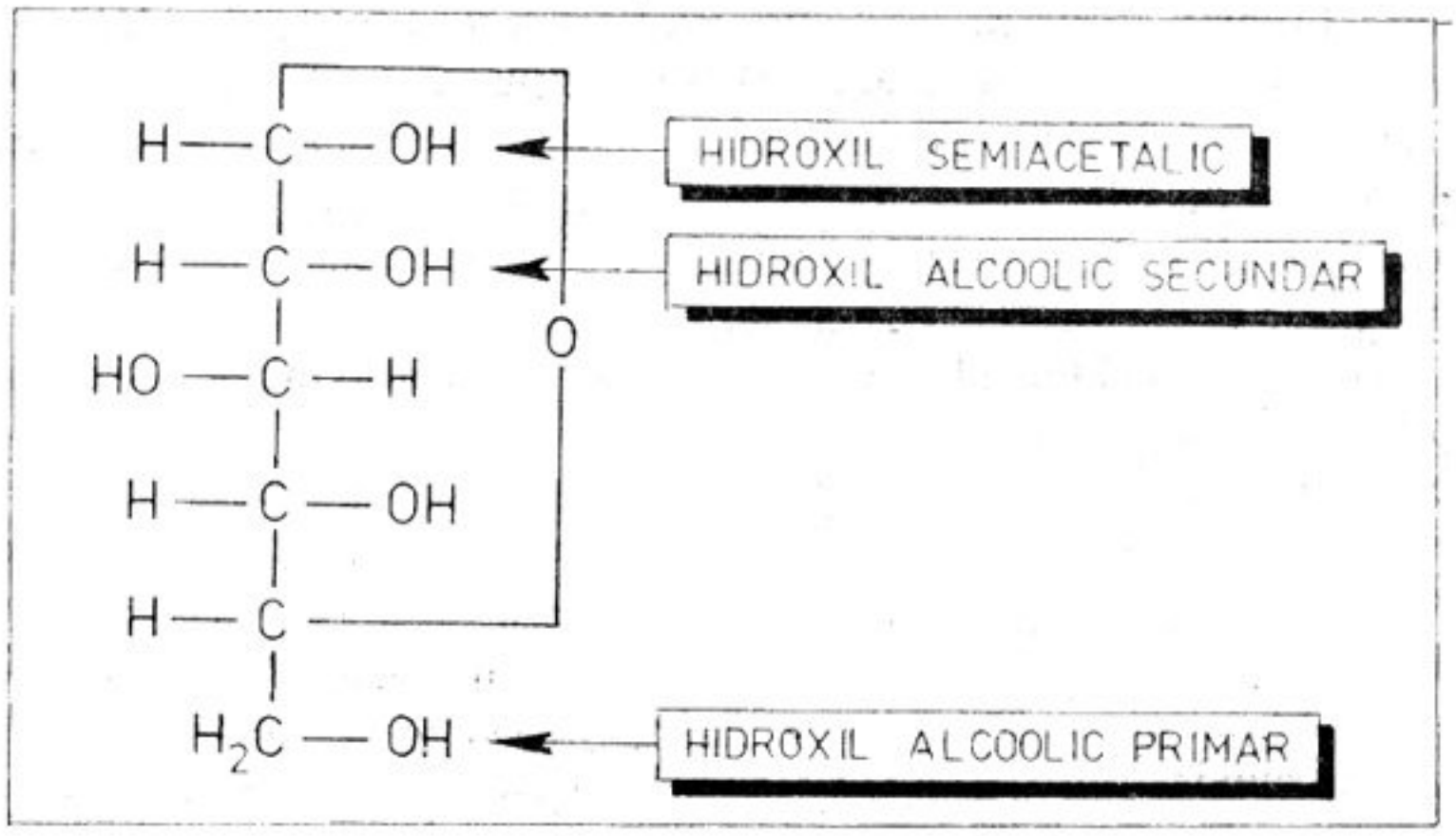
c) - **Oxidarea menajată.** Oxidarea grupării alcool primare C_6 a **aldozelor**, după o prealabilă protejare prin esterificare a grupărilor alcool secundare şi grupării carbonil devenită alcool prin semiacetalizare, se obţin **acizii uronici**. Acizii uronici au un rol important în procesele de detoxifiere la nivelul ficatului, cât şi un rol plastic deoarece intră în structura proteoglicanilor. Acidul glucuronic prezintă un interes deosebit în **glucuronoconjugare** , proces prin care ficatul intervine în eliminarea unor compuşi exogeni, sau produşi în intestin, ca de exemplu: fenolii rezultaţi în intestin sub influenţa florei microbiene din aminoacizi aromatici, **indoxilul** format din triptofan, medicamente, toxice accidentale etc.



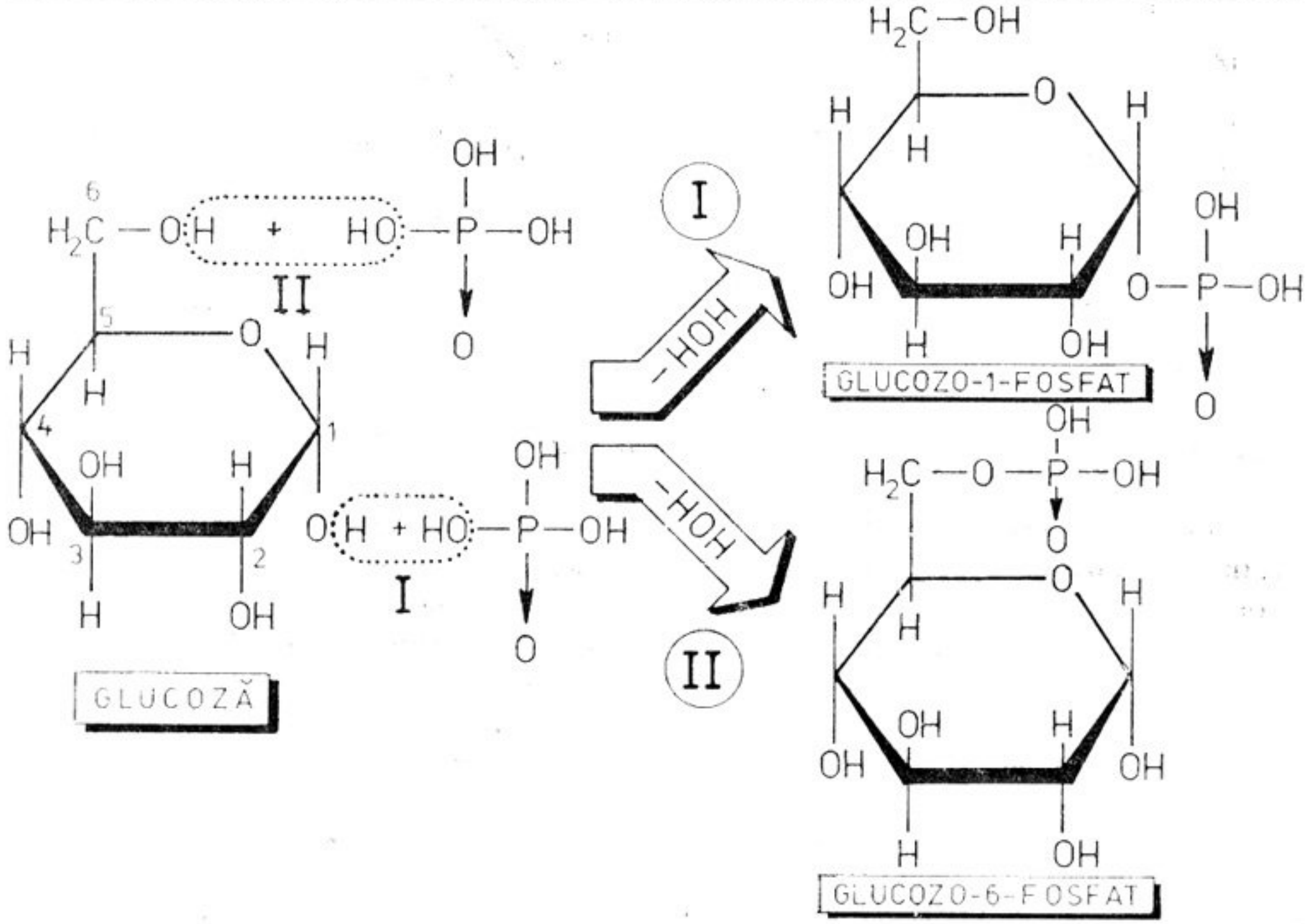
Acidul glucuronic acţionează asupra unor substanţe formate endogen ca **bilirubina, hormoni sexuali, corticosuprarenal, tiroidieni**. Acidul glucuronic se conjugă cu substanţa al cărei efect toxic îl neutralizează la nivelul grupării oxidril semiacetalice cu gruparea oxidril sau carboxil a substanţei respective. Prin această conjugare se realizează două deziderate: **scade toxicitatea** şi **creşte solubilitatea în apă** a compusului toxic care va fi transportat mai uşor spre căile de excreţie. In afara participării sale în procesul de detoxifiere hepatică, acidul glucuronic este important datorită implicării sale în biosinteza **glicozaminoglicanilor** compuşi cu roluri biologice majore în organismul animal şi uman. In organismul animal şi uman, **acidul glucuronic** este unul din metaboliţii importanţi rezultaţi pe **calea acizilor uronici** proces anabolic important al metabolismului glucidic.

5.3.2.2 Proprietăţi chimice datorate grupării -OH

Formarea de esteri - Funcţiile hidroxil din molecula ozelor (primare, secundare şi semiacetalică) pot fi esterificate. Cei mai importanţi din punct de vedere biologic sunt esterii fosforici formaţi între oze şi acidul ortofosforic la nivelul hidroxilului semiacetalic, sau cel alcoolic primar.



Glucoza poate forma esteri fosforici la nivelul grupării -OH semiacetalice, când rezultă Glucozo-1-fosfat (I) sau la nivelul grupării -OH primare când va rezulta Glucozo-6-fosfat (II), ambii esteri fiind intermediari ai unor procese ale metabolismului glucidic (glicogenoliză şi glicoliză).



Majoritatea monoglucidelor sunt reactive sub formă de esteri fosforici şi pot participa în diverse procese metabolice, ceea ce nu este posibil în cazul în care ar fi în stare liberă.

In organismul animal şi uman cei mai impotanţi esteri fosforici sunt: glucozo-1-fosfat, glucozo-6-fosfat, fructozo-6-fosfat, fructozo-1,6-bisfosfat (vezi fig.5.7) care reprezintă produşi intermediari ai metabolismului glucidelor.

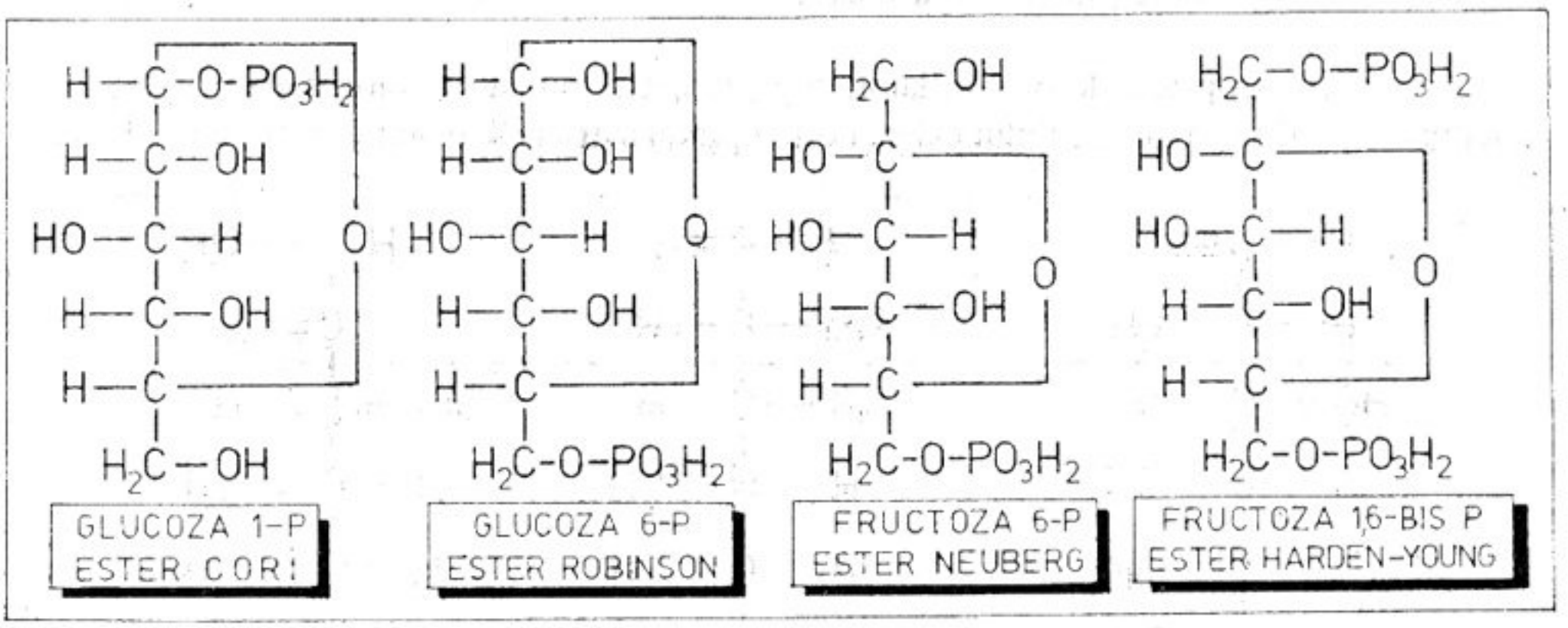
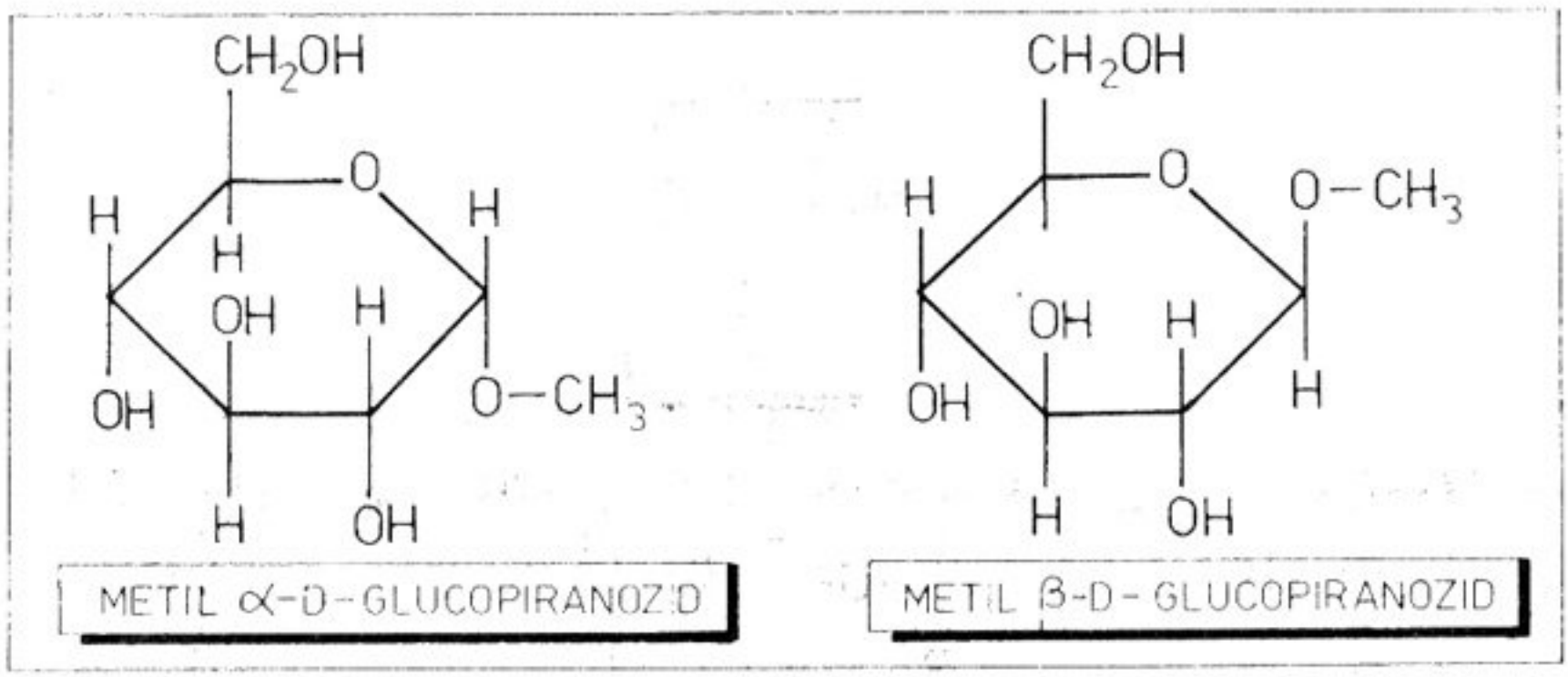


Fig.5.7 **Esteri fosforici ai glucozei şi fructozei**

Există şi esteri ai acidului sulfuric întâlniţi sub formă de componente ale proteoglicanilor (heparina, condroitin sulfaţii, dermatan sulfaţi). Esterificarea proteoglicanilor are loc sub acţiunea Fosfo adenozil-5-fosfosulfatului (PAPS) care este donor de grupări sulfat active (vezi fig.5.20).

Formarea glicozidelor. Gruparea -OH semiacetalică este mult mai reactivă decât grupările -OH alcoolice, putând forma cu alţi compuşi care conţin o grupare -OH (alcooli, oze) compuşi de tip **eteric** denumiţi **glicozide** sau **heterozide**.

Glicozidele se pot prezenta sub forma celor doi anomeri (α sau ß).



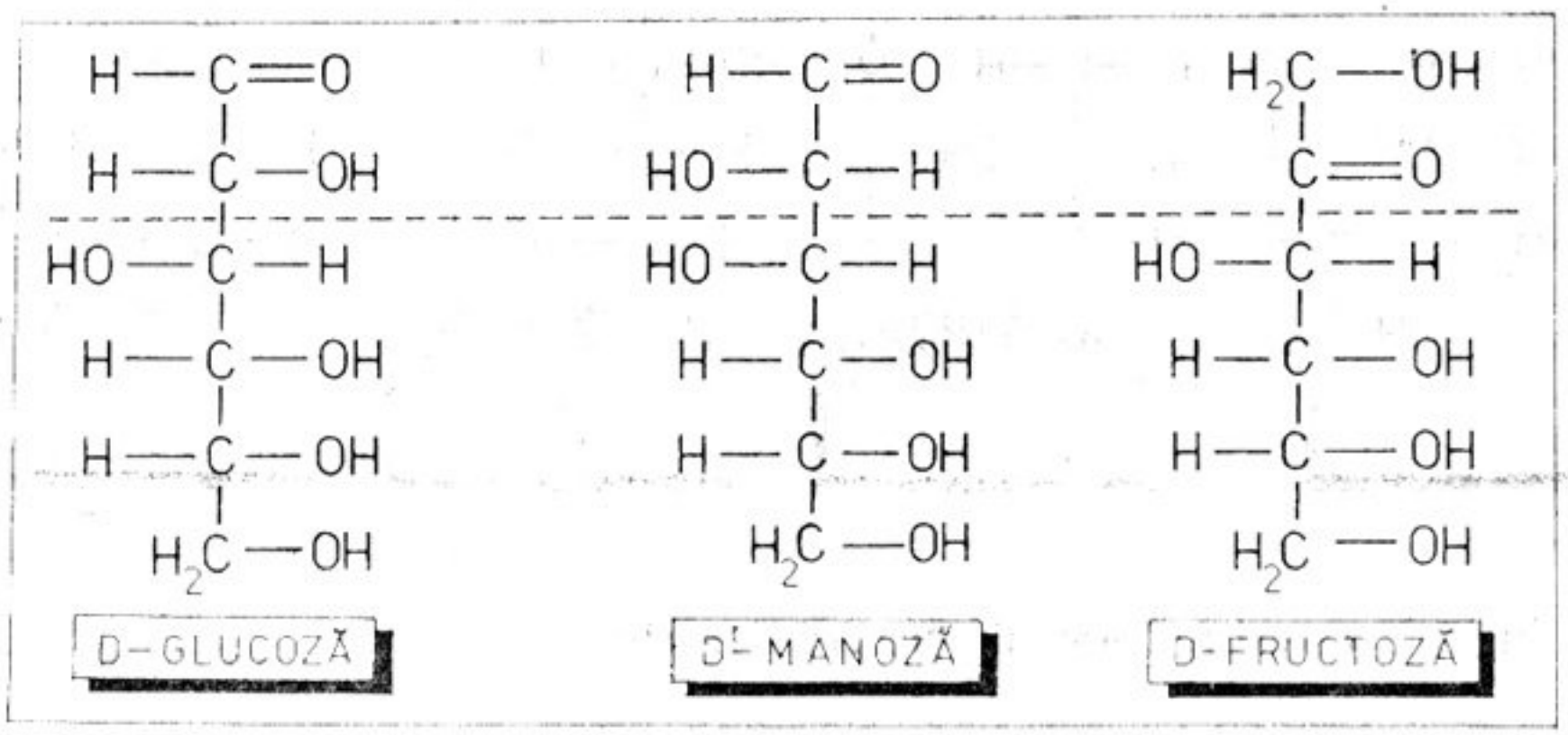
Dacă eterificarea se face cu gruparea -OH a altei oze se obţin oligo şi poliglucide. In cazul în care reacţia are loc cu o componentă neglucidică, desemnată cu termenul de **aglicon**, formează, oxigen, sulf sau azotglicozode.

De exemplu, nucleozidele sunt **N-glicozide** ale D-ribozei sau D-deoxiribozei, iar agliconul este o bază azotată purinică sau pirimidinică. Importante din punct de vedere

farmaceutic sunt **glicozidele cardiotonice** care au ca aglicon, steroli. Dacă sunt administrate în insuficienţa cardiacă scad frecvenţa şi cresc intensitatea bătăilor inimii.

5.3.2.3 Epimerizarea ozelor

Una din proprietăţile ozelor,datorate prezenţei simultane a celor două grupări funcţionale şi deci, a ansamblului catenei este **epimerizarea**. Sub acţiunea bazelor slabe, la



rece, asupra ozelor, face ca ele să sufere un proces de **izomerie sterică** la atomul de carbon vecin grupării carbonil, proces care are loc printr-o transpoziţie specială, denumită Lobry de Bruyn van Eckenstein sau **epimerizare**. Ozele epimere sunt glucoza, manoza şi fructoza; ele diferă prin conformaţia C_1 şi C_2. Dacă în mediu slab alcalin se dizolvă una din ozele de mai sus, după o anumită perioadă de timp se constată prezenţa unui amestec de oze în următoarea proporţie: 63% **D-Glucoză**, 6% **D-Manoză** şi 31% **D-Fructoză**.

Interconversia celor trei oze se poate explica prin mecanismul de mai jos (fig.5.7).

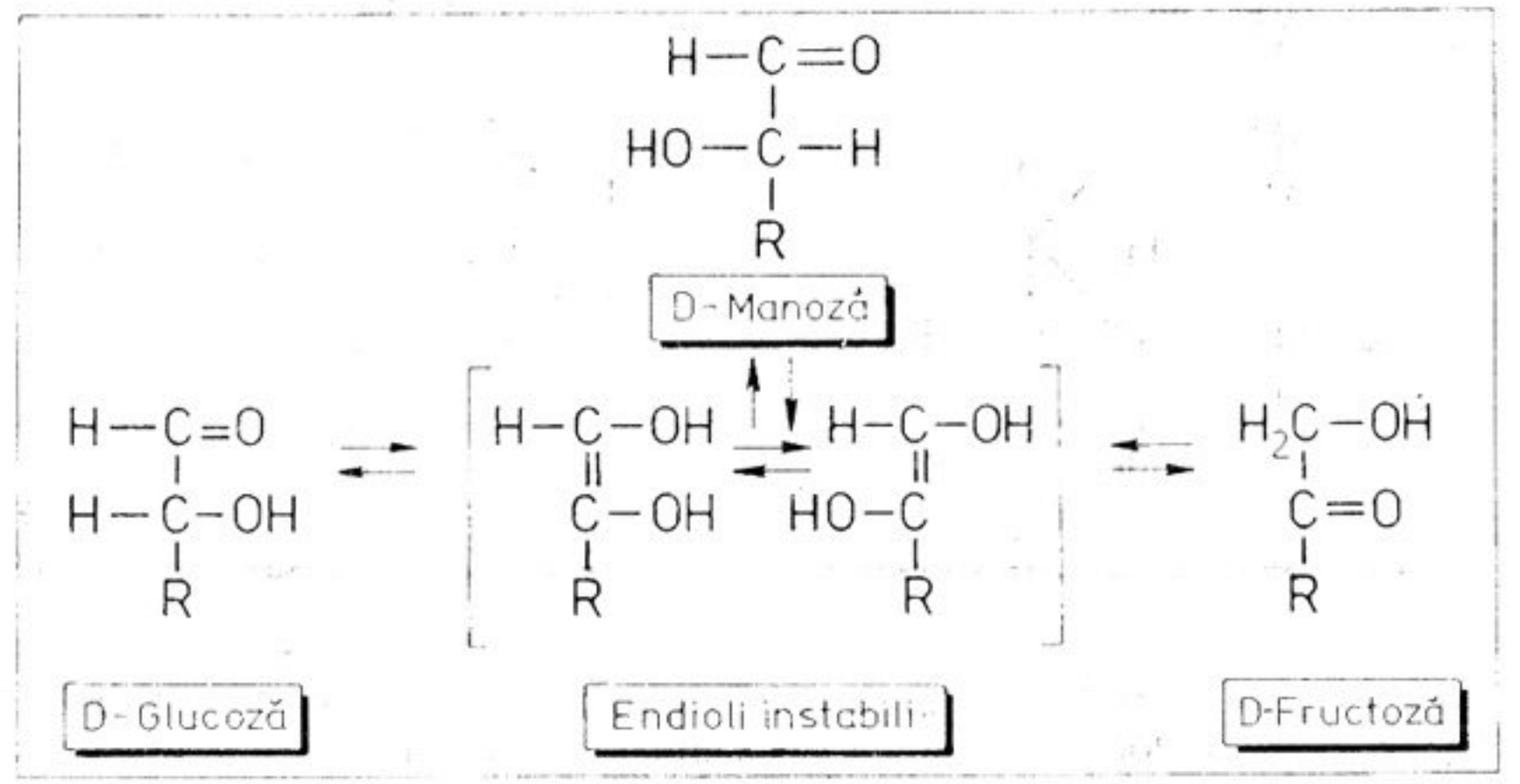


Fig.5.7 **Mecanismul epimerizării**

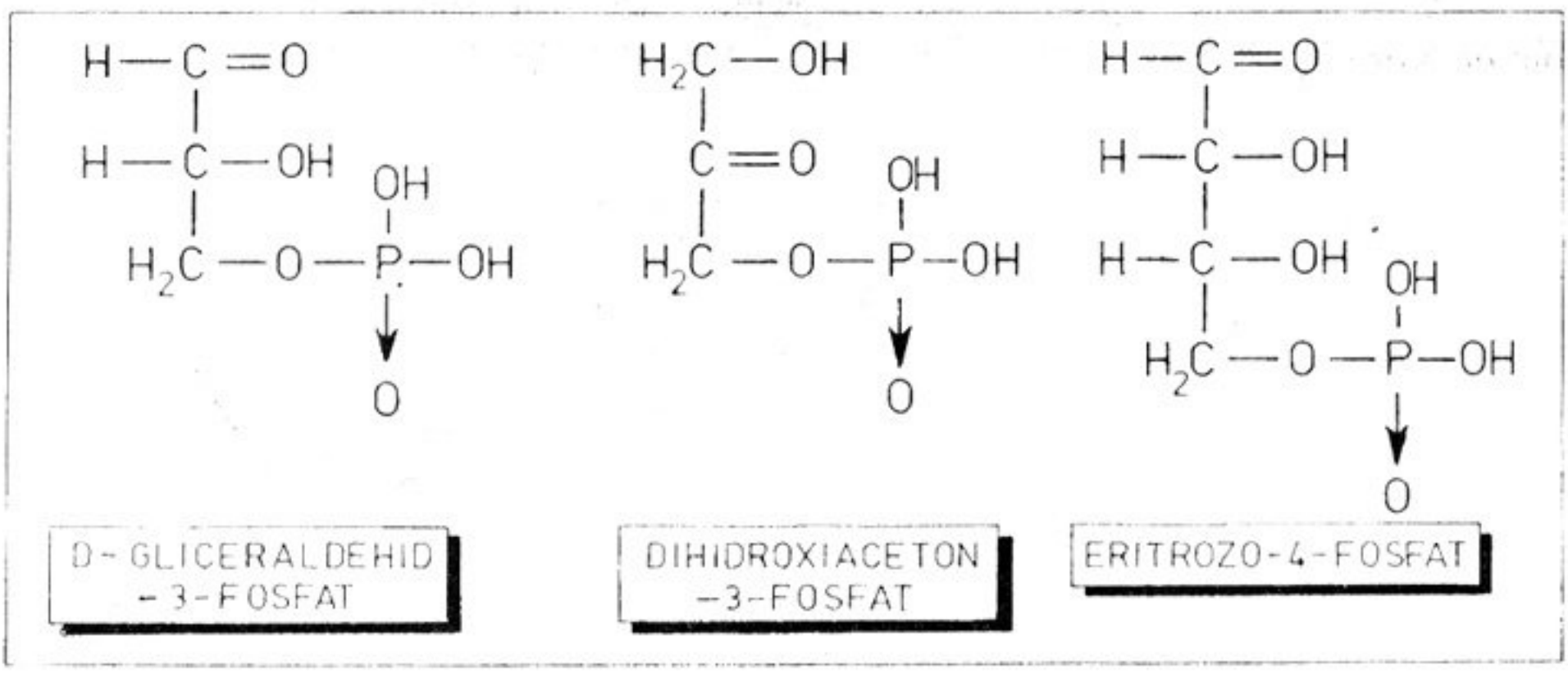
Acest proces important din punct de vedere metabolic are loc şi la nivelul ficatului, fiind catalizat de enzima **epimeraza**.

5.4 Principalii reprezentanţi ai ozelor

5.4.1 Trioze şi tetroze

Principala trioză este **D-gliceraldehida** care având un singur carbon asimetric, se prezintă sub forma a doi stereoizomeri optic activi (enantiomeri), care se deosebesc între ei prin sensul în care rotesc planul luminii polarizate, celelalte proprietăţi fizice şi chimice fiind identice. Prin convenţie cei doi enantiomeri au fost desemnaţi D şi L-gliceraldehidă şi au importanţă terapeutică deoarece sunt substanţele perentale de la care se formează seriile D şi L ale glucidelor (vezi capitolul 5.2.4).

Aceste trioze nu se găsesc libere în natură ci ele rezultă ca intermediari metabolici, formându-se în continuu în organism sub formă de esteri fosforici în procesul de glicoliză.



Dintre tetroze prezintă interes biologic numai **eritrozo-4-fosfatul** care apare ca intermediar în **"calea pentozo fosfaţilor"** proces al metabolismului glucidic.

5.4.2 Pentoze

După rolul biologic exercitat, ozele cele mai importante pentru organismul uman şi animal sunt **pentozele** şi **hexozele**.

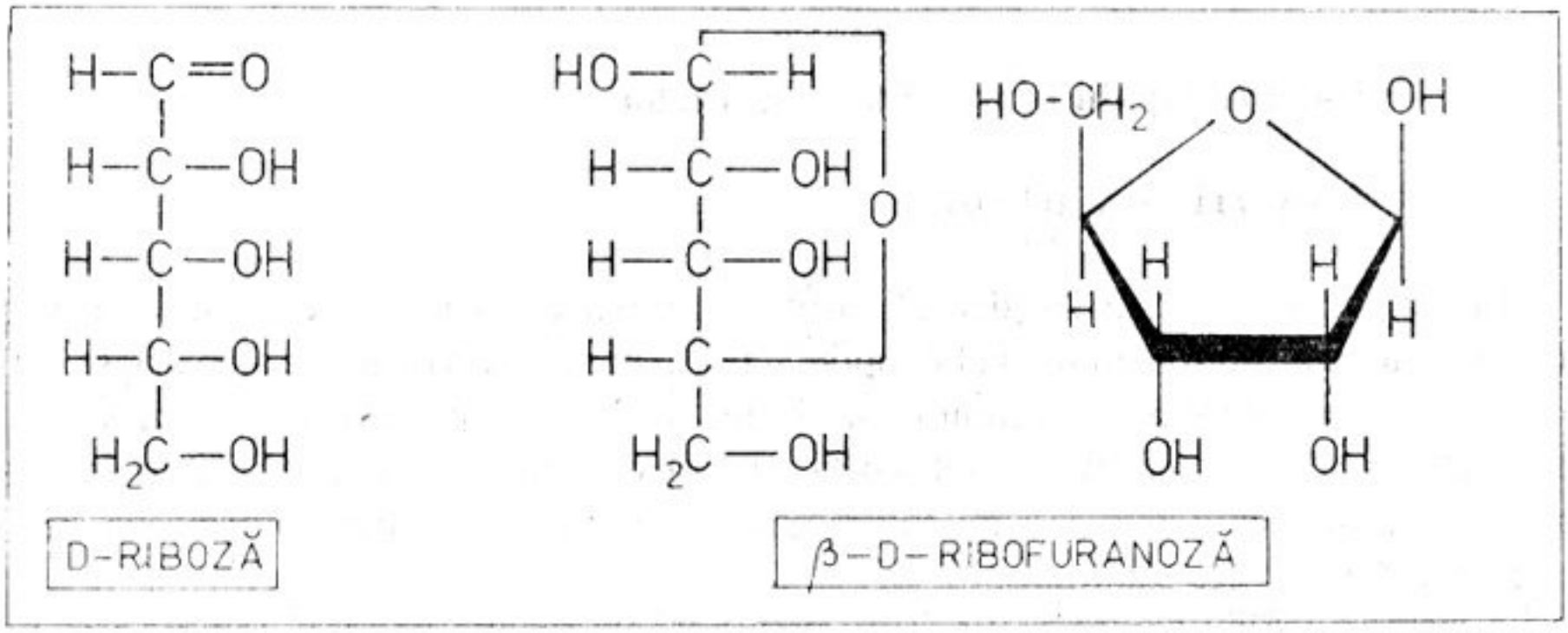
Dintre acestea un număr limitat sunt utilizate frecvent de organismul uman şi animal.

Pentozele sunt răspândite în regnul vegetal în structura unor biopolimeri numiţi **pentozani** (arabani, xilani), fără valoare alimentară pentru om.

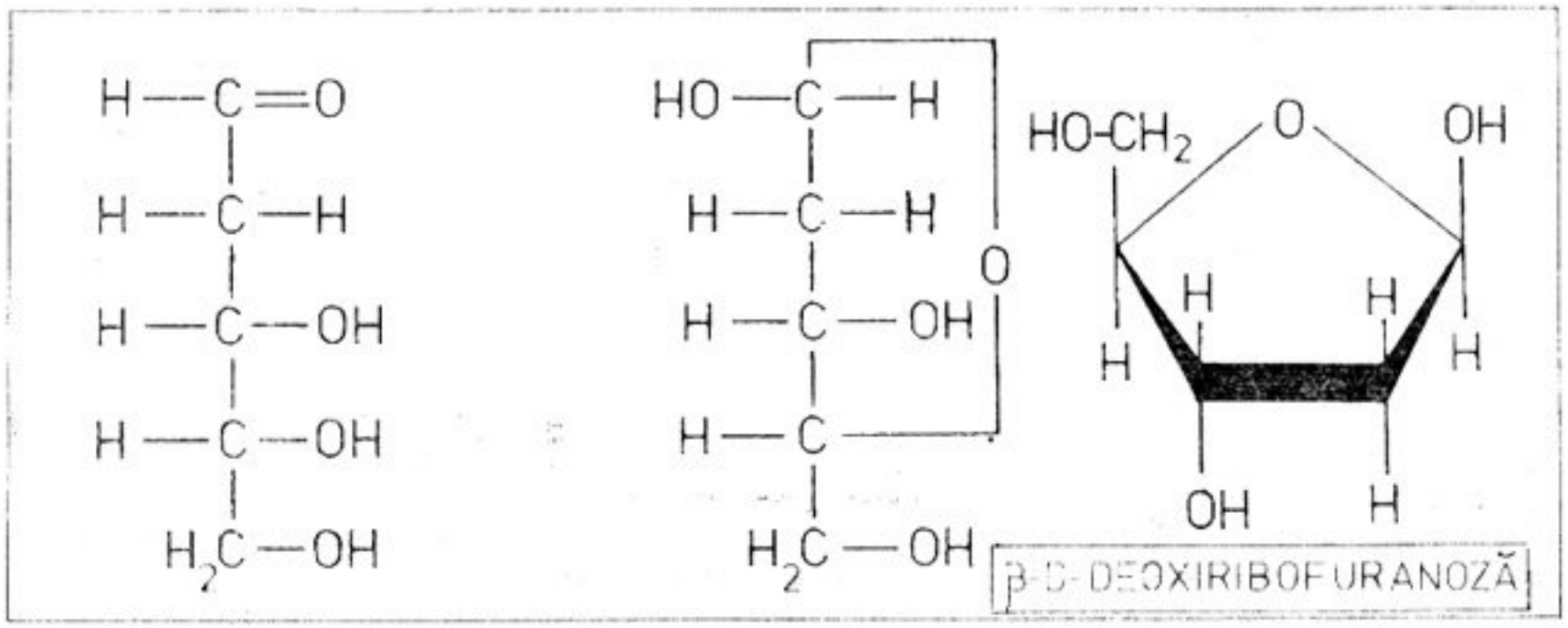
In organismul animal şi uman se găsesc sub formă de esteri fosforici, constituienţi ai nucleotidelor şi deci, ai acizilor nucleici şi ai unor enzime importante.

Riboza, principalul reprezentant al pentozelor, este sintetizată în toate organismele pe "calea pentozo-fosfaţilor". Riboza, în forma ß, este component structural al nucleotidelor, nucleozidelor, ARN, 3'-5'-AMP-ciclic, ATP şi a unor coenzime importante ca NAD^+, $NADP^+$, FAD, Coenzima A, a căror structură şi semnificaţie a fost prezentată în capitolele

anterioare.

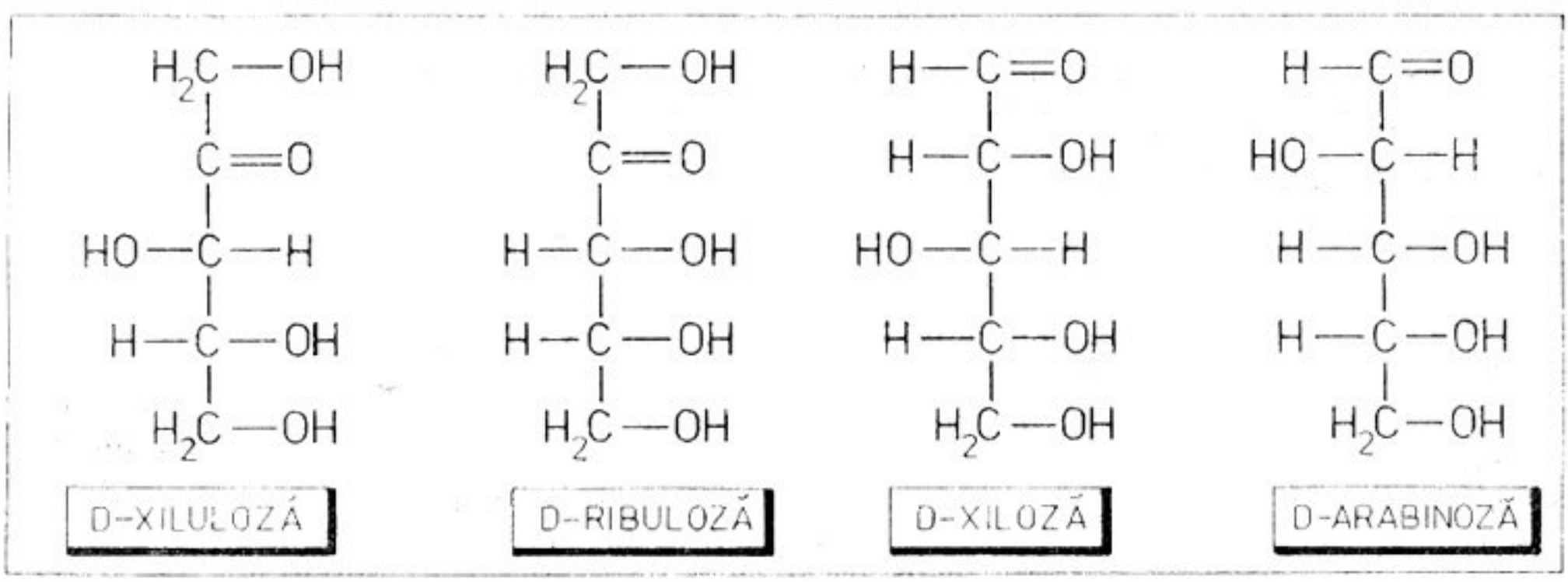


Deoxiriboza este o pentoză în care gruparea -OH din poziţia C_2 este substituită cu un atom de hidrogen şi intră în constituţia ADN şi nucleotidelor corespunzătoare.



Prin reducerea enzimatică a ribozei se obţine **ribitolul**, component structural al vitaminei B_2 (riboflavina).

Ribuloza şi xiluloza, sub formă de esteri, sunt intermediari ai căii pentozo-fosfaţilor.



Există o **pentozurie alimentară** temporară, întâlnită după ingestia unor alimente bogate în pentoze sau pentozani, cireşe, vişine, prune, care se manifestă excreţia urinară a unor cantităţi de diverse pentoze, ca D-riboză, L-arabinoza, L-xiloza. De asemenea, există o maladie ereditară **pentozuria esenţială** care constă în eliminarea unei anumite pentoze L-xiluloza, care se datoreşte absenţei sau sintezei hepatice deficitare a unei enzime din "ciclul acizilor uronici", **xilitoldehidrogenaza**.

5.4.3 Hexoze

Hexozele sunt cele mai răspândite oze, existând sub forma liberă, de diglucide şi de poliglucide. Intâlnim hexoze şi, în special glucoză, în structura unor glicozide.

Cel mai important reprezentant al hexozelor este glucoza care în organismul uman şi animal are o origine exogenă (alimentară) şi una endogenă.

Glucoza intră în constituţia diglucidelor (zaharoză, maltoză, lactoză, celobioză) şi a poliglucidelor (amidon, celuloză, glicogen).

In organism, glucoza provine prin hidroliza enzimatică a diglucidelor şi poliglucidelor de origine alimentară (exogenă), sau este rezultatul procesului de **gluconeogeneză** sau **epimerizare** a ozelor (origine endogenă).

Glucoza absorbită prin intestin este transportată prin vena portă la ficat, unde urmează trei căi diferite:

◆ - o parte este metabolizată pentru eliberarea energiei necesară manifestărilor vitale;

◆ - altă parte este depozitată sub formă de glicogen hepatic şi muscular;

◆ - a treia parte este eliberată în sânge şi distribuită tuturor organelor şi ţesuturilor. In organism sângele asigură transportul glucozei care se găseşte într-o concentraţie de 50-110 mg /100ml sânge şi orice scădere sau creştere peste aceste limite, este consecinţa unor tulburări metabolice grave.

Acidul glucuronic este unul din derivaţii importanţi ai glucozei utilizat în procesul de detoxifiere, dar şi ca unul din componenţii structurali ai proteoglicanilor.

Manoza nu se găseşte liberă în natură fiind constituient important al unor produşi de condensare vegetali **manani**, al glicoproteidelor şi al unor poliglucide bacteriene (bacilul Koch). In organism se mai găseşte şi sub formă de manozo-6-fosfat.

Galactoza este componentă structurală a lactozei, diglucidul din lapte. In ficat se transformă uşor în glucoză sub acţiunea unei enzime galacto-waldenază. Intră în structura glicoproteidelor şi a unor lipide complexe, numite **cerebrozide**, localizate în creier şi sistemul nervos central.

Fructoza este o cetohexoză care se află în stare liberă, în lichidul seminal; de asemenea în fructe, flori şi miere. Este component structural al zaharozei (zahărul comercial) şi al poliglucidului numit **inulina**, utilizată pentru explorarea **filtratului glomerular**. In celulele seminale există o cale specifică de transformare enzimatică a glucozei în fructoză, printr-o serie de procese de oxidoreducere.

Esterii fosforici ai fructozei sunt intermediari importanţi în metabolismul glucidic.

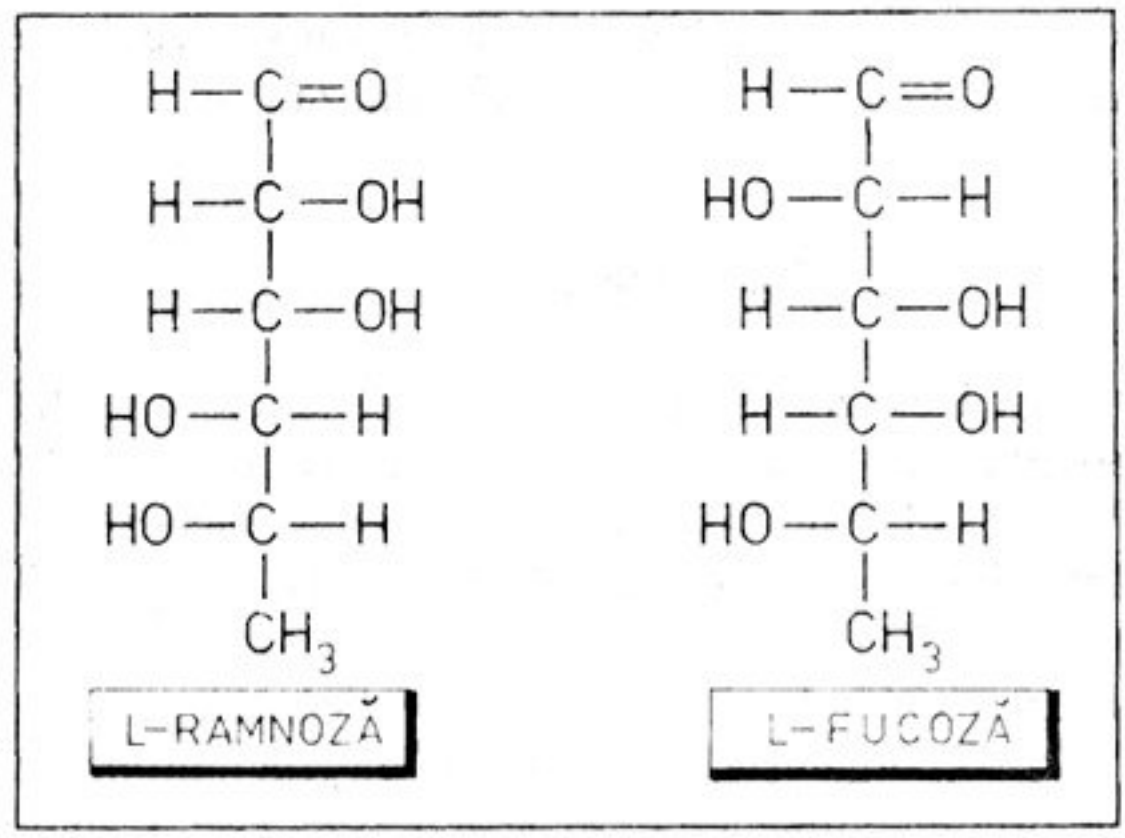
5.4.4 Deoxiglucide. Aminoglucide

Dintre aceşti compuşi vom menţiona numai aceia de importanţă fundamentală pentru organismul uman.

Deoxiglucidele sunt compuşi care corespund unor glucide cu mai puţini atomi de oxigen, decât de carbon.

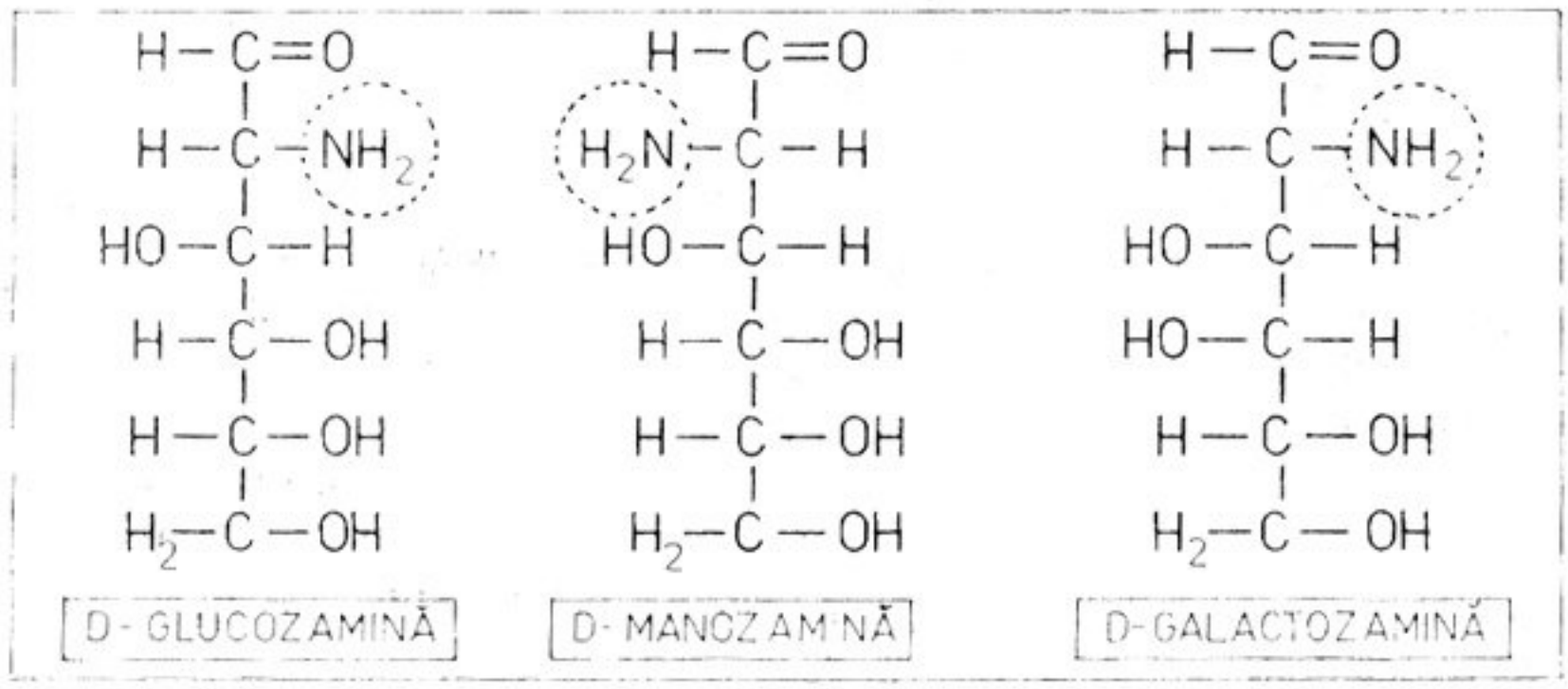
Deoxiriboza este constituient al acizilor **deoxiribonucleici**, ADN, structura fiind prezentată la capitolul 5.4.1.

L-ramnoza(6-deoxi-L-manoza) se găseşte în structura unor glicozide, dintre care cea mai importantă este vitamina P, care are în constituţia sa diglucidul numiţi **rutinoză**, formată din ramnoză şi glucoză.



L-fucoza (6-deoxi-L-galactoză) este constitu ent al glicoproteidelor dintre care menţionăm **izoaglutininele**, implicate în reacţii imunologice şi heteropoliglucidele grupelor sanguine (în grupa B sanguină se găseşte într-o concentraţie de 17%). Atât ramnoza cât şi fucoza sunt considerate a fi şi **metilpentoze**.

Aminoglucidele sunt derivaţi ai glucidelor care rezultă din substituirea unei grupări -OH de la C_2 cu gruparea $-NH_2$.



Glucozamina, galactozamina şi **manozamina** sunt cele mai răspândite aminoglucide care participă în structura glicoproteidelor şi proteoglicanilor .

Aminoglucidele intră şi în constituţia unor antibiotice (eritromicină, carbomicină); se consideră că sunt implicate în activitatea antibiotică a acestora.

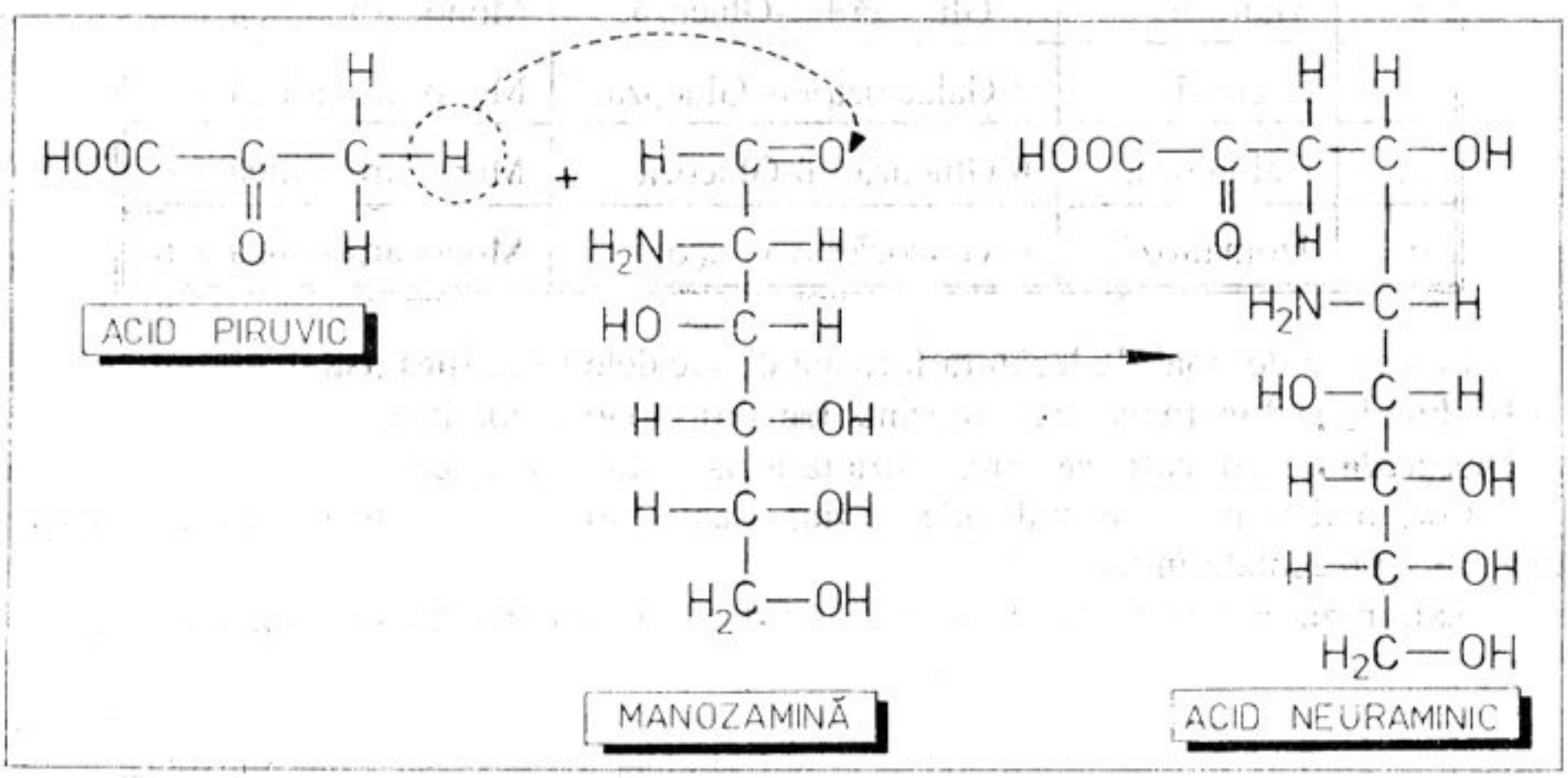
Acidul neuraminic este o cetoză cu 9 atomi de carbon, care rezultă prin condensarea acidului piruvic cu D-manozamina.

In plasmă au fost identificaţi derivaţi N-acilaţi ai acidului neuraminic, numiţi **acizi**

sialici, componenţi ai glicoproteidelor şi glicolipidelor membranelor celulare.

Joacă un rol fundamental în fixarea şi penetrarea virusurilor în celule.

Agenţii holerei, gripei şi oreionului posedă o enzimă specifică **neuraminidaza** sau. **sialidaza** care distruge receptorul membranar, îndepărtând specific legătura dintre acidul neuraminic şi diverşi constituienţi ai membranei.



5.5 Oligoglucidele (oligozaharide)

Oligoglucidele rezultă teoretic din condensarea a 2-8 molecule de oze, cu eliminare de apă. Sunt derivaţi funcţionali ai monoglucidelor la una din grupările -OH semiacetalice, cu caracter de **eteri**.

Pentru organusmul uman cele mai importante sunt diglucidele (dizaharidele), rezultate prin condensarea hexozelor. De exemplu:

$$2C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{-H_2O} C_{12}H_{22}O_{11}$$

Eliminarea moleculei de apă se poate face în două moduri, formându-se două tipuri de legături:

◆ - Eliminarea de apă între un -OH semiacetalic al unei molecule de oză şi un -OH alcoolic al celeilalte molecule de oză; diglucidul format are un **caracter reducător** deoarece un -OH semiacetalic rămâne neblocat şi poate acţiona ca o aldehidă. In acest caz legătura de tip eteric formată este **monocarbonilică**.

◆ - Eliminarea de apa între doi -OH semiacetalici aparţinând la doua oze diferite formează un diglucid care nu prezintă caracter reducător. In acest caz legătura de tip eteric formată este **dicarbonilică.**

Tabela 5.1 **Diglucide nereducătoare şi reducătoare**

Nr.	Diglucidul.	Componente structurale.	Tipul de legătură.
1.	Zaharoză.	α-Glucoză+ß-Fructoză.	Dicarbonilică 1-2
2.	Trehaloză.	α-Glucoză+α-Glucoză.	Dicarbonilică 1-2
3.	Maltoză.	α-Glucoză+α-Glucoză.	Monocarbonilică 1-4
4.	Lactoză.	ß-Galactoză+α-Glucoza.	Monocarbonilică 1-4
5.	Celobioză.	ß-Glucoză+ß-Glucoză.	Monocarbonilică 1-4
6.	Izomaltoză.	α-Glucoză+α-Glucoză.	Monocarbonilică 1-6

In funcţie de tipul de legătură formată diglucidele se clsifică astfel:

- **Diglucide reducătoare**, care prezintă legături monocarbonilice;
- **Diglucide nereducătoare**, care prezintă legături dicarbonilice.

Cele mai importante diglucide de importanţă biologică pentru organismul uman şi animal sunt prezentate în tabela 5.1.

Zaharoza este principalul diglucid nereducător şi reprezintă una din cele mai

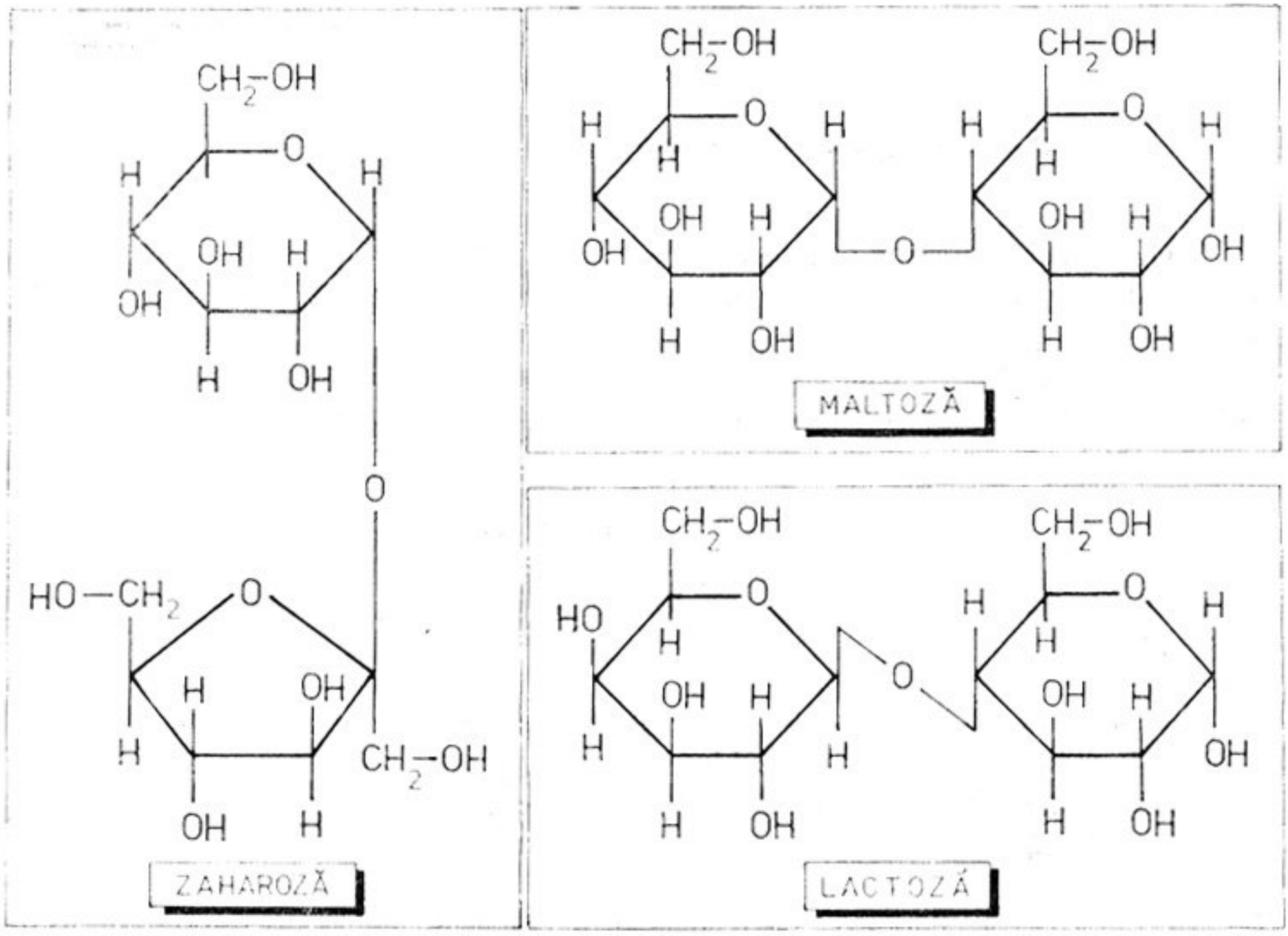


Fig.5.9 **Cele mai importante oligoglucide pentru organismul uman**

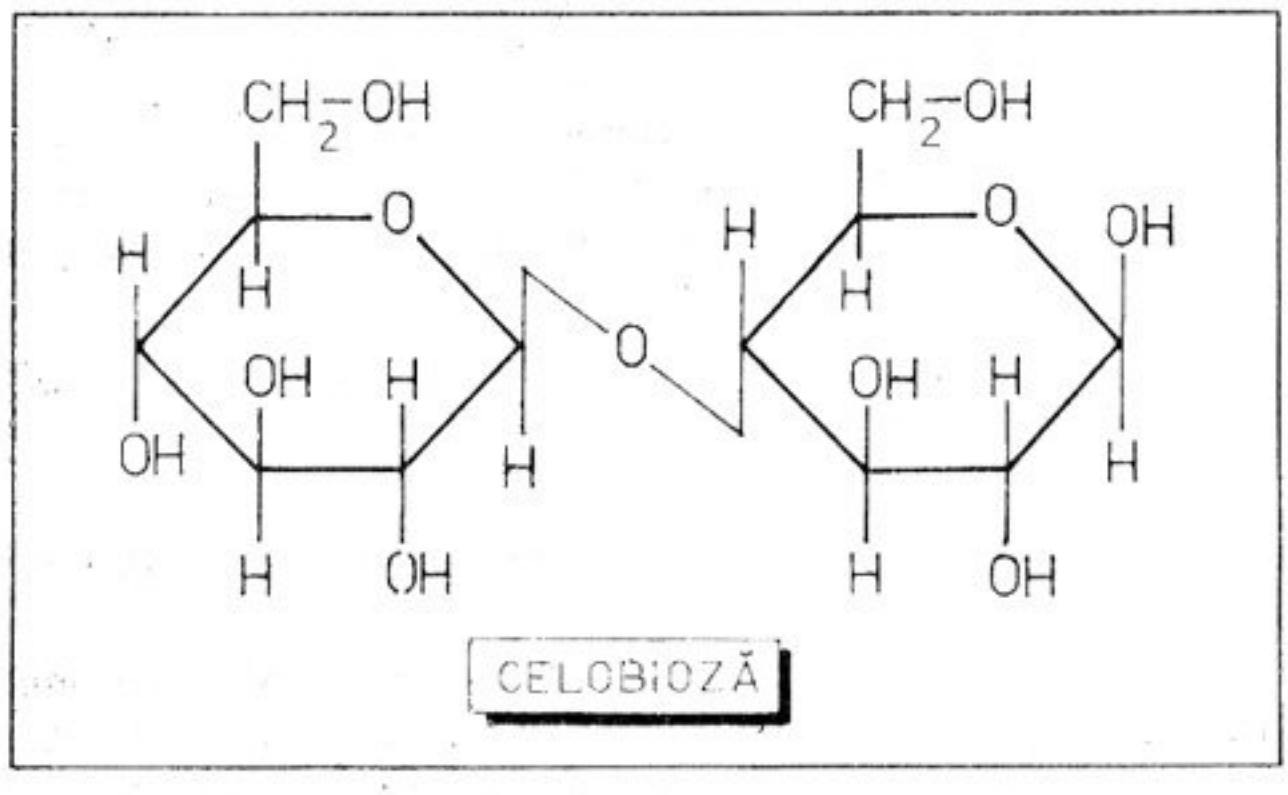
importante surse exogene de glucide pentru organismul uman (25%). Denumirea ştiinţifică este α-D-glucopiranozil-1-2-ß-D-fructofuranoza. Este sintetizată în exclusivitate de plante: sfecla de zahăr şi trestia de zahăr. Zaharoza are o mare solubilitate în apă şi are o activitate optică dextrogiră +66,5°. Sub acţiunea enzimelor "in vivo" sau a acizilor "in vitro", zaharoza este hidrolizată într-un amestec echimolecular de **glucoză** cu activitate optică +52,5° şi **fructoză** cu activitate optică -92°, denumit **zahăr invertit**. Această denumire este datorată faptului că amestecul respectiv este levogir, deoarece puterea rotatorie a fructozei rezultate (-) prin hidroliza zaharozei, este mai mare decât a glucozei rezultate (+). Procesul respectiv poartă denumirea de **"invertirea zahărului"**, iar enzima care determină hidroliza zaharozei - **invertaza**.

Maltoza este un diglucid reducător cu denumirea ştiinţifică α-glucopiranozil-1,4-α-glucopiranoza (vezi figura 5.9).

Maltoza constituie produsul de degradare al amidonului şi glicogenului şi reprezintă **unitatea diglucidică repetitivă** a celor două poliglucide. Maltoza poate fi eliberată din amidon şi glicogen sub acţiunea hidrolitică a amilazei (salivară şi pancreatică). Hidroliza enzimatică a maltozei sub acţiunea **maltazei** (α-glucozidaza intestinală), ca şi hidroliza acidă efectuată "in vitro" are ca rezultat final două molecule de α-glucoză.

Lactoza este singurul diglucid reducător existent în stare liberă în natură. Denumirea ştiinţifică a lactozei este ß-galactopiranozil-1,4-α-glucopiranoza. Este prezentă în laptele tuturor mamiferelor, secretată fiind de glanda mamară în proporţii diferite (2-8%), variind de la o specie la alta. Laptele de femeie conţine 6,5g%, iar cel de la vacă 5g%. Lactoza este scindată hidrolitic până la ozele componente de către enzima denumită **lactaza** (ß-galactozidaza), localizată în intestin. Galactoza odată formată este convertită, în condiţii normale, în glucoză de către enzima **galactowaldenază**. Se cunoaşte o maladie congenitală, **galactozemie esenţială**, însoţită de galactozurie frecventă în primele zile de viaţă ale copilului şi datorită sintezei deficitare la nivelul ficatului a enzimei de conversie.

Celobioza este un glucid reducător cu denumire ştiinţifică ß-glucopiranozil-1,4-ß-glucopiranoză. Reprezintă unitatea respectivă din structura poliglucidului denumit **celuloză**. Deoarece între cele două molecule de glucoză există o legătură ß glicozidică, aceasta nu poate fi scindată de către arsenalul enzimatic al organismului uman care nu dispune de o ß glucozidază. Din acest motiv,celobioza şi celuloza nu au valoare alimentară pentru organismul uman, nefiind posibilă hidroliza acestora sub acţiunea enzimelor digestive.



CELOBIOZĂ

5.6 Poliglucide (Poliozide)

Poliglucidele sau glicanii au o structură macromoleculară, fiind constituite dintr-un mare număr de monoglucide (hexoze) sau derivaţi ai acestora (glucozamină, galactozamină,

acizi uronici, acizi sialici), legate între ele prin legături glicozidice. Legăturile glicozidice existente în aceste lanţuri macromoleculare sunt legături 1-4, dar pot fi şi legături 1-6 sau 1-3.

Prin hidroliză enzimatică sau acidă, poliglucidele se scindează în produşi cu grad de condensare din ce în ce mai mic, iar în final în monoglucidele de bază.

Nu au proprietăţi reducătoare deoarece hidroxilul glicozidic al tuturor monoglucidelor este angrenat permanent în lanţul macromolecular.

Clasificarea poliglucidelor. Se disting două categorii:

1)- **Homoglicani** - poliglucide omogene - produşi de policondensare a unui singur tip de unitate structurală: amidon, glicogen, celuloză.

2) - **Heteroglicani** - poliglucide neomogene - produşi de policondensare a mai multor tipuri de unităţi structurale, precum şi componente neglucidice. Exemple: **glicoproteide, proteoglicani** şi **poliglucide bacteriene**.

Glicanii îndeplinesc roluri structurale (celuloza, proteoglicanii) sau de depozitare a rezervelor energetice (amidonul, glicogenul).

5.6.1 Homoglicanii

Formula generală a poliglucidelor omogene constituite pe bază de glucoză este $-(C_6H_{10}O_5)_n-$, unde $n = 300 \div 1000$, ceea ce le conferă mase moleculare de ordinul 10^5-10^6. Sunt de origine vegetală şi animală.

Amidonul este poliglucidul de rezervă al regnului vegetal, fiind forma în care este depozitat în celule surplusul de glucide. Amidonul este componenta principală a raţiei alimentare a omului şi reprezintă 50% din glucoza exogenă.

Amidonul este amorf, insolubil în apa rece; în apă caldă se dizolvă parţial, formând o soluţie coloidală, o pastă.

Amidonul se identifică prin coloraţia albastră cu o soluţie de iod la rece, coloraţie care dispare la cald.

Fenomenul se explică prin faptul că iodul se comportă ca un compus de **incluziune** în spaţiile goale situate între resturile de D-glucoză şi lasă să treacă numai razele albastre ale luminii. Dispariţia culorii albastre la cald evidenţiază faptul că iodul nu se leagă covalent de amidon. Prin hidroliză enzimatică progresivă se formează produsi intermediari denumiţi **dextrine** (amilodextrine, eritrodextrine, flavodextrine, acrodextrine) şi, în final, **maltoza**. Termenul final al hidrolizei acide sau alcaline a amidonului este ***α*-glucoza**. Aşadar, amidonul este format dintr-un număr mare de resturi de α-glucoză, număr care variază în funcţie de sursa vegetală din care a fost extras.

Amidonul nu este o substanţă unitară, ci un amestec de două componente distincte localizate diferit în grăunţele de amidon:

- ◆ - o componentă cu structură liniară, denumită **amiloză**, în interiorul grăunţelor de amidon;
- ◆ - o componentă ramificată, **amilopectina** în exteriorul acestora.

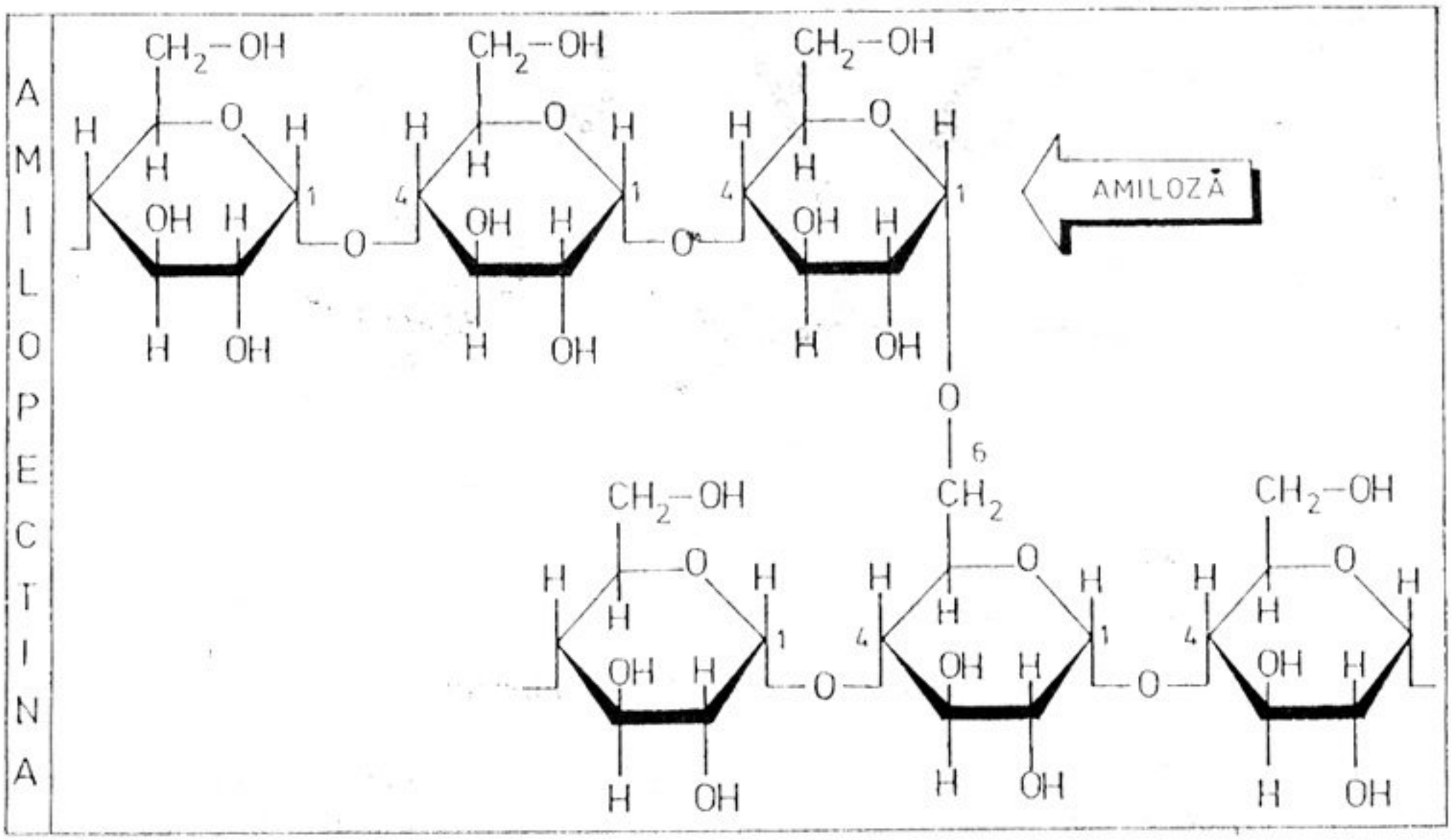


Fig.5.10 **Structura amilozei şi amilopectinei**

Amiloza reprezintă 20% din structura amidonului şi este constituită dintr-o structură liniară neramificată formată din resturi de α-glucoză legate 1-4. Lanţurile lungi neramificate ale amilozei se organizează spaţial într-o configuraţie helicoidală, un pas al elicei cuprinzând 5-6 resturi glucozil.

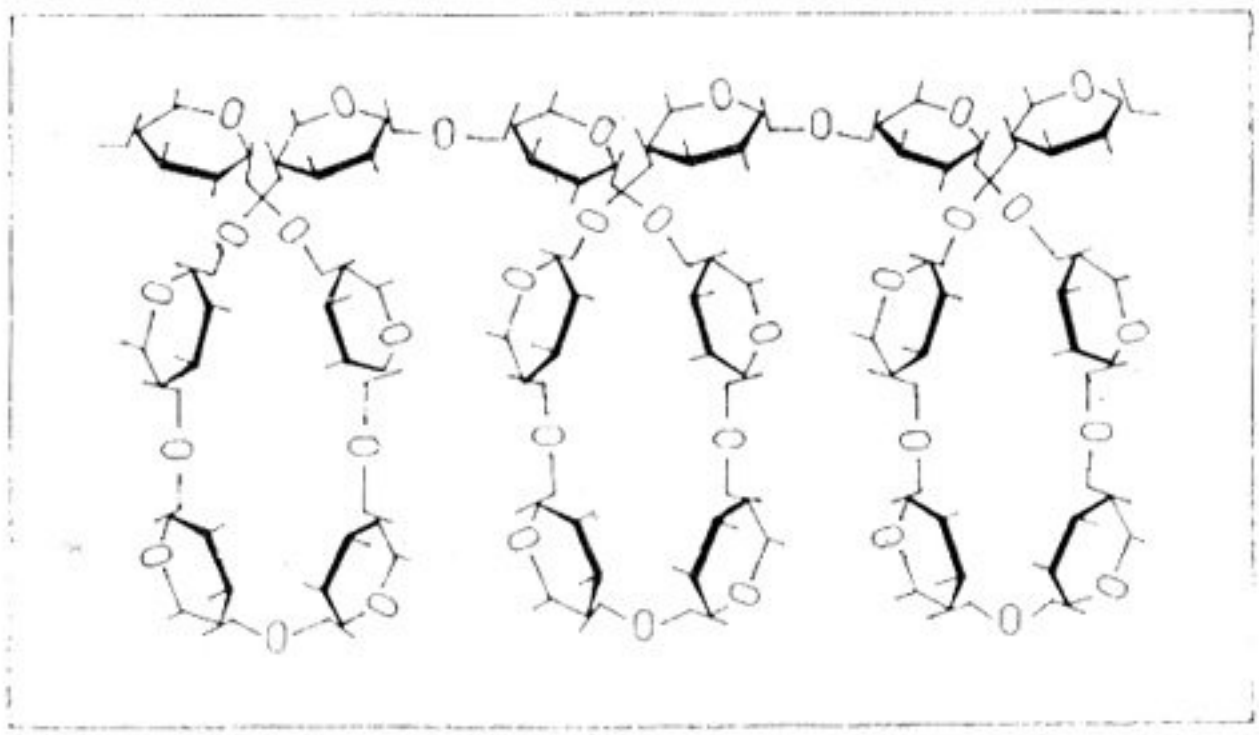


Fig.5.11 **Structura helicoidală a amilozei**

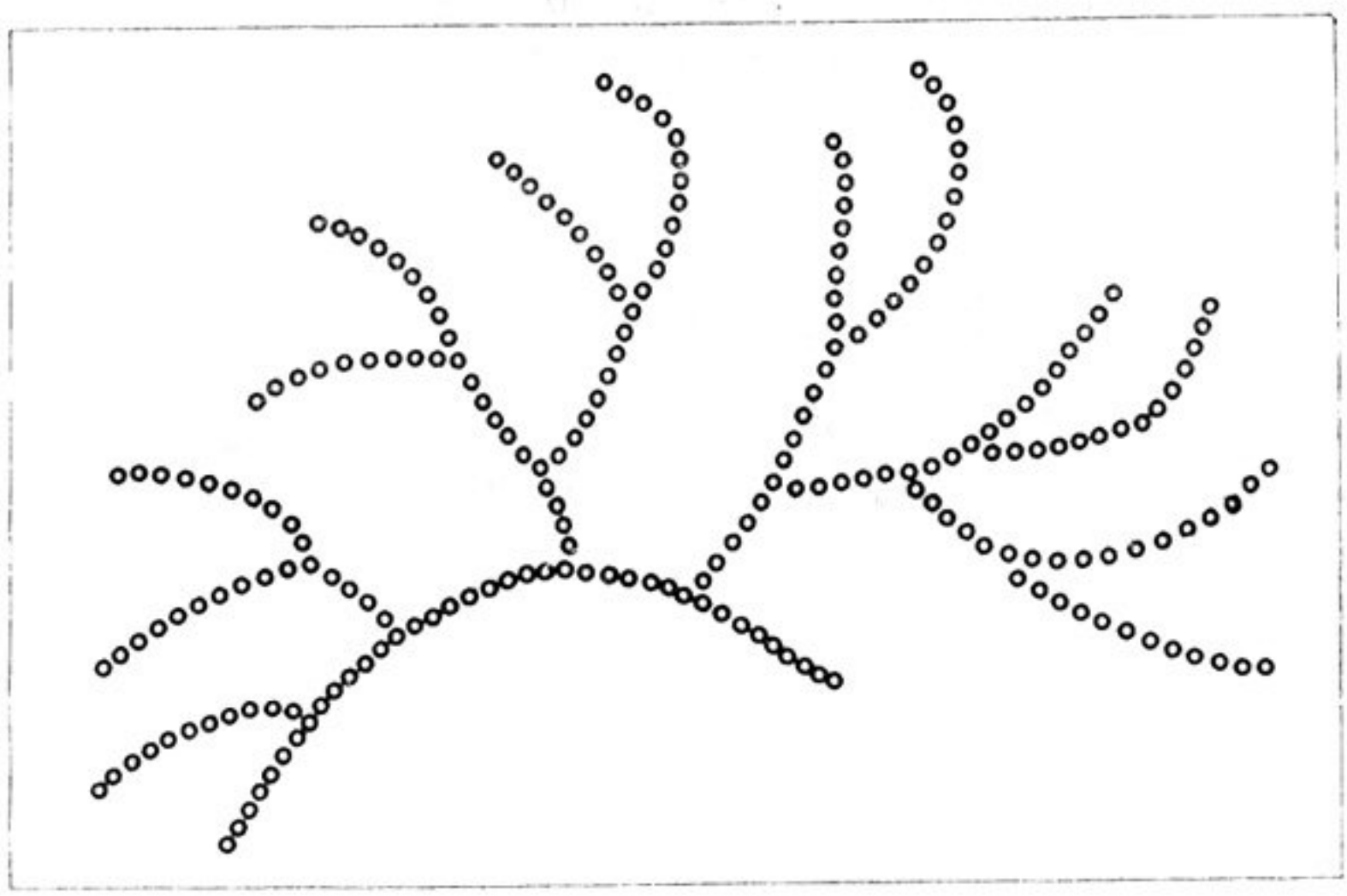


Fig.5.12 **Structura spaţială a amilopectinei**

Amilopectina reprezintă 80% din macromolecula amidonului şi are o strctură **ramificată arborescentă**, pentru că resturile glucozil sunt reunite prin două tipuri de legături glicozidice: legături 1-6 glicozidicePorţiunile liniare din amilopectină au structură amilozică cu legături 1-4, iar la punctele de ramificare se află legături 1-6.

Prin studiul enzimelor hidrolitice care acţionează asupra amidonului, se pot evidenţia diferenţele structurale ale componentelor acestui poliglucid:

◆ - **α-amilaza** - este o metalenzimă digestivă (salivară şi pancreatică) care desface legăturile 1-4 din interiorul lanţului;

◆ - **ß-amilaza** - este enzima care acţionează prin scindarea legăturilor 1-4, începând de la extremitatea nereducătoare a lanţului poliglucidic, cu eliberarea succesivă de unităţi de maltoză;

◆ - **α-1-6-glucozidaza** - este o enzimă de **deramificare** care catalizează scindarea hidrolitică a legăturilor 1-6 ale amilopectinei care este astfel deramificată;

◆ - **Maltaza** - acţionează asupra maltozei pe care o scindează hidrolitic în două molecule de α-glucoză.

In urma hidrolizei enzimatice a amidonului, la nivelul tubului digestiv rezultă molecule de glucoză, care sunt absorbite prin peretele intestinal şi ulterior, polimerizate sub formă de glicogen.

Glicogenul este echivalentul animal al amidonului vegetal şi reprezintă forma de depozitare a excesului de glucide în muşchi şi ficat. Această acumulare este realizată prin oligoglucide, poliglucide şi monoglucide care, mai întâi, sunt hidrolizate până la

monoglucide, se resorb prin mucoasa intestinală şi servesc apoi la sinteza glicogenului; proces denumit **glicogenogeneză**, al cărei sediu este în ficat şi muşchi. In funcţie de necesitaţile organismului, glicogenul se transformă progresiv în glucoză.

Din punct de vedere structural glicogenul prezintă o similitudine cu amilopectina; deosebirea esenţială constă în faptul că gradul de ramificare al glicogenului este cu mult mai mare decât al amilopectinei. Se apreciază că la fiecare 3-5 unităţi de glucoză apare o ramificaţie, o legatură 1-6 glicozidică.

La nivelul celulei hepatice glicogenul ocupă un spaţiu cât mai restrâns, prin faptul că structura sa arborescentă se încadrează într-o sferă în care coexistă legăturile 1-4 şi 1-6, acestea din urmă fiind mult mai frecvente decât amilopectină. Din aceasta cauză masa moleculară a glicogenului este de ordinul 10^6-10^7 daltoni.

In ţesuturile animale, glicogenul nu este scindat până la molecule de glucoză printr-o simplă hidroliză enzimatică (ca în cazul digestiei amidonului), ci printr-un proces de **fosforoliză**, proces în care intervin enzimele denumite **fosforilaze** (a şi b); legăturile 1-6 sunt scindate enzimatic în prezenţa enzimei **amilo-1-6-glucozidaza**.

Prin acţiunea conjugată a acestor enzime glicogenul hepatic este astfel fragmentat până la stadiul de glucoză, care trece în sânge pentru a menţine nivelul glicemiei.

In moleculele de glucoză pe care le eliberează, glicogenul muscular constituie şi sursa de energie a contracţiei musculare.

Glicogenul este parţial solubil în apă cu care formează soluţii coloidale opalescente, iar cu iodul dă o coloraţie brun-roşcată ce nu dispare la cald.

Celuloza - este un important poliglucid omogen de natură vegetală; reprezintă constituentul principal al pereţilor celulelor plantelor, cu rol de susţinere al acestora. Celuloza este constituită din lanţuri filiforme dispuse paralel, stabilizate prin legături de hidrogen, care conferă acestui edificiu macromolecular, o remarcabilă rezistenţă mecanică.

Celuloza are o structură liniară neramificată formată din 2000-10000 resturi de ß glucopiranoză, unite prin legături ß 1-4 glicozidice.

Unitatea structurală repetitivă a celulozei o constituie **celobioza** (fig.5.13).

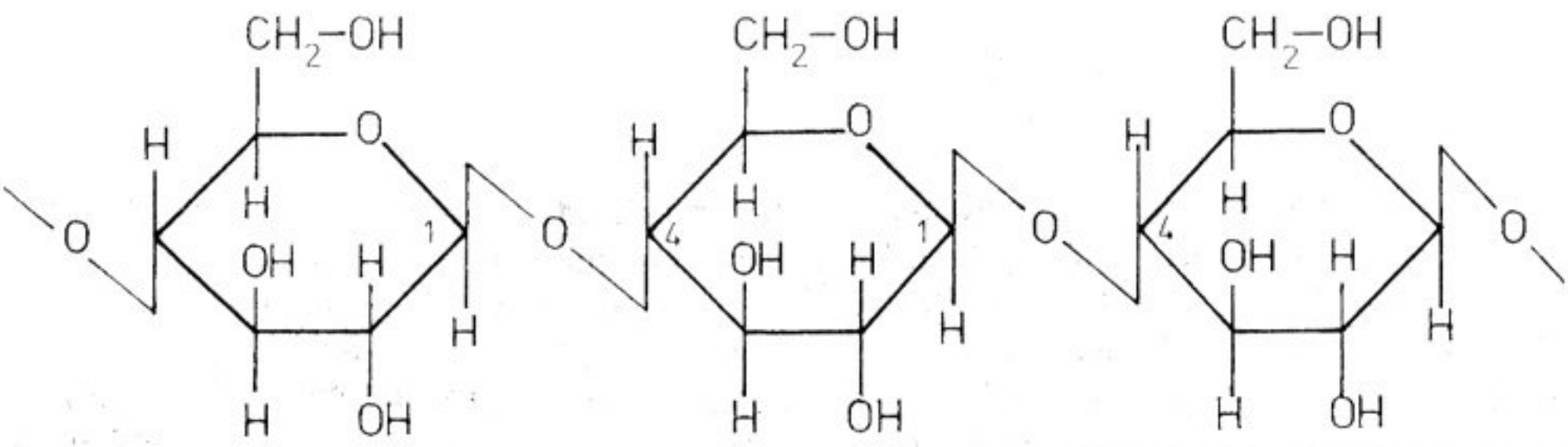


Fig.5.13 **Structura celulozei**

Nu are valoare alimentară şi deci nici energetică, datorită faptului că în organismul uman nu există sisteme enzimatice care să desfacă legăturile ß-glicozidice (ß-glucozidaze). Flora intestinală din intestinul gros are capacitatea de a hidroliza o cantitate limitată de celuloză. Cel mai important rol fiziologic al celulozei pentru organismul uman este

participarea acesteia în motilitatea intestinală.

Inulina este un poliglucid de rezervă din tuberculii plantelor compozee (dalie, cicoare). Este constituită din resturi de ß-fructofuranoză unite prin legături 1-2.

Inulina introdusă în organismul uman se elimină ca atare, nefiind metabolizată (hidrolizată). Din acest motiv poate fi utilizată ca test pentru explorarea **filtratului glomerular**, deoarece după filtrarea ei la nivelul glomerulului renal nu este resorbită de tubii uriniferi.

Dextranii sunt formaţi din molecule de D-glucopiranoză unite prin legături 1-6 glicozidice. Datorită proprietăţilor lor speciale sunt utilizaţi ca substituienţi de plasmă. In soluţie ei au o vâscozitate şi o presiune osmotică asemănătoare plasmei, iar pe de altă parte, nu sunt metabolizaţi datorită lipsei unei enzime care să scindeze legăturile 1-6 glucozidice. Menţinerea lor în circulaţia sanguină în soluţie coloidală, până la refacerea proteinelor proprii organismului, face posibilă restabilirea volumului de lichid circulant.

5.7 Glicoproteide. Proteoglicani

Aceste clase de heteroproteide conţin în molecula lor o grupare de natură poliglucidică. Datorită vâscozităţii lor s-a considerat iniţial că există o singură grupă de substanţe numite **mucosubstanţe.**

Ulterior, au fost diferenţiate în două clase de heteroproteide distincte, **glicoproteide** şi **proteoglicani**. Diferenţele dintre acestea constau din:

a) - structură;
b) - natura ozelor şi a derivaţilor glucidici;
c) - raportul glucide/proteine;
d) - tipul de legătura dintre partea glucidică şi proteine.

In **glicoproteide** predomină componenta **proteică**, pe când în **proteoglicani** predomină componenta **glucidică**.

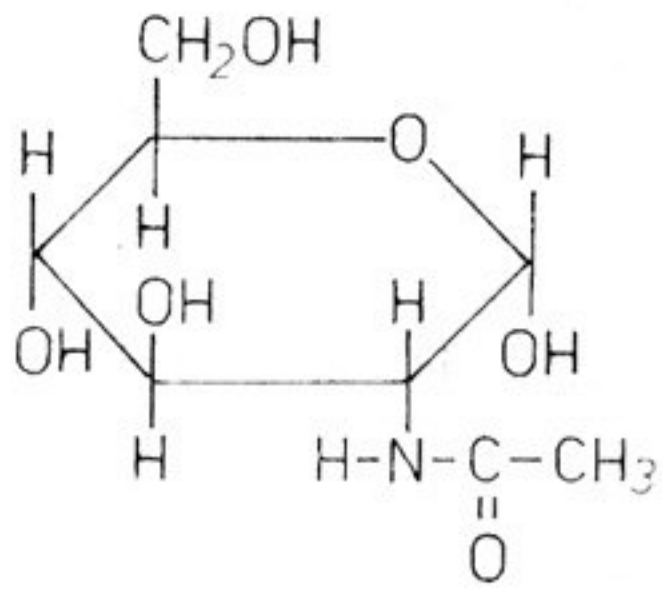
5.7.1 Glicoproteidele

Glicoproteidele sunt heteroproteide în care **componenta proteică** este **predominantă**, iar componenta prostetică este reprezentată de substanţe din clasa glucidelor.

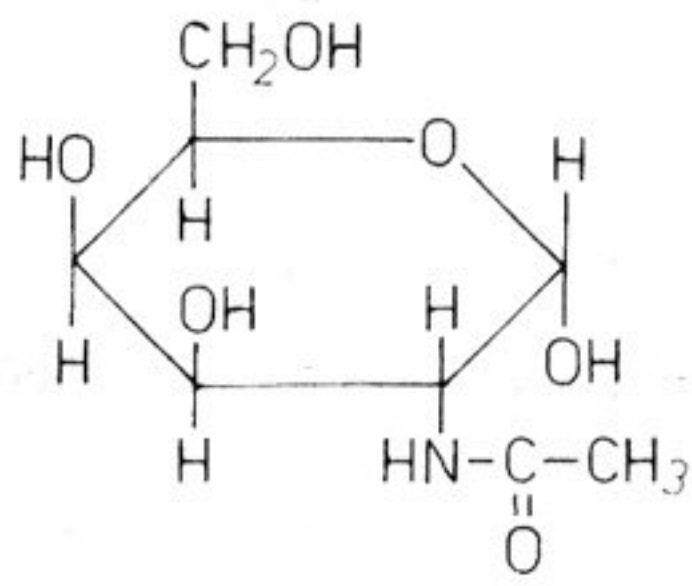
Componenta glucidică din glicoproteide prezintă grade variate de complexitate structurală. Unităţile glucidice care participă frecvent la alcătuirea componentei prostetice a glicoproteidelor sunt: **pentoze** (xiloză, arabinoză), **hexoze** (glucoză, manoză, galactoză), **metilpentoze** (fucoză), **hexozamine** (glucozamina, galactozamina), derivaţi acetilaţi ai hexozaminelor (N-acetil glucozamină, N– acetil galactozamina), acidul neuraminic, acidul sialic.

Legăturile care se formează între glucide şi proteine sunt legături covalente de tip N- sau O- glicozidice şi se stabilesc fie prin azotul amidic al asparaginei, fie prin grupările hidroxil ale serinei, treoninei, hidroxilisinei, tirozinei, hidroxiprolinei.

La formarea legăturii N- sau O- glicozidice participă cu precădere N- acetil glucozamina şi N– acetil-galactozamina.



[N – Acetil glucozamină]



[N – Acetil galactozamină]

Legătura N–glicozidică este cea mai frecventă şi utilizează ca glucid de legătură N-acetil glucozamina (N-Ac-Glc). Exista două tipuri de glucide N–glicozidice:

a) - **simple** - conţinând exclusiv N–acetil glucozamină şi un număr relativ mare de unităţi manozil;

b) - **complexe** - care, pe lângă N–acetil-glucozamină şi manoză, conţin acid sialic, galactoză, N–acetil galactozamina.

5.7.1.1 Biosinteza glicoproteidelor

Biosinteza glicoproteidelor are loc în trei etape distincte:

- ◆ - formarea unui oligoglucid precursor;
- ◆ - transferul oligoglucidului pe proteina acceptoare;
- ◆ - prelucrarea oligoglucidului precursor din molecula glicoproteidelor cu formarea glicoproteidelor "mature", conţinând un fragment oligoglucidic specific.

Primele două etape ale biosintezei au loc la nivelul **reticulului endoplasmic**, iar cea de-a treia are loc în **complexul Golgi**.

I. Glucidele iau parte la sinteza oligoglucidelor cu rol de **precursor** sau "**mature**", numai în stare activată; forma activă este reprezentată de **nucleozid-difosfat-monoglucid**.

Oligoglucidul precursor este un oligoglucid simplu, care rezultă prin transferul succesiv al ozelor active pe un alcool gras care poartă numele de **dolicol**.

In asemenea reacţii de transfer de grupări glicozil, donorul este UDP-monoglucidul, iar transportorul este dolicol-fosfatul.

UDP-N-Acetil-Glucozamină + Dolicol monofosfat ⟶

Dolicol difosfat-N-Acetil-Glucozamină + UMP.

Dolicolul este un **polizoprenoid** constituit dintr-un număr variabil de resturi **izopren**. Se deosebeşte de poliizoprenoidele tipice, prin aceea că posedă două duble legături în poziţia **trans** şi ultimul rest izopren este saturat şi are o grupare hidroxilică terminală (vezi fig.5.14).

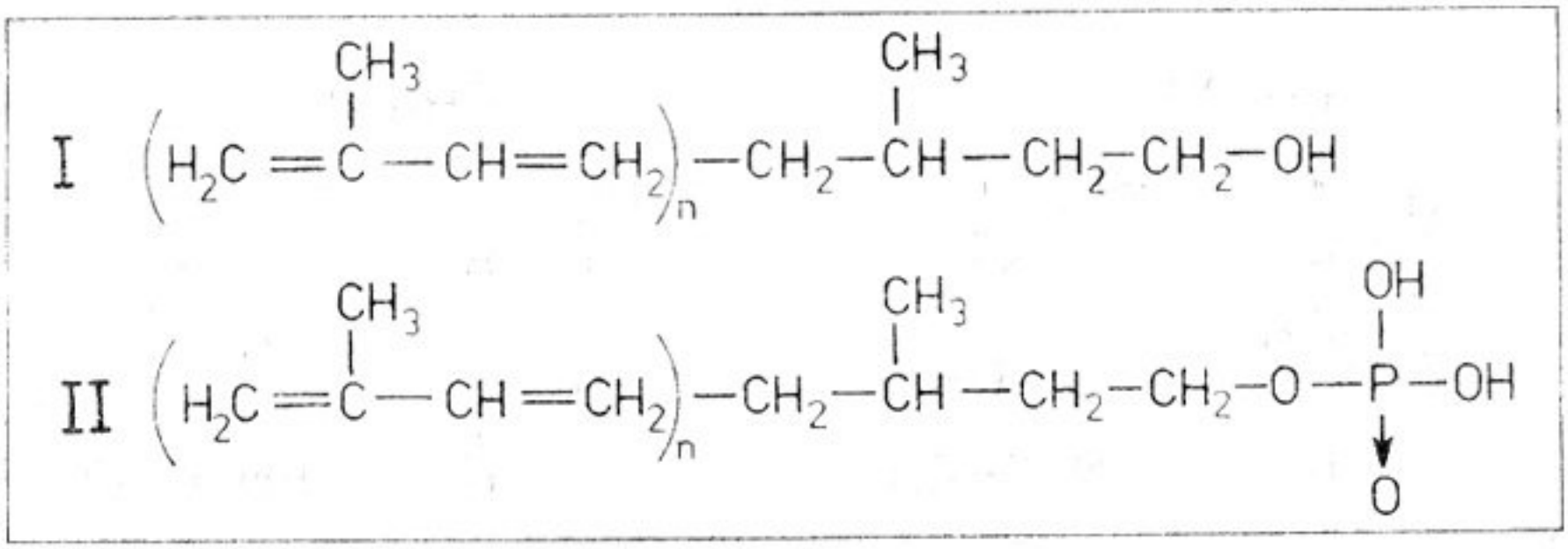


Fig.5.14 **I. Dolicol; II. Dolicol fosfat**

Molecula de dolicol este puternic hidrofobă şi are o lungime de 10 nm, ceea ce îi permite să străbată de mai multe ori stratul lipidic al membranei reticulului endoplasmic.

Dolicolul este fosforilat în prezenţa ATP formând **dolicol fosfat** care devine acceptorul resturilor glicozidice ce constituie "miezul" precursor.

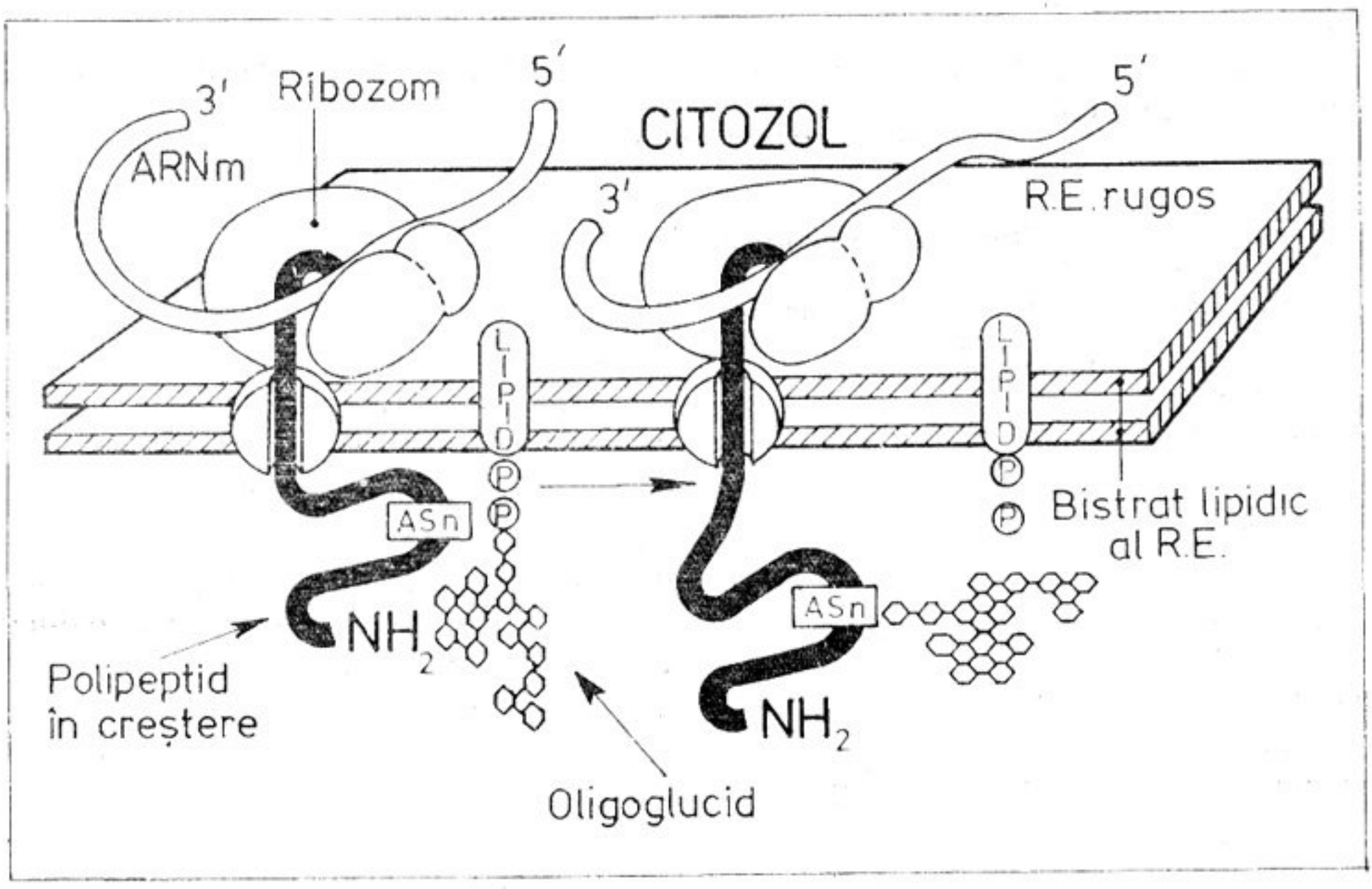


Fig.5.15 **Glicozilarea unei proteine născânde în lumenul reticulului endoplasmatic**

Forma mono sau difosforilată a dolicolului are funcţie coenzimatică de transportor de resturi de monoglucide.

Edificiul oligoglucidului precursor se consolidează prin adausul unui număr variabil de unităţi manozil, cedate de **GDP- manoză** "miezului" precursor.

Oligoglucidul se leagă de dolicol printr-o legătură pirofosfat care îl activează facilitând

transferul său ulterior pe proteină. Proteinele ce urmează a fi glicozilate pentru a forma glicoproteidele sunt sintetizate, ca toate proteinele secretorii, pe reticulul endoplasmic (RE). Proteinele sintetizate pe polizomii ataşaţi parcurg tunelul subunităţii mari a ribozomului, tunel ce se extinde în membrana reticulului endoplasmic (vezi fig.5.15).

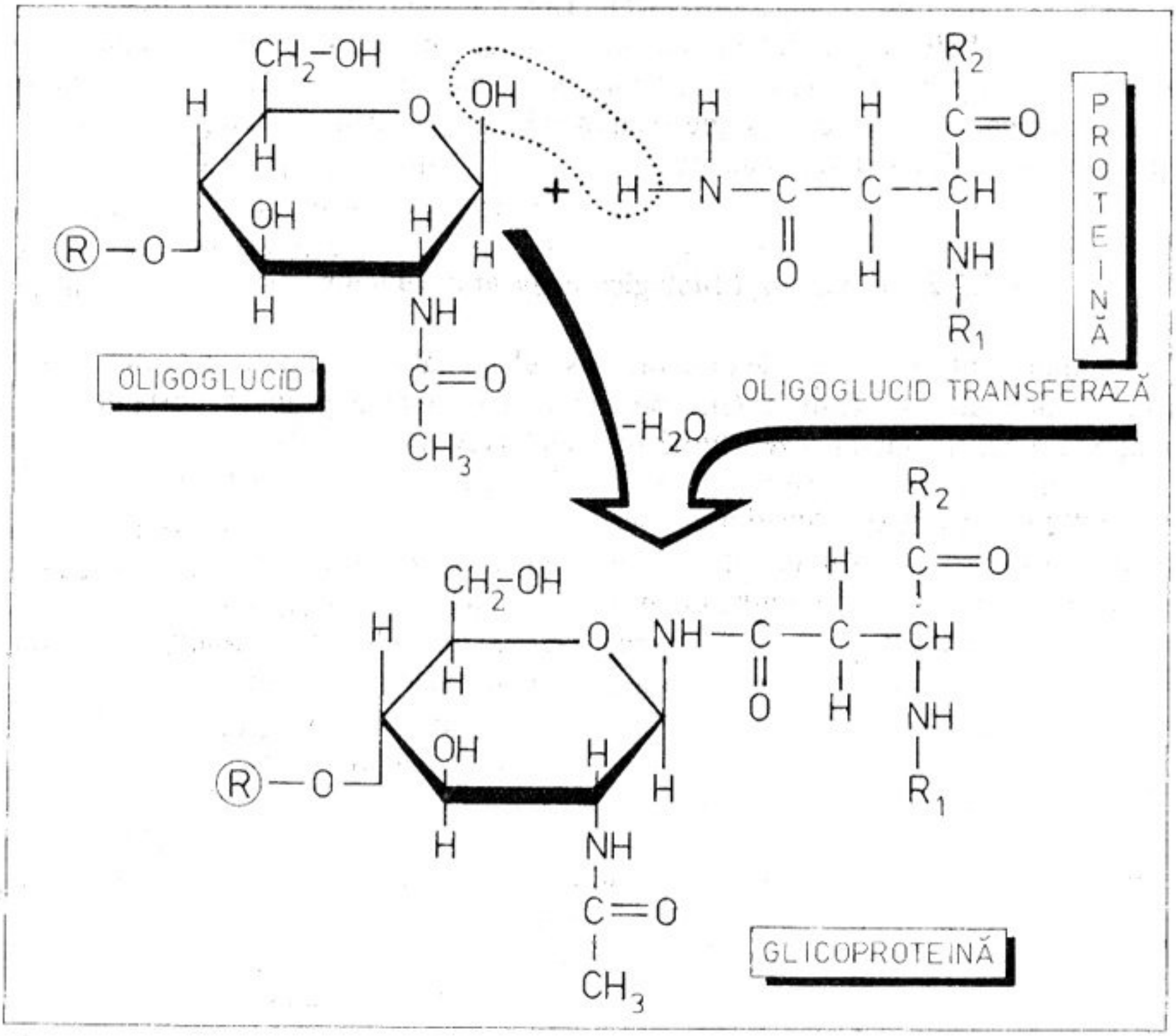


Fig.5.16 **Transferul oligoglucidului precursor pe proteină**

II. Oligoglucidul precursor este transferat pe restul de asparagină al proteinei, procesul fiind catalizat de **oligoglucid transferaza**, enzimă membranară având centrul activ orientat spre faţa luminală a membranei reticulului endoplasmic, acolo unde are loc glicozilarea (vezi fig.5.16). Orientarea spaţială a enzimei de transfer face ca glicozilarea să fie atributul exclusiv al proteinelor ce intră în lumenul reticulului endoplasmic, respectiv al proteinelor destinate a intra în constituţia membranelor intracelulare (lizozomale, nucleare, ale reticulului endoplasmic) şi plasmatice.

III. Glicoproteidele purtătoare ale unui oligoglucid precursor suferă un proces de **prelucrare** şi **remodelare**, având ca rezultat formarea oligoglucidelor complexe. Procesul are loc în complexul Golgi, unde glicoproteidele "imature" sunt aduse de către microveziculele ce se detaşează din capetele reticulului endoplasmic. Prelucrarea oligoglucidului presupune **înlăturarea unor resturi glicozil** şi **adăugarea altora**, proces realizat de **glicozidaze** (manozidaze) şi **glicozil transferaze** (galactozil transferaze, fucozil transferaze, sialil transferaze).

Glicozil-transferazele formează un sistem multienzimatic cu determinare spaţială rigidă; integrarea succesivă strictă a unităţilor glicozil este rezultatul specificităţii de substrat a **glicozil transferazelor**, produsul de glicozilare al fiecărei etape constituie substratul exclusiv al următoarei enzime din sistem.

Variabilitatea fragmentului oligoglucidic în diferite proteine "**mature**" evidenţiază ideea că celula adoptă un "**program de prelucrare**" al oligoglucidului precursor.

Glicoproteidele "maturate" în complexul Golgi sunt transportate de pe faţa concavă a acestuia spre membranele plasmatice, lizozomale, nucleare, de către veziculele secretorii golgiene. Fuzionarea veziculelor golgiene cu membrana plasmatică are ca rezultat ancorarea glicoproteidelor pe faţa externă a acesteia.

5.7.1.2 Importanţa biologică a glicoproteidelor

Omniprezenţa glicoproteidelor în organismul animal şi uman este un argument esenţial pentru funcţiile vitale ale acestora. Glicoproteidele reprezintă un grup de substanţe cu o largă distribuţie şi o considerabilă semnificaţie biologică (vezi tabela 5.2).

I - In organism se găsesc un număr impresionant de glicoproteide **funcţionale** solubile, cu cele mai diverse roluri:

- ◆ - participă în procesul de **coagulare** a sângelui: trombina şi fibrinogenul;
- ◆ - participă în procesele de **apărare** ale organismului: imunoglobuline;
- ◆ - determină **specificitatea** de grup sanguin: izoaglutininele, haptoglobine;
- ◆ - asigură **protecţia** mucoaselor gastrointestinale, ale aparatului respirator şi urogenital faţă de acţiunea enzimelor proteolitice: glicoproteide submaxilare, glicoproteide gastrice, glicoproteide urinare;
- ◆ - asigură **transportul** unor **vitamine,** ex: factorul intrinsec transportă vitamina B_{12};
- ◆ - asigură **transportul** unor **hormoni**, ex: thyroxine - binding-globuline (T.BG), transportă hormonii tiroidieni;
- ◆ - **transportă cuprul** prin sânge - ceruloplasmina;

II - Glicoproteidele **structurale** reprezintă o a doua categorie importantă, cu roluri biologice diverse:

- ◆ - **Receptorii hormonali** sunt glicoproteide membranare capabile să recunoască şi să lege un hormon;
- ◆ - **Glicoforinele** reprezintă aproximativ 10% din totalul proteinelor membranare şi sunt localizate în **glicocalixul eritrocitar**.

In moleculele de glicoforine se delimitează trei zone distincte: două zone **hidrofile**, corespunzând capetelor N şi C-terminale şi o zonă cuprinsă între zonele hidrofile, care reprezintă **zona hidrofobă**. Zona hidrofilă **N-terminală** este situată în afara membranei şi reprezintă 60% din masa moleculei, conţine peste 100 de resturi glucidice repartizate în 16 fragmente oligoglucidice, având invariabil acid sialic la capete. Datorită acidului sialic la suprafaţa eritrocitului apare o încărcare electrică negativă cu rol în controlul ionic transmembranar. Zona hidrofilă **C-terminală** a moleculei este orientată spre citoplasmă şi este bogată în acizi monoaminodicarboxilici (glutamic şi aspartic), ionizaţi negativ la pH fiziologic. Zona hidrofobă a moleculei are capacitatea de a penetra bistratul lipidic. Se consideră că zona bogată în glucide a glicoforinelor conţine antigenele de grup sanguin (A,B,O).

Tabela 5.2 **Principalele glicoproteide şi localizarea lor**
(După A.L.Lehninger 1989)

Localizare	Glicoproteide
Plasmă.	- Fibrinogen. - Trombină. - Izoaglutinine. - α-antitripsină. - Orosomucoidul. - Haptoglobină. - Ceruloplasmină. - Imunoglobulinele. - Factorul intrinsec. - Interferonul.
Urină.	- Glicoproteide urinare.
Hormoni.	- Hormonul stimulator al foliculinei. - Hormonul stimulator al tiroidei.
Enzime.	- Ribonuclează. - ß-glucuronidază. - Pepsină. - Colinesterază.
Secreţiile mucoaselor.	- Glicoproteide submaxilare. - Glicoproteide gastrice.
Tesutul conjunctiv.	- Colagen. - Elastină.
Membranele celulare.	- Glicoforinele. - Glicoproteida din banda III. - Receptorii hormonali.
Membranele extracelulare.	- Glicoproteida din membrana bazală.
Albuşul de ou.	- Ovalbumină. - Avidină. - Ovomucoidul.

♦ - **Glicoproteida din banda III** - (denumită după criteriul de migrare electroforetică) este o proteină integrală a membranei eritrocitare. Prezintă o structură similară glicoforinelor, cu deosebirea că zona hidrofobă traversează de mai multe ori bistratul lipidic.

Distribuţia specială a zonei hidrofobe permite glicoproteidei din banda III să constituie un canal hidrofil pentru ionii Cl^- şi HCO_3, consacrând-o ca pe o proteină eritrocitară cu rol major în transportul O_2 şi CO_2.

♦ - **Ovalbumina, ovomucoidul** şi **avidina** sunt glicoproteide prezente în albuşul de ou. Avidina se combină cu vitamina denumită biotină, formând un complex inactiv; sub această formă biotina nu mai poate fi absorbită şi utilizată de către organism. Avidina se inactivează

prin încălzire deoarece suferă procesul de denaturare care are ca rezultat eliberarea biotinei din complexul inactiv. Aşadar, albuşul de ou fiert nu manifestă activitate antibiotinică, în timp ce albuşul de ou crud suprimă activitatea vitaminică a biotinei datorită avidinei.

5.7.2 Proteoglicani. Glicozaminoglicani

Proteoglicanii, sunt biomolecule care prezintă fragmente poliglucidice, legate **covalent** şi **electrovalent** de partea proteică a moleculei. Conţinutul glucidic al proteoglicanilor, cantitativ predominant, variază între 85-90% din masa moleculei, iar componenta proteică se găseşte într-o proporţie mult mai redusă comparativ cu glicoproteidele.

Proteoglicanii sunt poliglucide specifice organismului animal şi uman; se găsesc în cartilagii, tendoane, piele, lichid sinovial şi sunt constituenţi importanţi ai substanţei fundamentale care umple spaţiul dintre celule.

Componenta glucidică a proteoglicanilor este alcătuită din condensarea a două tipuri de unităţi de natură glucidică: a) - **hexozamină** (glucozamina sau galactozamina) şi b) - **acid uronic** (în general, acid ß-glucuronic şi acid ß-iduronic).

Grupările aminice ale hexozaminelor sunt frecvent acetilate; unele poliglucide cuprind şi resturi sulfat -SO_3H, legate esteric sau amidic.

Deoarece în structura glucidică a proteoglicanilor apare invariabil **glucozamina**, fragmentele glucidice ale acestora sunt denumite şi glicozaminoglicani (GAG).

Glicozaminoglicanii au diferenţe structurale determinate de:

- ◆ - natura glucidelor ce constituie unitatea diglucidică;
- ◆ - configuraţia anomerică şi poziţia legăturii glicozidice ce se stabileşte între unităţile diglucidice;
- ◆ - numărul şi localizarea grupărilor sulfat.

Sunt cunoscute şapte tipuri de glicozaminoglicani ale căror caracteristici sunt prezentate în tabela 5.3. Datorită numărului mare de anioni carboxilat şi sulfat prezenţi în molecule, glicozaminoglicanii se comportă similar unor **polielectroliţi anionici**, caracteristică esenţială care ar explica implicarea lor funcţională în fixarea cationilor în organism.

Exceptând acidul hialuronic care formează lanţuri heteropoliglucidice solitare, ceilalţi glicozaminoglicani se asociază covalent sau electrocovalent cu proteinele. Legătura cu proteinele se stabileşte între N-acetil-galactozamină şi serină, treonină sau asparagină.

Caracterul polianionic şi hidrofil puternic, determină proteoglicanii să lege mari cantităţi de apă, ceea ce face ca aceştia să ocupe volume mult mai mari faţă de procentul de greutate pe care-l reprezintă din masa proteinelor mediului extracelular.

Această organizare difuză şi hidratată a moleculelor, formează goluri care facilitează migrarea moleculelor solubile în apă în mediul extracelular.

5.7.2.1 Acidul hialuronic

Acidul hialuronic este singurul GAG nesulfatat şi se găseşte localizat în substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv, piele, corpul vitros, cartilagii, lichid sinovial; îndeplineşte rolul de **liant tisular**, acţionând ca un **ciment intercelular**. Acidul hialuronic nu este legat de o moleculă proteică, dar formează arhitecturi moleculare "gigant" prin asamblarea cu proteoglicani conţinând predominant condroitin sulfat (vezi fig 5.21).

Este un polimer liniar cu masă moleculară mare, compus din acid D-glucuronic şi **N-glucozamină** care se leagă alternativ 1-3 şi, apoi 1-4; unitatea diglucidică alternativă fiind

TABEL 5.3.

GLICOZAMINOGLICANII SI PRINCIPALELE LOR CARACTERISTICI

GLICOZAMINOGLICANUL	MASA MOLECULARĂ	DIGLUCIDUL REPETITIV		LEGAT LA PROTEINA	DISTRIBUTIA TISULARA	PRINCIPALUL ROL BIOLOGIC
		Glucid I	Glucid II			
ACID HIALURONIC	4000 - 8 x 10^6	Acid D-Glucuronic	N-Acetil-D-Glucozamină	-	Corp vitros, lichid sinovial	Ciment intercelular
CONDROITIN 4-SULFAT Condroitin sulfat A	5000 - 50000	Acid D-Glucuronic	N-Acetil D-Galactozamină 4-Sulfat	+	Cartilaje, oase, artere, cornee	Mineralizarea matricei osoase; Metabolismul Ca osos
CONDROITIN 6-SULFAT (Condroitin sulfat C	15000 - 50000	Acid D-Glucuronic	N-Acetil D-Galactozamină 6-Sulfat	+	Cornee, oase, artere, piele	Mineralizarea matricei osoase; Metabolismul Ca osos
DERMATAN SULFAT Condroitin sulfat B	15000 - 40000	Acid D-Iduronic	N-Acetil D-Galactozamină	+	Piele, singe, inimă	Constituent al tesutului conjunctiv dermic
HEPARINĂ	6000 - 25000	Acid D-Glucuronic	N-Acetil D-Glucozamină	+	Ficat, piele, plamini	Anticoagulant, Activeaza lipoproteín lipaza
HEPARAN SULFAT	5000 - 12000	Acid D-Glucuronic	N-Acetil D-Glucozamină	+	Aortă, artere, plamini	Protectie a mucoaselor
KERATAN SULFAT	4000 - 19000	D-Galactoza	N-Acetil D-Glucozamină	+	Cartilaje, cornee	Concentratia tisulară creste cu virsta

denumită **acid hialobiuronic** (fig.5.17).

Macromolecula de acid hialuronic poate fi scindată, respectiv hidrolizată specific, de către enzima **hialuronidază** prezentă în bacterii, veninul unor şerpi şi în spermatozoizi.

Hialuronidaza existentă în capul spermatozoizilor depolimerizează stratul de acid hialuronic ce înconjoară ovulul; astfel permeabilitatea ovulului se măreşte, ceea ce facilitează fecundarea sa prin penetrarea spermatozoidului.

Un fragment din structura acidului hialuronic se prezintă astfel:

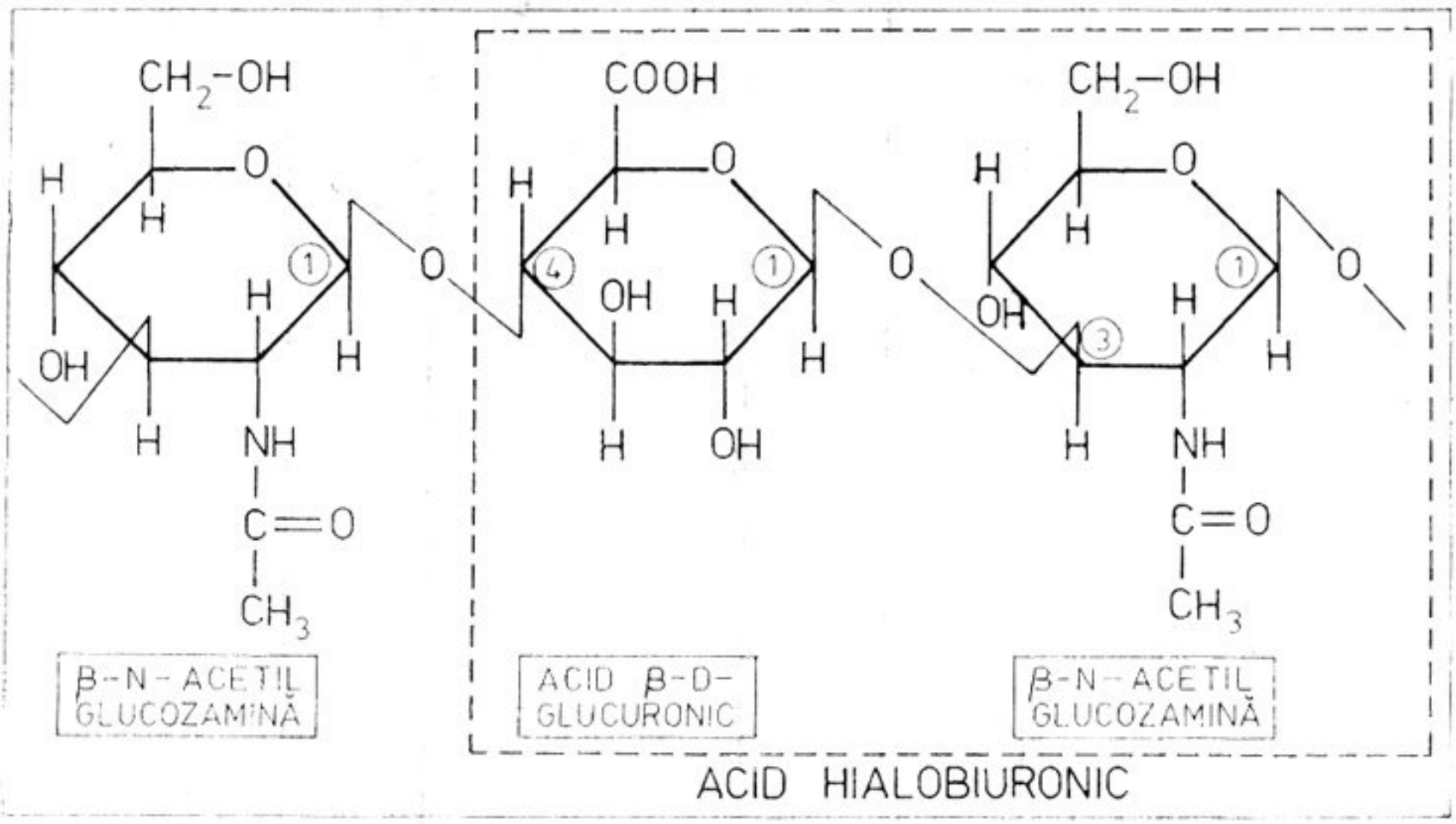


Fig.5.17 **Structura acidului hialuronic**

Hialuronidaza bacteriană desface hidrolitic acidul hialuronic din ţesutul conjunctiv, ceea ce determină diminuarea capacităţii de filtru selectiv a substanţei fundamentale şi în consecinţă expunerea ţesuturilor la invazia toxinelor bacteriene în organism.

5.7.2.2 Heparina

Heparina este un GAG având o serie de particularităţi structurale care determină unele particularităţi funcţionale.

Unităţile diglucidice manifestă o mare heterogenitate în privinţa comportamentului acidului uronic, care poate fi acidul glucuronic sau iduronic sulfatat, cât şi a glicozaminei, care poate fi N-sulfatată sau N-acetilată.

O structură posibilă a heparinei formată din ß -Glucuronic şi Glucozamină C_2 şi C_6 sulfonată, poate fi prezentată în continuare.

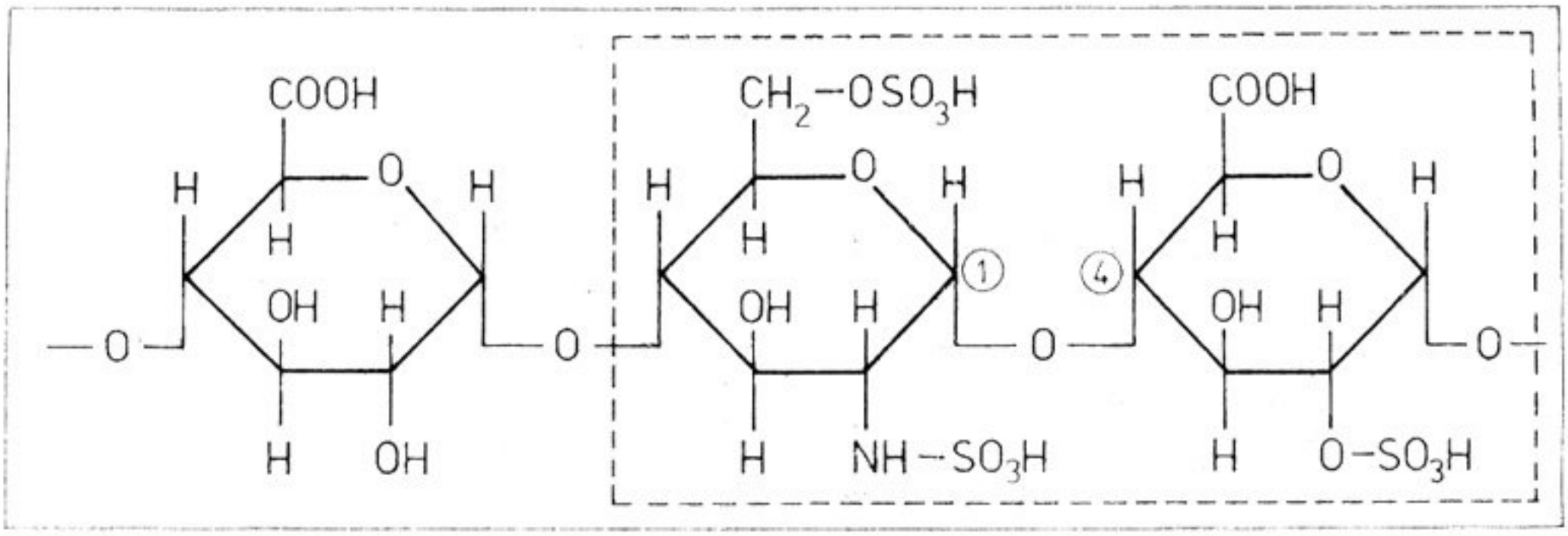


Fig.5.18.A **Structura heparinei (cu acid glucuronic)**

O a doua structura posibilă a heparinei care diferă de prima numai prin prezenţa acidului iduronic (în locul acidului glucuronic), este prezentată în figura 5.18.B.

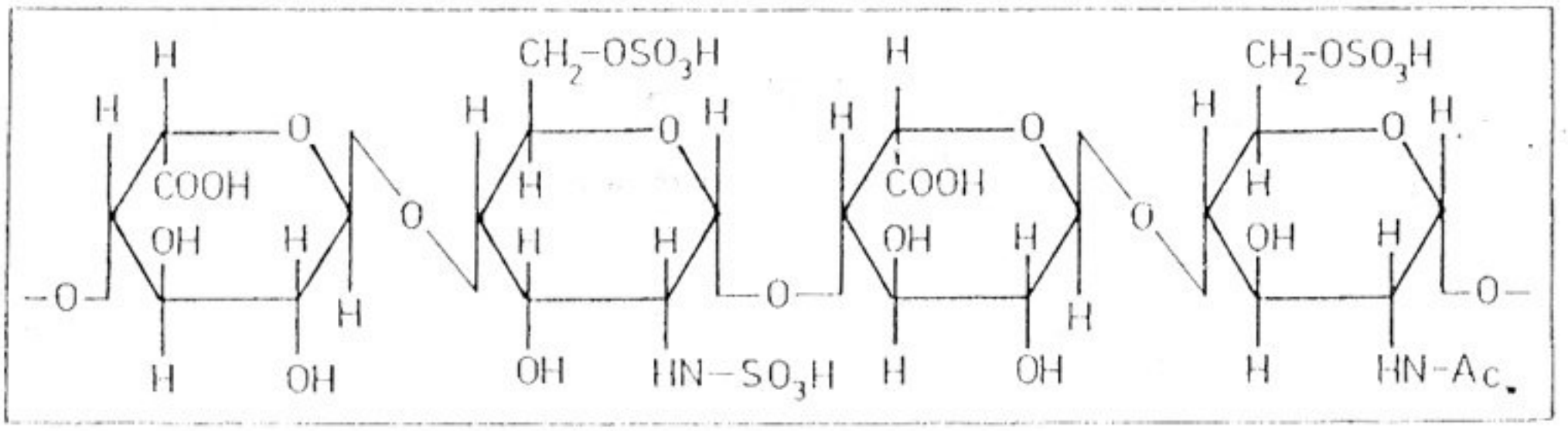


Fig.5.18.B **Structura heparinei (cu acid iduronic)**

Heparina a fost identificată în ficat, plămân, miocard, de unde se poate izola. Are acţiune anticoagulantă şi este activator al enzimei denumite **lipoproteinlipază**.

Acţiunea anticoagulantă a heparinei se bazează pe proprietatea sa de a forma un complex inactiv cu **trombokinaza** care intervine în reacţia de transformare a **protrombinei în trombină**.

Heparina deţine un rol important în procesul de clarifiere al plasmei prin acţiunea de eliberare şi activare a **lipoproteinlipazei** care acţionează asupra chilomicronilor şi lipoproteidelor cu densitate foarte mică (VLDL).

5.7.2.3 Condroitinsulfaţii. Dermatan sulfaţii

Condroitinsulfaţii sunt glicozaminoglicanii majori din proteoglicanii cartilagiilor, tendoanelor, arterelor; ţesutul nediferenţiat cicatriceal (**ţesutul granular**) cuprinde cantităţi mari de condroitinsulfaţi. Condroitinsulfaţii sunt constituiţi din resturi de acid glucuronic care alternează cu resturi de N-acetil galactozamină care cuprinde o grupare ester sulfurică în C_4

sau C_6; acest diglucid este unitatea repetitivă din condroitinsulfaţi.

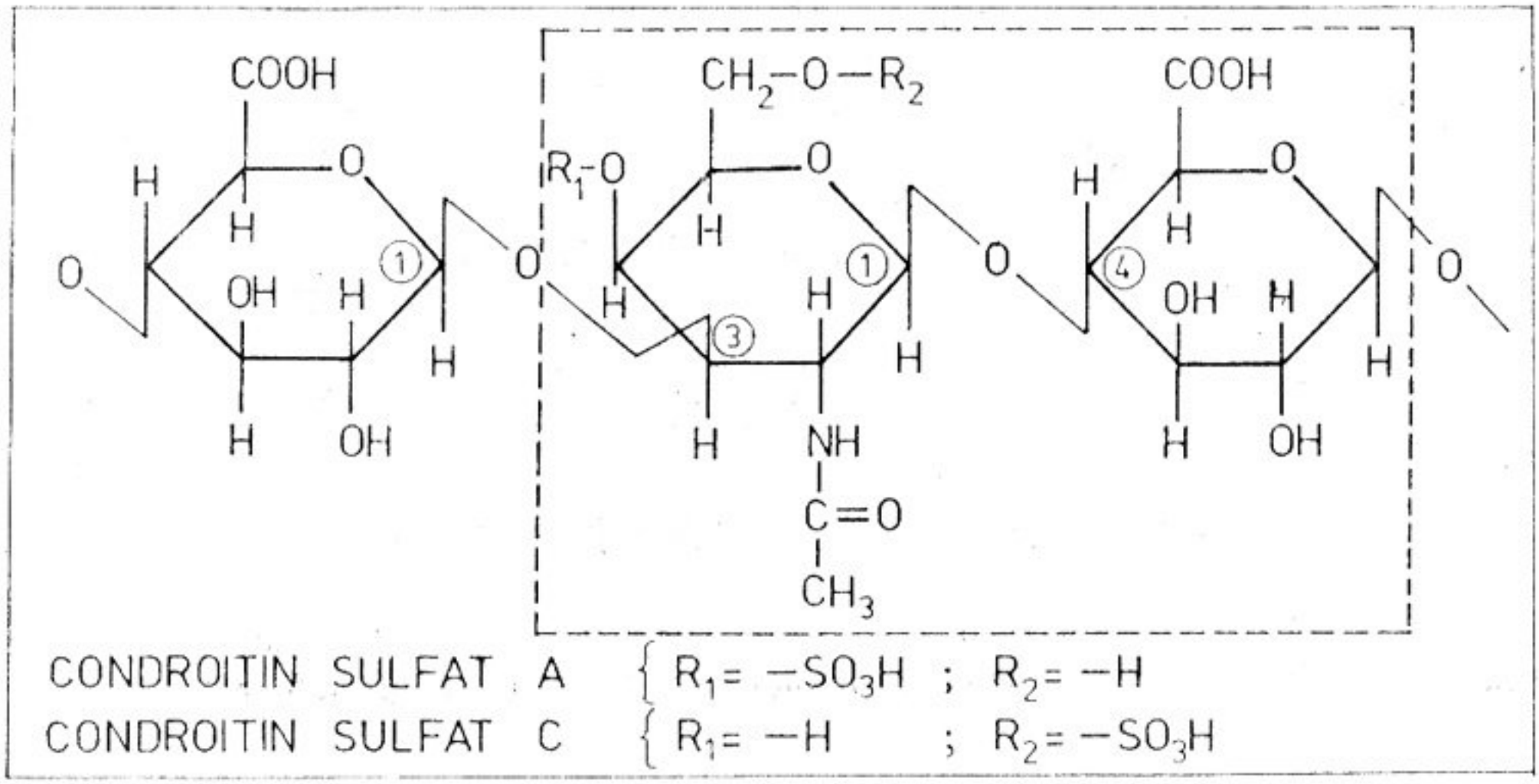


Fig.5.19 **Structura condroitinsulfaţilor A şi C**

Ca donor de grupări sulfat active funcţionează 3′-fosfo-adenozil-5′-fosfo-sulfatul (PAPS),(fig.5.20).

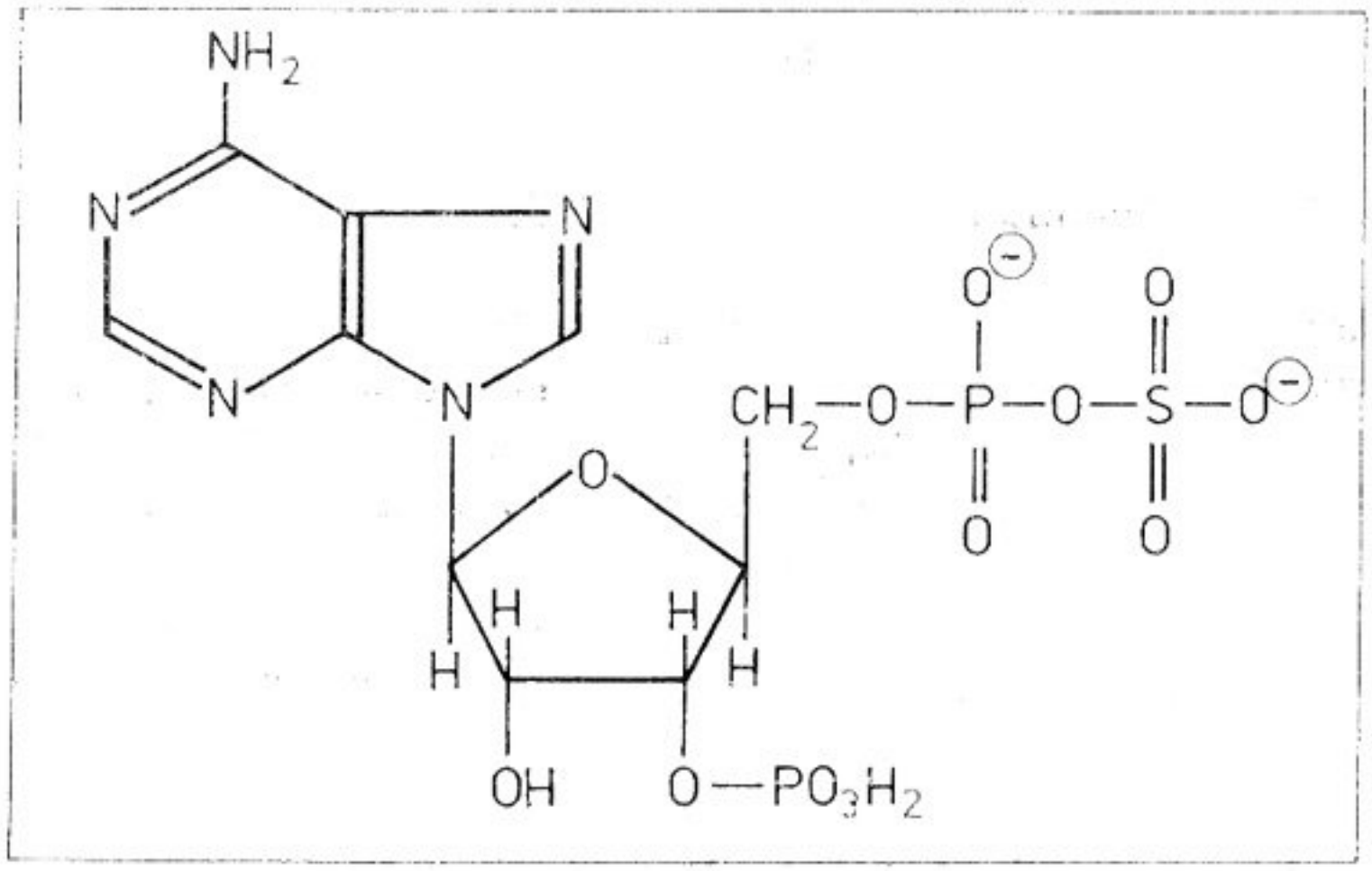


Fig.5.20 **Fosfo adenozil-5′-fosfo sulfatul (PAPS)**

Condroitinsulfaţii prezintă un rol de susţinere în timpul elaborării structurii fibrilare a colagenului.

Datorită numărului mare de sarcini electrice negative, condroitinsulfaţii au capacitatea

de a fixa ionii de Ca^{2+}, ceea ce conferă un rol important în **reglarea homeostaziei** matricei cartilajului şi în **mineralizarea matricei osoase**.

Proteoglicanii conţinând condroitinsulfaţi se asociază prin intermediul unor proteine de legare cu acidul hialuronic (care apare ca o coloana vertebrală) formând agregate supramoleculare de dimensiuni foarte mari (cca.100 molecule de proteoglicani/moleculă de acid glucuronic) cu o masă moleculară de ordinul sutelor de milioane (vezi fig.5.21). In cursul evoluţiei biologice a unui individ, s-a constatat o particularitate interesantă a condroitin sulfaţilor, al căror nivel cantitativ scade odată cu vârsta.

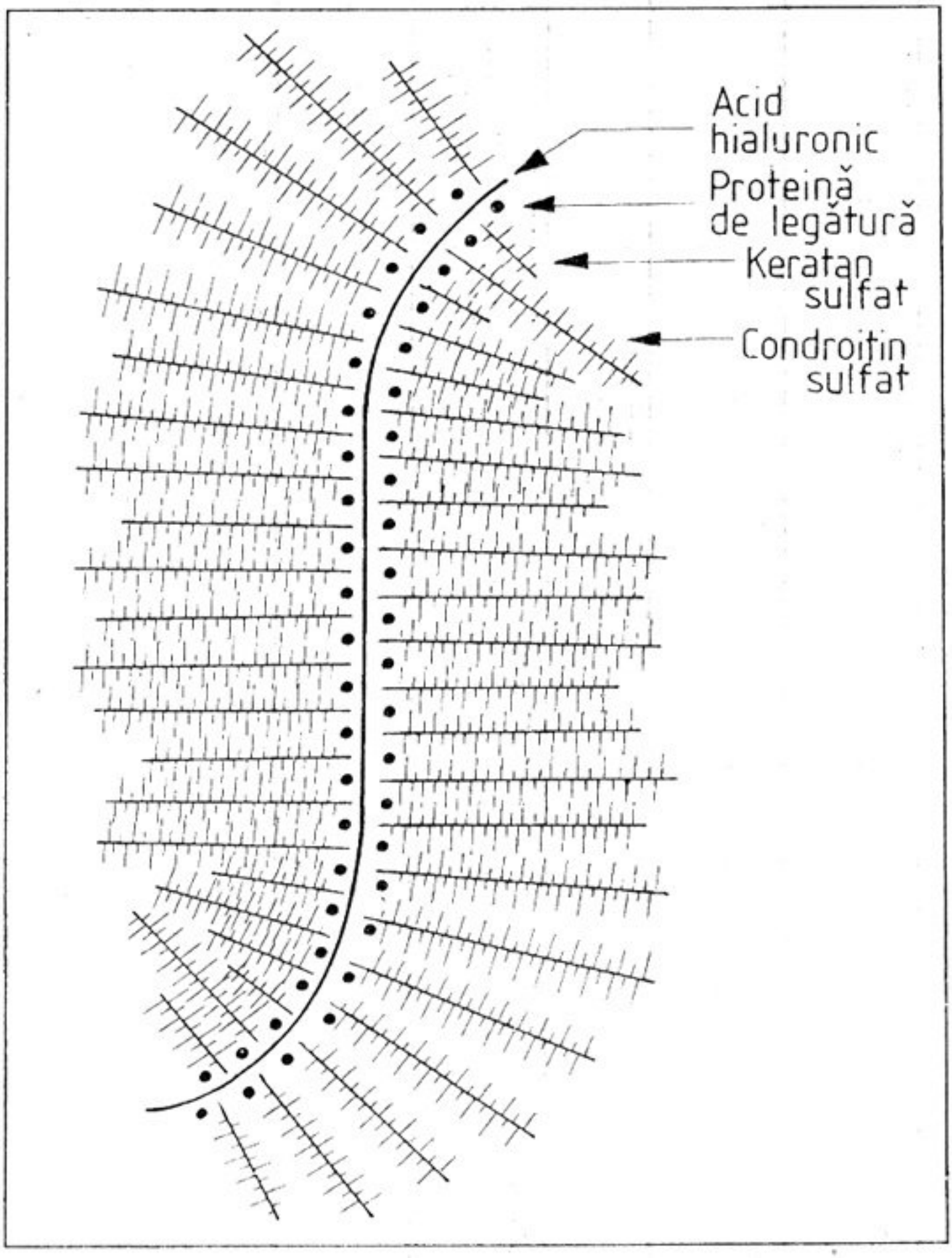


Fig.5.21 **Diagrama schematică a unui agregat proteoglicanic.** (După Lawrence Rosenberg, 1975)

Dermatan sulfatul considerat până nu de mult timp **condroitinsulfatul B** acompaniază condroitinsulfaţii în cartilaje, vase, tendoane.

Structural este asemănător cu condroitinsulfatul A cu deosebirea că în locul acidului glucuronic apare epimerul la C_5 al acestuia, denumit **acidul iduronic**. Particularitatea biologică importantă este aceea că nivelul său tisular creşte cu vârsta.

O excreţie urinară crescută a dermatan sulfatului se observă în **Boala lui Hurler** caracterizată prin **infiltraţie lipidică** în ţesuturi şi organe (ficat, splină, cornee) şi **tulburări psihice**. Boala se instalează la 3-4 luni de viaţă şi subiectul nu depăşeşte 20 de ani; cauza

TABEL 5.4. ENZIMOPATII IN METABOLISMUL GLICOZAMINOGLICANILOR

SINDROMUL	Manifestari clinice						Glicozaminoglicanul predominant in urină
	Modificari somatice si	Intirziere mintala	Cardio-pulmonar	Hepato-splenomegalie	Opacifierea corneei	Pierderea auzului	
HURLER	marcate	severă dupa primul an	slabirea ventilatiei	marcată	progresivă	prezentă	Dermatansulfat Heparansulfat
HUNTER	moderate pînă la marcate	severă dar gradată	hipertensiune pulmonară	marcată	rară	prezentă	Dermatansulfat Heparansulfat
SANFILIPPO	slabe	severă	nedescrise	moderată	absentă	prezentă	Heparansulfat
MORQUIO	marcate	absentă	ingustarea aortei	usoară	prezenta dar intirziată	prezentă dar nu severă	Keratansulfat
SCHEIE	slabe	absentă	afectiune aortico-valvulara	variabilă	marcată	variabilă	Dermatansulfat
MAROTEAUX LAMY	marcate	absentă	murmur cardiac	moderată	prezentă	variabilă	Dermatansulfat

decesului este **insuficienţa circulatorie** ca urmare a acumulării dermatan sulfatului.

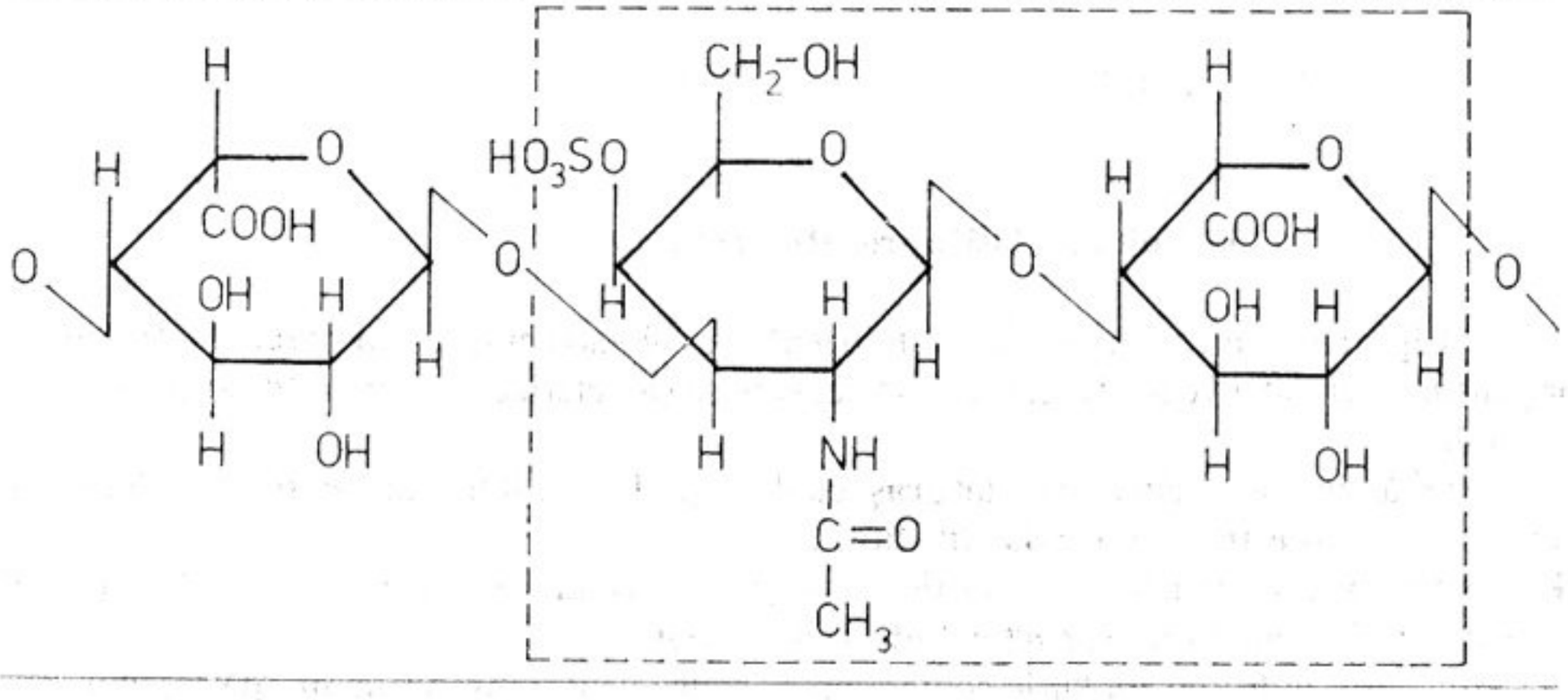


Fig.5.22 **Structura dermatan sulfatului**

In tabela 5.4 sunt menţionate diversele manifestări clinice ale unor maladii determinate de acumularea în organismul uman a unor glicozaminoglicani.

Keratan sulfatul are o structură analoagă cu a celorlalţi glicozaminoglicani deosebindu-se de aceştia prin **absenţa acizilor uronici** care sunt substituiţi cu **grupări galactozil**.

Keratan sulfatul se întâlneşte într-o concentraţie nulă la naştere, creşte până la vârsta de 30 de ani, pentru ca apoi să rămână la un nivel stabil până la vârsta de 80 de ani.

Variaţiei cu vârsta a Keratan sulfatului şi condroitinsulfaţilor li s-a acordat o atenţie deosebită în studiul **procesului de îmbătrânire**.

6.1 Definiţie. Clasificare. Roluri biologice

Lipidele reprezintă o clasă eterogenă de biomolecule cu o largă distribuţie în organismele vii, atât vegetale, cât şi animale, care se caracterizează prin următoarele trăsături generale:

◆ - rezultă din combinarea **acizilor graşi** cu diverşi **alcooli**, între care se realizează legături covalente de tip **ester** sau **amidă substituită**;

◆ - conţin în molecula lor radicali de acizi graşi constituiţi din catene lungi de atomi de carbon care le conferă un **caracter hidrofob, apolar**;

◆ - caracterul hidrofob apolar le conferă proprietatea de a fi **insolubile în apă** (mediu apos) şi solubile în solvenţi **nepolari** (benzen, cloroform, eter, tetraclorură de carbon); Gradul variat de solubilitate al lipidelor în diferiţi solvenţi organici sau amestecuri de solvenţi permite **fracţionarea lor selectivă**.

Clasificarea cea mai generală şi unanim acceptată grupează aceste substanţe în două categorii:

I - **Lipide simple** în compoziţia cărora intră C,H,O. Se definesc ca esteri ai acizilor graşi cu diverşi alcooli; în funcţie de natura alcoolului lipidele simple se subdivid:

1. **Acilgliceroli** - esteri ai glicerolului cu acizii graşi;
2. **Steride** - esteri ai unor alcooli ciclici superiori, steroli, cu acizii graşi;
3. **Ceride** - esteri ai unor alcooli alifatici superiori cu acizii graşi;

II - **Lipide complexe** (heterolipide) în compoziţia cărora intră pe lângă C,H,O şi N,P,S. Sunt **esteri** ai acizilor graşi cu glicerolul sau **amide** ale acizilor graşi cu **sfingozina**, care mai conţin însă în structura lor alcooli cu azot (serina, colamina, colina), acid fosforic, inozitol, glucide. După natura alcoolului constituient heterolipidele se subclasifică astfel:

1. **Glicerofosfolipide** care sunt compuse din glicerol, acizi graşi, acid fosforic, alcooli şi se subdivid în:

A. **Glicerofosfolipide cu azot**:

a) Lecitine; b) Cefaline; c) Serincefaline; d) Plasmalogeni.

B. **Glicerofosfolipide fără azot**:

a) Acizi fosfatidici; b) Cardiolipine; c) Inozitol-fosfatide.

2. **Sfingolipide** compuse din sfingozină, acizi graşi, alcooli azotaţi, glucide, eventual acid fosforic:

A. **Sfingolipide cu fosfor**: sfingomieline.

B. **Sfingolipide fără fosfor**:

a) Cerebrozide; b) Sulfatide; c) Gangliozide; d) Ceramide.

Unii autori divizeaza lipidele în două categorii:

A - **Lipide saponifiabile** care cuprind acizi graşi legaţi esteric sau amidic, iar prin hidroliză sunt descompuse în substanţele componente; din această categorie fac parte lipidele simple şi complexe.

B - **Lipide nesaponifiabile** reuneşte diverse categorii de compuşi, care **nu sunt scindate hidrolitic** în compuşi simpli, păstrează **criteriile de solubilitate** ale lipidelor şi

prezintă în moleculele lor **zone hidrofobe** întinse. Din această categorie fac parte alcooli, aldehide cu structură poliizoprenică (terpene, carotenoizi), steroizi, vitamine liposolubile.

Roluri biologice ale lipidelor

Lipidele îndeplinesc următoarele roluri de prim ordin pentru organismul uman şi animal:

◆ - constitu e o **importantă sursă de energie** pentru organism; prin metabolizare 1g lipide eliberează 9,3 calorii, superioară glucidelor care în aceleaşi condiţii eliberează 4,1 calorii.

◆ - în asociaţie cu proteinele sunt **constituienţi structurali** ai **membranelor celulare** şi **intracelulare** intervenind în reglarea permeabilităţii, respectiv a transportului prin biomembrană;

◆ - în lichidele biologice funcţionează ca **sisteme transport** pentru unele substanţe nepolare liposolubile (vitamine, hormoni);

◆ - reprezintă principala **formă de depozitare** a rezervelor energetice ale organismului animal şi uman, în special în ţesutul adipos;

◆ - au un rol de **material izolant** de protecţie mecanică şi termică a unor organe şi a întregului corp;

◆ - datorită sarcinii electrice a unor lipide acestea participă în **transmiterea impulsului** de-a lungul fibrelor nervoase.

6.2 Componenţi structurali ai lipidelor

Principalii componenţi structurali ai lipidelor sunt acizii graşi şi alcooli azotaţi şi neazotaţi.

6.2.1 Acizii graşi

Acizii graşi sunt componenţi fundamentali ai majorităţii lipidelor. De la diverse specii de plante şi animale au fost izolaţi şi identificaţi peste 100 de acizi graşi diferiţi.

Deşi prezintă structuri variate, acizii graşi au o serie de caracteristici structurale comune:

◆ - sunt acizi monocarboxilici;

◆ - au minimum 8 atomi de carbon;

◆ - au un număr par de atomi de carbon deoarece provin de la un rest de doi atomi de carbon $CH_3\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\sim SCoA$ (acetil~coenzimă A);

◆ - acizii graşi cei mai răspândiţi sunt acizii monocarboxilici alifatici cu catenă normală saturată sau nesaturată.

Acizii graşi din compoziţia lipidelor se pot clasifica astfel:

1 - acizi graşi saturaţi;
2 - acizi graşi nesaturaţi;
3 - acizi graşi particulari: hidroxiacizi, acizi ramificaţi, acizi ciclici.

6.2.1.1 Acizii graşi saturaţi

Acizii graşi saturaţi au origine endogenă şi exogenă şi au formula generală

$$C_nH_{2n}O_2$$

sau

$$CH_3\text{-}(CH_2)_n\text{-}COOH$$

unde $n = 2 \div 28$.

In tabela 6.1 sunt prezentaţi principalii acizi graşi saturaţi şi nesaturaţi cu importante roluri biologice pentru organismul animal şi uman. Pentru organismul uman cei mai importanţi sunt acizii graşi care au între $14 \div 24$ atomi de carbon. Acizii inferiori C_4-C_{10} se găsesc din abundenţă în lipidele din laptele rumegătoarelor, importante din punct de vedere alimentar pentru organismul uman..

Sub formă de constituienţi ai lipidelor aceşti acizi graşi se găsesc distribuiţi în diferite ţesuturi animale şi produse naturale de importanţă alimentară. De importanţă majoră pentru organismul uman şi cu cea mai largă răspândire sunt acizii palmitic, stearic, lignoceric.

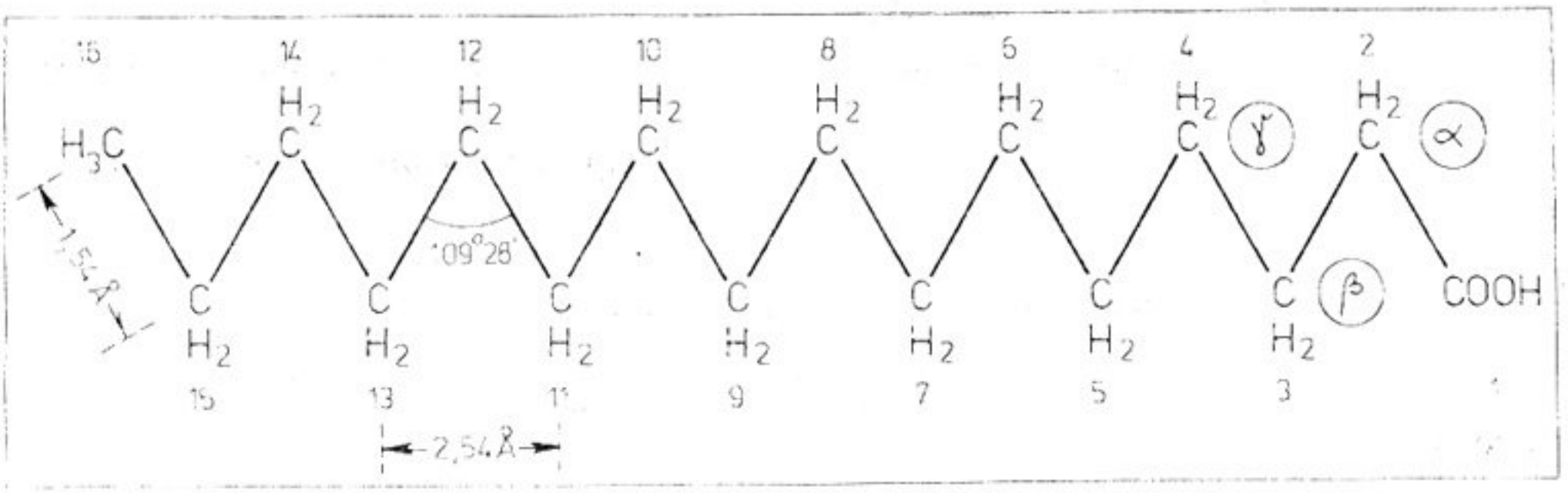


Fig.6.1 **Structura acidului palmitic**

Acizii graşi saturaţi prezintă o catenă de atomi de carbon, care are o configuraţie spaţială stabilă, în formă de zig-zag cu toţi atomii de carbon în acelaşi plan; prezintă totodată un unghi de 109°28' între doi atomi de carbon şi o distanţă de 2,54 Å între trei atomi de carbon.

Procesul de degradare metabolică a acizilor graşi are loc la atomii de carbon C_2, C_3, C_4 faţă de gruparea carboxil (α, β, γ).

6.2.1.2 Acizii graşi nesaturaţi

Acizii graşi nesaturaţi reprezintă cca.75% din totalul acizilor graşi constitu enţi ai lipidelor de origine animală şi vegetală.

Cei mai importanţi din punct de vedere biologic pentru organismul uman sunt acizii graşi cu 18,20 sau 24 atomi de carbon, având una, două, trei sau patru duble legături.

Prezenţa în moleculă a dublelor legături conferă acizilor graşi o **izomerie geometrică** şi deci existenţa a doi izomeri **cis** şi **trans**.

Conformaţia spaţială a izomerilor trans a acizilor graşi prezintă o similitudine cu

aceea a acizilor graşi saturaţi.

Tabela 6.1 **Acizi graşi saturaţi şi nesaturaţi**

Nr. C	Denumire uzuală	Denumire sistematică	Formula
4.	Acid butiric	Acid butanoic	CH_3-$(CH_2)_2$-COOH
6.	Acid caproic	Acid hexanoic	CH_3-$(CH_2)_4$-COOH
8.	Acid caprilic	Acid octanoic	CH_3-$(CH_2)_6$-COOH
10.	Acid capric	Acid decanoic	CH_3-$(CH_2)_8$-COOH
12.	Acid lauric	Acid dodecanoic	CH_3-$(CH_2)_{10}$-COOH
14.	Acid miristic	Acid tetradecanoic	CH_3-$(CH_2)_{12}$-COOH
16.	Acid palmitic	Acid hexadecanoic	CH_3-$(CH_2)_{14}$-COOH
18.	Acid stearic	Acid octadecanoic	CH_3-$(CH_2)_{16}$-COOH
20.	Acid arahidic	Acid icosanoic	CH_3-$(CH_2)_{18}$-COOH
22.	Acid behenic	Acid docosanoic	CH_3-$(CH_2)_{20}$-COOH
24.	Acid lignoceric	Acid tetracosanoic	CH_3-$(CH_2)_{22}$-COOH
16.	Acid palmitoleic	Acid (16:1;Δ9) hexadecenoic	CH_3-$(CH_2)_5$-CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH
18.	Acid oleic	Acid (18:1;Δ9) octadecenoic	CH_3-$(CH_2)_7$-CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH
18.	Acid vaccenic	Acid (18:1;Δ11) octadecenoic	CH_3-$(CH_2)_5$-CH=CH-$(CH_2)_9$-COOH
22.	Acid erucic	Acid (22:1;Δ13) docosenoic	CH_3-$(CH_2)_7$-CH=CH-$(CH_2)_{11}$-COOH
24.	Acid nervonic	Acid (24:1;Δ15) tetracosenoic	CH_3-$(CH_2)_7$-CH=CH-$(CH_2)_{13}$-COOH
18.	Acid linoleic	Acid (18:2;Δ9,12) octadecadienoic	CH_3-$(CH_2)_4$-CH=CH-CH_2-CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH
18.	Acid linolenic	Acid (18:3;Δ9,12,15) octadecatrienoic	CH_3-CH_2-(CH=CH-CH_2)$_3$-$(CH_2)_6$-COOH
20.	Acid arahidonic	Acid (20:4;Δ5,8,11,14) icosatetraenoic	CH_3-$(CH_2)_4$-(CH=CH-CH_2)$_4$-$(CH_2)_2$-COOH
20.	Acid icosapentaenoic	Acid (20:5;Δ5,8,11,14,17) icosapentaenoic	CH_3-CH_2-(CH=CH-CH_2)$_5$-$(CH_2)_2$-COOH

In lipidele naturale predomină izomerii cis; configuraţia cis a unei duble legături determină o contorsionare cu 30° a catenei hidrocarbonate care capătă următorul aspect (vezi fig.6.2).

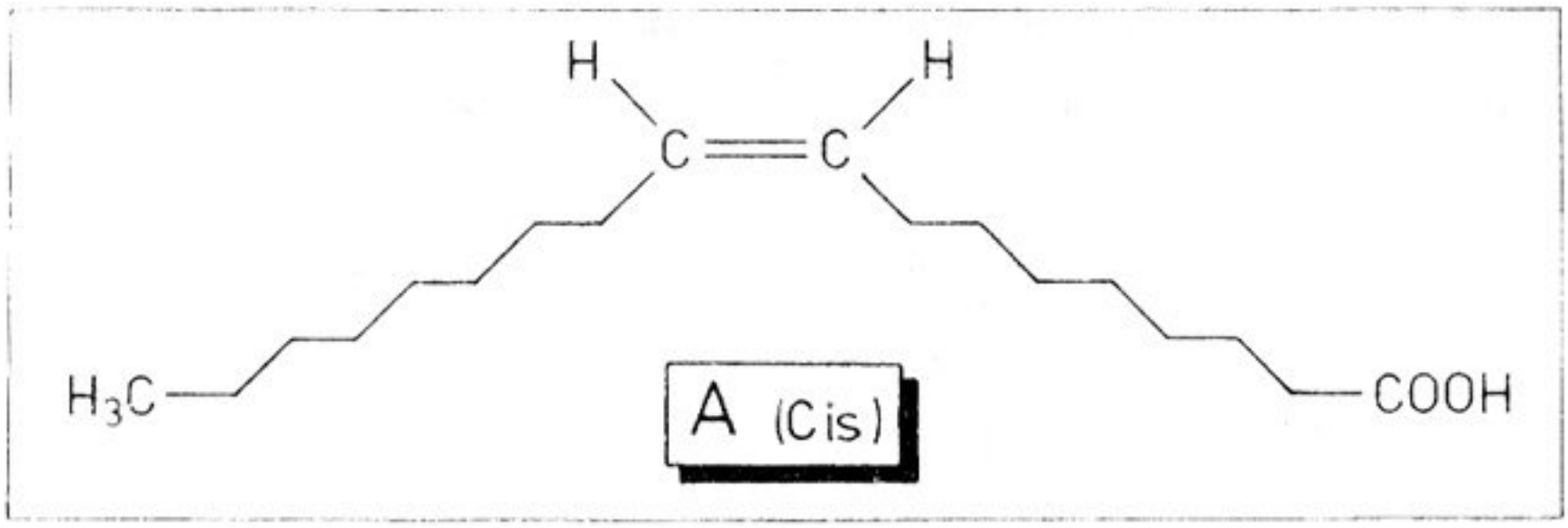


Fig.6.2 **Configuraţia acidului 9-octodecenoic; A-acidul oleic; B-acidul elaidic**

Cel mai cunoscut reprezentant al acizilor graşi nesaturaţi este **acidul oleic** care intră în structura majorităţii lipidelor naturale; izomerul său trans denumit **acidul elaidic** a fost sintetizat în laborator prin acţiunea unor reactivi asupra acidului oleic. Spre deosebire de acidul oleic care este lichid la temperatura ordinară, acidul elaidic în aceleaşi condiţii se prezintă sub formă de cristale.

Configuraţia cis a acizilor graşi nesaturaţi este un element important care explică existenţa lor în membranele celulare; aceeaşi configuraţie determină **fluiditatea lichidelor** în a căror constituţie intră.

In cazul acizilor graşi polinesaturaţi, dublele legături nu sunt conjugate, dar nici izolate, ci întotdeauna separate prinr-o grupare metilen; deci dublele legături se vor găsi din trei în trei atomi de carbon.

Pentru a prezenta structura acizilor graşi nesaturaţi se utilizează sistemul internaţional. După denumirea lor se introduc în paranteză o serie de cifre care indică în ordine:

- numărul de atomi de carbon; numărul dublelor legături;
- precizarea poziţiei dublelor legături, prin litera grecească Δ, urmată de cifra corespunzătoare primului atom de carbon din această legătură.

Acidul arahidonic care are 20 atomi de carbon, patru duble legături situate în poziţiile 5-6; 8-9; 11-12 şi 14-15 se va nota: acid arahidonic (20,4;Δ 5,8,11,14).

Acizii graşi polinesaturaţi: acidul linoleic, acidul linolenic arahidonic (vezi tabela 6.1) sunt consideraţi **acizi graşi esenţiali** pentru organismul uman, fiind indispensabili funcţionării normale a acestuia. Este necesar ca aceşti acizi graşi să fie introduşi prin aport alimentar, deoarece nu pot fi sintetizaţi de organismul animal şi uman, care nu dispune de enzime de dehidrogenare. Acizii linoleic şi linolenic sunt de origine vegetală, iar **acidul arahidonic**

poate fi sintetizat în organismul animal într-o proporţie foarte redusă, având ca precursori acizii linoleic şi linolenic. Acizii graşi esenţiali îndeplinesc următoarele funcţii:

- ◆ - asigură creşterea şi dezvoltarea normală a organismului;
- ◆ - determină o ovulaţie şi o reproducere normală;
- ◆ - previn dermatitele, uscarea pielii, căderea părului;
- ◆ - sunt precursorii prostaglandinelor şi leucotrienelor (icosanoizi);
- ◆ - sunt activatori enzimatici implicaţi în metabolismul lipidic.

Una din principalele cauze ale multiplelor tulburari pe care le provoacă lipsa acizilor graşi esenţiali din organism este legată de faptul că toţi aceştia intră în compoziţia fosfolipidelor care sunt componentele de bază ale membranelor celulare şi ale ţesutului nervos.

Structura acizilor graşi este prezentată mai jos, cu precizarea că în cazul acidului arahidonic cele patru duble legături configuraţia cis conferă catenei forma literei U.

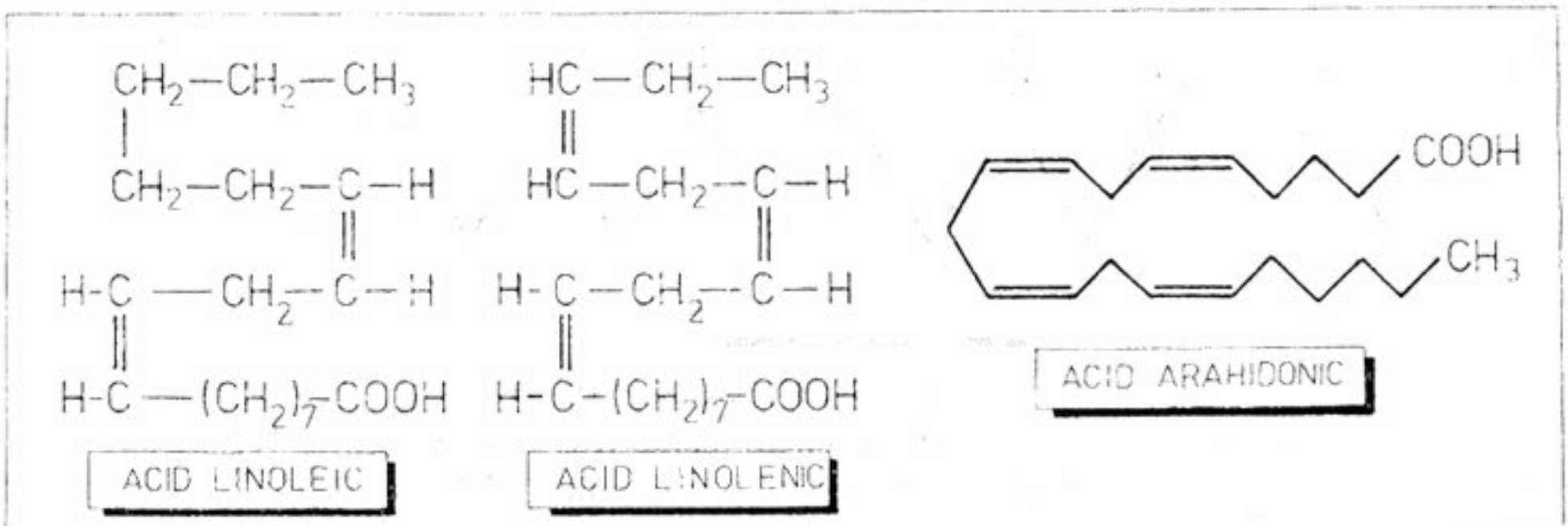
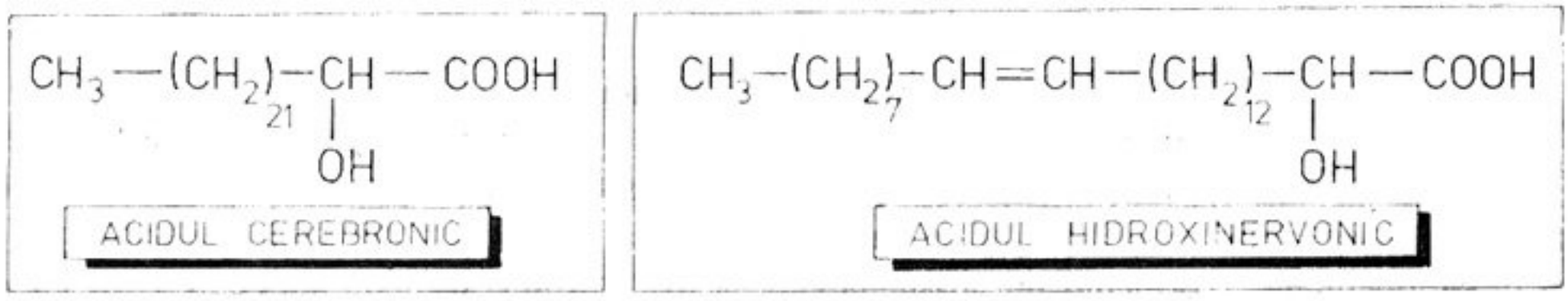


Fig.6.3 **Structura acizilor graşi esenţiali**

6.2.1.3 Acizii graşi particulari

In categoria acizilor graşi particulari se pot include: acizii **hidroxilaţi**, acizii **ramificaţi** şi acizii **ciclici**.

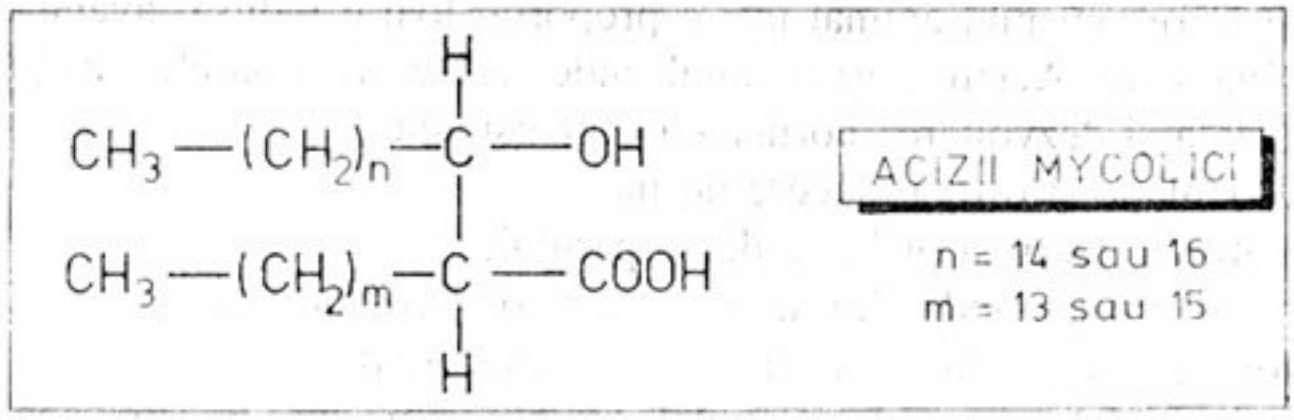
◆ **Acizii hidroxilaţi** sunt rezultatul procesului de α-oxidare a acizilor graşi saturaţi, prin care se obţin α-hidroxi acizi cu importante roluri anabolice, dintre care menţionăm: **acidul cerebronic** (α-hidroxilignoceric) şi **acidul α-hidroxinervonic** care intră în structura lipidelor localizate în sistemul nervos central.



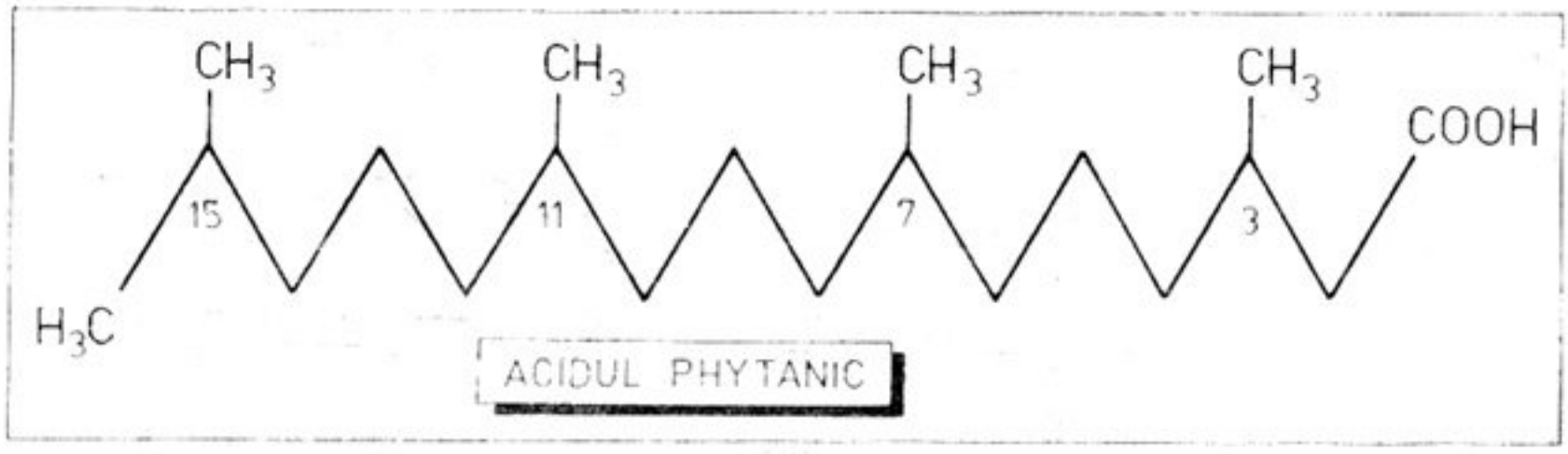
◆ **Acizii graşi ramificaţi** au fost identificaţi mai ales în bacterii; astfel acidul tuberculostearic (acidul 10-metil-stearic) a fost izolat din capsula bacilului **Koch**.

Acizii **mycolici** au proprietăţi tinctoriale caracteristice şi sunt responsabili de coloraţia

Ziehl-Nielson a bacililor acido-rezistenţi.



Acidul phitanic (3,7,11,15-tetrametil-hexadecanoic) are în poziţia beta un metil şi nu se poate degrada prin β-oxidare din care cauză se acumulează, în special în sistemul nervos, determinând tulburările caracteristice din "**boala lui Refsum**", o maladie neurologică transmisibilă genetic.



◆ **Acizii ciclici** au fost extrasi din unele plante tropicale din genul Hydnocarpus şi la care s-au pus în evidenţă proprietăţi terapeutice în tratamentul **leprei** (acidul hidnocarpic, gorilic şi chaulmoogric).

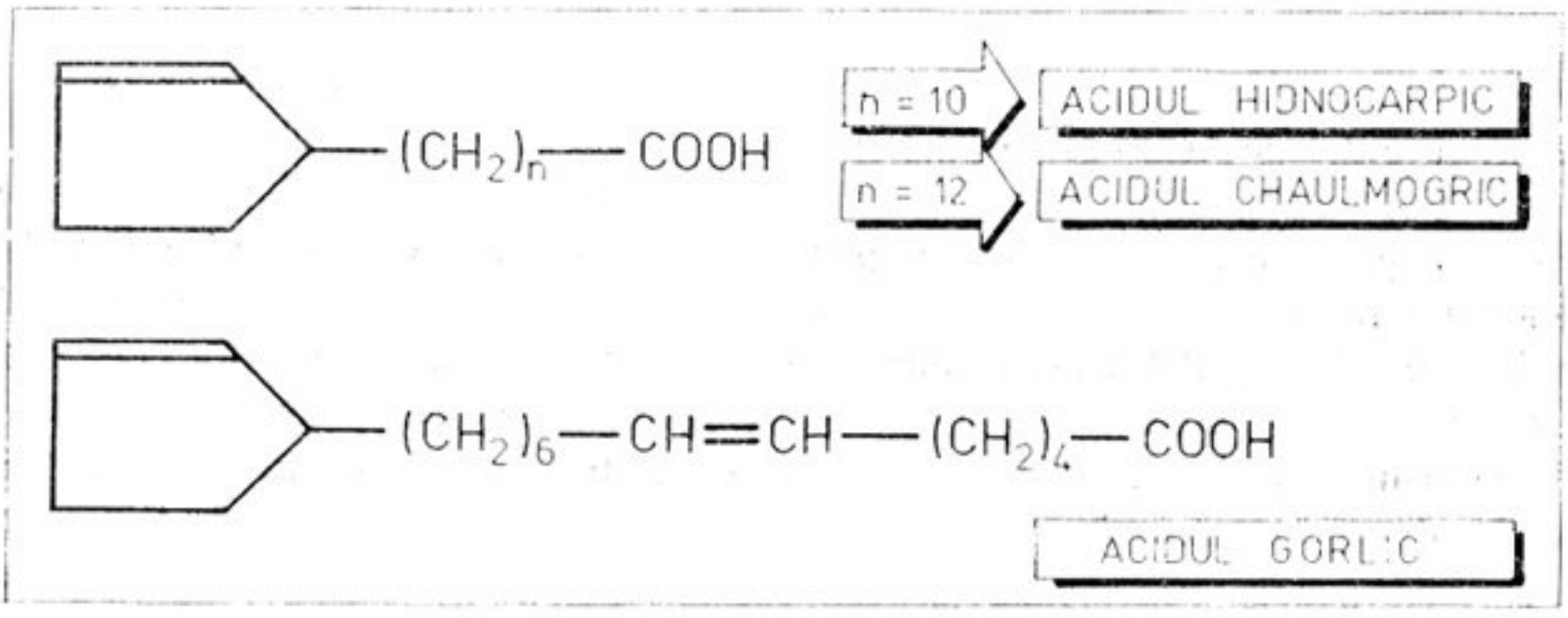
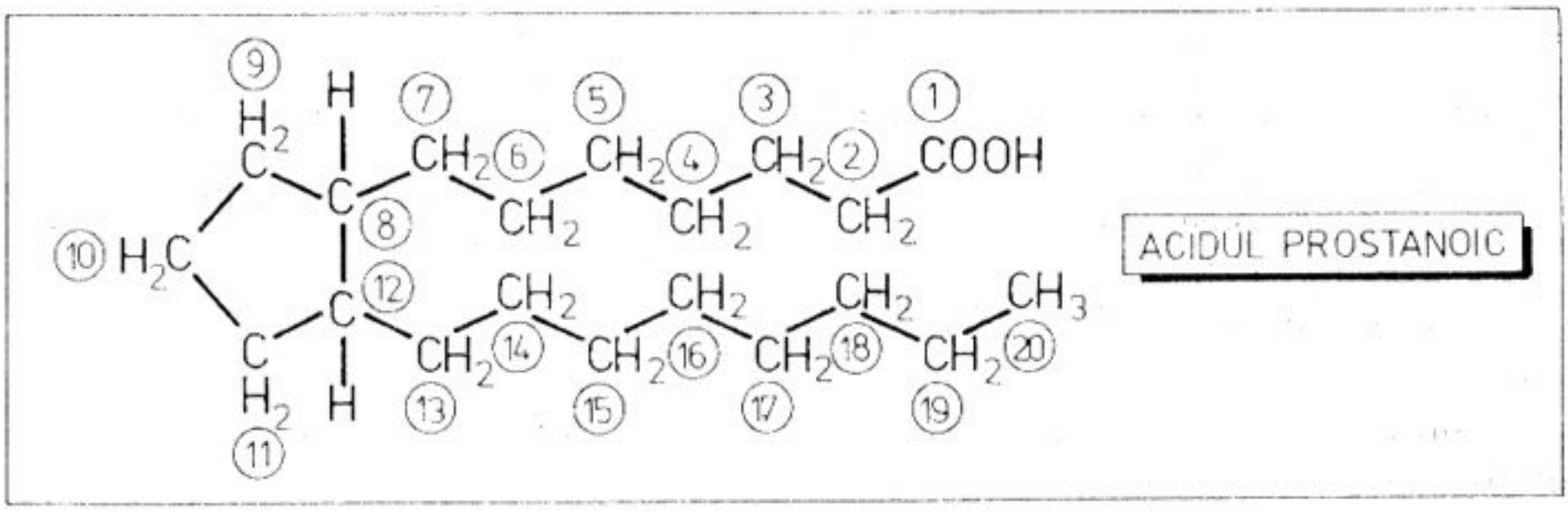


Fig.6.4 **Acizii graşi ciclici**

◆ **Prostaglandinele** (PG) reprezintă un grup de substanţe de natură lipidică,format din acizi graşi ciclici cu 20 atomi de carbon pentru care este caracteristică existenţa unui ciclu ciclopentanic. Termenul de prostaglandine a fost introdus de Von Euler în 1935 care a izolat un grup de substanţe din plasma seminală a prostatei umane şi care exercită acţiune contractilă asupra miometrului. Prostaglandinele sunt sintetizate în toate ţesuturile animale

ca răspuns la diverşi stimuli, având un spectru larg de acţiuni biologice cu implicaţii profunde în fiziopatologia multor procese fundamentale ca: **vasomotricitatea, inflamaţia, tromboza, secreţia gastrică, reproducerea, funcţia renală, transmisia nervoasă etc.** Studii ample au stabilit multiplicitatea prostaglandinelor propriu-zise: au fost descoperite noi clase de compuşi înrudiţi, care derivă de la acizi graşi C_{20} cărora li s-au dat denumirea generică de "icosanoizi" (de la alcanul $C_{20}H_{42}$, icosan).



Grupul icosanoizilor cuprinde:
- prostaglandinele "primare" sau "clasice" (PG);
- endoperoxizii prostaglandinici (PGG_2, PGH_2);
- prostaciclina (PG I_2);
- tromboxanii (TX);
- leucotrienele (LT).

Prostaglandinele derivă teoretic de la un acid ipotetic cu 20 atomi de carbon, denumit **acidul prostanoic**.

Dat fiind amploarea cercetărilor asupra acestor clase de compuşi, le vom rezerva un capitol aparte de studiu aprofundat (6.7).

6.2.1.4 Proprietăţile generale ale acizilor graşi

♦ **Caracterul hidrofob.** Radicalul acidului gras (acil) atribuie întregii molecule un caracter hidrofob. De exemplu, acidul palmitic, $C_{15}H_{32}$-COOH este format dintr-un lanţ hidrocarbonat puternic nepolar cu 15 legături C-C şi 32 legături C-H; datorită unei diferenţe minime de electronegativitate între atomii C-H şi inexistenţei acesteia între atomii C-C, rezultă că în **acidul palmitic** există un total de **47 legături** puternic **nepolare** care anulează practic complet caracterul polar al grupării carboxil (-COOH).

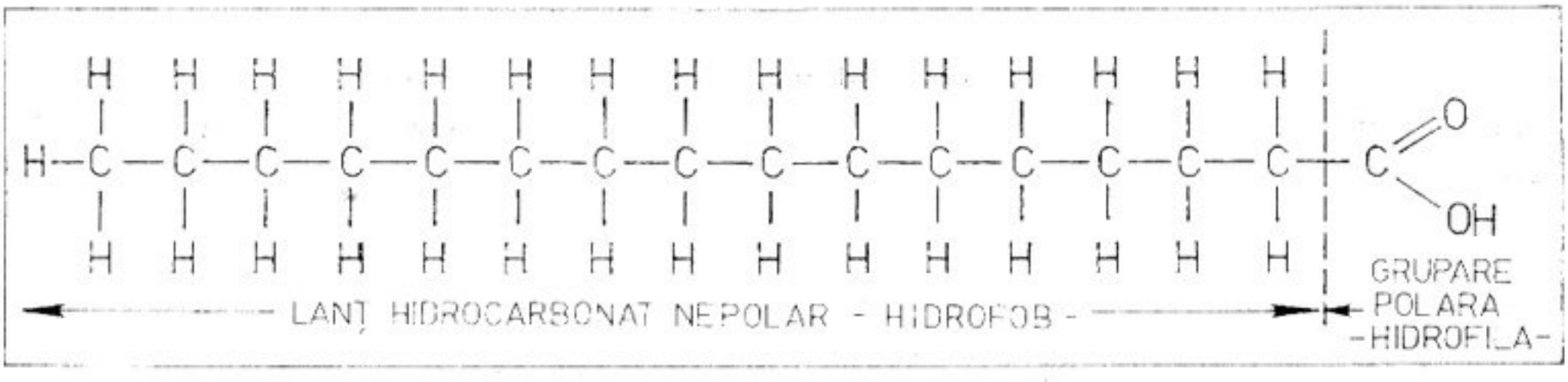


Fig.6.5 **Caracterul hidrofob al acidului palmitic**

Rezultă că lipidele care conţin unul sau mai mulţi acizi graşi în molecula lor sunt substanţe **puternic nepolare** cu **caracter hidrofob**, ceea ce le atribuie proprietatea de a fi **insolubile în apă**.

Această caracteristică fizico-chimică prezintă importanţă pentru participarea lipidelor în ultrastructura şi permeabilitatea biomembranelor.

◆ **Punctul de topire.** La acizii graşi saturaţi, **punctul de topire creşte cu lungimea lanţului** de atomi de carbon (de exemplu punctul de topire al acidului butiric este -8°C, iar cel al acidului stearic este +70°C). Acizii graşi nesaturaţi au **puncte de topire** care **descresc cu gradul de nesaturare** (de exemplu punctul de topire al acidului oleic este +14°C, al acidului linoleic este - 5°C, iar al acidului linolenic este -10°C).

Prezenţa în catena alifatică a uneia sau mai multe duble legături în **poziţia cis** coboară foarte mult punctul de topire,în raport cu acidul gras saturat omolog.

◆ **Izomeria geometrică** este datorată existenţei dublelor legături în structura acizilor graşi nesaturaţi.

Pentru organismul animal şi uman, izomerii **cis** au roluri biologice importante (ex. acidul oleic-cis şi nu acidul elaidic-trans).

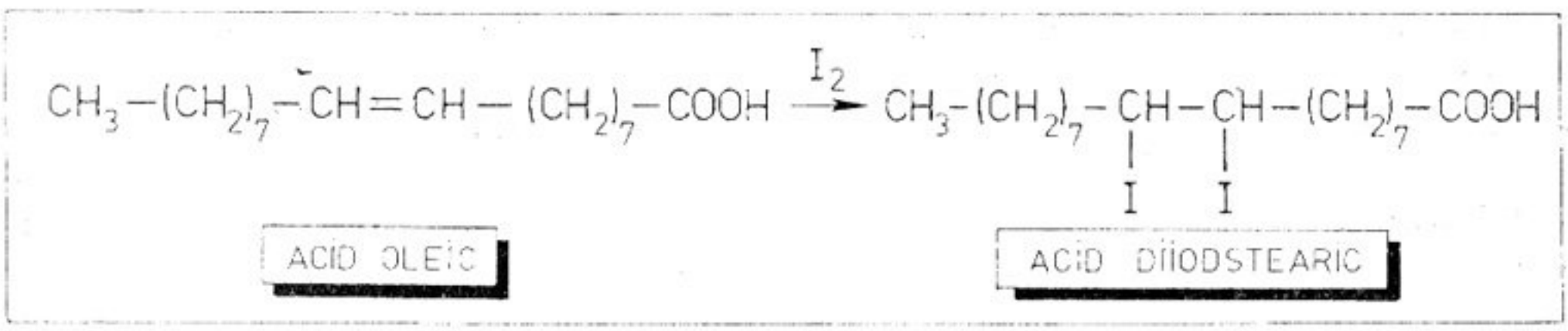
◆ **Formarea de săpunuri** este o altă caracteristică a acizilor graşi. Săpunurile sunt săruri de sodiu sau potasiu ale acizilor graşi, solubile în mediu apos şi au proprietatea de a se comporta ca agenţi de emulsionare. La nivelul intestinului subţire, unde prin hidroliza enzimatică a acilglicerolilor vor rezulta acizi graşi, se vor forma **săpunuri cu bicarbonaţii alcalini** din sucul pancreatic, care vor contribui la emulsionarea gliceridelor nedigerate.

Săpunurile obţinute pe cale industrială spumează în prezenţa apei şi sunt utilizate în scopuri igienice.

◆ **Formarea de esteri.** In numeroase clase de lipide, acizii graşi se află legaţi esteric (gliceride, ceride, steride, fosfolipide).

◆ **Formarea de amide** caracteristică sfingolipidelor.

◆ **Reacţii de adiţie** sunt caracteristice acizilor graşi nesaturaţi. Prin adiţia hidrogenului la dublele legături ale acizilor graşi nesaturaţi se obţin acizi graşi saturaţi corespunzători. Acizii graşi nesaturaţi adiţionează halogenii (Br_2,I_2) la nivelul dublei legături, formâd derivaţii halogenaţi respectivi.



Cantitatea de iod care se poate adiţiona la un acid gras nesaturat constituie un indice analitic de apreciere a gradului de nesaturare a acidului gras, respectiv a numărului de duble legături existente în moleculă.

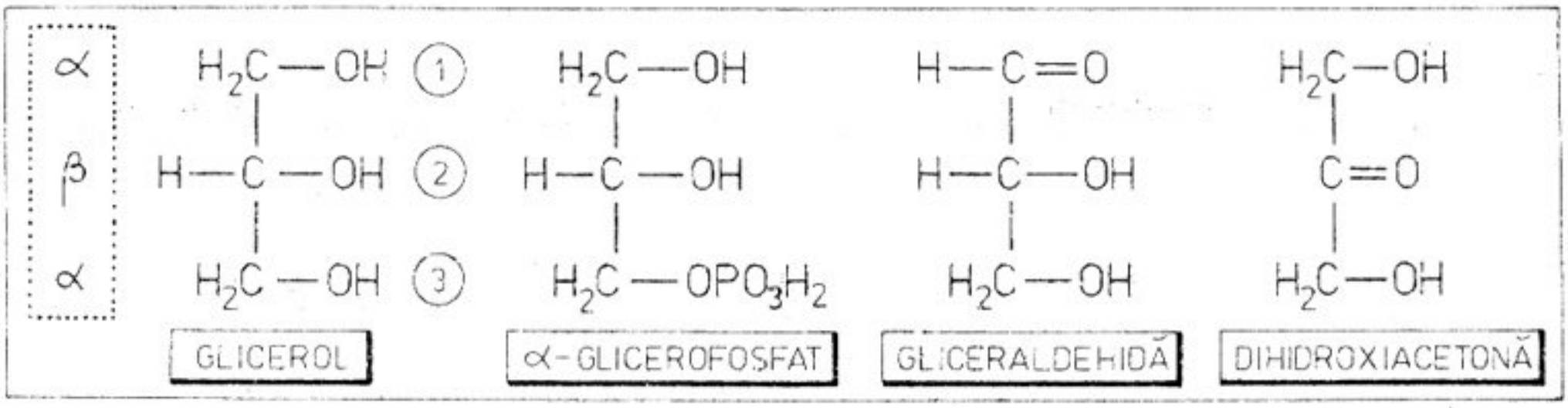
6.2.2 Alcooli constituienţi ai lipidelor

Alcoolii reprezintă a doua **componentă esenţială** din constituţia lipidelor. In funcţie de structura şi natura lor, alcooiii aparţin următoarelor categorii:

1. alcooli alifatici neazotaţi; 2. aminoalcooli (alcooli alifatici azotaţi); 3. alcooli ciclici.

6.2.2.1 Alcooli alifatici neazotaţi

a) -**Glicerolul** (propantriolul), denumit şi glicerină, este componentul cu cea mai largă răspândire în lipidele simple şi complexe.



Atomii de carbon la care se găsesc grupările de alcool primar (**1,3**) se denumesc α, iar atomul de carbon (**2**), care are gruparea alcool secundar, se denumeşte β. Glicerolul are origine exogenă (prin digestia acilglicerolilor alimentari), dar şi o proveniență endogenă deoarece parţial este sintetizat în organism.

Glicerolul formează cu acidul ortofosforic esterul **α-glicerofosfat**, iar prin oxidare menajată se obţin **gliceraldehidă** şi **dihidroxiacetonă**, intermediari importanţi ai întregului metabolism.

b) - **Alcooli aciclici neazotaţi** cu o singură grupare hidroxil, denumiţi şi **alcooli graşi**, prin analogie cu acizii graşi cu care prezintă asemănări de structură.

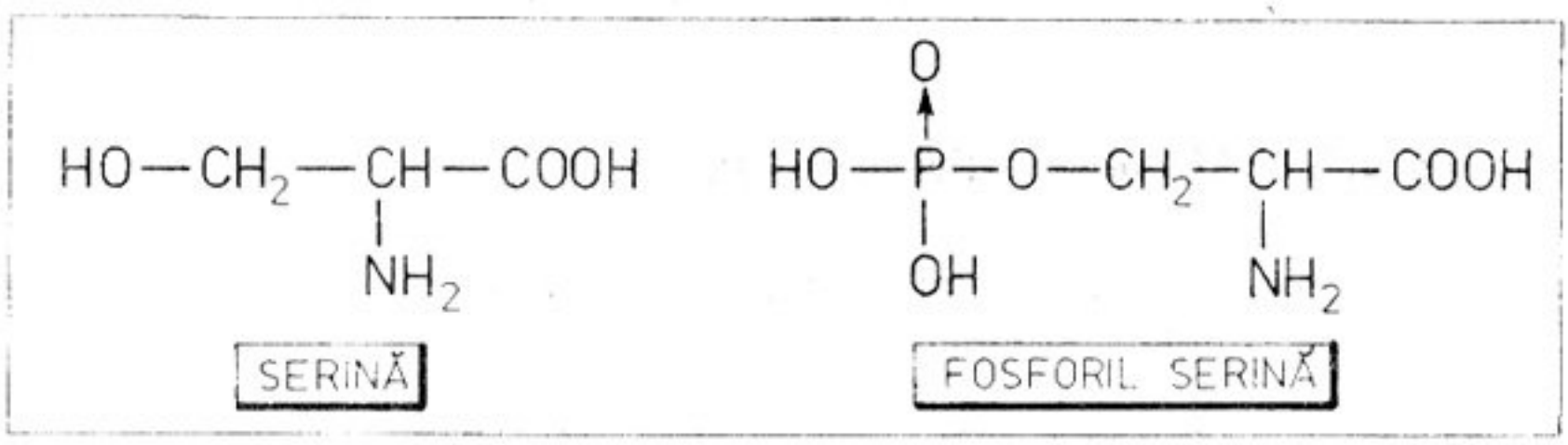
Alcooli graşi care intră în structura ceridelor sunt:

- ◆ - **alcool cetilic** CH_3-$(CH_2)_{14}$-CH_2OH;
- ◆ - **alcoolul stearilic** CH_3-$(CH_2)_{16}$-CH_2OH;
- ◆ - **alcoolul cerilic** CH_3-$(CH_2)_{24}$-CH_2OH;
- ◆ - **alcoolul miricilic** CH_3-$(CH_2)_{28}$-CH_2OH.

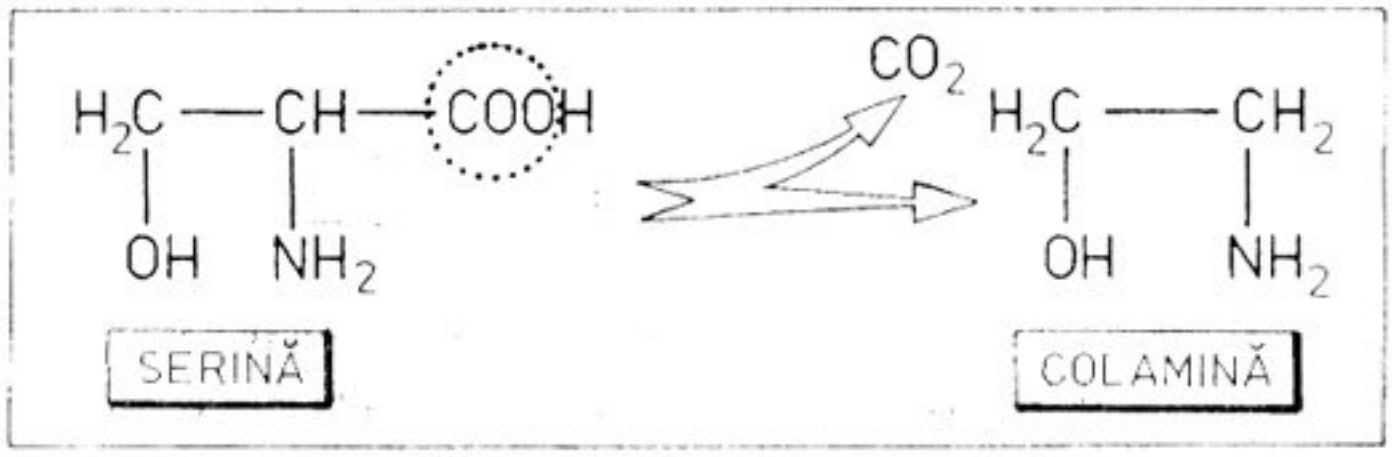
6.2.2.2 Aminoalcooli

Aminoalcoolii sau glicolii azotaţi sunt substanţe care conţin în afară de funcţia alcool (-OH) şi o funcţie amino (-NH_2) ce imprimă substanţei un caracter bazic. Aminoalcoolii din structura lipidelor sunt legaţi de acizii graşi printr-o funcţie **amidică** (sfingozina) sau prin intermediul unui **ester** fosforic (colina şi colamina).

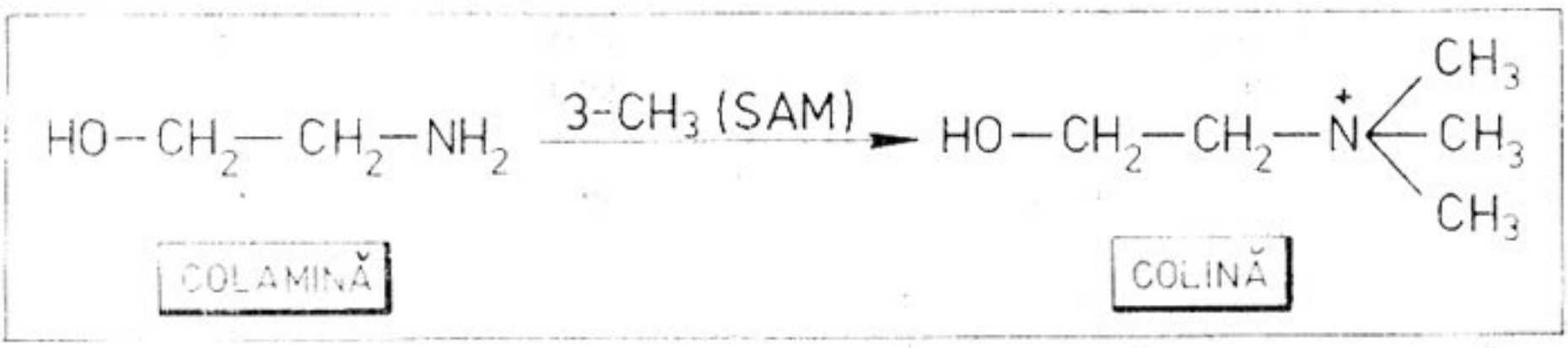
◆ **Serina** este un aminoacid (acid α-amino, β-hidroxipropionic) care, pe lângă grupările funcţionale -NH_2 şi -COOH, conţine şi gruparea alcool primar. Manifestă totalitatea proprietăţilor pe care le conferă prezenţa celor trei funcţiuni. In structura lipidelor serina este legată prin intermediul acidului fosforic (fosforilserină).



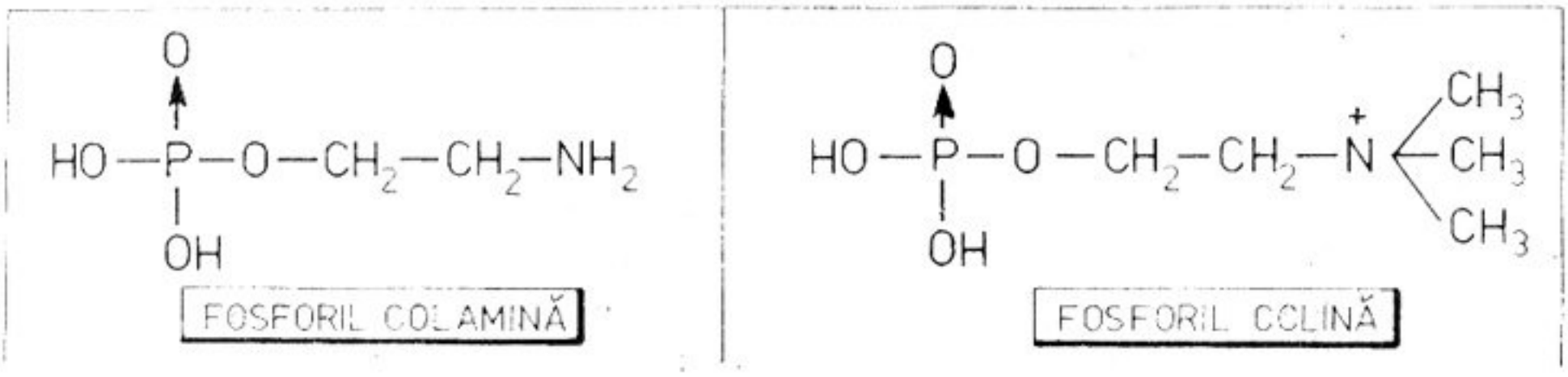
Serina este precursorul colaminei la care se ajunge prin decarboxilare enzimatică.



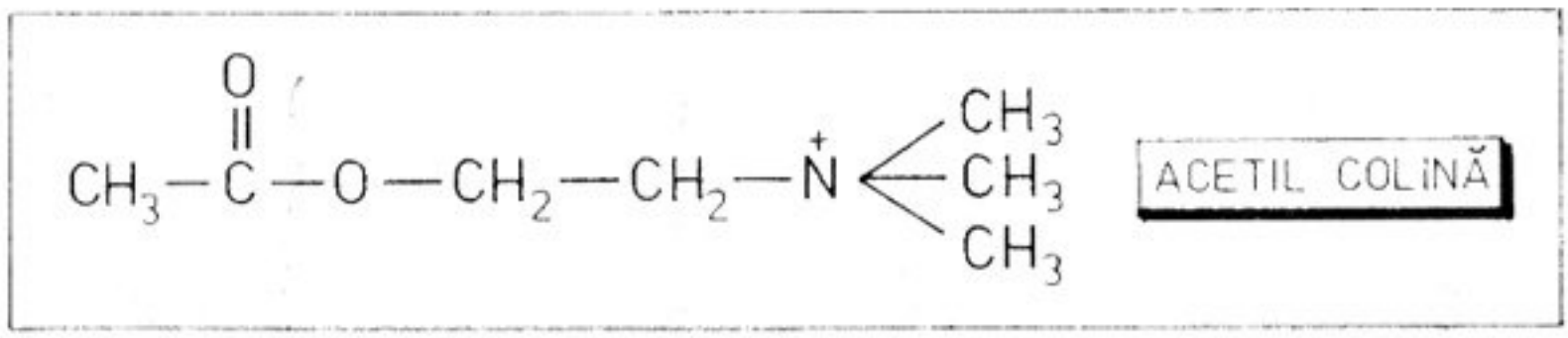
◆ **Colamina** sau etanolamina participă la sinteza lipidelor complexe sub formă de **fosforilcolamină**. Este precursor în sinteza **colinei,** la care se ajunge prin metilare sub acţiunea metilantă a S-Adenozil metioninei (SAM).



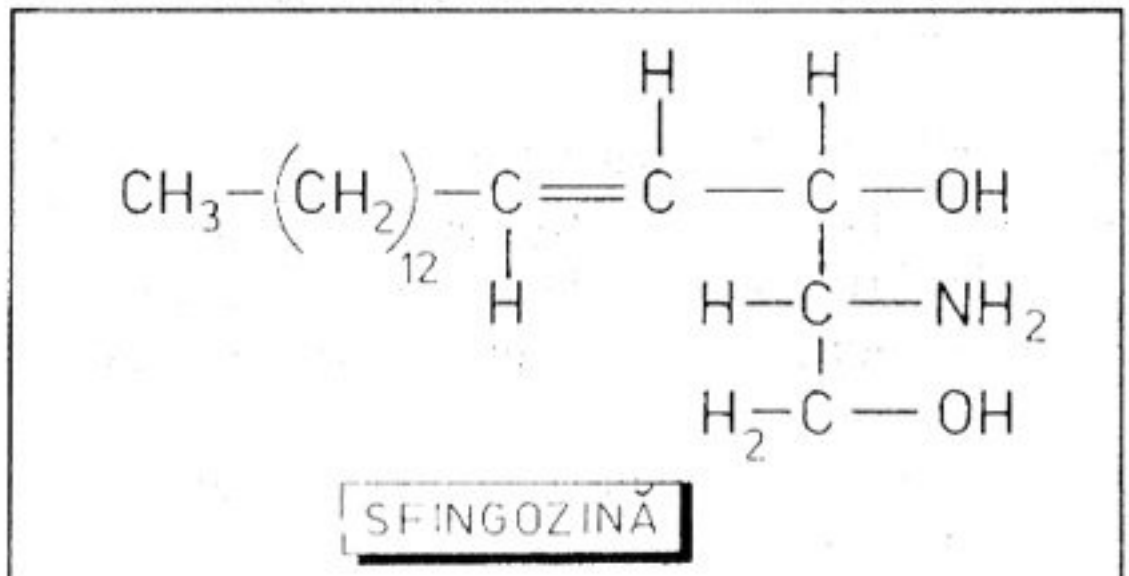
◆ **Colina** sau trimetilhidroxietilamoniu participă la sinteza lipidelor complexe sub formă de **fosforilcolină**.



Esterul acetic al colinei, denumit **acetilcolină**, acţionează ca un mediator chimic în procesul de transmitere a impulsului nervos la joncţiunea neuromusculară; acetilcolina formată la acest nivel este instabilă şi rapid hidrolizată de către enzima denumită **colinesteraza**, prezentă în **nervi** şi **muşchi**, punând în libertate **colina**.



Colina se comportă ca un factor de crestere indispensabil pentru numeroase specii animale şi microbiene fiind considerata ca un factor vitaminic. Unul dintre rolurile biologice ale colinei este şi acela de a fi **factor lipotrop**.

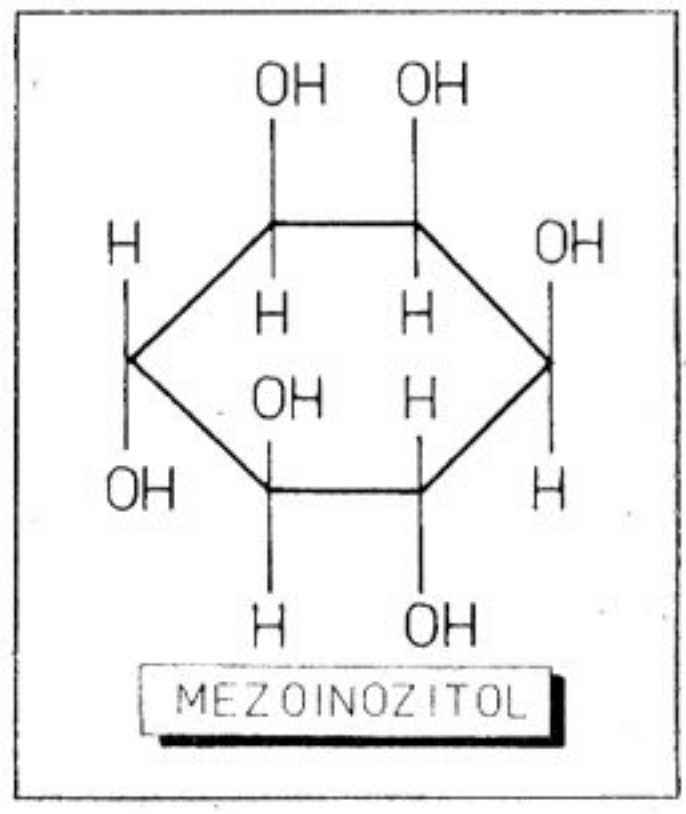


◆ **Sfingozina.** Este un aminoalcool nesaturat cu 18 atomi de carbon care intră în structura sfingolipidelor. Sfingozina are două funcţii: o funcţie **alcool secundar** liberă şi o funcţie **alcool primar**, legată de fosforil colină în **sfingomielină** sau de o oză în cerebrozide. Prin hidrogenare enzimatică se obţine **dihidrosfingozina** care se întâlneşte alături de sfingozină în sfingolipidele ţesutului nervos.

6.2.2.3 Alcooli ciclici

◆ **Inozitolul** este un alcool ciclic cu denumirea ştiinţifică de **hexahidroxiciclohexan**. Inozitolul natural se mai numeşte şi **mezoinozitol**, fiind considerat vitamină de către unii autori. In structura **inozitol fosfatidelor**, din care face parte, inozitolul este legat prin intermediul acidului fosforic. Prezintă o acţiune **lipotropă** care previne acumularea colesterolului în ficat. Activitatea lipotropă a inozitolului mai scăzută decât a colinei, potenţează pregnant activitatea acesteia.

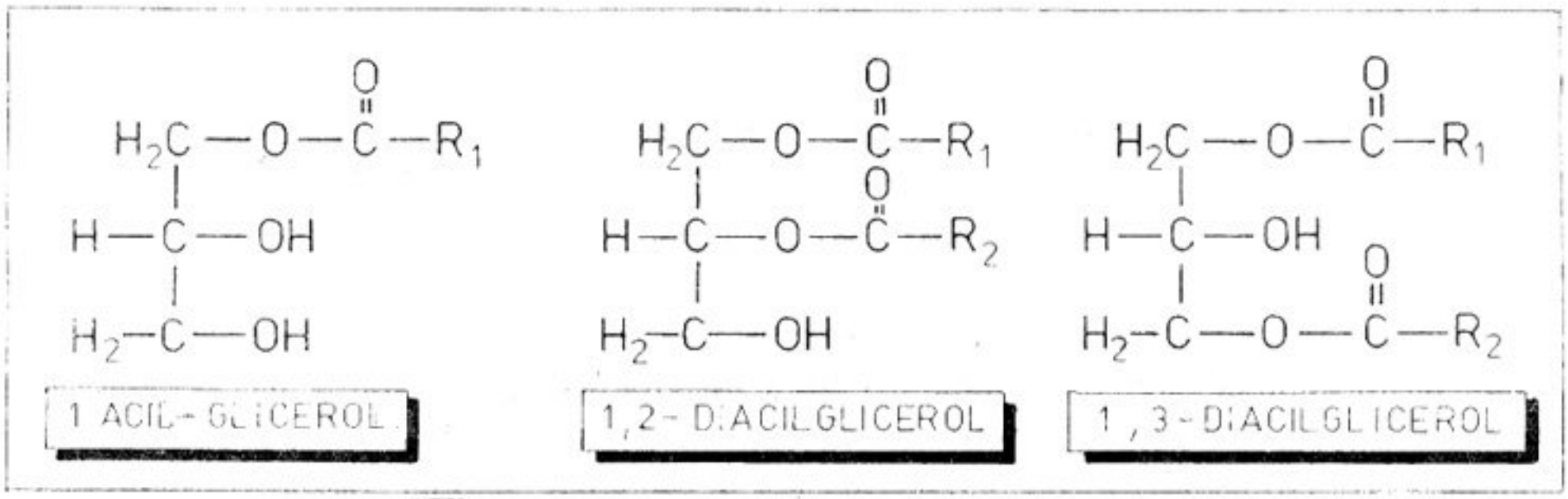
◆ **Sterolii.** Sunt alcooli policiclici care derivă de la o structura ciclică de bază, denumită **steran** (ciclopentanperhidrofenantren). Principalul sterol de importanţă primordială pentru organismul uman este **colesterolul**, căruia îi vom acorda un spaţiu important de studiu (vezi capitolul 6.4).



6.3 Acil glicerolii. Gliceridele

6.3.1 Caracterizare generală. Structură. Transport

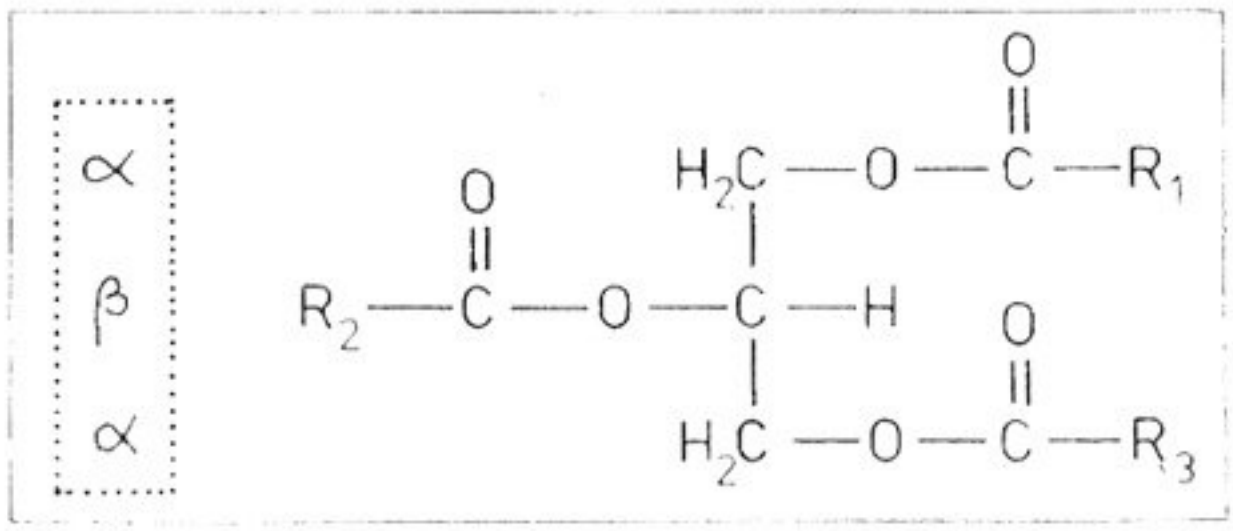
Acil glicerolii sau **gliceridele** sunt **esteri naturali** ai glicerolului cu acizi graşi saturaţi şi nesaturaţi. Acilglicerolii reprezintă lipidele de rezervă din organismul animal; se găsesc



în proporţii variabile în laptele mamiferelor, având o largă răspândire şi în regnul vegetal. După numărul grupărilor alcool din glicerol esterificate cu acizi graşi, acil glicerolii pot fi: monogliceride (**monoacilgliceroli**); digliceride (**diacilgliceroli**); trigliceride (**triacilgliceroli**).

In aceste structuri **R** desemnează radicalii acizilor graşi care esterifică grupările alcool din diferite poziţii ale glicerolului.

Mono şi diacilglicerolii sunt intermediari în cursul sintezei şi degradării triacilglicerolilor şi se găsesc în ţesuturi în cantităţi foarte mici:



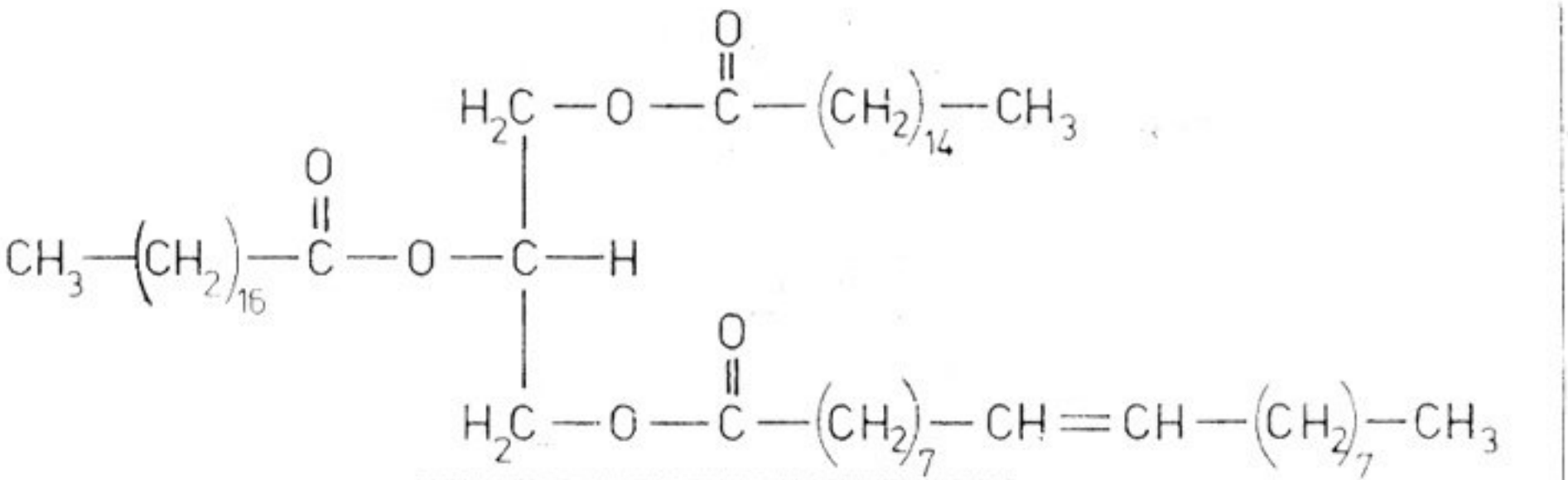
Lipidele de rezervă sunt exclusiv formate din triacilgliceroli, în care radicalii acil (R-CO-) pot fi identici sau diferiţi.

Deoarece sub acţiunea lipazelor sunt scindaţi preferanţial, radicalii acil din poziţia (1 şi 3), deci de la atomii de carbon din poziţia α, demonstrează că proprietăţile grupării alcool din poziţia β nu sunt identice cu acelea ale grupărilor alcool primar din poziţia α. Din această cauză, poziţia în spaţiu a celor trei radicali acil nu este identică, cel din poziţia 2 fiind dispus în **stânga**, similar seriei L a glucidelor.

Triacilglicerolii există într-o mare varietate, diferenţiindu-se prin natura acizilor graşi constituenţi, cât şi prin combinarea lor diferită în interiorul moleculei. Din acest punct de vedere, triacilglicerolii pot fi **omogeni**, când conţin radicali ai aceluiaşi acid gras şi **eterogeni**, când conţin radicali provenind de la acizi graşi diferiţi. Denumirea acestor triacilgliceroli se stabileşte precizând numele acizilor graşi constituienţi, urmaţi de sufixul -**ină**, de exemplu: oleo-palmito-stearină; stearo-dioleină; trioleină etc.

Triacilglicerolii pot fi consideraţi ca **lipide neutre**, deoarece nu conţin în molecula lor o grupare funcţională **ionizabilă**.

Triacilglicerolii din organismul uman au origine exogenă şi endogenă. Lipidele de origine alimentară suferă procesul de digestie în porţiunea proximală din **ileum** şi din **duoden**, sub acţiunea combinată a acizilor biliari şi a lipazei, conducând la glicerol şi acizi graşi.



După absorbţie, triacilglicerolii se sintetizează în celule epiteliale şi se formează **chilomicronii**, care sunt transportaţi prin **vasele limfatice** şi de aici ajung în **sistemul sanguin** şi apoi în diverse ţesuturi şi organe, unde sunt antrenaţi în diferite procese metabolice.

Sinteza endogenă are loc în **ţesutul adipos şi ficat**, după care sunt transportate prin sânge sub forma lipoproteidei cu densitate foarte mică (VLDL).

Rolul biologic principal al triacilglicerolilor este de a reprezenta **depozitul** de acizi graşi, principalii componenţi **energogeneratori**, prin metabolizarea cărora se obţine energia necesară activităţilor vitale.

Depozitarea triacilglicerolilor în ţesutul adipos se poate face practic fără limite, ceea ce nu este posibil pentru o altă substanţă de depozit, cum ar fi glicogenul.

In afară de gliceride de **rezervă** există şi gliceride de **constituţie**, care sunt componente structurale ale celulei legate de anumite formaţiuni (membrane, particule subcelulare).

6.3.2 Proprietăţi generale ale acilglicerolilor

Proprietăţile fizice şi chimice ale acilglicerolilor sunt determinate de **natura** şi **numărul acizilor graşi constituenţi**.

Acilglicerolii naturali reprezintă, de fapt, amestecuri de diferite tipuri de acilgliceroli care, în funcţie de proporţia lor, conferă amestecului respectiv proprietăţi caracteristice speciei sau ţesutului.

◆ **Solubilitatea.** Sunt solubile în solvenţi nepolari şi insolubile în apă. In mediu apos formează **emulsii** (de exemplu laptele care este o emulsie de lipide, stabilizată de prezenţa proteinelor, care au rol de emulgator).

◆ **Starea de agregare** a gliceridelor depinde de compoziţia în acizi graşi şi de raportul dintre acizii graşi saturaţi si nesaturaţi; cele bogate în **acizi saturaţi inferiori sau acizi nesaturaţi sunt lichide**; cele cu un conţinut ridicat în acizi **saturaţi** superiori sunt **solide**.

In tabela 6.2 este prezentată repartiţia procentuală a acizilor graşi saturaţi (S) şi acizilor graşi nesaturaţi (N) din structura triacilglicerolilor naturali (1,2,3 reprezintă cele trei poziţii din structura glicerolului).

Tabela 6.2 **Repartiţia procentuală a acizilor graşi în triacilglicerolii naturali**
(după W.F.Ganong,1977)

1	2	3	%
S	S	S	0,3
S	N	S	4,1
N	S	S	1,6
S	N	N	19,5
N	S	N	12,8
N	N	N	61,8

Din analiza tabelului de mai sus se constată că în triacilglicerolii naturali de natură **vegetală** şi **umană** predomină **acizii graşi nesaturaţi**.

In organismul uman şi animal se respectă o anumită proporţie între acizii graşi saturaţi şi nesaturaţi, care să asigure **fluiditatea** lipidelor "**in vivo**".

◆ **Gradul de nesaturare** al gliceridelor se poate aprecia prin capacitatea acestora de a adiţiona halogeni (I_2 sau Br_2). Cantitatea de halogeni ce se adiţionează la dublele legături ale acizilor graşi este proporţională cu gradul de nesaturare al gliceridei. **Indicele de iod** reprezintă o măsură a numărului de duble legături din gliceride. Valoarea acestui indice furnizează anumite date asupra structurii acizilor graşi care intră în constituţia gliceridelor.

◆ **Reacţia de saponificare.** Prin hidroliză alcalină (KOH sau NaOH) şi la cald gliceridele se scindează cu formare de glicerol şi săpunuri (sărurile acizilor graşi). "In vivo" reacţia de saponificare este catalizată de **lipazele pancreatice**. Prin determinarea cantităţii de hidroxid consumat în aceasta reacţie, se pot obţine indicaţii referitoare la masa moleculară a gliceridelor saponificate.

Indicele de saponificare reprezintă cantitatea de KOH necesară pentru a saponifica 1g de gliceride. In corelaţie cu alţi indici indicele de saponificare permite caracterizarea şi diferenţierea gliceridelor în funcţie de proveniența lor.

◆ **Autooxidarea.** Gliceridele de origine alimentară, în anumite condiţii suferă un proces de degradare chimică, manifestat prin modificarea proprietăţilor organoleptice native. O serie de factori cum ar fi: lumina, căldura, umezeala, contaminarea bacteriană, contribuie la apariţia şi accelerarea procesului care poartă denumirea de **râncezire**.

Râncezirea constă în degradarea gliceridelor pe cale hidrolitică sau oxidativă cu formare de acizi carboxilici liberi (R-COOH), peroxizi (R-O-O-R_1), aldehide (R-CHO), cetone (R-CO-R) etc. Acizii liberi şi aldehidele libere reprezintă principalele substanţe care rezultă în procesul de **râncezire**.

Acizii apar în urma hidrolizei lente a gliceridelor sub acţiunea lipazelor bacteriene contaminate. Acizii nesaturaţi liberi din gliceride, sub acţiunea oxigenului din aer şi a luminii, se oxidează la nivelul dublelor legături cu formare de **peroxizi**, compuşi puţin stabili care se descompun cu formare de aldehide (fig.6.6).

Mecanismul autooxidării se poate explica şi prin formarea radicalilor liberi în **poziţia alilică** (imediat învecinată unei duble legături) care este cea mai activă; aceasta determină desfăşurarea unei reacţii în lanţ în care rezultă produşi de oxidare, polimerizare, scindarea

lanţurilor hidrocarbonate.

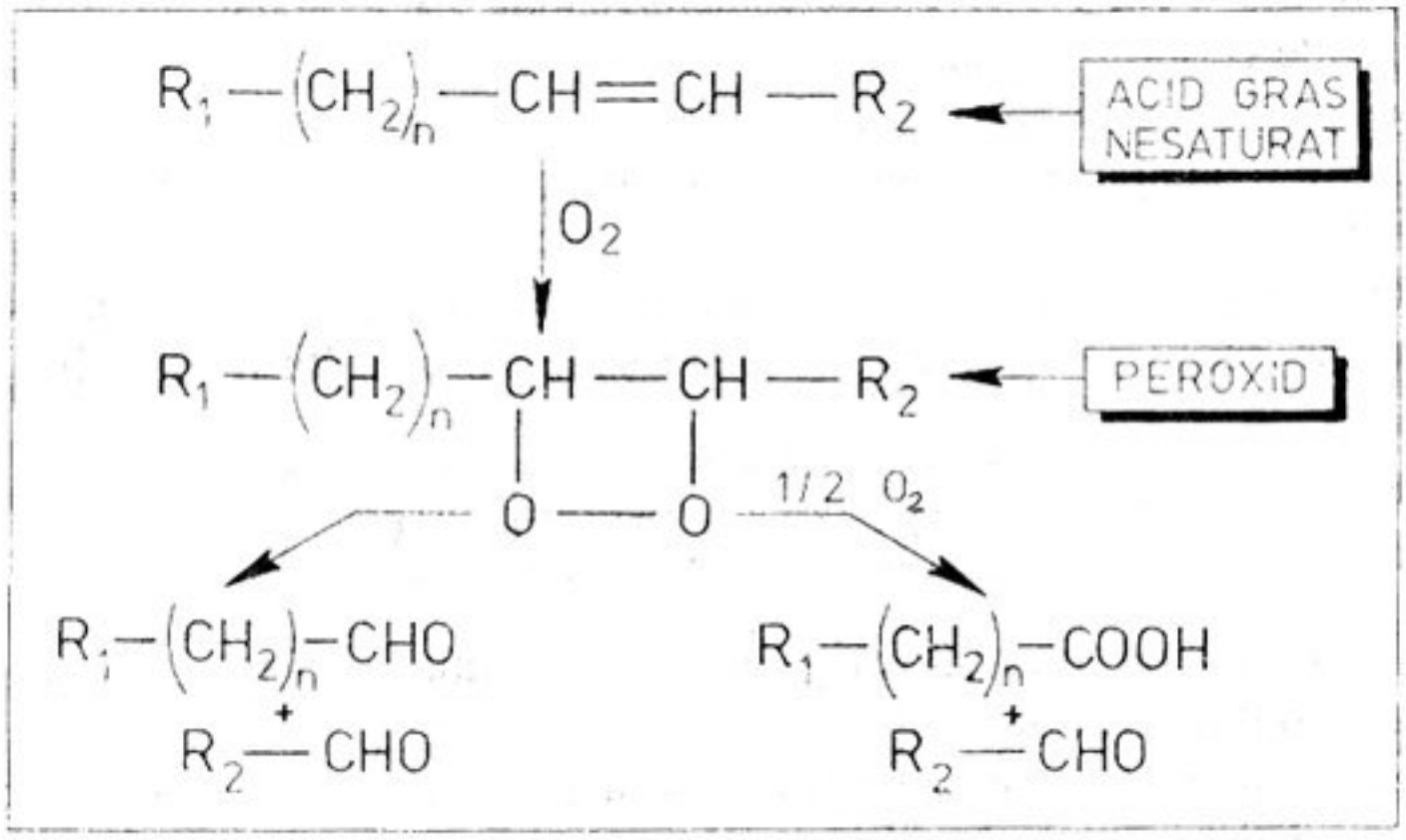


Fig.6.6 **Un posibil mecanism al râncezirii**

Pentru aprecierea gradului de prospeţime al lipidelor se determină anumiţi indici:

Indice de aciditate - numărul de miligrame KOH necesar pentru neutralizarea acizilor graşi liberi dintr-un gram de produs (grăsimi, uleiuri, răşini, balsamuri).

Indice de peroxid - numărul de miliechivalenţi de oxigen activ din 1000 g grăsime, respectiv numărul de ml de $Na_2S_2O_3$ (tiosulfat de sodiu) 0,001 N oxidaţi din iodul eliberat din HI prin acţiunea peroxizilor din 1g produs.

In organism peroxidarea lipidelor nesaturate este întârziată sau blocată prin acţiunea unor factori **antioxidanţi** naturali, captatori de radicali liberi cum ar fi **vitaminele E**.

6.4 Ceridele

Ceridele fac parte din clasa lipidelor simple, fiind esteri ai acizilor graşi superiori cu alcooli monohidroxilici superiori.

Structura generală a unei ceride este:

$$R_1\text{-}CO\text{-}O\text{-}R_2$$

Ambii componenţi structurali - acidul gras şi alcoolul - care se esterifică sunt constituiţi din catene lungi, de multe ori acidul gras şi alcoolul, având acelaşi număr de atomi de carbon. De exemplu, cerida rezultată din esterificarea **acidului palmitic** cu **alcoolul cetilic** - denumită palmitat de cetil - are următoarea structură:

$$CH_3\text{-}(CH_2)_{14}\text{-}CO\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}(CH_2)_{14}\text{-}CH_3$$

Principalii acizi din compoziţia ceridelor sunt:

Acid cerotic $(CH_3\text{-}CH_2)_{24}\text{-}COOH$; **Acid melisic** $CH_3\text{-}(CH_2)_{28}\text{-}COOH$;
Acid laceroic $CH_3\text{-}(CH_2)_{32}\text{-}COOH$.

Ceridele sunt insolubile în apă, greu saponificabile, nu râncezesc deoarece nu conţin acizi graşi nesaturaţi. Datorită acestor proprietăţi rolul important al ceridelor este de a servi ca **strat de protecţie** a suprafeţelor organismelor animale şi vegetale.

Exemple de ceride importante:

♦ **Lanolina** este cea mai importantă ceridă de origine animală extrasă din grăsimea de pe lâna ovinelor. Are o compoziţie eterogenă şi complexă fiind formată din esteri diverşi. Este utilizată în cosmetică.

♦ **Ceara de albine** (cera flava) este un amestec format din esteri ai acizilor graşi, alcoolilor cu catene cuprinse între C_{24}-C_{34} în care predominant este **palmitatul de miricil**.

$$CH_3\text{-}(CH_2)_{14}\text{-}CO\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}(CH_2)_{28}\text{-}CH_3$$

♦ **Walratul şi uleiul de spermaceti** - extrase din cutia craniană a caşalotului în care predominant este **palmitatul de cetil**.

Ceridele sunt utilizate în industrie pentru fabricarea de hârtie carbon, materiale electroizolatoare, lacuri, cosmetice şi pentru restaurarea tablourilor.In sens mai larg grupa ceridelor cuprinde: caroteno-ceride, etolide, glicolide, alcoxigliceride.

Etolidele sunt esteri ai unor acizi alcool cum ar fi acidul sabinic

$$HO\text{-}CH_2\text{-}(CH_2)_{10}\text{-}COOH$$

Glicolidele sunt esteri ai acizilor graşi cu polialcooli (oze sau ozide).

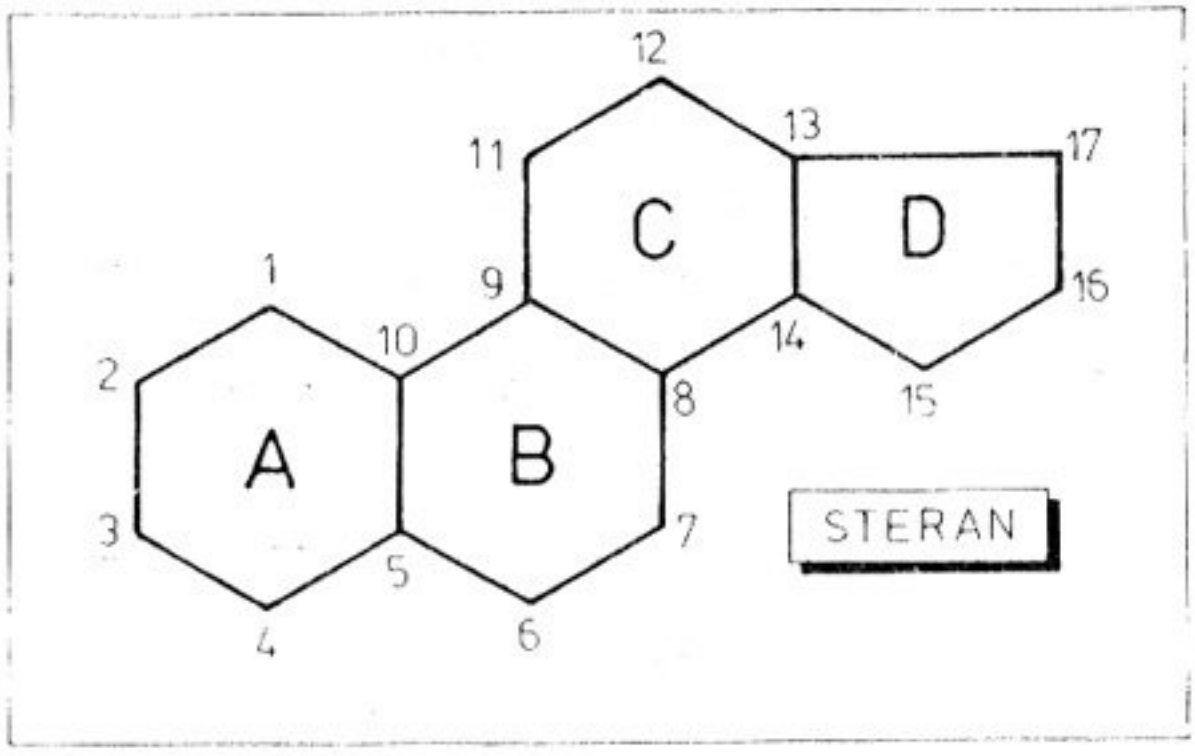
Alcoxigliceridele sunt esteri ai alcoolilor graşi cu glicerolul sau cu mono şi digliceride.

Carotenoceridele sunt considerate provitaminele şi vitaminele A.

6.5 Steride

6.5.1 Generalităţi. Clasificare. Reprezentanţi

Steridele sunt lipide simple constituite din acizi graşi esterificaţi cu alcooli policiclici de tipul **sterolilor**, răspândite în plante, animale, microorganisme. Derivă de la o hidrocarbură ipotetică denumită **steran (ciclopentanoperhidrofenantren)**, care cuprinde trei nuclee ciclohexanice şi unul ciclopentanic condensate.



Această structură se întâlneşte într-o serie de compuşi biologici importanţi cum ar fi: steroli; acizi biliari; vitamine D; hormoni steroizi; **tonice cardiace** (digitoxigenina, strofantidina, ouabagenina), **alcaloizi**, saponine.

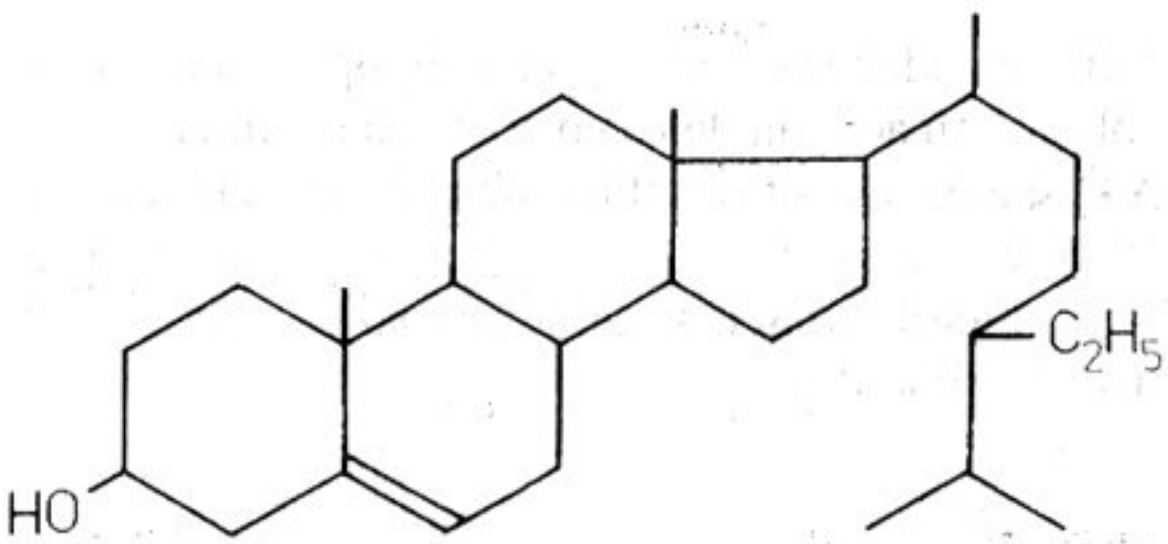
După orientarea relativă a atomilor de hidrogen legaţi de atomii de carbon de la joncţiunea ciclurilor (C_5, C_{10}, C_8, C_9, C_{13} şi C_{14}) steranul poate exista teoretic sub forma a **64** stereoizomeri (2^6).

Există mai multe tipuri de steride care diferă între ele prin:

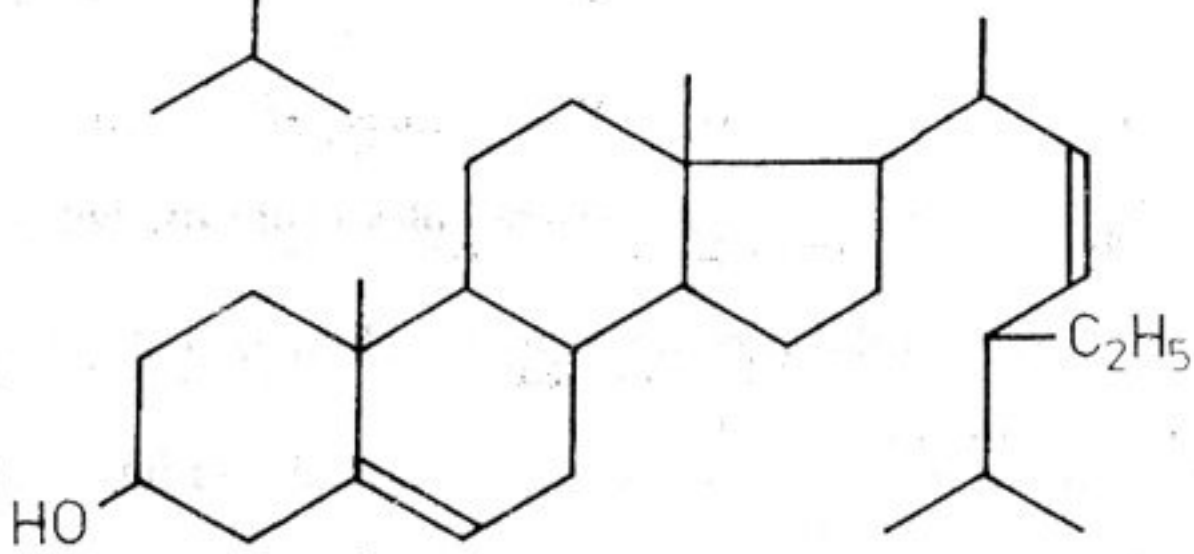
a) - gradul de nesaturare al sterolului; b) - natura substituenţilor din policiclu; c) - natura catenei laterale din C_{17}; d) - natura acidului gras constituent.

Sterolii se caracterizează printr-o mare **diversitate structurală** determinată şi de fenomenul de izomerie din poziţiile C_3, C_5, C_{17}. In funcţie de provenienţa lor sterolii se clasifică:

- ♦ - **zoosteroli** (origine animală): **colesterol, 7-dehidrocolesterol;**
- ♦ - **fitosteroli** (origine vegetală): **sitosterol, stigmasterol;**
- ♦ - **micosteroli** (din mucegaiuri, ciuperci): **ergosterol.**



SITOSTEROL



STIGMASTEROL

ERGOSTEROL

Fig.6.7 **Principalii steroli derivaţi ai unor provitamine D**

6.5.2 Colesterolul

6.5.2.1 Surse de colesterol. Sinteză. Esterificare

Colesterolul este cel mai important sterol din regnul animal localizat - sub formă **liberă** sau **esterificată** - în toate celulele.

Colesterolul are origine **exogenă** alimentară, dar predominant **endogenă**. Zilnic sunt introduse în organism cca.300-700 mg colesterol de origine alimentară vegetală, din care sunt absorbite la nivelul intestinului în medie numai 30-50%.

Absorbţia sa necesită, ca de altfel şi pentru toate celelalte componente lipidice, prezenţa în intestinul subţire (**partea mediană şi terminală a ileumului**) a acizilor biliari primari - acidul colic şi chenodezoxicolic.

Colesterolul tisular provine din biosinteza, care se desfăşoară foarte activ la nivelul **ficatului** şi **glandelor suprarenale**, iar în proporţii mai reduse în toate ţesuturile, procesul fiind reglat la nivelul enzimei 3-hidroxi-3- metil-glutaril-CoA reductază (HMG-CoA-reductază).

Imediat după sinteza sa colesterolul endogen este integrat în lipoproteide - VLDL şi HDL - majoritatea fiind esterificat în plasmă cu acid linoleic sub acţiunea enzimei, - Lecitin - Colesterol - Acil - Transferază (**LCAT**) sau în celelalte ţesuturi sub acţiunea enzimei - Acil - Colesterol - Acil - Transferază (**ACAT**), mai ales în ficat, intestin, corticosuprarenală. De menţionat, că **ţesutul nervos** şi, mai ales **calculii biliari**, se caracterizează printr-un conţinut ridicat de colesterol, de unde a fost izolat prima dată.

6.5.2.2 Structura colesterolului. Izomerie

Colesterolul prezintă următoarele detalii structurale:

◆ - este un derivat al **steranului** conţinând **trei hexacicluri** (A,B,C) şi **un pentaciclu** (D);

◆ - conţine 27 atomi de carbon şi are formula moleculară $C_{27}H_{45}OH$;

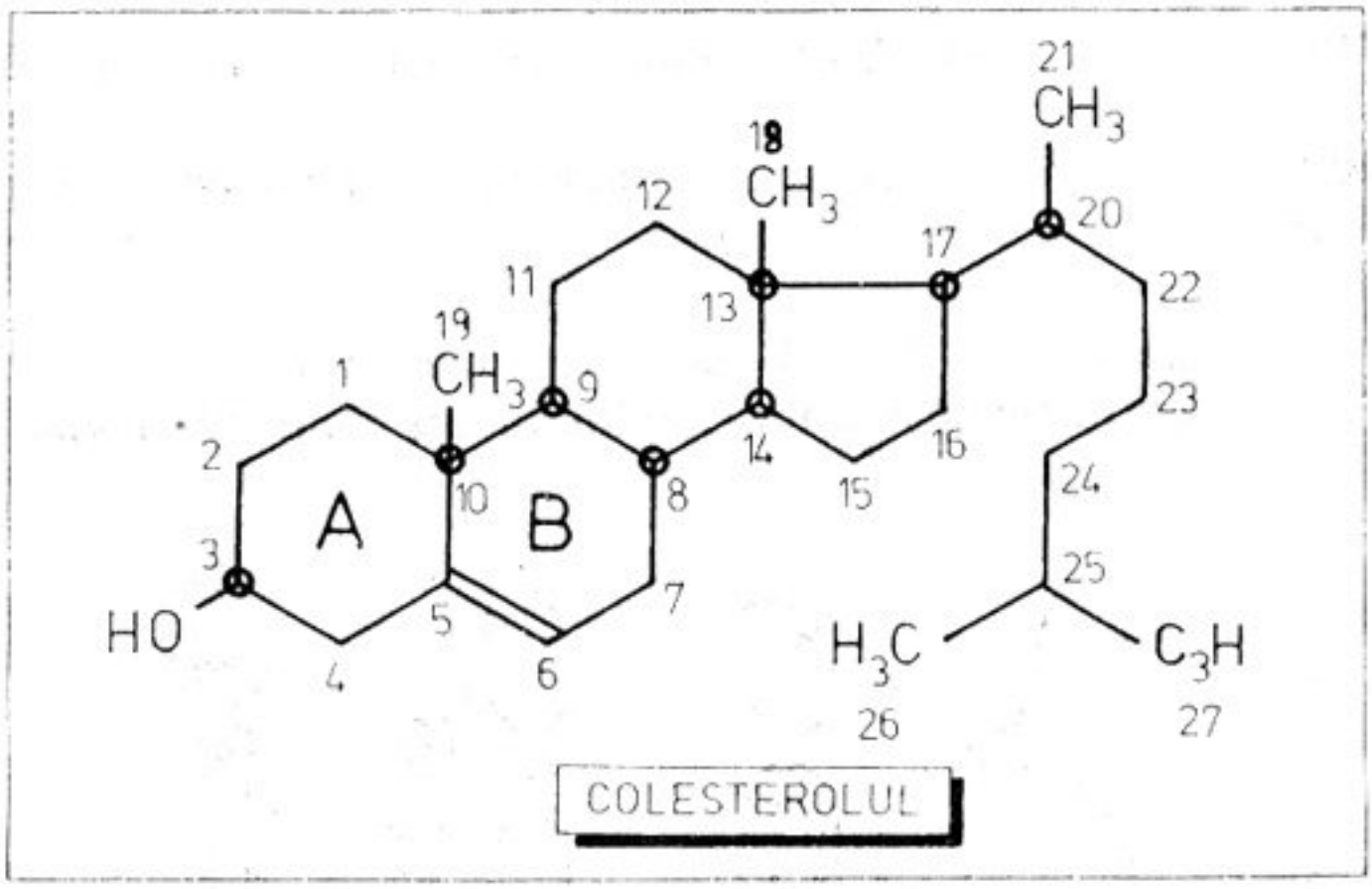
◆ - are o grupare alcool (-OH) în poziţia C_3 a ciclului A, fiind deci un **alcool ciclic**;

◆ - prezintă o dublă legătură în ciclul B (poziţia 5-6), fiind deci nesaturat;

◆ - în poziţia C_{17} este amplasată o **catenă laterală saturată** cu 8 atomi de carbon şi o grupare **izopropil** la extremitate;

◆ - în poziţiile C_{10} şi C_{13} situate între ciclurile A-B şi C-D se află doi radicali metil ($-CH_3$) denumiţi **"metili angulari"**;

◆ - prezintă **8** atomi de **carbon asimetrici** ceea ce determină existenţa a **256** stereoizomeri ($N=2^8$);



COLESTEROLUL

♦ - prin reducerea dublei legături de la C_5 din molecula colesterolului, apare cel de-al 9-lea carbon asimetric la C_5 şi deci numărul izomerilor va fi $N=2^9=512$;

♦ - în realitate la sterolii naturali s-au constatat până în prezent numai izomeri ce provin din modificările configuraţiei la atomii de carbon (**C_3, C_5 şi C_{17}**).

Tipurile de izomerie ale colesterolului sunt:

a) - **Izomeria C_3** - Prin introducerea unui -OH la C_3 rezultă sterolii propriu-zişi şi se creează un carbon asimetric. Izomeria de la C_3 se consideră tot în raport cu metilul de la C_{10}, gruparea -OH putând ocupa două poziţii diferite:

- una deasupra planului moleculei şi notată cu **linie plină** (———), denumită **cis** sau β;
- alta în partea posterioară a planului moleculei notată cu **linie punctată** (- - - - -), denumită **trans** sau **epi**.

b) - **Izomeria C_5.** Prin apariţia unui atom de H la C_5 acesta poate avea două poziţii diferite în raport cu metilul de la poziţia C_{10}.

- una deasupra planului moleculei, denumită **cis** şi notată cu **linie plină** (———);
- alta sub planul moleculei, denumită **trans** şi notată cu **linie punctată** (- - - - -).

c) - **Izomeria C_{17}.** După poziţiile radicalilor fixaţi la C_{17}, în raport cu metilul angular din C_{10} se deosebesc două serii de izomeri:

- de aceeaşi parte cu C_{10} (———), β;
- de partea opusă cu C_{10} (- - - - -), α.

Izomerul β C_{17} corespunde compuşilor **naturali**, iar izomerul α C_{17} corespunde produşilor de **sinteză**.

Grefarea unei **grupări funcţionale** în nucleul steranic în poziţiile **α sau β** antrenează **diferenţe notabile** în ceea ce priveşte **reactivitatea** şi **acţiunile biologice**.

6.5.2.3 Rolurile biologice ale colesterolului

Colesterolul este o substanţă solidă, albă, insolubilă în apă, având un caracter

hidrofob pronunţat şi roluri biologice remarcabile:

◆ - intră în constituţia steridelor sub formă de esteri cu acizii superiori;

◆ - este un component esenţial al tuturor structurilor **membranelor celulare** şi participă implicit la permeabilitatea acestora;

◆ - catena alifatică şi nucleul rigid al steranului intercalaţi între moleculele fosfolipidelor din stratele dublu lipidice reglează **fluiditatea biomembranelor** (vezi fig.6.8);

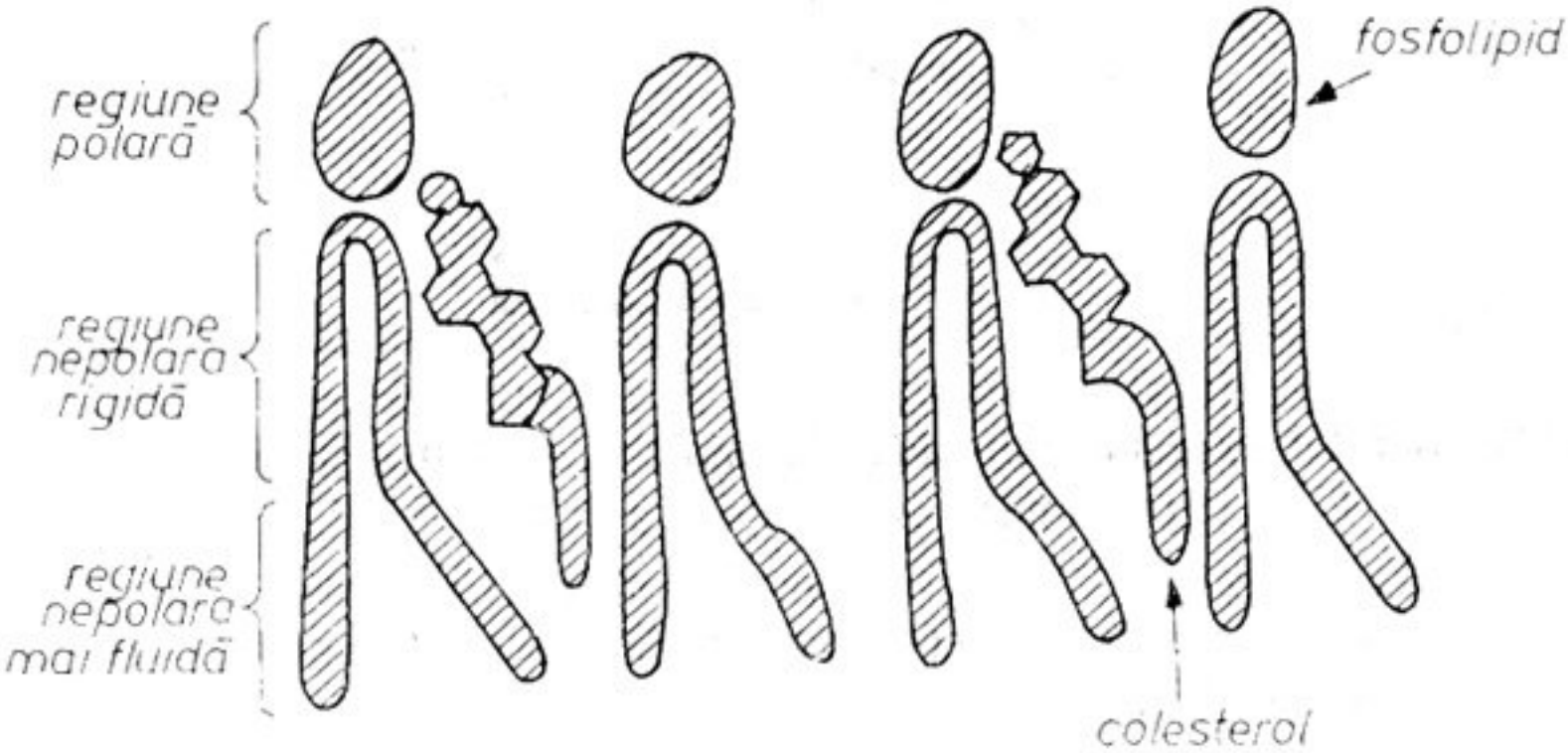


Fig.6.8 **Colesterolul reglează fluiditatea biomembranelor**

◆ - este precursorul metabolic al **hormonilor** steroizi **corticosuprarenali** şi **sexuali**;

◆ - sub formă de **7-dehidrocolesterol** este provitamina D_3, deoarece prin iradiere cu lumină UV se transformă în această vitamină;

◆ - prin saturarea dublei legături C_5-C_6 şi scindarea oxidativă a catenei la C_{24}, se obţine **acidul colanic** care este precursorul acizilor biliari;

◆ - are rol **antitoxic** şi **antihemolitic** neutralizând efectul unor toxine sau inhibând acţiunea hemolitică a unor substanţe pătrunse sau formate în organism (saponine, hemolizine şi lizolecitine);

◆ - participă la procesele de **imunizare** ale organismului, absorbind agenţii patogeni pe particulele coloidale pe care le formează cu apa.

6.5.3 Acizii biliari

6.5.3.1 Acizii biliari primari şi secundari

Cea mai mare parte din colesterolul hepatic (70-80%) este transformat în **acid colanic**, prin saturarea dublei legături C_5-C_6 concomitent cu scindarea oxidativă la C_{24}.

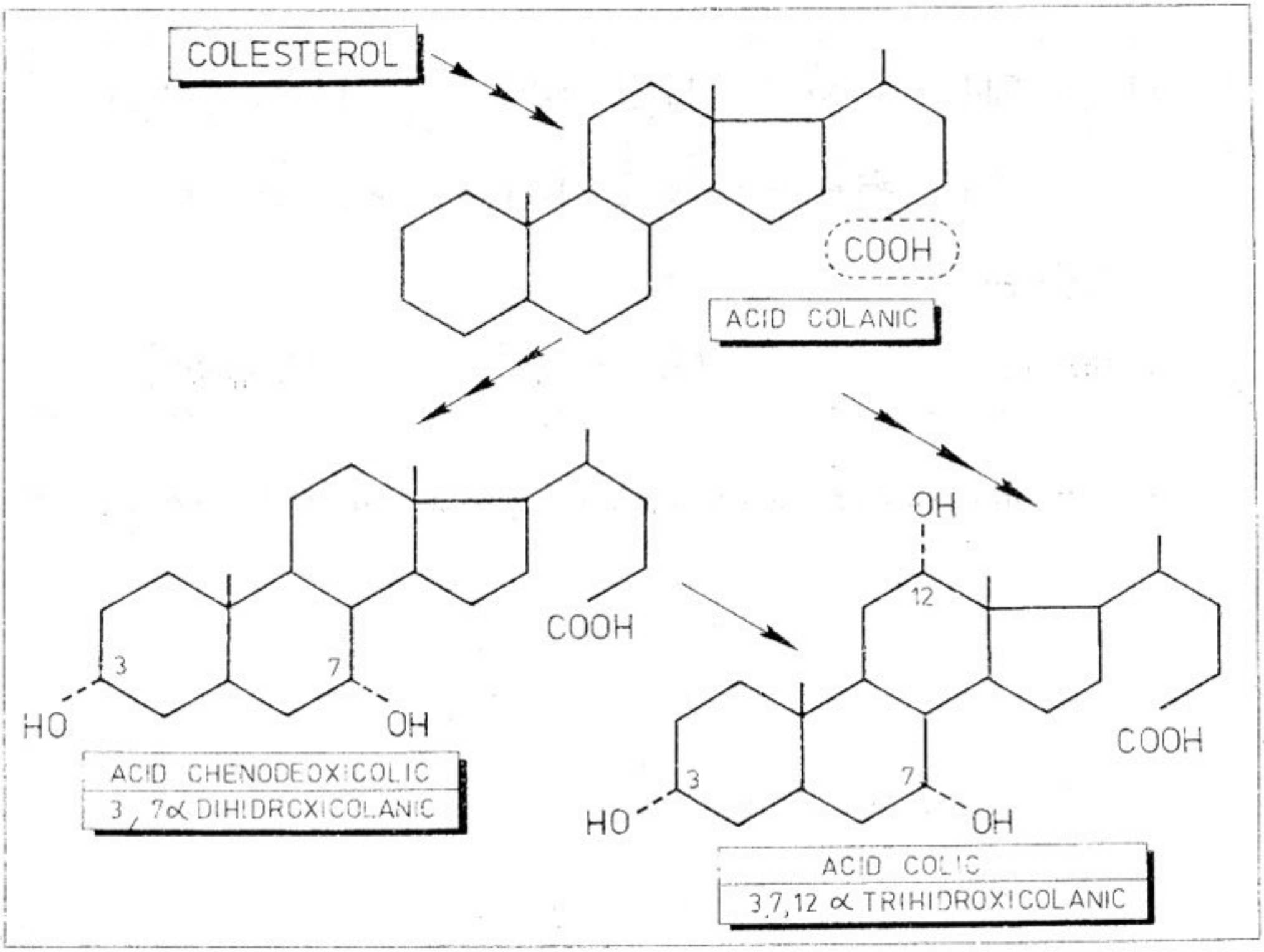


Fig.6.9 **Sinteza acizilor biliari primari**

Acizii biliari pot fi consideraţi ca derivaţi hidroxilaţi ai acidului colanic, fiind denumiţi şi **steroizi C_{24}**.

Sinteza acizilor biliari are loc în **microzomii hepatici** sub acţiunea citocromului P_{450} şi a vitaminei C care participă în procesele de hidroxilare; ulterior aceştia sunt deversaţi în **vezica biliară**.

Acidul **colic** şi **deoxicolic** sunt consideraţi acizi biliari **primari**, fiind sintetizaţi la nivelul **ficatului** din colesterol.

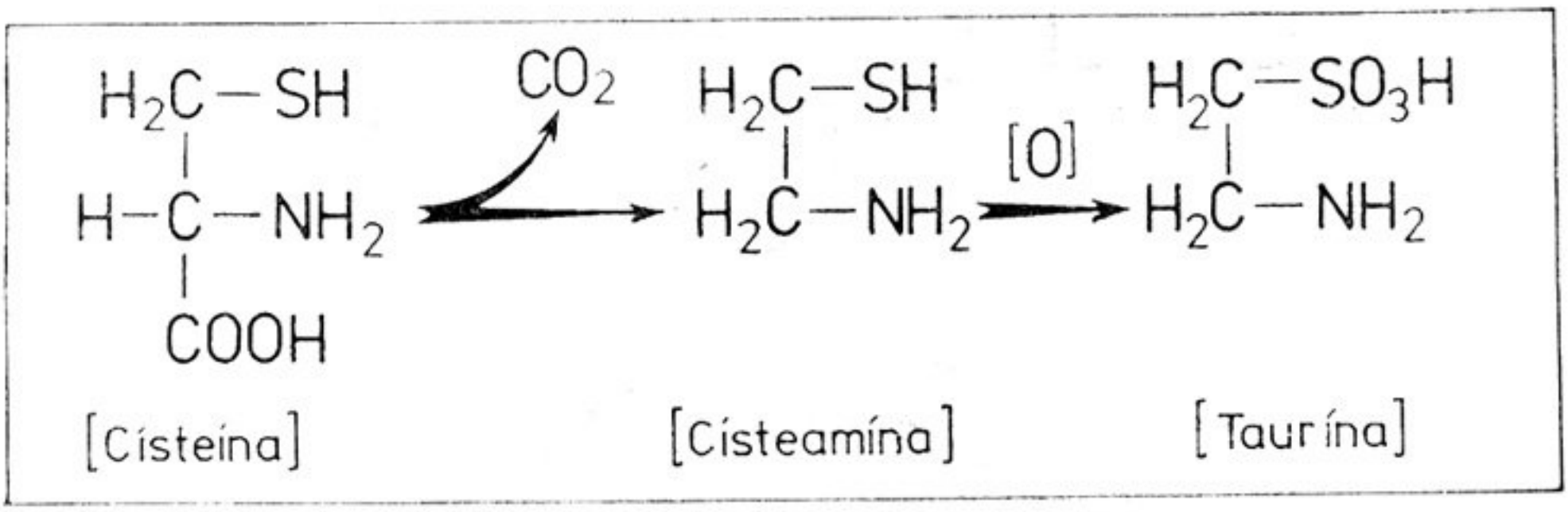
In **lumenul intestinal** sub acţiunea microorganismelor sunt sintetizaţi din acizi biliari primari, acidul **deoxicolic** ($3\alpha,12\alpha$-dihidroxicolanic) şi acidul **litocolic** (3α-hidroxicolanic); din aceste considerente au fost denumiţi **acizi biliari secundari**.

Acizii biliari se găsesc în bilă în cea mai mare parte sub formă de **amide**, rezultate în urma conjugării cu **glicocolul** sau cu **taurina**; sunt denumiţi **acizi biliari conjugaţi**.

$$\text{Acid colic} + \text{glicocol} \xrightarrow{H_2O} \textbf{Acid glicocolic}$$

$$\text{Acid colic} + \text{taurina} \xrightarrow{H_2O} \textbf{Acid taurocolic}$$

Taurina se obţine din aminoacidul cisteina:



Acizii biliari conjugaţi rezultă din următoarea succesiune de reacţii (vezi fig.6.10).

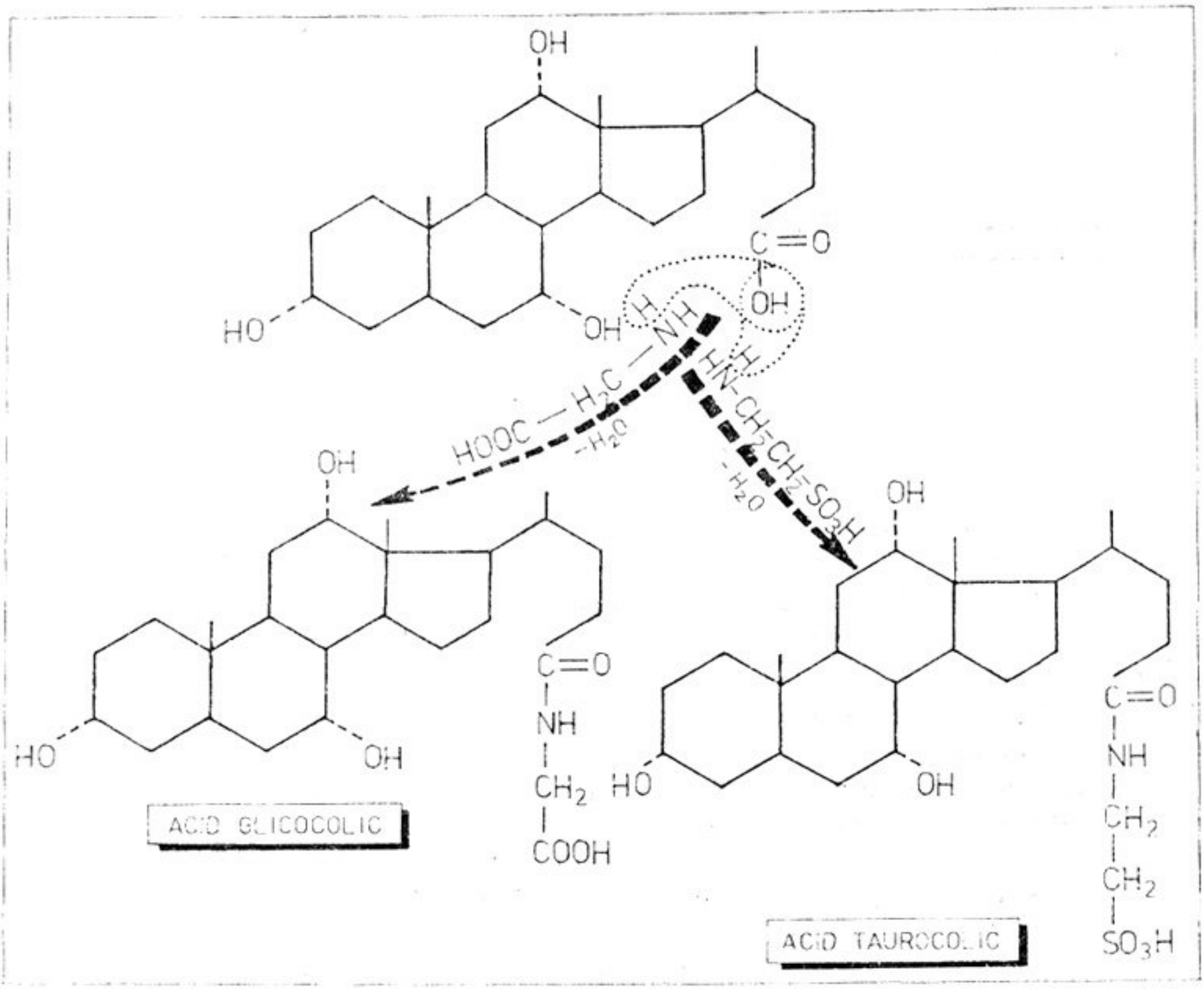


Fig.6.10 **Sinteza acizilor biliari conjugaţi**

Acizii biliari conjugaţi se găsesc în bilă salifiaţi sub formă de săruri de Na sau K.

6.5.3.2 Circuitul enterohepatic al acizilor biliari

Circuitul enterohepatic desemnează totalitatea secvenţelor metabolice ale acizilor biliari şi cuprinde mai multe etape:

- biosinteza hepatică;
- excreţia hepato-canaliculară;
- faza intestinală;
- faza intestino-portală;
- extracţia hepatocitară;
- reexcreţia hepatocanaliculară.

Acest proces apare ca un mecanism deosebit de eficient care permite **conservarea** şi **reutilizarea** acizilor biliari.

In cele ce urmează vom prezenta detaliat mecanismul care permite conservarea şi reutilizarea acizilor biliari.

Acizii biliari sunt sintetizaţi în **hepatocite**, sunt secretaţi în **canaliculele biliare** şi, după un tranzit prin **vezica biliară**, sunt deversaţi cu bila în **duoden**.

Acizii sintetizaţi în ficat denumiţi **acizii biliari primari** (acid colic şi deoxicolic) sunt conjugaţi cu glicocol sau cu taurină, rezultând **acizii biliari conjugaţi** (glicocolic, taurocolic, glicochenodeoxicolic, taurochenodeoxicolic) şi ulterior sunt secretaţi în bilă sub formă de săruri denumite generic **săruri biliare**.

Aceste săruri sunt deversate în intestin, unde datorită propietăţilor tensioactive, participă la solubilizarea şi absorbţia lipidelor alimentare.

Sub acţiunea florei bacteriene intestinale, este **hidrolizată** legătura amidică şi **suprimată** grupa hidroxil din poziţia 7 a acizilor biliari primari, care se transformă în **acizi biliari secundari** (acid deoxicolic şi litocolic).

In segmentul distal al ileonului, acizii biliari sunt reabsorbiţi printr-un mecanism activ într-o proporţie de aproximativ 90% şi transportaţi prin vena portă în ficat. La nivelul ficatului acizii biliari sunt conjugaţi şi împreună cu acizii biliari primari sunt secretaţi în bilă şi deversaţi în intestin, realizându-se astfel **circuitul enterohepatic** al acizilor biliari.

La fiecare tură a circuitului enterohepatic o cantitate variabilă de acizi biliari scapă reabsorbţiei, sunt eliminaţi cu fecalele şi reprezintă o cale de excreţie a colesterolului.

6.5.3.3 Proprietăţile şi rolurile acizilor biliari

Acizii biliari liberi, conjugaţi şi sărurile acestora sunt substanţe tensioactive cu un puternic efect emulsionant asupra lipidelor, care manifestă proprietăţi de solubilitate specifice. Prezintă regiuni cu **caracter hidrofil**, datorită grupărilor hidroxilice polare şi grupărilor $-COO^-$ sau $-SO_3^-$; nucleul hidrocarbonat steranic prezintă un caracter **hidrofob**.

Regiunile hidrofilă şi hidrofobă ale moleculei au o dispoziţie diferită de cea a lipidelor amfipatice; toate grupările hidroxil care au afinitate pentru apă (hidrofile) sunt situate pe aceeaşi parte a moleculei, cealaltă parte a moleculei având un caracter hidrofob .

Sărurile biliare interacţionează cu apa şi cu unele lipide într-un mod particular şi specific. Cu apa şi cu unele categorii de lipide formează **agregate micelare mixte**. Miceliile formate între sărurile biliare şi lecitine au forma unor bastonaşe mici, în timp ce moleculele de lecitină formează un cilindru bimolecular care are grupările polare (restul fosforil şi ionul cuaternar de amoniu) expuse spre exterior. Prin intermediul zonei steranice hidrofobe, sărurile hidrofobe interacţionează cu catenele hidrocarbonate ale resturilor acil din moleculele

de lecitină prin forţe Van der Waals, iar grupările hidrofobe ale sărurilor biliare şi fosfolipidelor sunt expuse la exteriorul micelei mixte formate (fig.6.11).

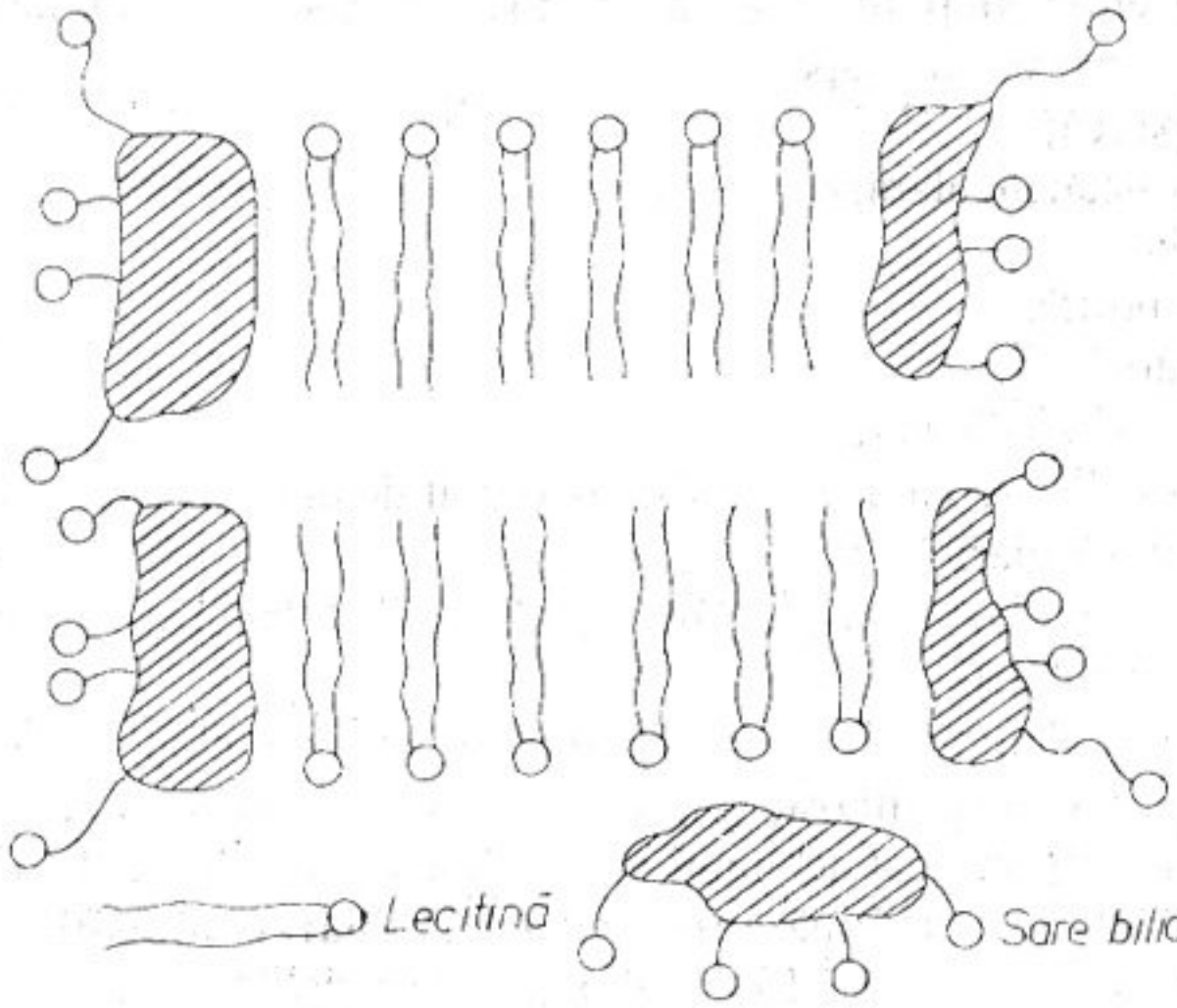


Fig.6.11 **Structura unei micelii mixte: sare biliară-lecitină (secţiune longitudinală)**

Miceliile mixte, **săruri biliare-lecitine**, au capacitatea de a solubiliza diferite categorii de lipide polare (acizi graşi, monogliceride) şi mai puţin polare (colesterol, acilcolesterol, triacilgliceroli). Moleculele nepolare sunt încorporate în centrul hidrofob al micelei, iar lipidele amfipatice se intercalează în stratul superficial. În acest fel sărurile acizilor biliari facilitează absorbţia prin peretele intestinal a unor substanţe insolubile în apă.

Rolurile biologice ale acizilor biliari

◆ - la nivelul intestinului acţionează ca **agenţi de emulsionare** a lipidelor, facilitând absorbţia lipidelor emulsionate sau scindarea lor enzimatică de către **lipaze**;
◆ - activează secreţia pancreasului, determinând creşterea în duoden a cantităţii de **lipază pancreatică** concomitent cu stimularea activităţii acesteia;
◆ - favorizează eliberarea **enterokinazei** (enzimă care converteşte tripsinogenul în tripsină) la nivelul mucoasei duodenale;
◆ - intervin în **controlul sintezei colesterolului** şi **autoreglarea sintezei** lor hepatice; scăderea concentraţiei sărurilor biliare în intestinul subţire induce creşterea sintezei colesterolului la acest nivel, deoarece o cantitate mai mare de colesterol devine disponibil pentru transformarea sa în săruri biliare.

6.6 Lipide complexe. Heterolipide

Lipidele complexe (heterolipidele) prezintă următoarele caracteristici:
◆ - sunt biomolecule cel puţin **cuaternare** în a căror compoziţie intră pe lângă C,H,O şi N,P,S.

◆ - în funcţie de natura componentei alcoolice acizii graşi se leagă **covalent esteric** cu glicerolul sau **amidic** cu sfingozina;
◆ - prezintă o structură complexă deoarece, pe lângă acizi graşi şi alcooli (componente primordiale), conţin şi alţi constituenţi diferiţi ca: acid fosforic, aminoacizi, aminoalcooli, inozitoli, glucide etc.;
◆ - sunt componente principale ale lipidelor de **constituţie**, participând la edificarea anumitor structuri celulare şi subcelulare cu rol important în permeabilitatea biomembranelor;
◆ - formează cu proteinele combinaţii complexe, **lipoproteide** - forme de transport ale lipidelor prin sânge;
◆ - sunt mai **reactive** chimic decât lipidele simple, fapt care explică prezenţa lor într-o proporţie ridicată în celulele organelor cu metabolism intens;
◆ - prezintă o largă răspândire în toate celulele animale şi, în special, în ţesutul nervos.

In funcţie de natura alcoolului care formează legături de tip **ester** sau de tip **amidă** cu acizi graşi, heterolipidele se subdivid în două categorii:
A) **Glicerofosfolipide;** B) **Sfingolipide.**

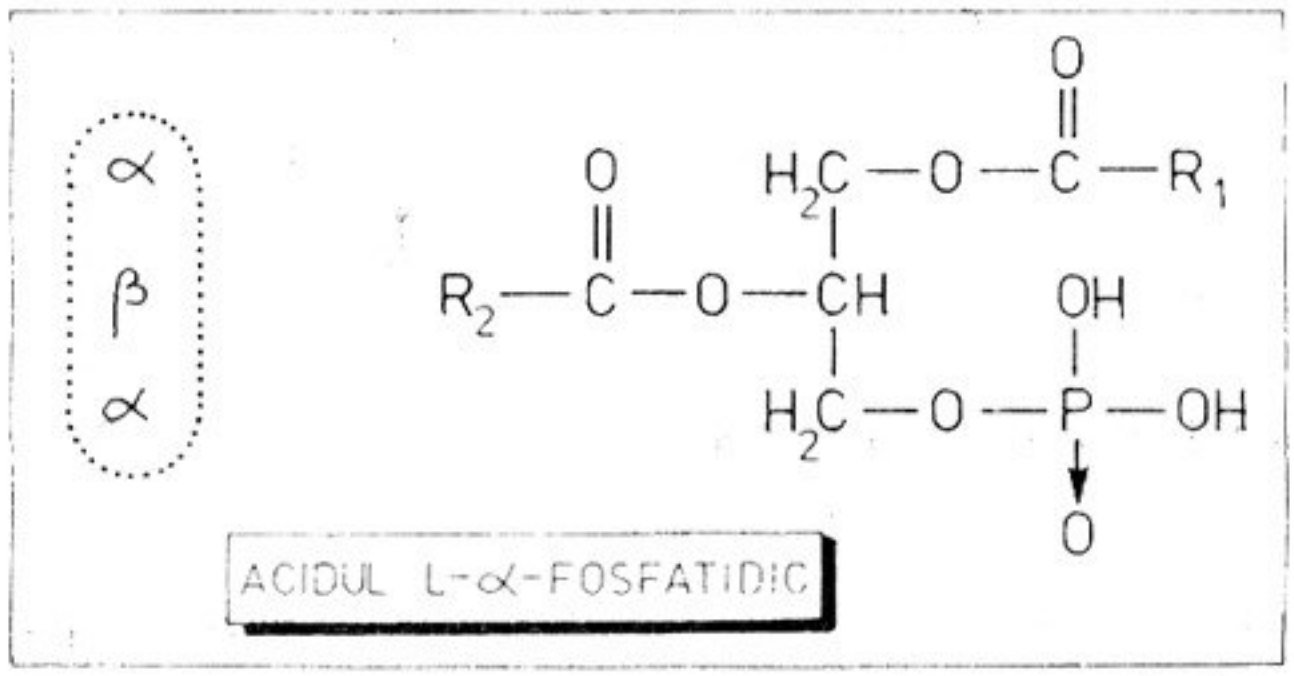
6.6.1 Glicerofosfolipidele

Glicerofosfolipidele sunt **lipide complexe** care includ în structura lor glicerol, având în mod obligatoriu **fosfor** (P); unele conţin şi azot (N).

Clasificarea glicerofosfolipidelor poate fi astfel prezentată:

Glicerofosfolipide (toate conţin fosfor)
- **cu azot**
  - Lecitine
  - Cefaline
  - Serincefaline
  - Plasmalogeni
- **fără azot**
  - Acizi fosfatidici
  - Inozitolfosfatide
  - Cardiolipine

Structura de bază din constituţia glicerofosfolipidelor este aceea a **acizilor fosfatici** care sunt formaţi din glicerol esterificat în poziţiile C_1 (α) şi C_2 (β) cu acizi graşi (C_1 cu un acid gras **saturat** şi C_2 cu acid gras **nesaturat**), iar în poziţia C_3 (α) este esterificat cu acid fosforic.



In organismul animal şi uman se găsesc numai acizi L-fosfatidici; aceştia, ca şi glicerofosfolipidele, prezintă izomerie optică şi fac parte din seria sterică L.

Acizii fosfatidici sunt intermediari în biosinteza **glicerofosfolipidelor** şi, datorită prezenţei radicalului fosfat în molecula lor, prezintă solubilitate în apă.

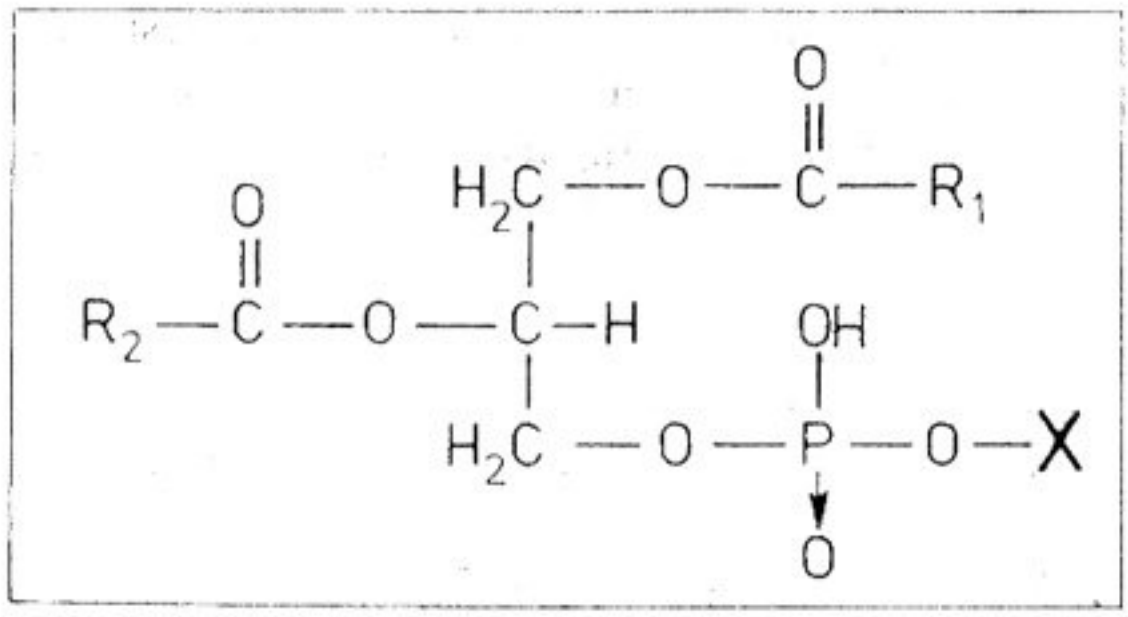
Dacă acidul fosforic din structura acizilor fosfatidici este esterificat cu diverşi alcooli se obţine toată gama de reprezentanţi ai glicerofosfolipidelor (tabela 6.3).

Majoritatea glicerofosfolipidelor sunt prezente practic în toate celulele organismului animal.

Tabela 6.3 **Tipuri de glicerofosfolipide şi componentele lor**

Denumirea glicerofosfolipidelor		Componenta I	Componenta II
Chimică	Uzuală		
Fosfatidil colină	Lecitine	Acid fosfatidic	Colină
Fosfatidil etanolamină	Cefaline	Acid fosfatidic	Colamină
Fosfatidil serină	Serincefaline	Acid fosfatidic	Serină
Fosfatidil inozitol	Inozitol fosfatide	Acid fosfatidic	Inozitol
Difosfatidil glicerol	Cardiolipine	Acid fosfatidic	Glicerol
Acetal fosfatide	Plasmalogeni	Acid fosfatidic (α-eter-enol ß-ester)	Colină Colamină

In comparaţie cu alte ţesuturi, **ţesutul cerebral** se caracterizează printr-o mare cantitate de glicerofosfolipide; urmează apoi în ordine, eritrocitele, măduva osoasă şi ficatul.

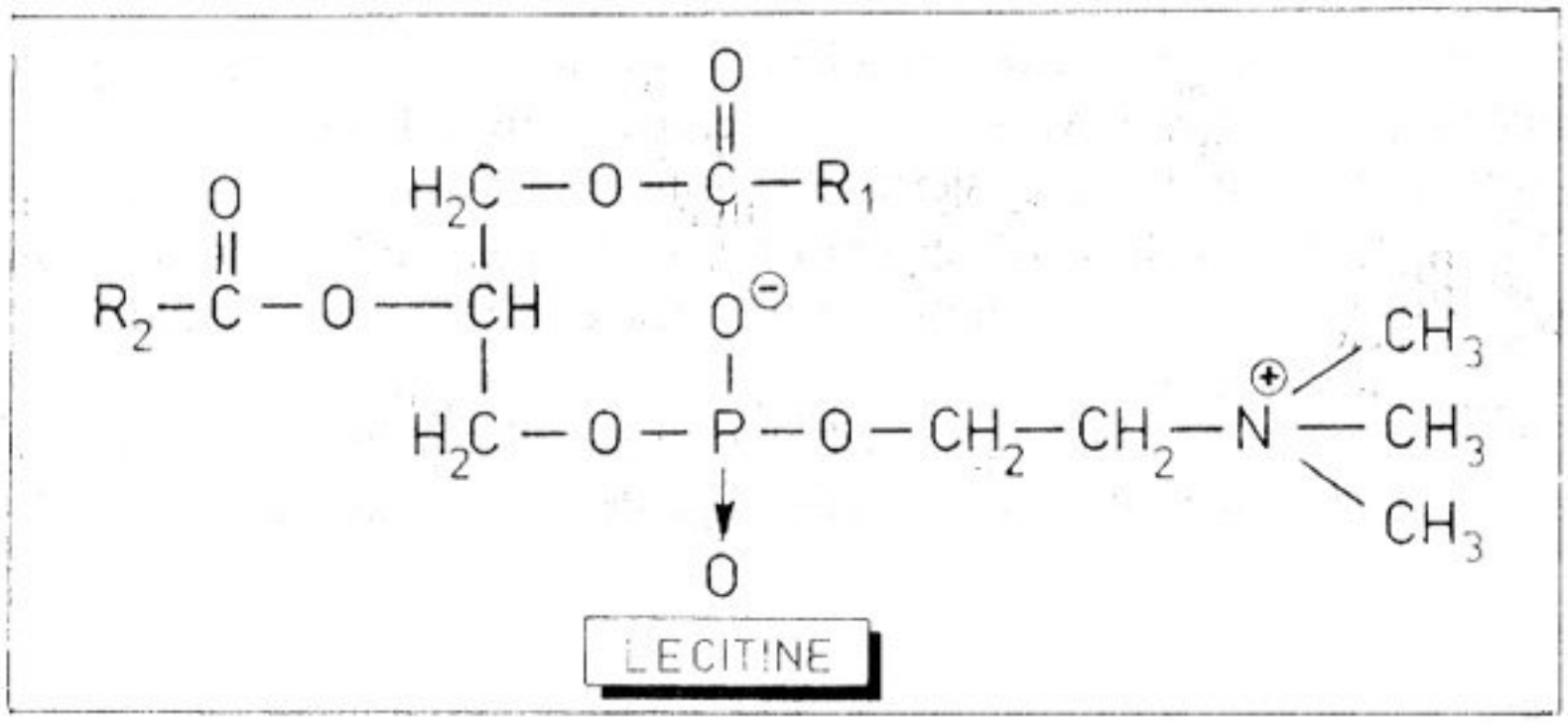


6.6.1.1 Glicerofosfolipide cu azot

Structural această categorie de glicerofosfolipide este formată din: gliceroli, acizi graşi, acid fosforic şi un aminoalcool.

Lecitinele - (fosfatidilcolinele) sunt cele mai răspândite dintre glicerofosfolipide şi rezultă prin esterificarea acizilor fosfatidici cu colina (trimetilaminoetanol).

Acidul gras din poziţia C_1 (α) este saturat (palmitic sau stearic), iar celălalt din poziţia C_2 (β) este nesaturat (oleic, linoleic, arahidonic). In molecula unei lecitine există o funcţie acidă (restul fosforil) şi una bazică (baza cuaternară de amoniu) care se neutralizează reciproc, fapt care conferă întregii molecule caracterul de amfiion.



Prezenţa resturilor acil hidrofobe şi a sarcinilor electrice pozitivă şi negativă conferă lecitinelor caracter **amfipatic** şi proprietăţi tensioactive pronunţate.

Caracterul amfipatic este datorat prezenţei în aceeaşi moleculă a două zone distincte: una cu caracter **hidrofob - apolară** (radicali de acizi graşi esterificaţi la glicerol) şi una cu caracter **hidrofil-polară** (fosforil colina).

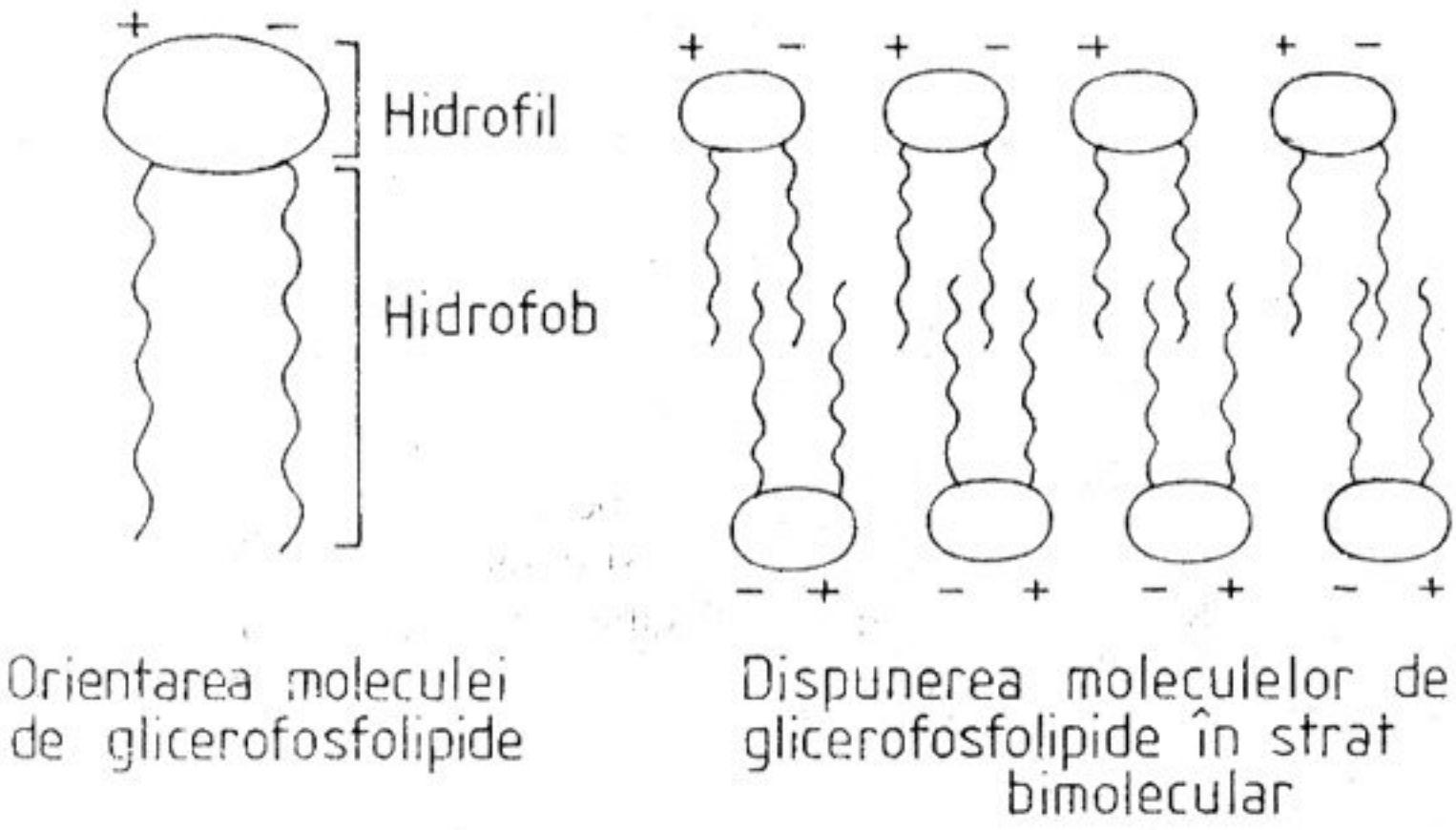


Fig.6.12 **Orientarea şi dispunerea moleculelor de fosfolipide**

Datorită caracterului amfipatic, lecitinele au capacitatea de a se comporta ca agenţi activi de suprafaţă prin orientarea lor într-o fază apoasă, proprietate pe care se bazează participarea acestora la organizarea structurală a **biomembranelor** (fig.6.12).

Acest strat bimolecular lipidic este stabilizat prin forţe **Van der Waals** care se realizează

între catenele hidrocarbonate ale resturilor acil dispuse paralel şi pe de altă parte, prin interacţiunile electrostatice. Lecitinele reprezintă **unităţi structurale** constitutive ale **biomembranelor**. Datorită prezenţei lor în biomembrane se explică rolul acestora în procesele de **permeabilitate selectivă**.

Fosfatidil colina cu două resturi palmitil este componentul lipidic principal (80-90%) al "**surfactantului pulmonar**", înveliş care acoperă alveolele pulmonare şi împiedică colapsul la expirare.

Datorită sarcinilor electrice, lecitinele participă la procesul de **polarizare** ale biomembranelor şi în transmiterea impulsului nervos la nivelul sinapselor.

Lecitinele sunt capabile să esterifice colesterolul cu acidul nesaturat din poziţia β, transformându-l în colesterol esterificat sub acţiunea enzimei LCAT (**lecitin colesterol acil transferaza**). Procesul are loc simultan cu o nouă esterificare, evitându-se formarea de **lizolecitine** cu efecte toxice.

In organism lecitinele pot fi scindate hidrolitic sub acţiunea unor enzime denumite **fosfolipaze** care sunt de mai multe tipuri, în funcţie de provenienţa lor şi de legătura pe care o desfac :

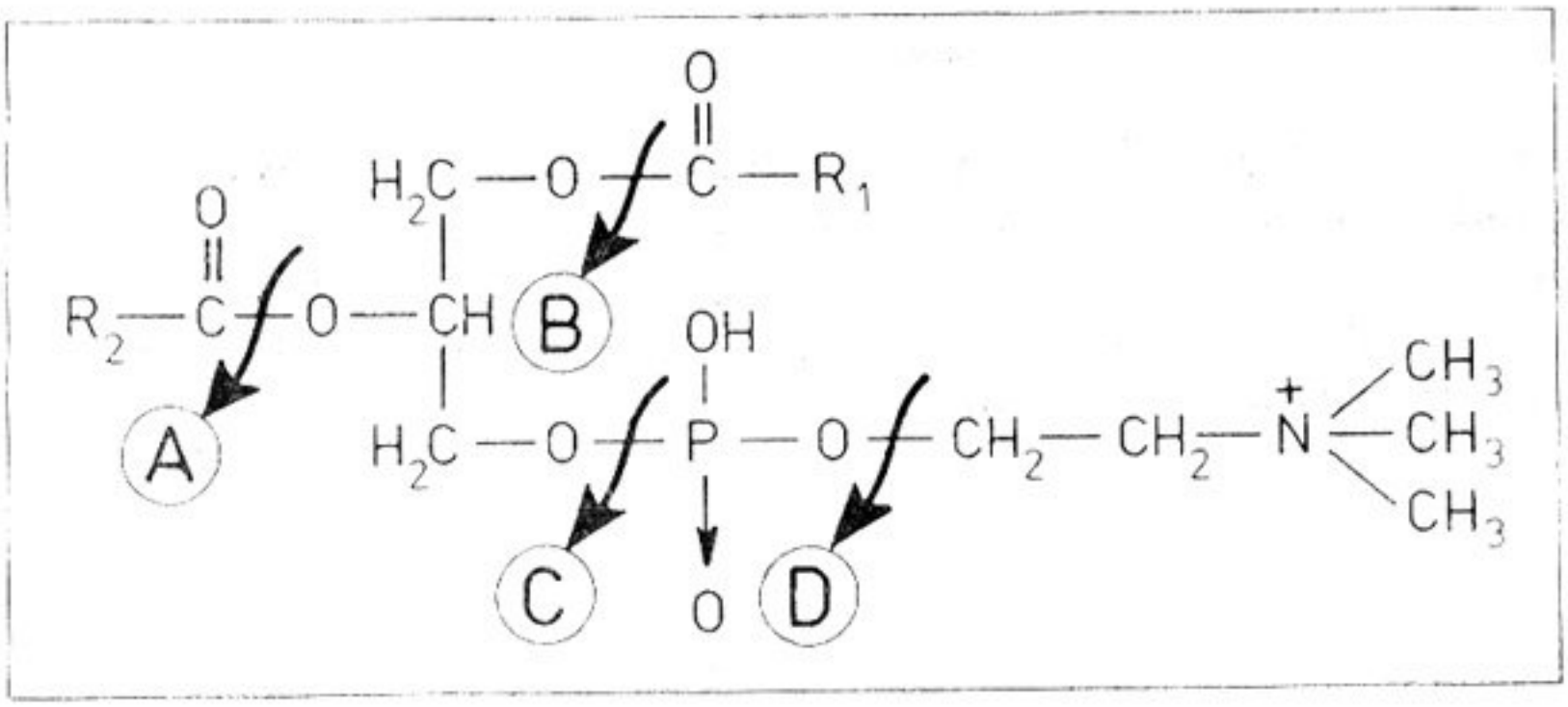


Fig.6.13 **Acţiunea tipurilor de fosfolipaze asupra lecitinelor**

Fosfolipazele A (fosfatidacilhidrolazele) intervin în scindarea legăturii ester din poziţia 2 (β) unde există un acid gras nesaturat. Enzima este prezentă în veninul de şerpi şi de albine, iar produsul acestei hidrolize, **lizolecitina**, manifestă o puternică acţiune **hemolitică** prin afectarea membranelor eritrocitare.

Prin liza membranei eritrocitului se eliberează hemoglobina, ceea ce face să fie perturbate procesele de transport al oxigenului şi oxigenarea ţesuturilor.

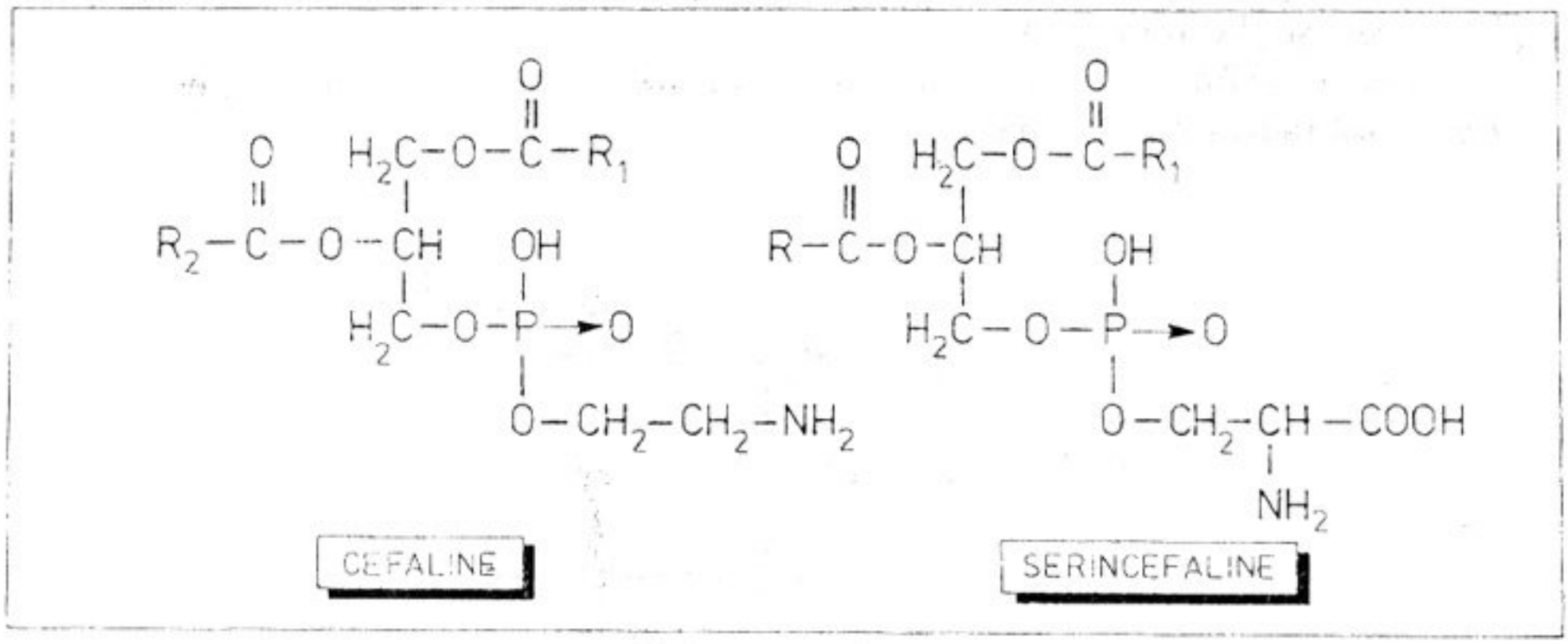
Fosfolipaza B, prezintă în diverse ţesuturi animale, în sucul pancreatic şi în serul sanguin, acţionează la nivelul legăturii **ester** din poziţia C_1, eliberând acidul gras saturat şi glicerolfosfatcolina.

Fosfolipaza C şi fosfolipaza D, specifice microorganismelor şi plantelor, evidenţiate şi în unele ţesuturi animale (nervos, cerebral, hepatic), scindează hidrolitic legăturile **ester** din poziţia 3 eliberând: glicerolul, colina şi acidul fosforic.

Cefalinele (fosfatidiletanolamine) au fost izolate prima dată din creier unde se găsesc în cantitate mare (13%), dar sunt distribuite practic în toate celulele organismului animal, în asociaţie cu serincefalinele.

Serincefalinele (fosfatidilserine) predomină în ţesutul cerebral, unde reprezintă 50%

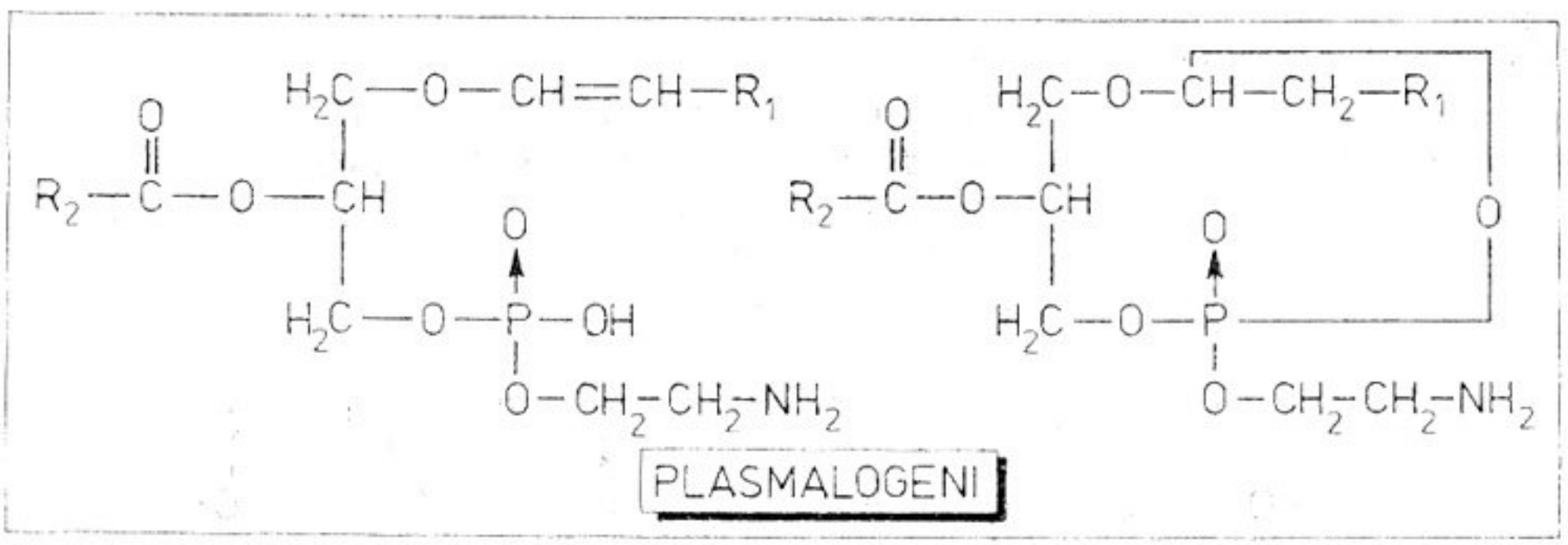
din totalitatea glicerofosfolipidelor, dar există şi în alte ţesuturi în proporţii mai mici.



Având în aceeaşi moleculă **două funcţiuni acide**, au un **caracter acid** mai pronunţat, din care cauză în ţesuturi se găsesc sub formă de săruri de potasiu. Fosfatidil-serinele poartă o sarcină electrică **negativă**, spre deosebire de lecitine şi cefaline care sunt neutre.

Prin decarboxilerea restului de serină se pot forma **fosfatidiletanolamine**. Atât cefalinele, cât şi serincefalinele au un rol plastic participând în structura biomembranelor.

Acetalfosfolipidele (plasmalogeni) au o structură chimică asemănătoare cu cea a lecitinelor sau cefalinelor de care se deosebesc prin prezenţa în poziţia C_1 a unei aldehide superioare (**palmitică, stearică**) în forma **enolică** care se leagă **eteric**. Prezenţa plasmalogenilor a fost evidenţiată în multe ţesuturi cu precădere în ţesutul cerebral (până la 10% din fosfolipidele totale) şi muscular. Pentru plasmalogeni s-au propus mai multe variante structurale din care prezentăm două din ele.



Spre deosebire de lipide totale şi colesterol al căror nivel seric creşte **cu vârsta**, plasmalogenii **scad**.

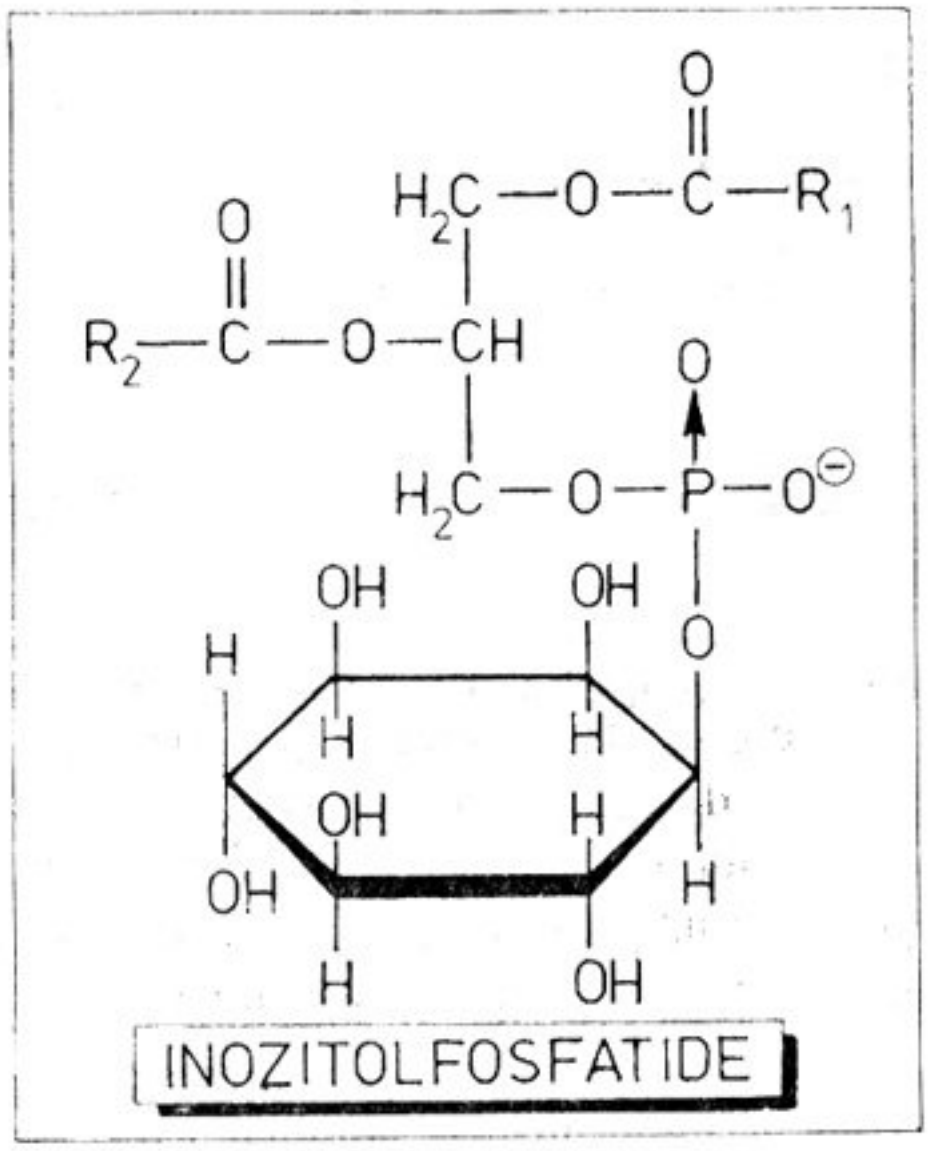
6.6.1.2 Glicerofosfolipide fără azot

Structura chimică a acestei subclase de glicerofosfolipide este constituită din glicerol,

acizi graşi, acid fosforic şi un alcool neazotat.

Acizii fosfatidici reprezintă componenta de bază a glicerofosfolipidelor care apar liberi în cantităţi mici, ca produşi de liză intermediari în biosinteza şi hidroliza enzimatică a gliceridelor şi glicerofosfolipidelor.

Inozitolfosfatide (fosfatidilinozitoli) sunt constituite din acid fosfatidic esterificat cu **mezoinozitol** (hexahidroxiciclohexan).

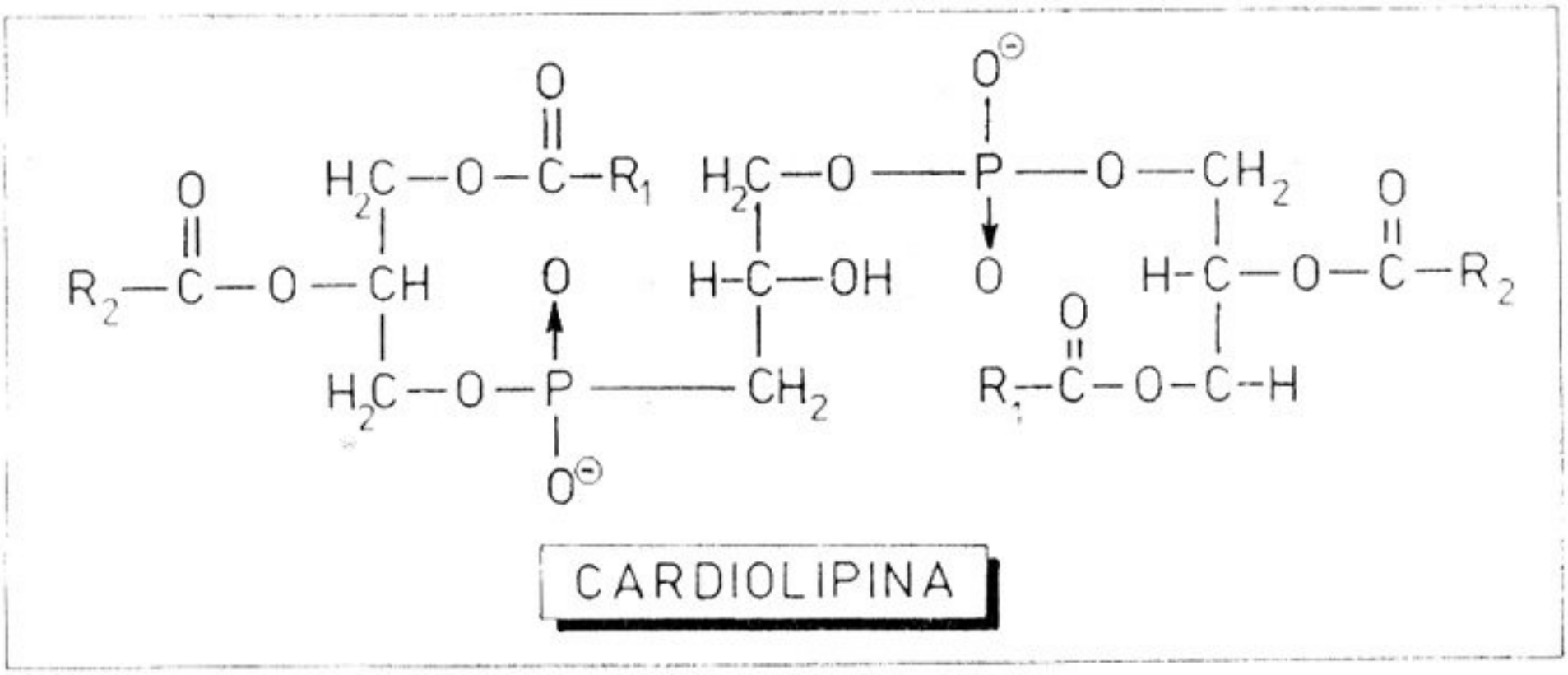


INOZITOLFOSFATIDE

In molecula fosfatidilinozitolilor se află numai o funcţie acidă puternică şi poartă o sarcină negativă. In creier s-au identificat şi alte categorii de inozitolfosfatide care mai cuprind unul sau două resturi fosforil (difosfo şi trifosfo-inozitide). Aceste fosfolipide care cuprind trei sarcini negative, participă la transportul cationilor prin membrane, proces fundamental pentru funcţia nervoasă.

De menţionat, că au fost puse în evidenţă şi inozitolfosfolipide care conţin şi oze (arabinoză, galactoză, glucoză, manoză), legate de acidul fosforic sau de inozitol.

Cardiolipinele (difosfatidilglicerol) au fost izolate din muşchiul cardiac, dar prezenţa



CARDIOLIPINA

lor a fost semnalată şi în alte ţesuturi; este localizată într-o mare proporţie în **membranele mitocondriilor**.

Structural sunt constituite din două molecule de acizi fosfatidici cuplate prin legături esterice cu o moleculă de **glicerol**. Au fost izolate din ţesutul cardiac, dar sunt şi componente alesurfactantului pulmonar.

Cardiolipinele au proprietăţi antigenice şi sunt folosite în unele reacţii serologice, în care pot substitui antigenul specific (reacţia Wassermann).

6.6.2 Sfingolipidele

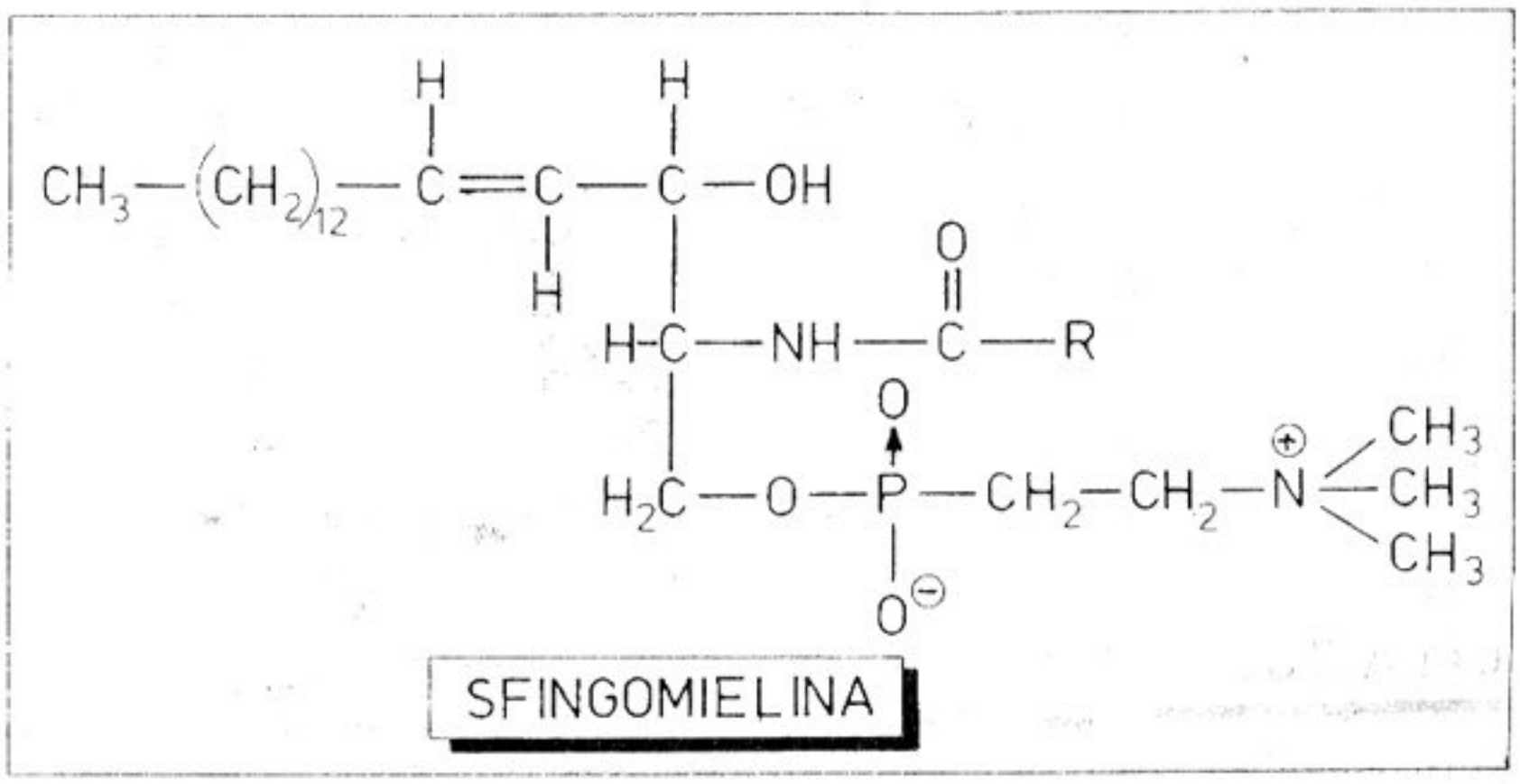
Sfingolipidele sunt lipide complexe cu rol structural, ca şi fosfatidele, derivate de la alcoolul **sfingozina,** sau. uneori, de la derivatul său saturat **dihidrosfingozina**. Conţin în mod obligatoriu N în molecula lor, iar unele conţin şi P (vezi clasificarea).

Sfingolipide -toate conţin azot-
- **cu fosfor**
  - sfingomieline
- **fără fosfor**
  - ceramide
  - cerebrozide
  - sulfatide
  - gangliozide

Spre deosebire de celelalte lipide (gliceride, glicerofosfolipide) acidul gras care intră în structura sfingolipidelor nu este legat de alcool prin legătură esterică, ci printr-o legătură de tip **amidă** realizată la nivelul grupării $-NH_2$ din molecula de sfingozină. Cel mai frecvent în sfingolipide se întâlnesc acizii graşi cu 24 de atomi de carbon (lignoceric, cerebronic, nervonic). Sfingolipidele fără fosfor, care conţin unul sau mai multe resturi glicozil, au fost denumite **glicolipide**.

6.6.2.1 Sfingolipide cu fosfor

Sfingomielinele sunt cele mai importante sfingolipide şi cantitativ predomină în ţesutul nervos şi participă la structura tecilor de mielină, îndeplinind rol de **izolator** al **tecilor de mielină** din axoni (datorită caracterului lor hidrofob).



Sfingomielinele sunt constituite din: **sfingozină**, acid gras (nervonic, cerebronic, lignoceric) şi **fosforilcolină** sau **fosforilcolamină** legate esteric la gruparea $-CH_2-OH$ a sfingozinei.

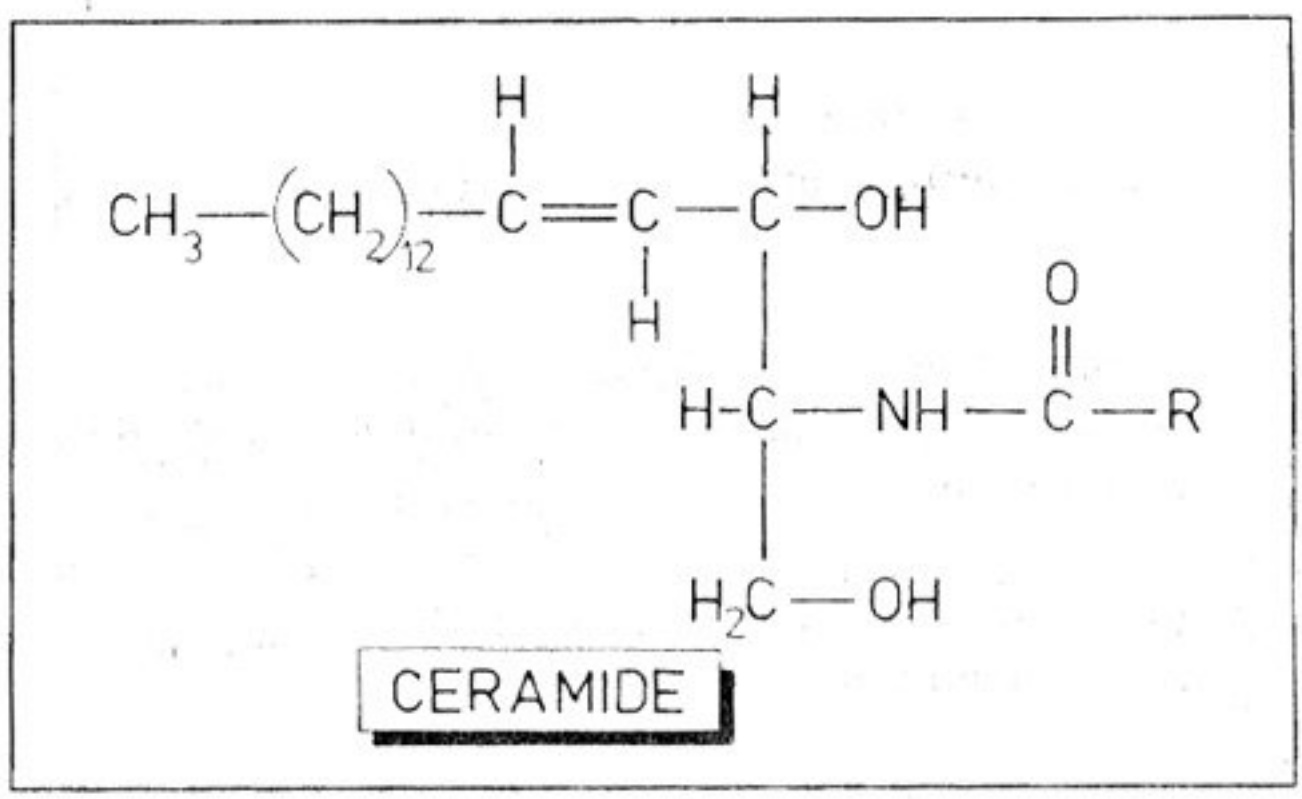
Sfingomielina are o structură conformaţională similară cu cea a lecitinelor, având o **zonă apolară** (hidrofobă) formată din cele două resturi acil şi o **zonă polară** (hidrofilă), fosforilcolina.

Acumularea excesivă a sfingomielinelor în ficat, splină şi creier numită sfingomielinoză sau "**boala lui Nieman-Pick**" este datorată unui defect genetic (lipsa unei enzime, **sfingomielinaza**) care duce la imposibilitatea ruperii legăturii dintre ceramidă şi fosforilcolină (vezi tabela 6.4).

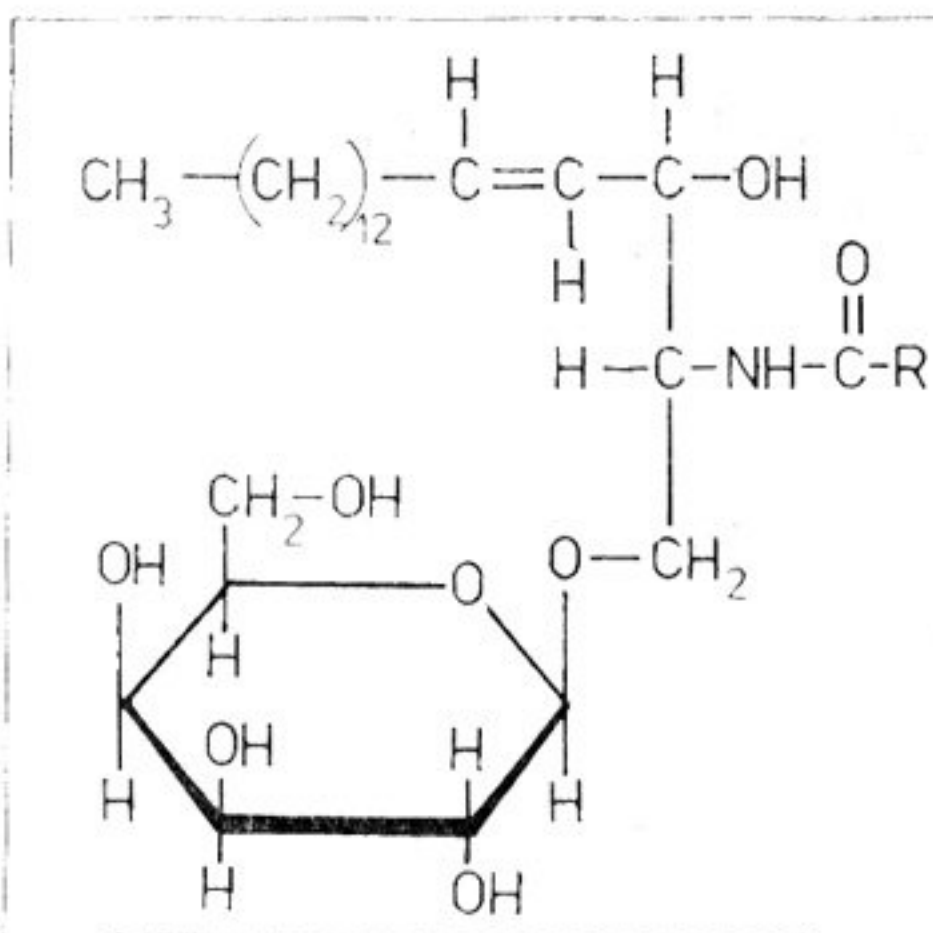
6.6.2.2 Glicolipide

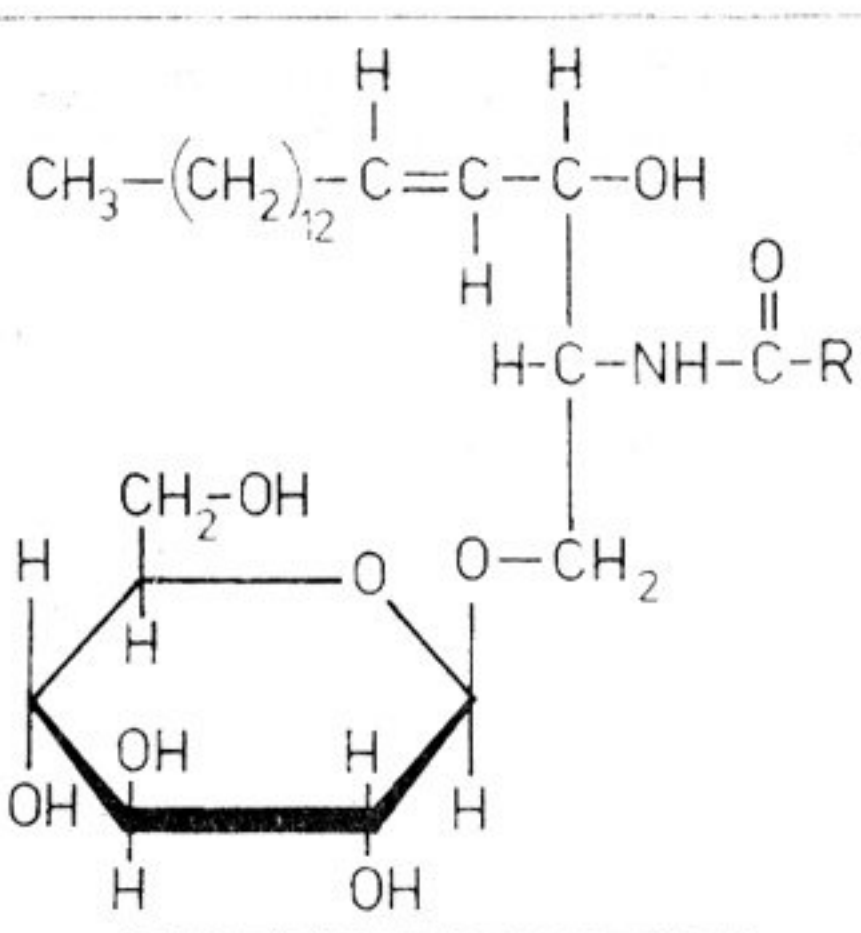
Glicolipidele de natură animală sunt derivaţi ai ceramidelor care conţin diferite oze legate **esteric** de gruparea alcool primar a ceramidei. Glicolipidele **nu conţin** în molecula lor legături **ester**.

Ceramidele sunt alcătuite din sfingozină şi un acid gras. Sunt distribuite în ţesutul nervos, ficat şi splină, fiind consideraţi compuşi intermediari în biosinteza altor sfingolipide: sfingomieline, cerebrozide, sulfatide, gangliozide.



Cerebrozidele sunt sfingolipide cu largă răspândire





în creier, ficat, rinichi, splină,eritrocite; conţin sfingozină legată amidic cu un acid gras cu 24 C, iar la hidroxilul de la gruparea alcoolică primară se leagă eteric o moleculă de β galactoză (galactocerebrozid) sau β glucoză (glucocerebrozid).

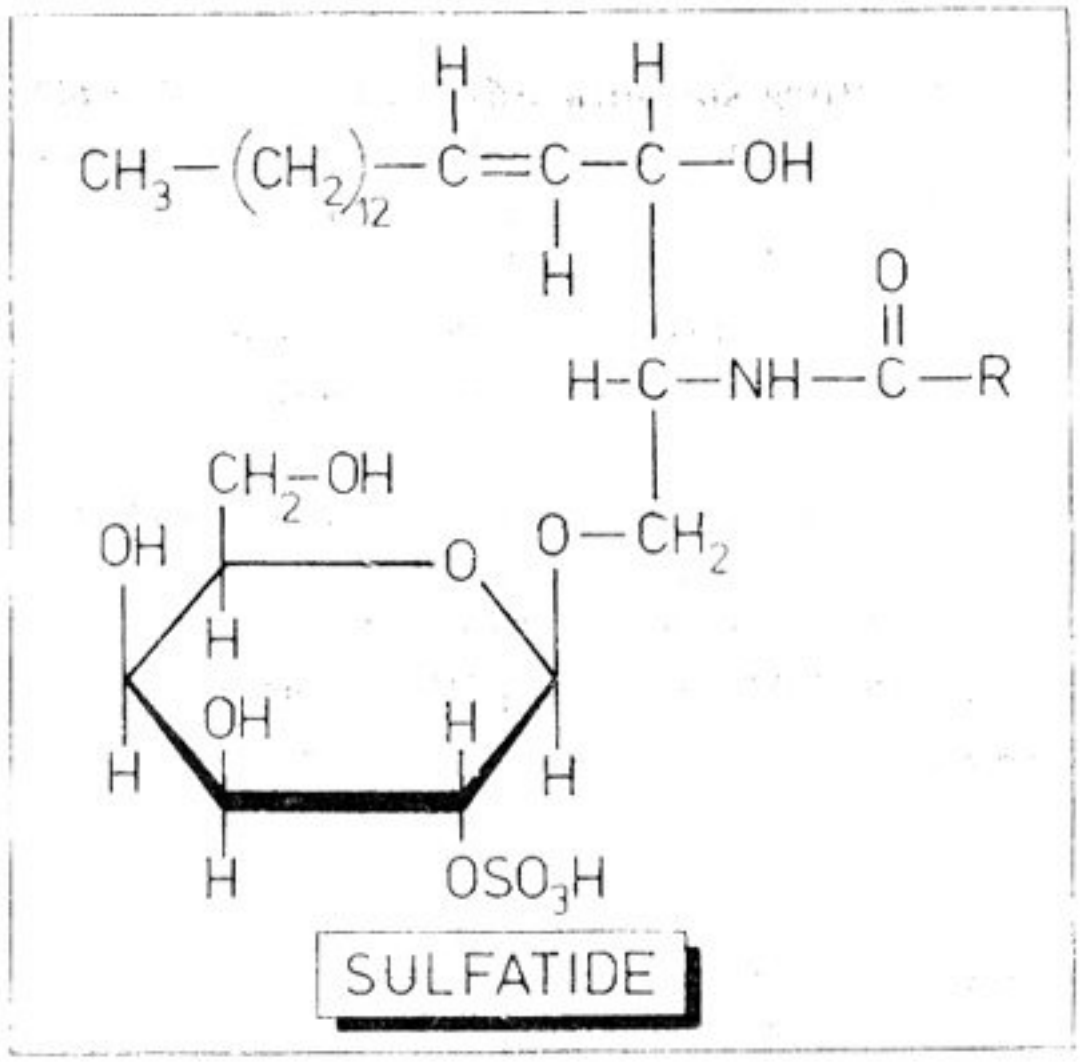
In funcţie de natura acidului gras legat amidic de sfingozină se întâlnesc mai multe tipuri de cerebrozide:

- **cerazina** - conţine acid lignoceric;
- **frenozina** - conţine acid cerebronic;
- **nervona** - conţine acid nervonic;
- **oxinervona** - conţine acid oxinervonic.

Cerebrozidele sunt glicosfingolipide neutre, deoarece nu conţin funcţiuni ionizabile, deci nu au sarcină electrică.

Acumularea în cantităţi mari (10-20 ori faţă de cantitatea normală) a **glucocerebrozidelor** în splină şi sistemul reticuloendotelial determină o serie de manifestări patologice de natură genetică, cunoscute sub denumirea de **"boala lui Gaucher"** (vezi tabela 6.4).

Sulfatidele sunt derivaţi ai cerebrozidelor esterificaţi cu un radical al acidului sulfuric C_2 sau C_3 a hexozei. Se găsesc în exclusivitate, în ţesutul nervos, însoţind cerebrozidele. Au fost identificate în mitocondrii, nucleu, microzomi şi membrane.



SULFATIDE

Leucodistrofia metacromatică este o sfingolipidoză care se manifestă prin acumularea sulfatidelor în creier de 2-5 ori (vezi tabela 6.4).

Gangliozidele sunt glicolipide cu structura complexă care spre deosebire de cerebrozide, au drept componentă glucidică un oligoglucid; seamănă într-o oarecare măsură cu partea glucidică a glicoproteidelor. In componenţa gangliozidelor au fost identificate: sfingozină, acizi graşi, glucoză, galactoză, N-acetil glucozamina, N-acetil galactozamină, L-fucoză, acid sialic (acid acetil neuraminic). Gangliozidele cuprind o ceramidă, în care acidul gras predominant este **acidul stearic**.

Oligoglucidul alcătuit din ozele enumerate mai sus este legat la un capăt de ceramida, iar la celălalt capăt de unul, două sau trei resturi de acid sialic. După numărul resturilor de acid sialic gangliozidele se clasifică în: **monosialogangliozide** (GM), **disialogangliozide** (GD)

şi **trisialogangliozide** (GT).

Componenta glucidică a gangliozidelor se găseşte totdeauna pe faţa externă a membranelor, aceste lipide fiind implicate în procesele de pe suprafaţa membranelor.

Gangliozidele se găsesc distribuite preponderent în creier (substanţa cenuşie) din care cauză li se atribuie un rol în fiziologia sistemului nervos central.

Concentraţia gangliozidelor în **creier** se modifică cu vârsta: la om s-a constatat o creştere a conţinutului în gangliozide până la vârsta de 30 de ani.

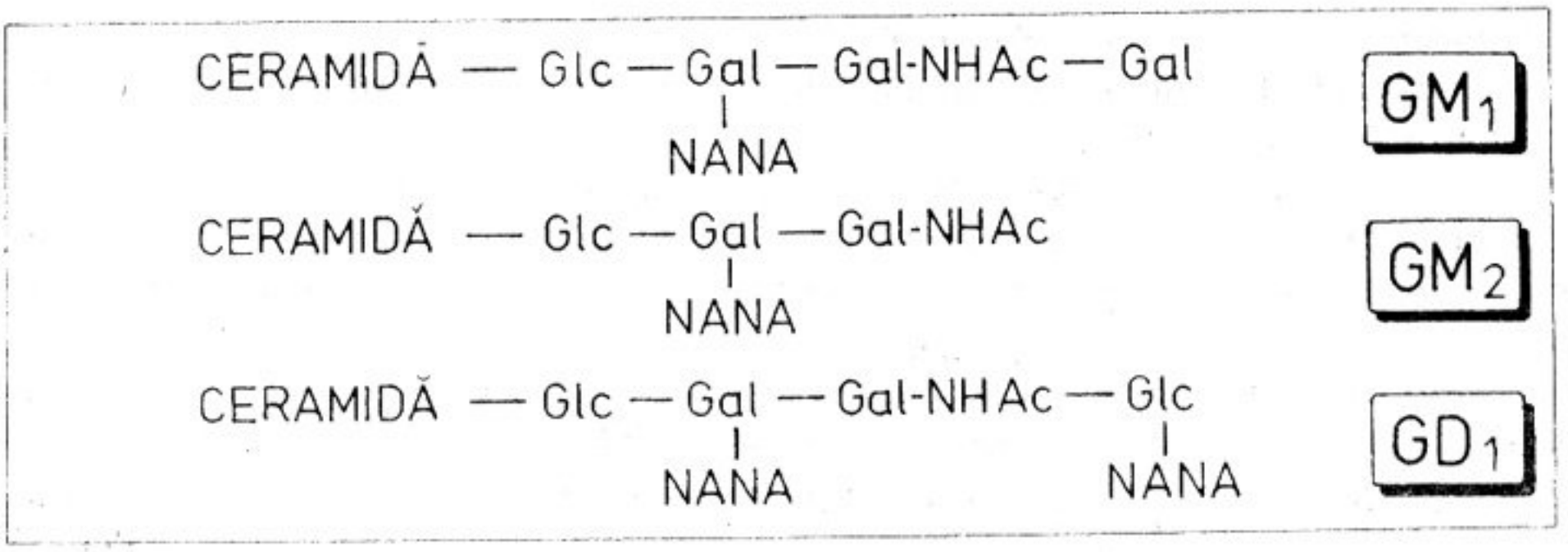


Fig.6.14 **Structura simplificată a gangliozidelor GM_1, GM_2, GM_3**
Gcl=glucoză; Gal=galactoză; NANA=acid N-acetil neuraminic;
Gal NHAc= N-Acetil-Galactozamină

In cadrul acestei clase de substanţe au fost semnalate o serie de maladii ereditare (**gangliozidoze**) care fac parte din clasa **sfingolipidozelor**.

Tabela 6.4 **Principalele sfingolipidoze şi caracteristicile lor**
(după I.Teodorescu Exarcu, 1974)

Denumirea maladiei	Componenta lipidică acumulată	Organul implicat	Deficienţa enzimatică
NIEMANN-PICK	Sfingomielină	Creier, ficat, rinichi,splină	Ceramid difosfo-colinliază
FARBER	Ceramidă	Creier, piele, schelet	Ceramidază
KRABBE	Galactocerebrozid	Sistem nervos	Galactocerebrozid-β-galactozidază
GAUCHER	Glucocerebrozide	Ficat, splină, ganglioni limfatici	Glucocerebrozid -β-glucozidază
FABRY	Digalactozo-glucocerebrozide	Sistem nervos, vase sanguine, muşchi cardiac	β-Galactozidază
TAY-SACHS	Gangliozidul GM_2	Creier, ficat, splină	β-N-acetil-hexozaminidază
LEUCODISTROFIA METACROMATICĂ	Sulfatide	Creier, ficat, rinichi	Sulfatidază

Studiul gangliozidelor a luat o mare amploare prin descrierea unui număr de maladii ereditare, în care deficitul unor enzime hidrolitice specifice pentru diverse legături din gangliozide, determină întreruperea şirului de reacţii şi acumularea produsului situat **în amonte** de enzima deficitară.

Sfingolipidozele desemnează anumite maladii ereditare care se manifestă prin acumularea diferitelor sfingolipide în sistemul nervos central, în sistemul reticuloendotelial, sau în rinichi asociate cu anumite **enzimopatii**, fiecare caracterizată prin dereglări metabolice specifice din care unele sunt consemnate în tabela 6.4.

6.7 Prostaglandine. Icosanoizi

6.7.1 Generalităţi. Istoric

Denumirea generică de **prostaglandine** a fost introdusă de Von Euler în 1935, pentru a desemna un material lipidic extras din lichidul seminal, care exercită o acţiune contractilă asupra miometrului.

După o perioadă de 20 de ani de stagnare a studiului acestor substanţe, odată cu perfecţionarea tehnicilor de cercetare a lipidelor, interesul pentru prostaglandine s-a amplificat vertiginos după anul 1957.

Incepând cu anul 1964 s-a trecut la realizarea unor prostaglandine sintetice cu o structură analogă celor extrase din plasma seminală.

S-a constatat că nu numai plasma seminală ci toate ţesuturile mamiferelor sintetizează prostaglandine ca răspuns la diverşi stimuli şi acestea sunt implicate în fiziopatologia multor procese fundamentale ca **vasomotricitatea, inflamaţia, tromboza, secreţia gastrică, reproducerea, anticoncepţia, funcţia renală, transmisia nervoasă, respiraţia, metabolismul intermediar etc.**

S-a stabilit multiplicitatea prostaglandinelor propriu-zise, diversitatea acţiunilor fiziologice şi farmacologice, au fost descoperite şi caracterizate noi clase de compuşi înrudiţi.

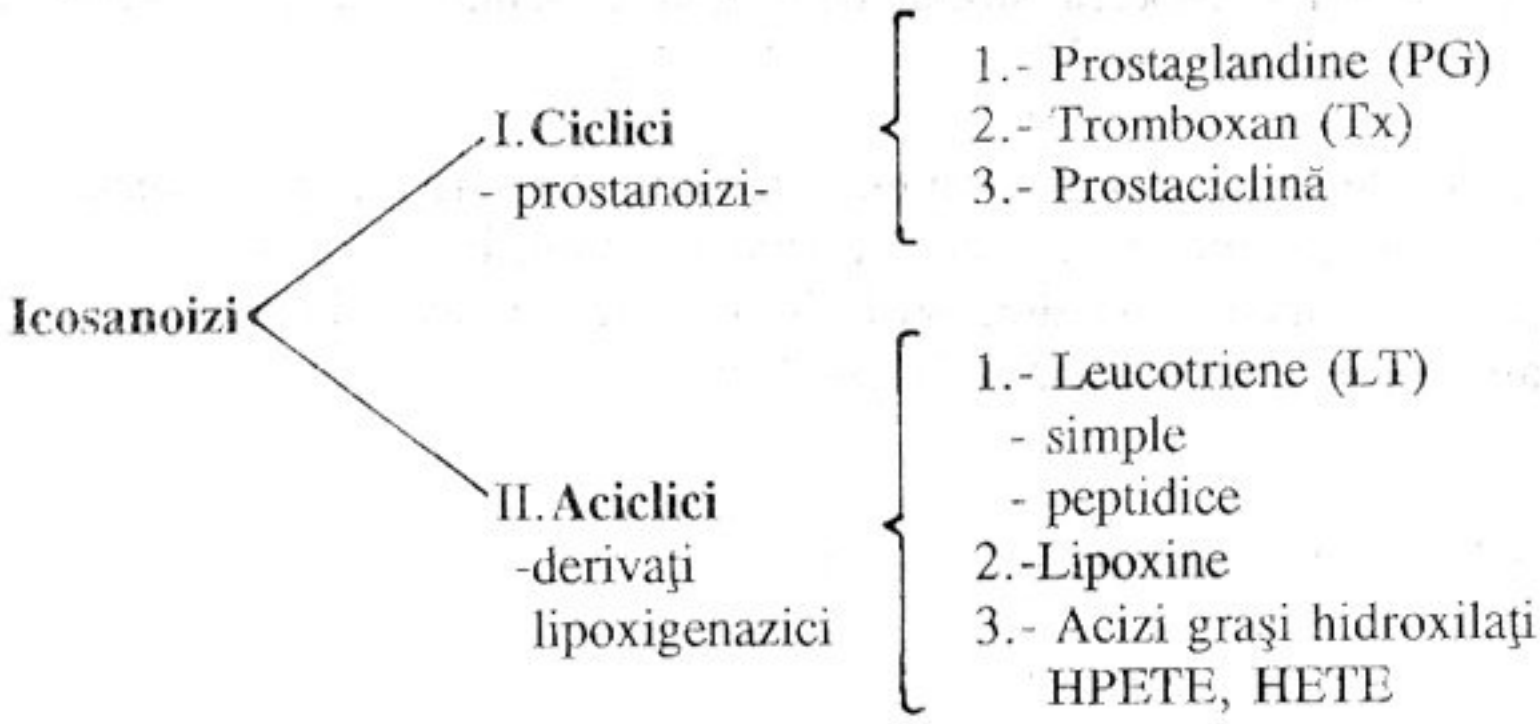
Prostaglandinele reprezintă un grup de substanţe naturale cu implicaţii fără precedent în istoria medicinii.

In anul 1982 premiul Nobel pentru medicină a fost acordat unui grup de 3 cercetători pentru lucrările lor în domeniul prostaglandinelor: profesorul **Sune Bergström** (Institutul Karolinka Suedia) pentru izolarea, purificarea şi determinarea structurii chimice a prostaglandinelor şi pentru descoperirea biosintezei acestora; profesorul **Bengt Samuelson** (Institutul Karolinska Suedia) pentru investigarea metabolismului prostaglandinelor şi descoperirea a două noi clase: **tromboxanii** şi **leucotrienele** şi dr. **John Yane** (Welcome Co. Marea Britanie) pentru explicarea **acţiunii antiinflamatoare a aspirinei** prin activitatea sa antiprostaglandinică şi descoperirea unei noi clase de prostaglandine, denumită **prostacicline**.

6.7.2 Clasificare. Reprezentanţi

Aceasta clasă de lipide biologic active care au ca element comun, filiaţia din acizi graşi nesaturaţi polienici cu 20 atomi de carbon (acid dihomo γ-linolenic, acid arahidonic, acid icosapentaenoic) au fost denumite "**icosanoizi**" de la alcanul ($C_{20}H_{42}$=**icosan**).

O clasificare a icosanoizilor evidenţiază atât structura acestor compuşi cât şi calea enzimatică de biosinteză.



Acidul arahidonic (icosa - 4Δ; 5,8,11,14 - tetraenoic) este **precursorul** comun al prostaglandinelor şi al leucotrienelor.

Produşii sintetizaţi sub acţiunea enzimei **prostaglandin ciclooxigenaza** se numesc **prostanoizi**, iar cei rezultaţi sub acţiunea enzimei **lipoxigenaza** se numesc **derivaţi lipoxigenazici** (leucotriene, lipoxine, acizi graşi hidroxilaţi).

Se cuvine să prezentăm lista abrevierilor utilizate în acest capitol: PG = prostaglandină; TX = tromboxani; LT = leucotrienă; HETE = acid 12 L - hidroxi - 5,8,11,14 - eicosatetraenoic; HPETE = acid 12-L-hidroperoxi - 5,8,11,14 -eicosatetraenoic.

Prostaglandinele sunt compuşii majoritari ai acestei clase de lipide şi reprezintă o categorie de acizi graşi polinesaturaţi cu 20 atomi de carbon care derivă de la ipoteticul acid prostanoic. Caracteristic structurii prostaglandinelor naturale este un ciclu pentanic pe care sunt grefate două catene inegale cu 7 şi respectiv 8 atomi de carbon. La C_1 se află o grupare carboxilică, iar la C_{15} există o grupare hidroxilică.

Diversele prostaglandine naturale se deosebesc prin natura substituenţilor din poziţiile 9 şi 11 ale acidului pentanic şi de existenţa unei duble legături în acest ciclu alcătuind cele 9 serii simbolizate prin literele: A,B,C,D,E,F,G,H,I.

Notaţia prostaglandinelor s-a făcut în momentul descoperirii lor, înaintea stabilirii structurii lor chimice. Prostaglandina denumită "E" a fost izolată dintr-o fază **eterică**, prostaglandina "F" prin extracţie cu tampon **fosfat**, iar prostaglandinele "A"şi "B" s-au obţinut din "E" prin tratare cu **acizi** sau respectiv **baze**.

In raport cu **numărul** de **duble legături** catenare la simbolul seriei se adaugă următorii indici:

- pentru o legătură dublă **trans** între C_{13} - C_{14}, **indice** 1;
- pentru o legătură dublă **trans** C_{13} - C_{14} şi una **cis** între C_5 - C_6, **indice** 2;
- pentru o legătură dublă **trans** C_{13} - C_{14}, una **cis** între C_5 C_6 şi alta **cis** C_{17} - C_{18}, **indice** 3.

Aşadar există 3 subserii de prostaglandine, gradul de nesaturare crescând cu câte o dublă legătură de la subseria 1 la 3 (vezi figura 6.15).

Cele 6 prostaglandine din grupele E şi F_α descoperite primele, s-au denumit **prostaglandine primare**, iar cele derivând din acestea **prostaglandine secundare**.

Pentru substituenţii ciclului pentanic s-a convenit să se utilizeze simbolurile **alfa** (α),

pentru cei aflaţi sub planul imaginii grafice, cu reprezentare prin linie punctată şi **beta** (ß) pentru cei dispuşi deasupra, reprezentaţi prin linie continuă.

Dintre prostaglandinele primare la om cele mai importante sunt $PGF_{2\alpha}$ şi PGE_2.

Denumirile ştiinţifice pentru cele două PG_e sunt:

PGE_2 - acidul 11,15(S) - dihidroxi 9 - ceto - 5 cis - 15 - trans - prostadienoic;

$PGF_{2\alpha}$ - acidul 9,11 15(S) - trihidroxi - 5 cis - 13 - trans - prostadienoic.

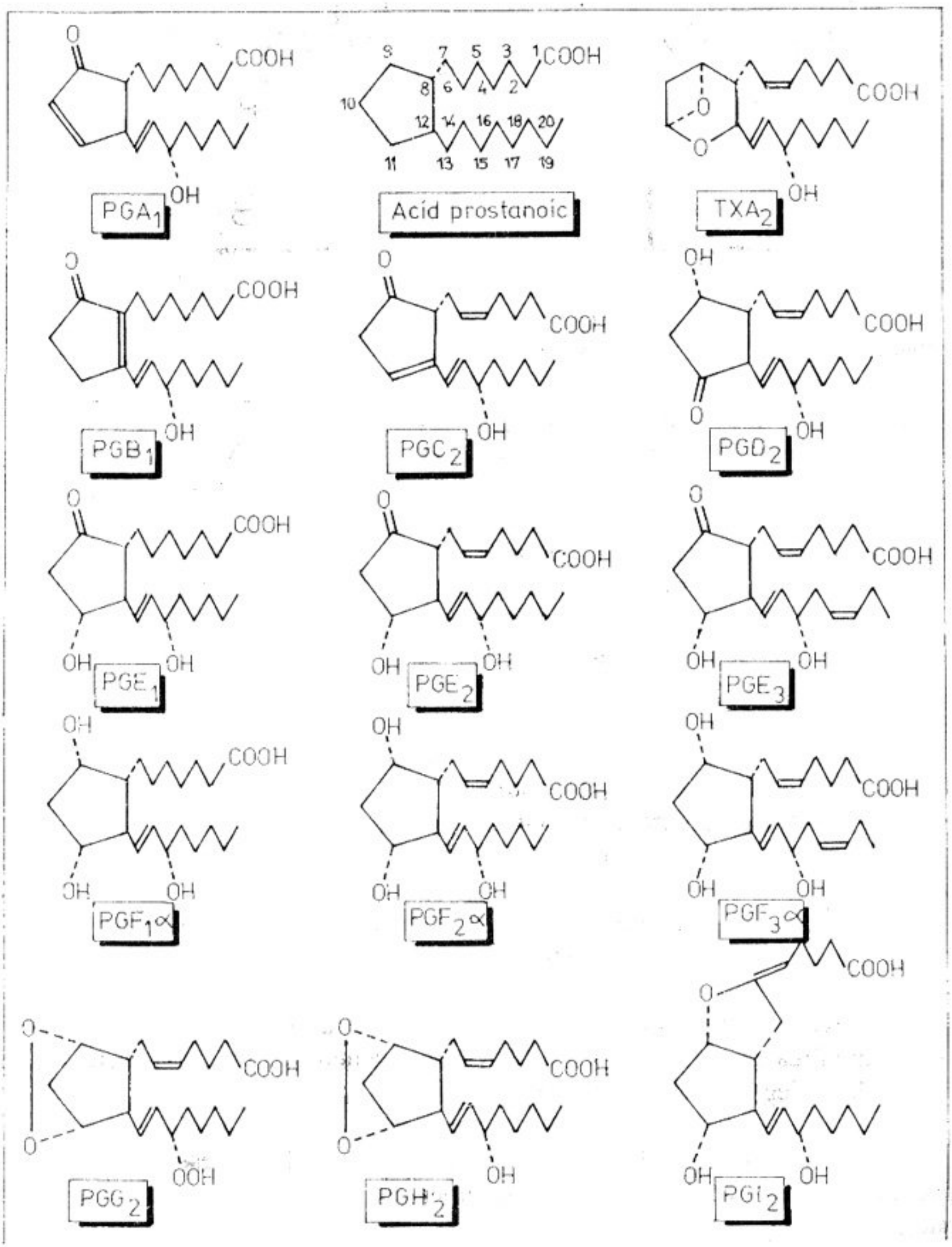
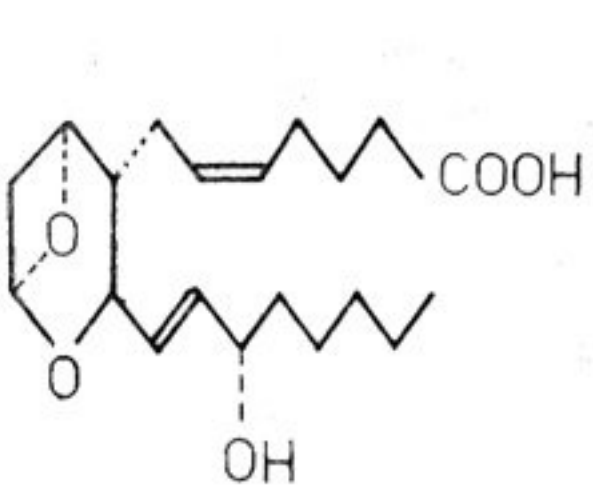
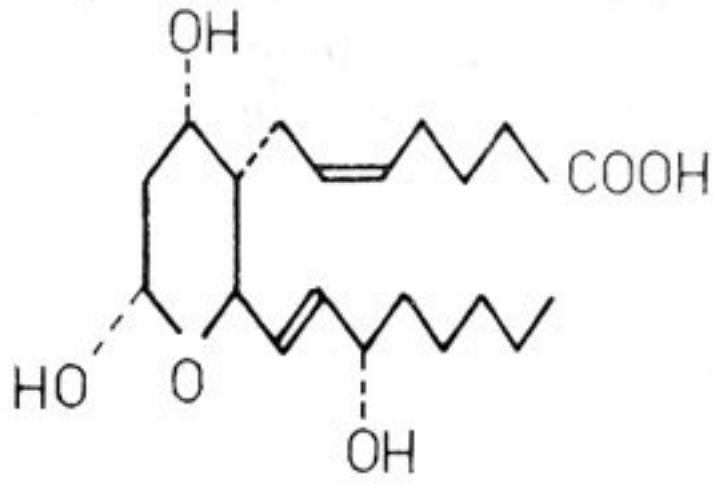


Fig.6.15 **Principalele serii de prostaglandine naturale**

Tromboxanii cuprind un heterociclu piranic (cu oxigen) TXA_2 foarte instabil, trece uşor (enzimatic sau neenzimatic) în TXB_2 prin hidroliza punţii interne eterice:



TXA_2

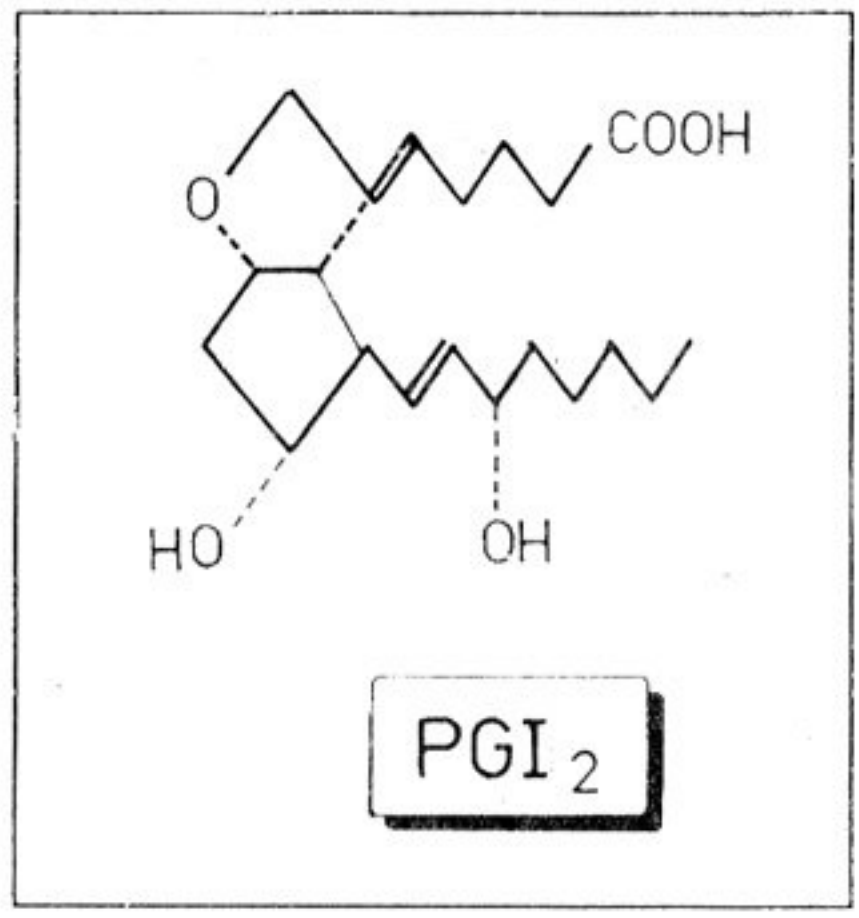


TXB_2

Prostaciclina (PGI_2) se sintetizează în organism ca rezultat al acţiunii enzimei **prostaciclinsintetaza**, asupra unor endoperoxizi proveniţi din acidul arahidonic (vezi schema de biosinteză).

Enzima care catalizează formarea PGI_2 este prezentă în peretele vascular din reţeaua care irigă foarte multe organe.

PGI_2 prezintă structura alăturată; este un produs instabil, dar cu puternice proprietăţi **antiagregatoare**.



PGI_2

Leucotrienele sunt derivaţi oxigenaţi neciclizaţi ai acizilor graşi superiori monocarboxilici de regulă cu 20 atomi de carbon cu 3,4,5 duble legături dintre care cel mai important este acidul arahidonic.

Au fost denumite şi **icosanoizi aciclici** deosebindu-se de **prostanoizi** care provin tot de la acidul arahidonic, dar care posedă în moleculă un ciclu pentanic.

Denumirea de **leucotriene** a fost atribuită acestor substanţe de către Samuelson, care a îmbinat denumirea principalului loc de biosinteză (**leucocite**) cu o caracteristică chimică majoră (trei duble legături conjugate - **trienă**).

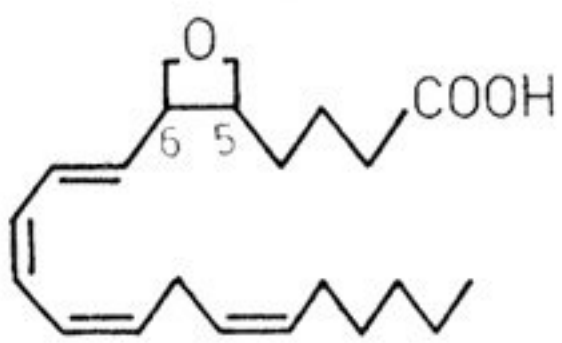
Leucotrienele se pot clasifica în **leucotriene simple** nepeptidice şi **leucotriene peptidice** acestea din urmă fiind legate de o **tiopeptidă** (glutationil cisteinil glicină, cisteinil glutamic).

In ceea ce priveşte nomenclatura leucotrienelor este necesar să fie făcute anumite precizări:

- ◆ - fiecare leucotrienă este simbolizată printr-o literă majusculă de la A la F;

◆ - fiecare literă majusculă este urmată de o cifră care precizează numărul dublelor legături din moleculă;

◆ - leucotriena A_4 (LTA_4) care are patru duble legături în moleculă este "acidul 5(S), 6(S) - epoxido - icosa - 7,9,11,14 - tetraenoic" şi are ca precursor **acidul arahidonic**:

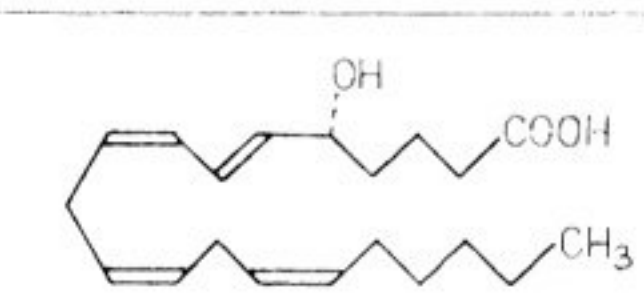


LTA$_4$

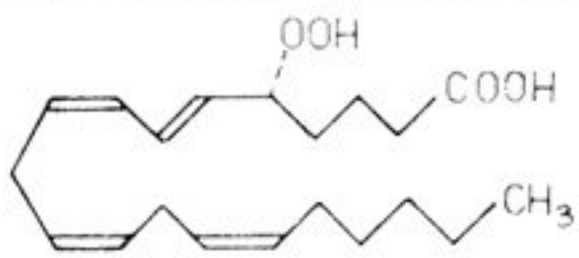
Deosebit de numeroşi şi importanţi sunt precursorii imediaţi ai leucotrienelor şi anume acizii **hidroxi** sau **hidroperoxiicosatetraenoici** rezultaţi prin oxidarea acidului arahidonic pe calea lipoxigenazică.

Pentru o exprimare mai simplă aceşti acizi sunt simbolizaţi prin iniţialele HETE şi HPETE mai indicându-se şi poziţiile funcţiunilor hidroxil din moleculă.

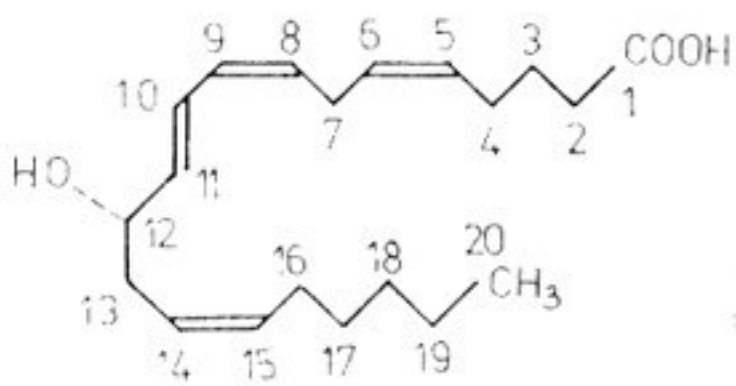
De exemplu, acidul 5 hidroxi - icosa - 6,8,11,14 - tetraeonic este notat cu **5-HPETE**, acidul 5-12 dihidroxi - icosa 6,8,11,14 - tetraenoic este notat **5,12-di HETE** (prezentaţi mai jos).



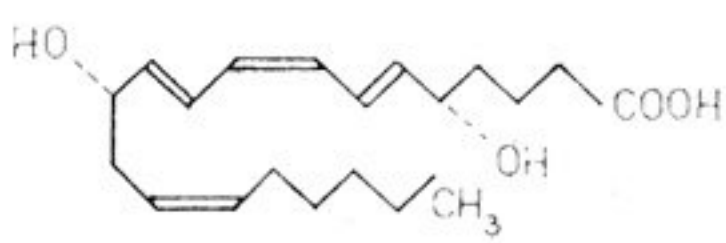
5-HETE



5-HPETE

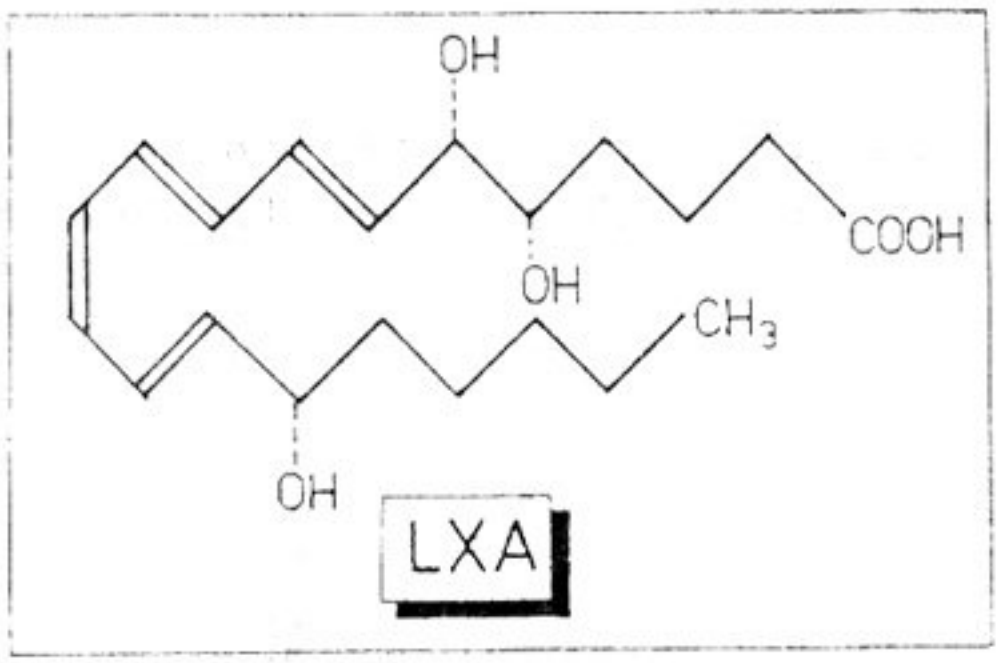


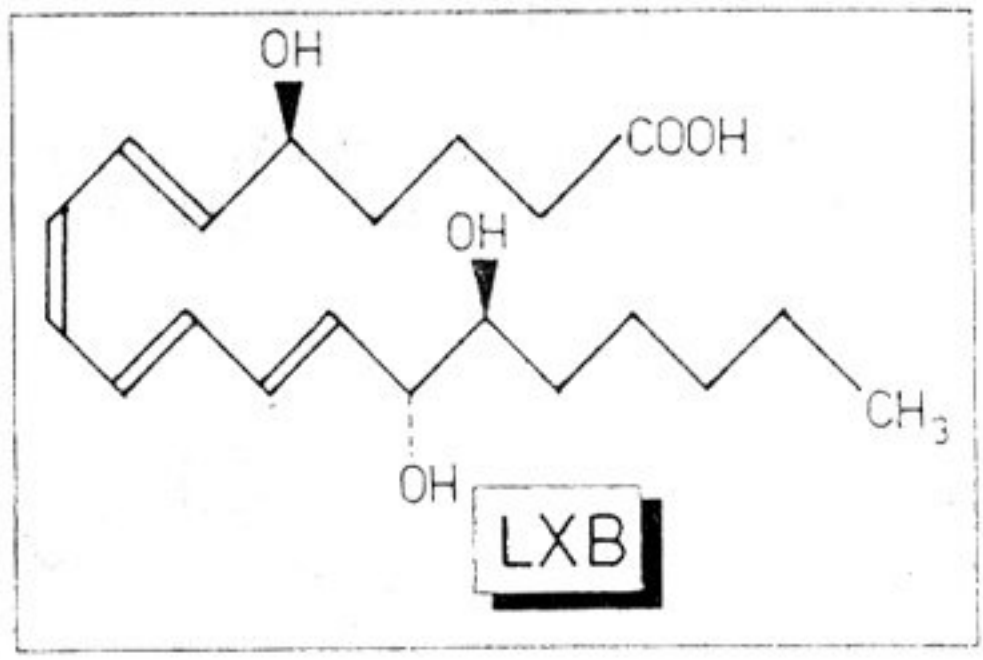
12-HETE



5 (S),12 (S)- diHETE

Ulterior s-a descoperit o enzimă prezentă în neutrofilele de om, care produce din 15-HPETE o nouă categorie de acizi graşi tetraenoicitrihidroxilaţi care au fost denumite **lipoxine**. Aceste noi substanţe din grupul acizilor polihidroxilaţi s-au dovedit active biologic, stimulând **degranularea neutrofilelor**.





In tabela 6.5 sunt prezentaţi o parte din icosanoizii naturali cu denumirea lor sistematică şi prescurtarea în nomenclatura lui Bergström (după B.Samuelson, 1975).

Tabela 6.5 **Principalii icosanoizi naturali**

Denumiri uzuale	Prescurtări	Denumiri chimice
Prostaglandină E_1	PGE_1	Acid 11α 15α-dihidroxi - 9 ceto - - 13 trans - prostaenoic
Prostaglandină E_2	PGE_2	Acid 11α 15α-dihidroxi - 9 ceto - - 5 cis,13 trans - prostadienoic
Prostaglandină E_3	PGE_3	Acid 11α 15α-dihidroxi - 9 ceto - - 5,13,17 - prostatrienoic
Prostaglandină $F_{1\alpha}$	$PGF_{1\alpha}$	Acid 9α,11α,15α-trihidroxi - - 13 prostaenoic
Prostaglandină $F_{2\alpha}$	$PGF_{2\alpha}$	Acid 9β,11α,15α-trihidroxi - - 5 cis,13 trans - prostadienoic
Prostaglandină $F_{3\alpha}$	$PGF_{3\alpha}$	Acid 9α,11α,15α-trihidroxi - 5,13,17 - prostatrienoic
Prostaglandină $F_{1ß}$	$PGF_{1ß}$	Acid 9ß,11α,15α-trihidroxi - - 13 prostaenoic
Prostaglandină $F_{2ß}$	$PGF_{2ß}$	Acid 9ß,11α,15α-trihidroxi - - 5,13 - prostadienoic
Prostaglandină A_1	PGA_1	Acid 15α - hidroxi - 9 - ceto - 10,13 - - trans - prostadienoic
Prostaglandină A_2	PGA_2	Acid 15α - hidroxi - 9 - ceto - 5(cis), 10,13(trans) - prostatrienoic
Prostaglandină B_1	PGB_1	Acid 15α - hidroxi - 9 - ceto -8(12), 13(trans) - prostadienoic
Prostaglandină C_1	PGC_1	Acid 15α - hidroxi - 9 - ceto - 11, 13(trans) - prostadienoic
Prostaglandină D_1	PGD_1	Acid 9α,15-dihidroxi - 11 - ceto - 13(trans) - prostaenoic

Tabela 6.5 (continuare)

Prostaglandină G_2	PGG_2	Acid 15- hidroperoxi - 9α,11α peroxido - 5(cis),13(trans) - prostadienoic
Prostaglandină H_2	PGH_2	Acid 15- hidroxi - 9α,11α - peroxido - 5(cis),13(trans) - prostadienoic
Prostaciclină	PGI_2	Acid 11.15-dihidroxi -6,9α epoxi - - 5,13 - prostadienoic
Leucotrienă A_4	LTA_4	Acid 5(S),6(S) -epoxido - 7,9,11,14 - icosatetraenoic
Leucotrienă C_4	LTC_4	Acid 5(S) -hidroxi - 6(R) - S - glutationil - 7,9 trans - 11,14 cis - icosatetraenoic
Acid hidroxi icosa tetraenoic	5-HETE	Acid 5 - hidroxi - icosa - 6,8,11,14 - -tetraenoic
Acid dihidroxi icosa tetraenoic	5,12-di HETE	Acid 5,12 -dihidroxi - icosa - 6,8,11,14 - -tetraenoic
Acid hidroperoxi icosa tetraenoic	5-HPETE	Acid 5-hidroperoxi - icosa - 6,8,11,14 - -tetraenoic
Lipoxină A	LXA	Acid α 5,6,15- trihidroxi - icosa - -7,9,11,13 - tetraenoic
Lipoxină B	LXB	Acid 5,14(S),15- trihidroxi - icosa - -6,8,10,12 - tetraenoic

6.7.3 Biosinteza icosanoizilor

Principalele clase de icosanoizi ciclici şi aciclici, deşi prezintă anumite particularităţi structurale distincte, au o **cale comună** de biosinteză.

Icosanoizii sunt **ubicuitari** în corpul **uman** şi al animalelor superioare şi de aceea sinteza acestora are loc la nivelul tuturor ţesuturilor, fiecare tip de celulă fiind capabilă să sintetizeze unul sau mai mulţi reprezentanţi din această clasă.

Spre deosebire de alţi mediatori biochimici (hormoni, neurotransmiţători) icosanoizii **nu sunt depozitaţi** în celule ca atare sau sub formă de precursori; imediat după biosinteză sunt eliberaţi şi acţionează imediat. Biosinteza de prostaglandine este declanşată de o diversitate foarte mare de **stimuli** (umorali, electrici, mecanici) care ajung la nivelul membranelor celulare (vezi fig 6.16).

I.- Prima fază a acestei succesiuni de reacţii care conduce la sinteza şi eliberarea de icosanoizi este o modificare a "stării fosfolipidelor membranare" sau activarea fosfolipazei A_2 care atacă hidrolitic legătura esterică din poziţia 2 a glicerofosfolipidelor (fosfatidilcoline, fosfatidilcolamine, fosfatidilserina, fosfatidilinozitoli) eliberând un acid gras nesaturat (acidul dihomo γ-linolenic, acidul arahidonic şi acidul icosa pentaenoic). Aceşti acizi graşi nesaturaţi şi în special acidul **arahidonic** reprezintă precursorii icosanoizilor.

Fosfolipaza A_2 are un rol predominant în **iniţierea** şi chiar **reglarea** întregului lanţ metabolic.

II.- In etapa secundă acidul arahidonic este metabolizat pe două căi enzimatice distincte:

1. calea **cicloxigenazei** prin care enzima **prostaglandin cicloxigenază** formează **prostaglandine primare, tromboxani, prostaciclină**.

2. calea **lipoxigenazei** prin care diferite enzime numite **lipoxigenaze** produc **leucotriene, lipoxine** şi **acizi graşi hidroxilaţi**.

Factorii enumeraţi mai jos pot determina **cantitatea, seria** şi **subseria** de PG sintetizate de diverse celule:

- ◆ - natura substratului disponibil (acid icosatrienoic, tetraenoic sau pentaenoic);
- ◆ - echipamentul enzimatic celular, raportul cicloxigenază/lipoxigenază şi prezenţa altor enzime specifice unora dintre ramificaţii;
- ◆ - prezenţa unor inhibitori specifici ai uneia dintre căi;
- ◆ - natura stimulului determinant: traumă, ischemie, catecolamine etc.

Cicloxigenaza (**prostaglandin-sintetaza**) este o hemoproteidă cu activitate dublă, **dioxigenazică** (încorporează molecula O_2 în substrat) şi **peroxidazică** (descompune peroxizi) din care se obţin endoperoxizi ciclici PGG_2 şi PGH_2 care deşi sunt compuşi labili au şi ei activităţi biologice. De la endoperoxizi se ramifică trei căi de sinteză sub acţiunea a trei enzime distincte:

1. **prostaglandin-izomeraza** - conduce la sinteza unor prostaglandine clasice (PGE_2, $PGF_{2\alpha}$, PGD_2) şi este localizată în special în pulmon, creier, stomac, muşchi;
2. **prostaciclin-sintetaza** - conduce la sinteza de prostaciclină (PGI_2) fiind localizată în special în endoteliul vascular, inimă şi corpul galben;
3. **tromboxan-sintetaza** - conduce la sinteza de tromboxani (TXA_2 şi TXB_2) fiind localizată predominant în creier, inimă, fibroblaşti de pulmon, splină, leucocite, plachete.

Predominanţa uneia sau alteia dintre aceste căi de biosinteză, este determinată de **profilul enzimatic** specific fiecărui ţesut.

Prin acţiunea **lipoxigenazelor** asupra acidului arahidonic, iau naştere **leucotrienele, lipoxinele** şi **acizi graşi hidroxilaţi**.

De la 5-HPETE se obţin leucotrienele (cuprind trei legături duble conjugate cu configuraţie cis). Primul compus şi cel mai activ obţinut este LTA_4,de la care prin desfacerea punţii eterice şi alte remanieri se obţine LTB_4, sau LTC_4 prin fixarea glutationului (sub acţiunea glutation S-transferazei).

Din ceilalţi doi precursori (acidul dihomo γ linolenic şi acidul icosapentaenoic) se formează LTC_3 şi respectiv LTC_5,ca şi alţi icosanoizi în cantităţi nesemnificative comparativ cu calea acidului arahidonic.

Lipoxigenaza şi cicloxigenaza pot exista concomitent în aceeaşi celulă, care este capabilă să producă leucotriene şi prostanoizi.

Succesiunea de reacţii pe calea arahidonatului poate fi blocată la diverse niveluri prin acţiunea unor inhibitori, care pot fi compuşi naturali endogeni, dar şi numeroşi compuşi de sinteză, mulţi dintre aceştia agenţi medicamentoşi.

Cascada de reacţii din etapa iniţială,poate fi întreruptă prin acţiunea **corticosteroizilor** asupra **fosfolipazei A_2** care eliberează substratul.

Majoritatea substanţelor care interferează sinteza de prostanoizi acţionează la nivelul PGH_2-sintetazei. Exemplul cel mai concludent în acest sens îl constituie **medicamentele antiinflametoare nesteroidice** care intră în competiţie cu acidul arahidonic pentru legarea de centrul activ al cicloxigenazei. Inhibiţia pe care o dau aceste substanţe este de două feluri: a) Substanţe care dau o **inhibiţie ireversibilă** a enzimei. Din această grupă exemplul cel mai reprezentativ este **aspirina** (acid acetil salicilic) care acetilează aminoacidul **serină** din structura ciclooxigenazei.

Plachetele sunt mai sensibile la aspirină deoarece nu au capacitatea de a reînnoi moleculele de enzimă modificate şi ciclooxigenaza pe toată durata existenţei lor. In alte tipuri

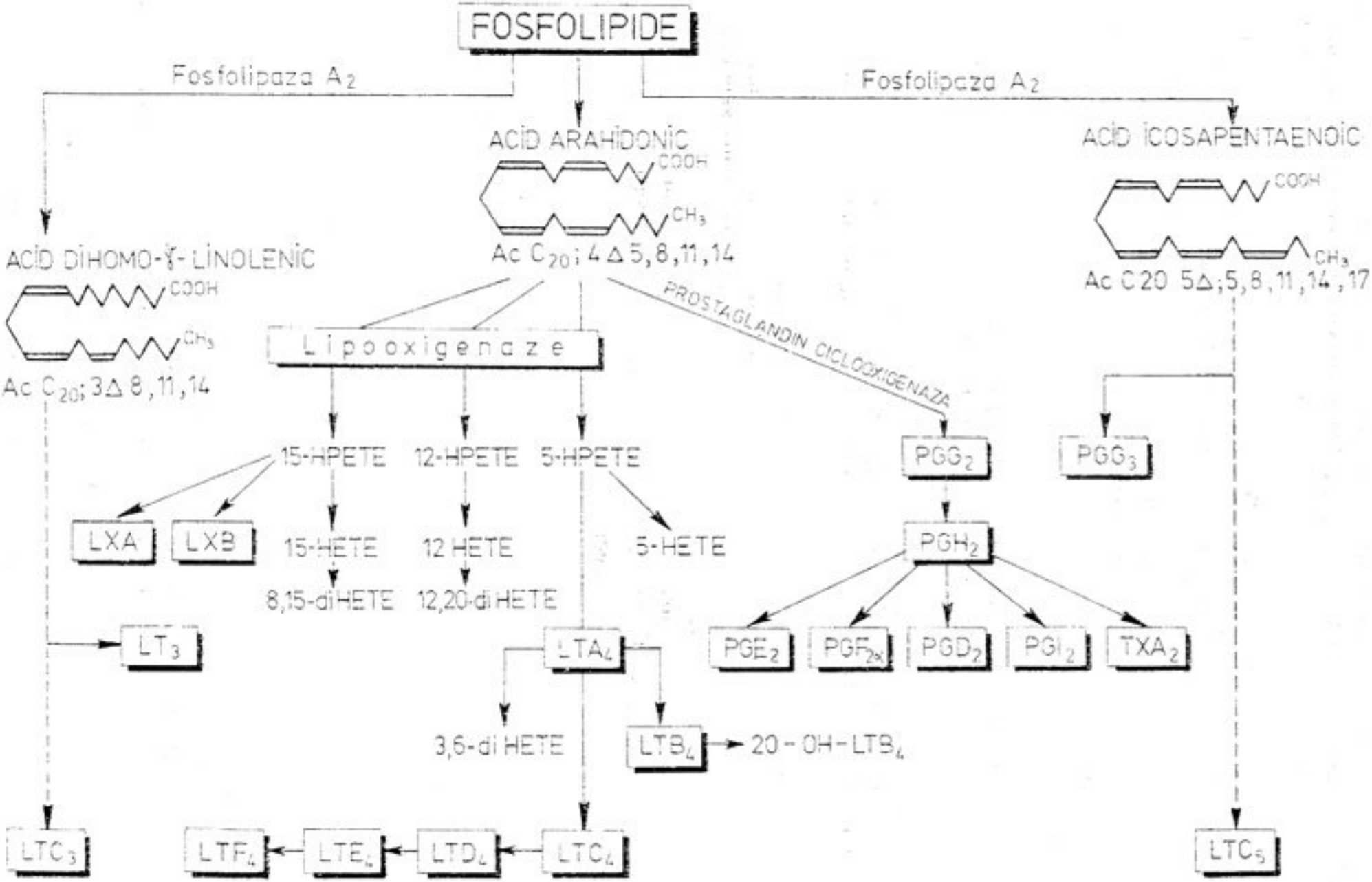


Fig 6.16 BIOSINTEZA ICOSANOIZILOR

de celule (endoteliul vascular) sinteza de noi molecule enzimatice înlocuieşte treptat moleculele inactivate. Din această categorie de inhibitori mai fac parte **acidul meclofenamic** şi **flubiprofenul**.

b) Substanţe ce dau o **inhibiţie reversibilă** a enzimei: **naproxenul, acidul fluferamic, indometacinul** (care produce o inhibiţie parţial reversibilă).

O serie de compuşi cu acţiune medicamentoasă au fost studiaţi pentru capacitatea lor de a inhiba selectiv biosinteza icosanoizilor, de a dirija calea de biosinteză pentru formarea unui anume compus.

6.7.4 Rolurile biologice ale icosanoizilor

Icosanoizii reprezintă un grup de substanţe cu activităţi biologice multiple şi diverse, care depind nu numai de **natura compusului**, dar şi a **tipului celular, a speciei**.

De foarte mulţi ani, în acelaşi tip de celulă acţiunile exercitate de către unele sau altele dintre icosanoizi sunt opuse (de exemplu contractă sau relaxează musculatura netedă, favorizează sau împiedică agregarea plachetară) astfel încât balanţa dintre cele două efecte determină natura şi amploarea răspunsului biologic.

La fel ca toţi compuşii cu caractere hormonale, icosanoizii acţionează prin "**transmiterea informaţiei**" care declanşează activităţi celulare specifice, ceea ce înseamnă că ele joacă un rol de "prim mesager" atunci când sunt recunoscute de către celule ţintă ale organelor efectoare.

Icosanoizii îşi exercită acţiunile lor diverse după fixarea acestora pe **receptori specifici** (o moleculă de proteină). sau zone cu afinitate crescută pentru aceşti stimuli. Receptorii icosanoizilor sunt localizaţi la nivelul **membranei celulare** sau la nivelul **membranei** unor **organite celulare.**

6.7.4.1 Mecanismul de acţiune al PGe la nivelul celular

Mecanismul de acţiune al PGe la nivel celular îşi găseşte în mare măsură explicaţia în conceptul celui de-al doilea mesager (Sutherland, 1972).

Explicarea mecanismului de acţiune al PGe prin modificarea nivelului AMPc a beneficiat de numeroase informaţii şi confirmări prin studiile asupra procesului de **luteoliză** (inhibiţia secreţiei de progesteron).

Intervenţia PGe în sinteza de progesteron se realizează prin scăderea nivelului AMPc din celulele luteale.

Pentru explicarea acestui proces Henderson şi Mc.Natty folosesc modelul ipotetic al **adenilat ciclazei**, prin care aceasta este formată, pe lângă **unitatea regulatoare** şi **catalitică** şi dintr-o a treia componentă, **interconectată, unitatea de cuplare**.

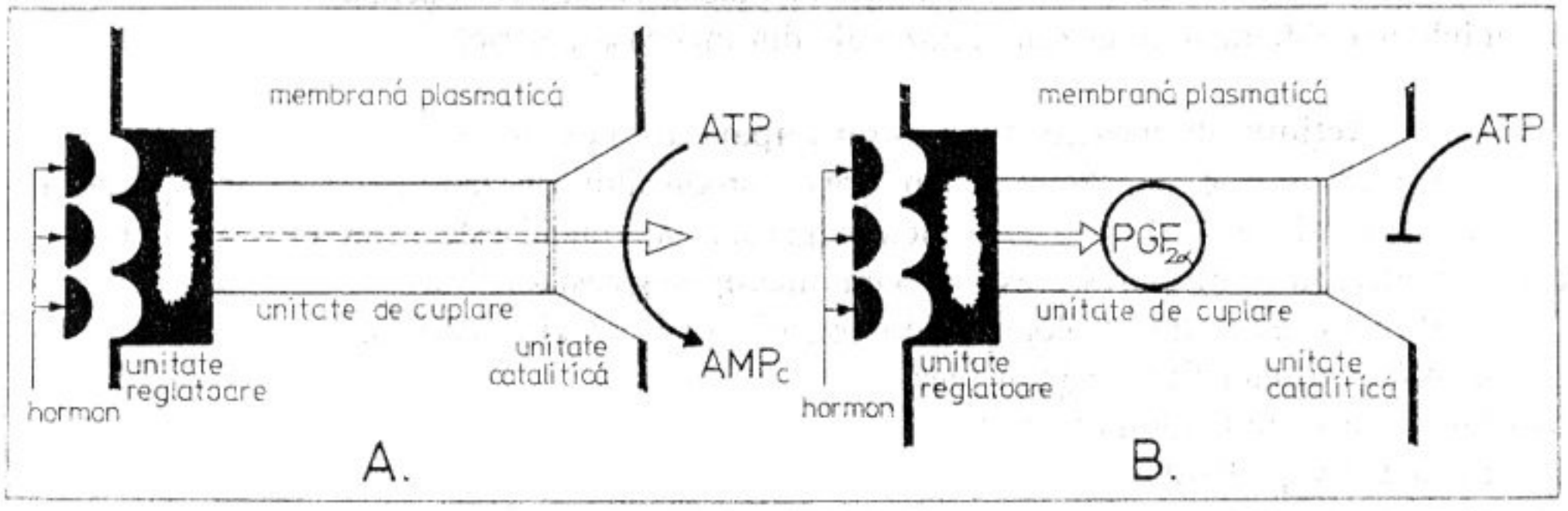


Fig.6.17 **Modelul sistemului adenilatciclază cu 3 componente (A) şi intervenţia $PGF_{2\alpha}$ la nivelul unităţii de cuplare (B) - după Henderson şi Mc.Natty**

Unitatea de cuplare are rolul ca în momentul contactului cu molecula unui hormon să conducă un semnal de la unitatea regulatoare spre unitatea catalitică, rezultatul fiind o stimulare a adenilatciclazei şi deci o creştere a concentraţiei de AMPc. Henderson şi Mc.Natty emit ipoteza că PGF_2 acţionează la nivelul acestei unităţi de cuplare prin **oprirea semnalului** care activează unitatea catalitică şi ca o consecinţă scade sinteza de AMPc şi deci sinteza de progesteron (vezi fig.6.17).

6.7.4.2 Acţiunile biologice ale icosanoizilor asupra organismului uman

La baza tuturor efectelor biologice ale icosanoizilor stau trei acţiuni principale:

- la nivelul **terminaţiei nervoase**;
- asupra fibrei musculare netede;
- la nivelul **membranei** celulare.

Vom urmări pe rând o parte din implicaţiile biologice ale icosanoizilor la nivelul unor ţesuturi, organe şi sisteme.

I.- **Acţiunea icosanoizilor asupra sistemului digestiv**

Icosanoizii sunt sintetizaţi şi eliberaţi în cantităţi apreciabile la nivelul tubului digestiv. PGe acţionează asupra musculaturii netede pe întreaga lungime a tubului digestiv: esofag, stomac, intestin subţire şi colon.

Acţiunile biologice ale icosanoizilor asupra sistemului digestiv se pot rezuma astfel:

a) PGE **contractă musculatura longitudinală** şi o **relaxează pe cea circulară**;
b) PGF determină contracţia ambelor forme de musculatură (longitudinală şi circulară);
c) PGI_2 are un rol **citoprotector** al mucoaselor gastrice şi intestinale;
d) PGI_2 are un rol în menţinerea unei **irigaţii sanguine** în mucoasa tubului digestiv;
e) PGI_2 intervine în reglarea **motilităţii intestinale**;
f) PGI_2 intervine în **reglarea transportului** transepitelial intestinal.

Se consideră că există cel puţin patru mecanisme prin care PGI_2 are o acţiune protectoare asupra mucoasei gastrice faţă de factorii ulcerogeni:

1 - inhibarea secreţiei de HCl;
2 - **vasodilataţia** cu creşterea fluxului sanguin în mucoasa gastrică;

3 - acţiunea **antitrombotică** la nivelul vaselor mucoasei gastroduodenale;
4 - inhibarea eliberării de enzime lizozonale din mucoasa gastrică.

II.- **Acţiuni ale icosanoizilor asupra aparatului excretor**

Rinichiul este cunoscut ca un organ producător de icosanoizi şi în special de prostaglandine E şi A. Localizarea ciclooxigenazei în rinichi este la **nivelul glomerulului** care sintetizează în proporţii crescute **tromboxanii** şi **prostaciclina**.

Principalele roluri biologice ale icosanoizilor la nivel renal sunt:
a) - menţinerea unui flux sanguin renal;
b) - creşterea filtrării glomerulare;
c) - rol nutritiv şi diuretic;
d) - inhibiţia reabsorbţiei de sodiu şi homeostazia apei;
e) - efecte stimulatoare asupra hemodinamicii renale a funcţiei excretorii renale;
f) - sunt în relaţii de interdependenţă cu sistemul **renină-angiotensină**;
g) - implicaţia PGe în hipertensiunea sistemică este explicată prin rolul lor antagonist faţă de agenţii vasopresori (angiotensina, noradrenalina, aldosteronul) la nivel renal.

III.- **Acţiuni ale icosanoizilor asupra sistemului nervos central**

Prezenţi în absolut toate structurile sistemului nervos central şi periferic, icosanoizii au acţiuni foarte puternice asupra acestor structuri şi sunt eliberaţi din creier şi măduva spinării prin intervenţia unor stimuli nervoşi şi chimici. Icosanoizii desfăşoară, la acest nivel, o multitudine de acţiuni incluzând modificări ale comportamentului, funcţiilor motorii, reglării temperaturii, reglării debitului sanguin cerebral, eliberării mediatorilor chimici nervoşi etc. Acţiunile biologice se pot rezuma astfel:
a) - PG sunt considerate a funcţiona ca **modulatori** ai **neurotransmisiei sinaptice**;
b) - determină modificări ale nivelului nucleotidelor ciclice (PGE stimulează sau inhibă **adenilat ciclaza** în timp ce PGF acţionează în acelaşi loc asupra guanilat ciclazei);
c) - PGE scade concentraţia GMPc cu efecte tranchilizante, anticonvulsionante, iar $PGF_{2\alpha}$ creşte concentraţia 3',5'-GMPc cu efecte contrare;
d) - PG au fost incriminate în mecanismul de producere a **migrenei** ca şi în acela al durerilor de cap posttraumatice, pentru că PGe provoacă **reducerea debitului sanguin cerebral**, sau ca urmare a vasoconstricţiei cerebrale;
e) - eliberarea de noradrenalină (NA) creşte când se inhibă sinteza de PGe şi scade când are loc o sinteză crescută de PGe.

IV.- **Acţiunile icosanoizilor asupra sistemului reproducător**

Icosanoizii au fost identificaţi şi au acţiuni atât la nivelul aparatului genital masculin cât şi feminin.

A. **La nivelul aparatului genital feminin**

Tractul genital feminin elaborează în mod diferenţiat din punct de vedere topografic şi în strânsă relaţie cu fazele ciclului sexual diverse PGe.

Raportul dintre prostaciclină, tromboxani şi prostaglandine E este major implicat în reglarea fazelor ciclului luteal şi a lungimii acestora.

Acţiunea biologică a PGe asupra miometrului este cunoscută; PGE_1, PGE_2, PGE_3 descresc tonusul, frecvenţa şi amplitudinea contracţiilor spontane ale uterului uman izolat.

$PGF_{2\alpha}$ şi analogi sintetici ai acesteia au acţiune contractilă asupra musculaturii netede din uter şi sunt utilizate la declanşarea travaliului, în **avortul terapeutic**.

Prin studii asupra femeii gravide s-a ajuns la concluzia că pe parcursul sarcinii există

un anumit raport între TXA_2/PGI_2; schimbarea acestui raport duce la grave tulburări ale evoluţiei normale a sarcinii cum sunt:
- hipertensiune de sarcină;
- întârziere în dezvoltarea intrauterină;
- insuficienţă placentară cronică.

B. **La nivelul aparatului genital masculin**

Veziculele seminale sunt activ producătoare de icosanoizi, o parte din aceşti compuşi ajungând la lichidul seminal, care este cel mai concentrat lichid biologic în icosanoizi dintre toate ţesuturile şi organele. Icosanoizii influenţează spermatogeneza, mobilitatea şi procesul de fertilitate.

La nivelul veziculelor seminale există o mare cantitate de ciclooxigenază care metabolizează acizii graşi polinesaturaţi la prostaglandine, tromoxani şi prostaciclină. Prezenţa PGe în concentraţie fiziologică în spermă este o indicaţie a bunei funcţionări a aparatului reproducător.

V.- **Acţiunile icosanoizilor asupra sistemului respirator**

Sistemul respirator este unul dintre cele mai implicate atât în sinteza cât şi catabolizarea icosanoizilor. Pulmonul este probabil, alături de ficat, cel mai bine echipat enzimatic dintre toate organele pentru a interveni în metabolizarea acizilor graşi şi polinesaturaţi, atât pe calea ciclooxigenazei cât şi pe calea lipooxigenazei.

Sulfidoleucotrienele LTD_4şi LTC_4 sunt puternici factori **bronhoconstrictori**. Rolul compuşilor rezultaţi pe calea lipooxigenazei în producerea contracţiilor musculaturii netede bronşice este superior celui al compuşilor rezultaţi pe calea ciclooxigenazei.

Studii farmacologice au evidenţiat faptul că **peptidoleucotrienele** sunt **agenţi miotropi** puternici la nivelul musculaturii netede respiratorii.

PGI_2 şi TXA_2 se produc şi acţionează atât la nivelul parenchimului pulmonar, cât şi la nivelul căilor aeriene inferioare, astfel PGI_2 se manifestă ca un **vasodilatator** în timp ce TXA_2 ca **vasoconstrictor**.

Leucotrienele sunt cei mai puternici factori **bronhoconstrictori** dar acţionează concertat cu TXA_2 a cărei sinteză este stimulată (de LTC_4 şi LTD_4) având o acţiune **bronhoconstrictoare** mai mare de 500 de ori decât histamina.

Realizând simultan vasodilataţie pulmonară şi reglând în bună măsură **fluxul sanguin pulmonar**, pe de o parte, şi suprimând bronhoconstricţia, pe de altă parte, prostaciclina (PGI_2) este un factor important de corelare a fluxului sanguin pulmonar cu debitele ventilatorii.

VI.- **Acţiunea icosanoizilor asupra sistemului cardiovascular**

Icosanoizii acţionează ca modulatori în activitatea cardiacă, în reglarea tonusului musculaturii şi a permeabilităţii endoteliului arterelor şi venelor, în dirijarea funcţiilor variate ale sângelui şi elementelor figurate.

Prostaciclina (PGI_2) şi tromboxanul (TXA_2) formează un sistem de control al homeostazei tonusului vaselor sanguine şi al grupării plachetare. TXA_2 are acţiune contractilă asupra musculaturii netede din vasele periferice, din arterele coronariene, de creştere a tensiunii arteriale. Prostaciclina are acţiuni opuse cu cele exercitate de TXA_2, relaxează musculatura vaselor şi este un factor antitrombic, împiedică agregarea plachetelor.

Acţiunea esenţială a icosanoizilor asupra sistemului circulator (vezi tabela 6.6) se exercită prin modularea diversă a tonusului musculaturii netede vasculare.

Tabela 6.6 **Activitatea cardiovasculară a icosanoizilor**

Segmentul sau funcţia	PGI_2	TXA_2	$PGF_{2\alpha}$	PGE_2
Tensiunea arterială	scădere	creştere	creştere	scădere
Musculatură netedă vasculară	relaxare	contracţie	contracţie	relaxare
Vase periferice	-	contracţie	-	relaxare
Arteriole	-	-	contracţie	relaxare
Artere coronariene	relaxare	contracţie	-	contracţie
Permeabilitatea capilarelor	creştere	-	scădere	creştere
Agregarea plăcuţelor sanguine	inhibare	stimulare	inhibare	inhibare

VII.- **Implicaţii hematologice ale icosanoizilor**

Elementele figurate ale sângelui sunt puternic implicate în metabolizarea icosanoizilor atât în fiziologia normală cât şi în unele procese patologice hematologice.

Proprietăţile **reologice** ale eritrocitului sunt influenţate de concentraţiile fiziologice de **catecolamine** şi **prostaglandine**. Flexibilitatea membranei eritrocitului şi deci deformabilitatea acestuia sunt influenţate de PGE_1 şi PGE_2.

$PGE_{2\alpha}$ **scade** activitatea enzimei glucozo 6-fosfat dehidrogenaza.

PGE_2 şi PGD_2 au un efect de **stimulare** a **eritropoiezei** în măduvă şi a **eritropoietinei**.

Prostaciclina (PGI_2) produsă de endoteliul vascular şi de musculatura vasculară este cel mai puternic factor antiagregant plachetar din organismul uman.

PGE_1, PGD_2, PGI_2 agenţi antiagreganţi plachetari au ca mecanism comun de acţiune creşterea concentraţiei plachetare de AMP-ciclic.

Leucotrienele au fost izolate din leucocite motiv pentru care sunt implicate profund în diverse funcţii la nivel leucocitar: agregarea leucocitelor, adeziunea la endoteliul vascular, producerea de anioni superoxid, degranularea leucocitelor, influenţa transportului cationic transmembranar etc.

LTB_4 influenţează puternic distribuţia intracelulară a calciului în leucocite deoarece realizează cel puţin două acţiuni importante în acest domeniu:

a) - acţiune de ionofor pentru Ca^{2+};

b) - eliberarea rapidă a calciului legat de membranele intracelulare.

VIII.- **Implicaţii ale icosanoizilor asupra sistemului endocrin**

Sistemul endocrin care se află sub controlul sistemului nervos central, are rolul de reglare a vitezei şi intensităţii proceselor metabolice, precum şi a funcţiilor de creştere şi dezvoltare a organismului respectiv.

Incercarea de a clasa PGe în rândul hormonilor **nu a reuşit** deoarece PGe sunt elaborate de majoritatea ţesuturilor şi nu de formaţiuni glandulare:

- acţionează asupra tuturor organelor;
- au un rol reglator-modulator al sintezei şi acţiunii hormonilor;
- au rolul de legătură funcţională între sistemul endocrin şi cel al mediatorilor chimici.

Implicaţiile endocrine ale icosanoizilor se exercită în special asupra **hipofizei, suprarenalei, tiroidei, pancreasului, gonadelor** etc.

Prostaglandinele din seria E stimulează secreţia de LH, FSH, STH, ACTH, TSH, insulină etc.

Departe de a epuiza întreaga paletă a implicaţiilor biologice ale icosanoizilor, se precizează că toate ţesuturile mamiferelor îi sintetizează ca răspuns la diverşi stimuli, iar acţiunile lor se manifestă practic la nivelul tuturor organelor şi ţesuturilor odată cu implicarea acestora în fiziopatologia multor procese fundamentale pentru organismul uman.

Alături de marile progrese în domeniul geneticii moleculare icosanoizii constituie una dintre cele mai mari achiziţii în arsenalul biochimiei, fiziologiei şi patologiei celulare moderne.

6.8 Biomembrane

6.8.1 Tipuri de biomembrane

Progresele citologiei datorate în special **microscopului electronic**, au permis evidenţierea compartimentării celulei printr-un sistem complex de membrane celulare.

Membranele celulare, denumite generic **biomembrane** reprezintă formaţiuni moleculare de natură lipoproteică, care realizează compartimentarea dintre mediul intern de cel extern al celulei şi care funcţionează ca o barieră semipermeabilă. In afară de acest tip de membrană externă denumită membranăplasmatică, există şi un sistem membranar care delimitează diferite organite compartimentând spaţiul intracelular.

Se disting mai multe categorii de biomembrane:

1.- **Membrana citoplasmatică** de cca.60-100 Å grosime care separă conţinutul celulei de mediul înconjurător împiedicând amestecarea citoplasmei cu acest mediu.

2.- **Membranele organitelor celulare** mai subţiri de cca. 60 Å:

- membrana dublă a mitocondriilor;
- membrana **lizozomilor** a cărei integritate asigură menţinerea enzimelor lizozomale în stare inactivă "latentă";
- **reticulul endoplasmic** reprezintă o reţea de canale ce traversează întreaga celulă, ca un aparat circulator intracelular;
- **aparatul Golgi** compus din vezicule, cisterne şi tubuli care se află în relaţie de continuitate cu reticulul endoplasmic;
- **microzomii** reprezintă o fracţiune subcelulară constituită din fragmente şi mici vezicule rezultate prin disrupţia reticulului endoplasmic ;
- **nucleul** constituie cea mai mare şi cea mai densă particulă infracelulară delimitată de o dublă membrană prevăzută cu numeroşi pori nucleari.

3.- **Membrane speciale**:

- teaca de mielină care înconjoară axonii neuronilor, produsă de celula lui Schwann;
- discurile segmentului extern al celulelor cu bastonaşe din retină care se formează prin plierea membranei citoplasmatice urmată de detaşarea discurilor, care se aşează unul peste celălalt ca un fişic de monede.

Fenomenul de **permeabilitate selectivă** reprezintă una din funcţiile esenţiale ale biomembranelor; prin aceasta se realizează schimburile de molecule şi ioni între mediul intern şi extern al celulei.

6.8.2 Organizarea structurală a biomembranelor

Membranele biologice sunt compuse în principal din proteine cca.60%, lipide cca.40% (existând o variaţie apreciabilă în jurul acestor valori, de la un tip de membrană la alta), glucide, apă.

La o extremă membrana internă mitocondrială conţine doar 20-25% lipide, iar la cealaltă extremă membrana mielinică poate conţine până la 75% lipide.

Biomembranele au o componentă lipidică constituită predominant din **lipide polare** (lecitine, sfingomieline) iar cele plasmatice sunt bogate şi în colesterol liber şi esterificat, pentru fiecare tip de membrană şi tip de celulă există un raport caracteristic pentru fiecare specie în parte.

Funcţia de **permeabilitate** a membranelor care reflectă procesele de transport a diferitelor molecule sau ioni este dependentă de raportul componentelor lipidice constitutive.

Fiecare tip de membrană conţine mai multe feluri de proteine sau polipeptidice clasificate astfel:

a) - **proteinele extrinsece** sau periferice - slab ataşate de suprafaţa membranei şi pot fi uşor îndepărtate;

b) - **proteinele intrinsece** sau integrale care reprezintă mai mult de 70% din totalul proteinelor membranare şi sunt foarte strâns legate de partea lipidică; din această categorie fac parte **glicoforinele** din membrana eritrocitară.

Au fost postulate mai multe modele moleculare referitor la structura biomembranelor.

Modelul de biomembrană cel mai acceptat (Danielli-Davson-Robertson) postulează existenţa unui dublu strat de lipide polare (fosfolipide), delimitate de o parte şi de alta de către un monostrat de proteine. Structura biomembranelor poate fi astfel sistematizată;

- **lipidele polare** în exclusivitate fosfolipide prezintă componentele lor hidrofobe (apolare) - catenele de acizi graşi - orientate spre interior;
- **componentele hidrofobe** care aparţin unui strat de lipide se dispun faţă în faţă cu componentele hidrofobe ale celuilalt strat de lipide, formând o fază continuă;
- **dublul ţesut lipidic** care constituie "**miezul**" membranei este stabilizat şi menţinut prin interacţiuni hidrofobe ce se exercită între componentele apolare ale moleculelor de lipide;
- **componentele hidrofobe** (polare) se orientează spre extremităţile dublului strat, în direcţie opusă celor hidrofobe spre stratul monomolecular marginal de proteine;
- **legăturile electrostatice** (polare) care se realizează între sarcinile electrice ale zonei polare a fosfolipidelor şi sarcinile electrice ale unor radicali de aminoacizi din structura proteinelor "**stabilizează**" asocierea de tip **lipide - proteine**.

Aşadar biomembrana prezintă o ultrastructură organizată şi stabilizată prin două tipuri de interacţiuni:

1 - **interacţiuni hidrofobe** (lipide-lipide);
2 - **interacţiuni electrostatice** (lipide- proteine).

Reprezentarea schematică a acestui model molecular de biomembrană este prezentată în figura 6.18.

Au fost propuse şi alte modele de structură pentru biomembrane, care reprezintă variante ale modelului Danielli- Davson considerat clasic.

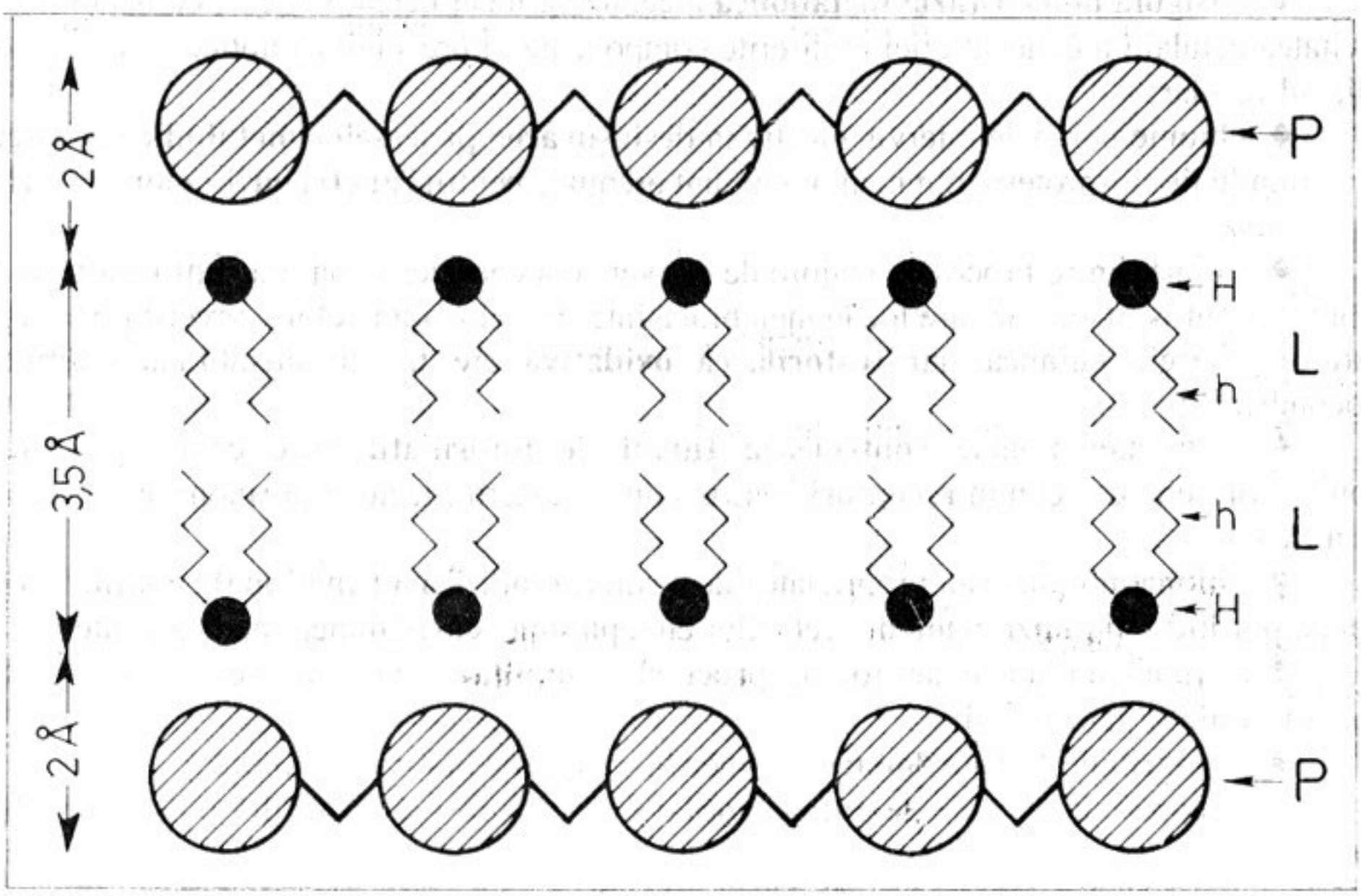


Fig.6.18 **Modelul molecular de biomembrană**
P-proteine; L-lipide; H-componente hidrofile; h-componente hidrofobe

Conform modelului **"în mozaic lipidoproteic"** (Singer-Nicolson, 1972) proteinele membranare plutesc ca nişte **"iceberguri"** într-o mare lipidică concepută fluidă, cu stare de cristal lichid. In acest complex structural denumit **"în mozaic"** şi proteinele membranei pot fi considerate ca **proteine integrale** şi **periferice**. Proteinele integrale străbat stratul lipidic dintr-o parte în cealaltă,în timp ce proteinele periferice sunt ataşate membranelor.

Aminoacizii polari sunt dispuşi spre exterior în timp ce aminoacizii nepolari se găsesc în interior spre a putea interacţiona cu acizii graşi din fosfolipide. Complexele lipoproteice deţin un rol funcţional , participând la procesele de transport sau la unele activităţi enzimatice la nivelul biomembranei.

Modelul implică o anumită **fluiditate** a biomembranei care se află într-o stare de echilibru termodinamic; orice perturbare fizică sau chimică produsă, poate antrena o redistribuire prin translaţie a diferiţilor constituenţi în mediul fluid asociată cu realizarea unui nou echilibru, determinate de noile interacţiuni apărute.

6.8.3 Funcţiile biomembranelor

Funcţiile biomembranelor sunt foarte variate şi indispensabile pentru buna desfăşurare a proceselor vitale:

- ♦ - membranele celulare **delimitează** celulele şi **compartimentează** interiorul acestora şi diferite formaţiuni intracelulare;
- ♦ - reglează transportul de substanţe intra şi extracelular funcţionând ca o **barieră semipermeabilă** între mediul extern şi intern al celulei;

◆ - asigură **homeostazia metabolică** a celulei şi menţinerea în limite compatibile cu activitatea celulară a concentraţiei în diferite componente, a presiunii osmotice, a volumului de lichid celular;

◆ - biomembranele intervin efectiv în **desfăşurarea proceselor metabolice** deoarece interacţiunile lipido-proteice din membrane sunt esenţiale pentru **funcţia enzimelor** localizate la acest nivel;

◆ - două dintre procesele majore de conversie a energiei în natura sunt localizate în membrane: **fotosinteza** care are loc în membrana internă a **cloroplastelor** converteşte energia solară în energie chimică, iar **fosforilarea oxidativă** are loc în membrana internă a mitocondriilor;

◆ - biomembranele **controlează fluxul de informaţii** între celule şi mediul înconjurător deoarece conţin **receptori** pentru stimulii externi: legarea hormonilor, percepţia luminii etc.;

◆ - biomembranele au proprietatea de a suferi **modificări funcţionale adaptative** ca de exemplu **inducţia enzimelor** din reticulul endoplasmic sub acţiunea medicamentelor;

◆ - biomembranele au rol în **procesele imunitare**, în reacţiile de apărare ale celulelor şi ale organismului;

◆ - contribuie la **coordonarea** intracelulară a proceselor biochimice;

◆ - reprezintă sisteme de **autoasamblare** cu o mare stabilitate din punct de vedere termodinamic.

6.8.4 Procese de transport prin biomembrane

Funcţia primordială a biomembranelor este **permeabilitatea lor selectivă**, care asigură **transportul** sau **translocarea** tuturor substanţelor necesare pentru funcţionarea normală a celulei.

Biomembranele nu sunt permeabile pentru cele mai multe molecule polare; proprietate avantajoasă biologic deoarece previne difuzia în afara mediului celular a diferiţilor metaboliţi interni, dintre care cei mai mulţi sunt polari. Totodată, celula necesită pentru activitatea sa anumiţi metaboliţi (glucoză, aminoacizi, ioni) care trebuie să pătrundă din exterior pe baza unor mecanisme diferite.

Se disting două tipuri principale de transport prin membrane: **transportul activ şi pasiv**. Dacă deplasarea speciilor transportate se face de la o concentraţie mai mare spre o concentraţie mai mică deci în **sensul gradientului de concentraţie** (pentru molecule fără sarcină electrică) sau în sensul **gradientului electrochimic** (pentru ioni) pentru aceasta nu se consumă energie (**transport pasiv**).

In cazul în care transportul are loc contra gradientului (electro) chimic este necesar să se consume energie cedată de ATP-ul celular (**transport activ**).

Există patru căi prin care metaboliţii pot traversa biomembranele şi anume:

a) - difuzia simplă;
b) - difuzia mediată;
c) - transportul activ;
d) - translocarea de grup.

6.8.4.1 Difuzia liberă

Daca doua soluţii cu concentraţii diferite sunt puse în contact, în absenţa membranei,

se produce un proces de amestecare numit **difuziune simplă**. Astfel, dacă o soluţie de zaharoză este pusă în contact cu apa, se produce un flux al moleculelor de zaharoză din regiunea cu concentraţie mai mare, spre regiunea cu concentraţie mai mică. Cu cât diferenţa de concentraţii dintre cele două soluţii este mai mare, cu atât viteza de difuziune este mai mare. Prezenţa unei membrane biologice determină scăderea vitezei difuziunii simple (de 10^6-10^9 ori).

Metaboliţii cu masă moleculară mică difuzează cu o viteză dependentă de **gradientul de concentraţie** dintre cele două compartimente separate prin membrană. Gradientul de concentraţie se anulează atunci când se produce o egalizare a concentraţiilor în metaboliţi de o parte şi de alta a membranei (vezi fig.6.19).

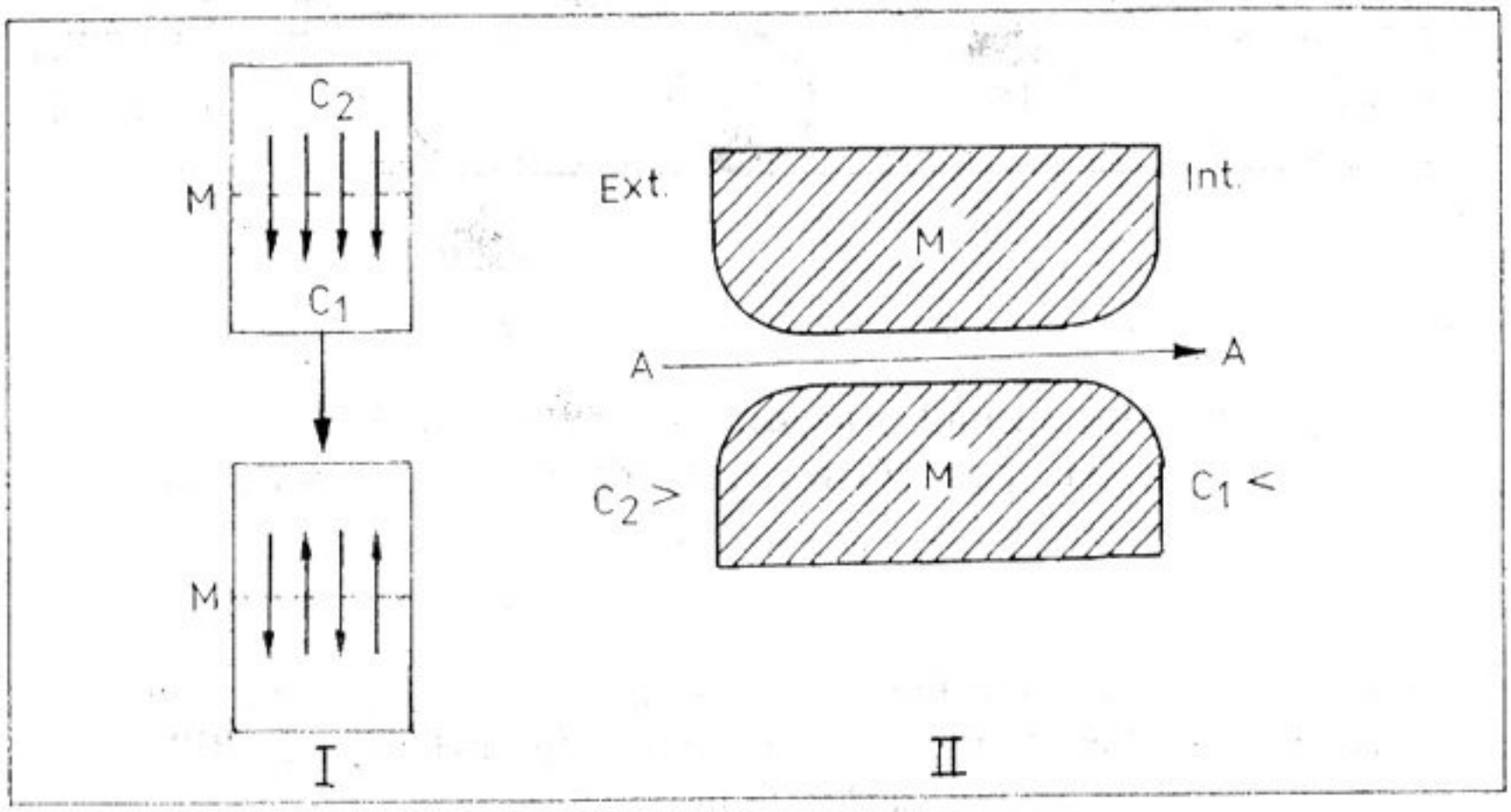


Fig.6.19 **Difuziunea liberă între două compartimente** M=membrană; C_2=compartiment cu concentraţie mare; C_1= compartiment cu concentraţie mică**(I)**
Difuziunea liberă a unui metabolit A printr-un por umplut cu apă al membranei M (II)

Difuziunea liberă are loc cu o **viteza mică** şi nu permite nici o **selectivitate** fiind un proces fizic de importanţă secundară.

6.8.4.2 Difuziunea mediată

Acest proces implică prezenţa în biomembrană a unor sisteme **transportoare** de natura proteică denumite şi **permeaze**. Prin intermediul acestui sistem transportor metaboliţii se deplasează prin membrană în orice direcţie, dar niciodată contra gradientului de concentraţie.

Difuzia mediată se realizeaza în sensul scăderii gradientului de concentraţie, fiind un **transport pasiv** ce nu implică consum de energie.

Transportorii manifestă specificitate pentru substanţa transportată şi au rolul de a facilita procesul de transport în sensul accelerării vitezei de difuzie prin biomembrană. Viteza de penetraţie a unui metabolit ajunge la o valoare limită pe măsura creşterii concentraţiei pe

una din feţele membranei, proces care se aseamănă foarte bine cu cataliza enzimatică.

Spre deosebire de difuzia liberă, difuzia mediată este **stereospecifică** (de exemplu D şi L-aminoacizi traversează membrana cu viteze diferite).

Mecanismul procesului de difuzie mediata (după M.Şerban, 1982) implică urmatoarele etape:

◆ **recunoaşterea** de către molecula transportoare (T) din membrană a substanţei (S) care urmează a fi transportată;

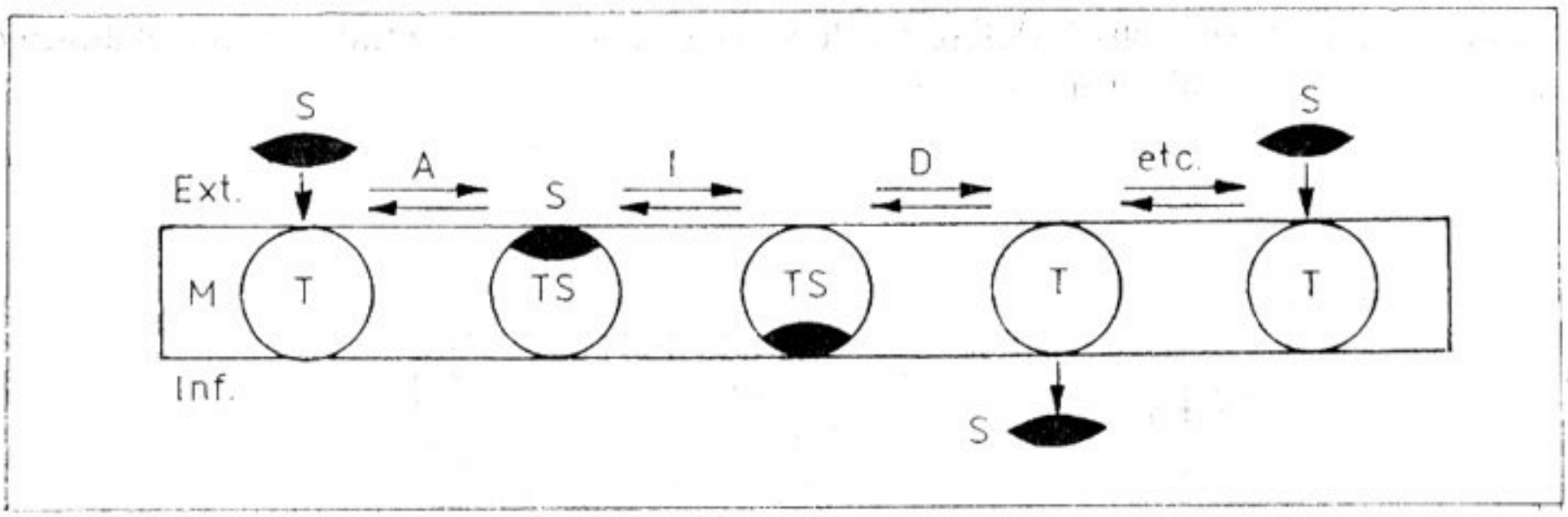


Fig.6.20 **Mecanismul procesului de difuzie mediată**
M=membrană; T=moleculă transportoare; A=asociere;
t=translocare; D=disociere

◆ **asocierea** acestora într-un complex specific pe aria externă a membranei (TS) care este posibilă datorită faptului că molecula transportoare (**permeaza**) are **situsuri specifice** la care poate lega reversibil un anumit substrat transportabil;

◆ **translocarea** (prin difuzie, rotaţie, oscilaţie sau translaţie) complexului (TS) prin biomembrana spre aria internă a acesteia;

◆ **disocierea complexului** (TS) cu eliberarea substratului transportat (S) precum şi a moleculei transportoare (T) care poate relua procesul (vezi fig.6.20).

Au fost izolate şi caracterizate o serie de proteine implicate în transportul diferiţilor metaboliţi (glucide, aminoacizi, calciu, sodiu,potasiu).

6.8.4.3 Transportul activ

Este similar procesului de difuzie mediată cu deosebirea că transportul metabolitului prin biomembrană se realizează **contra gradientului de concentraţie**. Tansportul se realizează **unidirecţional** sau **vectorial** cu consum de energie metabolică, deoarece metabolitul se deplasează de la o arie de concentraţie mică (C_1) la una de concentraţie mare (C_2). Această deplasare nu se efectuează în mod spontan deoarece entropia sistemului ar descreşte. In transportul activ, sistemul câştigă **energie liberă**, fiind cuplat cu alte reacţii metabolice care furnizează energie ceea ce explică translocarea contra gradientului de concentraţie.

Schimbul de energie liberă este dat de relaţia:

$$\Delta G = RT \ln \frac{C_2}{C_1}$$

în care: ΔG = variaţia de energie liberă; R = constanţa gazelor;
C_2 = concentraţia mare; C_1 = concentraţia mică

Sistemele de transport activ permit celulei **extragerea selectivă** din mediu a anumitor substanţe chiar când concentraţia acestora în mediu este foarte mică.

Transportul activ se desfăşoară după un mecanism care necesită două condiţii:

- ◆ prezenţa în biomembrană a unor compuşi de natură proteică cu rol de transportori;
- ◆ furnizarea de energie necesară efectuării transportului activ contra gradientului de concentraţie.

Proteina transportoare prezintă un situs de legare reversibilă a substanţei care urmează să fie transportată prin membrană. Energizarea proteinei transportoare sau a substratului pe care îl transportă creează condiţia necesară pentru realizarea unui transport **unidirecţional, vectorial**. In procesul de transport activ pe lângă transportori, intervin şi componente care cuplează acţiunea acestor transportori la o sursă de energie (ATP), care direcţionează transportul prin biomembrană într-un singur sens.

Mecanismul transportului activ este reprezentat sugestiv în figura 6.21 şi poate fi astfel caracterizat:

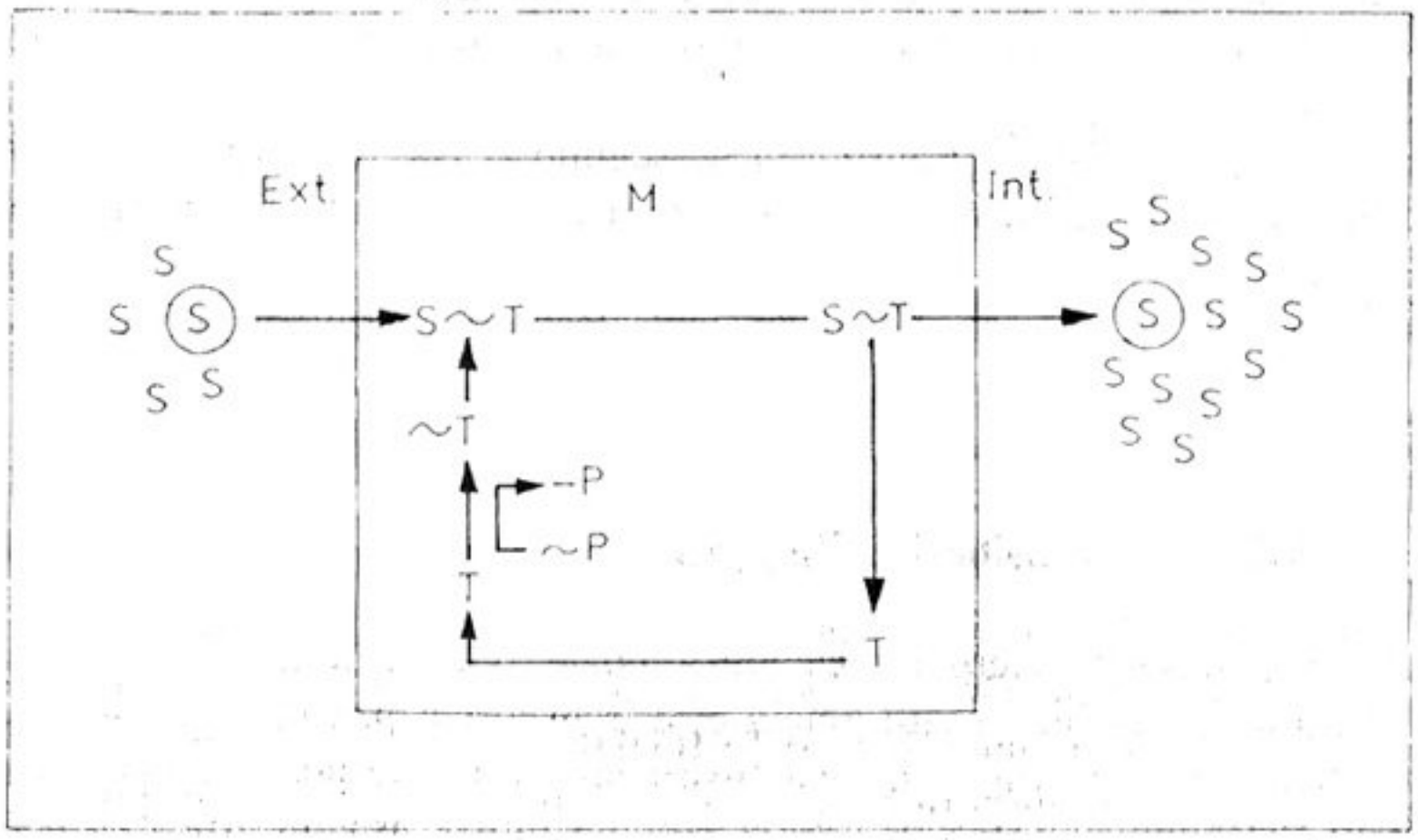


Fig.6.21 **Mecanismul transportului activ**

Acest mecanism preconizează faptul că substratul (S), traversează membrana sub forma unui complex labil cu molecula transportoare (S~T) care este energizată, deoarece T (proteina transportoare) trece în ~T sub acţiunea sursei de energie ~P. Complexul S~T transportat către compartimentul interior se disociază rapid, cu eliberarea lui S de cealaltă parte a biomembranei şi a transportorului (T) în interiorul acesteia. Prin energizarea acesteia procesul de transport poate fi reluat.

Procesele de transport activ prezintă următoarele caracteristici:

◆ **sunt unidirecţionale sau vectoriale** substanţa fiind transportată prin biomembrană numai într-o singură direcţie; de exemplu sistemul de transport din eritrocite determină transportul Na^+ numai în afara celulei, iar a K^+ numai spre interior;

◆ acţionează **contra gradientului de concentraţie** şi se realizează cu consum de energie;

◆ sistemele de transport activ permit celulei **extracţia selectivă** din mediu a anumitor molecule sau ioni chiar când concentraţia acestora este foarte mică;

◆ transportul activ asigură menţinerea concentraţiei constante în electroliţi a presiunii osmotice, a volumului fluidului intracelular participând astfel la reglarea şi menţinerea homeostaziei metabolice a celulei.

Organismele vii posedă numeroase sisteme de transport activ prin care substanţele sunt transportate contra gradientului de concentraţie.

Astfel, filtratul glomerular al rinichiului are un conţinut în glucoză în concentraţie aproximativ egală cu cea plasmatică, dar în mod normal în urină nu apare glucoză, deci în tubii renali **glucoza este reabsorbită** împotriva gradientului de concentraţie.

Iodul alimentar şi hidric, după absorbţia intestinală este de asemenea transportat la glanda tiroidă, după un mecanism asemănător.

Pentru caracterizarea mecanismelor moleculare ale transportului activ sunt utilizaţi o serie de termeni: transportori, cărăuşi, permeaze, pompe; s-a considerat că termenul de "**pompă**" este cel mai potrivit.

Există mai multe tipuri de transport activ:

◆ pompele ionice reprezentate de ATP-aze care utilizează energia rezultată din scindarea moleculei de ATP pentru transportul unui singur ion (de exemplu pompa de calciu din eritrocite, muşchi sau nervi);

◆ Na^+-K^+-ATP-aza realizează transportul de schimb al Na^+ în afară şi al K^+ în celulă;

◆ transportul cuplat al glucozei şi al aminoacizilor cu al Na^+ în unele tipuri de celule, nervi, muşchi, eritrocite;

◆ transportul cuplat al apei şi al Na^+ în unele ţesuturi epiteliale (nefron, vezica biliară, intestin).

6.8.4.4 Translocarea de grup

Deoarece necesită energie metabolică poate fi considerat tot un transport activ. Conform acestui mecanism, fiecare glucid este transportat prin biomembrană şi eliberat în interiorul celulei sub forma unui **derivat fosforilat**, ce nu se poate deplasa prin membrană în sens invers. Sistemul transportor este constituit dintr-o proteină transportoare, o enzimă care transferă gruparea fosfat pe molecula de glucid (fosfat transferază) şi o sursă de energie (ATP). In această variantă de transport activ, energia necesară procesului de transport este conservată sub forma derivatului glucid-fosfat (glucozo-6-fosfat) moleculă aptă pentru activitatea metabolică a celulei.

Bibliografie selectivă

1. ALBERTS BRUCE, BRAY DENNIS, LEWIS JULIAN, RAFF MARTIN, ROBERTS KEITH, WATSON JAMES D. - Molecular biology of the cell - Garland Publishing Inc. New-York.London 1989.
2. BACIU I. - Fiziologie. Ed. didactică şi pedagogică - Bucureşti 1977.
3. BANCIU AXENTE SEVER, CIACOI DIMITRIU DELIA - Descoperiri epocale în biochimie. Ed. Albatros 1990.
4. BEDELEANU DAN D., MANTA IOAN - Biochimie medicală farmaceutică. Ed. Dacia - Cluj Napoca 1985.
5. BENGA GHEORGHE - Biologia moleculară a membranelor cu aplicaţii medicale. Ed. Dacia - Cluj Napoca 1979.
6. BLACKWELL R.QUENTIN, BONN WONG HOCK, WANG C.L., WENG M.I. - Biochimica et Biophysica acta 351, 7 (1974).
7. CAPALNA S., TANASESCU D., TRUTIA E. - Biochimie medicală. Ed. didactică şi pedagogică - Bucureşti 1977.
8. CAPALNA S. - Biochimie dinamică. Ed. medicală - Bucureşti 1971.
9. CARSTEANU MIOARA, VLADESCU C. - Colagenul, biochimie şi fiziologie. Ed. Academică R.S.R. - Bucureşti 1982.
10. CRISTEA-POPA ELENA, POPESCU AURORA, TRUTIA E., DINU VERONICA - Tratat de biochimie medicală. Ed. medicală - Bucureşti 1991.
11. DARNELL JAMES, LODISH HARVEY, BALTIMORE DAVID - Molecular cell biology -Scientific american books, W.H.Freeman and Company New-York 1990.
12. DUMITRU I.F. - Biochimie. Ed. didactică şi pedagogică - Bucureşti 1980.
13. DUMITRU I.F., IORDACHESCU D. - Enzime - structură şi mecanisme de acţiune. Ed. medicală - Bucureşti 1974.
14. EDMONDS JAMES W., DUAX WILLIAM L. - Prostaglandins vol. 5, nr.3-275, 1974.
15. ENESCU A.LONGINUS, OITA N.NICOLAE - Bazele vitaminoterapiei. Ed. Junimea 1990.
16. GANONG W.F. - Review of medical physiology. Lange Medical Publications -Los Altos California 1977.
17. GRIGORESCU MIRCEA, TAPALAGA DANIELA, DUMITRASCU DUMITRU - Patologia clinică a acizilor biliari. Ed. Dacia - Cluj Napoca 1983.
18. GROZA P. - Fiziologie umană. Ed. medicală - Bucureşti 1980.
19. HARPER H.A., RODWELL V.W., MEYES P.A. - Review of physiological chemistry. Lange Medical Publications 1975.
20. HAULICA ION - Fiziologie umană. Ed. medicală - Bucureşti 1989.
21. LEHNINGER ALBERT L. - Biochimie vol. I. Ed. tehnică - Bucureşti 1987.
22. LEHNINGER ALBERT L. - Biochimie vol. II. Ed. tehnică - Bucureşti 1992.
23. NICHIFOR MIHAI, BABES LILIANA, TASCA SERBAN I. - Leucotrienele. Implicaţii biomedicale. Ed. medicală - Bucureşti 1987.
24. NICHIFOR MIHAI - Prostaciclina şi tromboxanii. Implicaţii biomedicale. Ed. medicală - Bucureşti 1993.
25. OERIU S. - Biochimie medicală. Ed. didactică şi pedagogică - Bucureşti 1974.

26. OERIU S., OERIU I. - Grupările tiolice şi rolul lor în biologie. Ed. Acad. R.S.R.- Bucureşti 1977.
27. OLINESCU RADU - Peroxidarea în chimie, biologie şi medicină. Ed. Stiinţifică şi enciclopedică - Bucureşti 1982.
28. PAUSESCU EXACUSTODIAN, CHIRVASIE RODICA, NECHIFOR MIHAI - Prostaglandinele în patologie şi terapeutică. Ed. medicală - Bucureşti 1982.
29. PAUSESCU EXACUSTODIAN, POPESCU MIHAELA - Prostaglandinele în biologie. Ed. ştiinţifică şi enciclopedică - Bucureşti 1981.
30. POPESCU AURORA, CRISTEA ELENA, ZAMFIRESCU GHEORGHIU MARCELA Biochimie medicală. Ed. medicală 1980.
31. ROBERT REJ PH.D. - Annals of clinical and laboratory - SCIENCE vol.7, 6. 455 (1977).
32. ROSETTI-COLTOIU MATILDA, MITREA NICULINA -Biochimie. Ed. didactică şi pedagogică - Bucureşti 1985.
33. ROSETTI-COLTOIU MATILDA, OTELEANU D. - Biocatalizatorii în practica medicală şi farmaceutică. Ed. medicală - Bucureşti 1980.
34. RUSSELL PAUL T., EBERLE ANDREA J., CHENG HELEN - Clinical chemistry 21-653, 1975.
35. RUSSU GEORGE - Boli şi sindroame cu nume proprii. Ed. Junimea - Iaşi 1975.
36. SAMUELSON B.PAOLETTI, RAMWELL P.W. - Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research vol.XVII B Raven Press New-York 1987.
37. SAMUELSON B., GRANSTROM E., GREEN K., HAMBERG M., HAMMARSTROM S. - Annual review of Biochemistry 44,669 (1975).
38. SCHAPIRA G. - Elemente de biochimie generală. Ed. Flammarion Medecine - Scienses 1970.
39. STRYER LUBERT - Biochemistry. W.H.Frecman and Company - San Francisco 1975.
40. ŞERBAN MIHAI - Curs de biochimie animală. Organizarea moleculară şi macromoleculară a organismului animal. Bucureşti 1979.
41. ŞERBAN MIHAI, TAMAS VIRGIL, COTRUT MARIA - Biochimie medicală veterinară. Ed. didactică şi pedagogică - Bucureşti 1982.
42. TASCA ŞERBAN I., BABES LILIANA - Chimia şi farmacologia prostaglandinelor. Ed. Academiei R.S.R. - Bucuresti 1983.
43. TEODORESCU EXARCU I. - Patologie biochimică. Ed. medicală - Bucureşti 1974.
44. VELLA F., ENG A.C., MERY C.C. - Clinical Biochemistry 3; 125 (1970).
45. VELLA F., WONG S.C., WILSON J.B., HUISMAN T.H.J. - Canadian jurnal of Biochemistry - vol.50, no.7,841 (1972).
46. VEVERA VALERIU - Fiziopatologia şi clinica fierului. Ed. medicală - Bucureşti 1978.

Pagina	*se va citi*	*în loc de*
7	ADP	ADp
15	antifreeze	antitrezee
20	Acid amino tio metil butiric	Acid amino metil butiric
32	donoare	donor
63	prostetica	postetica
85	glicocol	glicocerol
91	eucariote	eucarotide
107	Situs allosteric	Situs allosferic
145	provitamine	polivitamine
150	iodopsina	idopsina
158	naftochinona	naftochivona
	vitamina	vitamona
186	proeritroblasti	proeritoblasti