

CAPITOLUL III

Metabolismul general. Bioenergetica.

Oxidarea biologică. Lanțul respirator și fosforilarea oxidativă

Metabolismul prezintă totalitatea transformărilor materiale și energetice ce asigură creșterea, dezvoltarea și supraviețuirea organismului. El este o activitate celulară cu destinație specială, determinată de interconexiunea sistemelor multienzimatice.

Metabolismul îndeplinește următoarele funcții: a) aprovizionarea celulelor cu energie chimică, eliberată în urma scindării substanțelor nutritive; b) transformarea moleculelor substanțelor nutritive în blocuri de construcție, utilizate de celulă la sinteza macromoleculelor proprii; c) sinteza și degradarea biomoleculelor necesare pentru îndeplinirea unor funcții specifice în celulă (pigmenți, hormoni, coenzime, mediatori etc.).

În procesul de oxidare a substanțelor se produce o anumită cantitate de energie liberă. O parte din aceasta se consumă pentru efectuarea unui anumit volum de lucru, restul se acumulează în compuși macroergici (ATP, etc.).

Sinteza ATP-ului constă dintr-un ansamblu de reacții în care energia eliberată la dehidrogenarea unui metabolit, a unui substrat energetic este utilizată imediat pentru fosforilarea ADP-ului în ATP. Procesul în ansamblu se numește fosforilare oxidativă, cuplată cu oxidarea de substrat.

Interacțiunea oxigenului cu hidrogenul are loc în câteva etape succesive în care atomii de hidrogen sau numai electronii lor sunt transportați pe sisteme redox cu afinități crescînde pentru echivalenții reducători ca în final aceștea să fie acceptați de către molecula de oxigen.

Ansamblul sistemelor redox (enzimelor care participă la transferul echivalenților reducători – protonii de hidrogen sau electronii de la coenzimele reduse pînă la oxigen) poartă denumirea de lanț respirator.

Energia liberă, ce devine disponibilă la trecerea electronilor prin lanțul respirator în direcția gradientului de potențial, este parțial utilizată pentru sinteza de ATP (La oxidarea NADH-ului se consumă 52,6 kcal ca și la sinteza a trei molecule de ATP). Lanțul respirator cuprinde trei puncte de fosforilare, adică trei puncte de cuplare a celor două procese: oxidativ și fosforilant.

TEMA 11

Noțiuni generale de metabolism. Căile generale de scindare a proteinelor, glucidelor și lipidelor. Noțiuni de bioenergetică. Oxidarea piruvatului și ciclul Krebs

Experiența 1. Determinarea activității dehidrogenazelor ciclului Krebs (izocitrat, α -cetoglutarat și succinatdehidrogenazelor) în ficat prin metoda neotetrazolică.

Principiul metodei. Dehidrogenazele ciclului acizilor tricarboxilici catalizează reacțiile de oxidare a substratelor respective prin dehidrogenare. În calitate de acceptor de hidrogen se folosește neotetrazolul care reducându-se se transformă în formazon colorat în roz. După intensitatea culorii se determină activitatea enzimelor.

Mod de lucru. Într-o eprubetă de centrifugare se introduc 0,25 ml de substrat respectiv, 0,5 ml soluție de neotetrazol, 0,1 ml soluție de NAD (în afară de eprubeta în care se determină activitatea succinatdehidrogenazei) și 0,5 ml omogenat hepatic. În eprubeta, în care se determină activitatea izocitratdehidrogenazei, se mai adaugă 0,1 ml $MgCl_2$. Eprubeta se agită și se incubează timp de 10 minute în baia de apă la 37°C.

După incubare, în fiecare eprubetă se adaugă câte 5 ml acetonă (pentru stoparea activității enzimatică). Eprubetele se astupă cu dopuri și se lasă la întuneric timp de o oră, apoi se centrifughează timp de 10 minute cu viteza de 1000 rotații/min. Centrifugatul se fotocolorimetrează la o lungime de undă de 525 nm (filtrul verde), cuva de 10 cm față de proba de control.

Notă. Se pregătesc 1-2 probe de control, care au același conținut ca și probele de experiență numai că în loc de omogenat se adaugă 0,5 ml soluție tampon. Calculele se fac după curba-etalon.

Importanța metodei. Determinarea activității enzimelor indicate prezintă informație prețioasă privind starea metabolismului țesutului respectiv.

Teme pentru autopregătire

1. Noțiuni generale de metabolism. Catabolismul și anabolismul. Căile metabolice centrale, ciclice și specifice.
2. Metabolismul intermediar. Metodele de studiere.

3. Noțiuni de energie liberă standard. Compuși macroergici - structura chimică și rolul lor. Ciclul ATP-ului.

4. Caracteristica stării energetice a celulei. Indicii ce o caracterizează. Reglarea metabolismului celular.

5. Decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic – enzimele, cofactorii, reglarea.

6. Ciclul Krebs – reacțiile parțiale. Esența biologică a ciclului Krebs, reglarea lui. Noțiuni de fosforilare la nivel de substrat. Stoichiometria ciclului Krebs.

7. Reacțiile anaplerotice (reacțiile care furnizează produse intermediare ale ciclului acizilor tricarboxilici).

Situații de problemă

1. Numiți toate enzimele ciclului Krebs și arătați tipurile reacțiilor catalizate de ele. Unde este localizat acest ciclu în celulă?

2. Enumerați componentele complexului piruvatdehidrogenazic. Scrieți formulele vitaminelor care intră în componența acestui complex. Arătați schematic procesul de formare a acetil-CoA.

3. De ce ciclul acizilor tricarboxilici este un proces aerob?

4. Ce cantitate de energie se eliberează la descompunerea unui mol de ATP în condiții standard? Care este durata vieții moleculei de ATP în celulele organismelor superioare?

5. Ținând cont de faptul că în organismul omului matur în fiecare zi se formează o cantitate mare de ATP, structura, compoziția și masa corpului nu se modifică evident în acest timp. Cum se poate explica aceasta?

6. Care enzime ale ciclului Krebs sunt reglatorii? Care metaboliți și în ce mod influențează activitatea acestor enzime? Explicați caracterul amfibolic al ciclului Krebs.

7. Oxalilacetatul se formează în ultima etapă a ciclului Krebs:

a) E posibilă oare sinteza OA din acetil-CoA doar sub acțiunea enzimelor și cofactorilor ciclului Krebs fără utilizarea produselor intermediare ale ciclului? Dați răspuns detaliat.

b) Cum se completează rezervele de OA?

8. ATP sintetizat în mitocondrii trebuie utilizat în celulă?

a) Cum ATP părăsește mitocondriile?

b) Cum se completează rezervele de ADP și de fosfat anorganic?

TEMA 12

Oxidarea biologică. Lanțul respirator și fosforilarea oxidativă

Experiența 1. *Reacția calitativă de determinare a activității catalazei.*

Principiul metodei. Catalaza face parte din clasa oxidoreductazelor. Ea se conține în toate țesuturile și lichidele biologice. Într-o cantitate mai mare catalaza se întâlnește în eritrocite și ficat. La oxidarea unor substanțe se formează peroxid de hidrogen, substanță toxică care se poate acumula în organism. Rolul biologic al catalazei constă în descompunerea peroxidului de hidrogen în oxigen și apă:

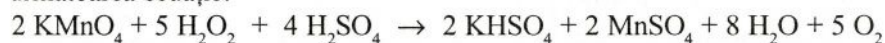
$$2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{catalază}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$$

Catalaza conține fier. La descompunerea peroxidului de hidrogen are loc oxidarea și reducerea fierului care intră în componența acestei enzime.

Mod de lucru. Activitatea catalazei sîngelui. În două eprubete se iau cîte 1 ml H_2O , se adaugă 2 picături de sînge. O probă se fierbe pentru inactivarea enzimei. După racire în ambele eprubete se adaugă cîte 5-10 picături soluție de H_2O_2 de 3% și conținutul eprubetelor se agită. În eprubeta de experiență se observă degajarea bulelor de oxigen.

Experiența 2. *Determinarea cantitativă a catalazei în sînge.*

Principiul metodei. Această metodă se bazează pe determinarea cantității de H_2O_2 descompusă de enzimă într-o perioadă anumită de timp după următoarea ecuație:



Activitatea catalazei se exprimă prin numărul de catalază și indicele de catalază. *Numărul de catalază* este cantitatea de peroxid de hidrogen, în mg, descompusă de 1 ml de sînge. Despre cantitatea de H_2O_2 descompusă se judecă după diferența cantității de KMnO_4 utilizat la titrare pînă și după acțiunea catalazei.

Mod de lucru. Sîngele diluat (1:1000) se agită. În două baloane se iau cîte 1 ml sînge, 7 ml apă distilată, în proba de experiență se adaugă 2 ml H_2O_2 de 1%, în cea de control - 5 ml soluție de H_2SO_4 de 10%. În mediul acid (proba de control) acțiunea enzimei se stopează, deoarece ea este activă la $\text{pH} = 7,4$. Baloanele se lasă pentru 30 minute la temperatura camerei. Apoi în proba de experiență se adaugă 5 ml soluție de H_2SO_4 de 10%, iar în cea de control - 2 ml soluție de H_2O_2 de 1%. Conținutul fiecărei probe se titrează cu soluție de KMnO_4 de 0,1 N pînă la culoarea roză. Se calculează unitatea

catalazei (UC) după formula: $UC = (A - B) \times 1,7$, unde: A - cantitatea de soluție de $KMnO_4$ de 0,1N consumată la titrarea probei de control (ml); B - cantitatea de permanganat cheltuită la titrarea probei de experiență. O cantitate mai mare va merge la titrarea probei de control, unde catalaza nu acționează. Diferența căpătată o înmulțim la 1,7 și obținem indicele de catalază pentru sîngele studiat. În normă această unitate este egală cu 10 - 15 unități (vezi nota).

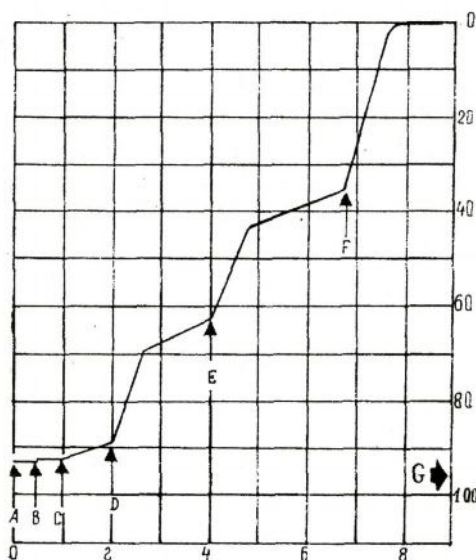
Notă: 1 mol/l H_2O_2 este de 17 g;

1 ml 0,1N soluție conține 1,7 mmol/l (1,7 mg) H_2O_2 și 1 ml 0,1 $KMnO_4$ este echivalent cu 1 ml 0,1N H_2O_2 .

Importanța clinico-diagnostică. Determinarea activității catalazei sîngelui are importanță pentru diagnosticul cancerului, anemiei, tuberculozei. În cazul acestor boli, concentrația catalazei în sînge se reduce.

Experiența 3. Oxidarea malatului și glutamatului în mitocondrii (metoda polarografică).

Principiul metodei. O pereche de electrozi (anod și catod) acoperiți cu o peliculă de polietilenă se introduc în vasul cu suspensie mitocondrială studiată. Oxigenul absorbit poate difuza prin peliculă ajungînd la electrozi. Alte substanțe din suspensie nu pot trece prin membrana polietilenică. Între electrozi se menține o tensiune constantă egală cu 0,65 V. La reducerea electrolică a oxigenului pe catod, între electrozi se creează un curent proporțional conținutului de oxigen din amestecul reacționar. Intensitatea curentului se înregistrează automat.



Absorbția mitocondrială a oxigenului determinată cu ajutorul electrodului de oxigen.

Mod de lucru. Într-un vas se iau 3,7 ml amestec, care conține 20 mmol soluție tampon tris-HCl, 80 mmol KCl și 5 mmol MgCl₂ pH = 7,4. La intervalele de timp indicate în imaginea de la p. 63, în vas se adaugă reactivele enumerate mai jos în următoarea ordine:

A - începutul înscrierii. În punctele notate au fost efectuate următoarele suplimente:

- B - 0,1 ml suspensie mitocondrială din ficatul șobolanilor;
- C - 0,1 ml soluție ce conține 0,5 ml de glutamat și 0,1 ml de malat cu pH = 7,4;
- D - 0,02 ml de 50 mmol soluție ADP;
- E - 0,05 ml de 10 mmol soluție ADP;
- F - 0,05 ml soluție dinitrofenol 10 mmol.

Amestecul se pune la incubare ($t = 30^{\circ}\text{C}$); toți reactanții au fost saturați cu aer. În imaginea de la p. 63 sunt indicate rezultatele experienței obținute la studierea respirației mitocondriale prin metoda polarografică (cu ajutorul electrodului de oxigen).

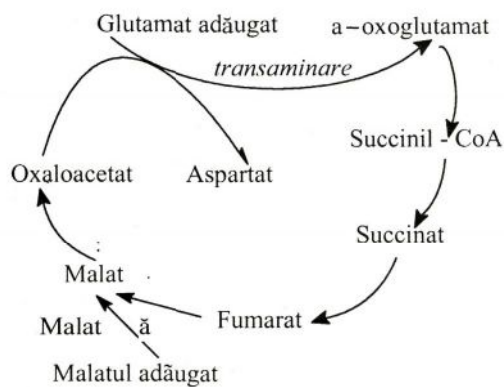
Determinați valoarea raportului P/O și coeficientului respirator în cazul oxidării malatului – glutamatului. Oxidarea malatului și glutamatului în mitocondriile ficatului are loc după schema de mai jos:

Correspunde oare raportul P/O dat reieșind din schema indicată acelei valori, care a fost obținută experimental?

Notă: Într-un litru de soluție apoasă saturată cu aer la 30°C se conțin 0,235 mM oxigen.

Experiența 4. Fosforilarea oxidativă (sinteza ATP).

Principiul metodei. Energia eliberată în procesul oxidării substratelor (succinat, izocitrat, malat) este utilizată parțial la esterificarea fosfatului anorganic la sinteza ATP ($\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$). Sursa enzimelor este suspensia de mitocondrii. Scăderea conținutului de fosfat (utilizat la sinteza



Schema oxidării substratelor (la exp. 4).

ATP) în proba de experiență se determină după molibdatul de amoniu și acidul ascorbic față de proba de control (culoarea albastră este mai puțin intensă în proba de experiență).

Mod de lucru.

Proba de experiență. În eprubetă se ia 1 ml amestec de incubare (soluție tampon de fosfați cu pH = 7,4, zaharoză, MgCl₂, KCl), 0,02 ml ADP, 0,5 ml soluție de substrat respectiv (la indicația profesorului) și 0,5 ml suspensie de mitocondrii. Proba se lasă pentru 25 minute la temperatura camerei, apoi în eprubetă se introduce 1 ml soluție acid tricloracetic (10%). Conținutul eprubetei se titrează.

Proba de control se efectuează concomitent cu proba de experiență. În eprubetă se introduc aceiași reactivi ca și în proba de experiență cu excepția, că în loc de 0,5 ml soluție de substrat în eprubetă se introduc 0,5 ml de apă distilată.

Determinarea fosfatului. În altă eprubetă se introduc 1 ml de filtrat, 1 ml soluție de molibdat de amoniu (25%) și 0,5 ml soluție de acid ascorbic (0,5%). Conținutul eprubetei se agită, apoi se mai introduc 7,5 ml de apă distilată. Peste 10 minute probele (de control și de experiență) se colorimetrează la FEC (filtrul roșu, cuva – 10 mm) față de amestecul de incubare. Rezultatele se calculează după curba etalon, se trag concluziile respective.

Teme pentru autopregătire

1. Oxidarea biologică. Dehidrogenarea substratelor – sursa energetică pentru sinteza ATP-ului. Enzimele dehidrogenării.
2. Lanțul respirator (schema). Complexele enzimatice. Acceptorii principali de electroni și protoni, structura lor chimică.
3. Potențialul de oxido-reducere a componentelor lanțului respirator. Fosforilarea oxidativă. Locurile de fosforilare. Produsele finale ale oxidării.
4. Reglarea intensității funcționării lanțului respirator. Coeficientul P/O, controlul respirator.
5. Decuplarea produselor de oxidare și fosforilare, principalii agenți decuplanți. Rolul biologic al produsului de decuplare, respirația liberă.
6. Mitocondriile, structura și permeabilitatea selectivă a membranelor pentru diferiți compuși. Sistemele-navetă de transport al echivalenților de reducere.

7. Ipotezele principale cu privire la procesele de fosforilare oxidativă. Ipoteza lui Mitchell.

8. Oxidarea microzomală, rolul citocromului P_{450} în reacțiile de oxido-reducere.

9. Vitaminele și rolul lor în procesele de oxidare biologică.

10. Noțiuni de radicali liberi. Oxidarea peroxidică a acizilor grași nesaturați din membrane. Sistemele de protecție a celulei împotriva acumulării radicalilor liberi.

Întrebări pentru autocontrol și situații de problemă

1. Care vitamine și substanțe cu activitate vitaminică intră în componența lanțului respirator? Scrieți formulele lor.

2. De ce la reducerea NAD-ului are loc acidularea soluției? Ilustrați aceasta prin exemplul reducerii NAD.

3. Adăugarea rotenonei la mitocondriile, care respiră pe glutamat, duce atât la încetarea sintezei ATP-ului, cât și la transportul de electroni. Cum se pot restabili aceste procese? (Amintim că rotenona blochează transportul de electroni în lanțul respirator pe sectorul NAD - ubichinonă).

4. Adăugarea oligomicinei la mitocondrii, care respiră pe succinat, duce la întreruperea transportului de electroni și a formării de ATP. Adăugarea ulterioară a dinitrofenolului sau a ionilor de Ca^{++} , conduc la reînceperea imediată a transportului de electroni în lanțul respirator fără generarea concomitentă de ATP. Care proces inhibă oligomicina?

5. Adăugarea malonatului (inhibitorul competitiv al succinatdehidrogenazei) la mitocondriile care respiră pe succinat, întrerupe transportul de electroni și sinteza ATP-ului. Cum se poate relua: a) numai transportul de electroni? b) transportul de electroni și sinteza ATP?

6. În ce stare (redușă sau oxidată) se vor afla transportorii lanțului respirator la adăugarea în suspensia de mitocondrii a antimicinei A și oxidului de carbon CO ?

7. De ce dinitrofenolul, tiroxina, acizii grași liberi și alte substanțe măresc termogeneza?

8. De ce sărurile acidului cianhidric, care nu influențează procesele de dehidrogenare, blochează respirația tisulară?

9. Care este valoarea coeficientului P/O la oxidarea malatului, succinatului și a izocitratului? Scrieți reacțiile respective.

10. Calculați câte molecule de NAD se formează la oxidarea completă a unei molecule de piruvat (până la CO_2 și apă). Câte molecule de ATP se vor forma în caz dacă toți atomii de hidrogen vor intra în lanțul respirator?

11. Câte molecule de ATP se generează la o rotație a ciclului Krebs în condițiile în care toți atomii de hidrogen intră în lanțul respirator? Arătați coeficientul P/O pentru fiecare substrat de oxidare. Explicați.

12. Reprezentați schematic calea lungă, medie și scurtă de oxidare. Determinați numărul de molecule de ATP formate și produsele finale de oxidare.

13. Care este cantitatea totală de ATP ce se descompune și se sintetizează timp de 24 ore în organismul omului matur (2000 kcal, 70 kg)? Eficacitatea transformării produselor alimentare în energia de ATP este de 50%.

14. Care este variația energiei libere standard la transportul a $2e^-$ de la NAD la O_2 în calorii sau jouli?

15. Ce se întâmplă cu energia electronilor în procesul de migrare al lor în lanțul respirator al mitocondriilor? Câtă energie se consumă în celule la sinteza unui mol de ATP?

16. Care reacție de oxidare din ciclul Krebs asigură intrarea electronilor în calea medie de oxidare? Câte molecule de ATP se formează în ciclul Krebs la fosforilarea la nivel de substrat?

17. La adăugarea malonatului de sodiu la o suspensie de mitocondrii, ce are ca sursă unică de combustibil numai acidul piruvic, respirația lor se întrerupe brusc și se acumulează unul din produsele metabolice intermediare:

1. Care este structura produsului intermediar acumulat?
2. De ce el se acumulează?
3. De ce se întrerupe consumarea oxigenului?
4. În ce mod se poate înlătura această inhibiție? Explicați.

18. La măsurarea cantității de oxigen folosite de mitocondriile mușchilor porumbelului s-a observat un caz surprinzător: cantitatea de oxigen consumată a fost de 7 ori mai mare decât cea necesară pentru oxidarea completă a oxalilacetatului sau malatului până la CO_2 și H_2O .

1. De ce adăugarea OA sau malatului mărește consumul de O_2 folosit?
2. De ce cantitatea de O_2 absorbit depășește de multe ori cantitatea de O_2 necesară pentru oxidarea completă a OA și malatului adăugat?
19. Ce proprietăți trebuie să posede membrana internă a mitocondriilor pentru a asigura procesele de fosforilare oxidativă?
20. În mitocondriile grăsimii brune la nou-născuți și la animalele în stare de hibernare, randamentul ATP-ului la un atom de oxigen absorbit constituie mai puțin de o moleculă:
 1. Ce funcție fiziologică poate fi determinată prin așa raport mic P/O în grăsimea brună a nou-născuților?
 2. Indicați mecanismele posibile care ar putea determina un astfel de raport P/O caracteristic pentru mitocondriile grăsimii brune.