

*Roman Gondko, Teresa Gabryelak, Ian V. Chapman**

GENEROWANIE RODNIKÓW TLENOWYCH W PROCESIE AUTOOKSYDACJI HEMOPROTEIN

Cząsteczkowy tlen w procesie spalania (utleniania) tworzy reaktywne i szkodliwe dla żywych organizmów formy pośrednie tj. anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-) i nadtlenek wodoru (H_2O_2), które w obecności metali (Fe, Cu) w reakcji Fentona tworzą najaktywniejszy z rodników – rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$). Wymienione rodniki, a także tlen singletowy nazwano „aktywnymi” formami tlenu.

Istnieje szereg mechanizmów obronnych (powstałych adaptacyjnie), które usuwają (zmiatają) bądź kontrolują zawartość aktywnych form tlenu w tkankach. Najważniejszym układem jest układ enzymatyczny (SOD, katalaza).

Stwierdzono, że hemoproteiny uczestniczące w jednoelektronowych reakcjach redox generują anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) i nadtlenek wodoru (H_2O_2).

Autooksydacji HbO_2 do metHb towarzyszy generowanie O_2^- . Jeden elektron niezbędny do redukcji O_2 pochodzi ze zredukowanego żelaza grupy hemowej. Reakcja ta ulega przyspieszeniu w obecności niektórych anionów (np. chlorki, azydki, cyjanki itp.). Szybkość reakcji spada ze wzrostem pH.

W trakcie autooksydacji HbO_2 w obecności jednoelektronowego donora zewnętrznego powstaje H_2O_2 . W tym przypadku jeden elektron pochodzi z żelaza hemowego, a drugi od donora niehemowego (zewnętrznego). Donorami tymi są hydrochinony, azotyny, żelaziany itp.

Przyjmuje się, że rodnik $\cdot OH$ pojawia się w reakcji H_2O_2 z HbO_2 (reakcja Fentona).

W reakcji utlenienia oksyhemoglobiny przez H_2O_2 do metHb powstaje przejściowa forma ferrylowa ($ferryHb - Hb^{2+}H_2O_2$).

1. WSTĘP

Pojawienie się fotosyntezy tlenowej (tj. chlorofilu ulegającego redukcji w wyniku utleniania cząsteczki wody z wydzielaniem O_2) i w konsekwencji atmosfery tlenowej stanowiło milowy krok w procesie ewolucji. Obecność w atmosferze tlenu umożliwiło przestawienie pierwotnej przemiany anareobowej na wydajniejszy energetycznie metabolizm tlenowy (fosforylacja substratowa) oraz pojawienie się bezwzględnych tlenowców. Tlen bez wątpienia jest pierwiastkiem życia, a przemiana aerobowa ostatnim szczeblem ewolucji [1, 12, 13].

* Radiobiological Research Unit, Department of Medicine, The University of Dundee.

Dostarczenie tlenu niezbędnego w przemianie areobowej w najprostszy sposób, tzn. drogą dyfuzji (oddychanie bezpośrednie) dla większych organizmów ze względu na powolne jej tempo jest niewystarczające. Mała rozpuszczalność tlenu w wodzie (ok. 15 mg O₂/l) i płynach biologicznych to następne ograniczenie fizyczne.

Dla zapewnienia organizmom niezbędnej ilości tlenu rozwinęły się u zwierząt odpowiednie mechanizmy umożliwiające komórkom ciągłą dostawę tego gazu. Jednym z nich jest układ krwionośny (naczyniowy) a na poziomie molekularnym pojawienie się białek przenoszących tlen (hemoglobiny, mioglobiny, hemocyjaniny itp.).

Białka oddechowe są związkami nader różnorodnymi tak pod względem chemicznym jak i biologicznym. Są one metaloproteinami (Fe, Cu) zdolnymi do odwracalnego wiązania tlenu [1, 2, 19, 20].

Pojawienie się atmosfery tlenowej stworzyło organizmom beztlenowym, a później tlenowym odmienne warunki bytowania. Otóż cząsteczkowy tlen, ulegając stopniowej redukcji tworzy bardzo reaktywne i jak się okazało szkodliwe dla organizmów formy pośrednie (rys. 1).

W procesie oddychania i fotosyntezy następuje generowanie aktywnych form tlenu (O₂⁻, H₂O₂, ·OH) i są one normalnymi metabolizmami komórki. Pomiedzy procesami generowania szkodliwych pochodnych tlenu i ich usuwaniem musi istnieć stan równowagi zapewniający prawidłowy rozwój organizmu.

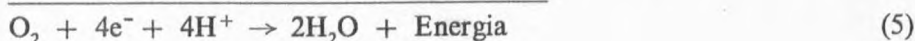
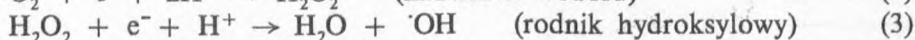
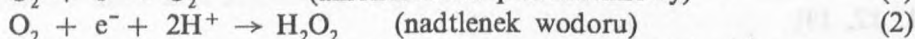
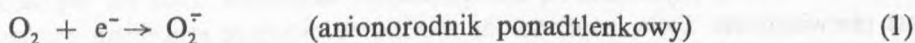
Paradoksem jest fakt, że aeroby, aby istnieć i przetrwać, muszą nieustannie zmagać się z toksycznością tlenu.

Generowanie produktów redukcji tlenu cząsteczkowego tj. anionorodnika ponadtlenkowego (O₂⁻), nadtlenu wodoru (H₂O₂) oraz rodnika hydroksylowego (·OH) stwierdzono w procesie autooksydacji hemoprotein (hemo- i mioglobiny). Jest faktem zaskakującym, że białko to uczestniczy w generowaniu toksycznych form tlenu, a jego podstawową funkcją jest transport tlenu.

Powyższemu zagadnieniu poświęcono niniejsze opracowanie.

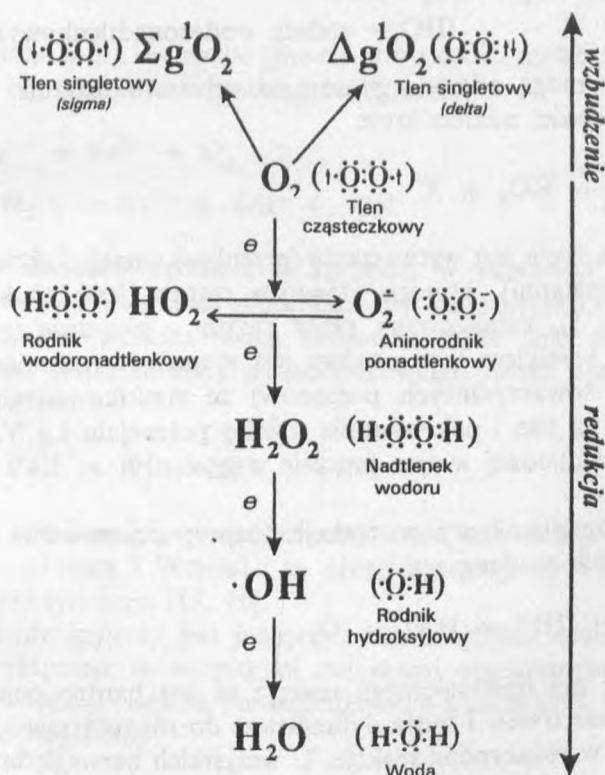
2. REDUKCJA TLENU

Redukcja tlenu cząsteczkowego zachodzi czteroetapowo wg schematu [12]:



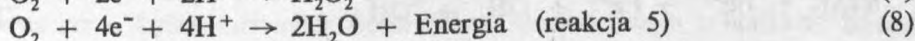
Tlen cząsteczkowy (O_2) jest stosunkowo słabym utleniaczem, a jednoelektronowa redukcja O_2 nie wymaga inwersji spinów, tym samym dominuje nad redukcją dwuelektronową. W wyniku pełnej redukcji O_2 , tj. przyłączenia czterech elektronów (reakcja 5) powstają dwie cząsteczki wody z wydzielaniem energii.

W procesie częściowej redukcji tlenu (reakcja 1 i 3) tworzą się przejściowe formy „tlenu aktywnego” reaktywne wolne rodniki, bardzo toksyczne dla organizmów tlenowych (rys. 1).



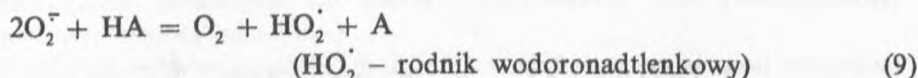
Rys. 1. Redukcja i wzbudzenie tlenu cząsteczkowego (18)

W układach biologicznych redukcja tlenu przebiega tylko poprzez następujące reakcje:



W organizmach, wiele enzymów uczestniczących w reakcjach utleniania (np. dehydrogenazy flawinowe, oksydaza ksantynowa) katalizuje jednoelektronową redukcję tlenu. Dalej, autooksydacja szeregu zredukowanych związków prowadzi także do powstania anionorodnika ponadtlenkowego. Powstaje on również w procesie radiolizy wody pod wpływem promieniowania jonizującego. Rodnik ten jest nietrwały w roztworach wodnych.

Anionorodnik jest mocną zasadą:



Jego roztwory mogą oderwać proton od substratu. Rodnik ten wykazuje również właściwości nukleofilowe:



Warunkiem życia jest wytwarzanie (przepływ) energii dokonywane dzięki oddychaniu (spalaniu), którego głównym etapem jest redukcja tlenu do wody (reakcja 5), katalizowana przez enzym – oksydazę cytochromową. Sumarycznym wynikiem tego procesu jest stopniowe przemieszczanie elektronów (oraz towarzyszących protonów) ze zredukowanego nukleotydu pirydynowego na tlen i pokonywanie różnicy potencjału 1,1 V. Teoretyczny zysk entalpii swobodnej w tym procesie wynosi $nFE = 1,1 \cdot 2 \cdot 96500 = 212 \text{ kJ}$.

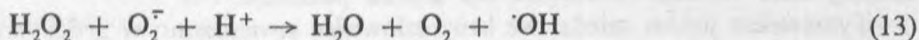
Rodnik ponadtlenkowy w reakcji dysproporcjonowania (dysmutacji) tworzy nadtlenek wodoru:



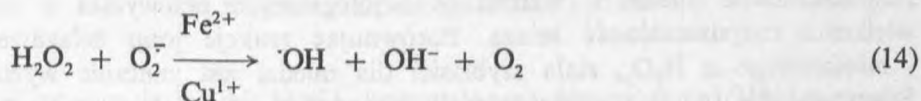
W zakresie pH fizjologicznego reakcja ta jest bardzo powolna tak, że O_2^- jest względnie trwały i może dyfundować do różnych miejsc w komórce, gdzie wchodzi w różnorodne reakcje. U wszystkich bezwzględnych i względnych tlenowców wykryto enzym dysmutazę ponadtlenową – SOD, katalizującą reakcję dysmutacji. Powstający w powyższej reakcji, a także w wyniku dwuelektronowej redukcji (reakcja 7) przy udziale enzymów (np. oksydaza moczanowa) nadtlenek wodoru (H_2O_2) jest również niepożądanym produktem w organizmie. Otóż w obecności soli metalu (Fe, Cu, Cr, Ti) z nadtlenku wodoru powstaje w reakcji Fentona najbardziej reaktywny i zarazem szkodliwy rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$). *In vitro* przy udziale na przykład Fe^{2+} otrzymamy:



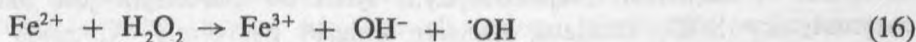
Haber i Weiss badając reakcję Fentona stwierdzili, że jeden z jej etapów prowadzi również do powstania rodnika hydroksylowego:



Sumarycznie możemy zapisać:

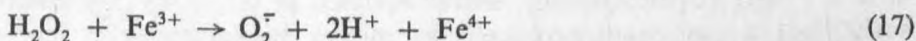


Reakcja Fentona może zachodzić głównie w obecności metali zredukowanych. Stąd uważa się, że ma ona przebieg następujący:



Redukcja chelatów metali (15) zachodzi w obecności anionorodnika ponadtlenkowego jak również glutationu czy askorbinianu.

Z nadttlenkiem wodoru mogą reagować także sole żelazowe (Fe^{3+}) z utworzeniem anionorodnika ponadtlenkowego (druga możliwość reakcji Fentona):



Powstały anionorodnik ponadtlenkowy może wchodzić w reakcje z H_2O_2 (reakcja 13 – Habera i Weissa) i tą drogą następuje również generowanie rodnika hydroksylowego [15, 16].

Rodnik hydroksylowy jest jednym z najsilniejszych znanych utleniaczy, reagujący praktycznie ze wszystkimi związkami organicznymi.

W wyniku reakcji rodnika ponadtlenkowego z rodnikiem hydroksylowym powstaje tlen singletowy:



Tlen singletowy nie jest rodnikiem, ale ze względu na swoją aktywność i możliwość indukowania reakcji wolnorodnikowych nie można go w rozważaniach tych pominąć. Tlen singletowy to cząsteczka tlenu o spinach antyrównoległych występująca w dwóch stanach wzbudzenia (Σ^1g , ${}^1\Delta g$) (rys. 1) [12, 13].

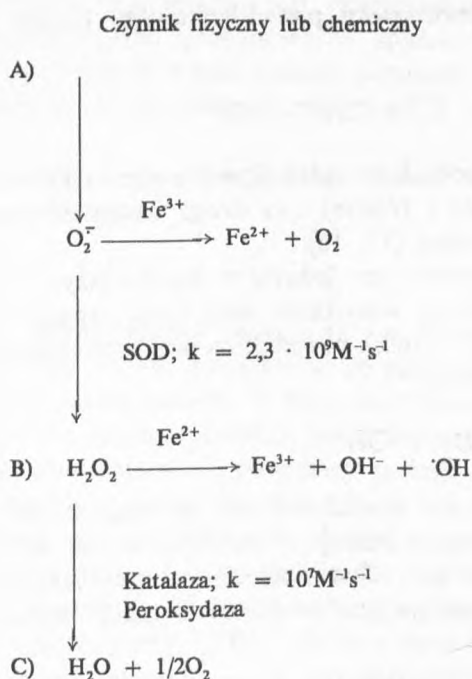
W warunkach fizjologicznych żelazo charakteryzuje się bardzo niską rozpuszczalnością, stąd ilość wolnego żelaza we krwi człowieka przyjęto za równe zero. Tylko niewielkie ilości żelaza niezwiązanego z białkami zdolne

są do dyfuzji międzykomórkowej i mogą uczestniczyć w reakcji Fentona. Przyjmuje się, że w organizmie ludzkim istnieje odrębny mechanizm utrzymujący ilość wolnego żelaza na tak niskim poziomie.

Tymczasem jonów miedzi we krwi człowieka stwierdzono w ilości około 100 mg i są one głównie związane z białkami (ceruloplazmina). Ogólnie miedzioproteiny są mniej stabilne niż połączenia żelaza z białkami. Ponadto, rozpuszczalność miedzi w warunkach fizjologicznych przewyższa o rząd wielkości rozpuszczalność żelaza. Porównując reakcje jonu żelazawego i miedziawego z H_2O_2 , stała szybkości dla miedzi jest znacznie wyższa. Sugerowałoby to, iż „wolna miedź” posiada większy udział w reakcji Fentona.

Rodniki tlenowe ze względu na swoje toksyczne właściwości nie mogą pozostawać w komórkach. Istnieje szereg mechanizmów obronnych (powstałych ewolucyjnie), które usuwają (zmiatacze) bądź kontrolują ich zawartość w tkankach. Najważniejszym systemem obronnym jest układ enzymatyczny SOD, katalaza, niektóre związki hydrofilne (witamina C, histydyna, GSH itp.) hydrofobowe (karoten, witamina A i E).

Wzajemne relacje pomiędzy układami generującymi formy tlenowe w organizmie przedstawiono na poniższym schemacie (rys. 2) [13].



Rys. 2. Sposoby generowania i eliminacji pochodnych tlenu w organizmie [13]

Należy pamiętać, że jednym z warunków istnienia życia (obok wytwarzania energii) jest utrzymywanie jonów i cząsteczek w stanie zredukowanym, nawet wówczas gdy są one narażone na utleniające warunki panujące w środowisku.

3. SAMOUTLENIANIE HEMOPROTEIN

Czerwone barwniki: krwi – tetrameryczna hemoglobina (Hb), a mięśni – monomeryczna mioglobina (Mb), są u ssaków jedynymi hemoproteinami wiążącymi odwracalnie tlen. Ich grupę prostetyczną stanowi hem (protoporfiryna IX – Fe^{2+}), w którym dwuwartościowe żelazo (Fe^{2+}) jest miejscem wiązania cząsteczki tlenu (O_2).

W nieutlenowanej hemoglobinie (deoksyhemoglobina) jon Fe^{2+} o konfiguracji wysokospinowej leży nad płaszczyzną pierścienia porfiryнового. Podczas utlenowania atom żelaza zmienia konfigurację na niskospinową i wsuwa się w pierścień porfiryновый.

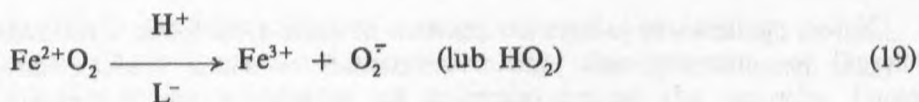
Żelazo (Fe^{2+}) jest jonem o konfiguracji d^6 , a żelazoporfiryny (Fe^{2+}) występują w 3 stanach spinowych, których każdy wykazuje charakterystyczną strukturę i liczbę koordynacyjną. Sześciokoordynacyjne hemowe kompleksy żelaza (Fe^{2+}) z dwoma ligandami aksjalnymi o konfiguracji niskospinowej $t_{2g}^6 e_g^0$ ($S = 0$) są diamagnetyczne. Żelazoporfiryny (Fe^{2+}) o konfiguracji wysokospinowej zawsze są pięciokoordynacyjne, a jon żelaza przemieszczony jest znacznie poza pierścień porfiryновый w kierunku aksjalnego ligandu. Twierdzenie przeciwne, że pięciokoordynacyjne żelazoporfiryny (Fe^{2+}) posiadają konfigurację wysokospinową nie zawsze jest prawdziwe.

Żelazo dwuwartościowe (Fe^{2+}) w hemoglobinie i oksyhemoglobinie (HbO_2) można łatwo utlenić do trójwartościowego (Fe^{3+}) przy użyciu utleniaczy (np. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, H_2O_2) z równoczesnym uwolnieniem O_2 . Powstaje wówczas methemoglobina (Fe^{3+}), forma niezdolna do odwracalnego wiązania tlenu (rys. 4) [1, 2, 23].

Proces utleniania może również zachodzić samorzutnie (autooksydacja samorzutna).

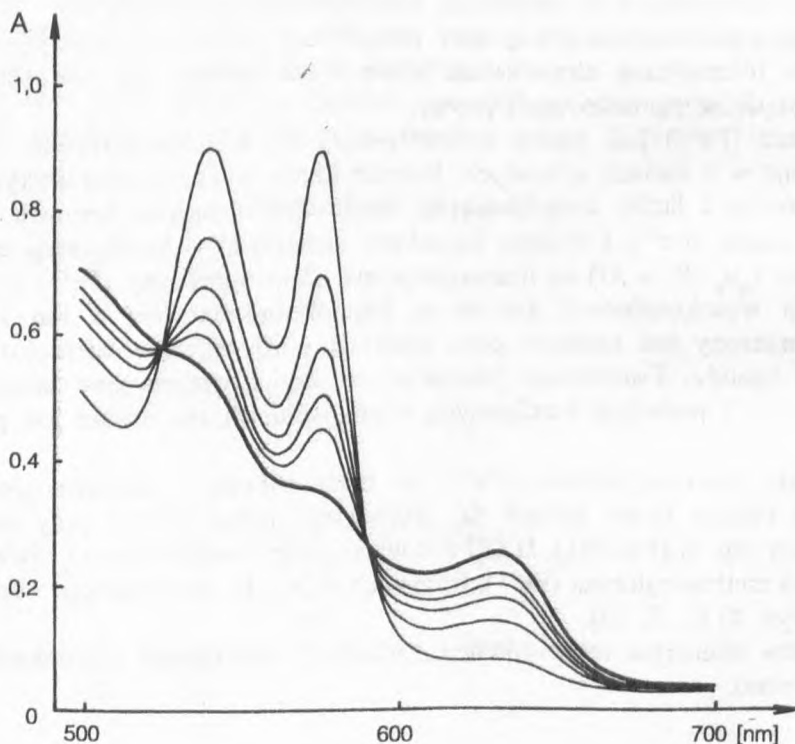
4. GENEROWANIE JONÓW PONADTLENKOWYCH (O_2^-)

Podczas autooksydacji w roztworach oksyhemoglobiny (oksymioglobiny) powstaje anionorodnik nadadtlenkowy wg reakcji:



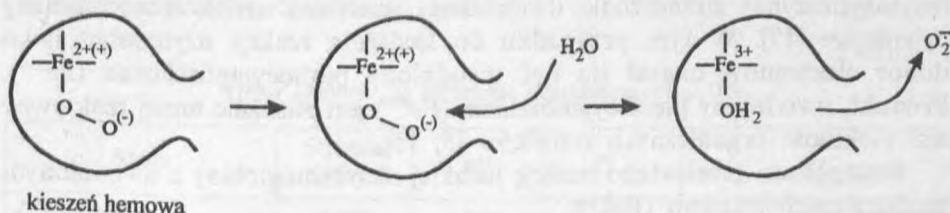
Jednego elektronu wymaganego do przekształcenia O_2 w O_2^- (reakcja 1) dostarcza zredukowany hem (Fe^{2+}). Reakcja ta w warunkach fizjologicznych przebiega wolno ulegając przyspieszeniu w wyższym stężeniu jonów wodorowych i innych kationów [5, 14, 24, 25]. Aniony przyspieszające powyższą reakcję mogą w niej uczestniczyć jako ligandy (L^-) wiążąc się z żelazem (Fe^{3+}) formy met lub uwodnionej methemoglobiny ($\text{Fe}^{3+} \text{H}_2\text{O}$).

Przebieg reakcji, tj. konwersję formy oksy do met łatwo śledzić spektrofotometrycznie (rys. 3).



Rys. 3. Reakcja HbAO_2 z $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}^{3-}$ w czasie (a 1,37 min);
 $\text{HbAO}_2 = 60 \mu\text{M}$, $\text{Fe}^{2+}\text{CN}_5\text{H}_2\text{O}^{3-} = 680 \mu\text{M}$, katalaza = $1 \mu\text{M}$ (24)

Na rys. 4 przedstawiono schematycznie przestrzenne przemieszczenie w otoczeniu grupy hemowej (kieszeni hemowej) towarzyszące utworzeniu rodnika ponadtlenkowego i formy metHb [3].



Rys. 4. Schemat zmian w otoczeniu grupy hemowej podczas tworzenia metHb i O_2^- (3)

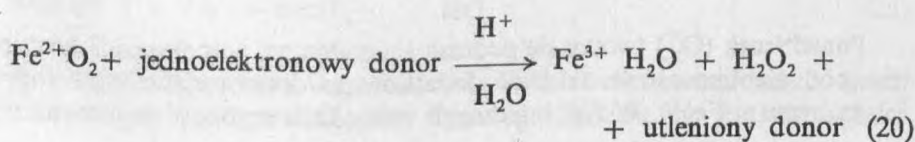
W układzie *in vitro*, w którym będą generowane rodniki ponadtlenkowe nie może być obecna katalaza, SOD, organiczne fosforany i inne jony. Użyte do badań hemoproteiny muszą być wysokiej czystości [5].

Reakcja kumulowania anionorodnika ponadtlenkowego przebiega w szerokim zakresie pH, stężeń anionów i temperatury. Szybkość reakcji wzrasta ze wzrostem pH. Szybkość ta jest również warunkowana stężeniem i rodzajem ligandu (L^-). Chlorki okazały się być mniej efektywnym promotorem niż azydki, a te mniej niż cyjanki. Efektywność chlorków ulega zwiększeniu wraz z podwyższaniem ich stężenia w środowisku (tab. 1) [25].

Do śledzenia reakcji samoutlenienia w czasie, najczęściej używa się roztworu 50 mM buforu Tris o pH 6,5 z 100 mM NaCl oraz 65 μ M HbO_2 w przeliczeniu na hem w łącznej objętości 5 ml (rys. 3). W tych warunkach czas połówkowy w przypadku oksyhemoglobiny formy A człowieka ($HbAO_2$) wynosił w przybliżeniu 700 min [25].

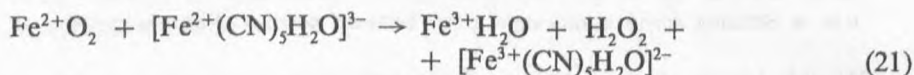
5. GENEROWANIE NADTLENKU WODORU (H_2O_2)

W roztworach HbO_2 i MbO_2 nadtlenek wodoru (H_2O_2) pojawić się może na dwa różne sposoby. W reakcji dysproporcjonowania anionorodnika ponadtlenkowego (reakcja 11), którą katalizuje SOD. W fizjologicznym pH (7) pod nieobecność anionów promujących, tworzenie H_2O_2 nawet z udziałem enzymu (SOD) jest bardzo powolne. Drugi szlak, znacznie szybszy przebiega następująco:



Szybkość powyższej reakcji determinuje struktura donora elektronu. Niezbędny do redukcji O_2 jeden z dwóch elektronów pochodzi z żelaza hemu (Fe^{2+}), a drugi od donora zewnętrznego (niehemowego). Efektywnymi jednoelektronowymi donorami są: hydrochinony, fenylohydrazyna (acetylofenylohydrazyna), aminofenole, dwutuniony, azotyny i zredukowane żelaziany cyjankowe [17]. W tym przypadku do śledzenia reakcji użytecznym jako donor elektronów okazał się być uwodniony pięciocyjanożelazian (Fe^{2+}). Produkt, uwodniony pięciocyjanożelazyn (Fe^{3+}) jest znacznie mniej reaktywny niż większość organicznych rodników [5, 15].

Szczegółowo przebadano reakcję ludzkiej oksyhemoglobiny z uwodnionym pięciocyjanożelazianem (Fe^{2+}):



Tworzenie formy uwodnionej metHb ($Fe^{3+}H_2O$) łatwo zarejestrować w zakresie widzialnym widma (rys. 3). Reakcję śledzono spektrofotometrycznie przy 577 nm (maksimum HbO_2). W tym celu do 4 ml 0,05 M buforu fosforanowego o pH 7,2 dodawano od 10 μ l do 40 μ l 0,1 M $Na_3[Fe^{2+}(CN)_5]NH_3$. Proces zapoczątkowuje dodanie 50 μ l HbO_2 do stężenia końcowego 40–100 μ M po usunięciu tlenu z roztworu (N_2). W trakcie przebiegu reakcji (do 70%) nie obserwowano zmian w punktach równoważnikowych widma. Dodanie do powyższego układu katalazy (usunięcie H_2O_2) podtrzymuje tworzenie metHb (patrz rys. 2).

6. GENEROWANIE RODNIKA HYDROKSYLOWEGO ($\cdot OH$)

Rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) pojawia się jako główny nietrwały produkt w reakcji H_2O_2 z HbO_2 lub MbO_2 (reakcja Fentona 12). Pośrednim świadectwem jego obecności jest spowolnienie reakcji autooksydacji (tj. tworzenia MetHb) o około 20% w obecności zmiataczy (EDTA, DMSO, mannitol). Ponadto kiedy w układzie obecna była katalaza nie dochodziło do degradacji białka i nie obserwowano efektu zmiatania. W końcowej fazie procesu (powyżej 70%) zarejestrowano zakłócenia w równoważnikowych punktach widma, co przypisano modyfikacji białka przez $\cdot OH$ [15].

7. MECHANIZM POWSTAWANIA RODNIKÓW

Ponadtlenek ($O_2^{\cdot -}$) tworzy się podczas spontanicznej autooksydacji hemoprotein pod nieobecność w układzie dodatkowego donora elektronów (oprócz żelaza hemu – Fe^{2+}). W fizjologicznych warunkach szybkość „spontanicznej”

reakcji tworzenia metHb w erytrocytach człowieka jest bardzo niska i wynosi około 3% dziennie [3, 26]. Wysokie stężenie chlorków (0,1 M) w krwinkach, wydaje się być odpowiedzialne za tak powolne tempo tej reakcji. Szybkość ta rośnie znacząco wraz ze wzrostem kwasowości lub zastąpieniem chlorków jonami o większej nukleofilności (tab. 1).

Tabela 1

Wpływ anionów na utlenienie oksyhemoglobiny [15]

Anion	Stężenie (M)	pH	(°C)	k* (M ⁻¹ min ⁻¹)
Cyjankowy	0,076	5,0	25	2800
Azydkowy	0,061	5,0	24	2,4
	0,0162	5,8	24	0,56
	0,32	7,4	24	0,0076
Tiocyjankowy	0,076	5,0	25	0,34
Fluorkowy	0,114	5,0	25	0,0065
Chlorkowy	0,20	6,4	25	0,0002

* k = k_{ap}/L⁻

Jony tworzące silne połączenie z methemoglobina jak cyjanki czy azydki tworzą kompleksy (met-anionowe) identyfikowane na podstawie charakterystycznego widma produktu. Tempo przekształcania w czasie, formy oksyhemoglobiny w met-anionową można śledzić korzystając z punktów równoważnikowych widm i maksimów pochłaniania. Tak na przykład dla reakcji HbO₂ z azydkiem punkty równoważnikowe stwierdzono przy długości (nm): 586 (7,25) 560 (8,51), 528 (9,17) a maksima: 573 (8,46) i 541 (10,85). W nawiasach podano wartości współczynników absorpcji w mM⁻¹cm⁻¹ [5].

W przebiegu samoutlenienia nierozstrzygnięty pozostaje sposób wiązania cząsteczkowego tlenu połączonego z Fe²⁺ w HbO₂ i transfer elektronu. Częstość drgań rozciągających wiązania O–O w HbO₂ (MbO₂) wynoszące blisko 1100 cm⁻¹ stanowi dowód przekazania elektronu (dπ) z Fe²⁺ na O₂. Najprawdopodobniej tworzy się wiązanie zwrotne dπ → pπ. Widma w podczerwieni sugerują, że połączenie pomiędzy żelazem i tlenem w Fe³⁺O₂ ma charakter wiązania kowalencyjnego [5]. Przemawiają za tym również dane kinetyczne, w oparciu o które zaproponowano następujący przebieg reakcji:



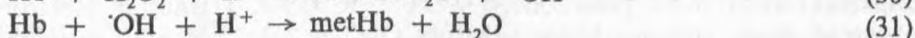
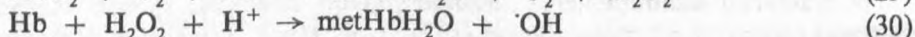
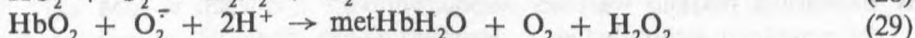
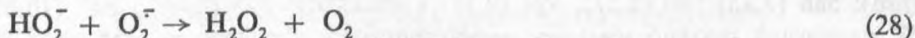
W przyjętym założeniu tlen cząsteczkowy jest utleniaczem żelaza hemu (Fe²⁺) aczkolwiek wiązanie O₂ jako ligandu z żelazem nie jest wymagane.

Miejsce i sposób przemieszczenia elektronów pozostają nadal niewyjaśnione. Transfer elektronów może powodować interakcję O_2 z pierścieniem porfirynowym czy aminokwasami białkowymi. Grupy karboksylowe usytuowane w pobliżu O_2 są także rozważaną możliwością. Z drugiej strony protonacja w pobliżu miejsc wiążących anion (prawdopodobnie Fe^{2+}) promowałaby wiązanie ligandów. Nierozstrzygniętą kwestią pozostaje rola anionu (L^-) w promowaniu samoutlenienia. Zwiększenie stabilizacji stanu Fe^{3+} względem stanu Fe^{2+} to jeden z czynników, które w rozważaniach tych należy także uwzględnić. Wiązanie anionu z Fe^{2+} może być priorytetowym w stosunku do transferu elektronów lub są to procesy równoległe. Przyjmuje się, że reakcja ta przebiega następująco:

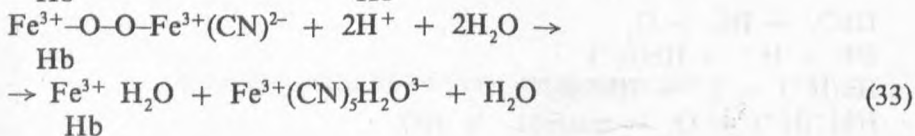
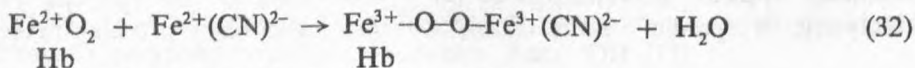


Odchylenia od punktów równoważnikowych w widmie widzialnym mające miejsce dopiero pod koniec przebiegu autooksydacji Hb w obecności dodatkowego reduktora są dowodem na obecność H_2O_2 i $\cdot OH$. Zmian tych nie obserwowano w początkowym okresie reakcji do 70%. Obserwowane odchylenie przypisuje się zmianom (utlenianiu) białka spowodowane przez nagromadzone produkty utlenienia tj. $\cdot OH$. Interpretacja ta ma poparcie w hamowaniu szybkości tworzenia metHb po podaniu katalazy czy zmiataczy rodników hydroksylowych (EDTA, DMSO) (rys. 2).

Z faktu, że zmiatacze hamują tworzenie metHb, przyjęto istnienie bezpośredniego oddziaływania rodnika $\cdot OH$ z HbO_2 . W układzie *in vitro* zachodziłyby następujące reakcje:



W tym przypadku również nie wyjaśniono mechanizmów przeniesienia elektronów z zewnętrznego niechemowego donora na O_2 . Przyjmuje się powstanie intermediatorów typu μ -peroksy:



W reakcji oksyhemoprotein z formami tlenu z utworzeniem methemprotein przyjmuje się istnienie pośredniej niestabilnej formy ferrylowej ($Fe^{4+}-\pi$ -kation).

Tlen cząsteczkowy wiążąc się z Fe^{2+} bez zmiany wartościowości żelaza (formy oksy) tworzy względnie trwałe połączenie $(\text{Fe}^{2+}\text{O}_2)^{2+}$ mając właściwości wolnorodnikowe:

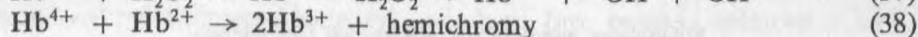
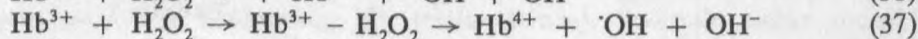


Przyłączenie żelazawego kompleksu w połączeniu z utlenianiem powyższego zostaje utworzony okso-kompleks:



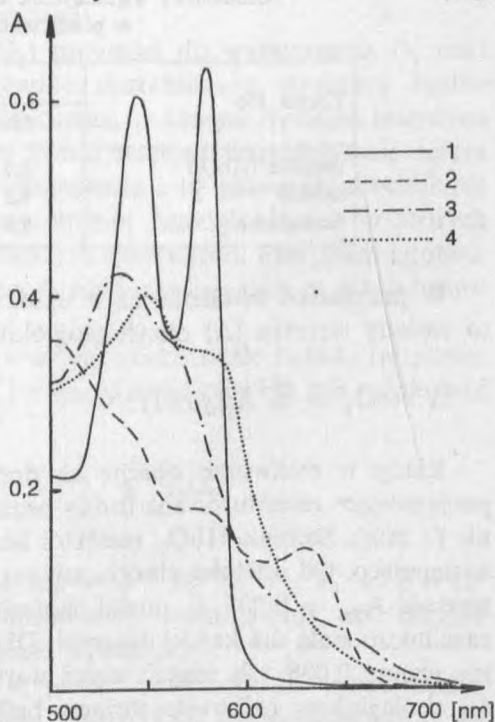
W okso-kompleksie żelazo formalnie jest na czwartym stopniu wartościowości, a takie związki nazwano ferryłowymi. Formy ferryłowe można łatwo zidentyfikować wyznaczając drugie pochodne widma. Uważa się, że H_2O_2 utlenia żelazo oksyhemoglobiny bezpośrednio do formy ferryłowej [9, 10].

Reakcja ta przebiegałaby następująco:



Pochodne ferryłowe mioglobiny wykryto w mięśniach mięczaków (*Aplysia*) i w nerwach pierścienic (*Aphrodite*) [27].

Forma ferryłowa Hb (ferrył Hb) posiada charakterystyczne widmo (rys. 5), co ułatwia badanie procesu autooksydacji w roztworach hemoglobiny jak i erytrocytach. Należy pamiętać, że kształt widma metHb z maksimum przy 630 nm jest zależne od pH. Hemichrom (hemoglobina z zdenaturowaną globiną) identyfikujemy na podstawie charakterystycznego wzniesienia przy 560 nm. Przyrost absorbancji przy 700 nm świadczy o obecności w roztworze choleglobiny (tj. zdenaturowana Hb ze zmodyfikowanym pierścieniem porfirynowym). Forma ferryłHb w odróżnieniu od metHb nie posiada maksimum przy 630 nm. Rozróżnienie formy ferryłowej i hemi-



Rys. 5. Widma: (1) HbAO_2 , (2) metHb, (3) hemichrom, (4) ferryłHb, stężenie wszystkich pochodnych w przybliżeniu $40 \mu\text{M}$ w buforze fosforanowym pH = 7,4 (29)

chromu ze względu na duże podobieństwo widm jest raczej utrudnione. Po dodaniu do hemichromu dwutlionianu powstaje hemochrom z dużym maksimum przy 558 nm i mniejszym przy 530 nm czego nie obserwuje się w przypadku ferryHb. Kiedy bada się tylko przekształcenia oksyHb w metHb wystarczający jest pomiar absorbancji przy 577 i 630 nm. Korzystając z wartości milimolowych współczynników poddanych w tab. 2 w przeliczeniu na hem stężenia obu form w μM wyliczamy z zależności:

$$\begin{aligned} [\text{HbO}_2] &= 66A_{577} - 80A_{630} \\ [\text{metHb}] &= 279A_{630} - 3,0A_{577} \end{aligned}$$

Podczas reakcji suma tych stężeń powinna być stałą, w przeciwnym razie oznacza to, że jej przebieg jest złożony (obecnie są inne formy).

Tabela 2

Milimolowy współczynnik absorbancji hemoglobiny
w przeliczeniu na hem

Forma Hb	nm		
	560	577	630
oksyHb (HbO_2)	8,6	15,0	0,17
metHb	4,3	4,45	3,63
hemichrom	8,6	6,8	0,92

W przypadku ustalenia, że w układzie znajdują się tylko HbO_2 i metHb to zmiany stężenia (Δ) oksyhemoglobiny oblicza się z zależności:

$$\Delta \text{HbO}_2 = \Delta A_{577} / 0,011$$

Kiedy w roztworze obecne są dodatkowo hemichrom i choleglobina, precypitujące zdenaturowane formy hemoglobiny należy usunąć przez wirowanie (1 min). Stężenie HbO_2 , metHb i hemichromu w μM obliczamy wówczas następująco. Od wartości absorbancji przy 560, 577, 630 i 700 nm odejmuje się wartość $A_{700} = 0,005$, tj. udział choleglobiny. Absorbancja choleglobiny jest zasadniczo stałą dla każdej długości. Dla 40 μM HbO_2 , metHb lub hemichromu wynosi 0,005. Dla innych stężeń wartość tę należy skorygować. W obecności choleglobiny całkowite stężenie białka pozostaje stałe.

$$\begin{aligned} [\text{HbO}_2] &= 119A_{577} - 39A_{630} - 89A_{560} \\ [\text{metHb}] &= 28A_{577} - 307A_{630} - 55A_{560} \\ [\text{hemichrom}] &= -133A_{577} - 114A_{630} + 233A_{560} \end{aligned}$$

Przybliżone stężenie formy ferryIHb w obecności HbO_2 i metHb wyznacza się na podstawie pomiaru absorbancji przy 700, 630, 577 i 560 nm, korzystając z wartości milimolowych współczynników absorpcji dla ferryIMb. Wynoszą one odpowiednio: $A_{560} = 14,1$; $A_{577} = 3,9$; $A_{630} = 3,0$ [28, 29].

8. PODSUMOWANIE

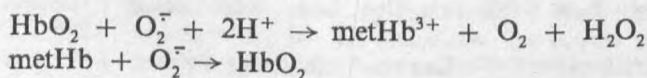
Hemoproteiny uczestniczą w jednoelektronowych reakcjach utleniania bądź redukcji, są źródłem lub zmiataczami wolnych rodników. Autooksydacja grup hemowych (Fe^{2+}) prowadzi bezpośrednio do generowania O_2^- , a pośrednio – H_2O_2 .

Hemoglobina reaguje także z aktywnymi ksenobiotykami i metabolitami, tworząc ich rodniki $\text{RH}^\cdot$ i inicjując reakcje generujące inne rodniki, które często powodują denaturację Hb (ciała Heinza). Powstałe wolne rodniki można wykryć konwencjonalnymi metodami (np. pułapki spinowe – EPR, inhibicja redukcji oksydazy cytochromowej).

Utlenienie oksyhemoglobiny (HbO_2) prowadzi do wytworzenia O_2^- oraz methemoglobiny (metHb). W przypadku destabilizacji struktury białka (globiny) metHb przekształca się w hemichrom, w którym dystalna histydyna lub ligand z zewnątrz zajmują szóstą koordynacyjną wartościowość żelaza (Fe^{3+}) w hemie. Hemichromy łatwo precypitują i są głównym składnikiem ciał Heinza. Choleglobiny są zdenaturowanymi hemoglobinami, w których pierścień porfirynowy uległ hydroksylacji lub rozerwaniu. Ferryhemoglobina (ferryIHb – $\text{Hb}^{2+}\text{H}_2\text{O}_2$) jest kompleksem Fe^{4+} utworzonym z żelazohemoglobiny i H_2O_2 .

W wyniku reakcji metHb z H_2O_2 powstają krótkotrwałe rodniki ferrytowe.

Anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-) może utleniać oksyHb lub redukować metHb tzn.



W pH 7,8 reakcje przebiegają wolno ($k_1 = 4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_2 = 6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Tym samym w stężonych roztworach hemoglobiny, O_2 reaguje z Hb, w rozcieńczonych zachodzi proces dysmutacji.

Ponieważ stałe szybkości (k_1 , k_2) są prawie równe, O_2^- nie może utlenić lub zredukować hemoglobiny całkowicie. Kiedy H_2O_2 zostaje usunięty przez katalazę przy stałej ekspozycji Hb na tlen tworzy się stan równowagi (steady-state), a mieszanina zawiera około 40% metHb.

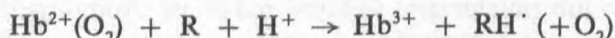
W przypadku nadmiaru H_2O_2 z oksyHb powstają pochodne ferrytowe ($\text{Hb}^{2+}\text{H}_2\text{O}_2$) będące związkami pośrednimi na drodze do końcowego produktu,

jakim jest pochodna metHb. Rodniki ferrytowe są zdolne do utleniania metHb do ferryHb.

Hemoglobina reaguje z wieloma związkami redukującymi (ksenobiotyki), które zostają utlenione przez tlen związany z hemem.



Hemoglobina reaguje też ze związkami utleniającymi (R), które redukuje żelazo hemu.



Do śledzenia przebiegu reakcji wolnorodnikowych autooksydacji hemo-protein zaleca się stężenie 40 μM w przeliczeniu na hem lub 0,7 g białka/ml. Inhibitor dysmutazy dietyloditiokarbaminian nie może mieć tu zastosowania bowiem utlenia on również hemoglobinę [28, 29].

9. BIBLIOGRAFIA

- [1] Adamska M., Gondko R. (1986), „Kosmos”, 3, 417–424.
- [2] Adamska M., Gondko R. (1987), Przegląd Zool., 31, 271–291.
- [3] Carrel R. W., Winterbourn C. C., Rachmilewitz E. A. (1975), Br. J. Haematol., 30, 259–264.
- [4] Castro C. E., Wade R. S., Besler N. O. (1978), „Biochemistry”, 17, 225–231.
- [5] Caughey W. S., Watkins J. A. (1989), [w:] *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, A. Greenwald (ed.), CRS Press. Inc., Boca Raton, Florida.
- [6] Caughey W. S., Kawanishi S. (1983), [w:] Cohen G., Greenwald R. A. (red.) *Oxy-Radicals and Their Scavenger System*, vol. 1, Elsevier, New York, 105.
- [7] Chiu D., Lunin B. (1989), Semin. Hematol., 24, 128–135.
- [8] Dershwitz M., Nowak R. F. (1981), „Biophysics”, 33, 81.
- [9] Duda W. (1992), Acta Univ. Lodz., Folia biochim. et biophys., 9, 53–63.
- [10] Duda W., Osmulski P. A. (1992), Acta Univ. Lodz., Folia biochim. et biophys., 9, 65–76.
- [11] French K. J., Witerbourn C. C., Carell R. W. (1978), Biochem. J., 173, 19–26.
- [12] Gondko R. (1990), Wych. Fizyczne i Sport., 3, 99–112.
- [13] Gondko R., Gabryelak T. (1992), [w:] *Ochrona Biosfery. Bory Tucholskie*, Wyd. Uniwers. Łódź., 24–44.
- [14] Gotoh T., Shikama K. (1976), J. Biochem. (Tokyo), 80, 397–403.
- [15] Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1984), Biochem. J., 219, 1–14.
- [16] Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1984), Meth. Enzym., 105, 47–53.
- [17] Kawanishi S., Caughey W. S. (1979), Biochem. Biophys. Res. Commun., 88, 1203–1209.
- [18] Klebanoff S. J. (1980), Ann. Intern. Med., 93, 480–489.
- [19] Mazur J., Gondko R. (1988), Zag. Biof. Współ., 13, 81–110.
- [20] Michalak W., Gondko R. (1988), Acta Univ. Lodz., Folia biochim. et biophys., 6, 145–175.

- [21] Munday R. (1985), *J. Appl. Toxicol.*, **5**, 402-407.
- [22] Summerfield M., Tudhope R. G. (1978), *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **6**, 319-323.
- [23] Szweda-Lewandowska Z. (1987), *Zag. Biof. Współ.*, **12**, 219-260.
- [24] Wallance W. J., Caughey W. S. (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 561-565.
- [25] Wallance W. J., Houtchens R. A., Maxwell J. C., Caughey W. S. (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4966-4970.
- [26] Wever R., Oudega B., van Gelder B. F. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 475-480.
- [27] Wittenberg J. B., Wittenberg B. A. (1990), *Annu. Rev. Biochim. Biophys. Chem.*, **19**, 217-241.
- [28] Whitburn D. K., Shieh J. J., Sellers M. R., Hoffman Z. M., Taub A. I. (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 1860-1867.
- [29] Winterbourn C. (1990), [w:] *Methods in Enzymology*, vol. 186, 265-272.

Wpłynęło do Redakcji
„Folia biochimica et biophysica”
9.06.1993

Katedra Biofizyki Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Roman Gondko, Teresa Gabryelak, Ian V. Chapman

GENERATION OF OXYGEN RADICALS IN THE PROCESS OF HEMOPROTEIN AUTOXIDATION

Life is a flux of matter, energy and information. Most compounds must remain in a reduced state in the stream. Living organisms use two sources of energy. Autotrophs utilise solar energy while heterotrophs make use of energy released from food oxidation.

In the animated world, the turnover of matter is always accompanied by turnover of energy. Oxygen, which is an element indispensable for life of most organisms (aerobes), participates in these processes.

In order to provide organisms with appropriate amounts of oxygen, appropriate adaptation mechanisms have evolved, enabling a continuous supply of this gas to cells. One mechanism is the vascular system, accompanied, at the molecular level, by the appearance of an oxygen-carrying respiratory proteins (e.g. hemoglobin, hemocyanin etc.).

The formation of an oxygen atmosphere created completely different living conditions for the organisms. Molecular oxygen forms highly reactive and harmful intermediate species during oxidation, viz the superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2). In the presence of metals (Fe, Cu) these compounds form the most active hydroxyl radical ($\cdot OH$) via the Fenton reaction.

All the above species, as well as singlet oxygen, are called „active” oxygen species.

During respiration and photosynthesis, active oxygen species (O_2^- , H_2O_2 and $\cdot OH$) are generated and constitute cellular metabolites.

It is paradoxical that aerobic forms of life must constantly cope with oxygen toxicity in order to exist and survive.

A set of (evolutionally created) defensive mechanisms exist which remove active oxygen species or control their content in tissues. The most important is the enzymatic defence system (SOD, catalase).

It has been established that hemoproteins participating in one-electron redox reactions, generate superoxide radical anions (O_2^-), hydroxyl radicals ($\cdot OH$) and hydrogen peroxide (H_2O_2).

Autoxidation of HbO_2 to MetHb is also accompanied by O_2^- generation. One electron necessary for O_2 reduction comes from the reduced iron of the heme group. This reaction is accelerated by some anions (e.g. chlorides, azides, cyanides etc.). The rate of this reaction decreases with increasing pH.

During autoxidation of HbO_2 in the presence of an exogenous one-electron donor, H_2O_2 is formed.

In this case one electron comes from the heme iron and the second from the non-heme (an exogenous) donor. Such donors may include hydroquinones, nitrites, ferrocyanates etc.).

It is assumed that the $\cdot OH$ radical is formed during reactions of H_2O_2 with HbO₂ (Fenton reaction).

In the reaction of oxyhemoglobin to MetHb by H_2O_2 the transient ferryl form (ferrylHb - $Hb^{2+}H_2O_2$) is formed.

Active oxygen species may react with hemoglobin and damage the protein structure (globin or heme or both components simultaneously). As a result, hemichrome or choleglobin appears in the system.

The course of hemoprotein autoxidation may be monitored spectrophotometrically.