

# Optimiziranje spektrofotometrijske metode za određivanje glutationa u punoj krvi

---

Đuranec, Anja

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:163:362509>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Anja Đuranec**

**Optimiziranje spektrofotometrijske metode za  
određivanje glutaciona u punoj 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 i u Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane-Marije Domijan i suvoditeljstvom dr. sc. Marka Gerića, znanstvenog suradnika Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada.

*Zahvaljujem svojim mentorima, prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan i dr. sc. Marku Geriću, na strpljenju, stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se asistentu Ivanu Duki, mag. pharm. na pomoći u izvođenju eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala prijateljima i kolegama što su bili uz mene i uljepšali mi studentske dane.*

*Posebno zahvaljujem svojim roditeljima i sestri na pruženoj podršci, ljubavi i pomoći tijekom studija.*

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Oksidacijski stres.....	2
1.2. Slobodni radikali .....	2
1.3. Antioksidansi.....	4
1.3.1. Glutation.....	5
1.3.2. Redoks procesi glutaciona .....	6
1.4. Malondialdehid.....	7
2. Obrazloženje teme.....	8
3. Materijali i metode .....	10
3.1. Kemikalije .....	11
3.2. Oprema .....	11
3.3. Biološki uzorak .....	11
3.4. Metoda određivanja GSH.....	12
3.4.1. Princip određivanja GSH .....	12
3.4.2. Priprema otopina za određivanje GSH.....	12
3.4.3. Postupak pripreme uzoraka krvi za određivanje koncentracije GSH.....	14
3.5. Metoda određivanja MDA .....	15
3.5.1. Princip metode određivanja MDA .....	15
3.5.2. Priprema otopina .....	15
3.5.3. Postupak pripreme uzoraka krvi za određivanje MDA.....	15
3.6. Statistička obrada rezultata.....	16
4. Rezultati i rasprava.....	17
4.1. Odabir kiseline za uklanjanje proteina iz uzorka krvi.....	18
4.2. Odabir koncentracije pufera u reakcijskoj smjesi .....	21
4.3. Ispitivanje sastava reakcijske smjese .....	22
4.4. Ispitivanje stabilnosti GSH prilikom pohranjivanja supernatanta.....	24
4.5. Ispitivanje stabilnosti produkta reakcije GSH i DTNB-a, 5'-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB).....	26
4.6. Ispitivanje linearnosti metode .....	27
4.7. Ispitivanje određivanja MDA.....	28
5. Zaključci.....	30
6. Literatura .....	32
7. Sažetak/ Summary.....	36
8. Prilog .....	39
9. Temeljna dokumentacijska kartica	

## **1. Uvod**

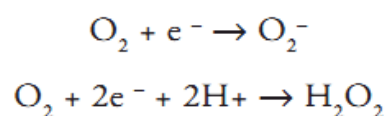
## 1.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres definira se kao pomak ravnoteže u oksidacijsko-redukcijskim procesima u stanici, u smjeru oksidacije, što može dovesti do oštećenja stanice (Halliwell i Whiteman, 2004). Oksidacijski stres nastaje zbog neučinkovitosti staničnog antioksidativnog sustava ili zbog pojačane sinteze oksidansa te rezultira većom razinom slobodnih radikala u stanici. Slobodni radikali mogu se kovalentno vezati na makromolekule stanice poput proteina, nukleinskih kiselina i lipida te tako uzrokovati gubitak njihove funkcije (Testa i Krämer, 2010.). Pored toga, slobodni radikali sudjeluju u procesima stanične proliferacije, genske transkripcije, unutarstanične signalizacije i apoptoze. Njihova povećana koncentracija unutar stanice uzrokuje poremećaje u tim procesima, što može dovesti do oštećenja tkiva i organa. Stoga se oksidacijski stres povezuje s patogenezom brojnih bolesti i stanja kao što su kardiovaskularne, neurodegenerativne, autoimune bolesti, kao i uz nastanak karcinoma te proces starenja (Ighodaro i Akinloye, 2017).

## 1.2. Slobodni radikali

Slobodni radikal je spoj koji sadrži jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci. Mala je i difuzibilna molekula, vrlo reaktivna zbog svog nastojanja da popuni vanjsku orbitalu i postigne stabilnu elektronsku konfiguraciju (Jones, 2008.). Da bi postigli elektronsku stabilnost, slobodni radikali reagiraju s prvom susjednom molekulom uzimajući njezin elektron te na taj način stvaraju novu molekulu slobodnog radikala. Susjedne molekule time i same postaju nestabilne, reagiraju s drugim prostorno bliskim molekulama te pokreću novi niz nezemskih lančanih reakcija (Parčetić-Kostelac i sur., 2016).

Najznačajniji slobodni radikali su reaktivni kisikovi spojevi (ROS, eng. *Reactive Oxygen Species*). ROS-ovi su djelomično reducirani metaboliti kisika koji nastaju uslijed prijenosa elektrona na molekulu kisika. Molekula kisika ima dva nesparena elektrona u osnovnom stanju, a primanjem jednog elektrona nastaje superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ). Primanjem još jednog elektrona i protoniranjem  $O_2^{\cdot-}$  prelazi u vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) prema reakciji:



Nastali  $H_2O_2$  ima jaki oksidacijski potencijal zbog svoje mogućnosti da prolazi membrane i stvara nove radikale (Štefan i sur., 2007). Stoga se  $H_2O_2$  svrstava u reaktivne intermedijere kisika. Reaktivni intermedijeri kisika su spojevi koji iako sami nemaju nesparenih elektrona, također mogu potaknuti oksidativne reakcije (Halliwell i Gutteridge, 1984). U Tablici 1 navedeni su neki od ROS-ova.

Tablica 1. Vrste reaktivnih kisikovih spojeva, ROS-ova.

SLOBODNI RADIKALI		REAKTIVNI INTERMEDIJERI	
superoksid radikal	$O_2^{\cdot-}$	vodikov peroksid	$H_2O_2$
hidroksil radikal	$HO^{\cdot}$	hipoklorasta kiselina	$HOCl$
peroksil radikal	$RO_2^{\cdot}$	hipobromasta kiselina	$HOBr$
alkoksi radikal	$RO^{\cdot}$	Ozon	$O_3$
hidroperoksil radikal	$HO_2^{\cdot}$	singlet kisik	$^1\Delta gO_2$

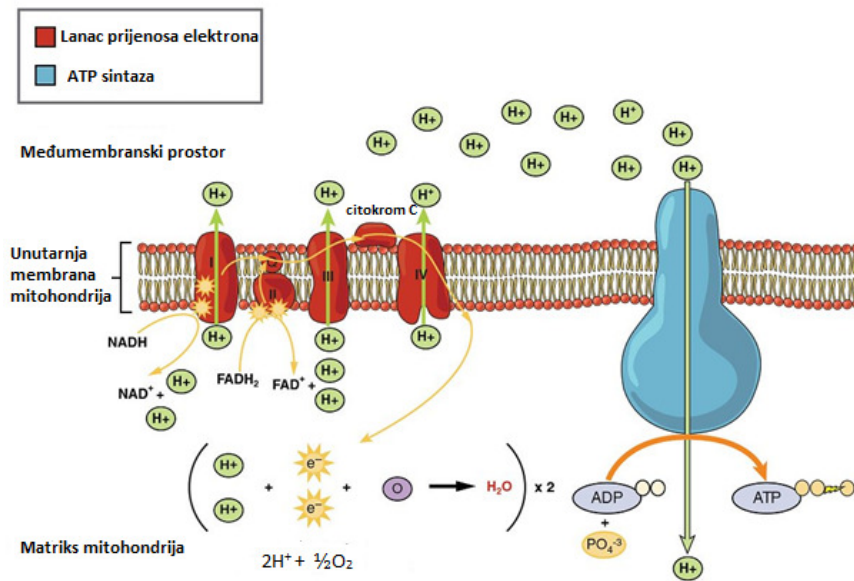
Uz ROS-ove uzročnici oksidativnog stresa su i reaktivni spojevi dušika (RNS, eng. *Reactive Nitrogen Species*) od kojih su najvažniji  $NO^{\cdot}$  i  $NO_2^{\cdot}$  (Tablica 2).  $NO^{\cdot}$  kao radikal može reagirati s endogenim radikalima, npr. sa superoksidnim radikalom,  $O_2^{\cdot-}$  stvarajući pritom peroksinitrite ( $ONOO^-$ ) koji su izrazito jaki oksidansi (Štefan i sur., 2007).

Tablica 2. Vrste reaktivnih dušikovih spojeva, RNS.

SLOBODNI RADIKALI		ČESTICE KOJE NISU SLOBODNI RADIKALI	
dušikov ( II ) oksid	$NO^{\cdot}$	Nitrozil	$NO^+$
dušikov ( IV ) oksid	$NO_2^{\cdot}$	nitritna kiselina	$HNO_2$
		dušikov ( III ) oksid	$N_2O_3$
		Peroksinitrit	$ONOO^{\cdot}$
		Alkilperoksinitrit	$ROONO$

Izvori slobodnih radikala u organizmu mogu biti endogeni i egzogeni. Među najznačajnije vanjske izvore spadaju zračenje (ionizirajuće i neionizirajuće), lijekovi, pesticidi, dim cigareta te različiti industrijski otrovi (Lobo i sur., 2010).

Endogeno, najviše slobodnih radikala nastaje u mitohondrijima i to na unutarnjoj membrani mitohondrija na kojoj se odvija proces oksidativne fosforilacije (Slika 1). Sustav prijenosa elektrona može dovesti do prijevremenog „curenja“ elektrona s transportnog lanca na molekularni kisik te dolazi do stvaranja superoksidnog radikala,  $O_2^{\cdot-}$ . Nastale reaktivne vrste uzrokuju oštećenje komponenti mitohondrija te iniciraju daljnje procese degradacije (Cadenas i Davies, 2000).



Slika 1. Prijenos elektrona u procesu oksidativne fosforilacije (preuzeto iz: <https://biologydictionary.net> i prilagođeno).

### 1.3. Antioksidansi

Ljudski organizam razvio je kompleksnu mrežu enzimskih i neenzimskih antioksidansa koji svojim sinergističkim djelovanjem štite stanice i organe od toksičnog učinka slobodnih radikala, odnosno služe održavanju oksido-reduktivne ravnoteže. Antioksidans je svaka molekula koja ima sposobnost stabiliziranja ili deaktiviranja slobodnog radikala prije nego što slobodni radikal ošteti stanične komponente. Antioksidansi mogu biti endogene i egzogene tvari, a obzirom na nivo njihova djelovanja u stanici dijele se na prvu, drugu, treću i četvrtu liniju obrane (Ighodaro i Akinloye, 2017).

Prvu liniju obrane čine antioksidansi koji sprječavaju nastajanje slobodnih radikala neutralizirajući molekule koje imaju potencijal stvaranja slobodnih radikala i reaktivnih vrsta općenito. Najznačajniji iz te skupine su enzimski sustavi – superoksid dizmutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation-peroksidaza (GPx), ali također bitnu ulogu imaju i proteini transferin i ceruloplazmin.

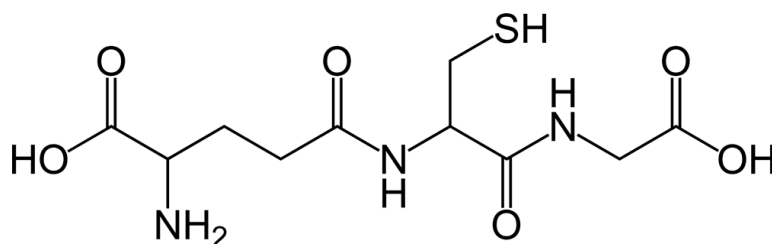
Sekundarnu liniju obrane čine antioksidansi koji, donirajući elektron, sami postaju slobodni radikali, ali s bitno manjim potencijalom oštećenja stanice od onih koje su neutralizirali. U sekundarnu liniju obrane spadaju askorbinska kiselina, glutation (GSH), vitamin E i ubikinon.



Tercijarna i kvartarna linija obrane aktiviraju se nakon što se pojavi oštećenje uzrokovano slobodnim radikalima. Riječ je o enzimskim sustavima koji će prepoznati, popraviti ili ukloniti oštećenja uzrokovana slobodnim radikalima na DNA, lipidima ili proteinima te tako spriječiti lančane reakcije i oštećenja stanica i tkiva. U treću liniju obrane ubrajaju se DNA-polimeraza, nukleaza, glikozilaze i proteolitički enzimi, dok kvartarna linija osigurava praćenje signala generiranih slobodnim radikalima te prema njima formira i usmjerava mrežu antioksidansa (Ighodaro i Akinloye, 2017).

### 1.3.1. Glutation

Glutation je glavni tiolni antioksidans u stanicama sisavaca. Po svojoj strukturi je tripeptid,  $\gamma$ -glutamyl-cisteinyl-glicin (Slika 2). U stanicama se nalazi u visokoj koncentraciji (0,5-10 mM), dok je u plazmi prisutan u mikromolarnim koncentracijama (Rendić i Medić-Šarić, 2013). Sintetizira se djelovanjem  $\gamma$ -glutamylcistein-sintetaze ( $\gamma$ -GCS) te glutathion sintetaze (GS) u ciklusu od šest enzimski kataliziranih reakcija. Sinteza se odvija u svim organima sisavaca, a ponajviše u jetri (Pastore i sur., 2003).



Slika 2. Struktura reduciranog oblika glutathiona, GSH.

U stanici GSH može biti vezan na proteine ili slobodan. Slobodni GSH najvećim je dijelom u reduciranom obliku koji je ujedno i njegov biološki aktivni oblik. Uslijed oksidativnog stresa dolazi do oksidacije GSH u glutathion disulfid (GSSG). Oksidirana forma akumulira se unutar stanica te je stoga omjer GSH/GSSG dobar pokazatelj oksidativnog stresa u organizmu (Halliwell i Gutteridge, 2015).

GSH se svojom tiolnom skupinom može vezati na proteinske komponente koje također sadrže  $-SH$  skupinu tvoreći mješovite disulfide. Primjer takvih komponenti su cistein i koenzim A (CoA), a tako nastali adukti mogu imati biološke učinke. Primjerice, CoA-GSH adukt je jak vazokonstriktor, dok disulfid cisteina i GSH ima ulogu u signalnim putevima nekih vrsti razreda *Polychaete* (Halliwell i Gutteridge, 2015).

Uloge GSH u organizmu su stoga brojne. GSH osigurava redukcijski kapacitet reakcija (primjerice redukcija dehidroaskorbata u askorbat i sinteza deoksiribonukleotida), sudjeluje u metabolizmu endogenih metabolita (leukotrieni, prostaglandini) i u transportu aminokiselina. Također sudjeluje u detoksifikaciji ksenobiotika njihovim izlučivanjem u obliku derivata merkapturane kiseline, a kao najvažnija uloga ističe se ona u detoksifikaciji vodikovog peroksida i slobodnih radikala, odnosno njegova uloga antioksidansa (Pastore i sur., 2003).

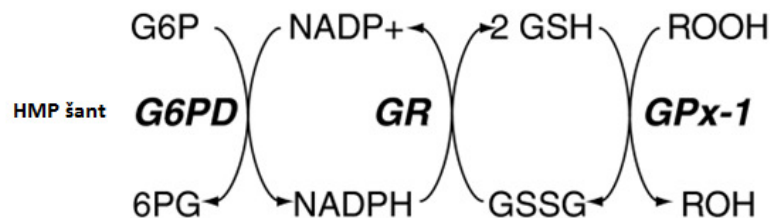
### 1.3.2. Redoks procesi glutationa

GPx je unutarstanični enzim koji katalizira oksidaciju GSH u smjeru hidroperoksida te na taj način vodikove i lipidne perokside prevodi u netoksične spojeve prema reakciji:



Smatra se da postoji osam izoformi GPx od kojih je GPx-1 najzastupljenija te je među najvažnijima u antioksidativnoj obrani organizma.

Drugi enzim, glutation reduktaza (GR), zatvara ciklus neprestano reducirajući GSSG u GSH koristeći NADPH kao izvor redukativnih ekvivalenata. Enzim glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PD) donira i održava stanične količine NADPH potrebne za reakciju. Isti enzim monofosfatnim šantom (HMP) povezuje NADPH i GR s glukoza-6-fosfatom (G6P) i 6-fosfoglukonatom (6PG) te ih tako vezuje na put GSH u stanici (Slika 3).



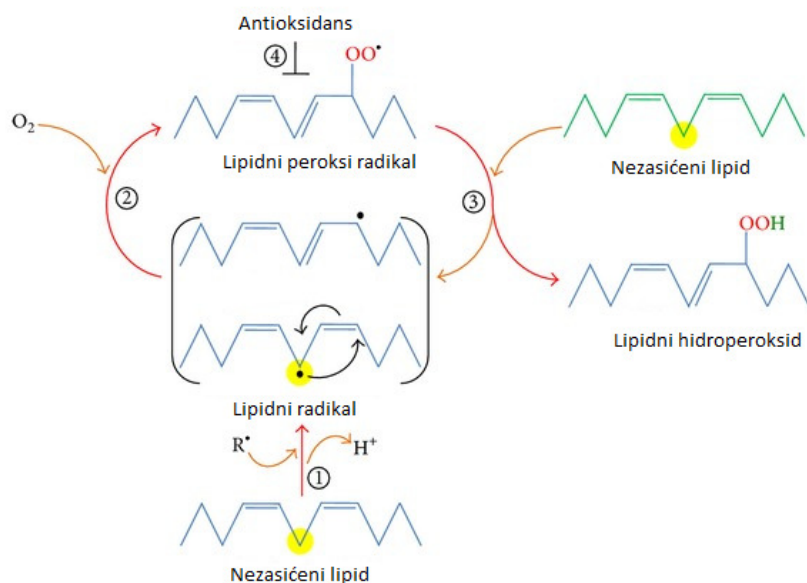
Slika 3. GSH redoks ciklus (preuzeto iz: Lubos i sur., 2011. i prilagođeno).

Enzimatskom detoksifikacijom neradikalnih hidroperoksida GPx regulira oksidacijski status stanice izravno kroz oksidaciju GSH i eliminaciju hidroperoksida. Upravo zbog svoje važne uloge u regulaciji oksidacijskog statusa, GPx se vezuje uz razvoj i prevenciju mnogih bolesti

kompleksne etiologije, primjerice karcinoma i kardiovaskularnih bolesti gdje se razmatra i njezina moguća terapijska uloga (Lubos i sur., 2011).

#### 1.4. Malondialdehid

Malondiladehid (MDA) je produkt lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija posljedica je „napada“ slobodnih radikala na višestruko nezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acid* - PUFA). PUFA-e su prisutne u staničnim membranama te su stoga prve s kojima slobodni radikali stupaju u reakcije. U reakciji slobodnih radikala i PUFA-e, slobodni radikali izdvajaju atom vodika iz metilenske skupine te tako iz PUFA nastaju lipidni radikali. Proces se odvija u tri koraka – inicijacija, propagacija, terminacija kako je prikazano na Slici 4 (Štefan i sur., 2007).



Slika 4. Lipidna peroksidacija (preuzeto iz: Ayala i sur., 2014. i prilagođeno).

Najvažniji ROS-ovi koji oksidiraju PUFA-u su hidroksilni (HO<sup>•</sup>) i hidroperoksilni radikal (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>).

Lipidna peroksidacija i MDA kao njezin produkt imaju važnu ulogu u biologiji stanice i ljudskom zdravlju općenito. Povezanost MDA s genskom ekspresijom i staničnim preživljenjem čini ga predmetom brojnih biomedicinskih istraživanja. Zbog svoje iznimne toksičnosti s jedne strane, i reaktivnosti i jednostavne reakcije s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) s druge strane, vrlo je popularan i pouzdan marker za određivanje lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa stanice (Ayala i sur., 2014).

## **2. Obrazloženje teme**

Tripeptid GSH sastoji se od aminokiselina cisteina, glutaminske kiseline i glicina. Aktivna skupina GSH je tiolna skupina (-SH) koja je smještena na cisteinu. GSH je glavni tiol uključen u antioksidativnu obranu stanice te zajedno sa svojim oksidiranim oblikom, GSSG, održava redoks homeostazu stanice. Također, GSH sudjeluje u detoksifikaciji ksenobiotika i njihovom izlučivanju, a pored toga ima važnu ulogu u staničnoj signalizaciji, genskoj ekspresiji te regulaciji funkcije proteina u stanici (Jiang i sur., 2017). Snižena koncentracija GSH povezuje se s brojnim patofiziološkim procesima. Primjerice, niža razina GSH dovodi se u vezu s nastankom karcinoma i kardiovaskularnih bolesti (Pastore i sur., 2003). Istraživanja pokazuju kako polimorfizam u ekspresiji gena koji kodiraju za enzime uključene u homeostazu GSH ima utjecaja na progresiju neurodegenerativnih bolesti, cistične fibroze, karcinoma, utjecaj na osjetljivost na infekcije HIV-om te na procese starenja (Townsend i sur., 2003). Upravo stoga se istražuje uloga GSH u patogenezi, a potencijalno i u terapiji brojnih bolesti i stanja. Također, MDA je jedan od najčešće istraživanih produktata lipidne peroksidacije te ga je kao takvog poželjno uključiti u istraživanja o oksidacijskom stresu.

Obzirom na brojne i važne uloge GSH u organizmu, nameće se potreba praćenja njegove koncentracije u organizmu. U tu svrhu potrebno je razviti metode koje će omogućiti određivanja točne koncentracije GSH u biološkim uzorcima. Cilj ovoga istraživanja je uvesti pouzdanu metodu kojom bi se točno i precizno mogla odrediti koncentracija GSH u punoj krvi. Za praćenje koncentracije GSH u punoj krvi odabrana je spektrofotometrijska metoda kojom se pomoću 5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeve kiseline), DTNB-a, tzv. Ellmanovog reagensa može odrediti koncentracija GSH (Pastore i sur., 2003). Za provođenje ispitivanja optimiziranja metode pribavljen je kontrolni uzorak krvi zdravog donora.

U svrhu optimiziranja metode za određivanje koncentracije GSH u punoj krvi provesti će se više pokusa. U prvom dijelu istraživanja ispitat će se optimalni uvjeti pripreme uzorka krvi za spektrofotometrijsko određivanje GSH. Potom će se ispitati reakcijski uvjeti pri kojima se odvija reakcija GSH i DTNB-a, temeljna reakcija na kojoj se metoda zasniva. U slijedećem koraku ispitati će se stabilnosti GSH u supernatantu za vrijeme pohranjivanja supernatanta te će se ispitati stabilnost produkta reakcije GSH i DTNB-a. Kako bi se utvrdila pouzdanost metode, odnosno je li optimiziranom metodom moguće pouzdano izmjeriti koncentraciju GSH u punoj krvi, pomoću standarda GSH ispitati će se linearnost metode. Također, ispitat će se mogućnost određivanja koncentracije MDA iz istog supernatanta krvi pripremljenog za određivanje koncentracije GSH.

### **3. Materijali i metode**

### 3.1. Kemikalije

U ovom istraživanju korištene su slijedeće kemikalije:

- kalijev dihidrogenfosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- kalijev hidrogenfosfat,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- trikloroocetna kiselina, TCA (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina), DTNB (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD)
- reducirani glutation, GSH (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD)
- etilendiamintetraocetna kiselina, EDTA (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD)
- 2-tiobarbituratna kiselina, TBA (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD).

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

### 3.2. Oprema

U istraživanju je korištena slijedeća oprema:

- analitička vaga, Pb 303 Delta Range (Mettler Toledo, Švicarska)
- miješalica, Vortex-Heidolph model REAX top (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka)
- centrifuga, Frontier 5706 (Ohaus, Greifensee, Švicarska)
- pH metar, HI 9025 (Hanna instrument, Portugal)
- Grijač, G-Term 035 (Fratelli Galli, Milano, Italija)
- UV-Vis spektrometar, PG T70 (PG Instruments, Lutterworth, UK)
- Kiveta, Open-top UV-quartz cell (Agilent Technologies, CA, SAD).

### 3.3. Biološki uzorak

Za uvođenje metode određivanja GSH u punoj krvi pribavljen je uzorak krvi od zdravog pojedinca, dobrovoljnog davaoca krvi u suradnji s Institutom za medicinska istraživanja i medicinu rada. Krv je donirala mlađa muška osoba koja prethodno nije bila izložena zračenju i lijekovima koji bi mogli imati utjecaja na koncentraciju GSH i MDA u krvi. Uzorkovanje krvi provedeno je prema pravilima i u skladnosti s dopusnicom Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada. Donoru je zajamčena

anonimnost, bio je upoznat sa svrhom istraživanja kao i s mogućnošću bezrazložnog odustajanja od istraživanja u bilo kojem trenutku. Kako je cilj istraživanja bio uvesti metodu za određivanje koncentracije GSH u punoj krvi te ispitati utjecaj različitih uvjeta reakcije prilikom pripreme uzorka, cijelo istraživanje provedeno je na istom uzorku krvi.

### **3.4. Metoda određivanja GSH**

#### **3.4.1. Princip određivanja GSH**

Spektrofotometrijska metoda određivanja GSH temelji se na kolorimetrijskoj reakciji GSH s DTNB-om (5,5-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina)) ili Ellmanov reagens. U blago alkalnim uvjetima (pH 7-8) DTNB reagira s tiolnom skupinom (-SH) pri čemu nastaje 2-nitro-5-benzoatni anion (TNB<sup>2-</sup>). Nastali produkt žute je boje, a intenzitet obojenja moguće je izmjeriti pomoću UV-Vis spektrofotometra na valnoj duljini od 412 nm (Pastore i sur., 2003). Koncentraciju GSH u uzorku može se izračunati prema Lambert-Beerovom zakonu i poznatom apsorpcijskom koeficijentu,  $\epsilon=14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Eyer i sur., 2003)

#### **3.4.2. Priprema otopina za određivanje GSH**

##### Priprema 1 % i 5 % otopine trikloroetane kiseline (TCA)

Prethodno je pripremljena 10 % TCA tako što je odvagano 1 g TCA, kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 10 ml te nadopunjeno s destiliranom vodom. 1% TCA pripremljena je razrjeđivanjem 10 % TCA 10 puta; za pripremu 10 ml 1 % TCA potrebno je uzeti 1 ml 10% TCA i 9 ml vode.

Za dobivanje 10 ml 5 % TCA treba uzeti 5 ml 10% TCA i 5 ml destilirane vode. 1 % i 5 % TCA korištene su za taloženje proteina iz biološkog uzorka (krvi) prije izvođenja reakcije.

##### Priprema 0,3 M K-fosfatnog pufera pH 7,4

Prvo je odvagano 10,2068 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  te je odvaga kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 250 ml i nadopunjena s destiliranom vodom. Tako je dobivena 0,3 M otopina



$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Potom je pripremljena 0,3 M otopina  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  vaganjem 13,0635 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  te njegovim otapanjem u 250 ml destilirane vode.

0,3 M K-fosfatni pufer pH 7,4 pripremljen je tako da su 0,3 M otopina  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 0,3 M otopina  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pomiješane do tražene pH vrijednosti. Pufer je korišten kao otapalo te općenito medij za izvođenje reakcija. U 100 ml pufera dodano je 0,0037 g EDTA, kako bi otopina sadržavala 0,1 mM EDTA. EDTA kao kelator metala sprečava autooksidaciju GSH u uzorku.

#### Priprema 1 M K-fosfatnog pufera pH 7,4

Za pripremu 1 M otopine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  prvo je odvagano 13,609 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  te preneseno u odmjernu tikvicu od 100 ml i nadopunjeno s destiliranom vodom. 1 M otopina  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pripremljena je vaganjem 17,418 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Ta je odvaga kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 100 ml i nadopunjena s destiliranom vodom.

1 M K-fosfatni pufer pH 7,4 pripremljen je miješanjem 1 M otopine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 1 M otopine  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  do tražene pH vrijednosti. Pufer je korišten kao otapalo te općenito medij za izvođenje reakcija. U 100 ml pufera također se dodaje 0,0037 g EDTA kako bi u otopini koncentracija EDTA bila 0,1 mM. EDTA veže metale iz uzorka te na taj način sprječava autooksidaciju GSH u uzorku.

#### Priprema otopine 1 mM DTNB-a

Prvo je pripremljena otopina 10 mM DTNB. 10 mM DTNB pripremljen je vaganjem 0,0396 g DTNB-a na analitičkoj vagi. Odvaga je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 10 ml te nadopunjena otopinom 1M K-fosfatnog pufera. 1 mM otopina DTNB-a pripremila se razrjeđivanjem 10 puta otopine 10 mM DTNB-a. 1 mM otopinu DTNB-a preciznije je pripremiti razrjeđivanjem 10 mM otopine nego vaganjem 0,00396 g DTNB-a. Otopina je korištena kao reagens za dokazivanje GSH.

#### Priprema standarda GSH

Matična otopina standarda GSH priređena je otapanjem 0,284 g otopine GSH u 3 ml 1 M K-fosfatnog pufera, pH 7,4. Koncentracija tako priređene matične otopine bila je 0,308 M. Matična je otopina razrijeđena 1000 puta, do koncentracije  $3,08 \cdot 10^{-4}$  M te su iz te otopine pripremljene otopine standarda GSH u 1 M K-fosfatnom puferu (pH 7,4) kako bi koncentracija GSH u ukupnoj reakcijskoj smjesi ( $V=900 \mu\text{l}$ ) bila u koncentracijskom nizu

od 10 do 60  $\mu\text{M}$ . Tablicom 3 prikazan je postupak dobivanja koncentracijskog niza standardnih otopina GSH.

Tablica 3. Postupak pripreme standarda GSH.

Priprema otopina	Koncentracija standarda GSH u ukupnoj reakcijskoj smjesi ( $V=900 \mu\text{l}$ ; $500 \mu\text{l}$ supernatanta + $350 \mu\text{l}$ K-fosfatnog pufera + $50 \mu\text{l}$ DTNB-a) ( $\mu\text{M}$ )
29,2 $\mu\text{l}$ matične otopine ( $3,08 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) nadopuniti 1M K-fosfatnim puferom do 350 $\mu\text{l}$	10
43,8 $\mu\text{l}$ matične otopine ( $3,08 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) nadopuniti 1M K-fosfatnim puferom do 350 $\mu\text{l}$	15
87,7 $\mu\text{l}$ matične otopine ( $3,08 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) nadopuniti 1M K-fosfatnim puferom do 350 $\mu\text{l}$	30
131,5 $\mu\text{l}$ matične otopine ( $3,08 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) nadopuniti 1M K-fosfatnim puferom do 350 $\mu\text{l}$	45
175,3 $\mu\text{l}$ matične otopine ( $3,08 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) nadopuniti 1M K-fosfatnim puferom do 350 $\mu\text{l}$	60

### 3.4.3. Postupak pripreme uzoraka krvi za određivanje koncentracije GSH

Uzorci krvi prvo su tretirani s 5 % TCA, homogenizirani te centrifugirani (6000 rpm, 20 min) kako bi se uklonili proteini. Potom je pažljivo odvojeno 500  $\mu\text{l}$  supernatanta te je u njega dodano 350  $\mu\text{l}$  1 M K-fosfatnog pufera, pH=7,4 i 50  $\mu\text{l}$  1 mM DTNB-a. Uz uzorke

pripremljen je i uzorak destilirane vode koji je služio kao slijepa proba. Intenzitet nastalog obojenog kompleksa GSH-DTNB izmjeren je pomoću UV-Vis spektrofotometra pri valnoj duljini 412 nm prema slijepoj probi.

Koncentracija GSH u uzorku krvi izračunata je pomoću Lambert-Beerovog zakona iz izmjerene apsorbancije i poznatog apsorpcijskog koeficijenta. Molarni apsorpcijski koeficijent,  $\epsilon$  (mjerna jedinica je  $M^{-1}cm^{-1}$ ) je konstantan za određeni spoj i valnu duljinu pri kojoj se mjeri (Nigović i sur., 2014). Prema Lambert-Beerovom zakonu, koncentracija tvari u otopini izračuna se kao omjer izmjerene apsorbancije i apsorpcijskog koeficijenta pomnoženog s duljinom puta svjetlosti kroz otopinu.

### **3.5. Metoda određivanja MDA**

#### **3.5.1. Princip metode određivanja MDA**

MDA u reakciji s TBA (2-tiobarbituratnom kiselinom) u kiselim uvjetima i pri povišenoj temperaturi daje intenzivno crveno obojeni adukt MDA-TBA<sub>2</sub>. Intenzitet obojenja kompleksa koji nastaje u reakciji nukleofilne adicije može se izmjeriti spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 532 nm. Pomoću Lambert-Beerovog zakona iz izmjerene apsorbancije i poznatog apsorpcijskog koeficijenta,  $\epsilon=156 \text{ mM}^{-1}cm^{-1}$  određuje se koncentracija MDA (Janero, 1990).

#### **3.5.2. Priprema otopina**

##### Priprema 0,6% otopine TBA

0,6% otopina TBA dobivena je vaganjem 0,6 g TBA i otapanjem u 100 ml destilirane vode. S obzirom da se TBA teško otapa, otapanje se vršilo uz blago zagrijavanje na grijaču/miješalici. Dobivena otopina je korištena kao kromogeni reagens za reakciju s MDA.

#### **3.5.3. Postupak pripreme uzoraka krvi za određivanje MDA**

Uzorci krvi tretirani su s 5% TCA, homogenizirani te centrifugirani (6000 rpm, 20 min) kako bi se istaložili proteini, a kako je već opisano u postupku za GSH. Potom je pažljivo odvojeno 500  $\mu$ l supernatanta u koji je dodano 500  $\mu$ l 0,6 % TBA. Uz uzorke

pripremljena je i slijepa proba koja je umjesto uzorka sadržavala destiliranu vodu. Epruvete s reakcijskom smjesom su zagrijavane na temperaturi od 90 °C kroz 30 minuta u grijaćem bloku. Nakon zagrijavanja epruvete su stavljene na led kako bi se zaustavila reakcija, a apsorbancija je izmjerena na UV-Vis spektrofotometru prema slijepoj probi pri valnoj duljini od 532 nm. Koncentracija MDA u uzorku krvi izračunata je pomoću Lambert-Beerovog zakona i poznatog apsorpcijskog koeficijenta,  $\epsilon=156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Janero, 1990).

### **3.6. Statistička obrada rezultata**

Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike u izmjerenim apsorbancijama i/ili koncentraciji GSH između grupa ispitane su pomoću t-testa u programu Excel (MS Office). Kao statistički značajna razlika uzeta je razina značajnosti od  $p < 0,05$ .

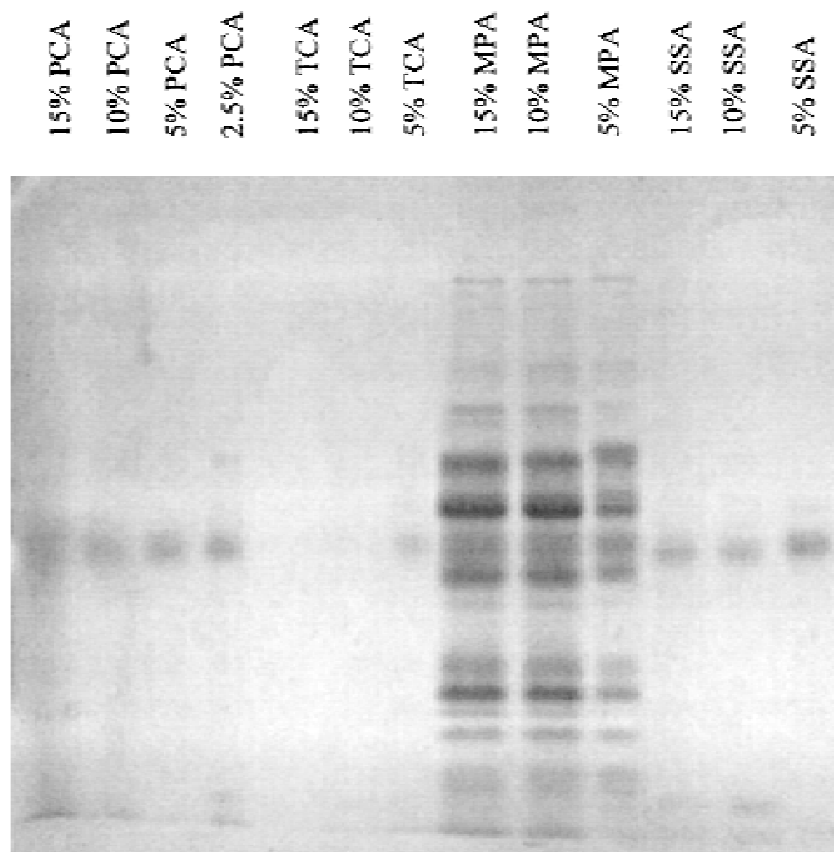
## **4. Rezultati i rasprava**

GSH je važan antioksidans u organizmu te brojna istraživanja prate njegovu koncentraciju u plazmi (Pastore i sur., 2003). Mali je broj istraživanja koja prate koncentraciju GSH u punoj krvi te je stoga cilj ovoga istraživanja bio uvesti metodu kojom bi se točno i precizno mogla odrediti koncentracija GSH u krvi.

U ovome istraživanju za određivanje koncentracije GSH odabrana je spektrofotometrijska metoda pomoću Ellmanovog reagensa, DTNB-a. Ta metoda je brza i jednostavna, no u uzorku krvi prisutni su i drugi kromogeni (primjerice hemoglobin) koji ometaju spektrofotometrijsko određivanje GSH. Pored toga DTNB nije specifičan reagens za GSH, već reagira i s tiolnim skupinama proteina iz uzorka te je proteine potrebno prethodno ukloniti iz uzorka krvi.

#### **4.1. Odabir kiseline za uklanjanje proteina iz uzorka krvi**

Kako bi se uklonili proteini iz uzorka, a koji bi ometali reakciju, potrebno je istaložiti proteine dodatkom kiseline. Istraživanje koje su proveli Stempak i suradnici (2001.) pokazalo je da nakon tretmana krvi s metafosfornom kiselinom (MPA) zaostaje najviše proteina u uzorku (Slika 5). Isto istraživanje pokazalo je da kada je krv tretirana s trikloroocetnom kiselinom, TCA, u supernatantu zaostaje neznatna količina proteina (Stempak i sur., 2001). Stoga je u ovome istraživanju za taloženje proteina odabrana TCA.

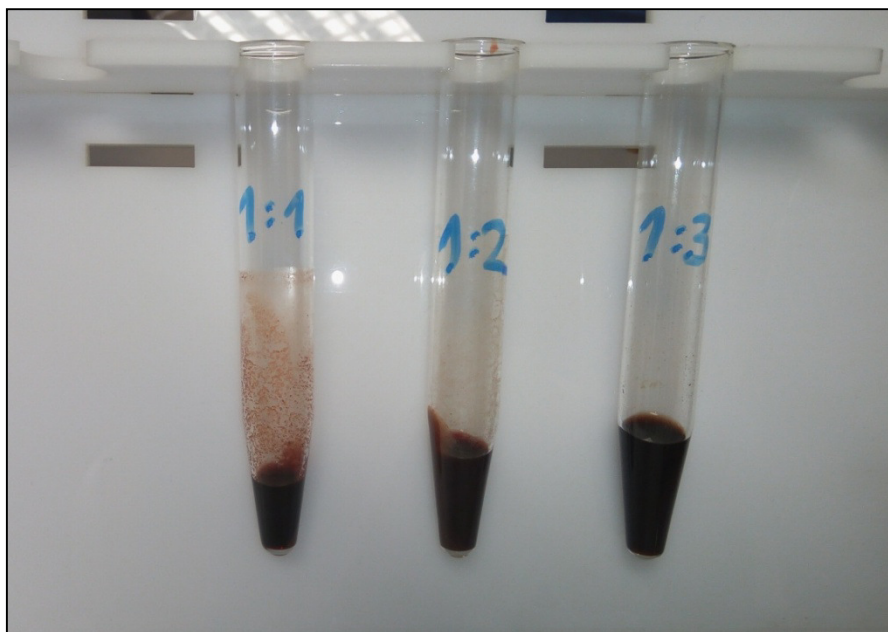


Slika 5. Gel-kromatografija: poliakrilamidni gel s nanesenim uzorcima supernatanta prikazuje sadržaj proteina nakon taloženja kiselinama, boja Coomasie Brilliant Blue R-250 korištena je za detekciju proteina (preuzeto iz: Stempak i sur., 2001. i prilagođeno).

Uvjeti u kojima se mora odvijati reakcija između GSH i DTNB-a su blago alkalni (pH 7-8) pri čemu nastaje intenzivno obojeni dianion Ellmanovog reagensa,  $TNB^{2-}$  (Pastore i sur., 2003). Upotreba jake kiseline za taloženje proteina zakiselila bi supernatant te u reakcijskoj smjesi ne bi bili optimalni uvjeti za reakciju dokazivanja GSH. Stoga su u ovome istraživanju za taloženje proteina ispitane 1% i 5% TCA. Osim jakosti kiseline, ispitivani su i različiti omjeri volumena krvi i kiseline (omjer krvi i kiseline - 1:1, 1:2 i 1:3). Cilj je dobiti veći volumen supernatanta za izvođenje pokusa, ali da se pritom supernatant ne razrijedi previše, odnosno da GSH u supernatantu bude u koncentraciji koju je moguće detektirati spektrofotometrijski. Nakon tretiranja uzorka krvi s 1% ili s 5% TCA, uzorci su homogenizirani te centrifugirani (6000 rpm, 20 min).

### Rezultat taloženja proteina s 1 % TCA

Upotreba 1% TCA nije dovela do taloženja ni u jednom od ispitanih omjera krvi i kiseline (1:1,1:2,1:3), odnosno supernatant se nije odvojio ili je bio zamućen (Slika 6.). Takav supernatant nije povoljan za određivanje koncentracije GSH u krvi.



Slika 6. Prikaz uzoraka krvi nakon tretmana s 1 % TCA i centrifugiranja (6000 rpm, 20 min).

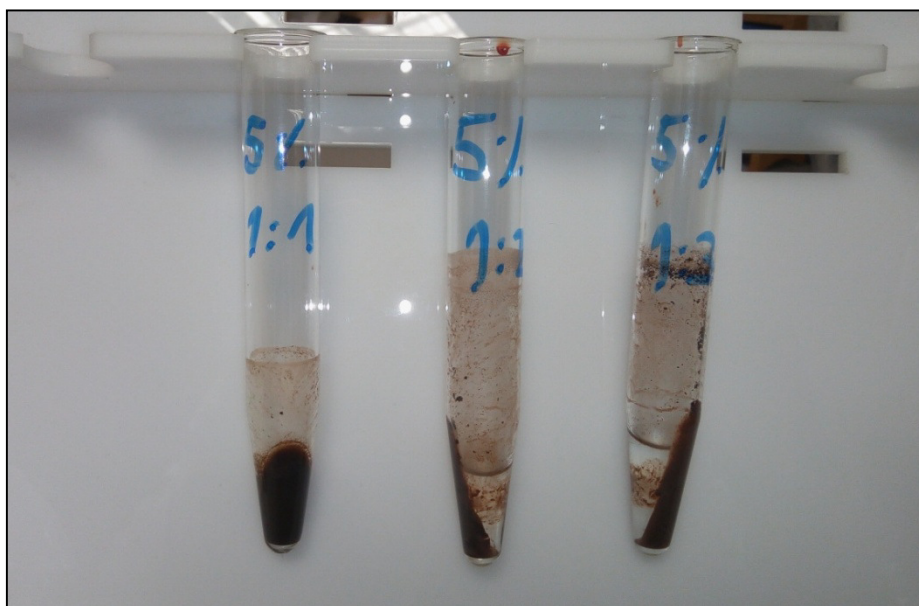
### Rezultat taloženja proteina s 5 % TCA

Uzorci krvi tretirani su s 5 % TCA u omjerima 1:1,1:2 i 1:3. Dobiveni rezultati prikazani su Tablicom 4 i Slikom 7. Uzorak krvi tretiran s 5 % TCA u omjeru 1:1 nije bio dobro istaložen, odnosno nije se odvojio bistri supernatant. Centrifugiranjem uzoraka krvi tretiranih s 5 % TCA u omjerima 1:2 i 1:3 dobiven je čisti supernatant što znači da su spojevi koji bi mogli ometati reakciju uklonjeni. Primijećeno je da što je bio veći volumen dodane kiseline, to su proteini bili bolje istaloženi i supernatant se lakše mogao odvojiti od taloga. S druge strane, veći volumen kiseline znači snižavanje pH reakcijske smjese i veće razrjeđenje uzorka što nije pogodno za spektrofotometrijsko određivanje GSH. Daljnja ispitivanja provedena su s 5 % TCA u omjerima krvi i kiseline 1:2 i 1:3.

Tablica 4. Rezultati taloženja proteina s 5 % TCA.

Omjer pune krvi i 5% TCA	Supernatant (izgled, pH, volumen)
1:1 (500 $\mu$ l pune krvi + 500 $\mu$ l 5% TCA)	Mutan (crvenkast), pH=3, V=200 $\mu$ l
1:2 (500 $\mu$ l pune krvi + 1000 $\mu$ l 5% TCA)	Bistar, pH=1, V=700 $\mu$ l
1:3 (500 $\mu$ l pune krvi + 1500 $\mu$ l 5% TCA)	Bistar, pH=1, V=850 $\mu$ l





Slika 7. Prikaz uzorka krvi nakon tretmana s 5 % TCA i centrifugiranja (6000 rpm, 20 min).

#### 4.2. Odabir koncentracije pufera u reakcijskoj smjesi

Za reakciju GSH i DTNB-a pri kojoj nastaje intenzivno obojeni dianion Ellmanovog reagensa, TNB<sup>2-</sup>, potrebni su blago alkalni uvjeti (pH 7-8). Nastali produkt je pri pH 7,27 stabilan te je 99,8% produkta u obliku obojenog dianiona (Pastore i sur., 2003). Osim na nastanak i stabilnost produkta, pH reakcijske smjese utječe i na apsorpcijski koeficijent produkta. Apсорpcijski koeficijent produkta osjetljiv je i na različite ione pufera te mu stoga vrijednost varira od 11400 do 14150 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, ovisno o reakcijskim uvjetima (Eyer i sur., 2003).

U ovome istraživanju u uzorku krvi proteini su istaloženi pomoću kiseline te je stoga pH supernatanta nizak (Tablica 4). Upravo zato potrebno je podesiti pH reakcijske smjese, a kako bi uvjeti reakcije između GSH i DTNB-a bili pogodni i kako bi se razvilo obojenje za kolorimetrijsku metodu određivanja koncentracije GSH. Za održavanje pH reakcijske smjese na temelju literaturnih podataka odabran je K-fosfatni pufer (Owens i Belcher, 1965; Pastore i sur., 2003).

U ovom istraživanju ispitani su K-fosfatni puferi molarnosti 0,3 M i 1 M. Oba pufera imala su pH 7,4 te im je dodana EDTA čija je uloga bila spriječiti oksidaciju GSH u uzorku. Za ovaj pokus krv je tretirana s 5 % TCA u omjerima 1:2 i 1:3 te je homogenizirana i centrifugirana (6000 rpm, 20 min). Potom je sakupljen supernatant kojem je izmjeren pH.

Zatim je u 500  $\mu$ l supernatanta dodano 350  $\mu$ l ili 1 M ili 0,3 M K-fosfatnog pufera. Nakon dodavanja pufera reakcijskoj smjesi je izmjeren pH. Tablice 5 i 6 pokazuju kako je dodavanje pufera različite molarnosti utjecalo na promjenu pH supernatanta.

Tablica 5. pH supernatanta prije i nakon dodatka 0,3 M K-fosfatnog pufera.

Omjer pune krvi i 5% TCA	pH supernatanta prije dodatka pufera	pH supernatanta nakon dodatka pufera
1:2 (500 $\mu$ l pune krvi + 1000 $\mu$ l 5 % TCA)	pH = 1	pH = 6
1:3 (500 $\mu$ l pune krvi + 1500 $\mu$ l 5 % TCA)	pH = 1	pH = 5

Tablica 6. pH supernatanta prije i nakon dodatka 1 M K-fosfatnog pufera.

Omjer pune krvi i 5% TCA	pH supernatanta prije dodatka pufera	pH supernatanta nakon dodatka pufera
1:2 (500 $\mu$ l pune krvi + 1000 $\mu$ l 5% TCA)	pH=1	pH=8
1:3 (500 $\mu$ l pune krvi + 1500 $\mu$ l 5% TCA)	pH=1	pH=7

Dodavanje i 0,3 M i 1 M pufera dovelo je do porasta pH reakcijske smjese, no kako je i vidljivo iz Tablica 5 i 6, samo je 1 M K-fosfatni pufer omogućio porast pH supernatanta na vrijednost optimalnu za reakciju, pH 7-8. Sukladno rezultatima daljnja ispitivanja provedena su s 1 M K-fosfatnim puferom.

#### 4.3. Ispitivanje sastava reakcijske smjese

Kako bi se postigli optimalni uvjeti za odvijanje reakcije i određivanje koncentracije GSH u punoj krvi, ispitani su različiti volumni omjeri izdvojenog supernatanta i pufera u reakcijskoj smjesi, uz stalni volumen (50  $\mu$ l) dodanog reagensa DTNB-a.

Nakon uklanjanja proteina iz uzorka taloženjem s 5 % TCA (omjer krvi i kiseline 1:2 i 1:3) te homogeniziranja i centrifugiranja, izdvojen je bistri supernatant. Izdvojenom supernatantu u volumenu od 500  $\mu$ l ili 300  $\mu$ l dodano je 0,3 M K-fosfatnog pufera u volumenu od 350  $\mu$ l ili 600  $\mu$ l, tako da je ukupni volumen reakcijske smjese zajedno s dodanih 50  $\mu$ l 1 mM DTNB-a iznosio 900  $\mu$ l. Tako pripremljenim uzorcima potom je izmjerena apsorbancija pri 412 nm prema slijepoj probi.

Sastav reakcijske smjese ispitan je i korištenjem 1 M K-fosfatnog pufera, uz jednaki postupak dobivanja supernatanta, pripreme uzoraka za mjerenje i konačnog

spektrofotometrijskog mjerenja. Tablicama 7 i 8 prikazane su izmjerene apsorbancije u nizu uzoraka različitog omjera supernatanta i pufera u reakcijskoj smjesi.

Tablica 7. Izmjerene apsorbancije u uzorcima različitog volumena supernatanta i 0,3 M K-fosfatnog pufera.

Omjer pune krvi i 5 % TCA	Reakcijska smjesa	Izmjerena apsorbancija
1:2 (500 $\mu$ l pune krvi + 1000 $\mu$ l 5 % TCA)	500 $\mu$ l supernatanta + 350 $\mu$ l pufera + 50 $\mu$ l DTNB	0,152*
1:2 (500 $\mu$ l pune krvi + 1000 $\mu$ l 5 % TCA)	300 $\mu$ l supernatanta + 600 $\mu$ l pufera + 50 $\mu$ l DTNB	0,072
1:3 (500 $\mu$ l pune krvi + 1500 $\mu$ l 5 % TCA)	500 $\mu$ l supernatanta + 350 $\mu$ l pufera + 50 $\mu$ l DTNB	0,144*
1:3 (500 $\mu$ l pune krvi + 1500 $\mu$ l 5 %TCA)	300 $\mu$ l supernatanta + 600 $\mu$ l pufera + 50 $\mu$ l DTNB	0,092

\*  $p < 0,05$  (u odnosu na manji V supernatanta u reakcijskoj smjesi i istu pripremu supernatanta)

Tablica 8. Izmjerene apsorbancije u uzorcima različitog volumena supernatanta i 1 M K-fosfatnog pufera.

Omjer pune krvi i 5 % TCA	Reakcijska smjesa	Izmjerena apsorbancija
1:2 (500 $\mu$ l pune krvi + 1000 $\mu$ l 5 % TCA)	500 $\mu$ l supernatanta + 350 $\mu$ l pufera + 50 $\mu$ l DTNB	0,152*
1:2 (500 $\mu$ l pune krvi + 1000 $\mu$ l 5 % TCA)	300 $\mu$ l supernatanta + 600 $\mu$ l pufera + 50 $\mu$ l DTNB	0,106
1:3 (500 $\mu$ l pune krvi + 1500 $\mu$ l 5 %TCA)	500 $\mu$ l supernatanta + 350 $\mu$ l pufera + 50 $\mu$ l DTNB	0,134*
1:3 (500 $\mu$ l pune krvi + 1500 $\mu$ l 5 % TCA)	300 $\mu$ l supernatanta + 600 $\mu$ l pufera + 50 $\mu$ l DTNB	0,097

\*  $p < 0,05$  (u odnosu na manji V supernatanta u reakcijskoj smjesi i istu pripremu supernatanta)

Iz prikazanih rezultata je vidljivo da su izmjerene apsorbancije bile više u onim uzorcima u kojima je volumen supernatanta u reakcijskoj smjesi bio veći (500  $\mu$ l u odnosu na 300  $\mu$ l;  $p < 0,05$ ). Također, može se primijetiti da su izmjerene apsorbancije bile više u onim uzorcima koji su prilikom pripreme manje razrijeđeni s TCA (omjer krvi i kiseline 1:2). S druge strane, pri omjeru 1:3 krvi i kiseline dobiven je veći volumen supernanta koji je potreban kako bi se ispitivanje moglo provesti u duplikatu za svaki uzorak. Kako nije primijećena značajna razlika u apsorbancijama kada je uzorak pripremljen s 5 % TCA u omjeru 1:2 i 1:3, moguće je prilikom pripreme uzorka krvi koristiti oba omjera, i 1:2 i 1:3.

Ovo ispitivanje pokazalo je da učinak pufera nije značajan za izmjerenu apsorbanciju (Tablica 7 i 8) te obzirom na ekonomičnost i manju potrošnju kemikalija može se preporučiti

korištenje 0,3 M K-fosfatnog pufera. No, u ovom istraživanju u daljnjim ispitivanjima korišten je 1 M K-fosfatni pufer zbog usporedbe konačnih rezultata.

#### 4.4. Ispitivanje stabilnosti GSH prilikom pohranjivanja supernatanta

GSH je nestabilan i podložan oksidaciji te je stoga potrebno utvrditi njegovu stabilnost prilikom pohranjivanja (Pastore i sur., 2003). U ovom istraživanju ispitana je stabilnost GSH u supernatantu nakon taloženja proteina, kako bi se utvrdila mogućnost pohranjivanja supernatanta i određivanja koncentracije GSH kasnije.

Nakon tretmana krvi s 5 % TCA supernatant je odvojen centrifugiranjem (6000 rpm, 20 min) te je razdijeljen u dva dijela. Prvi dio supernatanta pohranjen je na -20 °C u zamrzivač, a drugi dio supernatanta tretiran je prema utvrđenom protokolu. U 500 µl supernatanta dodano je 350 µl K-fosfatnog pufera (1 M K-fosfatni pufer, pH=7,4) i 50 µl 1 mM DTNB-a te je očitana apsorbancija na spektrofotometru pri 412 nm prema slijepoj probi. Očitana apsorbancija predstavlja apsorbanciju u početnom vremenu,  $t_0$ .

Nakon 48 sati pohranjeni supernatanti su odmrznuti. Potom je u 500 µl supernatanta dodano 350 µl K-fosfatnog pufera (1 M K-fosfatni pufer, pH=7,4) i 50 µl 1 mM DTNB-a te je očitana apsorbancija na spektrofotometru pri 412 nm prema slijepoj probi. Očitana apsorbancija predstavlja apsorbanciju u vremenu  $t_1$  (nakon 48-satnog pohranjivanja na -20°C).

Postupak pripreme uzoraka, izmjerene apsorbancije i izračunate koncentracije GSH prije i nakon pohranjivanja supernatanta prikazani su Tablicama 9 i 10.

Tablica 9. Stabilnost GSH u supernatantu prilikom pohranjivanja supernatanta na -20 °C u zamrzivaču tijekom 48 sati. Supernatanti su dobiveni taloženjem s 5 % TCA u omjeru krvi i kiseline 1:2.

	Apsorbancija u početnom vremenu, $t_0$	Koncentracija GSH u $t_0$ (µM)	Apsorbancija nakon 48h, $t_1$	Koncentracija GSH nakon 48 h u $t_1$ (µM)
Uzorak 1 (500 µl supernatanta + 350 µl 1 M K-fosfatnog pufera + 50 µl DTNB-a)	0,152	10,74	0,088*	6,22*
Uzorak 2 (500 µl supernatanta + 350 µl 1 M K-fosfatnog pufera + 50 µl DTNB-a)	0,152	10,74	0,102*	7,21*

\*  $p < 0,05$  (u odnosu na vrijednost apsorbancije i koncentracije u  $t_0$ )

Tablica 10. Stabilnost GSH u supernatantu prilikom pohranjivanja supernatanta na -20 °C u zamrzivaču tijekom 48 sati. Supernatanti su dobiveni taloženjem s 5% TCA u omjeru krvi i kiseline 1:3.

	Apsorbancija u početnom vremenu, $t_0$	Koncentracija GSH u $t_0$ ( $\mu\text{M}$ )	Apsorbancija nakon 48h, $t_1$	Koncentracija GSH nakon 48h u $t_1$ ( $\mu\text{M}$ )
Uzorak 1 (500 $\mu\text{l}$ supernatanta + 350 $\mu\text{l}$ 1 M K-fosfatnog pufera + 50 $\mu\text{l}$ DTNB-a)	0,144	10,17	0,080*	5,65*
Uzorak 2 (500 $\mu\text{l}$ supernatanta + 350 $\mu\text{l}$ 1 M K-fosfatnog pufera + 50 $\mu\text{l}$ DTNB-a)	0,134	9,47	0,079*	5,58*

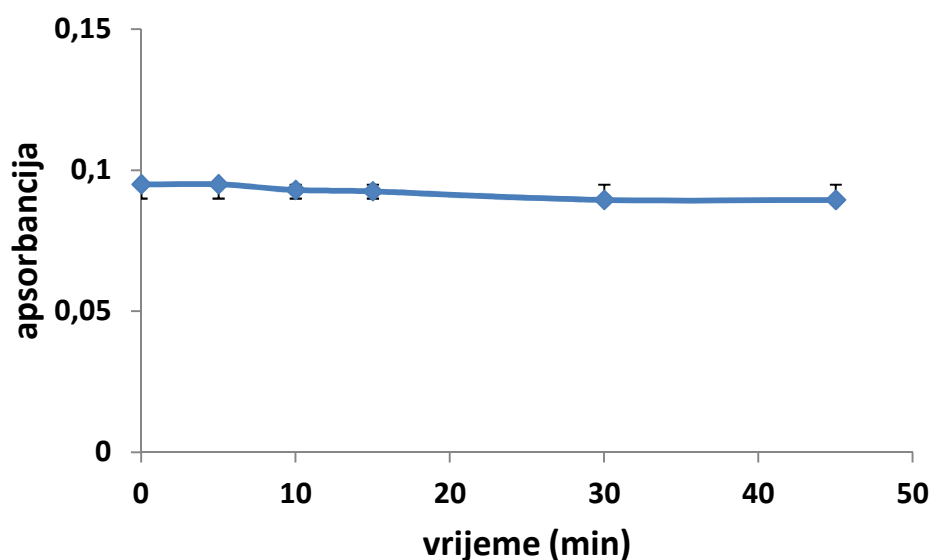
\*  $p < 0,05$  (u odnosu na vrijednost apsorbancije i koncentracije u  $t_0$ )

U ispitivanom razdoblju od 48 sati u supernatantu pohranjenom na -20 °C izmjerena je značajno niža apsorbancija pa time i značajno niža koncentracija GSH u uzorcima koji su bili zamrznuti tijekom 48 sati ( $p < 0,05$ ). To potvrđuje da GSH nije stabilan u supernatantu te da je vjerojatno došlo do njegove oksidacije u kiselom mediju. Stoga se preporučuje u zamrzivaču čuvati uzorke krvi, a ne supernatante. Tome u prilog ide i literaturni podatak koji govori kako prilikom pohranjivanja uzoraka krvi u zamrzivaču na -20 °C koncentracija GSH ne pada u periodu do 30 dana (Vujeva, 2019).

#### 4.5. Ispitivanje stabilnosti produkta reakcije GSH i DTNB-a, 5'-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB)

U slijedećem koraku ispitana je stabilnost produkta reakcije GSH s DTNB-om, TNB, a kako bi se utvrdilo potrebno vrijeme inkubacije reakcijske smijese, odnosno vrijeme kada se nakon dodatka DTNB-a mora izmjeriti apsorbancija.

Uzorci krvi tretirani su s 5 % TCA (omjer krvi i kiseline 1:2 i 1:3), centrifugirani (6000 rpm, 20 min) te je odvojen supernatant. Reakcijska smjesa sadržavala je 500  $\mu$ l supernatanta, 350  $\mu$ l 1 M K-fosfatnog pufera (pH 7,4) ili 0,3 M K-fosfatnog pufera (pH 7,4) te 50  $\mu$ l 1 mM DTNB-a. Nakon dodavanja reagensa u reakcijsku smjesu, apsorbancije su izmjerene u vremenskim razmacima od 5, 10, 15, 30 i 45 minuta na UV-Vis spektrofotometru pri 412 nm prema slijepoj probi. Na Slici 8 prikazani su rezultati kada je uzorak krvi tretiran s 5 % TCA u omjeru 1:2 (500  $\mu$ l krvi+1000  $\mu$ l 5 % TCA), a u finalnu reakcijsku smjesu dodan je 1 M K-fosfatni pufer (pH 7,4).



Slika 8. Stabilnost produkta reakcije GSH i DTNB-a, TNB praćena u razdoblju od 45 minuta.

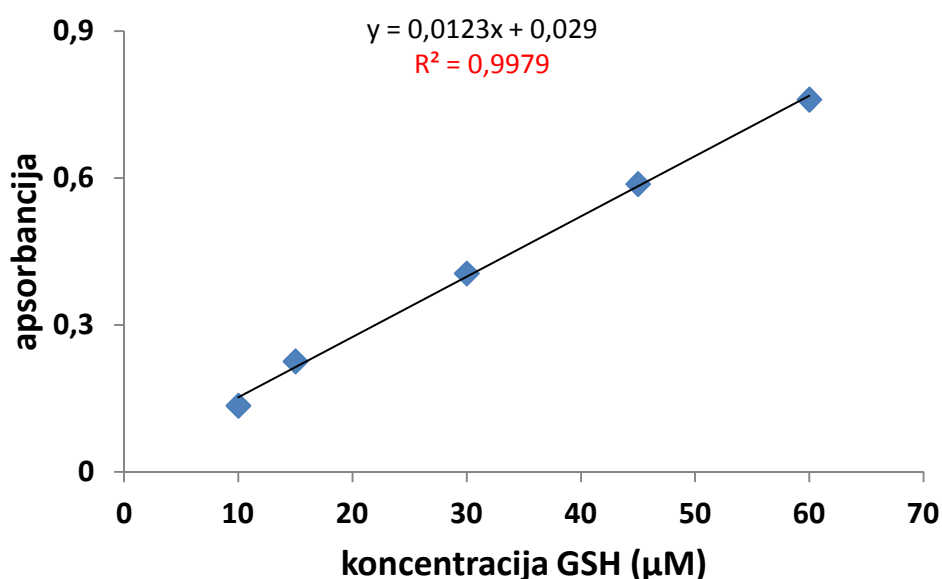
U literaturi je navedeno da je TNB produkt reakcije GSH i DTNB-a podložan oksidaciji u kiselom mediju (Giustarini i sur., 2014). I u ovom ispitivanju u razdoblju od 45 minuta primijećen je pad apsorbancije, što pokazuje da je došlo da blage oksidacije produkta (Slika 8). Međutim, taj pad apsorbancije nije bio statistički značajan ( $p > 0,05$ ; t-test) te se može zaključiti da je produkt reakcije GSH-DTNB stabilan i da se nakon dodavanja reagensa apsorbancija nastalog produkta može pouzdano izmjeriti unutar 15 minuta.

#### 4.6. Ispitivanje linearnosti metode

Kako bi se ispitala linearnost metode pripremljen je niz standardnih otopina GSH razrjeđivanjem standardne otopine GSH koncentracije  $3,08 \cdot 10^{-4}$  M s različitim volumenima 1 M K-fosfatnog pufera (pH 7,4). Koncentracija GSH u tako pripremljenim uzorcima ukupnog volumena reakcijske smjese 900  $\mu$ l (500  $\mu$ l supernatanta+350 $\mu$ l K-fosfatnog pufera različitog koncentracijskog raspona GSH+50  $\mu$ l DTNB-a) bila je u rasponu od 10  $\mu$ M do 60  $\mu$ M (Tablica 3).

Standardne otopine pripremljene su u K-fosfatnom puferu jer svi uzorci krvi imaju određenu koncentraciju GSH. Kako nije moguće pribaviti uzorak krvi koji nema GSH, ne može se ni pripremiti uzorak krvi s poznatom koncentracijom GSH. Pored toga, dodavanje standardne otopine u uzorak krvi ili supernatanta dodatno bi razrijedilo uzorak i time početnu koncentraciju GSH.

Krv je tretirana s 5 % TCA u omjeru 1:2, homogenizirana i centrifugirana (6000 rpm, 20 min) te je odvojen supernatant. Zatim je pripremljena serija od 5 uzoraka, svaki uzorak pripremljen je u duplikatu, a uz uzorke napravljena je i slijepa proba s destiliranom vodom. U 500  $\mu$ l supernatanta dodano je 50  $\mu$ l 1 mM DTNB-a i 350  $\mu$ l 1M K-fosfatnog pufera različite koncentracije GSH, a kako bi koncentracija GSH u ukupnom volumenu reakcijske smjese bila u rasponu 10 do 60  $\mu$ M. Intenzitet obojenja izmjeren je na UV-Vis spektrofotometru pri 412 nm prema slijepoj probi. Iz baždarnog pravca i koeficijenta regresije može se zaključiti se da je metoda linearna (Slika 9).



Slika 9. Baždarni dijagram ovisnosti intenziteta apsorbancije o koncentraciji GSH u uzorku.

#### 4.7. Ispitivanje određivanja MDA

Provedeno je istraživanje kako bi se utvrdilo je li dobiveni supernatant nakon postupka taloženja pune krvi s 5 % TCA, homogenizacije i centrifugiranja moguće upotrijebiti za mjerenje još jednog parametra oksidacijskog stresa, malondialdehida (MDA). Za ovo ispitivanje koristila se TBA koja reagira s MDA u omjeru 1:2 pri čemu nastaje crveno obojeni adukt MDA-TBA<sub>2</sub>. Za odvijanje reakcije potrebni su kiseli uvjeti i povišena temperatura (Janero, 1990). Prethodno provedena ispitivanja pokazala su da je nakon tretmana pune krvi s 5 % TCA pH supernatanta 1 (Tablice 5 i 6). S obzirom da je za reakciju MDA i TBA potreban kiseli medij, supernatant pH = 1 pogodan je za određivanje koncentracije MDA. U reakcijsku smjesu treba samo dodati reagens TBA bez zakiseljavanja reakcijske smjese.

Postupak je proveden tako da su uzorci krvi kao i prilikom određivanja GSH tretirani s 5 % TCA, homogenizirani te centrifugirani (6000 rpm, 20 min). Potom je odvojeno 500 µl supernatanta u koji je dodano 500 µl TBA. Uz uzorke pripremljena je i slijepa proba koja je umjesto uzorka sadržavala destiliranu vodu. Epruvete s reakcijskom smjesom su zagrijavane na temperaturi od 90 °C kroz 30 minuta u grijaćem bloku. Nakon zagrijavanja epruvete su stavljene na led kako bi se zaustavila reakcija, a apsorbancija je izmjerena na UV-Vis spektrofotometru pri valnoj duljini od 532 nm prema slijepoj probi. Izmjerene apsorbancije prikazane su u Tablici 11.

Tablica 11. Apsorbancije uzoraka pripremljenih za određivanje koncentracije MDA.

Postupak taloženja krvi	Reakcijska smjesa	Apsorbancija	Koncentracija (µM)
1:2 (500 µl krvi + 1000 µl 5% TCA)	Uzorak 1 (500 µl supernatanta + 500 µl TBA)	0,166	2,128
	Uzorak 2 (500 µl supernatanta + 500 µl TBA)	0,120	1,539
1:3 (500 µl krvi + 1500 µl 5% TCA)	Uzorak 1 (500 µl supernatanta + 500 µl TBA)	0,167	3,212
	Uzorak 2 (500 µl supernatanta + 500 µl TBA)	0,155	2,981

Očitane apsorbancije su u prihvatljivom rasponu. Kako referentne vrijednosti za koncentraciju MDA u krvi nisu utvrđene, izračunate koncentracije su uspoređene s koncentracijama u istraživanju u kojem je analizirana koncentracija MDA u krvi u kontrolnoj (zdravoj) skupini. Vrijednosti koncentracije MDA dobivene u ovom istraživanju odgovaraju



vrijednostima kontrolne skupine u navedenom istraživanju (Yildirim i sur., 2004). Manja odstupanja među uspoređivanim rezultatima posljedica su drugačije pripreme uzorka i samog izvođenja mjerenja. Dobivene vrijednosti pokazuju da supernatant krvi pripremljen za određivanje GSH se može upotrijebiti za određivanje koncentracije MDA.

## **5. Závěry**

- Punu krv potrebno je tretirati s 5 % TCA u omjeru ili 1:2 ili 1:3 kako bi se dobio supernatant kojemu su uklonjeni proteini te je u supernatantu moguće odrediti koncentraciju GSH.
- Upotrebom 1 M K-fosfatnog pufera (pH 7,4) moguće je postići optimalni pH reakcijske smjese (pH 7-8). Utvrđeni optimalan sastav reakcijske smjese za određivanje koncentracije GSH u punoj krvi je 500  $\mu$ l supernatanta, 350  $\mu$ l 1 M K-fosfatnog pufera (pH 7,4) te 50  $\mu$ l 1 mM DTNB-a.
- Ispitivanje stabilnosti GSH u supernatantu (pohranjivanje supernatanta na -20 °C tijekom 48 sati) pokazalo je da GSH nije stabilan u supernatantu te se preporuča pohranjivanje uzoraka krvi.
- Produkt GSH i DTNB-a, TNB, stabilan je tijekom 45 minuta, ali se zbog blagog pada apsorbancije uslijed oksidacije produkta preporuča mjerenje napraviti unutar 15 minuta od dodatka DTNB-a u reakcijsku smjesu.
- Ispitivanje linearnosti metode pokazalo je da je optimizirana metoda linearna te se može koristiti za određivanje koncentracije GSH u punoj krvi.
- U supernatantu pune krvi koji je pripremljen za određivanje koncentracije GSH može se izmjeriti i koncentracija MDA kao još jednog parametra oksidacijskog stresa.

## **6. Literatura**

1. Ayala A, Muñoz M, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014, 1-31.
2. Cadenas E, Davies K. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29(3-4), 222-230.
3. Electron Transport Chain and Oxidative Phosphorylation, 2008., <https://biologydictionary.net/electron-transport-chain-and-oxidative-phosphorylation/>, pristupljeno 26.5.2019.
4. Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, Reiner E. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal Biochem*, 2003, 312(2), 224-227.
5. Giustarini D, Fanti P, Matteucci E, Rossi R. Micro-method for the determination of glutathione in human blood. *J Chromatogr B, Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 964, 191-194.
6. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 1984, 219(1), 1-14.
7. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*, 2004, 142, 231-255.
8. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. New York, Oxford University Press, 2015, str. 99-105.
9. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex J Med*, 2017, 54, 287-293.

10. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*, 1990, 9, 515-540.
11. Jiang X, Chen J, Bajić A, Zhang C, Song X. Quantitative real-time imaging of glutathione. *Nat Commun*, 2017, 8, 16087.
12. Jones D. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 295, 849-868.
13. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010, 4(8), 118-126.
14. Lubos E, Loscalzo J, Handy D. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(7), 1957-1997.
15. Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova-Praktikum. Ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2014, str. 36.
16. Owens CWI, Belcher RV. A Colorimetric Micro-Method for Determination of Glutathione. *Biochem J*, 1965, 94(3), 705-711.
17. Parčetić-Kostelac I, Šperanda M, Kopačin T, Jozinović A, Jović T, Đidara M. Oksidacijski stres u uvjetima intenzivnog fizičkog napora u ljudi i životinja. *Stočarstvo*, 2016, 70(2), 71-92.
18. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, 2003, 333(1-2), 19-39.
19. Rendić S, Medić-Šarić M. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 236.

20. Stempak D, Dallas S, Klein J, Bendayan R, Koren G, Baruchel S. Glutathione stability in whole blood: effects of various deproteinizing acids. *Ther Drug Monit*, 2001, 23(5), 542-549.
21. Štefan L, Tepšić T, Zavidic T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija i posljedice. *Medicina*, 2007, 43, 84-93.
22. Testa B, Krämer SD. The Biochemistry of Drug Metabolism: Principles, Redox Reactions, Hydrolyses. Berlin, Wiley-VCH, 2010, str.158.
23. Townsend DM, Tew K, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*, 2003, 57(3-4), 145-155.
24. Vujeva V. Ispitivanje stabilnosti glutathiona u uzrocima plazme i krvi. Diplomski rad, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2019.
25. Yildirim O, Ateş N, Tamer L, Muşlu N, Ercan B, Atik U, Kanik A. Changes in Antioxidant Enzyme Activity and Malondialdehyde Level in Patients with Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmologica*, 2004, 218(3), 202-206.

## **7. Sažetak/ Summary**



## Sažetak

Glutation je najvažniji tiolni antioksidans u stanicama sisavaca. Smanjena koncentracija GSH dovodi se u vezu s brojnim patofiziološkim procesima te je cilj ovog istraživanja biooptimizirati metodu za određivanje koncentracije GSH u punoj krvi. Za određivanje koncentracije GSH odabrana je spektrofotometrijska metoda koja se temelji na reakciji tiolne skupine GSH i reagensa 5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeve kiseline), DTNB-a. U reakciji nastaje žuto obojeni produkt TNB (5'-tio-2-nitrobenzojeva kiselina) kojem se na valnoj duljini  $\lambda = 412 \text{ nm}$  može izmjeriti intenzitet apsorbancije. Koncentracija GSH u uzorku određuje se prema Lambert-Beerovom zakonu iz poznatog apsorpcijskog koeficijenta,  $\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Ispitivanja optimizacije metode za određivanje koncentracije GSH u punoj krvi provedena su na istom uzorku krvi, a uzorak krvi pribavljen je od zdravog dobrovoljnog davaoca krvi. Prilikom optimiziranja metode ispitana je kiselina koja se mora upotrijebiti za uklanjanje proteina iz uzorka krvi, molarnost pufera kojim se održava potreban pH reakcijske smjese te sastav reakcijske smjese. Također ispitana je stabilnost GSH tijekom pohranjivanja supernatanta te stabilnost TNB-a, produkta reakcije između GSH i reagensa DTNB-a. Pouzdanost metode ispitana je određivanjem njene linearnosti. Pored toga ispitano je može li se supernatant koji je pripremljen za određivanje GSH upotrijebiti za određivanje još jednog parametra oksidativnog stresa, malondialdehida (MDA).

Ispitivanjem je pokazano da je tretiranjem uzoraka pune krvi s 5 % TCA dobiven čisti supernatant koji je pogodan za kolorimetrijsko određivanje GSH. Optimalni uvjeti pH reakcijske smjese postignuti su korištenjem 1 M K-fosfatnog pufera (pH 7,4), a kao optimalan sastav reakcijske smjese pokazao se sastav: 500  $\mu\text{l}$  supernatanta, 350  $\mu\text{l}$  1 M K-fosfatnog pufera (pH 7,4) te 50  $\mu\text{l}$  1 mM DTNB-a. Obzirom da je pohranjivanje supernatanta u zamrzivaču na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  kroz 48 h dovelo do značajnog pada koncentracije GSH ( $p < 0,05$ ), ne preporuča se pohranjivanje supernatanta. Ispitivanjem stabilnosti produkta reakcije TNB-a u vremenu od 45 minuta uočen je blagi pad izmjerenih apsorbancija tijekom 45 minuta koji nije bio statistički značajan ( $p > 0,05$ ) te je zaključeno da je produkt stabilan tijekom 45 minuta. Pomoću standarda GSH (koncentracijski rasponu reakcijskoj smjesi 10 - 60  $\mu\text{M}$ ) utvrđeno je da je metoda linearna te pouzdana za mjerenje GSH u punoj krvi. Pokazano je da je iz istog supernatanta koji je pripremljen za određivanje GSH moguće odrediti koncentraciju MDA.

## Summary

Glutathione (GSH) is the most important thiol antioxidant in mammals. The decrease of GSH concentration in cells is linked with various pathophysiological processes. Therefore, the aim of this study was to optimize the method for GSH measurement in human blood. For the measurement of GSH concentration in blood, the spectrophotometric method was selected, based on the reaction between thiol group of GSH and reagent 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB. Reaction results in a yellow product, 5'-thio-2-nitrobenzoic acid, TNB, whose absorption intensity can be measured at wavelength  $\lambda = 412$  nm. Concentration of GSH was calculated according to Lambert-Beer law from the known absorption coefficient,  $\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Experiments were performed on the same blood sample that was obtained from healthy volunteer blood donor. For the purpose of optimization of the method the acid for deproteinisation of blood sample, the molarity of the buffer needed to obtain pH of the reaction mixture, and composition of reaction mixture were tested. Additionally, stability of GSH in stored supernatant was tested, as well as stability of reaction product, TNB. Reliability of the method was examined by testing its linearity. Furthermore, the same supernatant used for the measurement of GSH was tested for determination of another parameter of oxidative stress, malondialdehyde (MDA).

Experiments have shown that treatment of blood samples with 5% TCA removes interfering molecules leaving clear supernatant that is suitable for colorimetric determination of GSH. Optimal pH of reaction mixture is achieved by use of 1M K-phosphate buffer (pH 7.4) and the optimal reaction mixture composition was: 500  $\mu\text{l}$  of supernatant, 350  $\mu\text{l}$  of 1 M K-phosphate buffer (pH 7.4) and 50  $\mu\text{l}$  of DTNB. Statistically significant decrease in GSH level ( $p < 0.05$ ) was observed in supernatant samples stored at  $-20$  °C for 48h indicating that for determination of GSH supernatant cannot be stored. By monitoring stability of reaction product TNB, a slightly drop of measured absorbance was noticed that was not statistically different ( $p > 0.05$ ) so can be concluded that TNB is stable for 45 minutes. GSH standards were added in reaction mixture (in concentration range 10 - 60  $\mu\text{M}$ ) and it is established that method is linear and can be used for GSH determination. Additionally it is demonstrated that the supernatant prepared for GSH measurement can also be used for determination of MDA.

## **8. Prilog**

## Popis kratica

ATP – adenin trifosfat

CAT – katalaza

CoA – koenzim A

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DTNB – Ellmanov reagens, 5,5`-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina(eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

$\gamma$ -GCS –  $\gamma$ -glutaminilcistein-sintetaza

G6P – glukoza-6-fosfat

GPx – glutation-peroksidaza

GS – glutation sintetaza

GSH – reducirani glutation

GSSG – glutation disulfid (oksidirani glutation)

HMP –monofosfatni šant(eng. *hexose monophosphate pathway*)

MDA – malondiladehid

NADP – nikotinamid dinukleotid fosfat

NADPH – nikotinamid dinukleotid hidrogenfosfat

PUFA –polinezasićene masne kiseline(eng. *polyunsaturated fatty acids*)

ROS – slobodni kisikovi radikali(eng. *reactive oxygen species*)

RNS – slobodni dušikovi radikali(eng. *reactive nitrogen species*)

TBA – tiobarbiturna kiselina(eng. *thiobarbituric acid*)

TCA – triklorna kiselina(eng. *trichloroacetic acid*)

SOD – superoksid dizmutaza

## **9. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku botaniku  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Optimiziranje spektrofotometrijske metode za određivanje glutationa u krvi

Anja Đuranec

#### SAŽETAK

Glutation je najvažniji tiolni antioksidans u stanicama sisavaca. Smanjena koncentracija GSH dovodi se u vezu s brojnim patofiziološkim procesima te je cilj ovog istraživanja bio optimizirati metodu za određivanje koncentracije GSH u punoj krvi. Za određivanje koncentracije GSH odabrana je spektrofotometrijska metoda koja se temelji na reakciji tiolne skupine GSH i reagensa 5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeve kiseline), DTNB-a. U reakciji nastaje žuto obojeni produkt TNB (5'-tio-2-nitrobenzojeva kiselina) kojem se na valnoj duljini  $\lambda = 412$  nm može izmjeriti intenzitet apsorbancije. Koncentracija GSH u uzorku određuje se prema Lambert-Beerovom zakonu iz poznatog apsorpcijskog koeficijenta,  $\epsilon=14150$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Ispitivanja optimizacije metode za određivanje koncentracije GSH u punoj krvi provedena su na istom uzorku krvi, a uzorak krvi pribavljen je od zdravog dobrovoljnog davaoca krvi. Prilikom optimiziranja metode ispitana je kiselina koja se mora upotrijebiti za uklanjanje proteina iz uzorka krvi, molarnost pufera kojim se održava potreban pH reakcijske smjese te sastav reakcijske smjese. Također ispitana je stabilnost GSH tijekom pohranjivanja supernatanta te stabilnost TNB-a, produkta reakcije između GSH i reagensa DTNB-a. Pouzdanost metode ispitana je određivanjem njene linearnosti. Pored toga ispitano je može li se supernatant koji je pripremljen za određivanje GSH upotrijebiti za određivanje još jednog parametra oksidativnog stresa, malondialdehida (MDA).

Ispitivanjem je pokazano da je tretiranjem uzoraka pune krvi s 5 % TCA dobiven čisti supernatant koji je pogodan za kolorimetrijsko određivanje GSH. Optimalni uvjeti pH reakcijske smjese postignuti su korištenjem 1 M K-fosfatnog pufera (pH 7,4), a kao optimalan sastav reakcijske smjese pokazao se sastav: 500  $\mu$ l supernatanta, 350  $\mu$ l 1 M K-fosfatnog pufera (pH 7,4) te 50  $\mu$ l 1 mM DTNB-a. Obzirom da je pohranjivanje supernatanta u zamrzivaču na -20 °C kroz 48 h dovelo do značajnog pada koncentracije GSH ( $p < 0,05$ ), ne preporuča se pohranjivanje supernatanta. Ispitivanjem stabilnosti produkta reakcije TNB-a u vremenu od 45 minuta uočen je blagi pad izmjerenih apsorbancija tijekom 45 minuta koji nije bio statistički značajan ( $p > 0,05$ ) te je zaključeno da je produkt stabilan tijekom 45 minuta. Pomoću standarda GSH (koncentracijski raspon u reakcijskoj smjesi 10 - 60  $\mu$ M) utvrđeno je da je metoda linearna te pouzdana za mjerenje GSH u punoj krvi. Pokazano je da je iz istog supernatanta koji je pripremljen za određivanje GSH moguće odrediti koncentraciju MDA.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 9 grafičkih prikaza, 11 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Glutation, oksidacijski stres, antioksidans

Mentori: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

**Dr. sc. Marko Gerić**, znanstveni suradnik Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada

**Dr. sc. Erim Bešić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Botany  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### OPTIMIZING OF SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF GLUTATHIONE IN FULL BLOOD

Anja Đuranec

#### SUMMARY

Glutathione (GSH) is the most important thiol antioxidant in mammals. The decrease of GSH concentration in cells is linked with various pathophysiological processes. Therefore, the aim of this study was to optimize the method for GSH measurement in human blood. For the measurement of GSH concentration in blood, the spectrophotometric method was selected, based on the reaction between thiol group of GSH and reagent 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB. Reaction results in a yellow product, 5'-thio-2-nitrobenzoic acid, TNB, whose absorption intensity can be measured at wavelength  $\lambda = 412$  nm. Concentration of GSH was calculated according to Lambert-Beer law from the known absorption coefficient,  $\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Experiments were performed on the same blood sample that was obtained from healthy volunteer blood donor. For the purpose of optimization of the method the acid for deproteinisation of blood sample, the molarity of the buffer needed to obtain pH of the reaction mixture, and composition of reaction mixture were tested. Additionally, stability of GSH in stored supernatant was tested, as well as stability of reaction product, TNB. Reliability of the method was examined by testing its linearity. Furthermore, the same supernatant used for the measurement of GSH was tested for determination of another parameter of oxidative stress, malondialdehyde (MDA).

Experiments have shown that treatment of blood samples with 5% TCA removes interfering molecules leaving clear supernatant that is suitable for colorimetric determination of GSH. Optimal pH of reaction mixture is achieved by use of 1M K-phosphate buffer (pH 7.4) and the optimal reaction mixture composition was: 500  $\mu\text{l}$  of supernatant, 350  $\mu\text{l}$  of 1 M K-phosphate buffer (pH 7.4) and 50  $\mu\text{l}$  of DTNB. Statistically significant decrease in GSH level ( $p < 0.05$ ) was observed in supernatant samples stored at  $-20^\circ\text{C}$  for 48h indicating that for determination of GSH supernatant cannot be stored. By monitoring stability of reaction product TNB, a slightly drop of measured absorbance was noticed that was not statistically different ( $p > 0.05$ ) so can be concluded that TNB is stable for 45 minutes. GSH standards were added in reaction mixture (in concentration range 10 - 60  $\mu\text{M}$ ) and it is established that method is linear and can be used for GSH determination. Additionally it is demonstrated that the supernatant prepared for GSH measurement can also be used for determination of MDA.

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

Thesis includes: 40 pages, 9 figures, 11 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Glutathione, oxidative stress, antioxidant

Mentors: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marko Gerić, Ph.D.** Research associate, Institute for Medical Research and Occupational Health  
Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marko Gerić, Ph.D.** Research associate, Institute for Medical Research and Occupational Health  
**Erim Bešić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2019.

