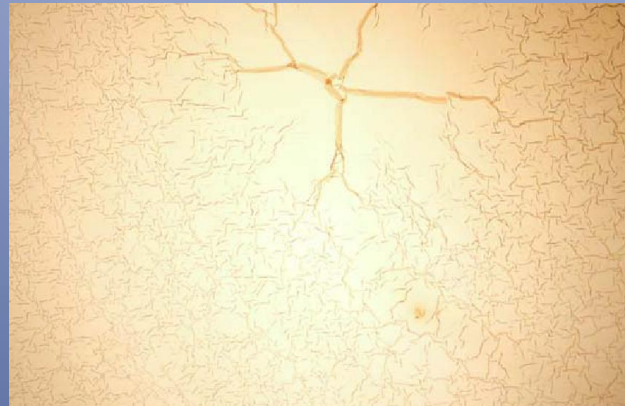


Rola wybranych układów redokswowych w biofizyce stresu oksydacyjnego komórki upigmentowanej.

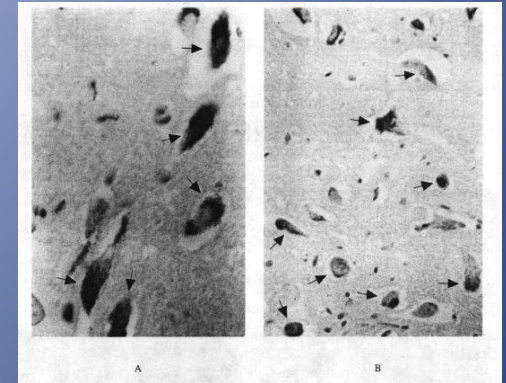
Melanoma



Melanina herbaciana



Choroba Parkinsona

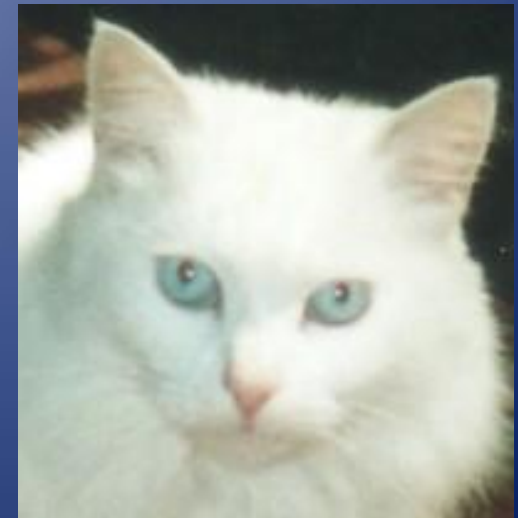


Podejście systemowe
Zenon Matuszak

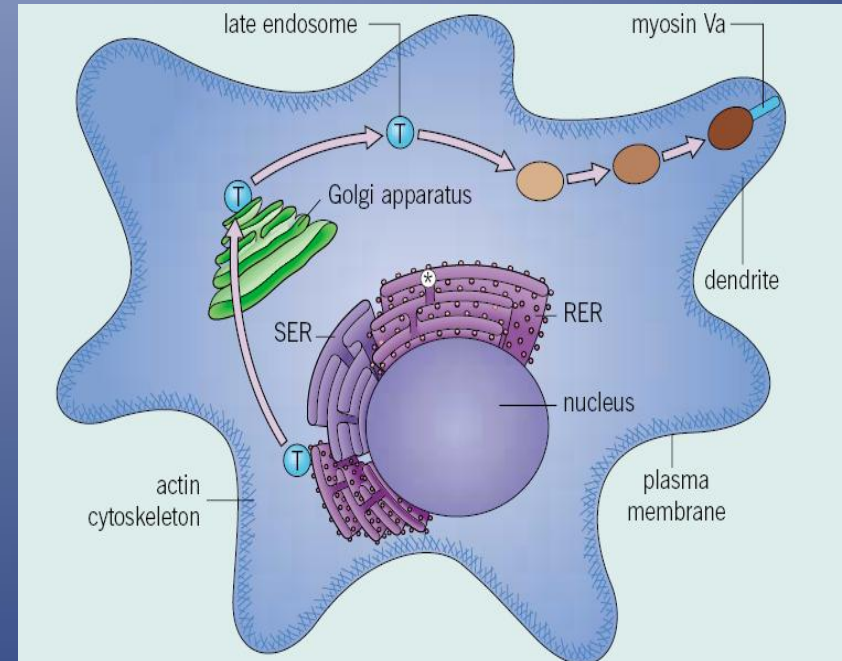
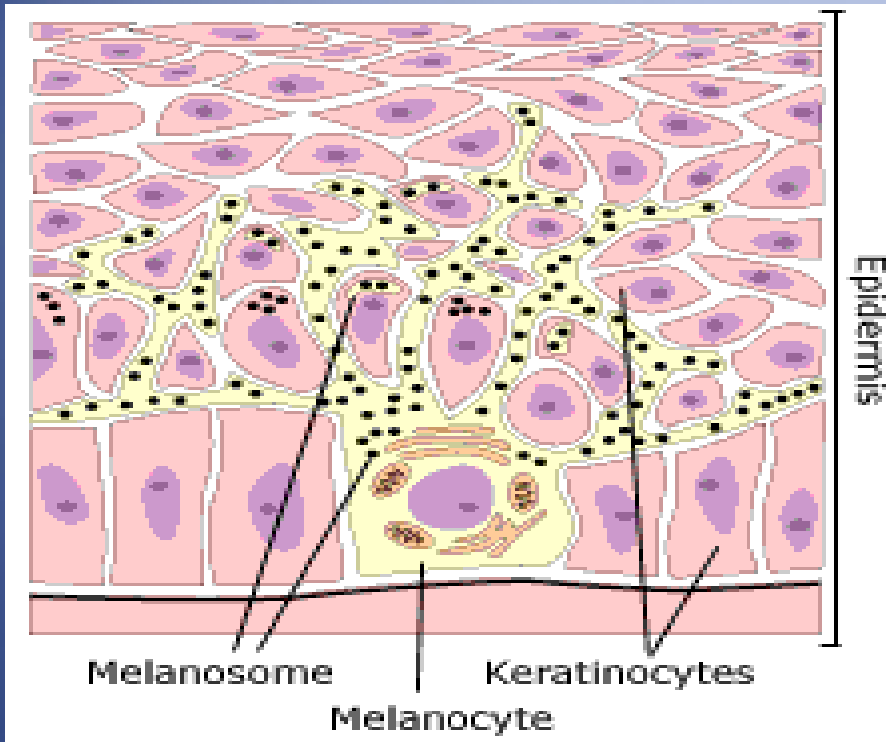


Giant Australian Cuttlefish

Kot Darwina



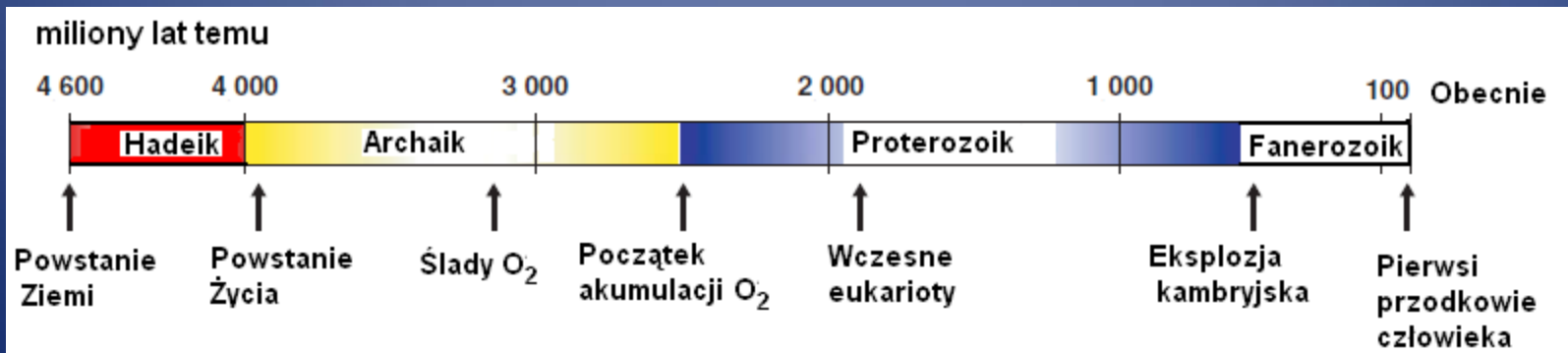
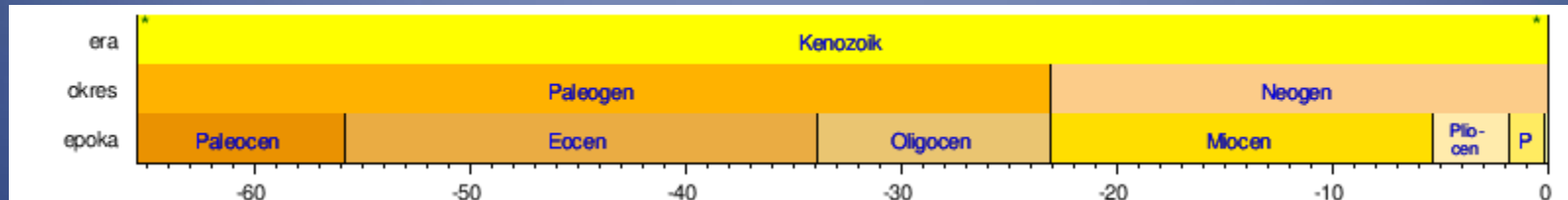
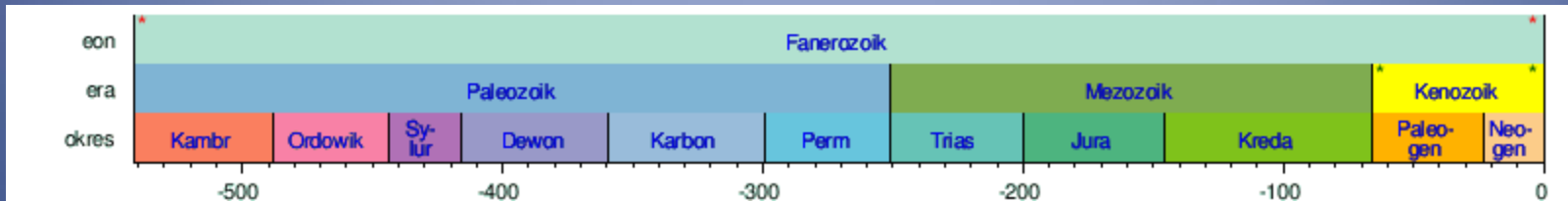
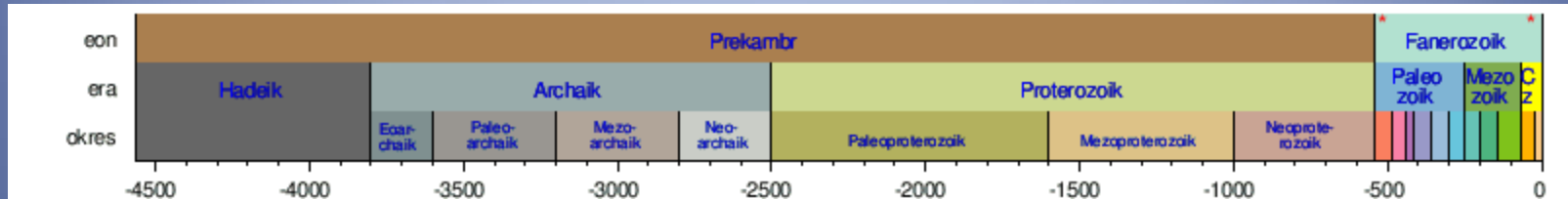
Melanocyt



MSH/agouti - stymuluje transkrypcję i aktywność tyrozynazy

UV, ACTH, estrogeny itp

Biochemia redoksowa a ewolucja



“Great Oxidation Event”

Praera i stan obecny



1775 - Priestley:

odkrycie O₂ i obserwacja toksyczności O₂



1900 - Gomberg:

odkrycie rodnika trójfenylo-metylowego



lata 1950/60:

ROS i wolne rodniki rola biologiczna niezuważalna (pomimo prac Michaelisa 1930-te)



1954 - Gerschman et al. : *rozpoznanie podobieństw toksyczności tlenu i prom. jonizującego*



1969 - McCord and Fridovich: *odkrycie dysmutazy ponadtlenkowej*



1973 - Babior et al.: *Rozpoznanie relacji pomiędzy produkcją rodnika nadtlenkowego i aktywnością antybakteryjną neutrofilii*



1981 - Granger et al.: *rozpoznanie relacji pomiędzy ploką produkcją ROS a uszkodzeniami w wyniku niedotlenienia/reperfuzji*

* **Wolny rodnik** – jeden lub więcej niesparowanych elektronów

* Podstawowa rola tlenu w procesach biologicznych - rodniki tlenowe dominują

* **O₂** działa w procesach podstawowych w metabolizmie organizmów aerobowych jako końcowy akceptor elektronów, jest redukowany do wody, transfer elektronów na tlen jest źródłem reaktywnych pośredników

* **Stres oksydacyjny** – niespecyficzne ciągle oddziaływanie ROS/RNS o niezbyt dużym natężeniu

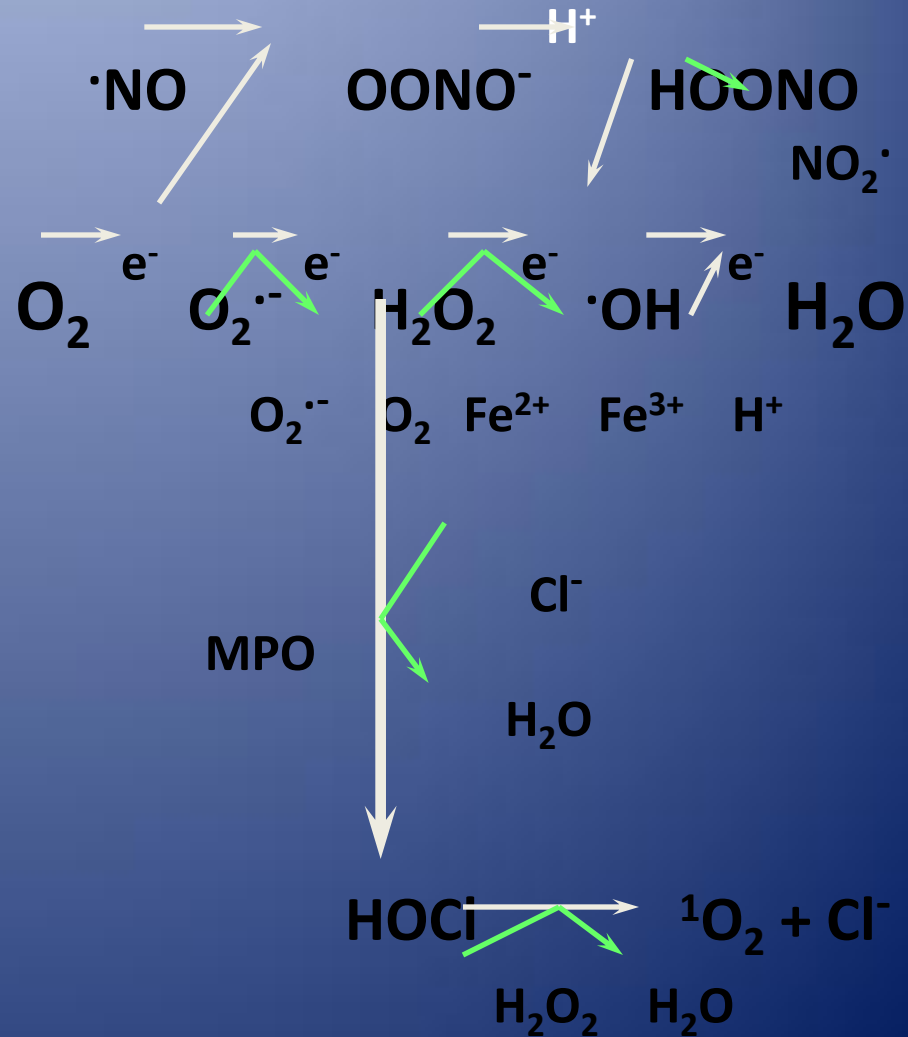
Czasy pół-rozpadu podstawowych ROS

<i>Reagent</i>	<i>Czas pół-rozpadu (s)</i>	<i>Steż. fizjologiczne (mol/l)</i>
Hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)	10^{-9}	
Alkoxy radical ($\text{RO}\cdot$)	10^{-6}	
Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)	10^{-5}	
Peroxynitrite anion (ONOO^-)	0.05 – 1.0	
Peroxyl radical ($\text{ROO}\cdot$)	7	
Nitric oxide ($\cdot\text{NO}$)	1 - 10	10^{-9}
Semiquinone radical	Minuty/godz	
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	spontan. godz/dni (przyśp. obecność enzymów)	$10^{-9} - 10^{-7}$
Superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	spontan. godz/dni (SOD przyśp. 10^6)	$10^{-12} - 10^{-11}$
Hypochlorous acid (HOCl)	Zależy od substratów	

- * **ROS** - mają źródła endo- (fizjologiczny metabolizm) i egzogenne.
- * W przybliżeniu 90% tlenu jest redukowana w komórkach ssaków enzymatycznie w procesach 4-elektronowych
- * **ROS** są szkodliwe, ale są kontrolowane. Komórki rozwinęły liczne systemy obrony, enzymatyczne i nieenzymatyczne, aby zapobiegać i naprawiać uszkodzenia spowodowane przez stres oksydacyjny

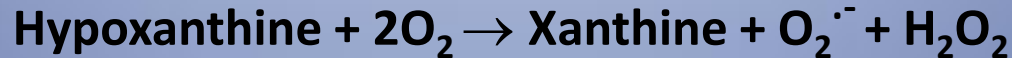
Pochodzenie ROS

Generacja u ssaków



Enzymatyczne źródła ROS

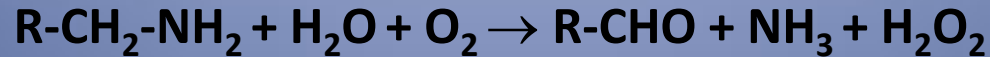
Xanthine oxidase



NADPH oxidase

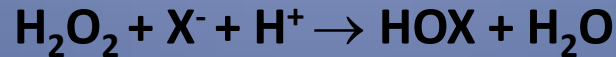


Amine oxidases



Myeloperoxidase

Hypohalous acid formation



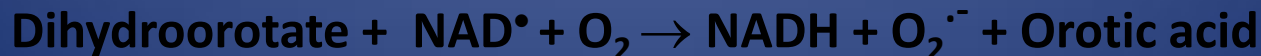
NADH oxidase reaction



Aldehyde oxidase



Dihydroorotate dehydrogenase



Nieenzymatyczne źródła ROS



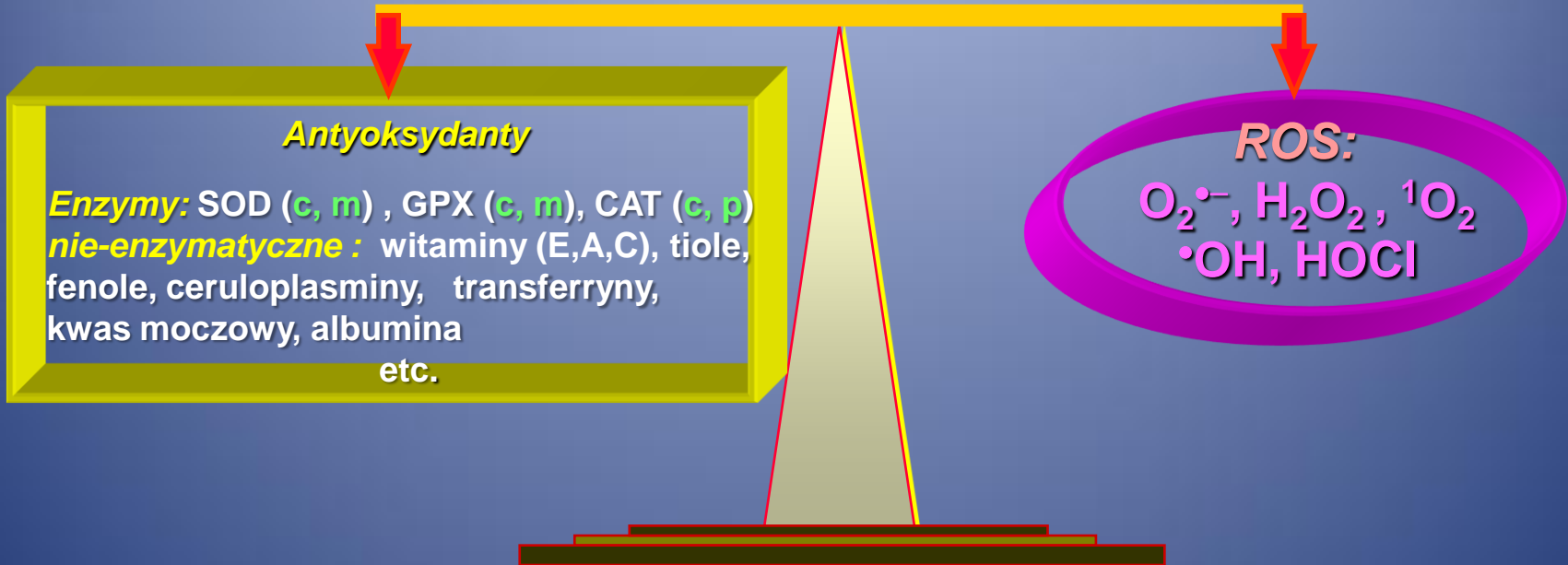
Reduced flavin



Coenzyme

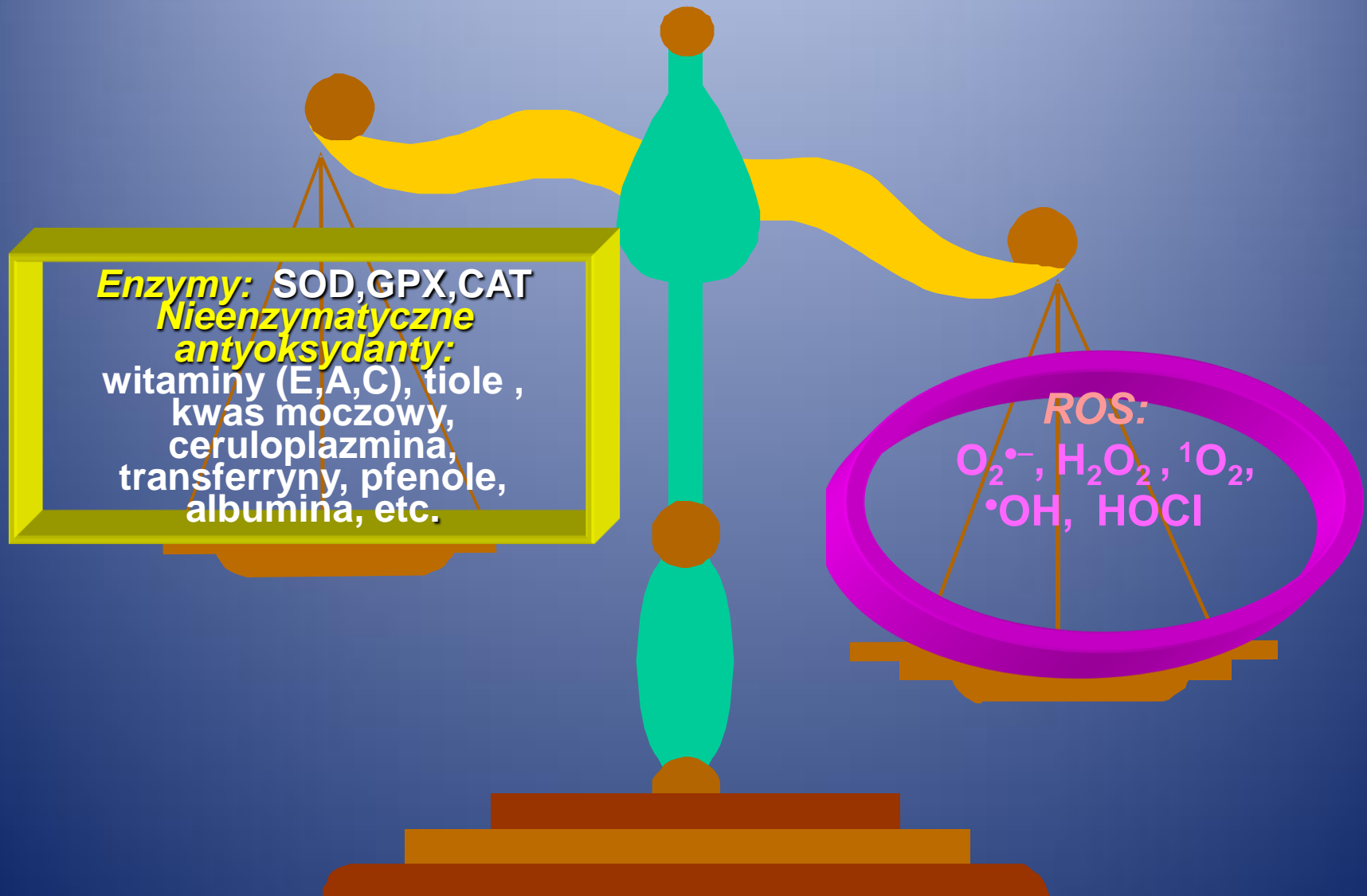


**ROS są kontrolowane
balans fizjologiczny pomiędzy produkcją a eliminacją**



c-cytozol, m-mitochondria, p-peroksysomy

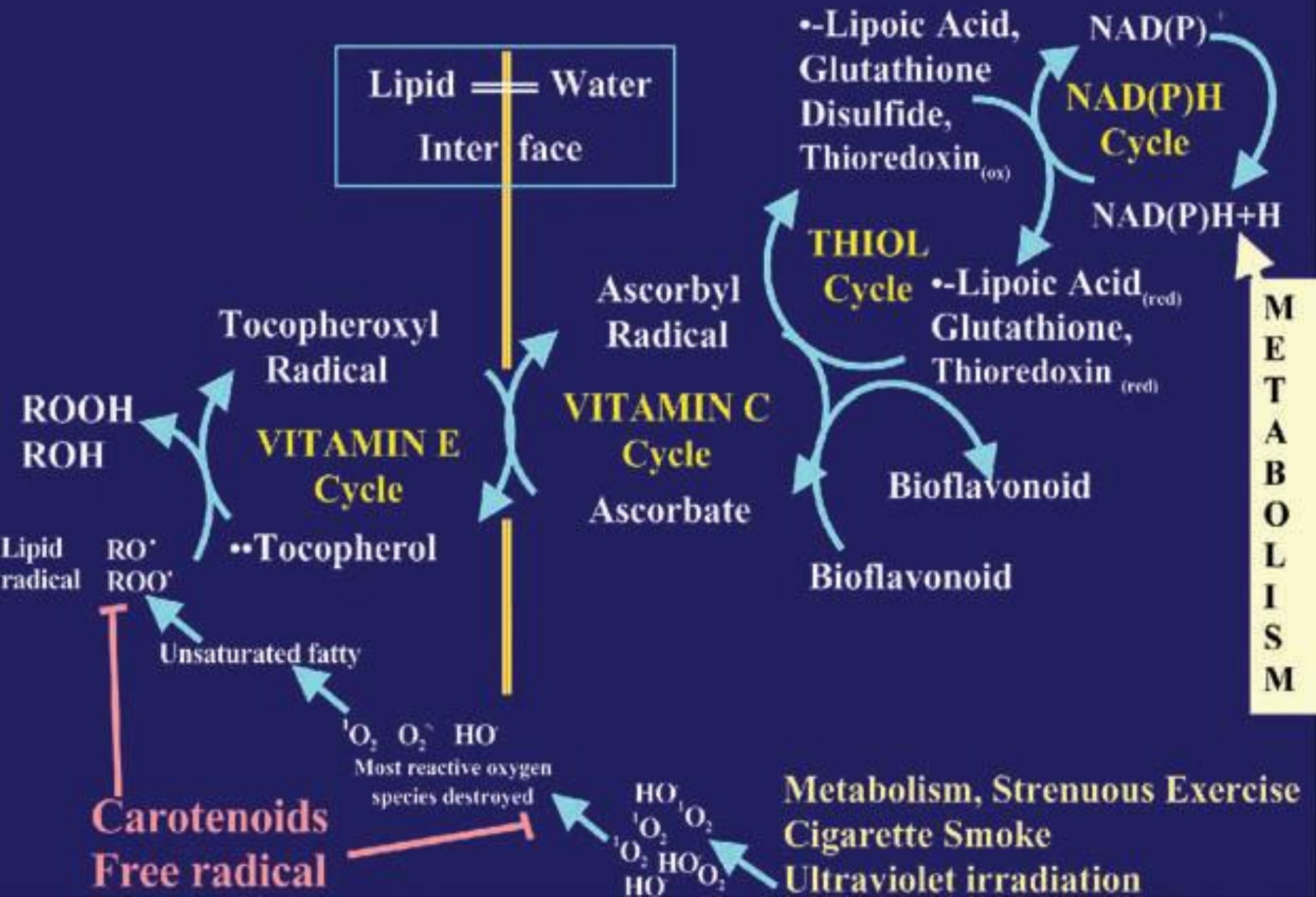
Stan patologiczny- balans jest zaburzony



Strategia badań doświadczalnych i teoretycznych w dziedzinie komórkowych procesów oksydacyjno-redukcyjnych

- Poszukiwanie nowych oksydantów i antyoksydantów i charakterystyka ich działania na różnych poziomach organizacji organizmu
- Doskonalenie doświadczalnych i teoretycznych metod badania charakterystyk fizykochemicznych uczestników procesów redoksowych w komórce i organizmie
- Opis dynamicznych procesów redoksowych i charakterystyka komórki jako całości z tego punktu widzenia

The Antioxidant Network



Cele

Celem prezentowanej pracy jest nie tylko pokazanie wyników konkretnych badań, ale zaprezentowanie systematycznej strategii badawczej ilustrowanej wybranymi problemami pojawiającymi się podczas badań zjawisk bioredoksowych na wszystkich poziomach badań struktury i fizjologii komórki upigmentowanej.

Musimy wiedzieć:

co?,
ile?,
gdzie?,
jak szybko ?

- **Melatonina** reprezentuje niskomolekularne układy redoksove nieodwracalne,
- **Znaczniki spinowe (pułapki spinowe)** układy odwracalne,
- **Peroksydazy** wielostanowe regulowane układy redoks generujące w systemie kaskady procesów redoksowych
- **Tyrozynaza** układy wielostanowe regulowane zewnątrznie
- **Melanina** kooperatywne układy redoksove
- **PDT** regulowaną terapię redoksową

Podejście systemowe

Centralne pytanie biofizyki

zasady organizacji systemu żywego - jak jego elementy są powiązane w układzie czasoprzestrzennym, w spójną, funkcjonującą i odnawiającą się całość

próba spojrzenia na w/w problematykę z punktu widzenia możliwości jej włączenia w ogólną biofizykę systemową

Podejście systemowe – zasady opisu

W podejściu systemowym dzielimy cały system na badany obiekt, czyli układ oraz otoczenie

elementy, ich własności oraz oddziaływania pomiędzy nimi; np. atom = jądro + elektrony.

Elementy - oddziałujące i reagujące składniki układu, które posiadają własności (cząstkowe lub integralne czyli atrybuty które charakteryzują elementy układu lub też cały system.

Oddziaływania – dzielimy na oddziaływania wewnętrzne czyli pomiędzy elementami układu oraz oddziaływania systemu z jego otoczeniem.

Podjęcie systemowe – zasady opisu

Ograniczenia układu – przestrzenne lub czasoprzestrzenne specyfikacja

Zadanie systemu przy różnych otoczeniach pozwala na zdefiniowanie

Celu układu, celowej reakcji systemu na jego otoczenie, funkcji układu (elementu układu)

cały system winien być widziany jako zagnieżdżony układ podsystemów.

Podójście systemowe – zasady opisu

Powstaje podstawowy problem przenoszenia własności obiektu z podsystemu na system nadrzędny, dobrze widoczny w badanej problematyce bioredoksowej np. problem antyoksydanta in vitro i in vivo jest ściśle związany z problemem otoczeń układu i jest problemem

Tworzenia systemu i jego opisu

wymaga zawsze użycia dodatkowych założeń, te zaś nie są wbudowane w teorię podstawową opisującą system niższego rzędu

Zasadniczym celem wprowadzenia dodatkowych założeń (nowych koncepcji) jest redukcja złożoności problemu.

Jednym ze sposobów preferowanych w pracy oswajania złożoności jest model matematyczny, porządkuje zdarzenia, kontroluje rozumowanie i pozwala na przewidywania.

Zmiana paradygmatu-Medycyna Submolekularna

Fizjologia organizmu z punktu widzenia
biofizyki systemów– medycyna
submolekularna

Na poziomie submolekularnym pojedyncza komórka stanowi skomplikowany układ jąder atomowych i elektronów o ogromnej liczbie stabilnych konfiguracji, zmieniających się bez przerwy w czasie.

Pewna część tych konfiguracji reprezentuje stan, który można określić jako stan fizjologicznie prawidłowy -> **zdrowie**

Stan patologiczny komórki lub organizmu (choroba) jest w tym ujęciu widziany jako odstępstwo od poprzednio zdefiniowanego, czyli jest to taki rozkład gęstości elektronowej (zbiór takich rozkładów) -> **śmierć**

Molekuła w QM

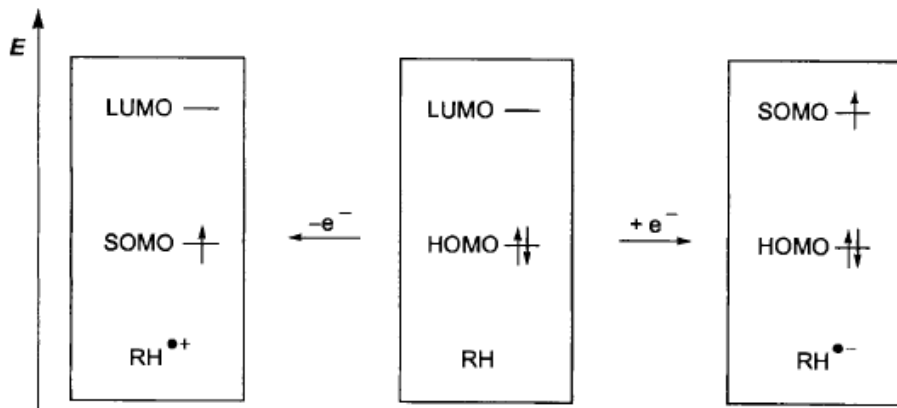
Opis molekuly w języku teorii MO i DFT

Podejście MO - obraz jakościowy

Opis w języku DFT.

$$E[\rho] = F[\rho] + \int d\mathbf{r} \rho(\mathbf{r}) v(\mathbf{r})$$

$$\mu = \left(\frac{\delta E}{\delta \rho(\mathbf{r})} \right)_v = v(\mathbf{r}) + \frac{\delta F}{\delta \rho(\mathbf{r})}$$



Scheme 1. One-electron-transfer reduction and oxidation of RH.

$$\mu = \left(\frac{\partial E}{\partial N} \right)_v = -\chi$$

Pomiary

Pomiary :

1. Charakterystyka systemu jako układu termodynamicznego , szacowanie wielkości termodynamicznych
np. równowagowy potencjał redoksy systemu
określa ramy energetyczne procesu

Metody: elektrochemiczne- równowagowe i nierównowagowe

2. Identyfikacji podukładów biorących udział w procesach

metody spektroskopowe – reżim stacjonarny lub impulsowy (stężenia i kinetyka)

EPR wraz z bardzo mocną techniką pułapkowania spinowego

spektroskopie UV- VIS

spektroskopie luminescencyjne (czasem możliwości unikalne np. identyfikacji $^1\text{O}_2$.poprzez bezpośredni pomiar emisji w 1270 nm.)

metody elektrochemiczne itd..

struktura procesu i interakcji wzajemnej składników
czyli powiedzieć coś o zależnościach entropowych.

Definicja procesu redokсового

- Reakcje transferu elektronu (ET_- electron transfer) zwane często reakcjami oksydacyjno-redukcyjnymi (redokсовymi) są najprostszą klasą reakcji chemicznych.

Klasyfikacja i terminologia opiera się na mechanizmie donorowo-akceptorowym, oparta jest o rodzaj wymienianej cząstki.

typy: **ELEKTRONOWE DONOROWO-AKCEPTOROWE** (czyli reakcje oksydacyjno redukcyjne,

PROTONOWE DONOROWO-AKCEPTOROWE tj. kwasowo zasadowe w sensie Bronsteda

CZĄSTECZKOWO DONOROWO-AKCEPTOROWE, tzn. takie w, w których dochodzi do wymiany jonów, atomów, molekuł- są one np. podstawą procesów tworzenia kompleksów.

Historia pojęć utleniania i redukcji

W przyjmowanym obecnie ujęciu pod pojęciem reakcji utleniania –redukcji (redoksowej) rozumie się taki typ reakcji chemicznej, w której zmieniają się stopnie utlenienia atomów pierwiastków biorących udział w reakcji.

Na pojęciu stopnia utlenienia , liczb przypisanych atomom opiera się cała a nomenklatura w chemii nieorganicznej

Skala elektroujemności pierwiastków-

Pierwiastkom można przypisać liczby odpowiadające ich zdolnościom przyciągania elektronów w wiązaniu kowalencyjnym, nosi to nazwę elektroujemności pierwiastka

Nomenklatura chemii nieorganicznej opiera się **stopnie utlenienia**: liczby, które są przypisane pierwiastkowi. Stopień utlenienia atomu jest to liczba odpowiadająca ładunkowi elektrycznemu, jaki posiadałby atom, gdyby elektrony występujące w związku zostały przekazane atomowi w określony sposób.

Przez **stopień utlenienia** (liczba) czyli ładunek formalny rozumie się, liczbę ładunków elektrycznych, jakie byłyby związane z danym atomem, gdyby wszystkie wiązania były jonowe.

Pojęcia utleniania i redukcji

W równaniach reakcji redukcji-utlenienia podaje się zwykle liczbę elektronów oddanych w procesie utlenienia i liczbę elektronów pobranych w procesie redukcji. Zatem umownie utożsamia się reakcje **utlenienia z oddawaniem elektronów** a **redukcje z przyjmowaniem elektronów**.

Budowa cząsteczek, natura wiązań chemicznych w cząsteczkami, mechanizmu procesu.

Zapis reakcji jest uproszczony i podaje się tylko stopnie utlenienia tych atomów, u których ulegają one zmianie.

Substancje zawierające atom lub jon zdolny do pobierania lub oddawania elektronów(ulegania redukcji, zmniejszaniu swojej liczby utlenienia) nazywamy **utleniaczem**, natomiast substancje związku chemiczne, które zawierają atomy zdolne do oddawania elektronów, , do zwiększania swojej liczby utlenienia) nazywamy **reduktorem**.

Utleniacz OX pobiera elektrony (ulega redukcji), reduktor (Red) oddaje elektrony utleniaczowi, ulega utlenieniu.

Utlenianie-Redukcja

STOPIEŃ utlenienia jest cechą atomu pierwiastka

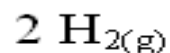
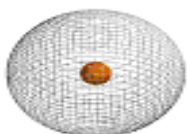
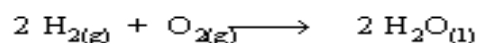
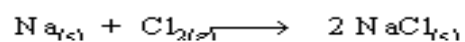
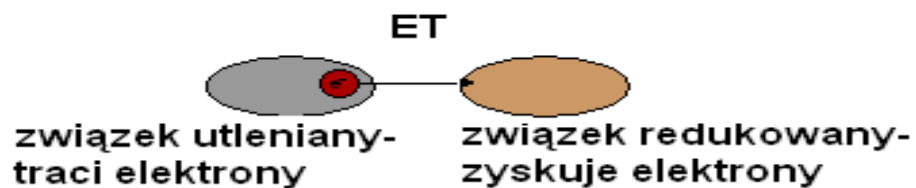
Utlenienie (pierwiastka) polega na usunięciu elektronów a redukcji na ich przyłączeniu.

- Proces taki jest zdefiniowany dla pierwiastków, a stopień utlenienia jest cechą atomu pierwiastka.

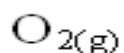
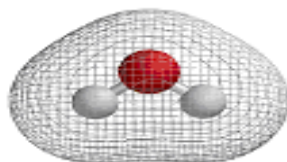
Wzrost stopnia utlenienia pierwiastka nazywa się jego utlenieniem, obniżenia stopnia utlenienia nosi nazwę redukcji.

Zwykle reakcje redoksowe prowadzą do zmian stanu oksydacyjnego atomów lub jonów biorących udział w procesie. Zmiana ta wynika z utraty lub pobrania elektronów, utrata elektronów przez atom produkuje stan bardziej dodatni stan oksydacyjny , pobranie elektronów stan bardziej ujemny.

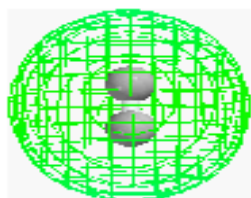
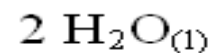
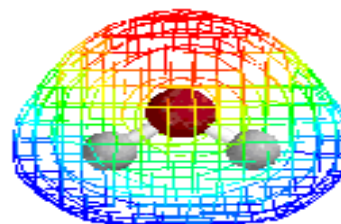
Utlenianie-redukcja



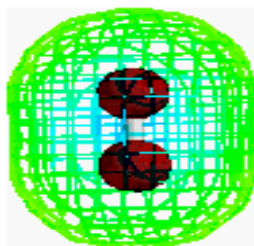
+



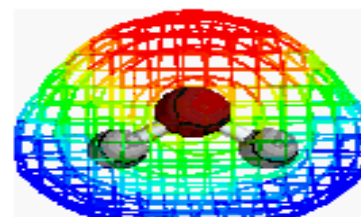
→



+



→



Stopnie utlenienia

Stopnie utlenienia

Przykłady

-4	CH_4								
-3	CH_3	RCH_3							
-2	$:\text{CH}_2$	$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$	H_3COH	H_3CCl	H_3CNR_2				
-1	$\left[\cdot \text{CH} \right]$	$\cdot \text{CH}_2\text{Cl}$	$\text{HC}\equiv\text{CH}$						
0	$[\text{C}]$	$\text{H}_2\text{C}=\text{O}$	$\text{H}_2\text{C}=\text{NR}$	H_2CCl_2	$\text{R}_2\text{C}=\overset{\text{OR}}{\text{C}}\text{H}$	$\text{R}_2\text{C}=\overset{\text{NR}_2}{\text{C}}\text{H}$	$\text{R}_2\text{C}=\overset{\text{Cl}}{\text{C}}\text{H}$		
2	$:\text{C}=\text{O}$	$:\text{CCl}_2$	HCOH	HCOR	HCNR_2	$\text{HC}\equiv\text{N}$	HC(OR)_3	HCCl_3	
4	CO_2	C(OR)_4	ROCOR	$\text{RO}\overset{\text{O}}{\text{C}}\text{NR}_2$	$\text{R}_2\text{N}\overset{\text{O}}{\text{C}}\text{NR}_2$	$\text{R-N}=\text{C}=\text{O}$	CCl_4		

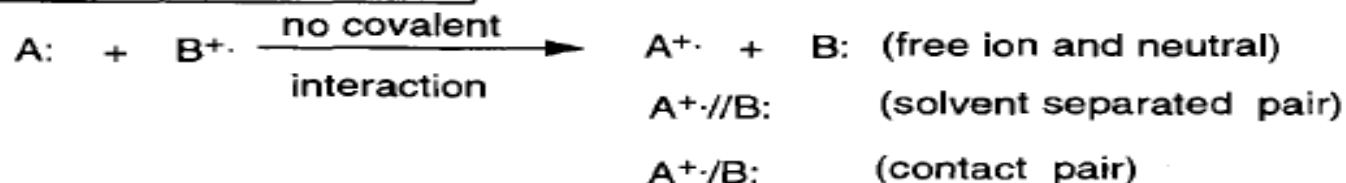
Table 4.1 A selection of biologically important reactive species, including their chemical formula, reaction center, oxidation state(s) of reactive atoms and preferred mode(s) of formation

Reactive species	Formula (protonated/deprotonated)	Reactive atom	Formal oxidation state	pK _a	Occurrence
Singlet oxygen	$^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$)	O	0		UV-radiation combined with endogenous photosensitizers
Ozone	O_3	O	0		Air pollution, possibly formation in neutrophils
Superoxide radical	HO_2^\bullet	O	-0.5	4.8	Mitochondria, NADPH oxidases, dual oxidases, xanthine oxidase
	$\text{O}_2^{\bullet-}$	O	-0.5		
Dihydrogen trioxide	H_2O_3	O	(-1,0,-1)		O_3 chemistry in phagocytes, formation still debatable
Hydrogen peroxide	H_2O_2	O	-1		Mitochondria (formed from $\text{O}_2^{\bullet-}$ in presence of SOD), Immune cells (formed from O_2 by various oxidases)
Aliphatic peroxides	ROOH (R = alkyl)	O	-1		Lipid damage, e.g. by $^1\text{O}_2$, lipid or DNA damage by O_3
Hydroxyl radical	HO^\bullet	O	-1		Fenton reaction in presence of H_2O_2 and Cu^+ , Fe^{2+}
Carbonate radical	$\text{CO}_3^{\bullet-}$	O	-1		$\text{CO}_3^{2-} + \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{CO}_3^{\bullet-} + \text{HO}^-$
Nitrogen monoxide	$^\bullet\text{NO}$	N	+2		Nitric oxide synthase, reduction of NO_3^- via NO_2^-
Peroxynitrite	ONOO^-	N,O	-2(O), +3(N), -1(O), -1(O)	cis 6.8 trans 8.0	$\text{O}_2^{\bullet-} + ^\bullet\text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^-$
Hypochlorous acid	HOCl	Cl,O	+1 (Cl), -2(O)	7.5	Myeloperoxidase in neutrophils, monocytes, macrophages

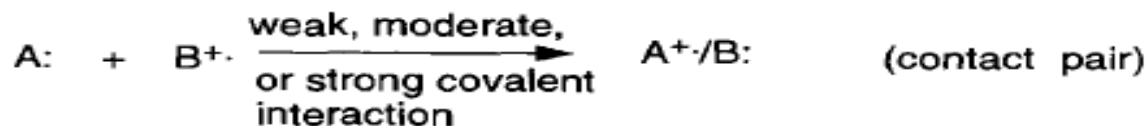
This list is a selection and is necessarily incomplete. More details about these chemical species are provided in the text. Metal ions and reactive sulfur species (RSS) are listed separately.

ET i mechanizm polarny (kwasy i zasady Lewisa) Teoria Marcusa

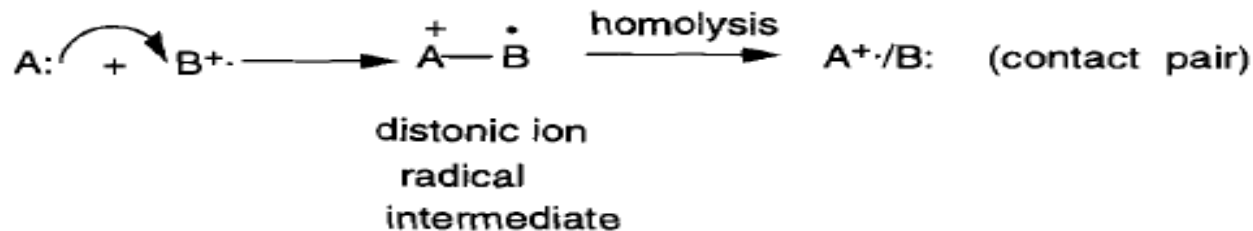
Outer Sphere Electron Transfer:



Inner Sphere Electron Transfer:

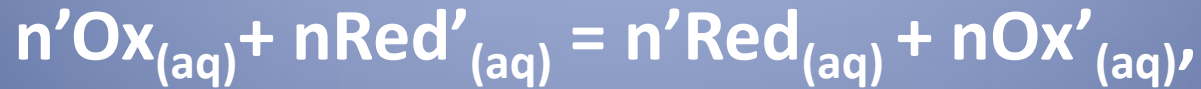


Polar Mechanism of Electron Transfer:



Scheme 30. Inner and outer sphere electron transfer mechanisms.

Reakcje oksydacyjno-redukcyjne (redoks))



$$\Delta G_{\text{react}} = \sum_i \mu_i n_i = 0$$

$$\Delta G^0 = \ln K_{\text{react}}$$

Potencjał redokswy- interpretacje

$$E_H = E_{H(Ox_{aq}/Red_{aq})}^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{Ox_{aq}}}{a_{Red_{aq}}} = E_{H(Ox_{aq}/Red_{aq})}^0 + \frac{2.303RT}{nF} \lg \frac{a_{Ox_{aq}}}{a_{Red_{aq}}}$$

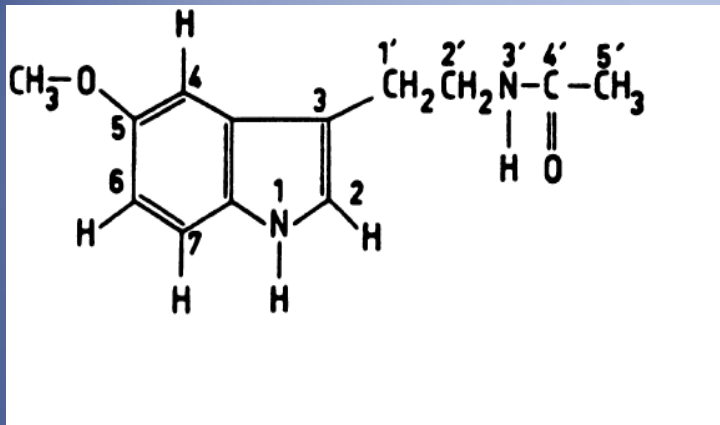
$$K_{react} = \left(\frac{a_{Red_{aq}}^{n'} a_{OX'_{aq}}^n}{a_{OX_{aq}}^{n'} a_{Red_{aq}}^n} \right)$$

$$E_H = E_{H_{s\bar{a}q}}^0 - \frac{2.303RT}{nF} \lg (a_{s\bar{a}q})$$

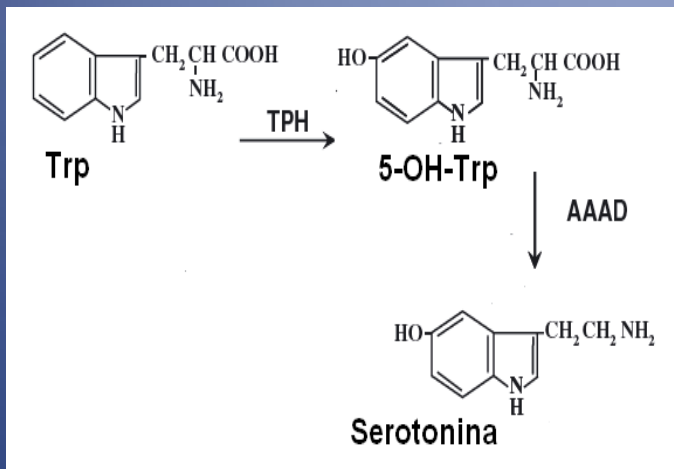
$$E_H = E_0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{p_0}{p_1}$$

Melatonina-nowy antyoksydant

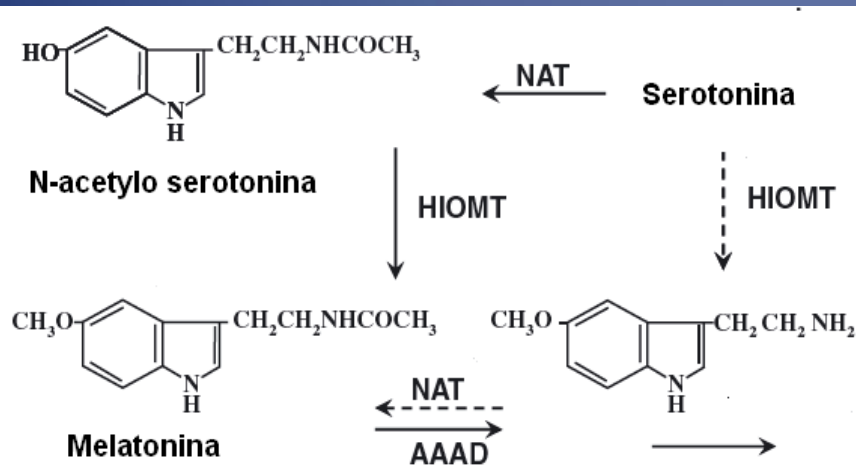
Melatonina(5-metoksy-tryptamina)



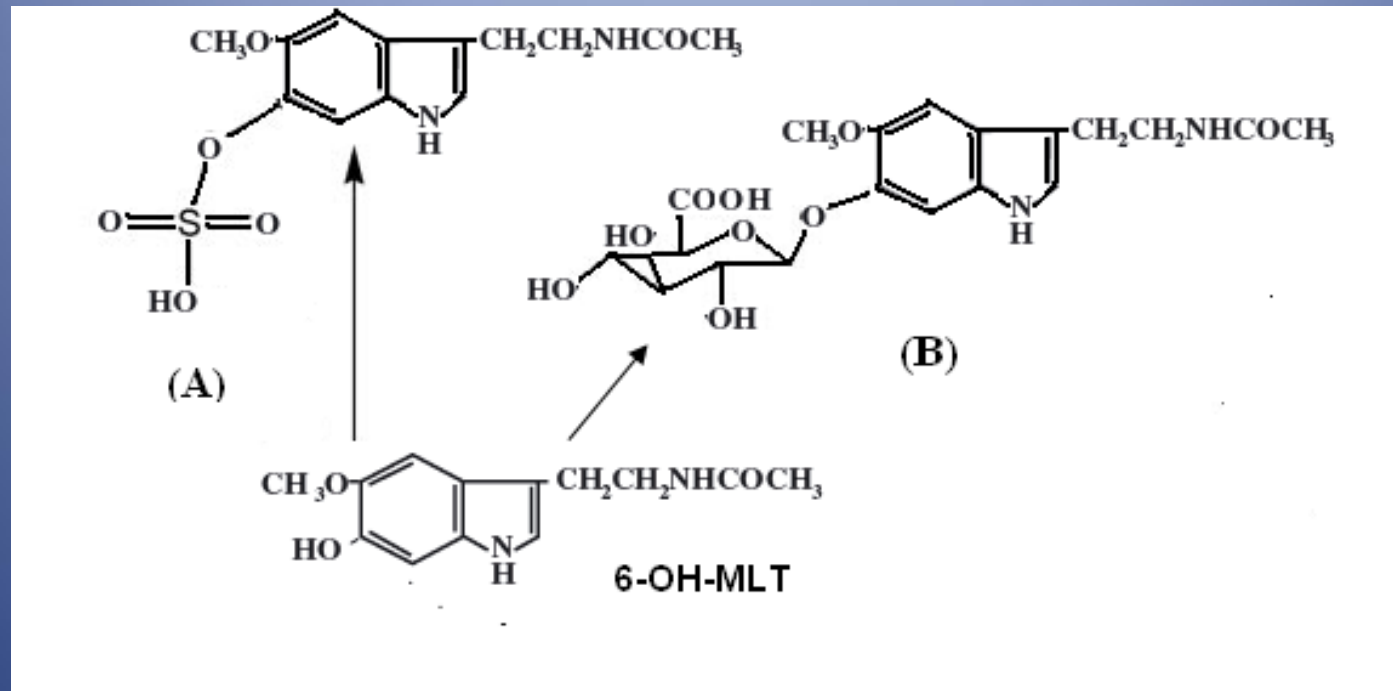
Trp -tryptofan, 5-OH-Trp -5-hydrokсы tryptofan, 5-acetylo-tryptamina (serotoninina), TPH- hydrolaza tryptofanu(EC 4.1.1.28), AAAD- dekarboksylaza aminokwasów



NAT- N-acetylotransferaza(EC 2.3.1.5) ,HIOMT- transferaza hydrokсыindolo-O-metylowa (EC 2.1.1.4)



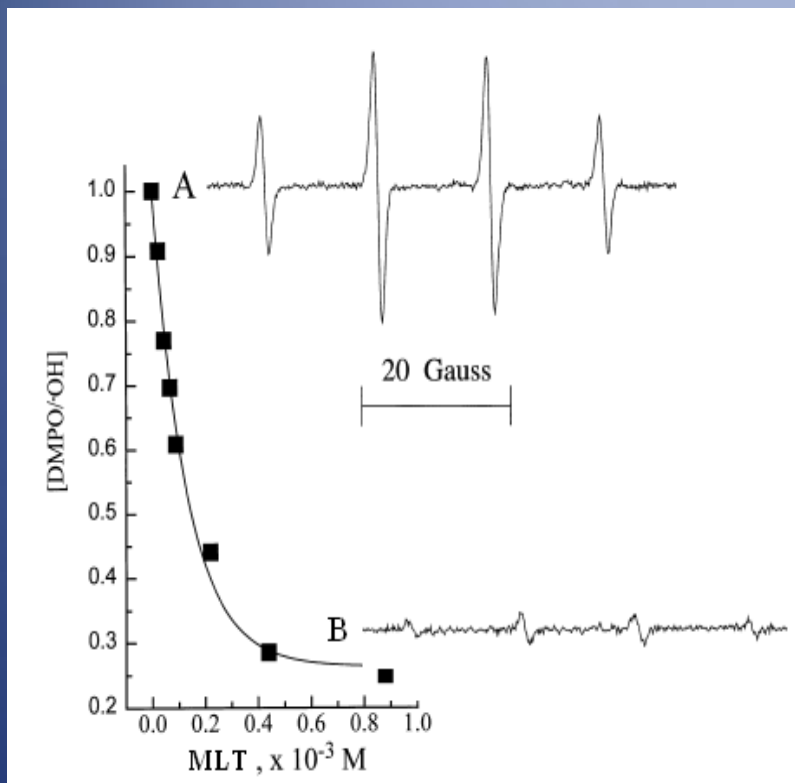
Produkty metabolizmu MLT



6-OH-MLT, siarczan 6-OH-MLT (A) i glukoronian 6-OH-MLT MLT. (B)

Działanie bezpośrednie MLT jako antyoksydanta

Zasady eksperymentu kompetycyjnego w warunkach stacjonarnych



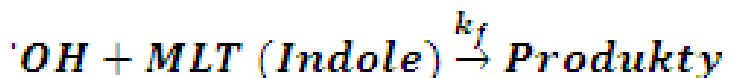
Wyznaczanie stałej szybkości reakcji MLT z rodnikiem $\cdot\text{OH}$ metodą ESR – pułapowania spinowego.

A -widmo ESR adduktu DMPO-OH (kwartet 1:2:2:1, $a_N = 14.9 \text{ G}$, $a_H = 14.8 \text{ G}$) rejestrowane pod nieobecność MLT,

-B - widmo ESR adduktu DMPO-OH, stężenia MLT = 0.7 mM.

Parametry rejestracji: Moc mikrofalowa-20 mW, amplituda modulacji 0.33 Gs, wzmacnienie 2×10^4 stała czasowa 0.25 s, szybkość przemieszczania 100 Gs/4 min.[]

•Układ generacyjny -system Fentona: Fe^{2+} - H_2O_2 , pH=7. [DMPO]=1 mM,



Reakcja referencyjna, $k_a = 0.47 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Reakcja pomiarowa, $k_f = 2.7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Wartości stałych szybkości oddziaływania MLT z rodnikami hydroksylowymi.

Tabela I. Wyniki pomiarów stałych szybkości oddziaływania MLT z rodnikami hydroksylowymi.

Sposób generacji	Stała szybkości ($M^{-1}s^{-1}$)	Metoda	Literatura
Fe^{2+}/H_2O_2	2.7×10^{10}	ESR –płakowanie spinowe DMPO	50a
Fe^{2+}/H_2O_2	0.6×10^{11}	Kompetycja ABTS	50b
H_2O_2/UV	4×10^{10}	Kompetycja ABTS, DMPO	50c
Radioliza impulsowa H_2O	1.25×10^{10}	Kinetyka rodnik melatoninowy	50d
Radioliza impulsowa H_2O	1.2×10^{10}	Kinetyka rodnik melatoninowy	50e

Wyznaczanie całkowitej stałej szybkości gaszenia luminescencji $^1\text{O}_2$ przez melatoninę z użyciem czasowo rozdzielczej luminescencji, $^1\text{O}_2 \lambda_{\text{em}} = 1270 \text{ nm}$

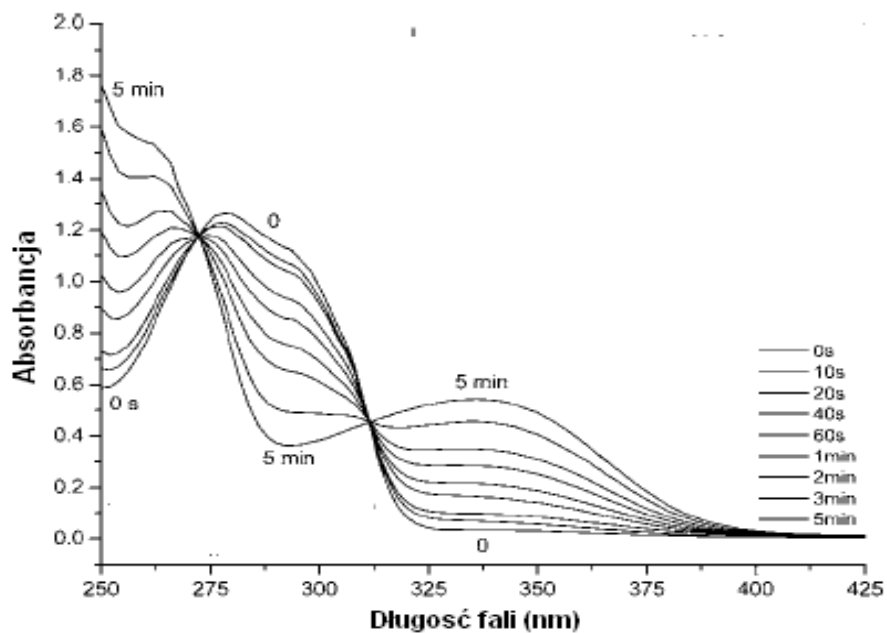
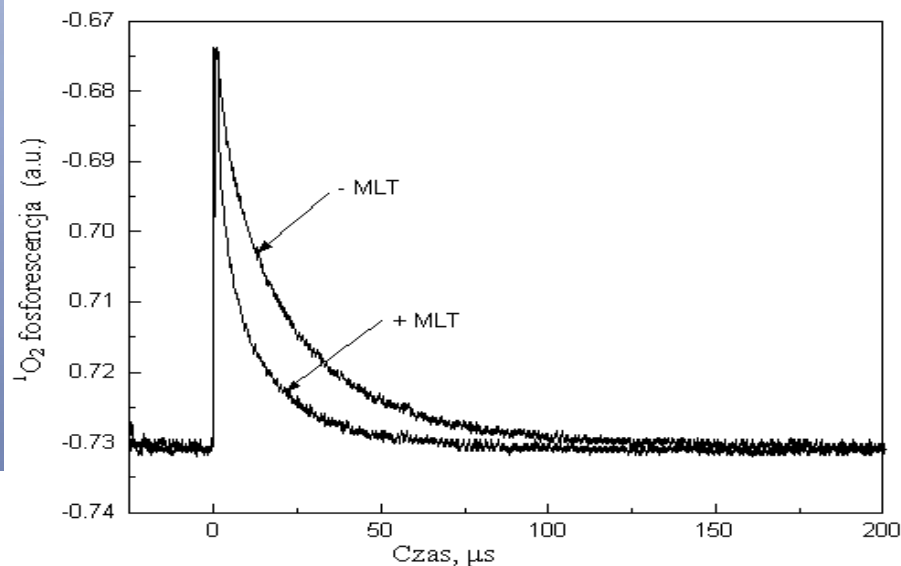


Tabela 2. Stałe szybkości reakcji MLT z rodnikami peroksyłowymi i alkoksyłowymi

Rodnik	Sposób generacji	Stała szybkości ($M^{-1}s^{-1}$)	Metoda	Literatura
$CCl_3OO\cdot$	Radioliza impulsowa	2.7×10^8	Pomiar $CCl_3OO\cdot$	51a
$CCl_3OO\cdot$	Radioliza impulsowa	6×10^8	Rodnik MLT	51b
$tert-BuO\cdot$	Fotoliza laserowa	3.4×10^7	Rodnik MLT	51c
$tert-BuO\cdot$	Radioliza impulsowa	2.8×10^9	Rodnik MLT	51a
$tert-CumO\cdot$	Fotoliza laserowa	6.7×10^7	Rodnik MLT	51b

Tabela 3. Stałe szybkości reakcji MLT z RNS

Rodnik	Sposób generacji	Stała szybkości ($M^{-1}s^{-1}$)	Metoda	Literatura
$ONOOH\cdot$	Radioliza impulsowa	159	Rodnik MLT	52a
$ONNO\cdot$	Radioliza impulsowa	5	Rodnik MLT	52a
$\cdot N_3$	Fotoliza laserowa	7.5×10^9	Rodnik MLT	50d
$\cdot N_3$	Radioliza impulsowa	9.8×10^9	Rodnik MLT	50d
$NO_2\cdot$	Radioliza impulsowa	3.7×10^6	Rodnik MLT	50d
$NO\cdot$	Fotoliza laserowa	3×10^7	Rodnik MLT	50d

Elektrochemia MLT

(schemat $2e^-/1H^+$).

0.66 V (vrs .Ag/AgCl, pH=7.4) i jest nieco niższy aniżeli dla innych indoli w podobnych warunkach: indol-(0.840 V), L-tryptofan (0.730 V), tryptamina (0.810 V). Serotonina (0.364 V) oraz 5,6 dwuhydroksytryptamina (0.225 V), mają znacząco niższe potencjały piku w Zachowanie elektrochemiczne MLT jest podobne do innych indoli

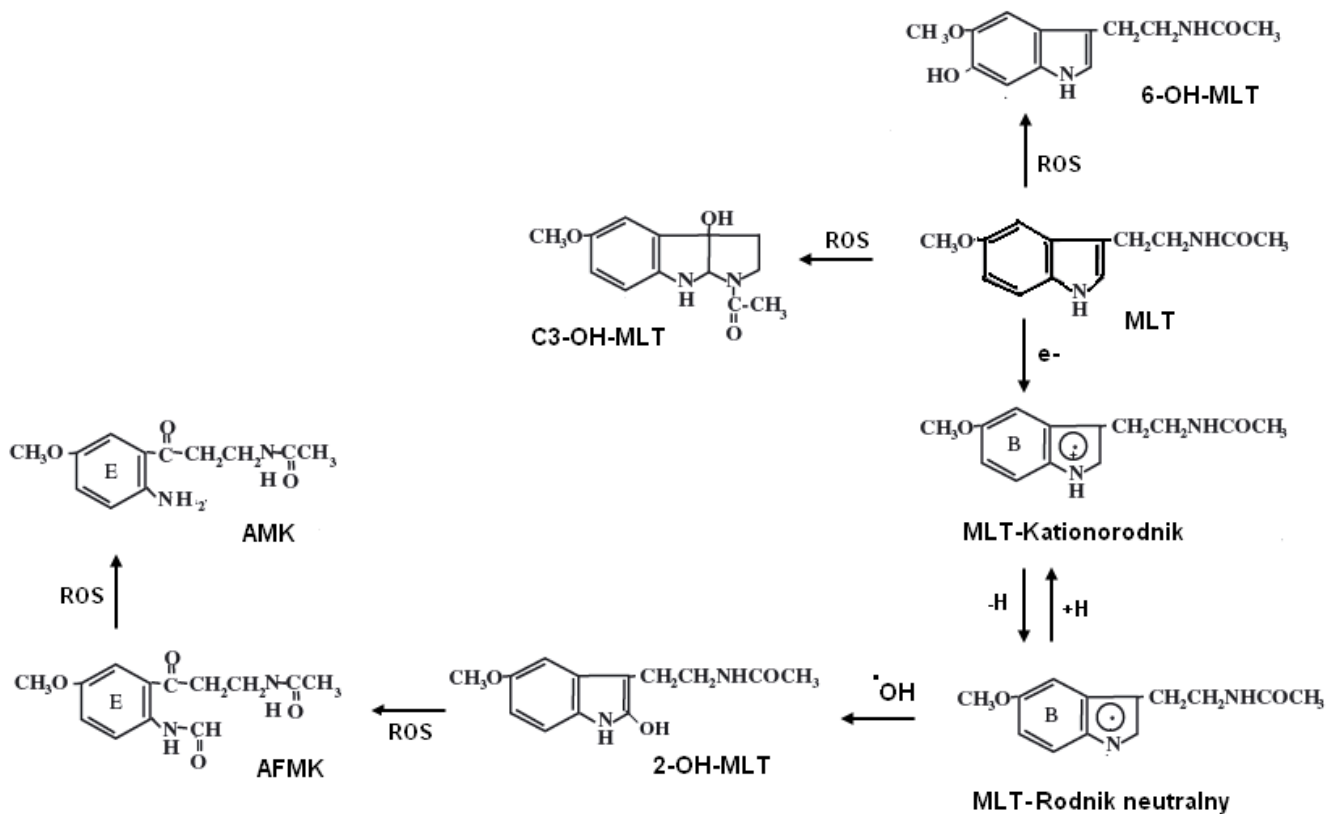
Tabela 5. Wpływ melatoniny na stymulację enzymów systemu redokсового komórki

Reagent	Wpływ MLT	Literatura
Peroksydaz a glutationu GPx	Zwiększa aktywność	[57]
Reduktaza glutationu (GRd)	Zwiększa aktywność	[58]
Dehydrogen aza glukozo-6- fosfatu (G6PD)	Zwiększa aktywność	[59]
Syntaza NO (NOS)	Hamowanie aktywności	[60]
Dysmutaza ponadtlenko wa (SOD)	Stymuluje mRNA	[61]
Katalaza (CAT)	Aktywuje	[62]

Radioochronny wpływ MLT

Rodzaj komórek lub gatunek zwierzęcia	Rodzaj i dawka promieniowania	Ilość podania napromieniowaniem	MLT i czas przed	Metoda oceny efektu radioochronnego MLT	Literatura
Limfocyty krwi ludzkiej	γ , 1.5 Gy	0.5,1.0, 2.0	2.0 mM, preinkubacja 20 min	Aberacje chromosomów, redukcja zależna od ilości MLT, odpowiednio 0 31,48,62 %	[77]
Limfocyty krwi ludzkiej	γ , 1.5 Gy	0.5,1.0, 2.0	2.0 mM, preinkubacja 20 min	Częstość formowania mikrojąder, obniżenie zależne od ilości MLT, odpowiednio 0 36,50,64 %	[78]
Komórki HeLa S3	γ , 0.5 Gy	0.01	0.01 mM, 30 min preinkubacji	Wiązanie do DNA NF- κ B, obniżenie o 30% ekspresji	[79]
Myszy CD2-F1	8.15 Gy	250 mg/kg wagi ciała;	1 godz.	Procent zwierząt , który przeżył 30 po napromieniowaniu: - MLT- 45 %, + MLT - 85%	[80]
Myszy ND4	Swiss 9.5 Gy	1.01 mM/kg wagi ciała;		Procent zwierząt , który przeżył 30 po napromieniowaniu: - MLT- 0 %, + MLT - 43%	[81]

MLT jako nietypowy antyoksydant



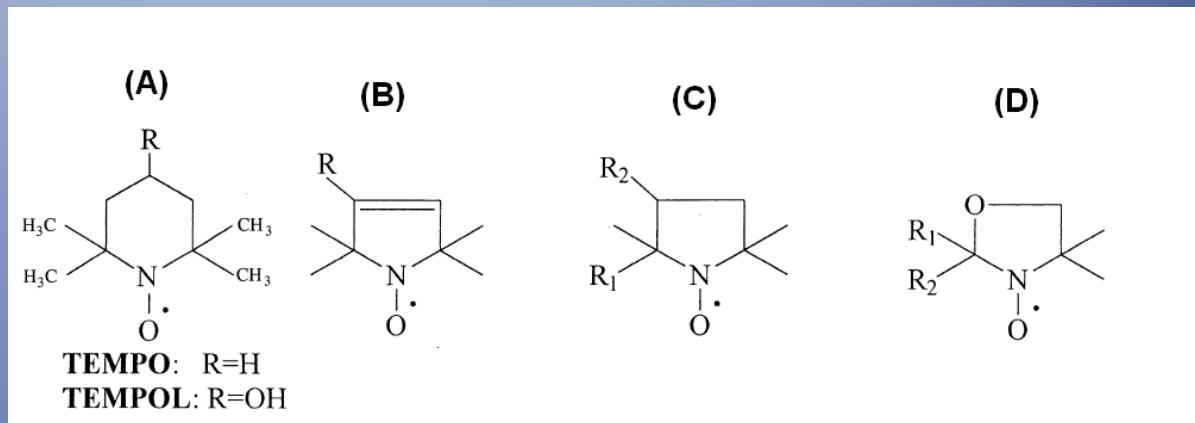
Produkty utleniania MLT.

ROS: - reaktywne formy tlenu,
 AMK - N-acetyl-5-metoksykynuramina,
 AFMK - N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-metoksykynuramina
 C3-OH-MLT- cykliczna 3-OH-MLT.
 6-OH-MLT,
 2-OH-MLT

Określanie stanu redokсового środowiska.

Odwracalne układy redokсовые

Metoda EPR w badaniach reakcji transferu elektronów

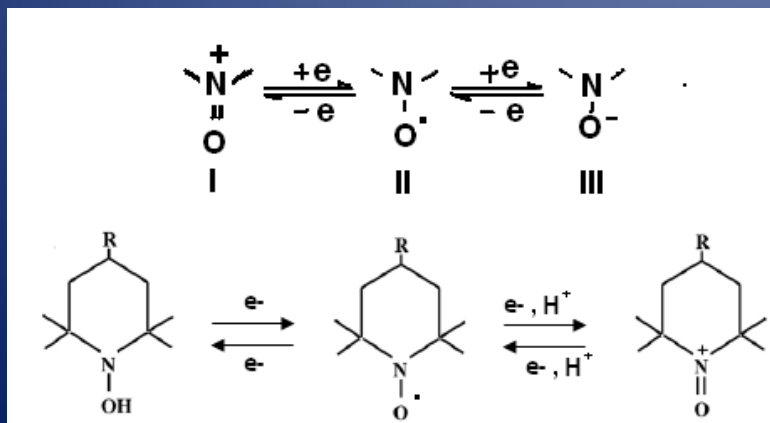


Struktury typowych wolnych rodników nitroksylowych (NFR).

(A) piperydyny, (B) pyroliny, (C) pyrolidyny, (D) oksazolidyny.

R, R₁, R₂ oznaczają podstawniki.

TEMPO- 2,2,6,6-tetrametylopiperydno-1-oksyl, TEMPOL- 4-hydroksy- 2,2,6,6-tetrametylopiperydno-1-oksyl



Podstawowe reakcje redokсовые wolnych rodników nitroksylowych (NFR). Rodnik (II) jest utleniany do kationu oksoamoniowego (I) lub redukowany do hydroksylaminy (III).

Dysproporcjonacja NFR na hydroksylamine i jon oksoamoniowy także powoduje utratę paramagnetyzmu przez NFR

Sondowanie stanu redokсового komórki

Nitroksyd	Potencjał redokсовy (mV/vrs. NHE)
Tempo	722
Tempol	810
Tempamina	826
Tempon	913

Wartości potencjałów redokсовych NFR.

$$E_0 = E'_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\sum_i k_i [Ox_i]^{a_i}}{\sum_i k_i [Red_j]^{a_j}}$$



Kinetyczny potencjał redokсовy

EPR (ESR) widma izotropowe. NFR w medium izotropowym

$$\hat{H}_S = \mu_B g \hat{S}_z B + \sum_i A_i \hat{I}_i \cdot \hat{S}$$

reguły wyboru – $\Delta m_s = \pm 1$, $\Delta m_{Ii} = 0$ dla wszystkich i)

wartości energii przejść

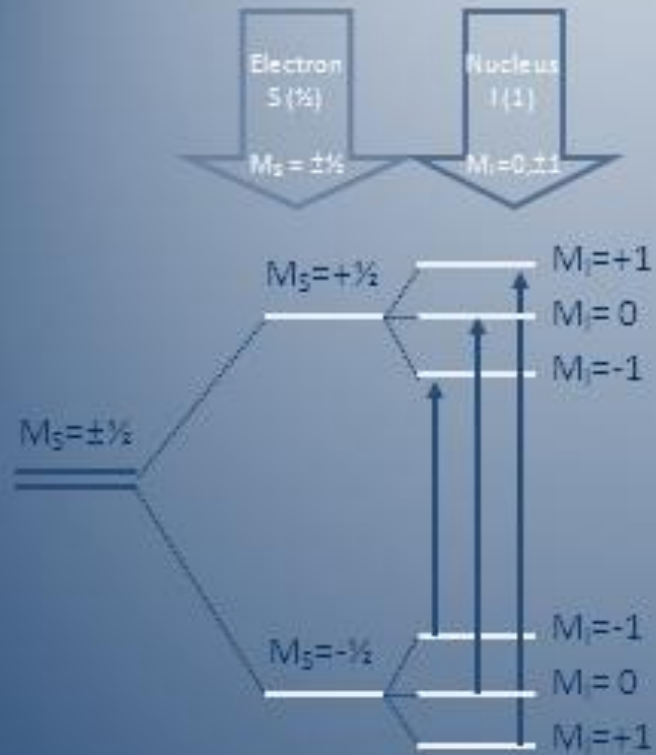
$$E(m_s = 1/2, m_{Ii}) - E(m_s = -1/2, m_{Ii}) = h\nu$$

wartości pól rezonansowych B

$$B_0 = \frac{h\nu}{g\mu_B}$$

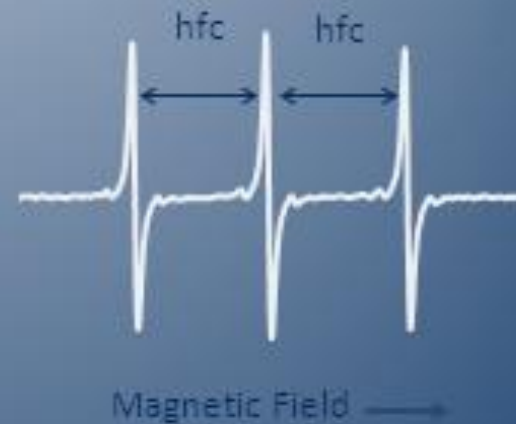
$$B = B_0 - \sum_i a_i m_{Ii}$$

Hyperfine Coupling

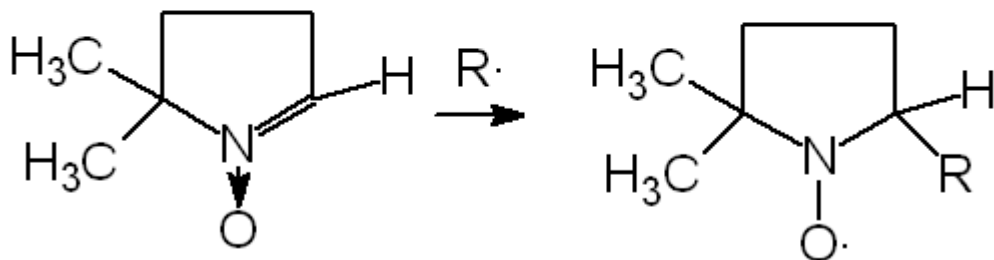
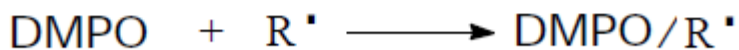


Selection Rule
 $\Delta M_S = \pm 1; \Delta M_I = 0$

$S = 1/2; I = 1$
 Triplet



Technika ESR-ST



Rys. Struktura DMPO i adduktu DMPO/R:

Podstawą identyfikacji widma ESR jest symulacja w oparciu o dobrze określone stałe oddziaływania nadsubtelnego, znajomość chemii środowiska i zachowania adduktu.

Addukt spinowy	a_N/G	a_H/G
DMPO/OH	14.9	14.9
DMPO/•OOH	14.3	11.7 1.3
DMPO/GS•	15.3	16.2
DMPO/•CH3	16.4	23.4
DMPO/H• (e•aq)	16.7	22.4 (2 H)

Wartości stałych oddziaływania nadsubtelnego dla typowych adduktów DMPO/R•.

Przykład

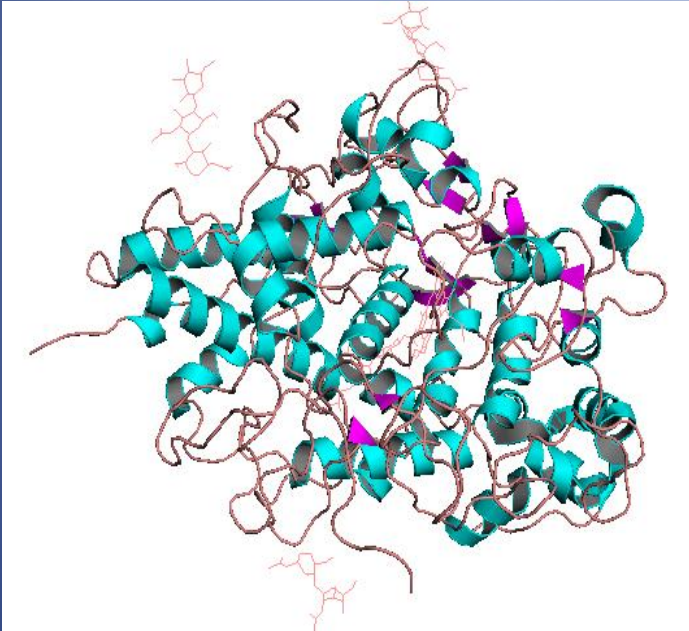


**Widmo ESR adduktu
DMPO/cysteina; [DMPO] = 50 mM.**

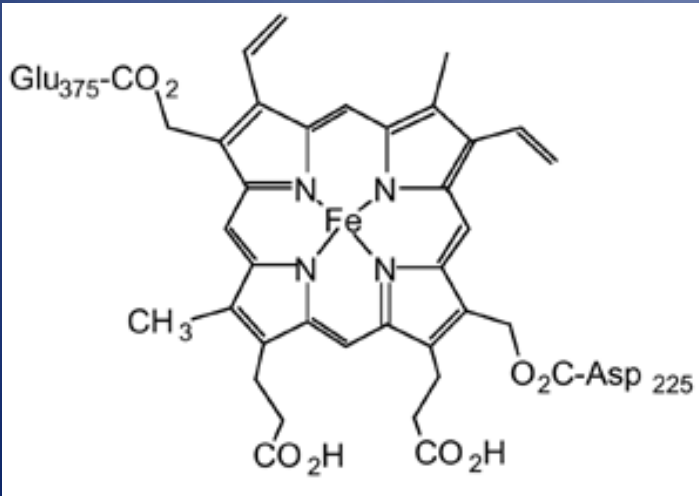
Wielostanowe autonomiczne systemy redoks

PEROKSYDAZY
TYROZYNAZA

Peroksydazy



Molekularna struktura LPO (EC1.11.1.7). LPO zawiera pojedynczy łańcuch polipeptydowy (595 reszt aminokwasowych), który nadaje enzymowi owalny kształt. Struktura zawiera 20 alfa helis o zróżnicowanej długości i specyficzną dla LPO helisę, H(2a), oraz dwa krótkie antyrównoległe beta-strands. [6]. W stabilizacji LPO bierze także udział jon Ca

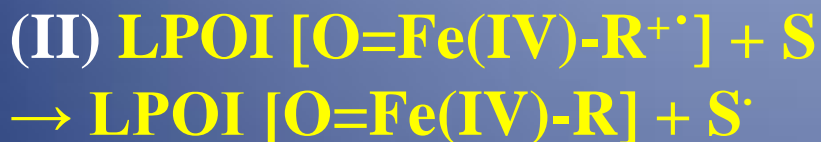


Hem b -grupa prostetyczna LPO. Hem związany jest z częścią białkowej enzymu wiązaniami estrowymi pomiędzy grupa metylową a aminokwasami Glu₃₇₅ i Asp₂₂₅. Typ wiązania jest wspólny dla MPO, LPO

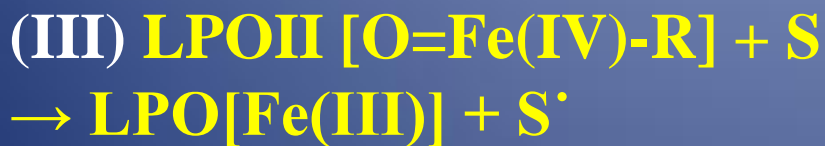
Klasyczny cykl reakcji peroksydazy



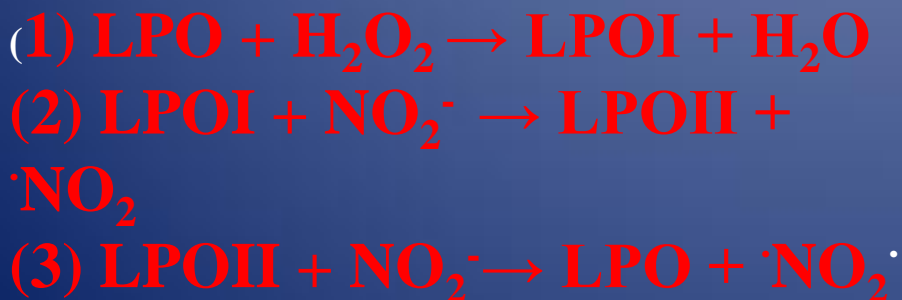
Rys.3A. I. Etap aktywacji natywnego enzymu przez H_2O_2 . LPO przechodzi w tzw. formę I (związek I, LPOI). Transfer dwu elektronów, powstaje $Fe(IV)=O$ (kompleks perferylowy i rodnik $R^{+\cdot}$. $R^{+\cdot}$ jest umiejscowiony na pierścieniu porfirynowym $R^{+\cdot} = \pi^{+\cdot}$ lub cząsteczce białka $R^{+\cdot} = aa^{+\cdot}$).



Rys3B. LPOI utlenia jednoelektronowo substrat S, powstaje kompleks II (LPOII) oraz rodnik substratu S^{\cdot} .

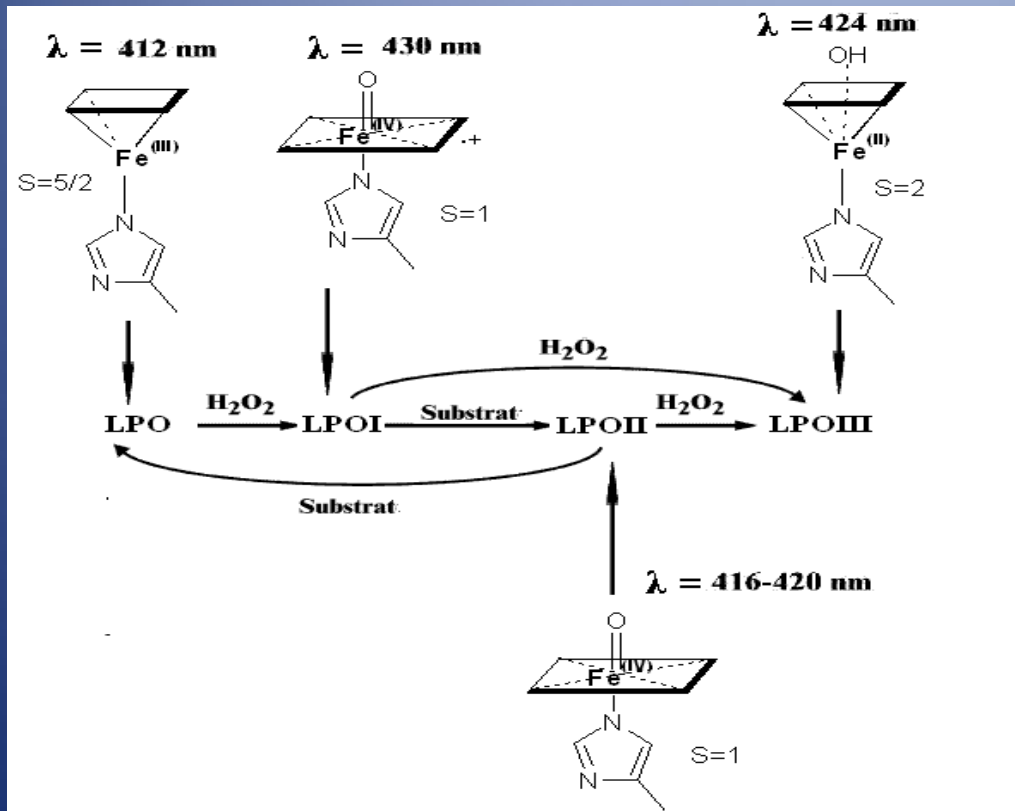


Rys 3.C. LPOII jest redukowany substratem S, odtwarza się LPO i powstaje rodnik S^{\cdot} .



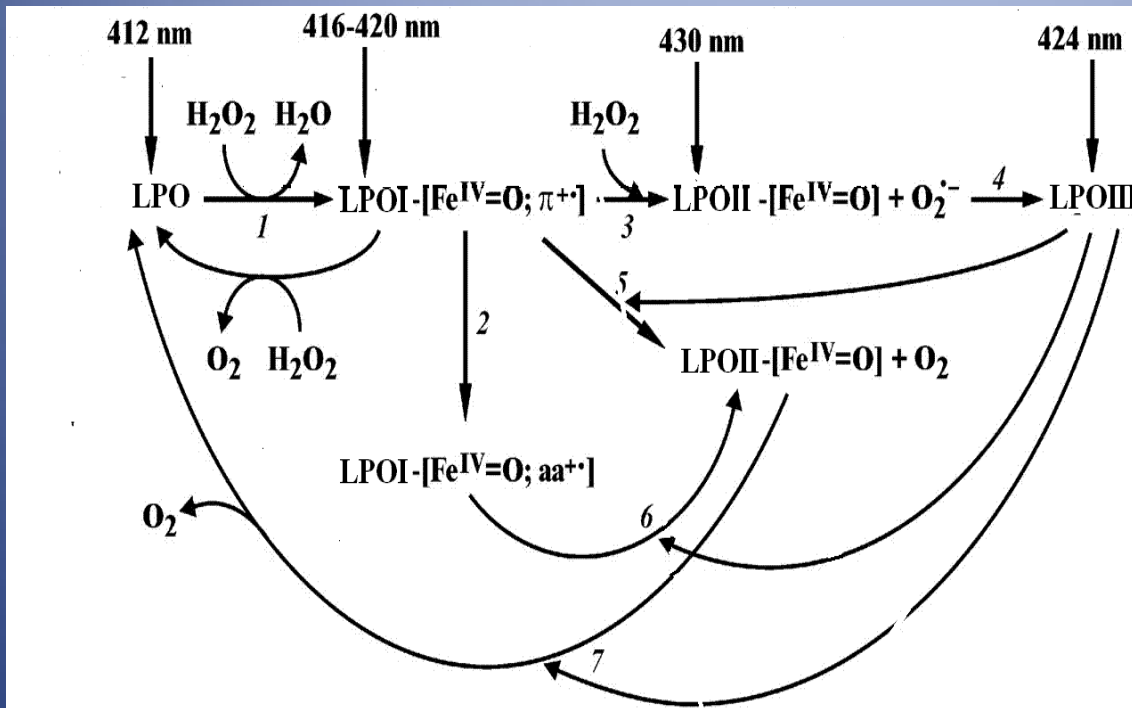
Rys. 3D. Cykl kinetyczny LPO, gdy substratem jest NO_2^- . Powstaje reaktywny rodnik $\cdot NO_2$.

Układ wielostanowy – stany można przygotować i śledzić ich oddziaływanie indywidualnie



Cykl reakcyjny Per z donorem elektronów H_2A . Pokazano formy enzymu (związki) ich geometrię oraz stany spinowe Fe. Fe tworzy wiązanie z N-His. W obecności nadmiaru H_2O_2 powstaje też bezpośrednio tzw. . kompleks III (LPOIII), w którym Fe ma spin $S=2$. Zaznaczono maksima absorpcji poszczególnych form LPO.

Peroksydaza-pełny cykl



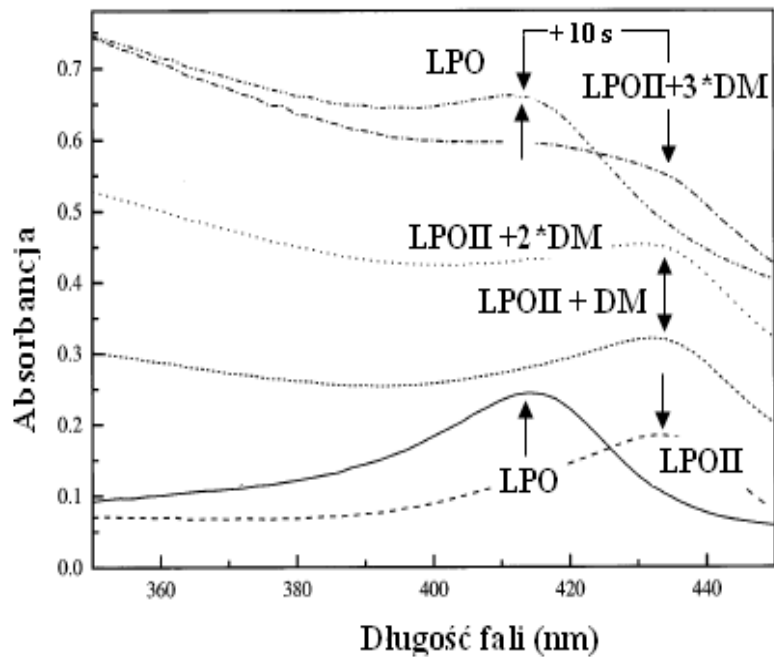
Rys3E. Pełny cykl katalityczny Per. Uwzględniający katalazową aktywność LPO.

Zaznaczono maksima absorpcji poszczególnych związków LPO oraz możliwe przejścia pomiędzy nimi.

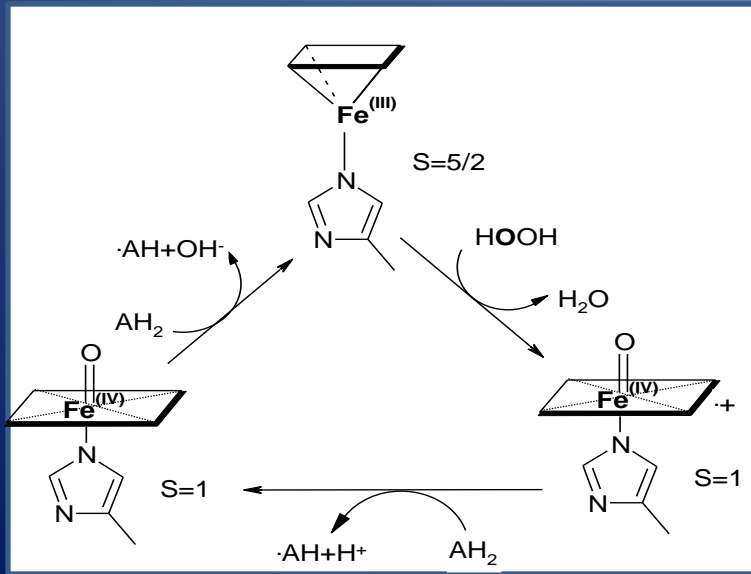
1. Generacja LPOI;

2. Konwersja LPOI → LPOII.

System LPO/NO2/D-Mel

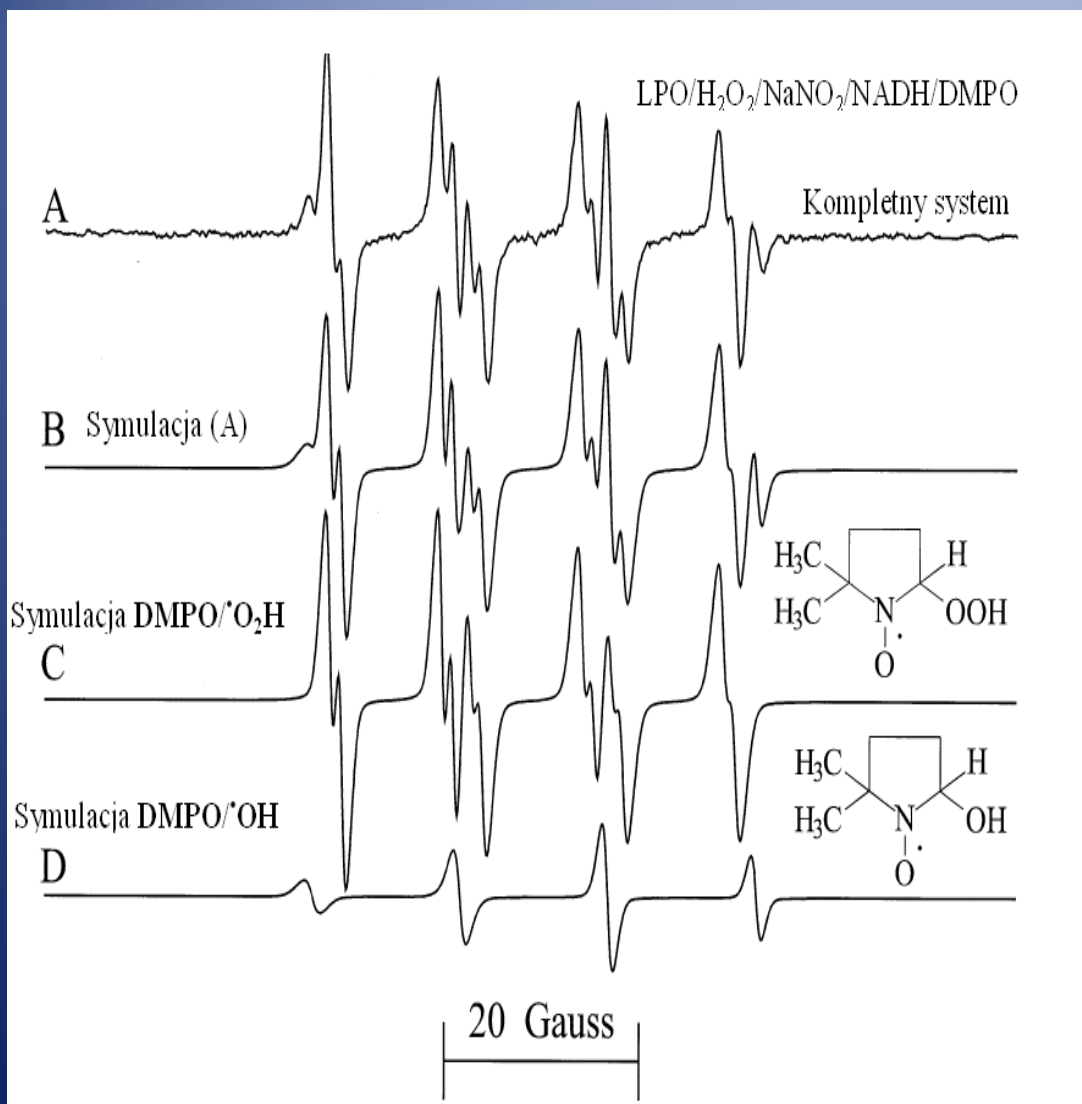


Reakcja LPOII z melaniną. Do natywnego LPO (2,16 μM) dodano H₂O₂ (23 μM) i powstało LPOII, widmo absorpcji uległo przesunięciu, dodanie kolejnych porcji DOPA-Mel (DM) spowodowało wzrost poziomu absorpcji. LPOII po około 10 s powraca do formy natywnej i cykl się zamyka. Podobne eksperymenty wykonano z LPOIII; LPOI, jest formą krótkożyciową i wymaga w badaniu metod relaksacyjnych

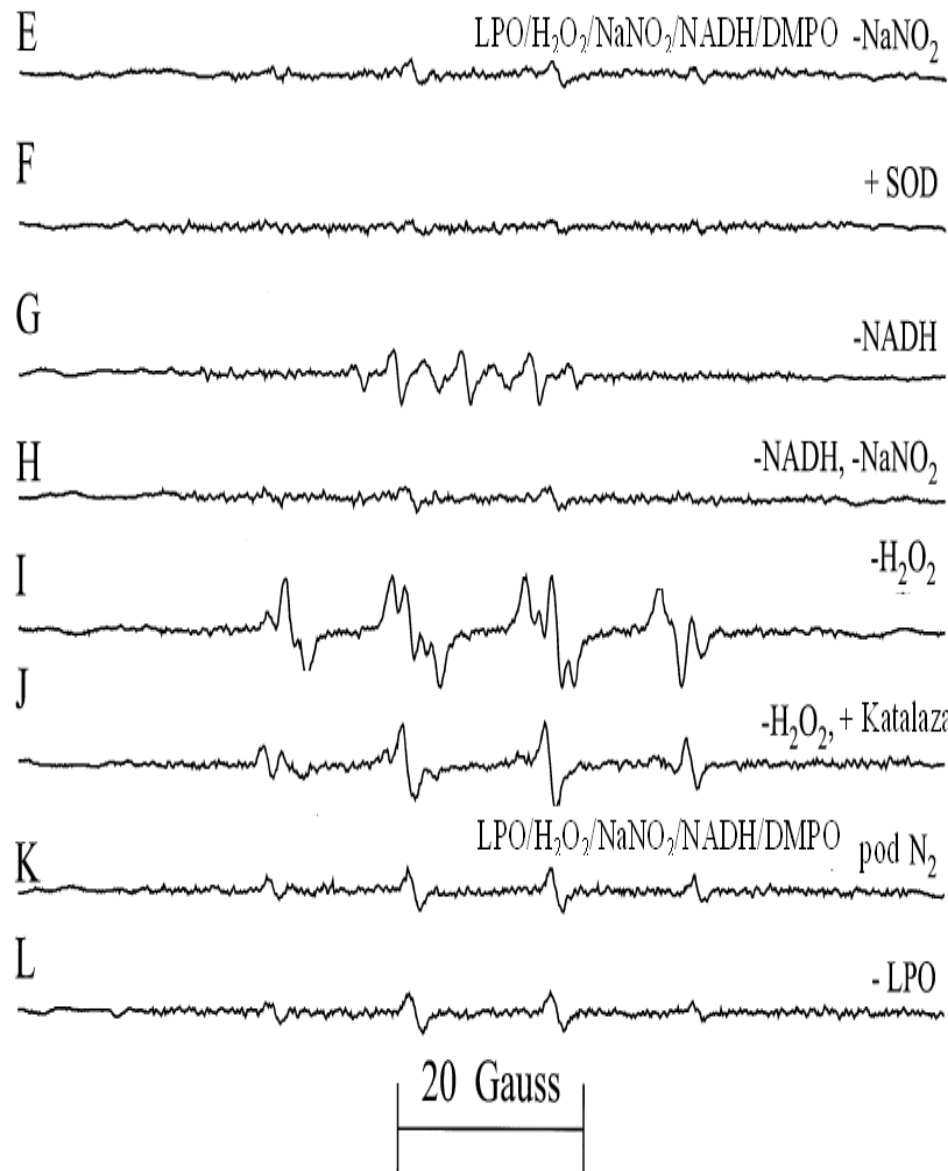


Cykl reakcyjny Per z donorem elektronów H₂A. Pokazano formy enzymu (związki) ich geometrię oraz stany spinowe Fe. Fe tworzy wiązanie z N-His

Układ LPO/H₂O₂/NaNO₂/NADH. Metoda redukcji złożoności ESR-ST



- A. Widmo kompletnego systemu,
- B. Symulacja (A) z użyciem następujących parametrów HFS (w Gs), DMPO/•O₂H - 14.2 (N), 11.3 (H), 1.2 (H); DMPO/•OH 14.9 (N), 14.9 (H);
- C. Symulacja indywidualna DMPO/•O₂H,
- D. Symulacja DMPO/•OH



Kompletny system był modyfikowany poprzez dodawanie i odejmowanie różnych składników:

F. A+[SOD]= 100 µg/mL;

G. A-NADH, obserwowany jest słaby addukt DMPOX (a_N 5 7.3 Gs, $a_H\gamma=5$ 4.1 Gs(2H));

H. A- (NADH + NaNO₂);

I. A- H₂O₂; sygnał jak (A) tylko słaby

J. I + [Cat]=200 µg/MI;

K.A+ N₂;

L. A-LPO.

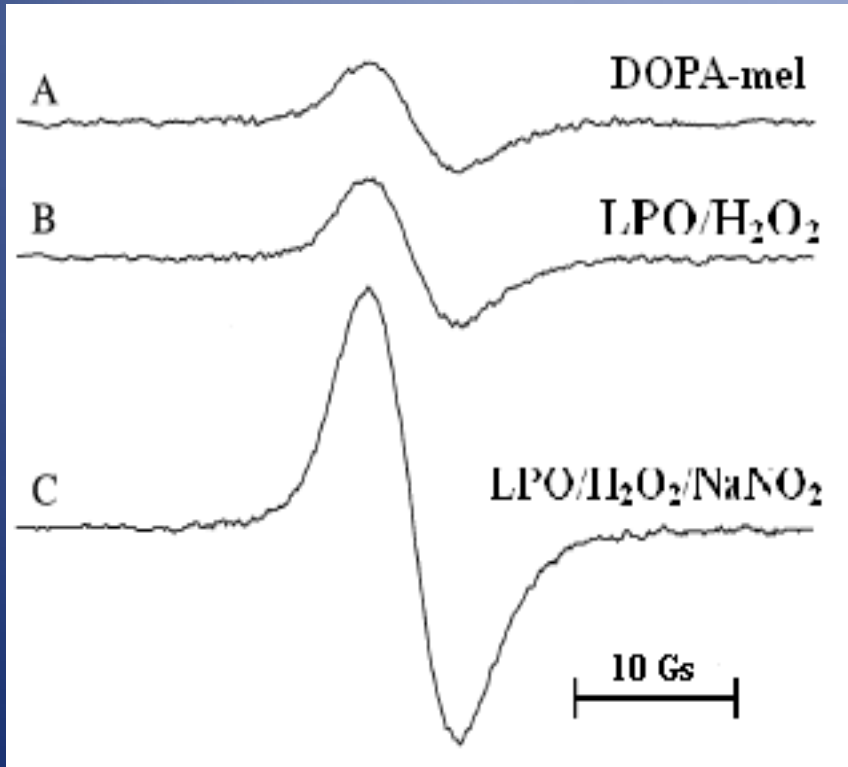
Mechanizm utleniania NADH przez system LPO/H₂O₂/NaNO₂



Rys 6. Mechanizm utleniania NADH przez rodniki NO₂ generowane w systemie LPO/H₂O₂/NaNO₂. Mechanizm jest zgodny z wartościami potencjałów redokswych uczestniczących w przemianach reagentów.
 $E_0^7(\bullet NO_2/NO_2) 1040 \text{ mV}$;
 $E_0^7(NAD^\bullet/NADH) = 282 \text{ mV}$;
 $E_0^7(NAD^+/NAD^\bullet) = -930 \text{ mV}$;
 $E_0^7(O_2/O_2^{\bullet-}) = -330 \text{ mV}$,
zatem są możliwe reakcje od (1) do(3)

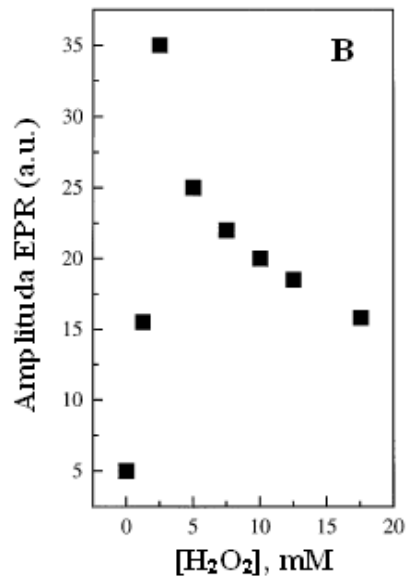
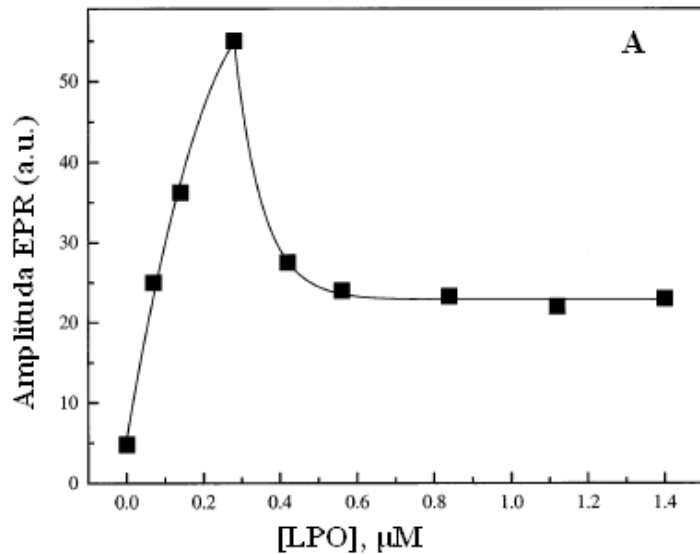
System LPO/NO₂/D-Mel

Zwiększenie przestrzennego zasięgu działania enzymu



Widma EPR DOPA-melaniny DM (1.1 mg/ml), pH=7.4(0.05M), odtleniony.. A. sama DM; B. DM+ LPO(0.57 μ M) +H₂O₂(5 mM), wzrost amplitudy sygnału EPR 30%; C. pełny system LPO/H₂O₂ + NaNO₂(20 mM). Parametry rejestracji sygnału: moc mikrofalowa 10 mW, amplituda modulacji 1.65 Gs, wzmacnienie 1.25 x10⁴, stała czasowa 0.245 s, przemieszczenie 4min/100 Gs. LPO była dodawana jako ostatnia. Sygnał EPR melaniny nie zmienia się pod wpływem dodania tylko H₂O₂, także NaNO₂

System LPO/NO₂/D-Mel



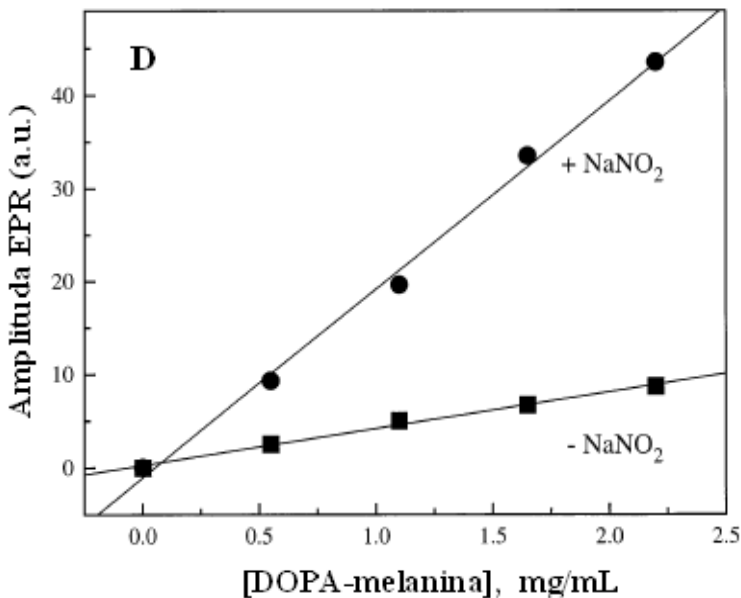
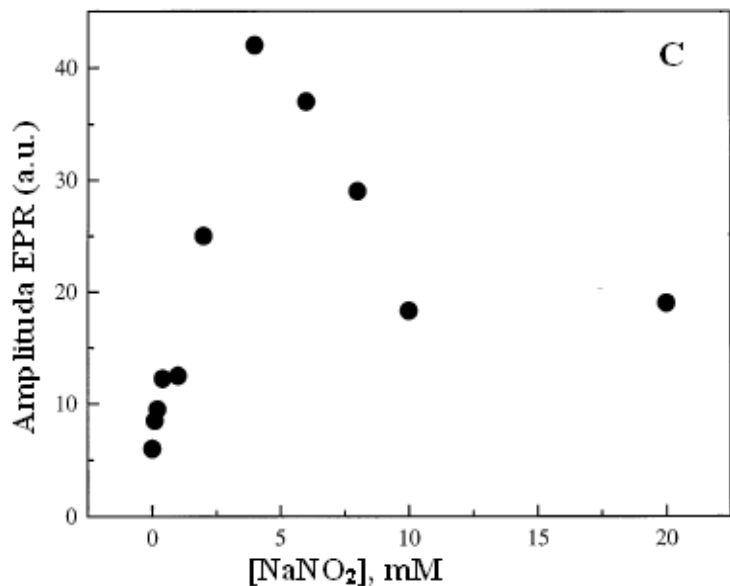
A. Utlenianie DM przez system LPO/H₂O₂/NaNO₂. pH=7.4 [NaNO₂]= 20 mM [H₂O₂]=6 mM, [DM] ≈ 0.55 mg/mL [NaNO₂]=20 mM, [LPO] - zmienne, Sygnały EPR mierzone po upływie 3 min. po dodania LPO. Wzrost amplitudy sygnału EPR do 11x

B. Utlenianie DM przez system LPO/H₂O₂/NaNO₂. pH=7.4; [NaNO₂]= 20 mM, [DM] ≈ 1.1 mg/mL, [NaNO₂]=20 mM, [LPO] = 0.07 μM M, [H₂O₂] = zmienne. Sygnały EPR mierzone po upływie 3 min. po dodaniu LPO. Wzrost amplitudy sygnału EPR do 7x

System LPO/NO₂/D-Mel

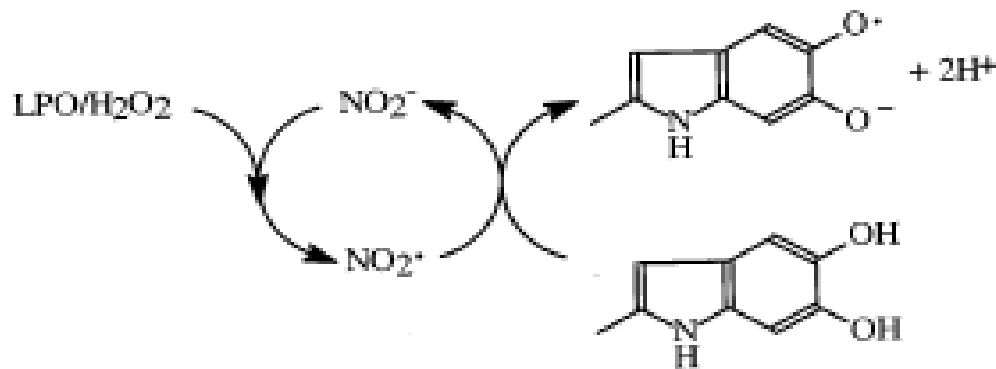
C.. Utlenianie DM przez system LPO/H₂O₂/NaNO₂. pH=7.4, [DM] ≈ 1.1 mg/mL, [LPO] = 0.38 μM, [H₂O₂] = 6 mM; [NaNO₂] = zmienne. Sygnały EPR mierzono po upływie 2 min. po dodaniu LPO. Dla niskich stężeń NaNO₂, do 5 mM, amplituda EPR DM zależy liniowo do stężenia azotynu. Wzrost amplitudy sygnału EPR do 7x

Rys.7II.D. Utlenianie DM przez system LPO/H₂O₂/NaNO₂. pH=7.4, ; [NaNO₂] = 20 mM, [LPO] = 0.57 μM, [H₂O₂] = 6.3 mM, [DM] - zmienne. **Obserwuje się liniowy wzrost amplitudy sygnału EPR melaniny ze wzrostem jej koncentracji, co pokazuje że ilość generowanych rodników jest proporcjonalna do liczby centrów reakcji.**



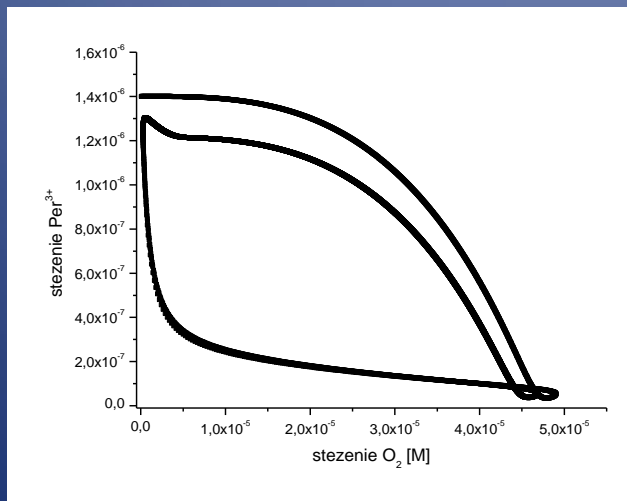
System LPO/NO₂/D-Mel

Mechanizm generacji rodników melaninowych przez system LPO/H₂O₂/NaNO₂ z uwzględnieniem reakcji dysproporcjonacji. DHI- 5,6 dwuhydroksyindol, DHICA- kwas 5,6 dwuhydroksy, 2- karboksylowy

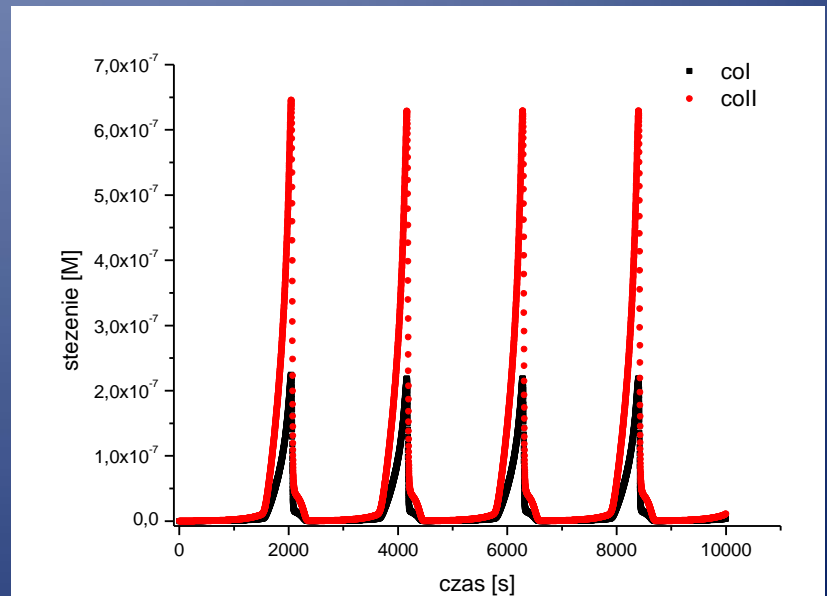
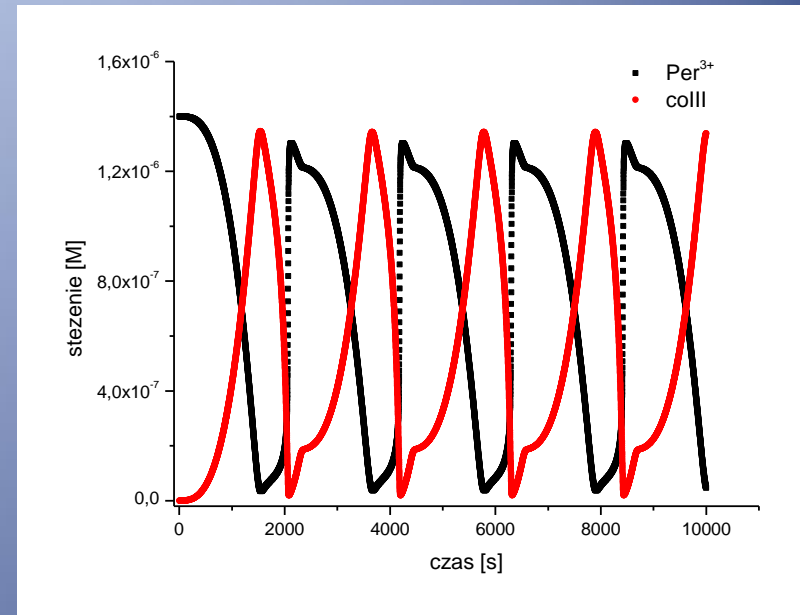


	Reakcja	Stała szybkości
1	$\text{NADH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$	3,0 1/Ms
2	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Per}^{3+} \rightarrow \text{coI}$	$1,8 \cdot 10^6$ 1/Ms
3	$\text{coI} + \text{ArH} \rightarrow \text{coII} + \text{Ar}'$	$1,5 \cdot 10^4$ 1/Ms
4	$\text{coII} + \text{ArH} \rightarrow \text{Per}^{3+} + \text{Ar}'$	$5,2 \cdot 10^3$ 1/Ms
5	$\text{NAD}' + \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{O}_2^-$	$2,0 \cdot 10^6$ 1/Ms
6	$\text{O}_2^- + \text{Per}^{3+} \rightarrow \text{coIII}$	$1,7 \cdot 10^6$ 1/Ms
7	$2^* \text{O}_2^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	$2,0 \cdot 10^5$ 1/Ms
8	$\text{coIII} + \text{NAD}' \rightarrow \text{coI} + \text{NAD}^+$	$4,0 \cdot 10^6$ 1/Ms
9	$2^* \text{NAD}' \rightarrow \text{NAD}_2$	$6,0 \cdot 10^3$ 1/Ms
10	$\text{Per}^{3+} + \text{NAD}' \rightarrow \text{Per}^{2+} + \text{NAD}^+$	$1,8 \cdot 10^4$ 1/Ms
11	$\text{Per}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{coIII}$	$1,0 \cdot 10^6$ 1/Ms
12	$\rightarrow \text{NADH}$	$7,2 \cdot 10^{-8}$ 1/s
13	$= \text{O}_2$ (próbka)	$7,2 \cdot 10^{-8}$ 1/s
14	$\text{Ar}' + \text{NADH} \rightarrow \text{ArH} + \text{NAD}'$	$7 \cdot 10^8$ 1/Ms

Warunki początkowe
 $[\text{ArH}] = 9.999997509 \cdot 10^{-5}$ M
 $[\text{Per}^{3+}] = 1.400000316 \cdot 10^{-6}$ M
 Pozostałe stężenia równe były zero



Peroksydaza jako wzorcowy dynamiczny system redoksywny



Koniec części I
Dziękuję bardzo za uwagę