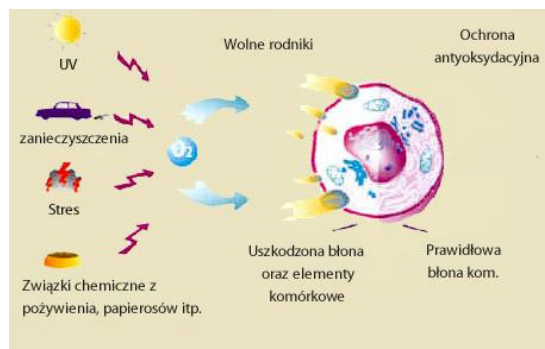


Ćwiczenie VII

Reaktywne formy tlenu (RFT)



- (1) Porównanie widm absorpcyjnych utlenionej i zredukowanej formy cytochromu c
- (2) Wytwarzanie i usuwanie anionorodnika nadadtlenkowego

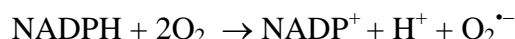
ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA:

1. Źródła powstawania reaktywnych form tlenu (RFT) w komórce
2. Mechanizmy obronne komórki przed działaniem RFT
3. Rola oksydazy ksantynowej w powstawaniu anionorodnika nadadtlenkowego w procesie degradacji puryn

WPROWADZENIE

Tlen jest jednym z pierwiastków niezbędnych do utrzymania życia na Ziemi. Jednak tlen i jego związki w niektórych warunkach mogą okazać się toksyczne i powodować uszkodzenie tkanek i narządów. Około 5% wdychanego O_2 przekształca się w reaktywne formy tlenu – jest to około 2 kg rocznie.

W organizmie reaktywne formy tlenu (RFT lub ROS - *reactive oxygen species*) mogą powstawać w wyniku działania zewnętrznych czynników, takich jak np. promieniowanie jonizujące. Jednakże znacznie bardziej istotne jest powstawanie RFT wynikające z jednoelektronowego utleniania wielu związków zarówno endo- jak i egzogennych przez tlen cząsteczkowy. Głównym źródłem wolnych rodników w warunkach fizjologicznych są procesy oddechowe w mitochondriach, gdzie poprzez czteroelektronową redukcję cząsteczki O_2 powstaje woda, ale wskutek „nieszczelności” układu może dochodzić do „wycieku” elektronów i tylko częściowej redukcji tlenu. W reakcji jednoelektronowej redukcji tlenu powstaje anionorodnik nadadtlenkowy $O_2^{\cdot-}$. Szczególną rolę w wytwarzaniu RFT pełnią limfocyty, monocyty i makrofagi. Obecność w organizmie ognisk zapalnych stymuluje gwałtowny wzrost zużycia tlenu („wybuch tlenowy”) przez fagocytyjające komórki. Podczas fagocytozy obserwuje się wzmożone wytwarzanie $O_2^{\cdot-}$, w reakcji katalizowanej przez oksydazę NADPH usytuowaną w błonie granulocytów:



RFT powstają także w wyniku autooksydacji związków endo- i egzogennych, reakcji katalizowanych przez oksydazy oraz przez jony metali przejściowych.

W większości przemian biologicznych jako pierwszy wytwarzany jest anionorodnik nadadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), którego pojawienie się pociąga za sobą powstawanie następnych RFT,

np. nadtlenu wodoru czy rodnika hydroksylogowego. Do najważniejszych reaktywnych form tlenu zalicza się:

Rodnikowe pochodne tlenu:

- $O_2^{\bullet -}$ – anionorodnik ponadtlenkowy – jest produktem jednoelektronowej redukcji tlenu; rodnik raczej mało reaktywny, powstaje: jako produkt uboczny łańcucha oddechowego, w procesach katalizowanych przez różne oksydazy (np. ksantynową), oraz wytwarzany jest celowo przez oksydazę NADPH.
- HO_2^{\bullet} – rodnik wodoronadtlenkowy jest bardziej reaktywny.
- $^{\bullet}OH$ – rodnik hydroksylogowy – charakteryzuje się bardzo dużą reaktywnością i toksycznością; reaguje z większością cząsteczek występujących w organizmie; należy do najmocniejszych biologicznych utleniaczy, może utlenić praktycznie wszystkie biologicznie ważne związki w organizmie.

Nierodnikowe (toksyczne) pochodne tlenu:

- H_2O_2 – nadtlenek wodoru – powstaje z anionorodnika ponadtlenkowego w reakcji enzymatycznej katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD) oraz jest produktem licznych oksydaz. W komórkach może być metabolizowany przez peroksydazę glutationową lub przez katalazę. Mimo, że nie jest wolnym rodnikiem odgrywa ważną rolę w procesach oksydacyjnych. Może przenikać przez błony komórkowe. Jest głównym substratem reakcji wytwarzających silnie toksyczny rodnik hydroksylogowy $^{\bullet}OH$.
- 1O_2 – tlen singletowy – forma singletowa tlenu jest formą wzbudzoną, o wyższej energii. Cząsteczka niewzbudzona tlenu jest w stanie trypletowym (2 elektrony walencyjne w cząsteczce tlenu rozmieszczone są, zgodnie z regułą Hunda, na dwóch orbitalach cząsteczkowych, tworząc 2 niesparowane elektrony). W tlenie singletowym elektrony te są rozmieszczone niezgodnie z regułą Hunda). Tlen singletowy jest jedną z głównych toksycznych form tlenu w żywych organizmach. Oddziałuje z innymi cząsteczkami na dwa sposoby: przechodząc w stan trypletowy, przekazuje energię wzbudzenia lub wchodzi z cząsteczkami w reakcję chemiczną

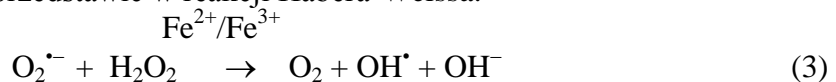
Mechanizm tworzenia wolnych rodników przy udziale jonów metali grup przejściowych przedstawiają reakcje Fentona (1, 2) i Habera-Weissa (3).



Utleniony metal pełni rolę katalizatora (może być on później zredukowany):



Oba te mechanizmy można przedstawić w reakcji Habera-Weissa:

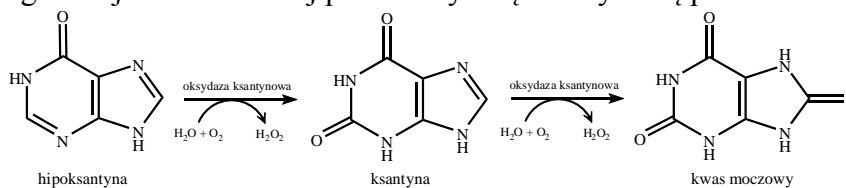


Działanie RFT prowadzi m.in. do utleniania związków niskocząsteczkowych (glutation, askorbinian), degradacji kolagenu, depolimeryzacji kwasu hialuronowego, utleniania hemoglobiny, inaktywacji enzymów, inaktywacji białek transportowych, pęknięć nici DNA, uszkodzenia zasad DNA, uszkodzeń chromosomów, peroksydacji lipidów błon (powodującej m.in. lizę (rozpad) erytrocytów), zaburzeń wewnątrzkomórkowej homeostazy Ca^{2+} , modyfikacji właściwości antygenowych komórek, agregacji płytek krwi, zmian morfologii komórek, powstawania mutacji, transformacji nowotworowej komórek.

W organizmie funkcjonuje wiele mechanizmów chroniących przed działaniem RFT. Do najważniejszych antyoksydantów w ustroju zalicza się niskocząsteczkowe [przeciwutleniacze](#), takie jak: glutation, witaminy E i C ([kwas askorbinowy](#)), kwas moczowy, bilirubina, flawonoidy. Enzymy usuwające RFT to: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa.

Rola oksydazy ksantynowej w powstawaniu anionorodnika ponadtlenkowego w procesie degradacji puryn:

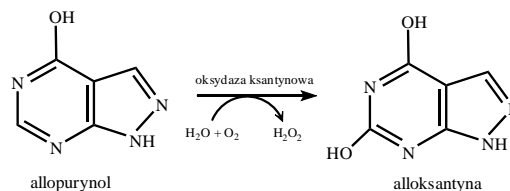
Końcowym produktem degradacji nukleotydów purynowych, w organizmach ssaków jest kwas moczowy. Jednym z enzymów prowadzących do jego powstania jest oksydaza ksantynowa, która katalizuje reakcję utleniania hipoksantyny do ksantyny oraz reakcję utleniania ksantyny do kwasu moczowego. Występuje m.in. w wątrobie, śluzówce jelita i w mleku. Przebieg reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową przedstawia schemat:



W cząsteczce oksydazy ksantynowej, poza dwiema cząsteczkami FAD znajdują się dwa jony molibdenu (VI) oraz osiem jonów żelaza tworzących centra żelazo-siarkowe. Podczas reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową działa miniaturowy łańcuch transportu elektronów z utlenianego substratu na tlen:

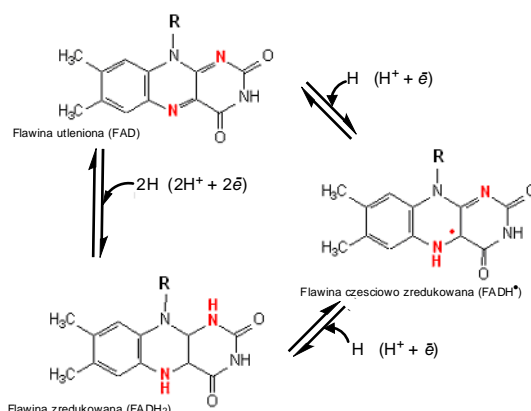


Niedobór molibdenu w diecie może doprowadzić do obniżenia aktywności oksydazy ksantynowej w wątrobie. Częściej jednak opisywane są schorzenia wynikające z nadmiernej syntezy kwasu moczowego lub z upośledzenia wydalania tego związku. Stężenie kwasu moczowego w osoczu krwi kobiet wynosi 150-360 $\mu\text{moli/l}$, w osoczu krwi mężczyzn 200-480 $\mu\text{moli/l}$. Nadmierne wytwarzanie kwasu moczowego może powodować chorobę atakującą stawy i nerki, określaną mianem skazy lub dny moczanowej albo podagry. W tym schorzeniu stężenie moczanu w osoczu i w moczu wzrasta. Krysztály soli moczanowych osadzają się w stawach i w nerkach. W leczeniu dny moczanowej, dla zahamowania aktywności oksydazy ksantynowej, stosuje się analog hipoksantyny – allopurynol. Allopurynol jest substratem reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową, lecz produkt jego utlenienia, alloksantyna, wiąże się bardzo silnie z centrum katalitycznym enzymu, hamując jego aktywność. Jest to przykład “samobójczego” działania produktu reakcji katalizowanej na enzym.



W biologicznych reakcjach utleniania-redukcji, które przebiegają z udziałem flawoprotein często - jako produkt uboczny jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego - powstaje anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot -}$). Nukleotyd flawinowy

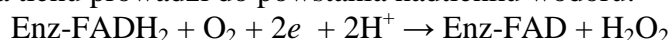
(FAD) może w tych reakcjach przyjmować jeden elektron (powstaje rodnik semichinonowy) lub dwa elektrony (powstaje wtedy forma zredukowana nukleotydu flawinowego –FADH₂).



Zredukowana flawina, w kolejnej reakcji utleniania–redukcji jest zdolna do przekazania, odpowiedniej cząsteczce akceptora, jednego bądź dwu elektronów. Jeżeli akceptorem tym jest tlen cząsteczkowy, to w wyniku jednoelektronowej reakcji powstaje anionorodnik ponadtlenkowy:

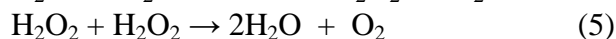


Natomiast dwuelektronowa redukcja tlenu prowadzi do powstania nadtlenu wodoru:



Zarówno anionorodnik ponadtlenkowy jak i nadtlenek wodoru ulegają reakcjom

dysproporcjonowania (dysmutacji) (4, 5):



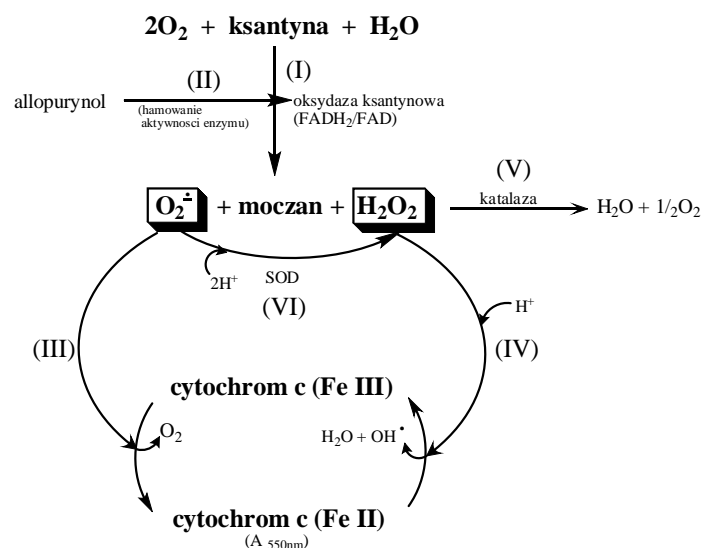
w reakcjach spontanicznych lub w reakcjach katalizowanych enzymami o odpowiedniej specyficzności.

Dysmutazy anionodników ponadtlenkowych (Super Oxide Dismutase, SOD), czyli dysmutazy ponadtlenkowe są enzymami powszechnie występującymi w tkankach zwierzęcych. W cytoplazmie komórek ssaków znajduje się dysmutaza zawierająca jony miedzi i cynku (CuZnSOD), w mitochondriach - dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca jony manganu (MnSOD), na powierzchni komórek zlokalizowana jest tzw. pozakomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa (ECSOD). Działanie tego enzymu polega na usuwaniu anionorodnika ponadtlenkowego (reakcja 4).

Reakcja dysmutacji nadtlenu wodoru katalizowana jest przez katalazę, enzym zawierający układ hemowy. Katalaza występuje w niemal wszystkich tkankach zwierzęcych - przede wszystkim w wątrobie, erytrocytach i nerkach. Działanie tego enzymu usuwa nadtlenek wodoru, który powstaje podczas utleniania zredukowanych flawoprotein. (reakcja 5)

Eksperymentalne tworzenie, wykrywanie i usuwanie anionorodnika ponadtlenkowego.

W przeprowadzanych doświadczeniach student obserwuje przebieg reakcji przedstawionych na schemacie:



Schemat przedstawia model doświadczalny, w którym anionorodnik ponadtlenkowy powstaje w wyniku utlenienia ksantyny tlenem cząsteczkowym, w reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową (reakcja I). Powstający anionorodnik ponadtlenkowy redukuje cytochrom c – (reakcja III). Zredukowana forma cytochromu c wykazuje silną absorbcję przy długości fali 550 nm, a stężenie tej formy zależy od stężenia anionu ponadtlenkowego, który jest donorem elektronów w reakcji III.

Jednakże ilościowe oznaczanie anionorodnika ponadtlenkowego komplikuje fakt, że w mieszaninie reakcyjnej powstaje także nadtlenek wodoru, który z jednej strony jest produktem reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową (reakcja I) – a z drugiej strony, może powstawać jako produkt spontanicznie przebiegającej reakcji dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego (proces analogiczny do reakcji VI, ale bez udziału enzymu). Nadtlenek wodoru powoduje reoksydację cytochromu c (reakcja IV). W efekcie, w miarę postępu reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową obserwuje się, od pewnego momentu, zmniejszenie absorbcji przy 550 nm.

Aby zapobiec utlenianiu (reoksydacji) cytochromu c do mieszaniny reakcyjnej wprowadza się katalazę, która usuwa nadtlenek wodoru (reakcja V). Wówczas, cytochrom c jest końcowym akceptorem elektronów przekazywanych z anionorodnika ponadtlenkowego, a stężenie zredukowanej formy cytochromu c odpowiada stechiometrycznie stężeniu anionorodników ponadtlenkowych w badanej mieszaninie reakcyjnej. Stąd, pośrednio, na podstawie pomiaru absorbcji przy 550 nm, można określić w roztworze stężenie anionorodników ponadtlenkowych.

Reakcja I hamowana jest przez allopurynol (reakcja II).

Anionorodnik ponadtlenkowy w badanym układzie modelowym, usuwany jest w reakcji dysmutacji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD)(reakcja VI).

WYKONANIE

Studenci otrzymują następujące roztwory (wcześniej przygotowane i podpisane literami: A, D, E, F, H, I, G):

A. 50 mM bufor fosforanowy pH 7,6 zawierający 0,1 mM EDTA (związek kompleksujący jony metali).

D. Mieszanina **ksantyny i utlenionej formy cytochromu c** sporządzona przez zmieszanie roztworów B i C (v/v 1 : 10).

Roztwór B: 1 mg ksantyny rozpuszczony w 10 ml 1 mM NaOH

Roztwór C: 2,5 mg cytochromu c rozpuszczone w 10 ml roztworu A

E. Roztwór oksydazy ksantynowej.

F. Allopurynol (1mg/ml 1 mM NaOH)

H. Roztwór katalazy

I. Roztwór dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

G. Kwas askorbinowy o stężeniu 2 mg/ ml roztworu A.

I. Porównanie widm absorpcyjnych utlenionej i zredukowanej formy cytochromu c.

1. W trzech kuwetach spektrofotometrycznych przygotować roztwory zgodnie z tabelą 1: **roztwór buforowy** (kuweta I), **utleniona forma cytochromu c** (kuweta II), **zredukowana forma cytochromu c** (kuweta III). Zawartość kuwet przed pomiarem dobrze wymieszać.

Tabela 1.

| Roztwory badane | Roztwór A [ml] | Roztwór D [ml] | Roztwór G [ml] |
|--|-------------------|-------------------|----------------|
| Kuweta I (próba odniesienia) | 1,00 | – | – |
| Kuweta II (utleniony cyt. c) | 0,15 | 0,90 | – |
| Kuweta III (zredukowany cyt. c) | 0,10 | 0,90 | 0,05 |

2. Ustalić **linię zerową** spektrofotometru, w zakresie 500 – 560 nm, dla próby odniesienia (**kuweta I**).

3. Wykonać pomiary **widm** absorpcyjnych, w zakresie 500 – 560 nm: **utlenionej formy cytochromu c (kuweta II)**, a następnie **zredukowanej formy cytochromu c (kuweta III)**. Uzyskane widma wydrukować.

4. Wykonać pomiar **widma różnicowego** zredukowanej i utlenionej formy cytochromu c w następujący sposób:

a) wstawić do spektrofotometru kuwetę zawierającą **utlenioną formę cytochromu c** (kuweta II), a następnie przeprowadzić pomiar linii zerowej w zakresie 500 – 560 nm,

b) przeprowadzić pomiar widma absorpcyjnego, w zakresie 500 – 560 nm, **zredukowanej formy cytochromu c** (kuweta III). Uzyskany wykres wydrukować.

c) określić długość fali dla najwyższej absorbancji w widmie różnicowym.

II. Wytwarzanie i usuwanie anionorodnika ponadtlenkowego

1. Ustawić spektrofotometr na pomiar kinetyki reakcji i wybrać następujące parametry: temperatura 25°C, długość fali 550 nm, czas trwania pomiaru 7 min, pomiar co 30 sekund.

2. W czterech kuwetach spektrofotometrycznych przygotować, zgodnie z tabelą 2, roztwory badane.

Tabela 2

| Roztwory badane | Roztwór D [ml] | Roztwór A [ml] | Roztwór F [ml] | Roztwór I [ml] | Roztwór H [ml] |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Kuweta 1 | 0,90 | 0,10 | – | – | – |
| Kuweta 2 | 0,90 | 0,05 | – | – | 0,05 |
| Kuweta 3 | 0,90 | – | – | 0,05 | 0,05 |
| Kuweta 4 | 0,90 | – | 0,05 | – | 0,05 |

Wstawiać kolejno **kuwety 1- 4** do komory pomiarowej spektrofotometru i każdorazowo ustalić punkt zerowy pomiaru przy długości fali 550 nm. W każdej kuwecie inicjować reakcję przez dodanie 0,05 ml (50 µl) roztworu **oksydazy ksantynowej (E)**. Dodany enzym szybko zamieszać w kuwecie. Przeprowadzić kolejno pomiary kinetyczne przebiegu reakcji. Uzyskane wykresy wydrukować.

REAKTYWNE FORMY TLENU

I. Porównanie widm absorbcyjnych utlenionej i zredukowanej formy cytochromu c

1. Wyznacz wartości długości fali, dla maksimum absorbancji (λ_{max}) utlenionego i zredukowanego cytochromu c oraz maksimum widma różnicowego obu form cytochromu c. Wyniki wpisz do Tabeli I.

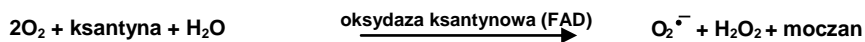
Tabela I.

| | Maksimum absorbancji (λ_{max}) |
|-------------------------|--|
| utleniony cytochrom c | |
| zredukowany cytochrom c | |
| widmo różnicowe | |

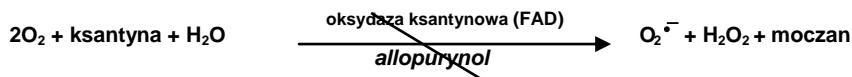
II. Powstawanie i eliminacja jonu nadtlenkowego

1. Naszkicuj przebieg krzywych kinetycznych w każdej z mieszanin reakcyjnych.
2. Przedstaw przy pomocy odpowiedniego **schematu** zachodzące przemiany (**odpowiednie równania reakcji**) w każdej z analizowanych mieszanin reakcyjnych oraz krótko omów obserwowane zmiany w widmach.

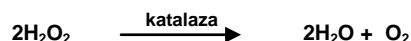
I. Tworzenie anionu nadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) w reakcji katalizowanej oksydazą ksantynową:



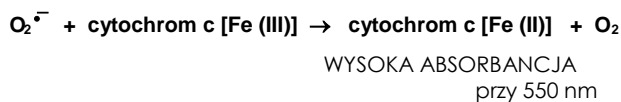
II. Hamowanie oksydazy ksantynowej allopurynolem:



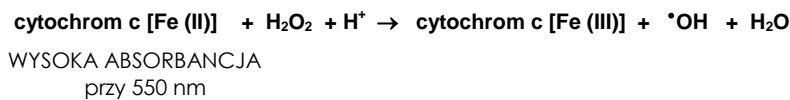
III. Dysmutacja nadtlenku wodoru katalizowana przez katalazę:



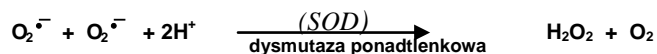
IV. Redukcja cytochromu c [Fe(III)] przez anion nadtlenkowy:



V. Utlenianie cytochromu c [Fe(II)] przez nadtlenek wodoru :



VI. Dysmutacja anionu nadtlenkowego przez dysmutazę nadtlenkową :



Mieszanina reakcyjna 1:

Mieszanina reakcyjna 2:

Mieszanina reakcyjna 3:

Mieszanina reakcyjna 4:

| Liczba punktów | | Data |
|-------------------|-----------|-----------|
| Test | Wykonanie | |
| | | Suma pkt. |
| | | |
| Podpis asystenta: | | |