

Ćwiczenie nr 6

Metabolizm węglowodanów – utlenianie glukozy w warunkach tlenowych z udziałem drożdży

Celem ćwiczenia jest:

- utlenianie glukozy w warunkach tlenowych i beztlenowych, przy udziale enzymów komórek drożdży.
- badanie przemian glukozy w obecności związków hamujących różne etapy glikolizy lub mitochondrialnego transportu elektronów.
- ilościowe oznaczenie glukozy metodą Somogyi-Nelsona

Wstęp teoretyczny

W komórkach wszystkich tkanek i narządów glukoza ulega fosforylacji do glukozy-6-fosforanu pod wpływem izoenzymów heksokinazy, kosztem energii ATP. **Szybkość estryfikacji glukozy w komórkach jest w przybliżeniu tego samego lub podobnego rzędu co szybkość transportu nośnikowego, stąd praktycznie w obrębie komórek wolna glukoza nie występuje.** Ufosforylowana glukoza nie przechodzi przez błonę cytoplazmatyczną poza komórkę, a powstający glukozy-6-fosforan jest bezpośrednim bądź pośrednim substratem w różnych torach metabolicznych przemiany węglowodanowej. Jego losy są zależne od **okresów** w ciągu doby (poposiłkowych i międzytrawiennych) oraz od **specyfiki funkcjonalnej** danej tkanki. Niektóre tor metaboliczne przemiany węglowodanowej przebiegają w komórkach wszystkich tkanek i narządów, **choć z różną szybkością**, zaś inne tylko w określonych tkankach. Stąd zużycie glukozy jest różne w poszczególnych tkankach. **Glikoliza oraz tor pentozofosforanowy**, dwa podstawowe kataboliczne tor przemiany węglowodanowej zachodzą w komórkach wszystkich tkanek i narządów. Podobnie jest z **glikozylacją**, prowadzącą do wytworzenia glikoprotein, jak również z **syntezą glikozaminoglikanów**, a następnie **proteoglikanów**. Z kolei synteza glikogenu (**glikogenogeneza**), a także degradacja tego związku (**glikogenoliza**) zachodzą tylko w wątrobie i w mięśniach. Natomiast synteza glukozy (**glukoneogeneza**) z metabolitów niecukrowych, (kwas mlekowy, glicerol i aminokwasy cukrotwórcze), ma miejsce w wątrobie oraz w korze nerek. Ponadto w wątrobie glukoza powstaje także z nadmiaru przyjętych z pożywieniem innych heksoz (fruktoza i galaktoza oraz mannoza).

Prawidłowe stężenie glukozy we krwi zależy z jednej strony od szybkości uwalniania tego cukrowca przez wątrobę lub jelito (dostarczanie do krwi), zaś z drugiej strony od szybkości pobierania go przez pozostałe tkanki (usuwanie z krwi). Należy podkreślić, że magazynowanie glukozy w formie glikogenu w wątrobie jest konieczne dla dostarczania jej do innych tkanek, które nie mogą magazynować tego cukrowca. Jest to szczególnie istotne w przypadku tych tkanek, w których glukoza jest podstawowym substratem energetycznym, np. dla mózgu.

W ciągu całej doby nośniki GLUT-1 i GLUT-3 zapewniają dopływ glukozy do komórek **mózgu**, w których głównym torem przemiany węglowodanowej jest **glikoliza**. Pirogronian, końcowy produkt glikolizy, przedostaje się z cytoplazmy do mitochondriów, gdzie ulega karboksylacji do szczawiooctanu oraz dekarboksylacji tlenowej do acetylo~CoA. Pierwsza z tych reakcji zachodzi pod wpływem karboksylazy pirogronianu, a druga przy udziale kompleksu multienzymatycznego dehydrogenazy pirogronianowej. Następnie kondensacja acetylo~CoA ze szczawiooctanem przy udziale syntetazy cytrynianowej (ze zużyciem ATP) prowadzi do wytworzenia cytrynianu. Zapewnia to prawidłową szybkość cyklu Krebsa, w trakcie którego powstają dwie cząsteczki dwutlenku węgla i trzy cząsteczki zredukowanego dinukleotydu nikotynamidoadeninowego $\text{NADH} + \text{H}^+$, które są bezpośrednio utleniane w łańcuchu oddechowym. Redukcja pośredników łańcucha oddechowego, zaś w końcowym efekcie tlenu powoduje powstawanie cząsteczek wody. Równolegle do łańcucha oddechowego zachodzi fosforylacja tlenowa, czyli wytwarzanie ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego. W tkance mózgowej ponad 70% wytworzonego ATP (na drodze fosforylacji substratowej i tlenowej) jest wykorzystywane na utrzymanie potencjału błonowego. Prawidłowy przebieg glikolizy, cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego jest więc szczególnie uzależniony od dopływu substratu, jakim jest glukoza, a także od dopływu tlenu. W ciągu doby mózg zużywa średnio 120 g glukozy. Natomiast z 16–20 moli tlenu przyjmowanych w ciągu tego samego okresu, aż 25% jest właśnie wykorzystywane przez mózg (o wadze około 1,2 kg). W mózgu cykl Krebsa jest także istotny dla utrzymania odpowiedniego stężenia związków pośrednich jak, na przykład kwasu α -ketoglutazarowego, uczestniczącego w wiązaniu toksycznych jonów amonowych.

W ciągu całej doby glukoza jest również podstawowym substratem energetycznym dla **erytrocytów**. Jest ona transportowana przy udziale nośnika GLUT-1. Erytrocyty są komórkami o ograniczonym zapotrzebowaniu energetycznym, bo nie zawierają ani jądra i mitochondriów, ani lizosomów i aparatu Golgiego. Cząsteczki ATP, powstające w tych komórkach podczas fosforylacji substratowej, zachodzącej w trakcie **glikolizy**, są zużywane głównie na utrzymanie gradientu stężeń elektrolitów i potencjału spoczynkowego błony. Powstający jako produkt glikolizy pirogronian musi być więc zredukowany do mleczanu, który jest usuwany do krwi na drodze dyfuzji niejonowej, bądź transportem nośnikowym na zasadzie symportu (anion mleczanowy i jon H^+). Mleczan przedostaje się do wątroby, gdzie jest wykorzystywany do syntezy glukozy. Przechodzenie mleczanu z erytrocytów do wątroby, a następnie uwalnianie wytworzonej glukozy, z powrotem do krwi zwane jest cyklem Corrich. Do odrębności metabolicznych w zakresie glikolizy w erytrocytach należy także zdolność przekształcania 1,3-difosfoglicerynianu w 2,3-difosfoglicerynian, z równoczesnym ominięciem pierwszej reakcji fosforylacji substratowej. Związek ten zmniejszając powinowactwo hemoglobiny do tlenu, ułatwia dysocjację oksyhemoglobiny na hemoglobinę i tlen. Ponieważ reakcja ta musi zachodzić dostatecznie szybko, stężenie 2,3 difosfoglicerynianu w erytrocytach jest tego samego rzędu, co stężenie hemoglobiny. W erytrocytach część glukozy jest też zużywana w torze **pentozofosforanowym**, przy czym szczególnie ważny jest oksydacyjny, nieodwracalny pierwszy etap tego toru, w trakcie którego następuje redukcja dinukleotydu NADP do $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Zredukowany dinukleotyd $\text{NADPH} + \text{H}^+$ jest niezbędny do redukcji glutationu w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową. Z kolei zredukowany glutation przy współudziale seleno-zależnej peroksydazy glutationu uczestniczy w usuwaniu nadtlenu wodoru. Należy pamiętać, że nadtlenek wodoru ułatwia utlenianie jonów metali przejściowych (miedzi i żelaza), co prowadzi do powstawania reaktywnego rodnika hydroksylowego, a następnie także innych reaktywnych form tlenu. Uszkadzają one

błonę komórkową utleniając przede wszystkim nienasycone kwasy tłuszczowe wchodzące w skład lipidów błonowych. W przypadku erytrocytów uszkodzenie błony prowadzi do hemolizy. Odpowiedni poziom zredukowanego glutationu zapobiega też wytwarzaniu methemoglobiny z hemoglobiny.

Wątroba jest narządem, w którym tor metaboliczny przemiany węglowodanowej przebiega inaczej po posiłkach niż w okresach międzytrawiennych. **Po posiłkach** przede wszystkim zachodzi szybkie przekształcanie glukozy w glukozo-6-fosforan nie tylko pod wpływem heksokinazy, ale także glukokinazy. Izoenzymy te różnią się powinowactwem do glukozy (glukokinaza ma znacznie wyższą wartość K_m i może działać przy dużym stężeniu glukozy), oraz mają odmienną wrażliwość na glukozo-6-fosforan (heksokinaza jest hamowana przez glukozo-6-fosforan). Tak więc fosforylacja przy współdziałaniu obydwóch kinaz, powoduje, że stężenie wolnej glukozy w hepatocytach jest minimalne nawet przy dużym posiłku węglowodanowym. Sprzyja to dalszemu napływowi tego cukrowca do komórek wątroby. W hepatocytach, zachodzi wtedy przede wszystkim **uzupełnianie zapasu glikogenu**. Należy podkreślić, że substancją wyjściową oprócz glukozy mogą być także inne heksozy, a nawet związki niecukrowe, a przede wszystkim mleczan. Wytworzony z tych związków glukozo-6-fosforan ulega izomeryzacji do glukozo-1-fosforanu pod wpływem fosfoglukomutazy. Powstająca następnie, z glukozo-1-fosforanu i UTP pod wpływem pirofosforylasy UDP-glukozy, aktywna glukoza (UDPG) jest już bezpośrednim substratem używanym do syntezy glikogenu, przy czym enzymem kluczowym jest tu syntaza glikogenowa. Proces ten polega przeważnie na wydłużaniu łańcucha polisacharydowego na „primerze” glikogenowym, a czasami rozpoczyna się od „primera” białkowego zwanego glikogeniną. Zawsze jednak pod wpływem syntazy glikogenowej tworzą się wiązania glikozydowe typu $\alpha 1,4$, oraz uwalnia się nieorganiczny pirofosforan. Ulega on hydrolizie pod wpływem pirofosfatazy, co warunkuje nieodwracalność powstawania wiązania glikozydowego pomiędzy C-1 aktywnej glukozy i C-4 końcowych reszt glukozowych w glikogenie. W ten sposób wątroba „przygotowuje” zapas glikogenu dla okresów międzytrawiennych. Glikogen w wątrobie stanowi około 6% masy mokrej tkanki.

Jeżeli po posiłku, stężenie glukozy w żyłach wrotnej utrzymuje się w granicach 7–9 mmol/l, to w wątrobie dominuje magazynowanie glikogenu, zaś nasilenie glikolizy jest tylko umiarkowane. **Przy diecie wysokowęglowodanowej**, obok resyntezy glikogenu intensywnie zachodzi zarówno **glikoliza**, jak i tor **pentozofosforanowy**, zaś w konsekwencji **synteza kwasów tłuszczowych i cholesterolu**. Wtedy glikoliza może zachodzić nawet z 10-krotnie większą szybkością niż w innych tkankach. Obok dużego stężenia substratu (napływ glukozy) nasila się także aktywność enzymów kluczowych, takich jak fosfofruktokinaza-I i kinaza pirogronianowa. Końcowym produktem **glikolizy** jest pirogronian, który z cytoplazmy przedostaje się do mitochondriów transportem nośnikowym, na zasadzie symportu (jon pirogronianu z jodem H^+). Równoczesne wytwarzanie szczawiooctanu i acetylo-CoA prowadzi do powstawania cytrynianu, co warunkuje prawidłową szybkość cyklu Krebsa. Jednak nadmiar powstającego cytrynianu przedostaje się do cytoplazmy, gdzie powstały z tego związku acetylo-CoA jest substratem wyjściowym do syntezy kwasów tłuszczowych, jak również cholesterolu. W trakcie syntezy tych związków musi być wykorzystywana zredukowana forma dinukleotydu $NADP^+$, która powstaje w nieodwracalnym, oksydacyjnym etapie toru **pentozofosforanowego**. Wtedy nawet do 40% glukozy dostającej się do wątroby może być metabolizowana na tej drodze. Powstające kwasy tłuszczowe są bezpośrednio używane do wytwarzania triacylogliceroli (TG). Część cholesterolu jest natomiast estryfikowana do jego estrów, zaś pozostała część używana do wytwarzania kwasów

żółciowych. Zarówno **TG, jak i cholesterol oraz jego estry**, jako związki nierozpuszczalne w wodzie są wiązane we frakcji lipoproteinowej VLDL, usuwanej z wątroby do krwi bezpośrednio po jej wytworzeniu. Ponadto po posiłkach **nasila się utlenianie aktywnej glukozy** (UDPG) do UDP-glukuronianu. Związek ten w wątrobie jest zużywany w reakcjach sprzęgania z substancjami nierozpuszczalnymi w wodzie. Powstają wtedy glukuronidy z niektórymi substancjami endogennymi, takimi jak bilirubina i hormony steroidowe, a także ze związkami egzogennymi, przyjmowanymi na przykład z pokarmem, jak również z niektórymi lekami. Jednak UDP-glukuronian jest przede wszystkim zużywany do syntezy glikozaminoglikanów, a następnie proteoglikanów. Główną funkcją wątroby **w okresach międzytrawiennych** w zakresie przemiany węglowodanowej jest dostarczanie glukozy do krwi. Zachodzi więc wtedy degradacja, nagromadzonego w okresach poposiłkowych glikogenu.

W **mięśniach**, podobnie jak w wątrobie, nasilenie torów przemiany węglowodanowej, jest zależne od okresów w ciągu doby (poposiłkowych i międzytrawiennych). **Po posiłkach** insulina oprócz pozytywnego wpływu na nośnik GLUT-4, od czego jest uzależniona szybkość pobierania glukozy, zwiększa także aktywność heksokinazy-I. W mięśniach glukoza jest zużywana przede wszystkim do **regeneracji zapasu glikogenu**. W pierwszym etapie powstały glukozo-6-fosforan jest zamieniany w glukozo-1-fosforan, a ten ostatni w UDPG, substrat zużywany w trakcie syntezy glikogenu. Zawartość glikogenu w mięśniach, po uzupełnieniu zapasu, nawet po posiłkach nie przekracza 1–2% masy mokrej tkanki. Część glukozo-6-fosforanu jest wtedy również wykorzystywana do wytwarzania innych monosacharydów, heksozamin, kwasów sjalowych i kwasów uronowych oraz ich pochodnych, zużywanych w glikozylacji białek, a także w syntezie glikozaminoglikanów, a następnie proteoglikanów. Nadmiar niewykorzystanej glukozy, może być wtedy materiałem energetycznym dla mięśni, przy czym stopień **nasilenia glikolizy** zależy pośrednio od ilości węglowodanów w pożywieniu. Powstający w trakcie glikolizy pirogronian, po przedostaniu się z cytoplazmy do mitochondriów, w mięśniach ulega głównie karboksylacji do szczawiooctanu. Acetylo~CoA jest bowiem wytwarzany z kwasów tłuszczowych w trakcie β -oksydacji. Kwasy tłuszczowe stanowią podstawowy materiał energetyczny dla tej tkanki, stąd w ciągu całej doby w mięśniach jest wystarczająca ilość acetylo~CoA. Pirogronian może być też zużywany do wytwarzania alaniny, która przedostaje się do krwi, a następnie do wątroby (cykl alaninowy). W **okresach międzytrawiennych** pobieranie glukozy przez mięśnie jest ograniczone. Podobnie jak w wątrobie, zachodzi wtedy degradacja glikogenu na drodze **glikogenolizy**. Powstający glukozo-1-fosforan jest przekształcany w glukozo-6-fosforan. Ze względu na brak w mięśniach fosfatazy glukozo-6-fosforanu, związek ten jest zużywany przede wszystkim w **glikolizie**. W trakcie degradacji jednej cząsteczki glukozo-6-fosforanu powstają dwie cząsteczki ATP na drodze fosforylacji substratowej (wytwarzanie ATP kosztem innych związków wysokoenergetycznych, jak kwas 1,3 difosfoglicerynowy oraz 2-fosfoenolpirogronian, a także bursztynylo~CoA) i zachodzi w cytoplazmie oraz w mitochondriach. Zaś fosforylacja tlenowa przebiega w mitochondriach i prowadzi do wytwarzania ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego, kosztem energii uzyskiwanej w trakcie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym. **W mięśniach szybkość glikolizy musi być jednak zawsze wystarczająca do wytwarzania takiej ilości pirogronianu, a następnie szczawiooctanu, która zapewniałaby prawidłową szybkość cyklu Krebsa.** Acetylo~CoA powstaje wtedy w trakcie degradacji kwasów tłuszczowych (β -oksydacja). Ponadto znacznie większa ilość pirogronianu jest przekształcana do alaniny w okresach międzytrawiennych niż po posiłkach.

W mięśniach, zależnie od potrzeb zmienia się szybkość glikolizy. Przyjmuje się, że w spoczynku mięśnie zużywają tylko około 30% tlenu pobieranego przez organizm. Stąd **przy nadmiernym wysiłku**, w trakcie którego dochodzi do niedotlenienia mięśni, zwiększa się szybkość glikogenolizy, a następnie glikolizy. Zużycie glukozy jest więc większe niż w stanie spoczynku. Mięśnie są wyjątkową tkanką, w której szybkość fosforylacji substratowej może być wystarczająca do uzyskania potrzebnej ilości ATP, ale tylko przez krótki okres czasu. W tych warunkach zasadniczym problemem jest reoksydacja zredukowanego dinukleotydu $\text{NADH} + \text{H}^+$. Redukcja NAD zachodzi podczas utleniania aldehydu 3-fosfoglicerynowego do 1,3-difosfoglicerynianu, przy współdziałaniu dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego. W warunkach ograniczonego dostępu tlenu taka reoksydacja zachodzi w cytoplazmie, a nie w mitochondriach. Dla odtworzenia utlenionej formy koenzymu NAD^+ pirogronian jest redukowany do mleczanu. Enzymem katalizującym tę reakcję jest dehydrogenaza mleczanowa współdziałająca z $\text{NADH} + \text{H}^+$. Reakcja ta zapewnia więc regenerację dinukleotydu NAD^+ , na skutek czego glikoliza może zachodzić nawet przy bardzo ograniczonym dostępie tlenu. Nadmiar mleczanu jest usuwany do krwi na drodze dyfuzji niejonowej bądź transportem nośnikowym na zasadzie symportu. Istotne jest usunięcie jonów H^+ poza komórkę, bowiem wtedy następuje **dalsze nasilenie glikolizy**. Z krwi mleczan przedostaje się do wątroby, gdzie jest wykorzystywany do syntezy glukozy. Przechodzenie mleczanu z mięśni do wątroby, a następnie jego przekształcanie w glukozę, która poprzez krew może ponownie „wędrować” do mięśni nazywane cyklem Corich, zachodzi przy niedotlenieniu. Tak więc podczas wysiłku poziom glukozy we krwi, konieczny do funkcjonowania mózgu, ale także mięśni szkieletowych, jest podtrzymywany na skutek nasilenia glukoneogenezy przebiegającej w wątrobie. Substratem wykorzystywanym wtedy w dużym stopniu jest mleczan wytwarzany w mięśniach.

Tkanka tłuszczowa jest najbardziej wrażliwa na działanie insuliny, stąd **po posiłku** glukoza bardzo szybko przedostaje się do adipocytów przy udziale nośnika GLUT-4. Proporcjonalnie do ilości pobranej glukozy, nasila się wtedy szybkość **glikolizy**. Powstający fosfodihydroksyaceton ulega redukcji do fosfoglicerolu pod wpływem dehydrogenazy fosfoglicerolu działającej z dinukleotydem NAD^+ . Fosfoglicerol jest zużywany wraz z napływającymi kwasami tłuszczowymi do syntezy triacylogliceroli (TG), które są następnie magazynowane w adipocytach, jako rezerwa energetyczna ustroju. Gdy napływ glukozy do adipocytów jest zbyt duży, a ilość ATP wystarczająca, pirogronian ulega redukcji do mleczanu, który jest następnie usuwany do krwi. Podobnie jak w pozostałych tkankach pewna ilość glukozy jest przekształcana do innych monosacharydów, heksozamin, kwasów sjałowych i kwasów uronowych oraz ich pochodnych, zużywanych w glikozylacji białek oraz do syntezy glikozaminoglikanów, a następnie proteoglikanów. W tkance tłuszczowej tor pentozofosforanowy zachodzi wolno i to głównie nieoksydacyjny, odwracalny etap tego toru. W **okresach międzytrawiennych** transport glukozy do komórek insulinozależnej tkanki tłuszczowej jest w bardzo znacznym stopniu zahamowany, co ogranicza szybkość glikolizy, podobnie jak inne tory przemiany węglowodanowej.

Glukoza, jako substancja dobrze rozpuszczalna w wodzie jest łatwo transportowana w osoczu krwi. Jednak jej przechodzenie do komórek jest już uwarunkowane sprawnością nośników glukozy. Po przedostaniu się do komórek glukoza wchodzi w tory metaboliczne przemiany węglowodanowej, zależnie od specyfiki funkcjonalnej danej tkanki. Przy ocenie przemiany węglowodanowej w organizmie należy też uwzględnić występujące po sobie w ciągu doby okresy poposiłkowe i międzytrawienne. Szybkość torów metabolicznych przemiany węglowodanowej, jest zawsze regulowana hormonalnie.

Utrzymanie prawidłowego stężenia glukozy we krwi zależy głównie od działania takich hormonów jak insulina, glukagon, aminy katecholowe i kortyzol. Oznaczanie stężenia glukozy, jako jedno z ważnych i często wykorzystywanych badań diagnostycznych w płynach ustrojowych, daje pewną możliwość wglądu w przemianę węglowodanową. Zmiany stężenia glukozy we krwi mogą być bowiem pierwszym sygnałem zaburzenia nie tylko w obrębie przemiany węglowodanowej, ale także lipidowej.

Istotnym, z punktu widzenia biochemii człowieka, jest oznaczenie glukozy

- we krwi
- w moczu (w stanach patologicznym).

Z biologicznego punktu widzenia

- ciekawym zagadnieniem dotyczącym przemian monocukrowców jest także fermentacja.

Ilościowe oznaczenie glukozy we krwi

W metodach stosowanych do oznaczania stężenia glukozy w płynach ustrojowych wykorzystuje się

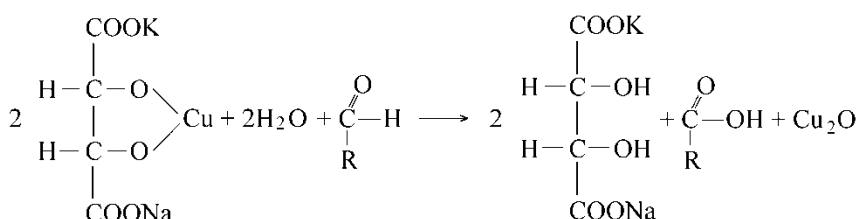
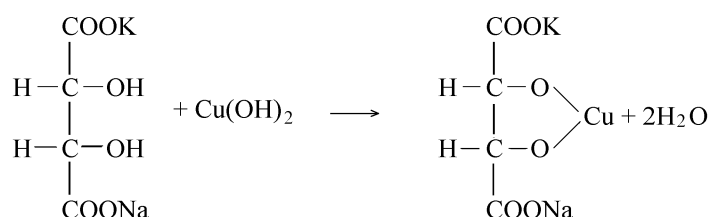
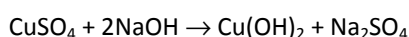
- właściwości redukujące
- tworzenie barwnych produktów w reakcjach kondensacji
- czynność optyczną
- swoiste metody enzymatyczne, oparte na działaniu określonych enzymów.

Podczas oznaczania stężenia glukozy we krwi uzyskiwane wyniki są w znacznym stopniu zależne od stosowanej metody, stąd zakres wartości prawidłowych należy ustalać w oparciu o określoną metodę. Ze wzrostem swoistości metody zakres wartości jest mniejszy, przy czym mniejszy dla metod enzymatycznych niż dla redukcyjnych. Oznaczenie stężenia glukozy we krwi powinno być wykonane w ciągu 30 min od momentu pobrania próbki (np. w czasie jednej godziny w temperaturze pokojowej, pod wpływem występujących we krwi enzymów, ok. 5% glukozy ulega degradacji w glikolizie, co powoduje zniżenie wyników). Aby zahamować glikolizę, krew pobiera się do odczynnika odbiałczającego, niezależnie od reakcji, która jest podstawą metody oznaczenia stężenia glukozy. Odbiałczanie przebiega w odmienny sposób w przypadku każdej z metod, przy czym dotyczy to zarówno rodzaju, jak i ilości użytej substancji odbiałczającej. W metodach redukcyjnych i kondensacyjnych do wytrącania białek stosuje się związki działające bardziej drastycznie, takie jak wodorotlenek cynku, otrzymywany w środowisku reakcji z wodorotlenku baru i siarczanu cynku (w metodzie Somogyi-Nelsona) oraz kwas trichlorooctowy (w metodzie Hultmana). Substancje odbiałczające, oprócz wytrącania białek i denaturacji enzymów koniecznych do glikolizy, wiążą także inne związki na skutek nieswoistej adsorpcji na osadzie. Usuwana jest znaczna część związków o charakterze redukującym, np. ketoheksozy lub związki niecukrowe, takie jak kwas askorbinowy, cysteina, glutation, kwas glukuronowy, kreatyna i kwas moczowy (związki te, mogłyby reagować z zastosowanymi odczynnikami powodując zawyżanie wyników podczas oznaczania stężenia glukozy). W enzymatycznych metodach stosuje się mniejsze ilości oraz łagodniejszy odczynnik odbiałczający, (np. kwas chlorowy(VII) – istnieje możliwość łatwego usunięcia nadmiaru tego kwasu przez wytrącenie go w postaci osadu chloranu potasu). Ze względu na dużą swoistość metod enzymatycznych nie jest konieczne

tak dokładne usuwanie innych związków redukujących. W przypadku metod enzymatycznych wyniki oznaczenia dotyczą głównie glukozy (inne heksozy, które w stanach patologicznych mogłyby znajdować się we krwi, nie wchodzą zwykle w tę samą reakcję co glukoza) Glukozę oznacza się dopiero w nadsączy, uzyskanym po odwirowaniu osadu. Zależnie od rodzaju badanego materiału (krew, płyn mózgowo rdzeniowy lub mocz, a także homogenat tkanki) zawsze należy wybrać odpowiednią metodę.

1. Metoda redukcyjna Somogyi-Nelsona

- oznaczenie stężenia glukozy we krwi przeprowadza się w środowisku zasadowym, zawierającym równocześnie winian sodowo-potasowy (umożliwia tworzenie kompleksów z jonami metali).
- glukoza redukuje jony miedzi z +2 na +1 stopień utlenienia, zaś grupa aldehydowa glukozy utlenia się do karboksylowej i powstaje kwas glukonowy.
- utworzony tlenek miedzi(+1), o barwie ceglastoczerwonej, redukuje kwas arseno-molibdenowy lub fosforo-molibdenowy do błękitu molibdenowego (o barwie niebieskiej), utleniając tym samym zaangażowane w reakcji jony miedzi z +1 na +2 stopień utlenienia
- natężenie barwy roztworu błękitu molibdenowego jest proporcjonalne do ilości tlenu miedzi(+1), a pośrednio do ilości glukozy.

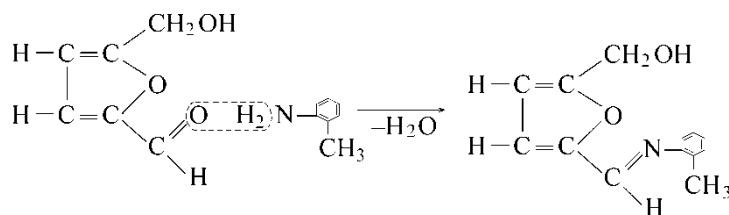


2. Metoda kondensacyjna Hultmana

Przy oznaczaniu stężenia glukozy we krwi metodą Hultmana

- jako substancję odwadniającą stosuje się lodowaty kwas octowy.
- powstaje wtedy hydroksymetylenofurfural, który kondensuje z aminą aromatyczną – orto-toluidyną tworząc barwne połączenie, zgodnie z poniższą reakcją.
- natężenie barwy roztworu zawierającego produkt kondensacji, jest proporcjonalne do stężenia oznaczanej glukozy.
- metody kondensacyjne są bardziej swoiste niż metody redukcyjne, ponieważ w reakcję wchodzi tylko cukrowce, które w warunkach metody mogą ulegać odwodnieniu.

- metoda Hultmana można traktować jako swoistą dla glukozy ze względu na to, że nie zmieniają wyników ani substancje redukujące występujące we krwi, ani ketoheksosa, fruktoza, która nie reaguje z orto-toluidyną.
- reakcję tę może dawać jedynie galaktoza. Jednak stężenie tego cukrowca w warunkach prawidłowych jest we krwi minimalne.
- wyjątkowo stężenie galaktozy może wzrastać we krwi u ludzi spożywających duże ilości mleka, a także u noworodków i niemowląt (wtedy podaje się sumarycznie stężenie glukozy i galaktozy)
- metodę Hultmana stosuje się także dla oznaczenia stężenia glukozy w moczu (w stanach patologicznych).
- stosowanie tej metody wymaga jednak zachowania szczególnej ostrożności ze względu na konieczność pracy z lodowatym kwasem octowym.



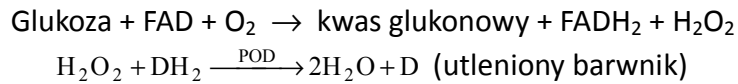
3. Oznaczenie glukozy we krwi metodą enzymatyczną

- oznaczanie często oparte są na dwóch sprzężonych reakcjach enzymatycznych,
- **zasadę sprzęgania** ze sobą co najmniej dwóch **reakcji** stosuje się wtedy, gdy ani substraty, ani produkty właściwej reakcji katalizowanej enzymatycznie nie absorbują światła o długości fali dogodnej do zmierzenia.
- aby umożliwić pomiar pierwszej reakcji, sprzęga się ją z inną reakcją, taką w której zachodzi charakterystyczna zmiana absorbancji, przy czym druga reakcja nie może być etapem ograniczającym
- drugi enzym, jak również jego substraty i koenzymy muszą być użyte w nadmiarze. Zachowanie tego warunku sprawia, że reakcja katalizowana przez właściwy enzym zachodzi nieodwracalnie, bowiem drugi enzym w pełni wykorzystuje powstały produkt jako własny substrat.
- czułość metod enzymatycznych stosowanych do oznaczania stężenia glukozy jest od kilku do kilkunastu razy większa w porównaniu z metodami kondensacyjnymi lub redukcyjnymi.
- metody enzymatyczne są bardziej precyzyjne i dokładne.
- metoda peroksydazowa jest mniej czuła niż heksokinazowa.

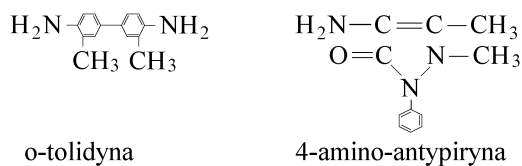
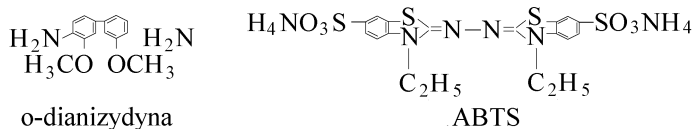
3a. W metodzie peroksydazowej Huggeta-Nixona (zwanej metodą GOD-POD)

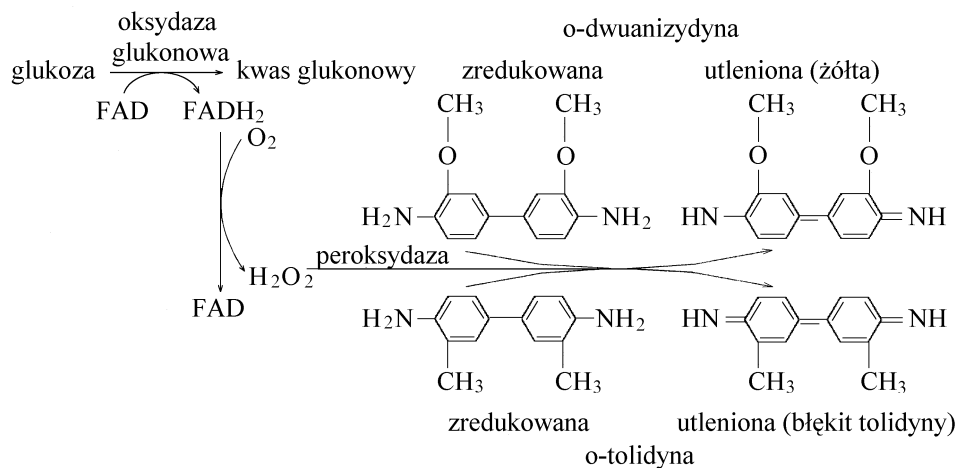
- oznaczanie glukozy opiera się na dwóch reakcjach, z których pierwsza jest wysoce swoista dla glukozy.
- do oznaczenia wykorzystuje się aktywność dwóch enzymów – oksydazy glukozowej (GOD), będącej flawoproteiną z dinukleotydem FAD oraz peroksydazy (POD), będącej hemoproteiną
- glukoza pod wpływem oksydazy glukozowej utlenia się do kwasu glukonowego, natomiast

- dinukleotyd FAD redukuje się do FADH₂,
- proporcjonalnie do ilości zredukowanego FADH₂ powstaje stechiometryczna ilość nadtlenu wodoru,
 - wytworzony nadtlenek wodoru utlenia o-dianizydynę (chromogen), a sam redukuje się do wody, zgodnie z przedstawionym poniżej równaniem reakcji:



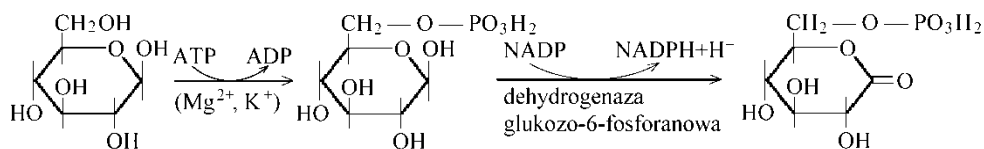
- natężenie barwy utlenionego chromogenu jest wprost proporcjonalne do stężenia nadtlenu wodoru, a pośrednio proporcjonalne do stężenia glukozy w badanej próbce
- chociaż pierwsza reakcja enzymatyczna w metodzie GOD-POD jest swoista tylko dla glukozy, to jednak ze względu na drugą reakcję enzymatyczną, badane próbki odbiać się stosując kwas chlorowy(VII). Odbiać powoduje wtedy zarówno wytrącanie białek, jak i usuwanie z roztworu większość interferujących substancji
- wśród usuwanych substancji jest enzym katalaza, która przyspiesza reakcję dysmutacji nadtlenu wodoru, co powodowałaby zaniżanie wyników.
- usunięciu, wraz z wytrąconym białkiem, ulegają także występujące we krwi inne związki o charakterze redukującym, takie jak kwas moczowy, kreatynina, bilirubina, kwas askorbinowy i glutation. Mogą one zmieniać ilość utlenionego barwnika, czyli zredukować H₂O₂, co też powodowałoby zaniżanie wyników.
- metoda GOD-POD, w której jako barwnik stosuje się o-dianizydynę, została zmodyfikowana przez wprowadzenie innego chromogenu – ABTS czyli 2,2-azini-di(3-etylobenzotiazolino)-6-sulfonianu dwuamonowego, który łatwiej ulega utlenieniu w warunkach reakcji (metoda GOD-Perid). W ten sposób zwiększyła się czułość i swoistość oznaczenia glukozy.
- pomiary absorbancji wzorca glukozy i badanych próbek przeprowadza się przy długości fali 436 nm.
- zużycie glukozy przelicza się na godz/ mg białka w mieszaninie inkubacyjnej.





3b. W metodzie heksokinazowej

- oznaczenie glukozy też opiera się na dwóch reakcjach,
- wykorzystuje się aktywność heksokinazy i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu,
- w pierwszej reakcji z glukozy i ATP przy współudziale heksokinazy powstaje glukozy-6-fosforan oraz ADP.
- glukozy-6-fosforan jest następnie utleniany do 6-fosfoglukonolaktonu pod wpływem dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu, współdziałającej z dinukleotydem NADP^+ ,
- w trakcie reakcji dinukleotyd NADP^+ ulega redukcji do $\text{NADPH} + \text{H}^+$, zgodnie z poniższym równaniem reakcji:



- ilość zredukowanego dinukleotydu $\text{NADPH} + \text{H}^+$ jest proporcjonalna do ilości glukozy-6-fosforanu, a więc pośrednio do ilości glukozy w badanej próbce,
- zredukowany dinukleotyd $\text{NADPH} + \text{H}^+$ oznacza się spektrofotometrycznie wykorzystując optyczny test Warburga. Zarówno dinukleotyd NADP^+ , jak i zredukowany $\text{NADPH} + \text{H}^+$ charakteryzują się ze względu na adeninę, intensywnym pochłanianiem promieniowania przy 260 nm.
- powstawanie zredukowanej formy dinukleotydu jest związane z redukcją pierścienia pirydynowego, który traci swój aromatyczny charakter, a pojawia się wtedy dodatkowe pasmo pochłaniania światła przy 340 nm,
- podstawą testu Warburga jest przyrost absorbancji światła przy długości fali 340 nm, który świadczy o powstawaniu zredukowanej formy dinukleotydu $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Służy to do obliczenia ilości glukozy w badanej próbce,
- ilość zredukowanego dinukleotydu $\text{NADPH} + \text{H}^+$ jest proporcjonalna do ilości glukozy-6-fosforanu, a więc pośrednio do ilości glukozy w badanej próbce,
- zredukowany dinukleotyd $\text{NADPH} + \text{H}^+$ oznacza się spektrofotometrycznie wykorzystując

- optyczny test Warburga. Zarówno utleniony dinukleotyd NADP^+ , jak i zredukowany $\text{NADPH}+\text{H}^+$ charakteryzują się ze względu na adeninę, intensywnym pochłanianiem promieniowania przy 260 nm,
- powstawanie zredukowanej formy dinukleotydu jest związane z redukcją pierścienia pirydynowego, który traci swój aromatyczny charakter, a pojawia się wtedy dodatkowe pasmo pochłaniania światła przy 340 nm,
 - podstawą testu Warburga jest przyrost absorbancji światła przy długości fali 340 nm, który świadczy o powstawaniu zredukowanej formy dinukleotydu $\text{NADPH}+\text{H}^+$. Służy to do obliczenia ilości glukozy w badanej próbce,
 - absorbancję mierzy się po 15 min inkubacji, przy 340 nm, w temperaturze 25°C , wobec ślepej odczynnikowej,
 - metoda heksokinazowa jest swoista i czuła, choć nie stosuje się jej powszechnie ze względu na koszty.

4. Polarymetryczne oznaczenie stężenia glukozy w moczu

Cukrowce ze względu na obecność węgli asymetrycznych w cząsteczce są związkami optycznie czynnymi, czyli posiadają zdolność skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego (są prawo- lub lewoskrętne). Wielkość kąta skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego, w przypadku wodnego roztworu cukrowca, jest proporcjonalna do jego stężenia w roztworze, temperatury i długości fali spolaryzowanego promienia. Dla porównania ze sobą zdolności skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego przez różne związki optycznie czynne, wprowadzono pojęcie skręcalności właściwej.

Skręcalność właściwa jest to kąt, mierzony w stopniach, o jaki zostanie skręcona płaszczyzna monochromatycznego światła spolaryzowanego (linia D światła sodowego, przy długości fali 589,3 nm), po przejściu przez warstwę roztworu substancji optycznie czynnej o stężeniu 1 g/ ml i grubości 1 dm (10 cm), w temperaturze 20°C . Skręcalność właściwą wyraża się zależnością:

$$[\alpha_D^{20}] = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot c}$$

gdzie:

- α – kąt o jaki została skręcona płaszczyzna światła spolaryzowanego po przejściu przez badany roztwór
- l – grubość warstwy roztworu (w decymetrach), przez którą przechodzi światło spolaryzowane;
- c – stężenie badanego roztworu w g/100 ml.

Znając skręcalność właściwą danej substancji, grubość warstwy roztworu, przez który przechodzi światło spolaryzowane oraz kąt o jaki została skręcona płaszczyzna światła spolaryzowanego, można oznaczyć stężenie procentowe substancji optycznie czynnej w roztworze, wg wzoru:

$$c = \frac{\alpha \cdot 100}{[\alpha_D^{20}] \cdot l}$$

- zależność pomiędzy kątem skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego, a stężeniem substancji jest wprost proporcjonalna tylko dla rozcieńczonych, 0,5–10% roztworów.
- metoda polarymetryczna jest stosowana do oznaczania stężenia glukozy w moczu, w warunkach patologicznych,
- warunkiem niezbędnym przy oznaczeniu glukozy w moczu jest usunięcie innych substancji

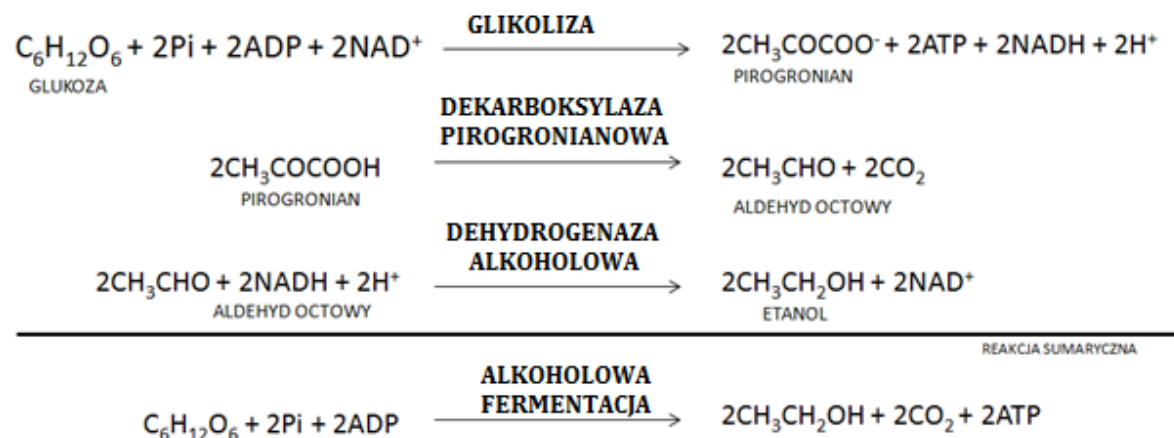
- optycznie czynnych (aminokwasy, hydroksykwas), wszelkich zmętnień oraz barwników. Stosuje się do tego, na przykład węgiel aktywny lub octan ołowiu(+2).
- mocz przeznaczony do oznaczenia glukozy metodą polarymetryczną należy najpierw odbiałczyć, usunąć wszelkie zmętnienia czy osady oraz odbarwić.

5. Półilościowe oznaczenie glukozy w moczu za pomocą papierków testowych

- Do półilościowego oznaczenia glukozy we krwi lub w moczu, stosuje się papierki testowe.
- są one nasycone mieszaniną zawierającą flawoproteinową oksydazę glukozy z *Penicillium notatum*, a także peroksydazę z chrzanu oraz chromogen zmieniający barwę po utlenieniu
 - glukoza jest utleniana do kwasu glukonowego, a dinukleotyd FAD redukuje się do FADH₂,
 - powstały w tej reakcji nadtlenek wodoru w obecności peroksydazy utlenienia bezbarwną ortotoluidynę do pochodnej o barwie niebieskiej lub w przypadku innych pasków testowych o-dianizydyne do żółtej pochodnej
 - jest to metoda szybkiego, półilościowego oznaczenia glukozy, gdy jej stężenie we krwi badanego przewyższa wartości prawidłowe.

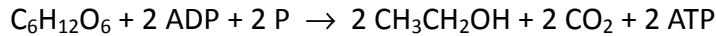
6. Fermentacja alkoholowa glukozy

Organizmami zdolnymi do fermentacji alkoholowej, polegającej na degradacji glukozy do alkoholu etylowego, są przede wszystkim drożdże. Fermentacja alkoholowa do etapu wytwarzania pirogronianu nie różni się od glikolizy. Powstający z glukozy w warunkach tlenowych pirogronian jest utleniany dalej do acetyloCoA, bądź karboksylowany do szczawiooctanu. Zapewnia to prawidłowy przebieg cyklu Krebsa, a następnie łańcucha oddechowego, co prowadzi do powstawania ATP na drodze fosforylacji tlenowej.



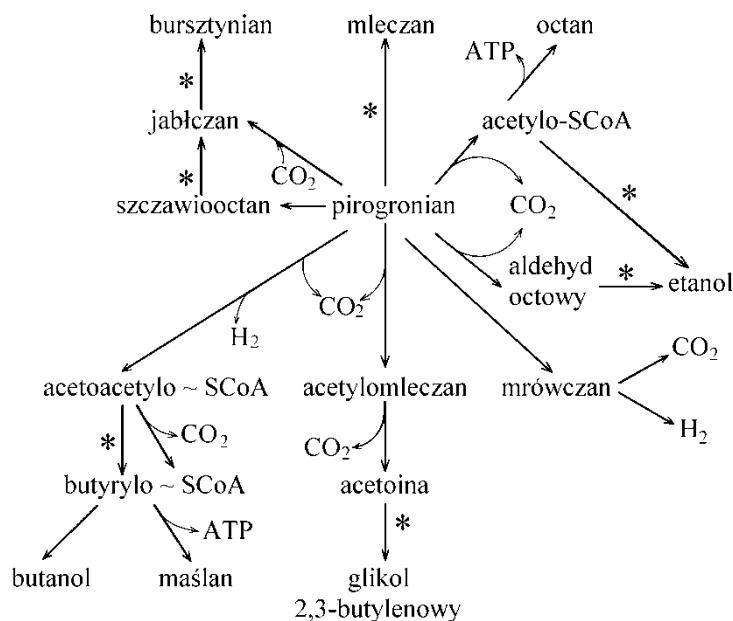
W warunkach ograniczonego dostępu tlenu następuje upośledzenie procesów mitochondrialnych. W drożdżach dochodzi do nasilenia fermentacji alkoholowej, w trakcie której pirogronian jest metabolizowany do etanolu. Biorą w tym udział dwa enzymy. W pierwszym etapie pirogronian ulega nieoksydacyjnej dekarboksylacji do aldehydu octowego. Reakcja zachodzi pod wpływem dekarboksylazy pirogronianowej, współdziałającej z pirofosforanem tiaminy TPP (brak u człowieka). Jest to reakcja nieodwracalna, stąd można przyjąć, że bezpośrednio po wytworzeniu aldehyd jest redukowany do etanolu przy udziale

dehydrogenazy alkoholowej. Utworzony alkohol jest końcowym produktem fermentacji alkoholowej, którą sumarycznie można zapisać:



Donorem atomów wodoru jest zredukowany dinukleotyd $NADH+H^+$, powstający podczas utlenienia aldehydu 3-fosfoglicerolowego do kwasu 1,3-difosfoglicerolowego. Redukcja aldehydu octowego do etanolu umożliwia regenerację NAD^+ , zaś w konsekwencji powoduje nasilenie fermentacji etanolowej w warunkach ograniczonego dostępu tlenu. ATP powstaje wtedy na drodze fosforylacji substratowej.

Są także drobnoustroje w których może zachodzić fermentacja mleczanowa. Wtedy regeneracja NAD^+ następuje w trakcie redukcji pirogronianu do mleczanu pod wpływem dehydrogenazy mleczanowej współdziałającej z dinukleotydem $NADH+H^+$, jako dawcą wodorów. Ponadto u jeszcze innych drobnoustrojów występują różne modyfikacje fermentacji lub zupełnie odrębne procesy, których celem jest regeneracja powstającego w glikolizie zredukowanego dinukleotydu $NADH+H^+$ do NAD^+ . Jak się podaje, wśród końcowych produktów tych reakcji mogą być takie metabolity, jak propionian, jabłczan, maślan, octan lub mrówczan. Procesy te, zachodzące przy ograniczonym dostępie tlenu, stanowią pewien rodzaj przystosowania bakterii do wytwarzania energii metabolicznej na drodze fosforylacji substratowej.



Schemat przebiegu różnego typu fermentacji

- przy ocenie przebiegu fermentacji alkoholowej jako źródło enzymów stosuje się zawiesinę drożdży (też ekstrakt bezkomórkowy drożdży, powstały przez autolizę – liza komórek spowodowana w odpowiednich warunkach ich własnymi enzymami hydrolitycznymi),
- przeprowadza się wtedy inkubację drożdży z glukozą jako podstawowym substratem, a także często z galaktozą jako cukrowcem kontrolnym, a wreszcie z mieszaniną obydwóch tych cukrowców
- oznaczenie wykonuje się w warunkach tlenowych lub w warunkach ograniczonego dopływu tlenu, w rurkach Thunberga,

- przeprowadza się też inkubację z użyciem inhibitorów enzymów biorących udział w degradacji glukozy:. Są nimi
- **jodoctan** – związek hamujący aktywność dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, przez kowalencyjne połączenie z grupami –SH istotnymi dla funkcji katalitycznej enzymu
- **fluorek** - związek hamujący aktywność enolazy (tworzy w miejscu aktywnym w obecności P kompleks z jonami magnezu, inaktywując w ten sposób enzym)
- **azydek** – związek hamujący kompleks oksydazy cytochromowej w łańcuchu oddechowym, co ogranicza zużycie glukozy w warunkach tlenowych
- przebieg fermentacji alkoholowej można śledzić na podstawie zużycia glukozy, oznaczając jej stężenie w próbkach po zakończonej inkubacji metodą redukcyjną Somogyi-Nelsona.

Procedura inkubacji

1. Ponumeruj próbówki od 1 do 8 (**I zestaw**)

- Próbówki 1-3 to próby kontrolne z glukozą (bez ekstraktu drożdżowego, bez inhibitorów).
- Próbówka 4 – próba kontrolna z zawiesiną drożdży (bez glukozy, bez inhibitorów)
- Próbówka 5 – próba badana (z glukozą, bez inhibitorów)
- Próbówki 6-8 – próby badane (z glukozą i inhibitorami)

W trakcie ćwiczeń należy przygotować **trzy** zestawy probówek.

2. Przygotuj zawartość probówek zgodnie z tabelą i wymieszaj.

Rozpocznij od dodawania do probówek: wody i buforu, następnie dodaj inhibitorów oraz zawiesinę drożdży i wymieszaj ich zawartość.

Próbka	H ₂ O	0.06 M Bufor #	0.2 M jodoocetan	0.3 M NaF	3% azydek	Zawiesina drożdży
1,2,3	1.6	0.7				
4	1.8	0.7				0.5
5	1.1	0.7				0.5
6	0.4	0.7	0.7			0.5
7	0.4	0.7		0.7		0.5
8	0.4	0.7			0.7	0.5

Objętości podane w tabeli – [ml]
bufor fosforanowo-potasowy pH 7.4

3. Próbówki 5-8 inkubuj w cieplarni, w temperaturze 37°C, przez 5 minut.

4. Po upływie 5 minut inkubacji do probówek 5-8 (z **I zestawu**) dodaj po 0.7 ml 0.06 M roztworu glukozy, wymieszaj i inkubuj kolejne 10 min w cieplarni (37°C).

5. Do probówek 1-3 (próbki nieinkubowane) dodaj po 0.7 ml 0.06 M roztworu glukozy.

6. Przygotuj **II zestaw małych probówek**. Ponumeruj probówki od 1 do 8, a następnie do każdej dodaj po 1 ml 0.15 M roztworu Ba(OH)₂

7. Z probówek 1-8 (**I zestawu**) pobierz po 0.5 ml mieszaniny i przenieś do nowych probówek 1-8 (**II zestawu**).

8. Do wszystkich probówek **II zestawu** (czyli 1-8) dodaj i wymieszaj po 1 ml 5% roztworu ZnSO₄.

9. Odwiruj wszystkie próbówki **II zestawu** (10 min, 600 rcf).

Procedura oznaczenie glukozy metodą Somogyi-Nelsona

1. Przygotuj 10 dużych próbówek (**III zestaw**), ponumeruj je od 1-8 oraz dodatkowo „0” , „W”

2. Następnie przygotuj ich zawartość zgodnie z tabelą i wymieszaj:

	Supernatant z II zestawu [ml]	Woda destylowana [ml]	10 mM glukoza [ml]	Odczynnik miedziowy [ml]
Próbówki 1-8	0.2	-	-	0.2
„0”	-	0.4	-	0.4
„W”	-	-	0.2	0.2

3. Ogrzewaj **wszystkie próbówki we wrzącej łaźni** wodnej przez 10 min, a następnie ostrożnie oziębij je pod bieżącą wodą.

4. Dodaj odczynnik fosfomolibdenowy i uzupełnij zawartość próbówek wodą destylowaną zgodnie z tabelą i wymieszaj:

	Odczynnik fosfomolibdenowy [ml]	Woda destylowana [ml]
Próbówki 1-8	0.2	4
„0”	0.4	6
„W”	0.2	4

5. Po dokładnym wymieszaniu zmierz absorbancję przy $\lambda=660\text{nm}$ wobec próby ślepej („0”).

Uwaga – absorbancja dla próby „W” powinna być około 3krotnie wyższa niż dla prób kontrolnych z glukozą.