**Oksydacyjna dekarboksylacja pirogronianu**

Kwas pirogronowy powstaje głównie w procesie glikolizy i deaminacji alaniny. W fizjologicznym pH występuje w postaci zdysocjowanej, jako anion zwany pirogronianem i ulega wielokierunkowym przemianom.

Większość pirogronianu jest przekształcana w macierzy mitochondrialnej do acetylo~S-CoA, w procesie oksydacyjnej dekarboksylacji, katalizowanej przez wieloenzymatyczny kompleks, określany mianem dehydrogenazy pirogronianowej. W skład tego kompleksu wchodzi *dekarboksylaza pirogronianowa* (E1), *transacetylaza dihydrolipoilowa* (E2) oraz *dehydrogenaza dihydrolipoilowa* (E3). Koenzymem *dekarboksylazy pirogronianowej* jest pirofosforan tiaminy (TPP), koenzymem *transacetylazy dihydrolipoilowej* jest liponian, a koenzymem *dehydrogenazy dihydrolipoilowej* – dinukleotyd flawinoadeninowy w formie utlenionej (FAD), który przekazuje wodory pobrane z liponianu na utleniony dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (NAD+).

W pierwszym etapie pirogronian przyłącza się do pirofosforanu tiaminy z równoczesną dekarboksylacją (odłączeniem CO2). Powstały aldehyd octowy, połączony z pierścieniem tiazolowym pirofosforanu tiaminy, ulega w drugim etapie oderwaniu z równoczesnym utlenieniem ( odłączeniem pary wodorów). Reszta kwasu octowego przyłącza się poprzez wiązanie wysokoenergetyczne (tioestrowe) do atomu siarki liponianu. W trzecim etapie reszta kwasu octowego ulega przeniesieniu na koenzym A. Powstajeacetylo~S-CoA i zredukowany liponian. Acetylo~S-CoA utlenia się w cyklu kwasu cytrynowego (Krebsa) do CO2 i H2O. Liponian ulega utlenieniu przy udziale *dehydrogenazy dihydrolipoilowej,* która przekazuje atomy wodoru pobrane z liponianu na FAD. Zredukowany FAD (FADH2) przekazuje atom wodoru i elektron na NAD+. Powstaje NADH+H+, który utlenia się dalej w łańcuchu oddechowym.

Przebieg oksydacyjnej dekarboksylacji pirogronianu przedstawia w sposób uproszczony poniższy schemat:



Ćwiczenie polega na wykazaniu zużycia pirogronianu dodanego do homogenatu wątroby szczura. Umożliwia prześledzenie zachodzących reakcji oksydoredukcyjnych oraz wskazuje na możliwość hamowania tego procesu przez arsenian (III). Akceptorem elektronów jest tlen bądź sztuczny akceptor – heksacyjanożelazian (III) potasu – K3[Fe(CN)6]. Związek ten bezpośrednio utlenia aldehyd octowy (połączony z pierścieniem tiazolowym pirofosforanu tiaminy) do kwasu octowego.



Reakcję przerywamy przez dodanie kwasu trichlorooctowego (TCA). Zużycie pirogronianu oceniamy przy pomocy reakcji barwnej. W probówkach zawierających heksacyjanożelazian (III) potasu obserwujemy dodatkowo zmianę zabarwienia roztworu (odbarwienie) w następstwie redukcji tego związku (o barwie żółtej) do bezbarwnego heksacyjanożelazianu (II) potasu K4[Fe(CN)6]. Arsenian (III) (AsO2-) jest typowym inhibitorem reakcji, w których biorą udział grupy –SH. W warunkach naszego doświadczenia hamuje on przebieg reakcji katalizowanej przez *dehydrogenazę dihydrolipoilową*.

Mechanizm blokowania grup –SH przez arsenian (III) przedstawia poniższe równanie:



Obecność heksacyjanożelazianu (III) potasu, jako sztucznego akceptora elektronów sprawia, że etap hamowany przez arsenian (III) zostaje pominięty. W tych warunkach arsenian nie hamuje zużycia pirogronianu.

Zawartość pirogronianu w układzie reagującym oceniamy przy pomocy reakcji z

2,4-dinitrofenylohydrazyną. Wszystkie α-ketokwasy, a więc i pirogronian, reagują z

2,4-dinitrofenylohydrazyną tworząc odpowiednie fenylohydrazony. Związki te rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych i można je wyekstrahować (np. octanem etylu). Po dodaniu octanu etylu i energicznym wytrząsaniu mieszanina rozwarstwia się. W fazie wodnej (dolna warstwa) pozostaje woda oraz sole znajdujące się w wyciągach tkankowych. W fazie organicznej (górna warstwa) gromadzą się fenylohydrazony i nadmiar wodnej fenylohydrazyny. Fenylohydrazony i fenylohydrazynę można łatwo rozdzielić. Różnią się one bowiem rozpuszczalnością w roztworze węglanu sodu. Po usunięciu fazy wodnej, do fazy organicznej dodajemy roztwór Na2CO3. Podczas wytrząsania fenylohydrazony przechodzą do fazy wodnej, zawierającej węglan sodu (dolna warstwa). 2,4-dinitrofenylohydrazon pirogronianu po alkalizacji roztworem NaOH zmienia zabarwienie z żółtego na brunatno-czerwone (jak wszystkie aromatyczne związki nitrowe). Natężenie barwy jast proporcjonalne do stężenia pirogronianu w układzie reagującym.

**Zagadnienia do przygotowania:**

1. Reakcje, w których powstaje pirogronian
2. Przebieg reakcji oksydacyjnej dekarboksylacji pirogronianu

**Materiał i odczynniki:**

Homogenat wątroby szczura

***Cel ćwiczenia*:**obserwacja przebiegu reakcji oksydacyjnej dekarboksylacji pirogronianu

# ***Wykonanie***

**1. Inkubacja**

1. Do 6 ponumerowanych probówek (1-6) dodać odpowiednie ilości odczynników, według Tabeli I.
2. Do probówek kontrolnych (1 i 4) należy dodać po 4ml 10% kwasu trichlorooctowego (TCA).
3. Do wszystkich probówek dodać po 2ml homogenatu wątroby szczura i inkubować w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 45 min.
4. Co 3-4 minuty zawartość probówek mieszać przez wstrząśnięcie.
5. Po zakończeniu inkubacji do probówek nr: 2, 3, 5 i 6 dodać po 4ml TCA.
6. Zawartość wszystkich probówek przesączyć przez małe sączki z bibuły filtracyjnej do kolejnego szeregu krótkich probówek.
7. Probówki z przesączami pozostawić do zakończenia ćwiczeń.
8. **Wykazanie ubytku pirogronianu**
9. Do 6 ponumerowanych probówek (jak w Tabeli II) odmierzyć po 0,5ml odpowiednich przesączów.
10. Do każdego przesączu dodać po 0,5ml roztworu 2,4-dinitrofenylohydrazyny.
11. Pozostawić w temperaturze pokojowej przez 15 minut.
12. Dodać po 4ml octanu etylu i każdą z probówek wstrząsać energicznie przez 1 minutę lub przedmuchiwać przy pomocy odpowiedniej pipety.
13. Odpipetować ostrożnie dolną warstwę wodną, przy użyciu odpowiedniej pipety.
14. Do pozostałości odmierzyć po 3ml 10% roztworu Na2CO3 i znów wytrząsać energicznie probówki przez 1 minutę.
15. Z dolnej warstwy wodnej pobrać pipetą po 1,5ml i przenieść do nowego szeregu identycznie ponumerowanych probówek.
16. Do każdej z nich dodać po 1,5ml 1,5M roztworu NaOH, wymieszać.
17. Na podstawie różnic zabarwienia ocenić, w których probówkach nastąpiło zużycie pirogronianu.
18. Porównać zużycie heksacyjanożelazianu (III) potasu w probówkach 4, 5 i 6.

**Tabela 1**

**Próby bez heksacyjanożelazianu potasu**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | **Zawartość** | | | | |
| **Próba** | | **0,2M bufor fosf. pH 7,2** | **0,05M pirogronian** | **0,1M heksacyjanożelazian** | **0,02M arsenian** | **H2O redest.** |
| 1 | **Kontrolna (enzymy zdenaturowane)** | 0,2 ml | 0,1 ml | - | - | 0,2 ml |
| 2 | **Właściwa** | 0,2 ml | 0,1 ml | - | - | 0,2 ml |
| 3 | **Właściwa z inhibitorem** | 0,2 ml | 0,1 ml | - | 0,1 ml | 0,1 ml |

**Próby z heksacyjanożelazianem potasu**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | **Zawartość** | | | | |
| **Próba** | | **0,2M bufor fosf. pH 7,2** | **0,05M pirogronian** | **0,1M heksacyjanożelazian** | **0,02M arsenian** | **H2O redest.** |
| 4 | **Kontrolna (enzymy zdenaturowane)** | 0,2 ml | 0,1 ml | 0,1 ml | - | 0,1 ml |
| 5 | **Właściwa** | 0,2 ml | 0,1 ml | 0,1 ml | - | 0,1 ml |
| 6 | **Właściwa z inhibitorem** | 0,2 ml | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml | - |

1. **Analiza i interpretacja wyników**
2. W zeszycie narysować Tabelę II (wg poniższego wzoru).
3. Do tabeli wpisać wyniki. Formułując spostrzeżenia używać symboli: (+) – zużycie, (-) – brak zużycia.
4. Wyniki przedyskutować a wnioski wpisać do zeszytu.

**Tabela 2**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | **Próby z heksacyjanożelazianem**  **potasu** | | |
|  | **Próba kontrolna** | **Próba właściwa** | **Próba właściwa z inhibitorem** | **Próba kontrolna** | **Próba właściwa** | **Próba właściwa z inhibitorem** |
| **Nr próby** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| **Pirogronian** |  |  |  |  |  |  |
| **Heksacyjanożelazian** |  |  |  |  |  |  |

***Piśmiennictwo:***

1. Bańkowski E.: Biochemia, Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2004, rozdz. 4.
2. Cechowska-Pasko M, Galewska Z, Gogiel T, Pawlicka E, Romanowicz L, Sobolewski K, Wolańska M: Ćwiczenia z biochemii dla studentów Wydziału Lekarskiego i Oddziałów: Stomatologii, Pielęgniarstwa i Fizjoterapii Akademii Medycznej w Białymstoku. Pod redakcją prof. dr hab. Edwarda Bańkowskiego. Białystok, 2001.