

## Ćwiczenie nr 5 - Reaktywne formy tlenu

### I. Oznaczenie ilościowe glutationu (GSH) metodą Ellmana

### II. Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej substancji metodą redukcji rodnika DPPH

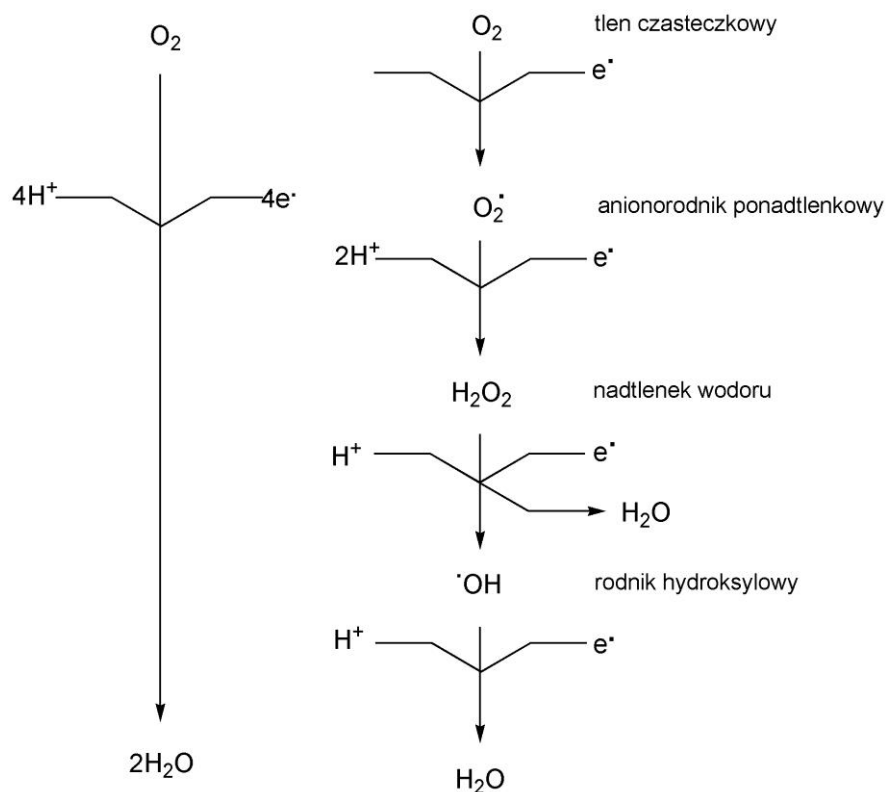
#### Celem ćwiczeń jest:

- poznanie metody oznaczania niebiałkowych grup –SH (glutationu)
- zapoznanie się z metodami umożliwiającymi pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej

#### Wprowadzenie

Wolne rodniki to atomy, grupy atomów lub cząsteczki posiadające niesparowany elektron. Głównym źródłem wolnych rodników w warunkach fizjologicznych są procesy oddechowe zachodzące w mitochondriach, gdzie poprzez przyłączenie czterech elektronów następuje reakcja cząsteczki  $O_2$  z powstaniem  $H_2O$ . Nawet w czynnościowo sprawnych mitochondriach przepływ elektronów jest „nieszczelny”, pewna ilość ich „wycieka” redukując po drodze tlen do tzw. reaktywnych form tlenu (RFT).

RFT są nieustannie generowane ale i jednocześnie usuwane przez złożony system antyoksydacyjny. Do RFT zaliczamy następujące wolne rodniki: rodnik hydroksylowy ( $\cdot OH$ ), anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2\cdot^-$ ), rodnik wodoronadtlenkowy ( $HO_2\cdot$ ), a także nie będące wolnymi rodnikami nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) oraz tlen singletowy ( $^1O_2$ ).



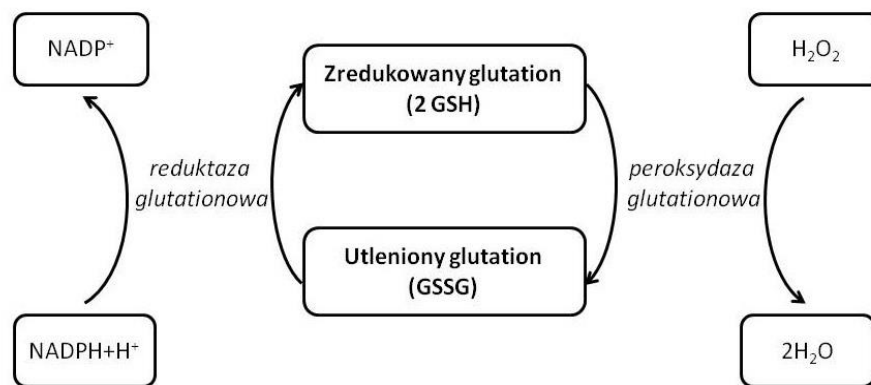
Reaktywne formy tlenu mogą powstawać w komórkach nie tylko jako produkty metabolizmu aerobowego, ale także w wyniku działania czynników fizycznych, takich jak

promieniowanie jonizujące i nadfioletowe czy ultradźwięków. Reaktywne formy tlenu w stężeniach fizjologicznych pełnią wiele istotnych funkcji regulacyjnych takich jak przekazywanie sygnału, regulacja ekspresji genów, regulacja metabolizmu i procesów naprawczych, czy też biorą czynny udział w mechanizmach obronnych poprzez zabijanie drobnoustrojów w procesie fagocytozy. Jednakże ich nadmiar prowadzi do stanu określanego mianem stresu oksydacyjnego i jest przyczyną występowania wielu schorzeń (stany zapalne, nowotwory, miażdżyca, zawał mięśnia sercowego, schorzenia immunologiczne, neurologiczne, procesy starzenia).

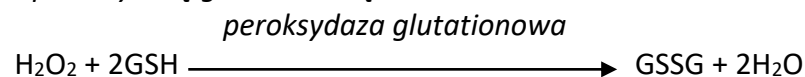
Przeciwdziałaniu uszkodzeniom komórek związanych z występującym stresem oksydacyjnym służy rozbudowany system antyoksydacyjny tworzony przez takie enzymy jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx), reduktaza glutationowa (GR).

Bardzo ważnym nieenzymatycznym mechanizmem obrony przed reaktywnymi formami tlenu jest układ antyoksydacyjny związany z glutationem, w skład którego wchodzi również peroksydaza glutationowa i reduktaza glutationowa.

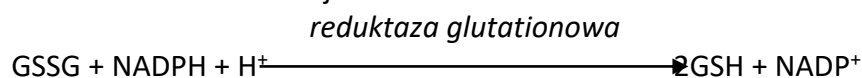
Glutation (GSH,  $\gamma$ -glutamylcysteinylglycyna) jest powszechnie występującym w komórkach zwierzęcych tiolowym tripeptydem, zawierającym cząsteczkę cysteiny, która z jednej strony łączy się z glicyną, a z drugiej z glutaminianem. Aktywność biologiczna glutationu, wynika z obecności grupy sulfhydrylowej (-SH), która uczestniczy w reakcjach antyoksydacyjnych oraz detoksykacyjnych. Glutation może występować zarówno w formie zredukowanej (GSH) i utlenionej (GSSG). W większości komórek GSH występuje w stężeniu 500 razy wyższym niż GSSG. Formy te ulegają wzajemnym cyklicznym przemianom regulowanym przez peroksydazę glutationową oraz reduktazę glutationową.



GSH reaguje z nadtlenkiem wodoru i nadtlenkami organicznymi w procesie katalizowanym przez *peroksydazę glutationową*:



Regeneracja zredukowanej formy glutationu zachodzi w obecności *reduktazy glutationowej* zgodnie z równaniem reakcji:



Grupy tiolowe glutationu mogą reagować z różnymi substancjami elektrofilowymi, np. z ksenobiotykami. Obecny w wątrobie GSH, przy udziale transferazy S-glutationowej,

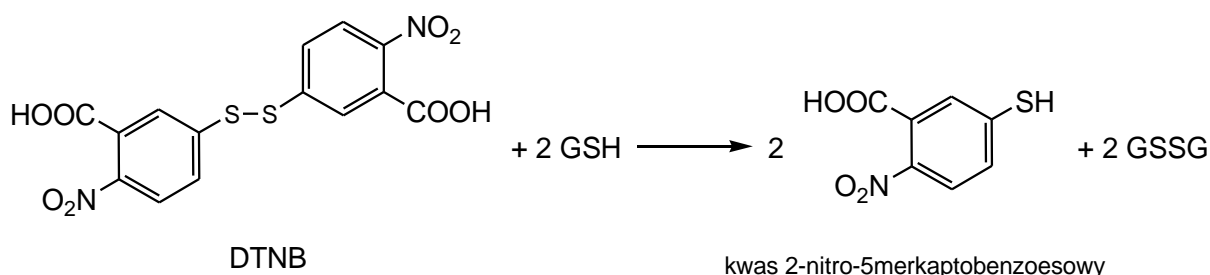
powoduje powstawanie S-koniugatów glutationu, które następnie mogą być usuwane są na zewnątrz komórek (detoksykacja). S-koniugaty glutationu lub produkty ich przemian są usuwane z krwiobiegu przez nerki i przekształcane w pochodne, a następnie wydalone z organizmu.

## Część doświadczalna

### I. Oznaczenie ilościowe glutationu (GSH) metodą Ellmana

#### Zasada metody

Glutation stanowi prawie 97% niebiałkowych związków tiolowych w komórkach. Dlatego oznaczając niebiałkowe grupy sulfhydrylowe, praktycznie oznaczamy ilościowo glutation. Spektrofotometryczna metoda oznaczenia niebiałkowych grup –SH opiera się na metodzie Ellmana, w której kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy) (DTNB) jest redukowany przez związki tiolowe z powstaniem barwnego kwasu 2-nitro-5-merkaptobenzoesowego, wykazującego maksimum absorpcji, przy długości fali  $\lambda = 412 \text{ nm}$ .



#### Procedura

1. Przygotowanie krzywej kalibracyjnej. Seryjne rozcieńczenia standardowego 1 mM roztworu glutationu służą do przygotowania krzywej wzorcowej.

Przygotuj próby w 8 probówkach szklanych zgodnie z poniższą tabelą. W 6 probówkach (próby 3-8) przygotuj rozcieńczenia standardowego 1 mM roztworu glutationu, a w dwóch probówkach (próby 1-2) przygotuj próby ślepe.

Próba	1 mM standard GSH (ml)	Bufor fosforanowy 0,2 M pH 8,2 (ml)	0,006 M DTNB (ml)
1 (ślepa)	0	2,7	0,3
2 (ślepa)	0	2,7	
3	0,03	2,67	
4	0,06	2,64	
5	0,09	2,61	
6	0,12	2,58	
7	0,15	2,55	
8	0,225	2,475	

## 2. Przygotowanie prób badanych.

Przygotuj w dwóch probówkach (próby X1 i X2) próby badane według poniższej tabeli.

*Uwaga: Roztwór badany A stanowi część zestawu ćwiczeniowego. Roztwór badany B należy przygotować samodzielnie poprzez dwukrotne rozcieńczenie Roztworu badanego A za pomocą buforu fosforanowego.*

Próba	Roztwór badany	Objętość roztworu badanego (A lub B) (ml)	Bufor fosforanowy 0,2 M pH 8,2 (ml)	0,006 M DTNB (ml)
X1	A	0,1	2,6	0,3
X2	B			

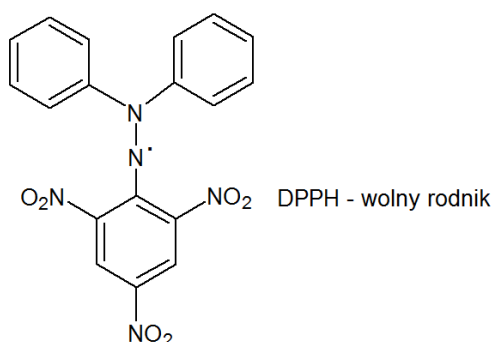
3. Dokonaj pomiaru absorbancji wszystkich przygotowanych prób (próby 3-8 oraz próby A i B) w obecności próby ślepej, przy długości fali  $\lambda=412$  nm.
4. Oblicz stężenie GSH w próbach 3-8, a uzyskane wyniki umieść w sprawozdaniu.
5. Zanotuj w sprawozdaniu wyniki pomiaru absorbancji poszczególnych prób oraz równanie sporządzonej krzywej kalibracyjnej.
6. Na podstawie odczytanej absorbancji i sporządzonej krzywej kalibracyjnej określ stężenie glutationu w badanych próbkach A i B, a wynik umieść w sprawozdaniu.

## Część doświadczalna

### II. Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej substancji metodą redukcji rodnika DPPH

#### Zasada metody

W warunkach laboratoryjnych pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej substancji można przeprowadzić wykorzystując związki będące wolnymi rodnikami takie jak np. syntetyczny rodnik DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl). Związek ten posiada niesparowany elektron, który znajduje się na powłoce walencyjnej jednego z atomów azotu, które tworzą mostek azotowy.



Roztwór DPPH w etanolu ma zabarwienie ciemnofioletowe i wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 517 nm. W wyniku reakcji z substancją, która wykazuje zdolność oddawania atomu wodoru, powstaje zredukowana forma DPPH, co prowadzi do zmiany wyjściowego zabarwienia roztworu. Obserwowany spadek absorpcji jest proporcjonalny do zawartości pozostającej w roztworze utlenionej formy DPPH.

#### Procedura

1. Przygotuj roztwory substancji badanych (1-3), które znajdują się w probówkach typu eppendorf według schematu przedstawionego w poniższej tabeli.

Próba	Substancja badana	Rozpuszczalnik	Objętość rozpuszczalnika (ml)
1	Kwas galusowy	Woda destylowana	1
2	Kwas askorbinowy	Woda destylowana	1
3	$\alpha$ – tokoferol	DMSO	1

2. 0,3 mM etanolowy roztwór DPPH oraz przygotowane roztwory nanieś na płytkę 96-dołkową według poniższego schematu, pamiętając o dokładnym wymieszaniu zawartości poszczególnych dołków. Każdą próbę wykonaj w trzykrotnym powtórzeniu.

- w 15 dołkach (3 kolumny, 5 rzędów) umieść 95 $\mu$ l roztworu DPPH

- do każdego dołka dodaj 5 $\mu$ l odpowiedniego roztworu:

I rząd: H<sub>2</sub>O

II rząd: DMSO

III rząd: kwas galusowy

IV rząd: kwas askorbinowy

V rząd:  $\alpha$ -tokoferol

3. Płytkę zamknij i inkubuj w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę.

4. Po inkubacji odczytaj absorbancję roztworów znajdujących się w poszczególnych dołkach płytki przy długości fali 517 nm.

5. Oblicz całkowitą zdolność antyoksydacyjną badanych substancji do przeciwdziałania reakcji utleniania korzystając z poniższego wzoru:

$$\% \text{ inhibicji} = 100 (A_0 - A_s) / A_0$$

gdzie:

$A_0$  – absorbancja próby kontrolnej

$A_s$  – absorbancja próby badanej