Ispitivanje stabilnosti glutationa u uzorcima plazme i krvi

Vujeva, Vesna

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:932719

Rights / Prava: In copyright

Download date / Datum preuzimanja: 2021-07-13

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb - Diplomski radovi Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Vesna Vujeva

Ispitivanje stabilnosti glutationa u uzorcima plazme i krvi

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.
Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Stanična biologija s genetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za Farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane-Marije Domijan i suvoditeljstvom dr. sc. Marka Gerića, znanstvenog suradnika u Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

Sadržaj:

1. Uvod ........................................................................................................................................... 1
   1.1. Slobodni radikali ..................................................................................................................... 2
       1.1.1. Reaktivni kisikovi spojevi ............................................................................................... 2
   1.2. Oksidacijski stres i stanični mehanizam obrane od oksidacijskog stresa .............................. 3
       1.2.1. Glutation .......................................................................................................................... 4
   1.3. UV-Vis spektrofotometrija ..................................................................................................... 5
       1.3.1. Određivanje koncentracije iz očitane apsorbancije ......................................................... 6
2. Obrazloženje teme .......................................................................................................................... 7
3. Materijali i metode ....................................................................................................................... 9
   3.1. Materijali .................................................................................................................................. 10
       3.1.1. Kemikalije ......................................................................................................................... 10
       3.1.2. Oprema ............................................................................................................................ 10
       3.2.1. Princip metode određivanja GSH .................................................................................... 10
       3.2.2. Priprema otopina ............................................................................................................ 11
       3.2.3. Postupak pripreme uzorka plazme i krvi za određivanja koncentracije GSH ............ 12
   3.3. Biološki pokus za utvrđivanje stabilnosti GSH u uzorku plazme i krvi ............................. 13
   3.4. Statistička obrada rezultata ................................................................................................... 14
4. Rezultati i rasprava ...................................................................................................................... 15
   4.1. Optimiziranje metode mjerenja GSH u plazmi ................................................................. 16
   4.2. Stabilnost produkta TNB ....................................................................................................... 18
   4.3. Ispitivanje stabilnosti GSH u uzorcima plazme i krvi u ovisnosti o pohranjivanju ........... 19
5. Zaključci ....................................................................................................................................... 22
6. Literatura ..................................................................................................................................... 24
7. Sažetak/Summary ...................................................................................................................... 28
8. Prilog ............................................................................................................................................ 31
1. Uvod
1.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali predstavljaju atome ili molekule koji u svojoj vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona (Halliwell i Gutteridge, 2007). Zbog slobodnog elektrona ili više njih, slobodni radikal se u biološkom sustavu smatra nestabilnom molekulom s niskom specifičnosti za reaktante. Slobodni radikali se u kemijskoj reakciji oksidacije brzo i nepredvidivo spajaju s bilo kojim, prostorno bliskim molekulom proteina, lipida, ugljikohidrata ili nukleinske kiseline (Reuben, 1998). Oni nastoje popuniti valentnu orbitalu te spartiti nesparen elektron, odnosno elektrone i time postignuti stabilnu elektronsku konfiguraciju. Pri tome mogu nastati novi radikali s mogućnošću pokretanja novoga niza neenzimskih lančanih reakcija.

1.1.1. Reaktivni kisikovi spojevi

Reaktivni kisikovi spojevi (engl. reactive oxygen species - ROS) djelomično su reducirani i izrazito reaktivni metaboliti kisika koji nastaju uslijed prijenosa elektrona na molekulu kisika. ROS-ovi mogu biti slobodni radikali, ali i reaktivni intermedijeri kisika. U skupinu ROS-ova koji su slobodni radikali (Tablica 1) pripadaju superoksid radikal (O$_2^{-}$) hidroksil radikal (HO•), peroksilni (RO$_2$•) i alkoksilni radikal (RO•). Reaktivni intermedijeri kisika su spojevi koji nisu slobodni radikali sami po sebi, ali mogu pokrenuti reakcije kojima nastaju slobodni radikali. To su primjerice vodikov peroksid (H$_2$O$_2$), hipoklorasta kiselina (HOCl), reaktivni (singletni) kisik (¹ΔO$_2$) te okolišni i endogeni ozon (O$_3$). HO• je posebno reaktivan radikal i smatra se izravno odgovornim za oksidacijska oštećenja u biološkim sustavima (Halliwell i Cross, 1994; Fleury i sur., 2002).

Tablica 1. Vrste reaktivnih kisikovih spojeva (ROS-ova).

<table>
<thead>
<tr>
<th>Radikali</th>
<th>Reaktivni intermedijeri</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Superoksid radikal</td>
<td>O$_2$•</td>
</tr>
<tr>
<td>Hidroksil radikal</td>
<td>HO•</td>
</tr>
<tr>
<td>Peroksil radikal</td>
<td>RO$_2$•</td>
</tr>
<tr>
<td>Alkoksil radikal</td>
<td>RO•</td>
</tr>
<tr>
<td>Hidroperoksil radikal</td>
<td>HO$_2$⁻</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Primjer staničnog organela u kojem nastaju endogeni ROS-ovi je mitohondrij. U mitohondriju endogeni ROS-ovi nastaju procesom oksidativne fosforilacije koja se odvija na unutrašnjoj membrani mitohondrija. Tijekom prijenosa elektrona preko kompleksa membranskih proteina u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama može doći do prijevremenog
„curenja“ elektrona s transportnog lanca na kisik i nastanka superoksidnog radikala, $O_2^{-\bullet}$ (Slika 1). Ovo se događa u svega 3 - 5 % slučajeva i to najčešće na razini kompleksa 1 (NADH dehidrogenaza) i 3 (citokrom b-c1 kompleks) (Smith i sur., 2004; Halliwell i Gutteridge, 2007).

**Slika 1.** Prijenos elektrona u procesu oksidativne fosforilacije te proces stvaranja i uklanjanja kisikovih radikala (preuzeto od: Li i sur., 2013).

1.2. Oksidacijski stres i stanični mehanizam obrane od oksidacijskog stresa

Oksidacijski stres označava pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-reduktijskim reakcijama prema oksidaciji ili prekomjernom stvaranju radikala. Tijekom normalnog staničnog metabolizma stvaraju se slobodni radikali, no sustav obrane odgovarajuće reagira s nastalim slobodnim radikalima te se tako održava homeostaza. Ukoliko je broj citoprotektivnih enzima i antioksidansa nedostatan, nastupa oksidacijski stres. Oksidacijski stres može dovesti do poremećaja staničnog metabolizma, uključujući lomove lanaca molekule DNA, povećanje unutarstaničnog slobodnog kalcija, oštećenje membranskih ionskih transportera i proteina te peroksidaciju lipida (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Uočena je uloga oksidacijskog stresa u mnogim bolestima (Slika 2).

Antioksidansi pripadaju grupi spojeva koja imaju funkciju sprečavanja nastanka oksidacijskog stresa. Djeluju tako što mogu sniziti količinu slobodnih radikala i/ili zaustaviti lančane reakcije koje su pokrenuli slobodni radikali. Osim toga njihova uloga je popravak...
oštećenja nastalih oksidacijom staničnih makromolekula. Neki od poznatijih antioksidansa, a koji sprečavaju nastajanje slobodnih radikala, su vitamini i neki flavonoidi (Reuben, 1998).

Slika 2. Bolesti u kojima je uočen utjecaj oksidacijskog stresa (preuzeto od: Adly, 2010).

1.2.1. Glutation

Glutation (GSH, Slika 3) je otkriven 1935. godine (Jurkovič i sur., 2008). Strukturno je neproteinski tiol, tripeptid koji se biosintetizira iz aminokiselina L-cistein, L-glutaminske kiseline i glicina. GSH je prisutan u svim stanicama te ima brojne uloge u stanicima. Kao kofaktor sudjeluje u brojnim enzimatskim reakcijama u citoplazmi stanice. Također ima ulogu u posttranslacijskim modifikacijama. U biljkama predstavlja glavni spremni i transportni oblik neproteinskog reduciranog sumpora te služi kao multifunkcionalni metabolit (Noctor i sur., 2002). U stanicama sisavaca GSH je prisutan u visokoj koncentraciji (oko 5 mM) i kao sulfhidrilni pufer štiti stanicu tako što reagira s H₂O₂ i ostalim štetnim produktima koji nastaju aerobnim metabolizmom te sprečava oksidacijski stres (Berg i sur., 2014).


Glutation zbog izmjene elektrona u prisutnosti slobodnih radikala prelazi između reduciranog tiolnog oblika (GSH) i oksidiranog oblika (GSSG) u kojem su dva tripeptida povezana disulfidnim mostom (Berg i sur., 2014). GSSG se reducira pomoću glutation reduktaze u GSH (Slika 4). Izvor elektrona je NADPH. U većini sisavaca omjer GSH prema
GSSG obično je 500 puta veći, odnosno reduciranog GSH ima i do 500 puta više nego oksidiranog GSSG. Omjer reduciranog i oksidiranog glutationa predstavlja jačinu oksidacijskog stresa u organizmu (Berg i sur., 2014).


1.3. UV-Vis spektrofotometrija

UV-Vis spektrofotometar je uređaj za analizu spektra elektromagnetskoga zračenja. Sadrži optički sustav za stvaranje monokromatskog svjetla valne duljine od 190 do 800 nm i odgovarajući detektor za mjerenje apsorbancije. Ispravnost instrumenta se ispituje kalibracijom skale valnih duljina i apsorbancije. Prednosti ove metode su jednostavnost, izdržljivost, preciznost i dostupnost. Njeni nedostatci su nedovoljna selektivnost pogotovo u slučaju analize tvari koje imaju kromofore te slaba primjenjivost u analizi smjesa (Nigović i sur., 2007).

Osnovni dijelovi UV-Vis spektrofotometra su:

1. **izvor zračenja** (deuterijeva lampa za ultraljubičasto područje i živina odnosno volframova lampa za vidljivo područje);

2. **monokromator** (optički instrument za izdvajanje zračenja sasvim uskoga područja spektra, tj. za dobivanje tzv. monokromatske (jednobojne) svjetlosti (http://www.enciklopedija.hr/), može biti prizma ili rešetka s ulaznom i izlaznom pukotinom);

3. **nosač uzorka** (najčešće kiveta, u UV području treba biti od kvarcnog stakla da bi svjetlosti val nesmetano dolazio do uzorka);

1.3.1. Određivanje koncentracije iz očitane apsorbancije

UV-Vis spektrofotometar funkcionira tako da mjeri apsorpciju zračenja molekule u otopini koja je definirana Beer-Lambertovim zakonom. Mjera količine svjetla koju apsorbira uzorak je apsorbancija. Definirana je kao dekadski logaritam recipročne vrijednosti transmisije (T) monokromatskog svjetla i prikazuje se izrazom:

\[ A = \log_{10} \frac{I_o}{I} = \varepsilon l c \]

pri čemu \( I_o \) predstavlja intenzitet ulaznog monokromatskog svjetla, a \( I \) intenzitet izlaznog monokromatskog svjetla. \( I < I_o \) ukazuje na to da je uzorak apsorbirao dio svjetla. Molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent (\( \varepsilon \), mjerna jedinica je \( L \; mol^{-1} \; cm^{-1} \)) je konstantan za određeni spoj i valnu duljinu pri kojoj se mjeri, \( l \) je širina kivete i izražava se u cm, a koncentracija (\( c \)) u mol/L (Nigović i sur., 2007).
2. Obrazloženje teme
Posljednjih 20-tak godina velika pozornost istraživača usmjerena je na istraživanje oksidacijskog stresa i ROS-ova koji ga uzrokuju. Istražuje se razina oksidacijskog stresa, ali i razlike u antioksidacijskim mehanizmima između osoba, posebice kod bolesnika koji boluju od bolesti koje se povezuju sa starenjem poput karcinoma, artritis i ateroskleroze. Rezultati tih istraživanja pokazuju da se oksidacijski stres i smanjena aktivnost antioksidacijske obrane organizma može povezati s nastankom raznih bolest (Slika 2) (Adly, 2010; Gериć i sur., 2016; Milevoj Kopčinović i sur., 2016; Rogulj i sur., 2012).


Upravo stoga što je GSH prisutan u svim stanicama te je mjera antioksidacijske zaštite stanice važno je razviti pouzdanu i reproducibilnu metodu za njegovu praćenje u biološkim uzorcima. Pored toga istraživanja pokazuju da pohranjivanje uzoraka (njihovo stajanje na sobnoj temperaturi i zamrzavanje uzoraka) može utjecati na izmjerenu koncentraciju GSH. Primijećeno je da zbog enzimatskog djelovanja i autooksidacije u uzorcima koji stoje koncentracija GSH se snižava. S druge strane razlike u izmjerenoj koncentraciji GSH u biološkim uzorcima pohranjenima na -20°C i -80°C nije bilo (Lin i sur., 2006).

Svrha ovog diplomskog rada bila je optimizirati metodu mjerenja GSH u plazmi te ispitati stabilnost GSH u biološkim uzorcima. U prvome dijelu istraživanja pomoću kontrolnog uzorka plazme ispitani su optimalni uvjeti mjerenja GSH kako bi se utvrdila pouzdana metoda za praćenje koncentracije GSH u uzorcima plazme. U drugome dijelu proveden je bioški pokus, odnosno pribavljen je uzorak krvi koji je alikvotiran u više epruveta koje su pohranjene ili u kontroliranim uvjetima (pri 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂) ili u zamrzivaču (na -20 °C) te je praćena stabilnost GSH. Rezultati drugog dijela istraživanja trebali bi pokazati utjecaj pohranjivanja na koncentraciju GSH u uzorcima plazme i krvi i olakšati istraživačima planiranje pokusa.
3. Materijali i metode
3.1. Materijali
3.1.1. Kemikalije

U ovom su istraživanju korištene kemikalije:

5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina), DTNB (Sigma, St. Louis, USA); natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, kristalni, Na₂HPO₄ × 12 H₂O (Kemika, Hrvatska); natrijev dihidrogenfosfat, kristalni NaH₂PO₄, (Kemika, Hrvatska); klorovodična kiselina, HCl (Kemika, Hrvatska).

Sve korištene kemikalije bile su pro analysi čistoće. Za pripremu otopina korištena je destilirana voda.

3.1.2. Oprema

U ovom istraživanju korištena je oprema:

- Analitička vaga Pb303 Delta Range (Mettler Toledo, Švicarska);
- Centrifuga Frontier 5706 (Ohaus, Greifensee, Švicarska);
- Centrifuga Heraeus Biofuge Pico (Heraeus Instruments, DJB Labcare Ltd., UK);
- Miješalica/vortex (Heidolph, Njemačka);
- pH metar Hanna HI 9025 (Hanna instruments, Portugal);
- Kvarcna kiveta volumena 1,4 ml (Yixing Zhcheng Material, China);
- UV-Vis spektrofotometar T70 (PG Instruments, UK);
- Heparinizirani spremlci (Becton Dickinson, USA);
- Inkubator za održavanje kontroliranih uvjeta od 37°C i vlažne atmosfere s 5 % CO₂ (Heraeus Hera Cell 240 inkubator, Langenselbold, Njemačka).

3.2. Metode

3.2.1. Princip metode određivanja GSH

Spektrofotometrijska metoda određivanja GSH bazira se na reakciji oksidacije GSH-a od strane sulfhidrilnog reagensa 5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina) ili skraćeno DTNB koja daje žuti produkt 5'-tio-2-nitrobenzojeva kiselina ili skraćeno TNB (Rahman i sur., 2006). Smatra se da je nastali produkt stabilan, a intenzitet žute boje nastalog produkta može se očitati pomoću UV-Vis spektrofotometra pri valnoj duljini od 412 nm. Reakcija DTNB-a sa sulfhidrilnom (tiolnom) skupinom GSH prikazana je na Slici 6. Koncentraciju GSH u uzorku moguće je izračunati prema Beer-Lambertovom zakonu i poznatom apsorpcijskom koeficijentu, ε = 14,15 x 10⁻³ M⁻¹ cm⁻¹ (Eyer i sur., 2003).

3.2.2. Priprema otopina

**Priprema 5 % otopine klorovodične kiseline**

5 % klorovodična kiselina pripremljena je razrjeđivanjem koncentrirane klorovodične kiseline s destiliranom vodom. Izračun je napravljen metodom zvijezde:

Za pripremu 35 mL 5 % klorovodične kiseline uzeto je 5 mL 35 % klorovodične kiseline i 30 mL destilirane vode. 5 % klorovodična kiselina se koristila za taloženje proteina iz biološkog uzorka (krv).

**Priprema 0,3 M natrijevog fosfatnog pufera pH 7,4**

Za pripremu 0,3 M natrijevog fosfatnog pufera prethodno je potrebno pripremiti 0,3 M Na₂HPO₄ i 0,3 M NaH₂PO₄ te ih pomiješati kako bi pH otopine bio 7,4.

Za pripremu 0,3 M Na₂HPO₄ odvagano je 107,44 g Na₂HPO₄ × 12 H₂O i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 1 L te nadopunjeno s destiliranom vodom.
Za pripremu 0,3 M NaH₂PO₄ × 2H₂O odvagano je na analitičkoj vagi 46,8 g NaH₂PO₄ × 2H₂O, kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 1 L i nadopunjeno s destiliranom vodom.

Pripremljene otopine su se pomiješale, a pomoću pH metra se pratio pH kako bi dobiveni natrijev fosfatni pufer imao pH 7,4.

**Priprema otopine 1 mM DTNB-a**

10 mM DTNB je pripremljen tako da je na analitičkoj vagi odvagano 0,0396 g DTNB-a. Odvaga je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopunjena s destiliranom vodom. 1 mM otopina DTNB-a pripremila se razrjeđivanjem 10 puta otopine 10 mM DTNB-a. Potrebnu otopinu (1 mM DTNB) preciznije je pripremiti razrjeđivanjem 10 mM otopine DTNB-a nego vaganjem 0,00396 g DTNB-a.

3.2.3. Postupak pripreme uzorka plazme i krvi za određivanja koncentracije GSH

**Plazma**

Plazma je centrifugirana (5600 rpm, 5 min) kako bi se odvojio supernatant. Potom je u 100 μL supernatanta dodano 850 μL natrijevog fosfatnog pufera (0,3 M, pH 7,4) i 50 μL DTNB-a (1 mM). Intenzitet nastalog obojenja izmjerena je spektrofotometrijski pomoću UV-Vis spektrofotometra pri 412 nm i sobnoj temperaturi. Uz uzorke plazme pripremljen je i uzorak destilirane vode koji je korišten kao slijepa proba.

Uzorci za spektrofotometrijsko određivanje GSH u plazmi pripremali su prema shemi prikazanoj Tablicom 2.

Tablica 2. Shematski prikaz pripreme uzoraka plazme za određivanje koncentracije GSH.

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>Slijepa proba</th>
<th>Uzorak</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>De-H₂O (μL)</td>
<td>100</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>Supernatant plazme (μL)</td>
<td>-</td>
<td>100</td>
</tr>
<tr>
<td>Natrijev fosfatni pufer (μL)</td>
<td>850</td>
<td>850</td>
</tr>
<tr>
<td>DTNB (μL)</td>
<td>50</td>
<td>50</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Koncentracija GSH u uzorku je izračunata pomoću Beer-Lambertovog zakona na osnovu očitane apsorbanije uzorka i poznatog apsorbancijskog koeficijenta.

**Puna krv**

Uzorci krvi prethodno su tretirani s 5 % klorovodičnom kiselinom te centrifugirani (5600 rpm, 15 min) kako bi se uklonile interferencije. Potom je u 500 μL supernatanta dodano 350 μl natrijevog fosfatnog pufera (0,3 M, pH 7,4) i 50 μl DTNB-a (1 mM), a intenzitet obojenja je izmjeren na UV-Vis spektrofotometru pri 412 nm i sobnoj temperaturi. Uz uzorke je pripreman i uzorak destilirane vode koji je služio kao slijepa proba.

Konzentracija GSH u uzorku supernatanta krvi izračunata je pomoću Beer-Lambertovog zakona na osnovu očitane apsorbanije uzorka i poznatog apsorbancijskog koeficijenta.

3.3. Biološki pokus za utvrđivanje stabilnosti GSH u uzorku plazme i krvi

Kako bi se utvrdila stabilnost GSH u biološkom uzorku (plazma i krv) pripremljeno je više uzoraka plazme i krvi, pohranjeno ili na 24 sata u inkubatoru na 37 °C u vlažnim uvjetima uz 5 % CO$_2$ ili u zamrzivaču na -20 °C, a potom je u njima izmjerena koncentracija GSH.

Za potrebe praćenja stabilnosti GSH, krv je prikupljena u sterilnim uvjetima u spremnik koji sadrži heparin kao antikoagulans. Krv je donirala ženska osoba starosti 29 godina, a koja prethodno nije bila izložena zračenju i lijekovima koji bi mogli imati utjecaja na koncentraciju GSH u plazmi ili krv. Donor krv je dobrovoljno sudjelovao u istraživanju te je bio upoznat sa svrhom istraživanja kao i s mogućnošću bezrazložnog odustajanja od istraživanja u bilo kojem trenutku, u skladu s dopusnicom Etičkog povjerenstva.

**Plazma**

Nakon prikupljanja krv, krv je centrifugirana (5000 rpm, 5 min) kako bi se odvojila plazma. Plazma je pospremljena u 4 odvojene Eppendorf epruvete. Odmah nakon centrifugiranja koncentracija GSH je određena samo u plazmi koja je pospremljena u prvoj epruveti (epruveta 1) kako bi se utvrdila početna koncentracija GSH u plazmi bez utjecaja inkubacije (37 °C) ili zamrzavanja (-20 °C).

Kako bi se utvrdio utjecaj inkubacije na koncentraciju GSH u plazmi uzorci krv u epruvetama 2, 3 i 4 pohranjeni su u inkubator (na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO$_2$) u vremenu od 24 sata, nakon čega je krv u epruveti 2 centrifugirana (5000 rpm, 5 min) te je
odvojena plazma u kojoj je određena koncentracija GSH. Nakon inkubacije od 24 sata (na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂), uzorci krvi u epruvetama 3 i 4 su centrifugirani i odvojena je plazma. Uzorci plazme (epruvete 3 i 4) pohranjeni su u zamrzivaču na -20 °C te je u njima određena koncentracija GSH nakon 8 odnosno 30 dana nakon pohranjivana na -20 °C kako bi se utvrdio utjecaj zamrzavanja uzorka na koncentraciju GSH u plazmi.

**Puna krv**

Nakon prikupljanja krvi, krv je pospremljena u 4 odvojene Eppendorf epruvete. U prvoj epruveti (epruveta 1) izmjerena je koncentracija GSH odmah nakon vađenja krvi, a kako bi se utvrdila početna koncentracija GSH u krvi.

Utjecaj inkubacije na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂ u periodu od 24 sata na koncentraciju GSH u krvi određen je tako da su uzorci krvi u epruvetama 2, 3 i 4 pohranjeni u inkubatoru na 37 °C i vlažnoj atmosferi s 5% CO₂ na 24 sata, nakon čega je izmjerena koncentracija GSH u krvi u epruveti 2.

Nakon inkubacije od 24 sata (na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂), uzorci krvi u epruvetama 3 i 4 su pohranjeni u zamrzivaču na -20 °C te je u njima određena koncentracija GSH nakon 8 odnosno 30 dana nakon pohranjivana na -20 °C kako bi se utvrdio utjecaj zamrzavanja na koncentraciju GSH u krvi.

3.4. Statistička obrada rezultata

Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlika u koncentraciji GSH između grupa testirana je upotrebom t-testa u programu Excel. Razina značajnosti od p < 0,05 uzeta je kao statistički značajna razlika.
4. Rezultati i rasprava

S obzirom na važnost GSH u oksidacijsko-reduksijskoj ravnoteži, cilj ovoga istraživanja bio je optimizirati metodu mjerenja koncentracije GSH u plazmi te ispitati stabilnost GSH u plazmi i krvi.

4.1. Optimiziranje metode mjerenja GSH u plazmi

Metoda koja se najčešće koristi za određivanje koncentracije GSH u biološkim uzorcima je metoda u kojoj DTNB reagira s tiolnom skupinom GSH. DTNB se pokazao kao dovoljno osjetljiv za detekciju koncentracije GSH u biološkim uzorcima. No, problem je što DTNB reagira sa svim alifatskim tiolima u uzorcima, a ne samo s tiolnom skupinom GSH (Habeeb, 1972). Stoga metoda nije selektivna. S obzirom da je metodu razvio George Ellman, metoda se zove i Ellmanova, a DTNB reagens Ellmanov reagens. Sama reakcija je brza te 1 M tiola u reakciji s DTNB-om daje 1 mol produkta TNB-a koji je žute boje i pokazuje maksimum apsorbancije na 412 nm (Ellman, 1959).

U ovom istraživanju ispitan je postupak pripreme plazme prema kojem se u 100 μL plazme dodaje 850 μL natrijevog fosfatnog pufera (određene molarnosti i pH) i 50 μL DTNB-a (koncentracije 1 mM). Uloga fosfatnog pufera u reakcijskoj smjesi je održavanje konstantnih uvjeta pH koji su potrebni za reakciju između DTNB-a i tiolne skupine GSH, odnosno pufer sprječava inhibiciju željene reakcije i pojave neželjenih reakcija u reakcijskoj smjesi.

Kako metoda određivanja koncentracije GSH pomoću Ellmanovog reagensa nije selektivna, odnosno DTNB osim s tiolnom skupinom GSH reagira i s tiolnim skupinama proteina koji se nalaze u reakcijskoj smjesi potrebno je ukloniti proteine iz uzorka kao moguće interferencije iz uzorka, a koje bi mogle pokazati lažno povišenu koncentraciju GSH. U svrhu uklanjanja interferencija uzorci plazme prije reakcije s DTNB-om su centrifugirani.
Tablica 3. Rezultati ispitivanja utjecaja centrifugiranja na uzorke plazme prilikom određivanja GSH.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Postupak</th>
<th>Očitana apsorbanca na 412 nm</th>
<th>Koncentracija GSH (µM)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Plazma nije centrifugirana</td>
<td>0,500 – 0,600</td>
<td>35,3 – 42,4</td>
</tr>
<tr>
<td>Plazma je centrifugirana</td>
<td>0,240</td>
<td>17,0</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Rezultati prikazani Tablicom 3 pokazuju da su centrifugiranjem plazme uklonjene interferencije koje bi mogle rezultirati lažno povišenim rezultatom koncentracije GSH. Stoga se može zaključiti da su optimalni uvjeti za pripremu uzoraka plazme za određivanje koncentracije GSH prethodno centrifugiranje uzorka plazme te postupak u kojem 100 µL supernatanta plazme reagira s 50 µL DTNB-a (1 mM) u prisutnosti 850 µL natrijevog fosfatnog pufera (0,3 M, pH 7,4), a apsorbanca tako pripremljenog uzorka se mjeri pri 412 nm na sobnoj temperaturi.

Krv se sastoji od plazme i krvnih stanica te je u uzorcima krv osim GSH iz plazme prisutan GSH iz krvnih stanica. Stoga je potrebno optimizirati pripremu uzorka krv kako bi došlo do pucanja staničnih membrana, a u uzorku bio prisutan sav GSH, i onaj iz plazme i onaj iz krvnih stanica. Pored toga potrebno je istaložiti proteine od kojih neki mogu imati tiolne skupine i tako interferirati u reakciji i pokazati lažno povišenu koncentraciju GSH. U ovom istraživanju su stoga uzorci krv tretirani s 5 % klorovodičnom kiselinom.

Ispitani su različiti postupci pripreme krv kako bi se uklonile interferencije i izmjerila koncentracija ukupnog GSH u krv (Tablica 4). Pokazano je da kada je omjer krv i kiseline 1:2, odnosno kada se 800 µL krv tretira s 1600 µL 5 % klorovodične kiseline moguće je izmjeriti optimalnu vrijednost apsorbance pomoću UV-Vis spektrofotometra. U postupak se dalje uzima 500 µL supernatanta krv tretirane s 5 % klorovodične kiseline te dodaje 50 µL DTNB-a (koncentracije 1 mM) i 350 µL natrijevog fosfatnog pufera (0,3 M i pH 7,4), a apsorbancija se očita na UV-Vis spektrofotometru pri 412 nm i sobnoj temperaturi.
Tablica 4. Ispitivanje različitih postupaka pripreme uzorka krvi za određivanje koncentracije GSH.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Postupak pripreme uzorka krvi</th>
<th>Očitana apsorbanca na 412 nm</th>
<th>Koncentracija GSH (μM)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>800 μl pune krvi + 800 μl 5 % HCl, centrifugiranje 5600 rpm, 15 min</td>
<td>1,100</td>
<td>77,7</td>
</tr>
<tr>
<td>800 μl pune krvi + 1600 μl 5% HCl, centrifugiranje 5600 rpm, 15 min</td>
<td>0,4156</td>
<td>29,4</td>
</tr>
<tr>
<td>800 μl pune krvi + 1600 μl 10 % HCl, centrifugiranje, 5600 rpm, 15 min</td>
<td>0,030</td>
<td>2,1</td>
</tr>
</tbody>
</table>

4.2. Stabilnost produkta TNB


Tablica 5. Ispitivanje stabilnosti produkta GSH-DTNB u razdoblju od 0 do 15 minuta.

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>Koncentracija GSH (μM)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>0 min</td>
</tr>
<tr>
<td>Uzorak 1</td>
<td>19,8</td>
</tr>
<tr>
<td>uzorak 2</td>
<td>23,0</td>
</tr>
<tr>
<td>uzorak 3</td>
<td>23,6</td>
</tr>
<tr>
<td>uzorak 4</td>
<td>24,8</td>
</tr>
<tr>
<td>Srednja vrijednost ± SD</td>
<td>22,8 ± 2,1</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Slika 7. Stabilnost produkta TNB praćena u razdoblju od 15 minuta.

Prilikom praćenja koncentracije produkta TNB primijećen je porast njegove koncentracije, a statistička razlika je primijećena nakon 10 minuta (t-test, p < 0,05). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je produkt reakcije GSH-DTNB, TNB stabilan svega 5 minuta te da se nakon dodavanja reagensa (DTNB-a) koncentracija novonastalog produkta može pouzdano izmjeriti unutar 5 minuta. No, s obzirom na primijećen značajan porast apsorbancije nakon 10 min, inkubacija duža od 5 minuta nije preporučljiva.

4.3. Ispitivanje stabilnosti GSH u uzorcima plazme i krvi u ovisnosti o pohranjivanju

Prema literaturnim podacima GSH je stabilan u eritrocitima venske krvi uz dodatak antikoagulansa. Na temperaturi od 4 °C GSH je stabilan i do tri tjedna. Ipak, pokazano je da u otopini GSH polako oksidira (Habeeb, 1972). S obzirom na moguću autooksidaciju GSH u uzorku u ovom istraživanju ispitan te je stabilnost GSH u uzorcima plazme i krvi.

Stabilnost GSH u plazmi i krv praćena je u uzorcima plazme i krvi prije i nakon pohranjivanja u inkubatoru na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂ nakon 24 sata. Za ovo ispitivanje isti uzorak plazme i krvi razdijeljen je u 4 epruvete. U prvom uzorku plazme i krvi izmjerena je koncentracija GSH odmah i ta je koncentracija predstavljala početnu vrijednost GSH. Preostali uzorci plazme i krvi stavljeni su u inkubator (37 °C, vlažna atmosfera s 5% CO₂ na 24 sata) te im je izmjerena koncentracija GSH nakon inkubacije. Rezultati su prikazani Tablicama 6 i 7. 24 satna inkubacija plazme na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂ dovela je do porasta koncentracije GSH, a taj porast bio je statistički značajan u odnosu na početnu
vrijednost GSH (nakon 24 sata inkubacije: 23,3 ± 2,1 μM; početna vrijednost: 18,5 ± 1,5 μM; t-test, p < 0,05).

Tablica 6. Stabilnost GSH u plazmi nakon inkubacije na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂ u periodu od 24 sata.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Koncentracija GSH (μM)</th>
<th>0 h na 37°C</th>
<th>24 h na 37°C</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>uzorak 1</td>
<td>16,7</td>
<td>21,4</td>
</tr>
<tr>
<td>uzorak 2</td>
<td>18,1</td>
<td>22,6</td>
</tr>
<tr>
<td>uzorak 3</td>
<td>19,2</td>
<td>23,0</td>
</tr>
<tr>
<td>uzorak 4</td>
<td>20,0</td>
<td>26,3</td>
</tr>
<tr>
<td>Srednja vrijednost ± SD</td>
<td>18,5 ± 1,5</td>
<td>23,3 ± 2,1*</td>
</tr>
</tbody>
</table>

* statistički različito (p < 0,05)

Rezultati ispitivanja utjecaja inkubacije na koncentraciju GSH u uzorcima krvi potvrdili su te rezultate (Tablica 7). Nakon 24 satne inkubacije na 37 °C u vlažnim uvjetima s 5 % CO₂ i u uzorcima krvi došlo je do porasta koncentracije GSH koja je bila statistički značajna (t-test, p < 0,05). Koncentracija GSH u uzorcima krvi prije inkubacije je bila 119,8 ± 2,0 μM, a nakon inkubacije 123,6 ± 2,2 μM.

Tablica 7. Stabilnost GSH u punoj krvi nakon inkubacije na 37 °C u vlažnim uvjetima s 5 % CO₂ u periodu od 24 sata.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Koncentracija GSH (μM)</th>
<th>0 h na 37°C</th>
<th>24 h na 37°C</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>uzorak 1</td>
<td>117,5</td>
<td>121,1</td>
</tr>
<tr>
<td>uzorak 2</td>
<td>121,3</td>
<td>125,0</td>
</tr>
<tr>
<td>uzorak 3</td>
<td>120,7</td>
<td>124,7</td>
</tr>
<tr>
<td>Srednja vrijednost ± SD</td>
<td>119,8 ± 2,0</td>
<td>123,6 ± 2,2*</td>
</tr>
</tbody>
</table>

* statistički značajno različito (p < 0,05)

Dobiveni rezultati također pokazuju da je koncentracija GSH u krvi otprilike 6 puta veća nego koncentracija GSH u plazmi što je i za očekivati s obzirom da se u krvi osim plazme nalaze i krvne stanice koje sadrže GSH.
U slijedećem koraku ispitivan je utjecaj pohranjivanja, odnosno zamrzavanja uzoraka plazme na -20 °C na stabilnost GSH. Rezultati su prikazani Tablicom 8. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je GSH iz uzoraka plazmi pohranjenih na -20°C stabilan do 30 dana.

Tablica 8. Stabilnost GSH u plazmi tijekom pohranjivanja na -20 °C u periodu od 30 dana.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Uzorak</th>
<th>1. dan (μM)</th>
<th>8. dan (μM)</th>
<th>30. dan (μM)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Uzorak 1</td>
<td>21,4</td>
<td>19,8</td>
<td>21,7</td>
</tr>
<tr>
<td>Uzorak 2</td>
<td>22,6</td>
<td>23,0</td>
<td>23,6</td>
</tr>
<tr>
<td>Uzorak 3</td>
<td>23,0</td>
<td>23,6</td>
<td>19,8</td>
</tr>
<tr>
<td>Uzorak 4</td>
<td>26,3</td>
<td>24,8</td>
<td>24,4</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Srednja vrijednost ± SD: 23,3 ± 2,1, 22,8 ± 2,1, 22,4 ± 2,1

Također, ispitana je stabilnost GSH u krvi pohranjene u zamrzivaču na -20 °C nakon 8 i 30 dana. Rezultati su prikazani Tablicom 9. Također ni u uzorcima krvi pohranjenih u zamrzivaču na -20 °C u periodu od 30 dana nije došlo do značajnije promijene koncentracije GSH.

Tablica 9. Stabilnost GSH u punoj krvi tijekom pohranjivanja na -20 °C u periodu od 30 dana.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Uzorak</th>
<th>1. dan (μM)</th>
<th>8. dan (μM)</th>
<th>30. dan (μM)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Uzorak 1</td>
<td>121,1</td>
<td>125,4</td>
<td>127,3</td>
</tr>
<tr>
<td>Uzorak 2</td>
<td>125,0</td>
<td>127,2</td>
<td>130,1</td>
</tr>
<tr>
<td>Uzorak 3</td>
<td>124,7</td>
<td>122,5</td>
<td>126,4</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Srednja vrijednost ± SD: 123,6 ± 2,2, 125,3 ± 2,4, 127,9 ± 1,9
5. Zaključci
• Centrifugiranjem plazme uklanjaju su molekule s tiolnim skupinama koje bi mogle reagirati s DTNB reagensom pri određivanju GSH te je stoga prilikom spektrofotometrijskog određivanja koncentracije GSH preporučljivo centrifugirati uzorke plazme.

• Produkt GSH i DTNB-a, TNB je stabilan tijekom 5 minuta te je stoga nužno provesti mjerenje u tom periodu.

• Razine GSH u plazmi i punoj krvi porasle su tijekom inkubacije na 37°C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂ tijekom 24 sata te se može zaključiti da je prilikom takvog pohranjivanja došlo do sinteze GSH s obzirom da se radi uvjetima koji su slični fiziološkim.

• Pohranjivanje uzoraka plazme i puno krvi na -20°C u periodu od 30 dana nije utjecalo na izmjerenu razinu GSH u plazmi i krvi te je stoga moguće sigurno pohraniti uzorke prije mjerenja GSH u zamrzivaču na -20 °C do 30 dana.
6. Literatura


7. Sažetak/Summary
Sažetak

Reducirani glutation (GSH) tripeptid je cisteina, glutaminske kiseline i glicina te predstavlja najvažniji neenzimatski antioksidans u organizmu. Cilj ovoga istraživanja bio je optimizirati metodu mjerenja GSH u ljudskoj krvi i plazmi te ispitati stabilnost GSH prilikom pohranjivanja uzoraka. Uzorci krvi i plazme pribavljeni su od dobrovoljnog davatelja krvi. Ispitivanje stabilnosti GSH provedeno je tako da je jedan uzorak podijeljen u četiri epruvete. U prvom uzorku plazme ili krvi koncentracija GSH izmjerena je odmah. Dio je uzoraka pohranjen u inkubatoru (na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂), a preostala dva uzorka nakon sakupljanja pospremljeni su u zamrzivač na -20 °C kroz 8 i 30 dana. Koncentracija GSH izmjerena je pomoću Ellmanovog reagensa (5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina), DTNB, spektrofotometrijski pri valnoj duljini λ = 412 nm i sobnoj temperaturi. Reakcija tiolne skupine GSH s DTNB-om odvija se na sobnoj temperaturi i pH = 7,4 pri čemu nastaje žuti produkt 5'-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB). Mjerenja su provedena na UV-Vis spektrofotometru, a koncentracija GSH određena je pomoću molarnog apsorpcijskog koeficijenta (ε) koji iznosi 14,15 x 10⁻³ M⁻¹ cm⁻¹.

Ispitivanja su pokazala da je centrifugiranje plazme, prije spektrofotometrijskog određivanja GSH optimalno kako bi se uklonio dio interferencija koje bi mogle reagirati sa DTNB reagensom i odredila točna koncentracija GSH. Za određivanje koncentracije GSH u krvi potrebno je krv tretirati s 5% klorovodičnom kiselinom kako bi se uklonile interferencije i omogućilo određivanje GSH. Nakon pohranjivanja uzorka krvi na 37 °C u vlažnoj atmosferi tijekom 24 sata uočen je statistički značajan porast koncentracije GSH i u plazmi i u krvi te se može zaključiti da su ovi uvjeti potakli sintezu GSH u krvnim stanicama. U uzorcima plazme i krvi pohranjenima na -20°C tijekom 8 i 30 dana nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji GSH. Stoga se može zaključiti da prilikom pohranjivanja uzoraka plazme i krvi na -20 °C do 30 dana ne dolazi do razgradnje GSH.
Summary

Reduced glutathione (GSH) is cysteine, glutamic acid and glycine tripeptide. It is the most important non-enzymatic antioxidant in the body. The aim of this study was to optimize the GSH measurement method in human blood and plasma samples, and to investigate GSH stability when storing samples. Blood and plasma samples were obtained from volunteer blood donor. To test GSH stability blood or plasma sample was divided into four tubes. In the first sample, concentration of GSH was measured immediately. Part of the samples were stored in the incubator (at 37 °C in a humid atmosphere with 5% CO₂) and the remaining samples were frozen at -20 °C and kept for 8 or 30 days. GSH concentration was measured using an Ellman reagent (5,5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid), DTNB spectrophotometrically at wavelength $\lambda = 412$ nm on room temperature. The reaction of thiol group GSH with DTNB was carried out at room temperature and pH 7.4, resulting in a yellow product of 5'-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB). The measurements were performed on UV-Vis spectrophotometer and the GSH concentration was determined by a molar absorption coefficient ($\varepsilon$) which is $14.15 \times 10^{-3}$ M⁻¹ cm⁻¹.

Tests have shown that centrifugation of plasma prior to spectrophotometric determination of GSH is optimal in order to remove interfering molecules and to determine the actual GSH concentration. Blood sample needs to be treated with 5% chlorodhydrogen acid, to remove possible interfering molecules with the reagents, and to reliably measure GSH. Storing plasma and blood sample at 37 °C and the humid atmosphere after 24 hours showed statistically significant increase in GSH level in blood and plasma, probably due to GSH synthesis in blood cells. Storing blood and plasma samples at -20 °C for 8 or 30 days did not affect the level of the GSH. Therefore can be concluded that during storage of plasma and blood samples at -20 °C for 30 days GSH was not degraded.
8. Prilog
**Popis kratica**

ADP – adenin difosfat

ATP – adenin trifosfat

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DTNB – Ellmanov reagens, 5,5’-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina)

GSH – reducirani glutation

GSSG – oksidirani glutation

H₂O – voda

H₂O₂ – vodikov peroksid

NADH – Nikotin amid dinukleotid reduktaza

NADP – nikotinamid dinukleotid fosfat

NADPH – nikotinamid dinukleotid hidrogenfosfat

ROS – reactive oxygen species, slobodni kisikovi radikali

UCP – mitochondrial uncoupling proteins, slobodni mitohondrijski protein
9. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card
Ispitivanje stabilnosti glutation u uzorcima plazme i krvi

Vesna Vujeva

Sažetak

Reducirani glutation (GSH) tripeptid je cisteina, glutaminske kiseline i glicina te predstavlja najvažniji neenzimatski antioksidans u organizmu. Cilj ovoga istraživanja bio je optimizirati metodu mjerenja GSH u ljudskoj krvi i plazmi te ispitati stabilnost GSH prilikom pohranjivanja uzoraka. Uzorci krvi i plazme pribavljeni su od dobrovoljnog davatelja krvi. Ispitivanje stabilnosti GSH provedeno je tako da je jedan uzorak podijeljen u četiri epruvete. U prvom uzorku plazme ili krvi koncentracija GSH izmjerena je odmah. Dio je uzoraka pohranjen u inkubatoru (na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂), a preostala po dva uzorka nakon sakupljanja pospremljeni su u zamrzivač na -20 °C na 8 i 30 dana. Koncentracija GSH izmjerena je pomoću Ellmanovog reagensa (5,5'-ditiol-2-nitrobenzojeva kiselina, DTNB), spektrofotometrijski pri valnoj duljini λ = 412 nm i sobnoj temperaturi. Reakcija tiolne skupine GSH s DTNB om odvija se na sobnoj temperaturi i pH = 7,4 pri čemu nastaje žuti produkt 5'-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB). Mjerenja su provedena na UV-Vis spektrofotometru, a koncentracija GSH određena je pomoću molarnog apsorpcijskog koeficijenta (ε) koji iznosi 14,15 x 10⁻³ M⁻¹ cm⁻¹.

Ispitivanja su pokazala da je centrifugiranje plazme, prije spektrofotometrijskog određivanja GSH optimalno kako bi se uklonio dio interferencije koje bi mogle reagirati sa DTNB reagensom i odredila koncentracija GSH. Za određivanje koncentracije GSH u krvi potrebno je krv tretirati s 5 % klorovodičnom kiselinom kako bi se uklonile interferencije i omogućilo određivanje GSH. Nakon pohranjivanja uzorka krvi na 37 °C u vlažnoj atmosferi tijekom 24 sata uočen je statistički značajan porast koncentracije GSH u plazmi i u krvi te se može zaključiti da su ovi uvjeti potakli sintezu GSH u krvinim stanicama. U uzorcima plazme i krvi pohranjenima -20°C tijekom 8 i 30 dana nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji GSH. Stoga se može zaključiti da prilikom pohranjivanja uzoraka plazme i krvi na -20 °C do 30 dana ne dolazi do razgradnje GSH.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 35 stranica, 7 slika, 9 tablica, 27 citata. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: glutation, antioksidansi, oksidacijski stres, stabilnost GSH, DTNB, biološki uzorak

Mentori: Dr. sc. Ana-Marija Domijan, redoviti profesor, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Marko Gerić, znanstveni suradnik, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada

Ocjjenjivači: Dr. sc. Ana-Marija Domijan, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr.sc. Marko Gerić, znanstveni suradnik, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Dr.sc. Petra Turčić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

TESTING OF GLUTATION STABILITY IN SERUM AND PLASMA SAMPLES

Vesna Vujeva

SUMMARY

Reduced glutathione (GSH) is cysteine, glutamic acid and glycine tripeptide. It is the most important non-enzymatic antioxidant in the body. The aim of this study was to optimize the GSH measurement method in human blood and plasma samples, and to investigate GSH stability when storing samples. Blood and plasma samples were obtained from volunteer blood donor. To test GSH stability blood or plasma sample was divided into four tubes. In the first sample, concentration of GSH was measured immediately. Part of the samples were stored in the incubator (at 37 °C in a humid atmosphere with 5% CO₂) and the remaining samples were frozen at -20 °C and kept for 8 or 30 days. GSH concentration was measured using an Ellman reagent (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB spectrophotometrically at wavelength λ = 412 nm on room temperature. The reaction of thiol group GSH with DTNB was carried out at room temperature and pH 7.4, resulting in a yellow product of 5'-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB). The measurements were performed on UV-Vis spectrophotometer and the GSH concentration was determined by a molar absorption coefficient (ε) which is 14.15 x 10⁻³ M⁻¹ cm⁻¹.

Tests have shown that centrifugation of plasma prior to spectrophotometric determination of GSH is optimal in order to remove interfering molecules and to determine the actual GSH concentration. Blood sample needs to be treated with 5% chlorodhydrogen acid, to remove possible interfering molecules with the reagents, and to reliably measure GSH. Storing plasma and blood sample at 37 °C and the humid atmosphere after 24 hours showed statistically significant increase in GSH level in blood and plasma, probably due to GSH synthesis in blood cells. Storing blood and plasma samples at -20 °C for 8 or 30 days did not affect the level of the GSH. Therefore can be concluded that during storage of plasma and blood samples at -20 °C for 30 days GSH was not degraded.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 35 pages, 7 pictures, 9 tables and 27 literature references. Original is in Croatian language.

Key words: glutathione, antioxidants, oxidative stress, GSH stability, DTNB, biological sample

Mentors: Ana-Marija Domijan, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Marko Gerić, Ph.D. research assistant, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb

Reviewers: Ana-Marija Domijan, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Marko Gerić, Ph.D. research assistant, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb

Petra Turčić, Ph.D. Professor Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
