

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



**STANOVENÍ OXIDOVANÉHO A
REDUKOVANÉHO GLUTATHIONU
V HEMOLYZÁTU ERYTROCYTŮ
METODOU KAPILÁRNÍ
ELEKTROFORÉZY S UV-VIS DETEKČÍ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Školitel: RNDr. Martina Ulrychová

Hradec Králové, 2007

Martina Anderlová

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně, pod odborným vedením RNDr. Marty Ulrychové a řádně cituji všechna převzatá data a skutečnosti. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v univerzitní knihovně Karlovy Univerzity.

V Hradci Králové dne 15. května 2007

Martina Anderlová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí své diplomové práce slečně RNDr. Martině Ulrychové za odborné vedení, korekturu mé práce a odborné a cenné připomínky.

V neposlední řadě chci poděkovat všem členům mé rodiny, kteří mě podporovali v průběhu studia.

SEZNAM ZKRATEK

ABD-F - 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol

BP – borátový pufr

cys – cystein

DHR-123 - dihydrorhodamin-123

DNP - 2,4-dinitrofenyl

DPDS - 2,2'-dipyridyldisulfid

DTNB - Ellmanovo činidlo, 5,5'-dithio-(bis-2-nitrobenzoová) kyselina

GCS – enzym γ -glutamylcysteinsynthetasa

GCS-HS - těžká podjednotka enzymu γ -glutamylcysteinsynthetasy

GCS-LS - lehká podjednotka enzymu γ -glutamylcysteinsynthetasy

GGT - enzym γ -glutamyltranspeptidasa

glu – kyselina glutamová

gly – glycin

GPx - enzym glutathionperoxidasa

GR - enzym glutathionreduktasa

GS – enzym glutathionsynthetasa

GS[•] – thiolový radikál

GSH – redukována forma glutathionu

GSNO - reaktivní nitrosothiol

GST - enzym glutathion-S-transferasa

GSSG – oxidovaná forma glutathionu

GSSG^{•-} - radikál oxidovaného glutathionu

KB – Kyselina boritá

Met – Methionin

Mrp2 – multilékový rezistentní protein

NDA - naftalen-2,3-dicarboxaldehyd

NEM – N-ethylmaleimid

[•]NO - radikál oxidu dusnatého

NPM - N-(1-pyrenyl)-maleimid

O₂^{•-} - superoxidový radikál

Oatp1 – organický anion-transportující protein

OPA – o-ftaldialdehyd

PFB-F - 5-(pentafluorobenzoylamino)-fluorescein

ROH – alkylalkohol

SBD-F – amonium-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol-4-sulfonát

SOD – superoxiddismutasa

TNB - 2-nitro-5-thiobenzoové kyseliny

Trp – Tryptofan

X_{AG} – protein důležitý pro transport glutamátu do buňky závislý na sodíku

x_c- protein důležitý pro transport glutamátu do buňky nezávislý na sodíku

Souhrn

V současné době existuje celá řada metod pro stanovení glutathionu v biologickém materiálu. Cílem této práce bylo nalézt vhodnou metodu a optimální podmínky pro separaci a identifikaci redukováného (GSH) a oxidovaného (GSSG) glutathionu v erythrocytech metodou vysokoúčinné kapilární elektroforézy. Snažili jsme se eliminovat dlouhé preanalytické postupy uváděné v mnoha publikovaných článcích a nalézt optimální a rychlou metodu pro stanovení forem glutathionu.

Optimalizovali jsme podmínky, které ovlivňují analýzu GSH a GSSG jako např. pH a koncentrace borátového pufru, průměr a délka kapiláry, napětí, vlnová délka, čas dávkování, teplota a frekvence. Optimalizace byla provedena na dvou různých systémech kapilární elektroforézy se záměrem najít nejvhodnější elektroforeogram pro stanovení glutathionu v hemolyzátech. Nejlepší výsledky jsme získali při použití 300 mmol/l borátového pufru o pH 7,8. K separaci jsme použili křemennou kapiláru o délce 47 cm a průměru 75 μm . Měření probíhalo při napětí 25 kV, proudu 30 μA , teplotě 25°C a vlnové délce 200 nm na kapilární elektroforéze firmy Prince Technologies.

Po zavedení pracovních podmínek jsme metodu validovali a použili ji pro stanovení GSH a GSSH v hemolyzátech lidských erytrocytů. Z důvodu dobré a rychlé analytické přípravy může být tato metoda použita pro rutinní stanovení GSH a GSSG v hemolyzátech zdravých nebo nemocných pacientů.

Abstrakt

Nowadays exist a lot of methods for setting the glutathione in biological materials. The aim of this work was to develop the right method and optimal conditions for the separation and identification of reduced and oxidized glutathione in red blood cells by capillary electrophoresis. Our biggest effort was to find and eliminate long pre-analytic procedures mentioned in most of the published articles and to find the optimal and fast method for setting forms of glutathione.

We optimized conditions which influence the analyze GSH and GSSG for example: pH and concentration of borate buffer, internal diameter and length of fused-silica capillary, voltage, wavelength, applying sample under pressure (time dosetion), temperature and frequency. Optimalization has been tryed in two different systems of capillary electrophoresis with the plan to find the most suitable electroforeogram for setting the glutathion in hemolyzate of red blood cells.

The best resolution we obtained from using 300 mmol/l borat buffer in pH 7,8. For the separation we used fused-silica capillary in 47 cm lenght and diameter 75 μm . The measurement was passing with voltage 25 kV, current 30 μA , temperature 25°C and the wavelength 200nm on capillary electrophoresis from company Prince Technologies.

We validated the method after installation of conditions and we used this method for setting the GSH and GSSG in red blood cells. Because of it's good and rapid analytical preparation this method could be used for red blood cell glutathione measurement in healthy and ill patients.

OSNOVA

1. ÚVOD	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1. Volné radikály a antioxidanty	11
2.2. Glutathion.....	12
2.2.1. Výskyt	12
2.2.2. Stavba.....	13
2.3. Cystein	14
2.4. Glutamová kyselina.....	15
2.5. Glycin	15
2.6. Syntéza Glutathionu	16
2.7. Regulace syntézy glutathionu	17
2.7.1. Hormonální regulace.....	18
2.7.2. Regulace na úrovni γ -glutamylcysteinsynthetasy	18
2.7.3. Cystein a jeho vliv na syntézu GSH.....	19
2.8. Metabolismus glutathionu	21
2.9. Biochemie glutathionu	21
2.9.1. Glutathion v hepatocytech.....	21
2.9.2. Interorgánová homeostáza glutathionu	23
2.10. Funkce Glutathionu	24
2.10.1. Všeobecný přehled rolí glutathionu v organismu	24
2.10.2. Antioxidační funkce glutathionu.....	24
2.10.3. Eliminace volných radikálů.....	25
2.10.4. Regenerace antioxidantů	27
2.10.5. Proces detoxikace.....	27
2.10.6. GSH jako zásobárna cysteinu.....	28
2.10.7. Transport aminokyselin.....	29
2.10.8. Ochrana thiolových skupin	29
2.11. Metody stanovení glutathionu.....	30
2.11.1. Úprava vzorku.....	30
2.11.2. Neseparativní techniky stanovení glutathionu	31
2.11.3. Fluorimetrické stanovení glutathionu	31
2.11.4. Separační techniky stanovení glutathionu.....	32
2.11.5. TLC stanovení	32
2.11.6. HPLC stanovení	32
2.11.7. GC metoda stanovení glutathionu.....	34
2.11.8. Kapilární elektroforéza.....	34
2.11.9. Porovnání HPLC a CE	36
2.11.10. Enzymatická metoda stanovení GSH.....	36
2.11.11. Bioluminiscenční stanovení GSH	37
3.1. Materiál a pomůcky.....	38
3.1.1. Chemikálie	38
3.1.2. Biologický materiál	38
3.1.3. Přístroje a laboratorní pomůcky	38
3.2. Pracovní postup.....	39

3.2.1.	Příprava roztoků	39
3.2.2.	Příprava standardů.....	40
3.2.3.	Příprava vzorků	40
3.3.	Kapilární elektroforéza firmy Beckman.....	40
3.3.1.	Stanovení optimální vlnové délky.....	41
3.3.2.	pH Borátového pufru.....	42
3.3.3.	Koncentrace borátového pufru	42
3.3.4.	Optimální teplota.....	42
3.3.5.	Optimalizace napětí.....	42
3.3.6.	Optimalizace času dávkování.....	43
3.3.7.	Optimalizace parametrů kapiláry	43
3.4.	Validace metody na CE Beckman	43
3.4.1.	Stanovení limitu detekce glutathionu.....	43
3.4.2.	Kalibrace metody	43
3.4.3.	Výpočet koncentrace z kalibračního faktoru.....	44
3.4.4.	Přesnost a správnost metody	44
3.5.	Kapilární elektroforéza firmy Prince Technologies	45
3.6.	Validace metody na CE Prince Technologies	45
3.6.1.	Kalibrace	45
3.6.2.	Přesnost a správnost metody	46
3.6.3.	Výtěžnost	46
3.7.	Stanovení GSH a GSSG v biologickém materiálu.....	46
4.	VÝSLEDKY	47
4.1.	Kapilární elektroforéza Beckman	47
4.1.1.	Optimalizace podmínek	47
4.1.2.	Limit detekce stanovení GSH a GSSG	48
4.1.3.	Kalibrace metody	48
4.1.4.	Přesnost a správnost metody	48
4.1.5.	Měření reálných vzorků krve	49
4.2.	Kapilární elektroforéza Prince Technologies.....	50
4.2.1.	Optimalizace podmínek	50
4.2.2.	Kalibrace metody	50
4.2.3.	Přesnost a správnost	51
4.2.4.	Výtěžnost	51
4.2.5.	Měření reálných vzorků	52
5.	DISKUZE.....	53
6.	ZÁVĚR.....	58
7.	PŘÍLOHY	59
7.1.	Seznam příloh.....	59
7.2.	Výsledky měření kalibrační křivky.....	60
7.3.	Záznamy měření.....	61
7.4.	Tabulky s přesností měření	65
7.4.1.	CE Beckman.....	65
7.4.2.	CE Prince Technologies	67
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	69

1. ÚVOD

Glutathion je tripeptidová molekula, která se vyskytuje ve dvou formách – redukované (GSH) a oxidované (GSSG). Tato látka je velmi významným antioxidantem, vedle toho se také účastní celé řady dalších pochodů (detoxikace xenobiotik, transport cysteinu, apoptóza buněk atd.).

Glutathion jako antioxidant se snaží zabránit vzniku tzv. volných radikálů, které mohou působit nevratné škody v lidském organismu. V erythrocytech je jeho funkcí chránit enzymy a koenzymy před oxidací, chránit membránové lipidy proti peroxidaci a účastnit se redukce methemoglobinu na hemoglobin. Pokud tyto funkce nejsou zajištěny dochází k rychlejšímu stárnutí erythrocytů a jejich zániku.

Pro stanovení GSH a GSSG v erythrocytech bylo zavedeno mnoho technik. V dnešní době se nejvíce používají metody chromatografické. Cílem naší práce bylo zavést a optimalizovat stanovení oxidovaného i redukovaného glutathionu v hemolyzátech lidských erythrocytů metodou vysokoúčinné kapilární elektroforézy s fotometrickou detekcí.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Volné radikály a antioxidanty

Volné radikály vznikají při metabolických procesech, které doprovázejí fyzickou aktivitu nebo různá onemocnění. Jsou to ionty, atomy či molekuly, které mají ve své valenční sféře volný nepárový elektron. Vytvářejí tak energeticky nestabilní stav a pro jeho odstranění se snaží přijmout elektron z okolí nebo ho odevzdat okolním strukturám.

Volné radikály jsou škodlivé a nebezpečné látky, které při masivní tvorbě poškozují organismus. Jeden z hlavních obranných mechanismů proti nim představují antioxidanty. Mají schopnost neutralizovat volné radikály darováním elektronu, bez toho, aniž by se sami staly aktivními radikály [45].

Antioxidanty mohou v těle vznikat nebo jsou přijímány potravou. Můžeme je dělit do dvou skupin: enzymatické a neenzymatické. V první skupině jsou enzymy s antioxidační funkcí (superoxiddismutasa - SOD, katalasa a glutathionperoxidasa - GPx). Druhou skupinu můžeme dále rozdělit na vysokomolekulární a nízkomolekulární látky. Vysokomolekulárními antioxidanty označujeme některé bílkoviny (transferin, albumin, ceruloplasmin) a mezi nízkomolekulární antioxidanty patří např. vitaminy A, E, C, kyselina močová a glutathion [70].

V dnešní době volné radikály exogenního a endogenního původu stále přibývají díky lidské činnosti. Dochází k vyčerpání antioxidačních ochranných mechanismů a následně poruše rovnováhy mezi volnými radikály a antioxidanty v organismu. Převaha volných radikálů se nazývá oxidační stres [42].

Oxidační stres se podílí na patogenezi mnoha onemocnění. Při nízkých koncentracích GSH nebo u dědičné poruchy GSH metabolismu může docházet k patologickým reakcím jako jsou např. neurologické poruchy vedoucí k mentální retardaci, cerebro-spinální degeneraci a Parkinsonově chorobě. Nízká koncentrace GSH může také doprovázet diabetes mellitus, cystickou fibrózu jater [53], AIDS, katarakta, reumatoidní artritidu [53] a ve velké míře má vliv na vznik karcinomů. Glutathion se může ve zvýšeném množství vylučovat do moči při dědičné poruše metabolismu aminokyselin (5-oxoprolinurie, glutathionurie) [66].

Na rozvoji Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby se také mohou podílet snížené hladiny cysteinu, což souvisí s nedostatkem folátu a vitamínu B¹² [53].

2.2. Glutathion

2.2.1. Výskyt

Glutathion je ubikvitární molekula a nachází se v buňkách živočichů a většiny rostlin i bakterií v poměrně vysoké koncentraci (0,1 – 10 mmol/l) [9]. Dále je také přítomen v mase, zelenině i ovoci (avokádo) [14].

Je hlavním intracelulárním antioxidantem [42]. Má ochrannou roli a patří v buňce mezi nejpočetněji zastoupené thioly nebílkovinné povahy [43].

Glutathion se může vyskytovat buď volný nebo vázaný, a to nejčastěji na proteiny [70]. Volný glutathion můžeme ještě dělit na redukovaný a oxidovaný a koncentrace této redoxní dvojice v buňkách se pohybuje v rozmezí hodnot 1-10 mmol/l [3], což záleží na oxidační zátěži organismu. Za fyziologických podmínek převládá v 99,5% redukovaná forma. Tato hodnota se snižuje během oxidačního stresu a redukovaný glutathion se mění v oxidovaný, jehož koncentrace následně vzrůstá [70]. Pokles tohoto poměru je známkou zátěže volnými radikály a využívá se pro posouzení oxidačně redukčního stavu uvnitř buňky. Poměr mírně klesá s věkem a také jsou známé výrazné mezidruhové rozdíly.

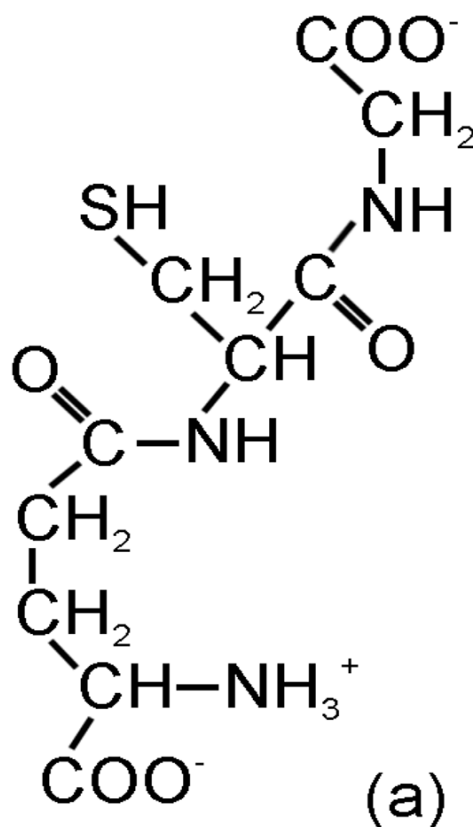
Glutathion je nejvíce je obsažen v jaterních buňkách, kde koncentrace přesahuje hodnotu 10 mmol/l [70]. Je též přítomen v erytrocytech [42], v leukocytech, v renálních buňkách [70], v mozkových buňkách (1-3 mmol/l) [4] a v plasmě (0,01 mmol/l). [5].

V buňkách můžeme GSH nalézt převážně na třech místech; 90% GSH je v cytoplasmě buňky, přibližně 10% v mitochondriích a velmi malé procento v endoplazmatickém retikulu [6,7]. Glutathion se transportuje z cytoplasmy do mitochondrií, protože mitochondrie nemají potřebné enzymy pro syntézu glutathionu. Mitochondriální glutathion je pak používán pro eliminaci volných radikálů vznikající během respirace v mitochondriích [2,8]. Glutathion je v endoplazmatickém retikulu využíván při vzniku disulfidové vazby v proteinech a GSH a GSSG se zde nalézají v poměru 3:1. Za fyziologického stavu je tento poměr často překračován až na 100:1 v cytoplasmě a mitochondriích [6,7]. Poměry mezi

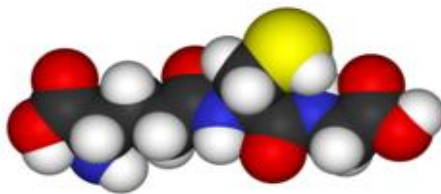
GSH a GSSG formou jsou udržovány enzymem glutathionreduktasou a dostupným množstvím NADPH. Dalším faktorem, který se podílí na zachování tohoto poměru je i syntéza glutathionu *de novo* [70].

2.2.2. Stavba

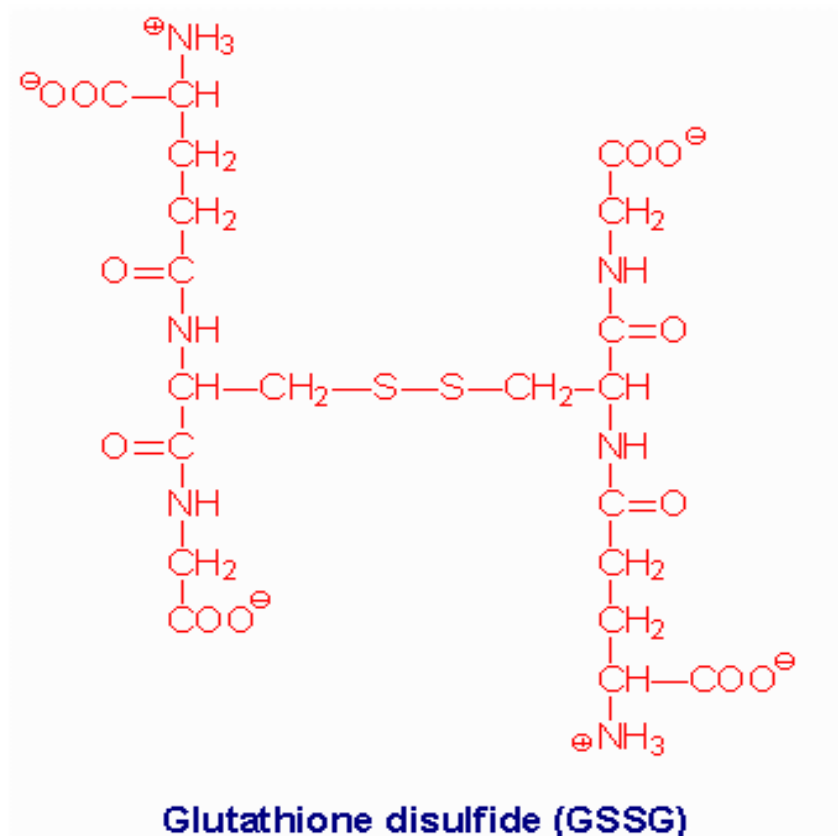
Glutathion, zkráceně GSH, je tripeptid s neobvyklou γ -amidovou vazbou [71]. Chemicky se jedná o N-(N-L- γ -glutamyl-L-cysteinyl)glycin [42]. Glutathion je složen ze tří aminokyselin: glycinu, cysteinu a glutamové kyseliny. Jak už bylo naznačeno, glutathion existuje ve dvou formách. Jako thiol je označovaná redukovaná forma (GSH) (Obr. č. 1 a 2) a jako disulfid oxidovaná forma (GSSG), kde jsou dvě molekuly GSH propojeny pomocí disulfidové vazby (Obr. č. 3) [71].



Obr. č.1 - Stavba redukovaného glutathionu (GSH)



Obr. č. 2 - 3d struktura glutathionu



Obr. č. 3 - Stavba oxidovaného glutathionu (GSSG)

2.3.Cystein

Cystein je aminokyselina s polárním, nenabitým, postranním řetězcem. Je charakteristický svou thiolovou skupinou a jako jediný může vytvářet s jinými cysteinovými zbytky oxidací thiolových skupin disulfidové vazby. Dimer se potom nazývá cystin a je také řazen mezi aminokyseliny [71].

O cysteinu můžeme hovořit jako o klíčové aminokyselině, která umožňuje glutathionu účastnit se řady reakcí. Díky thiolové skupině se glutathion může

účastnit detoxikace reaktivních elektrofilů a toxických oxygenních metabolitů, zachování nezbytné thiolové skupiny u proteinů [2,10,11] a mnoha dalších funkcí, které jsou dále popsány.

2.4. Glutamová kyselina

Glutamová kyselina je neesenciální, glukogenní aminokyselina kyselé povahy a má polární, nabitý, postranní řetězec . Při pH vyšší než 3,0 může nést záporný náboj [71].

Glutamová kyselina je N-terminální aminokyselinou glutathionu. Je spojena se sousedním cysteinem γ -karboxylovou skupinou glutamátu [8,12]. Vytvářejí spolu γ -glutamylovou vazbu, která chrání glutathion před degradací ze strany peptidas. γ -glutamylová vazba je štěpena pouze enzymem γ -glutamyltranspeptidasou (GGT). Tento enzym se nachází na vnější straně cytoplazmatické membrány většiny buněk (např. buňky nefronu, *plexus chorioideus*, enterocyty, kanalikulární membrány hepatocytů a membrány epitelových buněk žlučovodů [13]). GGT vystupuje na membráně jako poutaný enzym, který má aktivní centrum na extracelulární straně buňky. Je proto nezbytné transportovat glutathion do extracelulárního prostoru. Tento děj probíhá ve všech buňkách. Působením GGT je z glutathionu odštěpen glutamyl a vzniklý cysteinglycin se stává substrátem pro dipeptidasy, které hydrolyzují peptidovou vazbu mezi cysteinem a glycinem [5].

2.5. Glycin

Glycin, je aminokyselina s nejmenším, nepolárním postranním řetězcem. Byla objevena a identifikována jako první v roce 1820. Jako jediná aminokyselina není opticky aktivní [71]. Ve struktuře glutathionu se jedná o karboxyl-terminální aminokyselinu. Chrání glutathion před štěpením ze strany intracelulárního enzymu γ -glutamylcyklotransferasy. [8,12]

2.6.Syntéza Glutathionu

Syntéza glutathionu probíhá ve všech buňkách, z toho ale nejvíce v játrech (denně asi 45 mmol, tj. 14g). Je známo, že hepatocyty jsou schopné syntetizovat vyšší množství glutathionu než samy potřebují, a tak využijí jenom minimum. Nadbytečný GSH je následně sekretován do krevní cirkulace a odtud je vychytáván dalšími orgány [42]. Játra tak zajišťují udržení hladiny glutathionu a cysteinu v plazmě a tím i homeostázu glutathionu v organismu [12].

Játra jsou unikátní v rámci syntézy glutathionu, jednak schopností hepatocytů konvertovat methionin na cystein pomocí transsulfurace a potom jejich míra biosyntézy glutathionu je v rovnováze s mírou exportu do plazmy, žluči a mitochondrií díky GSH-transportnímu systému [14].

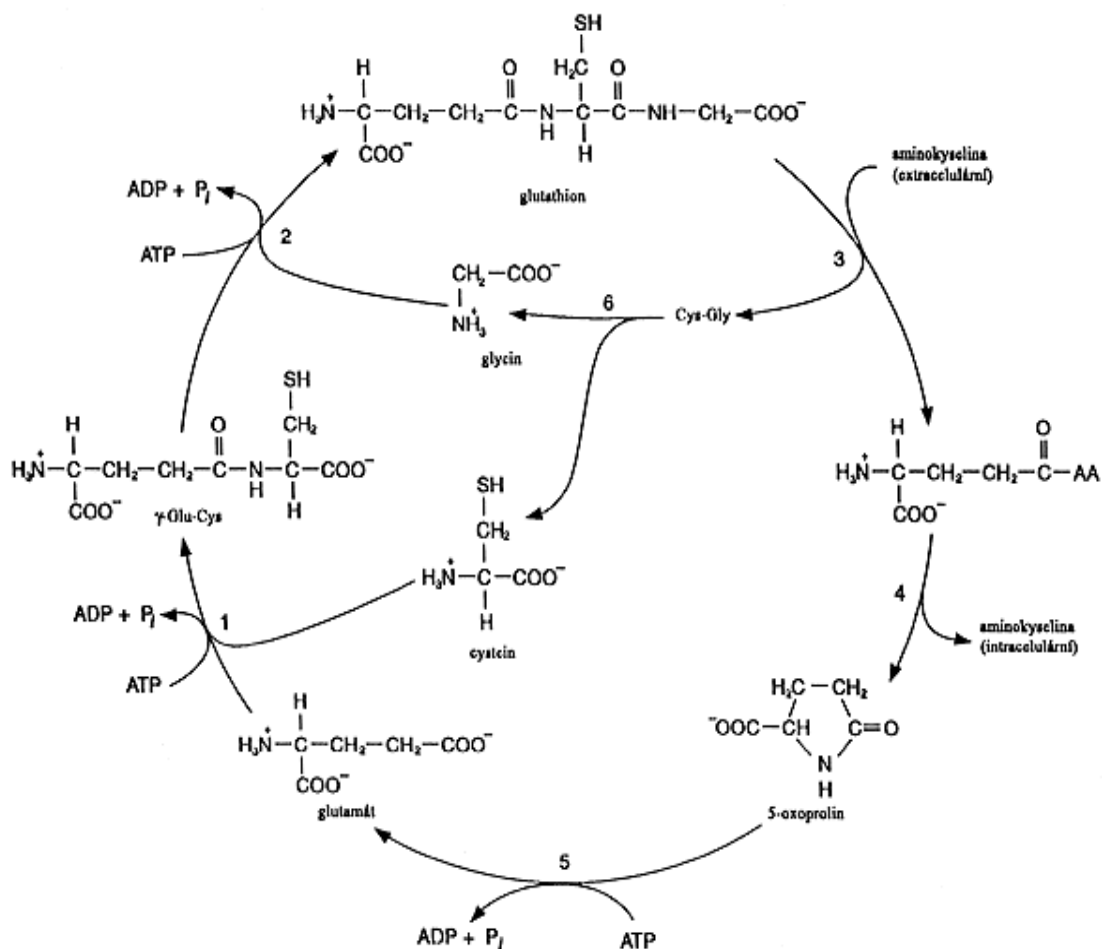
V buňce je glutathion syntetizován převážně v cytoplasmě, ale i v jiných organelách (např. v jádru, mitochondriích, endoplazmatickém retikulu aj.) a částečně i v extracelulárním prostoru [42]. Je syntetizován z L-glutamátu, L-cysteinu a L-glycinu v γ -glutamyllovém cyklu (de novo), který byl objasněn Altonem a Meisterem [71]. Jde o mechanismus přenosu aminokyselin do buněk tzv. translokací. Tento transportní mechanismus je možný díky syntéze a rozpadu glutathionu. Transport je rychlý, má vysokou kapacitu a potřebuje velký přísun energie. Nejvíce funguje v renálních epiteliálních buňkách [44].

Celá syntéza (Obr. č. 4) GSH probíhá ve dvou krocích. Každý krok vyžaduje jednu molekulu ATP a enzym, který reakci katalyzuje.

V prvním kroku syntézy dochází k reakci mezi L-glutamátem a L-cysteinem. Reakce je katalyzována enzymem γ -glutamylcysteinsynthetasou (GCS) a dochází ke spotřebě jedné molekuly ATP. Produktem této reakce je jedna molekula ADP a γ -L-glutamyl-L-cystein [8,12,15,16].

Ve druhém kroku syntézy GSH dochází k navázání molekuly L-glycinu na molekulu γ -glutamylcysteinu. Reakce je katalyzována enzymem glutathionsynthetasou (GS) a dochází opět ke spotřebě jedné molekuly ATP. Produktem reakce je jedna molekula glutathionu a ADP [8,12].

Enzym glutathionsynthetasa má molekulovou hmotnost 118 kDa. Je složen ze dvou identických podjednotek [17,18]. Má místa pro vazbu glycinu a γ -glutamylcysteinu, která jsou vysoce specifická. Tento enzym nepodléhá zpětnovazebné inhibici vznikajícím GSH [12].



Obr. č. 4 - γ -glutamylový cyklus a syntéza glutathionu

Legenda: Jednotlivé reakce cyklu jsou katalyzovány:

- (1) γ -glutamylcysteinylsynthetasou, (2) glutathionsynthetasou,
- (3) γ -glutamyltranspeptidasou, (4) γ -glutamylcyklotransferasou,
- (5) oxoprolinasou, (6) vnitrobuněčnou proteinasou [71].

2.7. Regulace syntézy glutathionu

Regulace syntézy glutathionu je řízena pomocí tří hlavních faktorů. Prvním z nich je aktivita γ -glutamylcysteinylsynthetasy v buňkách. Druhým je dostatečná koncentrace výchozích látek pro syntézu glutathionu a třetím faktorem je dostatečné množství energie v organismu, tedy ATP. Pokud je splněn požadavek dostatečného množství

východích komponent (syntéza enzymu, substráty a energie), pak posledními významnými faktory, které ovlivňují syntézu glutathionu jsou zpětnovazebná inhibice syntézy GSH na molekule enzymu GCS a hormonální regulace.

Pokud dojde k inhibici syntézy, dojde v krátké době k depleci buněčného GSH a k inhibici glutathionových detoxikačních mechanismů [43].

2.7.1. Hormonální regulace

Hormonální regulace se týká hlavně syntézy glutathionu v játrech [19]. Hormony, které se podílí na zvýšení syntézy jsou například insulin a hydrokortison. V nitrobuněčné signalizaci hepatocytů hraje důležitou úlohu cAMP a Ca^{2+} . Existují domněnky, že signály vázané na vápenatý kation mohou limitovat dostupnost prekurzorových aminokyselin uvnitř buňky.

Hormonální regulace se týká také enzymu GCS. Jeho aktivita je regulována cAMP dependentními proteinkinasami nebo proteinkinase-C, které stimulují fosforylaci enzymu vedoucí k útlumu jeho aktivity. Přesný význam této regulace není doposud znám. Je zde předpoklad, že k hormonální regulaci syntézy GSH dochází v případě existence stresové situace v organismu. Potom dochází ke zvýšenému uvolňování hormonů, které potlačí syntézu glutathionu, aby v buňkách nedocházelo k vyčerpávání zásob cysteinu významného pro syntézu proteinů akutní fáze jako odpovědi na vzniklý stres [19].

2.7.2. Regulace na úrovni γ -glutamylcysteinsynthetasy

Syntéza Glutathionu je v každé buňce regulována jeho množstvím. Syntetizovaný GSH působí negativní zpětnou vazbou na enzym GCS, avšak ne na GS. Aktivita GCS je závislá na dostatečném množství kationtů Mg^{2+} a Mn^{2+} [20].

GCS je enzym skládající se ze dvou podjednotek. První z nich je těžká podjednotka. Značí se jako GCS-HS a její molekulová hmotnost je 73 kDa. Je zodpovědná za katalytickou funkci enzymu. Druhá je lehká podjednotka značená jako GCS-LS. Její molekulová hmotnost je 31 kDa a má význam v regulaci aktivity enzymu.[12,21]

Obě podjednotky jsou kódovány různými geny. GCS-HS je reprezentována jedním transkriptem, GCS-LS má dva transkripty [22]. GCS je stabilizována pomocí disulfidové vazby, která se nachází mezi těžkou a lehkou podjednotkou. Dále také přispívají ke stabilitě enzymu i nekovalentní síly [23].

Chemický mechanismus tvorby γ -glutamylcysteinu zahrnuje dva oddělené kroky, které se odehrávají za přítomnosti GCS. V prvním spolu reagují L-glutamát a ATP. Vytvoří spolu těsnou vazbu za vzniku γ -glutamylfosfátu. Tento meziprodukt následně reaguje s L-cysteinem za vzniku finálního produktu γ -glutamylcysteinu.

GSH pomocí negativní zpětné inhibice reguluje aktivitu GCS. Tato Inhibice je nonalosterická a zahrnuje vazbu GSH na glutamátové a i na další místa enzymu [12].

2.7.3. Cystein a jeho vliv na syntézu GSH

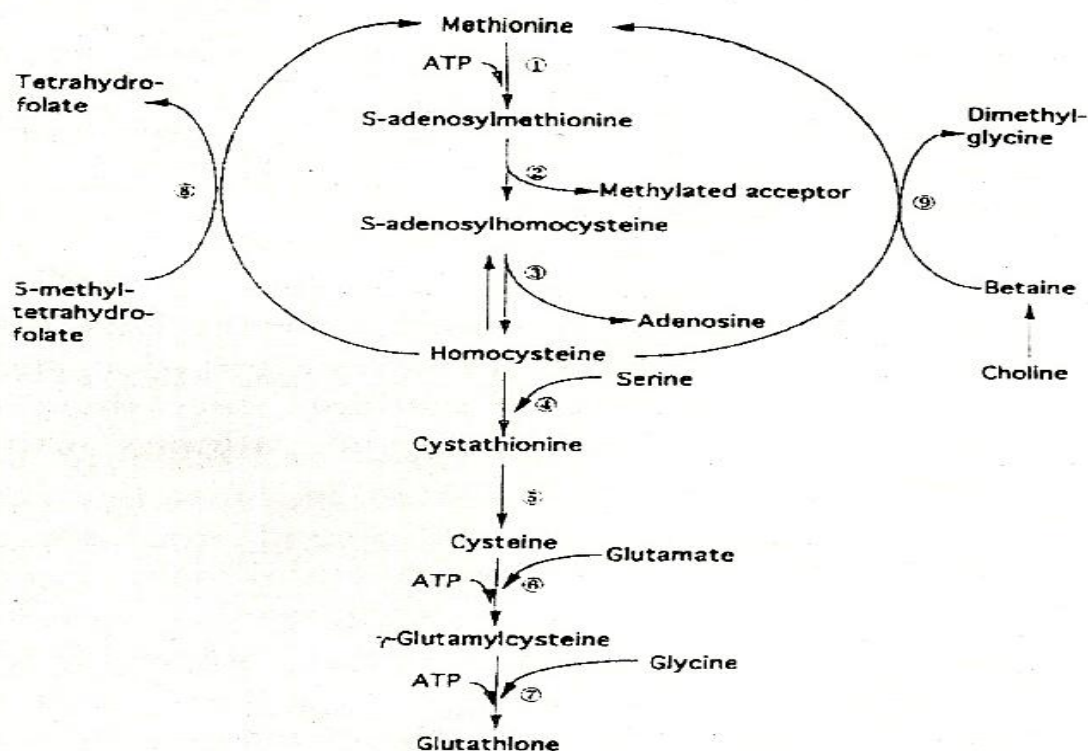
Pro další regulaci aktivity enzymu GCS je důležité zajistit dostupné množství prekurzorové aminokyseliny – cysteinu, který je získáván ze stravy a odbouráváním proteinů.

Cystein může být také syntetizován. Syntéza probíhá v játrech cestou transsulfurace (Obr. č. 5) z methioninu. V této reakci se methionin převádí na homocystein, který je následně sloučen se serinem za vytvoření cystathioninu. Ten se dále štěpí pomocí cystathioninlyasy na cystein a vedle toho buď na homoserin nebo 2-oxobutyrát [1,9, 69].

Cystein je redukováná forma a nachází se uvnitř buněk. V extracelulárním prostoru dominuje disulfidová forma této aminokyseliny, která je označována jako cystin. Cystein se vně buňky ochotně autooxiduje na cystin. Po vstupu cystinu do buňky dochází k jeho rychlé redukci na cystein thioltrasferasou nebo neenzymatickou reakcí [12,24].

Prekurzorové aminokyseliny jsou z extracelulárních prostor transportovány do buňky pomocí membránového transportního systému, který zahrnuje transmembránové proteiny [25]. Glutamát vstupuje do buňky za účasti dvou proteinů značených jako x_c^- (na sodíku nezávislý) a X_{AG} (na sodíku závislý). Cystin se do buňky dostává prostřednictvím x_c^- systému, tedy systému, který je využíván i glutamátem. Prekurzorové aminokyseliny mohou být do buňky transportovány také

nepřímo díky GGT. Tento enzym transportuje γ -glutamylový zbytek na další aminokyselinu. Do buňky tak vstupuje dipeptidový komplex [12,24,26].



Obr. č. 5. - Transsulfurace - metabolismus methioninu a syntéza GSH [12]

Některé buňky, jako například erytrocyty, lymfocyty a buňky mozkových cév, nejsou schopny využívat cystin a z toho důvodu jsou odkázány na plazmatický cystein [8]. Existují dvě biochemické cesty, díky kterým může být plazmatický cystin konvertován na cystein [8]. První z nich spočívá v transportu cystinu a jeho intracelulární přeměně na cystein. Vzniklý cystein je pak buňkami uvolněn do plazmy a následně je využit dle potřeby. Druhou cestou je uvolnění samotného glutathionu z hepatocytů. GSH pak reaguje s cystinem za uvolnění molekuly cysteinu při thiol-disulfidové výměně (reakce 1) [27]:



Ledviny jsou na rozdíl od jater schopny využívat jako zdroj cysteinu cystin [28]. Na druhou stranu enzym cystathionasa, která štěpí cystathionin na cystein, má

v ledvinách sníženou aktivitu. Tím je v ledvinných buňkách utlumena syntéza cysteinu z methioninu transsulfurací. Ledviny tak vychytávají značnou část plazmatického GSH a odbourávají ho na jednotlivé aminokyseliny. Aminokyseliny jsou potom uvolněny do krve. Součástí těchto aminokyselin je také cystein, který je pak využit játry pro resyntézu GSH [8,29].

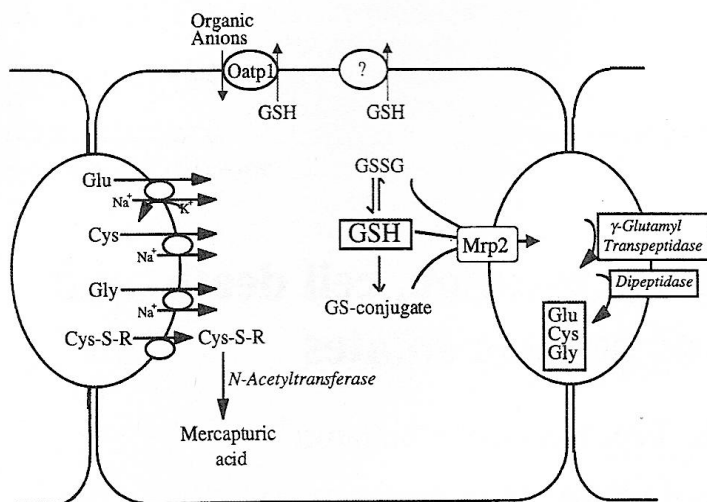
2.8. Metabolismus glutathionu

Rozklad GSH je katalyzován třemi enzymy: γ -glutamyltranspeptidasou, γ – glutamylcyklotransferasou, 5-oxoprolinasou (obr. č. 4). GSH je nejprve přenesen na vnější stranu membrány. Zde se nachází enzym γ -glutamyltranspeptidasa, který na sebe váže aminokyseliny (zejména cystein a methionin). Následně dojde k přenosu γ -glutamylové skupiny glutathionu na nějakou aminokyselinu. Vzniká γ -glutamylová aminokyselina a cysteinylglycin, který je za účasti vnitrobuněčné proteinasy štěpen na glycin a cystein a oba mohou být znovu využity na syntézu glutathionu. γ -glutamylová aminokyselina je transportována zpět do buňky a následně ve dvou krocích se uvolní transportovaná aminokyselina a 5-oxoprolin. Posledním krokem cyklu je hydrolýza oxoprolinu za katalýzy enzymem 5-oxoprolinasou, při tomto ději se spotřebuje ATP. Hydrolýza amidové vazby je obvykle exergonická, což je dáno neobvyklou stabilitou vnitřní amidové vazby 5-oxoprolinu [71].

2.9. Biochemie glutathionu

2.9.1. Glutathion v hepatocytech

Jako jeden z prvních kroků degradace syntetizovaného GSH v játrech je jeho transport sinusoidální nebo kanalikulární membránou hepatocytu (Obr. č. 6) [8].



Obr. č. 6. - Obrat GSH v hepatocytech a možnosti jeho sekrece [5].

(glu – kys. glutamová, cys – cystein, gly – glycin, Mrp2 – multilékový rezistentní protein, Oatp1 – organický anion-transportující protein)

Glutathion, který je sekretován sinusoidální membránou hepatocytů, je převážně ve formě redukované [30]. Transport GSH přes sinusoidální membránu je zprostředkován pomocí přenašeče, který může být inhibován například methioninem či konjugovaným i nekonjugovaným bilirubinem [30]. Mezi hormony a vasoaktivní substance zvyšující uvolňování GSH z hepatocytů, patří vasopresin a noradrenalin [31].

Tři čtvrtiny glutathionu sekretovaného přes kanalikulární membránu je v redukované formě. GSH exkretovaný do žluči je pomocí GGT a dipeptidasy na vnějším povrchu epitelu žlučového traktu hydrolyzován na cysteinglycin, cystinglycin, γ -glutamylglutathion nebo γ -glutamylcystein [32,33]. GSSG forma glutathionu je kanalikulárním pólem hepatocytů uvolňována ve zvýšeném množství s rostoucím intracelulárním oxidačním stresem, kdy dochází ke zvýšené přeměně GSH na GSSG při eliminaci volných radikálů [8].

2.9.2. Interorgánová homeostáza glutathionu

Koncentrace intracelulárního GSH odráží aktuální stav rovnováhy mezi tvorbou a spotřebou GSH. Jak již bylo uvedeno, na udržování potřebné koncentrace se podílí syntéza *de novo* a redukce oxidované formy na redukovanou.

GSSG je zpětně redukován na GSH pomocí enzymu glutathionreduktasy (GR) za přítomnosti $\text{NADPH} + \text{H}^+$ [20,34]. Během této reakce uvolňuje $\text{NADPH} + \text{H}^+$ své dva vodíkové protony, které jsou pomocí GR přenášeny na GSSG za vzniku GSH. Oxidovaná forma NADP^+ je následně regenerována v oxidační části pentózového cyklu. [20,34].

Glutathionreduktasa se vyskytuje v cytosolu buňky a matrix mitochondrií. Tento enzym se nenachází v plazmě a z tohoto důvodu nemůže být plazmatický GSSG recyklován na GSH [20].

V těle existuje konstantní obrat glutathionu. GSH je syntetizován hlavně v játrech. Skrze sinusoidální membránu hepatocytů je uvolňován do plazmy, ze které je vychytáván především ledvinami (cca 50-70%) a plícemi. Podstatná část GSH je degradována na výchozí aminokyseliny pomocí ledvin. Aminokyseliny jsou potom znovu využity zejména játry pro resyntézu GSH.

Hlavním zdrojem cysteinu pro syntézu glutathionu v játrech je transsulfurace methioninu a serinu. Játra přispívají k udržení koncentrace GSH v plazmě z 90% [36]. Uvolňování glutathionu z jater se zvyšuje v odpovědi na jeho zvýšenou spotřebu periferními orgány. Příkladem toho je kosterní svalovina, která se během a po fyzické zátěži musí vypořádat se vzrůstajícím oxidačním stresem. Z tohoto důvodu více, přijímá kromě jiných antioxidantů také glutathion [8,34,35].

S rostoucím věkem stále více převažuje sekrece glutathionu z hepatocytů kanalikulárním pólem [32]. GSH se tak dostává do žluči, kde je degradován. Vzniklé aminokyseliny podléhají enterohepatální recirkulaci. GSH hraje ve žlučovém systému významnou úlohu i v rámci prevence vzniku žlučových kamenů. GSH, který se dostane až do lumen tenkého střeva, je většinou katabolizován díky GGT, na kterou jsou enterocyty bohaté, nebo je přímo enterocyty použit jako součást ochrany proti oxidačnímu stresu [8,34].

2.10. Funkce Glutathionu

2.10.1. Všeobecný přehled rolí glutathionu v organismu

Glutathion má v organismu celou řadu funkcí. V tabulce (Tab. č. 1) je uveden přehled jeho významů pro organismus.

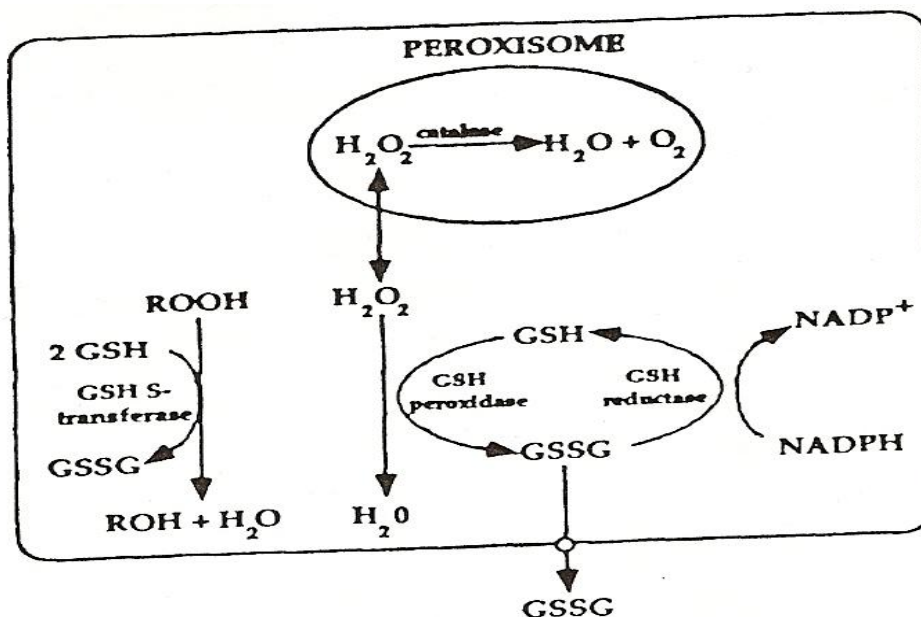
Tab. č.1 - Přehled úlohy glutathionu v organismu

Funkce glutathionu v organismu:
antioxidační funkce
kofaktor izomerasových reakcí a syntézy deoxyribonukleotidů
podíl na regulaci imunitní odpovědi
přítomnost při genové expresi
reakční partner při detoxikaci xenobiotik
účast na metabolismu prostaglandinů a leukotrienů
zachování sulfhydrylové skupiny proteinů v redukované formě
zásobárna a transportní forma cysteinu
transport aminokyselin přes membránu

2.10.2. Antioxidační funkce glutathionu

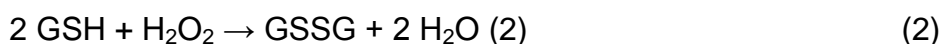
Důležitou funkcí glutathionu je spoluúčast na antioxidačních pochodech. GSH tak chrání buňky před volnými radikály. Některé radikálové formy (např. hydroxylový radikál) mohou přímo reagovat s GSH a jiné se s ním konjugují pomocí záporně nabitých izoenzymů glutathion-S-transferázy (GST) za vzniku méně toxických sloučenin, více hydrofilních a snadněji z buňky vyloučitelných. Jako antioxidant udržuje pomocí oxidované a redukované formy redoxní potenciál cytosolu [42].

2.10.3. Eliminace volných radikálů



Obr. č. 7. - Proces detoxikace peroxidu vodíku a peroxylového radikálu a regenerace GSSG na GSH [8]. ($NADPH+H^+$ - redukována forma NADP, H_2O_2 – peroxid vodíku). Glutamát vstupuje do buňky za účasti dvou proteinů značených jako x_c^- (na sodíku nezávislý) a X_{AG} (na sodíku závislý).

Za spoluúčasti s enzymem glutathionperoxidasou (GPx) je glutathion hlavní obrannou linií proti zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku a buňka se tak může chránit proti oxidačnímu stresu. Endogenně produkovaný peroxid vodíku je redukován v přítomnosti Se-dependentní GPx na vodu a GSH se oxiduje na GSSG. Reakce probíhá takto (reakce 2):



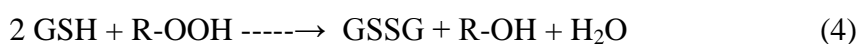
GSSG může být následně redukován zpět na GSH za účasti glutathionreduktázy a NADPH (Obr. č. 7). Regenerace probíhá tímto způsobem (reakce 3):



Tento proces normálně probíhá v poměru 100:1 (GSH:GSSG), což umožňuje působit GSH jako vnitrobuněčná redukční látka. Metabolický obrat GSH je docela rychlý. Má poločas kolem 1 hodiny [43].

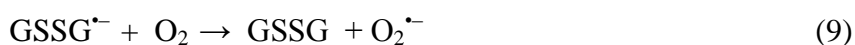
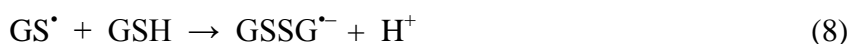
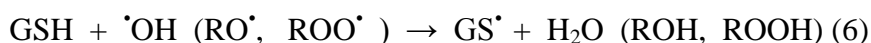
Redukce organických hydroperoxidů redukovanou formou glutathionu je katalyzována také Se-dependentní GPx nebo selen-independentní peroxidasovou aktivitou, která je zajištěna hlavně glutathion-S-transferasou (GST) [16,37].

Významným zdrojem NADPH důležitého pro regeneraci GSSG je pentosofosfátový cyklus. Zajišťuje integritu a správnou funkci zejména erytrocytů. Jeho intenzita je různá v různých tkáních, např. velmi nízká v kosterních svalech a velmi vysoká v játrech. Erytrocyty obsahují velké množství molekulárního kyslíku a to způsobuje zvýšenou tvorbu organických peroxidů. Ty narušují strukturu biologických membrán a způsobují tvorbu methemoglobinu spontánní oxidací železa hemu. Ochranu proti oběma reakcím poskytuje GSH podle reakcí (reakce 4 – 5):



Následná regenerace GSSG, jak už bylo řečeno, probíhá zase za účasti glutathion reduktázy.

Reakcí glutathionu s volnými radikály může vznikat thiolový radikál (GS^\bullet). Ten zaniká reakcí s dalším GS^\bullet radikálem za vzniku GSSG. Reakcí s molekulou GSH však může produkovat radikál oxidovaného glutathionu ($\text{GSSG}^{\bullet-}$), který je schopen redukovat kyslík na superoxid $\text{O}_2^{\bullet-}$. Radikál GS^\bullet může reagovat i s radikálem oxidu dusnatého NO^\bullet za vzniku reaktivního nitrosothiolu GSNO (reakce 6 – 10):



Volné radikály mohou vznikat i autooxidací glutathionu, zejména za katalytického účinku iontů přechodných kovů (Fe^{2+} , Cu^{2+}) [42].

2.10.4. Regenerace antioxidantů

Antioxidanty by nemohly být účinné, kdyby v buňce nepracovaly ve vzájemné souhře.

Glutathion se kromě eliminace volných radikálů uplatňuje jako antioxidant i v dalších oblastech. Přispívá k antioxidační obraně i tím, že je v úzké vazbě s jinými antioxidanty. Zejména se pak jedná o vitamin C a E [38]. GSH je schopen tyto vitaminy redukovat zpět z jejich oxidované formy a tím je regenerovat. Kromě toho je antioxidační aktivita selenu a vitamínu B₆ taktéž úzce spojena s aktivitou GSH. Vitamin B₆ zaručuje dostupnost selenu pro aktivitu GPx [20,39].

2.10.5. Proces detoxikace

Glutathion se také účastní procesu detoxikace v játrech, kde reaguje s reaktivními metabolity spontánní konjugací nebo reakcí katalyzovanou glutathion-S-transferasou [16,15]. Vytváří se tak glutathionový konjugát, který je následně atakován γ -glutamyltranspeptidasou. Tento enzym odštěpí γ -glutamyl a vznikne cysteinyl-glycinový konjugát, který podléhá dalšímu štěpení dipeptidasou za uvolnění cysteinylového konjugátu. Posledním krokem konjugace xenobiotika s GSH je zformování merkaptourátové kyseliny během acetylace cysteinu [8,12,40].

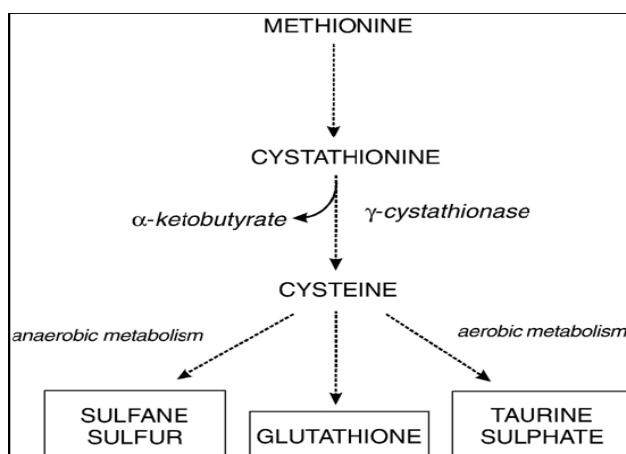
Příkladem xenobiotik, která jsou detoxikována za součinnosti s GSH, jsou acetaminophen, formaldehyd a bromobenzen [40]. Například formaldehyd je v organismu odstraňován formaldehyddehydrogenasou. Substrátem je právě GSH a formaldehyd, které jsou konjugovány na S-formyl-glutathion. Nutno podotknout, že formaldehyd v organismu není pouze exogenního, ale i endogenního původu. Formaldehyd vzniká během aldolového štěpení methioninu, při detoxikaci methanolu alkoholdehydrogenasou a degradaci cholinu [41].

Konjugace některých látek endogenního původu probíhá stejnou cestou jako detoxikace xenobiotik [12,15]. Příkladem látek endogenního původu konjugovaných s GSH jsou estradiol-17- β , melanin, leukotrieny a prostaglandiny [15].

Všechny konjugační reakce s GSH vedou k ireverzibilní spotřebě intracelulárního glutathionu [8,12,41].

2.10.6. GSH jako zásobárna cysteinu

Cystein nemůže být v organismu transportován v plazmě nebo skladován v buňkách, protože velice snadno podléhá autooxidaci na cystin. Během této přeměny navíc dochází k uvolnění toxických volných kyslíkových radikálů [8,12,15,37]. Proto GSH díky γ -glutamylovému cyklu slouží jako kontinuální zdroj cysteinu [8].



Obr.č. 8 - Aerobní a anaerobní metabolismus cysteinu

Na začátku tohoto cyklu je cystein (Obr. č. 8). Jde buď o cystein právě transportovaný do buňky, nebo cystein uvolněný v rámci katabolismu proteinů v buňce. Tento cystein může být převeden na sulfát a taurin, nebo je použit pro syntézu GSH [12]. Vzniklý GSH může být uvolněn z buňky pomocí přenašeči zprostředkovaného transportu [37]. V extracelulárním prostoru je GSH degradován působením enzymu γ -glutamyltranspeptidasy. GGT odštěpí z GSH γ -glutamylovou skupinu a naváže ji na aminokyselinu za vzniku γ -glutamyl-aminokyseliny. Nejčastějším akceptorem γ -glutamylové skupiny bývá cystin. Vzniklá γ -glutamyl-aminokyselina je transportována zpět do buňky, kde je metabolizována za uvolnění aminokyseliny a 5-oxoprolinu. 5-oxoprolin je konvertován na glutamát, který se může zúčastnit resyntézy glutathionu [12].

2.10.7. Transport aminokyselin

Glutathion se také účastní transportu některých aminokyselin přes buněčnou membránu. Existuje několik transportních mechanismů, z nichž převažuje symport a antiport. Dochází tak ke spojení transportu aminokyselin s transportem sodíku. γ -Glutamyl-aminokyselinový cyklus je jedním příkladem skupiny transportních mechanismů aminokyselin. Ačkoli tento mechanismus vyžaduje větší přísun energie, je velmi rychlý a má vysokou kapacitu. Cyklus je primárně funkční v renálních epiteliálních buňkách. Enzym γ -glutamyltranspeptidasa je lokalizován v buněčné membráně a kyvadlovým mechanismem přenáší GSH z buněčného povrchu k aminokyselinám (zejména k cysteinu), které s ním následně reagují. Tato reakce uvolňuje cysteinylglycin a generuje γ -glutamyl-aminovou kyselinu, která je transportovaná do buňky a hydrolýzou se uvolňuje aminokyselina do buňky. Glutamát je uvolňován jako 5-oxoprolin a cysteinylglycin je rozštěpen na komponenty (aminokyseliny). GSH reakce vyžaduje ATP-závislou přeměnu 5-oxoprolinu na glutamát a následně adici dvou molů ATP, které se spotřebují během normální generace glutathionu [44]. Existují i jiné mechanismy transportu aminokyselin, které jsou buď symporty nebo antiporty k transportu sodíku.

2.10.8. Ochrana thiolových skupin

Jednou z mnoha funkcí je také ochrana thiolových skupin ($-SH$) v bílkovinách, které jsou většinou nezbytné pro jejich funkci. Patří k nim např. mnohé enzymy (dehydrogenasy, ATPasy, kreatinkinasa, enzymy podílející se na regeneraci poškozené DNA aj.), některé receptory, transportní a jiné proteiny. GSH se uplatňuje nejen v cytoplazmě, ale chrání i DNA v buněčném jádře před oxidačním poškozením a tvoří rezervu thiolových skupin buňky [42].

2.11. Metody stanovení glutathionu

GSH hraje podstatnou roli v buněčné homeostáze a jeho kvantitativní a kvalitativní modifikace jsou brány v úvahu jako index oxidativního poškození. V posledních letech bylo vynalezeno a zdokonaleno mnoho separativních a neseperativních metod pro stanovení hladiny GSH v biologickém materiálu. Tyto metody jsou rozsáhle používány ve studiích metabolismu glutathionu a oxidativního stresu. V současnosti se nejvíce používají stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforézy (CE).

Abychom mohli posoudit míru oxidačního stresu v buňkách, tkáních nebo orgánech, můžeme použít tři typy metod. První spočívá ve stanovení volných radikálů např. metodou elektrospinové rezonance. Další možností je detekce látek, které specificky vznikly následkem reakce volných radikálů s různými biomolekulami. Třetí možností je analýza antioxidantů.

Následující přehled bude pojednávat o analytických možnostech pro stanovení glutathionu a jemu příbuzných látek.

2.11.1. Úprava vzorku

Důležitou součástí stanovení glutathionu je úprava vzorku. Glutathion můžeme dělit na redukovaný (GSH) a oxidovaný (GSSG) a dále také na volný a celkový, který je kromě volné formy tvořen i formou vázanou na některé proteiny [46].

Jednou možností při úpravě vzorku a následného stanovení volného glutathionu je precipitace proteinů. Nejčastěji se provádí okyselením roztoku kyselinou trichloroctovou, perchlorovou, metafosforečnou nebo sulfosalicylovou [47]. Supernatant bez proteinů se následně získá centrifugací a ve vzorku můžeme stanovit volný glutathion spektrofotometricky, fluorimetricky, HPLC metodou, kapilární elektroforézou či dalšími metodami. Další možností deproteinace vzorku je ultrafiltrace přes separační kolony. Výhodou je jednoduchost provedení bez použití dalších deproteinačních činidel.

Deproteinace vzorku je nutná takřka u všech známých metod. Výjimka je jen u některých metod, jako například nukleární magnetická rezonance (NMR). Tato

metoda umožňuje měřit glutathion i v neporušených buňkách nebo nedeproteinovaných vzorcích [48].

Problémem při manipulaci se vzorkem je oxidace thiolové skupiny. Tato oxidace pak často vede k nadhodnoceným výsledkům koncentrace GSSG [49]. Je známo, že GSH rychle oxiduje neenzymaticky při hodnotě pH větší než 7 [66]. Pro blokaci oxidace thiolové skupiny se používá některých činidel, jako například N-ethylmaleimid, iodoctová kyselina nebo 2-vinylpyridin. Určitou modifikací je přidání antioxidantních činidel do vzorku po deproteinizaci, kdy se současně upraví pH vzorku na neutrální hodnotu, a nebo dávkování antioxidantních činidel před přidáním precipitačních látek [50].

2.11.2. Neseparativní techniky stanovení glutathionu

Stanovení GSH a jeho analogů pomocí neseparativních metod, jako jsou např. spektrofotometrie, fluorimetrie a amperometrie, je v dnešní době méně používané. Mají dobrou senzitivitu, jsou jednoduché a cenově dostupné. Nevýhodou je mají neuspokojivou specifitu a selektivitu. Podle klasické spektrofotometrie může být celková koncentrace určena až po rozsáhlé předúpravě vzorku, která zahrnuje oxidaci GSH na GSSG, a následnou tvorbu barevného produktu. Fluorimetrie vyžaduje derivatizaci glutathionu na fluoreskující látku a detekční koncentrace se pak pohybuje v mmol/l někdy až $\mu\text{mol/l}$. Elektrochemické stanovení má také zdlouhavou preanalytickou fázi, ale amperometrická detekce je citlivější a detekční limit je v $\mu\text{mol/l}$ [66].

2.11.3. Fluorimetrické stanovení glutathionu

Fluorimetrická analýza je založena na kvantitativní reakci mezi GSH s o-ftaldialdehydem (OPA) při pH 8 za vzniku isoindolového kruhu. OPA se během této reakce váže na volné thiolové skupiny. Isoindolový kruh po expozici excitačnímu záření poskytuje fluorescenci, která je měřena fluorimetricky ($\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$) [50]. Tato metoda stanovení GSH byla poprvé popsána Cohnem a Lylem [63]. Později byla modifikována Hissinem a Hillem [58], ti popsali i

stanovení oxidované formy glutathionu a našli optimální reakční prostředí tvořené 0,1 M roztokem fosfátového pufru o pH 8 [47,64].

2.11.4. Separační techniky stanovení glutathionu

Mezi separační techniky můžeme řadit chromatografické metody -tenkovrstvá chromatografie (TLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC) a kapilární elektroforézu (CE). Tyto techniky jsou v kombinaci s různými detekčními systémy.

2.11.5. TLC stanovení

Stanovení GSH a GSSG pomocí tenkovrstvé chromatografie je založeno na selektivní reakci s fluorescenčním činidlem 5-(pentafluorobenzoylamino)-fluoresceinem (PFB-F). Detekce se potom provádí pomocí fluorescenčního detektoru ($\lambda_{em} = 515 \text{ nm}$; $\lambda_{ex} = 495 \text{ nm}$). Tato metoda, v porovnání s ostatními separačními metodami, se v dnešní době nepoužívá díky pracné přípravě a dlouhé době stanovení [56].

2.11.6. HPLC stanovení

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jedna z nejrozšířenějších metod pro stanovení glutathionu. Využívá se ve spojení s nejrůznějšími typy detekčních systémů (např. fluorimetrický, UV/VIS a elektrochemický detektor). Může být také použit hmotnostní detektor nebo diode array detektor. Mezi výhody elektrochemické detekce patří jednoduchá příprava vzorku, specifita detekce obou forem glutathionu, kratší čas měření a možnost současné analýzy dalších thiolů. Ostatní metody vyžadují složitější úpravu vzorků před vlastní analýzou [50].

Pro vlastní detekci glutathionu je většinou nutná derivatizace, buď předkolonová a nebo postkolonová.[51] Jednou z derivatizačních látek je Ellmanovo činidlo (5,5'-dithio-(bis-2-nitrobenzoová) kyselina, zkráceně DTNB) [50] nebo Sanderovo činidlo

(2,4-dinitrofluorobenzen). Nejdříve se formují S-karboxy-methylové deriváty z volných thiolových skupin a potom následuje konverze volných aminoskupin na deriváty 2,4-dinitrofenylu (DNP). Tuto metodu stanovení glutathionu s předkolonovou derivatizací pomocí Sanderova činidla používali Fariss a Reed. Deriváty byly následně separovány na reverzních fázích HPLC. [47]

Derivatizaci Ellmanovým činidlem popsali jako první Reeve a Kuhlenkamp. Katrusiak tento postup modifikoval [51]. Tím umožnil detekci nejen glutathionu, ale i dalších thiolů. Navíc může být detekována i GSSG forma, pokud je vzorek před separací inkubován například s dithiotreitem.

Mezi další skupinu derivatizačních látek patří fluorogenní činidla. Na ně jsou kladeny vysoké požadavky. Prvně by měly reagovat se stanovovanou látkou za tvorby produktu, který by poskytoval dostatečně intenzivní fluorescenci i v případě mikromolárního množství určované látky. Druhou podmínkou je to, aby fluorogenní činidlo samo neposkytovalo fluorescenci a posledním požadavkem je, aby tato činidla reagovala rychle a specificky s GSH za tvorby stabilního produktu. Příkladem těchto látek jsou monobromobimany, bimany, halogensulfonylbenzofurazany a OPA [46].

Bimany velice rychle reagují s thiolovou skupinou při pH 8 a za laboratorní teploty. Vzniká vysoce fluoreskující thioether. Nevýhodou tohoto činidla je to, že biman sám a také jeho hydrolytické produkty poskytují fluorescenci [51].

Do skupiny halogensulfonylbenzofurazanů se řadí amonium-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol-4-sulfonát (SBD-F). Derivatizací vzniklé produkty jsou separovány a kvantifikovány isokratickou elucí na reverzních fázích. Metody založené na derivatizaci SBD-F jsou citlivé a specifické a nejsou zde interferující píky v chromatogramu. Nevýhodou je dlouhý reakční čas a požadavek na vysokou teplotu reakce (60°C) a zásadité pH (9,5) [50, 51].

Další látkou, která se používá v rámci derivatizace je o-ftaldialdehyd (OPA) [1,46,47,52]. OPA reaguje s GSH za laboratorní teploty takřka okamžitě [52]. Sám OPA neposkytuje při měření interferující fluorescenci. Vzniklý produkt je stabilní, avšak za předpokladu jeho přechovávání ve tmě a chladu. OPA reaguje s GSH za vzniku substituovaného isoindolového kruhu [1,46,47,52]. Následuje separace na HPLC s fluorescenční detekcí. V metodě popsané Paronim [54] je plazmatický glutathion stanoven po redukci s dithiotreitem a proteinové precipitaci kyselinou perchlorovou. Vzniklý GSH adukt je separován a kvantifikován během isokratické

eluce na reverzní fázi do čtyř minut. [50] Tato metoda byla Cereserem [55] modifikována pro určení celkového a redukovaného glutathionu. Pro deproteinizaci je použita metafosforečná kyselina a GSH produkty jsou separovány a kvantifikovány gradientovou elucí na reverzních fázích. [52]

Pro postkolonovou derivatizaci existuje méně derivatizačních činidel. Jen některé z nich splňují požadavky na rychlou tvorbu produktů a spektrofotometrické nebo fluorimetrické vlastnosti odlišné od vzniklých produktů. Mezi tyto látky kupříkladu patří 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina a o-ftaldialdehyd, tedy látky, které se používají i pro předkolonovou derivatizaci [46].

2.11.7. GC metoda stanovení glutathionu

Existuje také několik metod pro stanovení GSH a GSSG pomocí plynové chromatografie. Jediné spojení, které se v literatuře uvádí, je GC s hmotnostním detektorem. Stanovení touto metodou vyžaduje látku, která se dá zplynit za vysoké teploty. To ale GSH a GSSG nesplňuje, protože se v bodě varu snadno degraduje. Takže můžeme konstatovat, že derivatizační krok je nutný pro snížení degradačních produktů v průběhu zplyňování. Takovým derivatizačním činidlem je anhydrid kyseliny trifluoroctové a ethylchloroformát. S prvním činidlem dochází k formaci bicykloglutarimidu s GSH a s druhým činidlem v alkalickém prostředí se GSH mění na N,S-ethoxycarbonylmethylesterový derivát. Oba deriváty se detekují pomocí MS detektoru s dobrou senzitivitou [66].

2.11.8. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je vysoce efektivní, velice rychlá, nízkoobjemová analytická separační technika pro analýzu koncentrace glutathionu. Piccoli [60] jako první popsal vysokoúčinnou kapilární elektroforézu (HPCE), která umožňuje současné určení GSH a GSSG formy v červených krvinkách, a to ve femtomolovém množství.

Jin [61] vytvořil kapilární zónovou elektroforézu s elektrochemickou detekcí pro stanovení glutathionu v jednotlivých erythrocytech. U této metody je do separační kapiláry injektována celá buňka a měří se pouze GSH.

Další modifikací kapilárních elektroforetických metod je varianta postupu dle Carrua [62]. Dochází zde k lýze erythrocytů ledovou vodou a jednoduchému filtračnímu kroku, který minimalizuje tvorbu GSSG bez nutné přítomnosti N-ethylmaleimid.

V dnešní době se CE používají různé detektory například UV\VS detektor, DAD, LIF, MS, fluorescenční, elektrochemický popř. i jiné.

Použití systému CE s fotometrickým detektorem se používá pro stanovení GSH\GSSG v matrici jako je např. erythrocyty, plasma, živočišná a zeleninová tkáň bez derivatizace. Mnoho metod ale derivatizaci používá. Derivatizačními činidly jsou např. N-ethylmaleimid (NEM), N-(1-pyrenyl)-maleimid (NPM), 5',5'-dithiobis(nitrobenzoová kyselina) (DTNB), používají se pokud je snížena hladina glutathionu v důsledku silných oxidativních změn. Takové derivatizace stabilizují GSH v průběhu úpravy vzorku, zlepšují absorpenci thiolových sloučenin a zlepšují rozhodnutí mezi GSH a GSSG v systému CE. Tak například použití DTNB dovoluje stanovení GSH ještě když je významně snižená hladina z důvodu silných oxidativních změn v buněčném systému. Speciálním znakem CE je možnost derivatizace analytu v koloně předtím, než dojdou k detektoru. To však ale omezuje čas přípravy vzorku. Takovým příkladem je reakce GSH s 2,2'-dipyridyldisulfidem (DPDS) přímo v koloně. Vzniká thiopyridon, který absorbuje při 343 nm [66]. U tohoto způsobu je potřeba část kapiláry, tzv. reakční komora, kde se analyt a derivatizační činidlo smíchají.

Spojení CE s fluorescenčním detektorem může poskytnout možnou výhodu zlepšení detekčního limitu asi 100-1000krát větší než umožňuje UV-VIS detekce. Za použití laserem indukované fluorescence může dojít ke zlepšení neustálých změn excitačního světla a také dojde k prodloužení detekčního limitu. Byla vynalezena plně automatizovaná a senzitivní metoda na stanovení GSH pomocí derivatizace na koloně 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazolem (ABD-F) a následná detekce na LIF detektoru.

Pro sledování oxidačního stresu indukovaného v buněčné kultuře pomocí syntetických hydroperoxidů můžeme použít detekci GSH a ROS po reakci s NDA (naftalen-2,3-dicarboxaldehyd) a DHR-123 (dihydrorhodamin-123).

V neposlední řadě bych ráda zmínila spojení CE s elektrochemickou detekcí, která je založena na reakci analytů na povrchu elektrody a jenom ty molekuly ve slabé difúzní vrstvě přispívají na intenzitě signálu. Pro sloučeniny, které nemohou být příznivě detegovány pomocí UV-absorpce, jako v případě glutathionu a jiných thiolů, stanovení pomocí ECD může být cennou alternativou.

Stanovení triolových sloučenin s následnou CE separací bylo provedeno pomocí amperometrické detekce na uhlíkové elektrodě v mírně neutrálním pH. Očekávaná účinnost dělá tuto metodu vhodnou pro detekci takovýchto sloučenin ve farmaceutických a sérových vzorcích. Jiná metoda pro stanovení GSH v plazmě nebo erythrocytech pomocí amperometrické detekce používá Au-Hg mikroelektrodu.

Poslední možností použití CE je ve spojení s MS, což se osvědčilo při stanovení GSH\GSSG v moči a může se použít pro diagnostiku defektní γ -glutamyl transpeptidasy [66].

2.11.9. Porovnání HPLC a CE

O analýzu GSH a GSSG je nepřetržitý zájem z důvodu jejich biologické funkce a klinické významnosti. HPLC analýza je používána hlavně pro stanovení GSH a GSSG. Nicméně HPLC metody jsou limitované dlouhým separačním časem a jednotlivými kroky při úpravě vzorku, která je velice zdlouhavá. Vzhledem k vysoké separační síle, krátké analýzy a nízkým nákladům je kapilární elektroforéza v dnešní nejvíce používaná k analýze GSH a GSSG v různých biologických materiálech. Ale při použití UV nebo elektrochemického detektoru, poskytuje senzitivitu pouze v rozsahu v $\mu\text{mol/l}$.

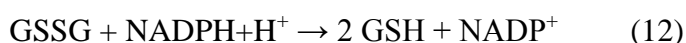
2.11.10. Enzymatická metoda stanovení GSH

Jednou z nejvíce používaných nechromatografických metod stanovení koncentrace GSH a GSSG je enzymatická metoda objevena Owensem a Belcherem [56].

Metoda je založena na detekci produktu 2-nitro-5-thiobenzoové kyseliny (TNB). TNB vzniká během reakce DTNB s GSH. Během této reakce je GSH oxidován na

GSSG. Vzniklý GSSG je následně redukován zpět na formu GSH pomocí přítomného enzymu glutathionreduktasy a kofaktoru NADPH. Míra nárůstu TNB je sledována při 412 nm spektrofotometricky a je přímo úměrná množství přítomného GSH a GSSG. Toto měření může být sledováno i při 340 nm, kdy se spektrofotometricky stanovuje úbytek NADPH nebo je sledována spotřeba NADPH během zpětné redukce GSSG na GSH [1,47].

Průběh reakcí při enzymatickém stanovení GSH je následující (reakce 11 a 12):



Nevýhodou této metody je případná nespecifická konverze endogenního GSH na GSSG. Následkem jsou nadhodnocené výsledky množství GSSG ve vzorku. Jako prevence proti této chybě se používá N-ethylmaleimid (NEM). Jeho velkou nevýhodou je inhibice enzymové aktivity glutathionreduktázy. Proto je potřeba tuto látku odstranit před vlastní inkubací. Pro odstranění NEM z reakční směsi se používá například kolonová chromatografie nebo etherová extrakce [57,58].

2.11.11. Bioluminiscenční stanovení GSH

Bioluminiscenční stanovení redukované formy glutathionu vyvinul Romero a Mueller-Klieser [59]. Principem je měření chemiluminiscence v reakčním systému zahrnujícím bakteriální luciferasu. GSH je navázán do NADP/NADPH+H⁺ redoxního systému skrze specifické enzymy. Tento redoxní systém je navíc spárován s bakteriální luciferasou prostřednictvím flavinmononukleotidu, který je detekovanou látkou.

Tato metoda poskytuje možnost měření malého množství kapalného vzorku a může být použita v širokém rozmezí koncentrací GSH [50]. Nevýhodou je však nemožnost detekce GSSG.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál a pomůcky

3.1.1. Chemikálie

- Superčistá voda připravená reverzní osmózou MILLI-Q PLUS (Millipore; USA)
- hydroxid sodný (NaOH; $M_r = 40$; Penta, ČR)
- kyselina chlorovodíková (HCl; $M_r = 36,46$; Penta, ČR)
- kyselina boritá, KB (H_3BO_3 ; $M_r = 61,83$; Penta, ČR)
- L-glutathion – redukovaný, GSH ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$; $M_r = 307,33$; Sigma Aldrich, Německo)
- Glutathion – oxidovaný, GSSG ($C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$; $M_r = 612,60$; Sigma Aldrich, Německo)
- Isopropanol (C_3H_8O ; $M_r = 55,06$; Penta, ČR)

3.1.2. Biologický materiál

- Vzorčky nesrážlivé krve získané z fakultní nemocnice v Hradci Králové.

3.1.3. Přístroje a laboratorní pomůcky

- Parafilm PM 992 (Pechinevy, USA)
- Skleněné laboratorní sklo (Simax, ČR)
- Pipety 100 – 1000 μ l, 1 – 5 ml, 50 – 200 μ l (Biohit, Finsko)
- Špičky na pipety 1000 μ l, 200 μ l (Sarstedt, Německo)
- Úprava vody MilliQ Plus (Millipore, USA)
- Referenční pH-metr PHM 93 (Radiometer Copenhagen, Dánsko)
- lednička (Zanussi)
- analytické váhy MC1 (Sartorius, Německo)

- mikrozkušavky o objemu 1,5 ml
- neupravená křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50 μm a 75 μm (Watrex, ČR)
- Kapilární elektroforéza P\ACE systém 5510 (Beckman, USA)
- Softwarový systém Gold, version 8 (Beckman, USA)
- P\ACE UV Absorbance Detektor (Beckman, USA)
- Centrifuga Biofuge 15R (Heraeus, Německo)
- Ultrafiltrační kolonky, 0,5 ml Microcon (Millipore, USA)
- Kapilární elektroforéza PrinCE (Prince Technologies B.V., Holandsko)
- Softwarový systém DAX 3D (Prince Technologies B.V., Holandsko)

3.2. Pracovní postup

3.2.1. Příprava roztoků

Roztok borátového pufru ($c = 300 \text{ mmol/l}$)

Rozpuštěním 1,8549 g kyseliny borité v 100 ml destilované vody byl připraven roztok o $c = 300 \text{ mmol/l}$. Konečná úprava pH na hodnotu 7,8 byla provedena přidáním 1 mol/l NaOH. Borátový pufr byl uchováván v chladničce.

Zásobní roztok HCl ($c = 1 \text{ mol/l}$)

Byl připraven ředěním koncentrované kyseliny chlorovodíkové.

Roztok HCl ($c = 0,01 \text{ mol/l}$)

Byl připraven naředěním 1 mol/l zásobního roztoku HCl.

Zásobní roztok NaOH ($c = 1 \text{ mol/l}$)

Roztok byl připraven rozpuštěním 20 g NaOH v 500 ml superčisté vody.

Roztok NaOH ($c = 0,1 \text{ mol/l}$)

Byl připraven ředěním 1 mol/l zásobního roztoku NaOH.

3.2.2. Příprava standardů

Standardní roztok GSH ($c = 500 \mu\text{mol/l}$)

Roztok byl připraven rozpuštěním 7,69 mg GSH v 50 ml 0,01 mol/l HCl.

Standardní roztok GSSG ($c = 500 \mu\text{mol/l}$)

Roztok byl připraven rozpuštěním 15,32 mg GSSG v 50 ml 0,01 mol/l HCl.

Tyto roztoky byly dále ředěny na standardy o nižších koncentracích glutathionu.

3.2.3. Příprava vzorků

Jako materiál jsme použili vzorky krve odebrané do zkumavek s obsahem EDTA. K 10 μl plné krve nebo krvinek propraných fyziologickým roztokem jsme přidali 1000 μl superčisté vody, čímž jsme získali hemolyzát, který jsme před stanovením deproteinovali ultrafiltrací. 0,5 ml hemolyzátu jsme pipetovali do kolonek Microcon a nechali centrifugovat (20 min., 15 000 ot. min). Filtrát jsme pak použili k analýze.

3.3. Kapilární elektroforéza firmy Beckman

K optimalizaci metody byla použita kapilární elektroforéza (Beckman, USA) systém P/ACE 5510. Stanovovaná látka byla detekována pomocí UV-VIS detektoru (Beckman, USA).

Jako základ pro analýzu byly převzaty parametry z již publikovaného článku [68, 69]. Jsou uvedeny v tabulce (Tab. č. 2) a byly následně optimalizovány.

Tab. č. 2 - Počáteční podmínky optimalizovaných parametrů [60, 61]

Parametr	Podmínky
Polarita	od + k -
Teplota	25 °C
Napětí	28 kV
Vlnová délka	200 nm
Proud	90 μ A
Čas dávkování	2 s
Doba analýzy	5 min.
pH BP	7,8
Koncentrace BP	300 mmol/l
Délka kapiláry	47 cm
Průměr kapiláry	75 μ m
Podmínky ekvilibrace	1 min. 0,01 mol/l HCl za vysokého napětí
	10 min. borátovým pufrům za vysokého napětí
	3 min. borátovým pufrům při 13 kV
	10 min. borátovým pufrům při 20 kV
	10 min. borátovým pufrům za vysokého napětí
Koncentrace GSH/GSSG	500 μ mol/l
Proplach kapiláry mezi stanoveními	1 min. 0,1 mol/l NaOH
	1 min. 0,01 mol/l HCl
	1 min. borátovým pufrům

Parametry uvedené v tab. č. 1 byly také použity pro první dávkování standardů před zahájením optimalizace podmínek.

3.3.1. Stanovení optimální vlnové délky

Pro stanovení optimální vlnové délky byly použity podmínky vzorového článku [60, 61]. Pro optimalizaci byly vybrány tři hodnoty vlnové délky: 180 nm, 200 nm a 214 nm. Signál snímáný kapilární elektroforézou Beckman nelze hodnotit v celém rozsahu spektra, ale jenom ve vybraných vlnových délkách. Je to způsobeno tím, že

přístroj používá k vyčlenění určitých vlnových délek ze spektra filtry a ne mřížku, která umožní získat libovolnou vlnovou délku a nebo umožní měření 3D spektra.

Pro stanovení byla použita koncentrace glutathionu 500 $\mu\text{mol/l}$. Separace probíhla v prostředí borátového pufru o koncentraci 300 mmol/l a pH 7,8.

3.3.2. pH Borátového pufru

Pro optimalizaci pH byl připraven borátový pufr o koncentraci 300 mmol/l a pH 6,19. Postupně jsme tuto hodnotu zvyšovali po 0,2 jednotkách až na hodnotu 8,79. Testovali jsme velikost signálu poskytovaného GSH a GSSG o koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$, který byl připraven dle postupu uvedeného výše.

3.3.3. Koncentrace borátového pufru

Pro měření byly připraveny roztoky o koncentracích 100, 200, 300 a 400 mmol/l . pH bylo upraveno na hodnotu 7,8.

3.3.4. Optimální teplota

Při optimalizaci teploty jsme proměřili širší spektrum kolem teploty 25°C, kterou udává vzorový článek jako nejvhodnější. Začali jsme na 16°C a postupně jsme zvyšovali teplotu až ke 30°C. Pro stanovení byl použit standardní vzorek GSH a GSSG o koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$ a borátový pufr o koncentraci 300 mmol/l a pH 7,8.

3.3.5. Optimalizace napětí

Pro optimalizaci napětí byl použit standardní roztok GSH a GSSG o koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$. Borátový pufr měl koncentraci 300 mmol/l a pH 7,8. Napětí jsme postupně zvyšovali po 2 jednotkách od 20 kV do 30 kV.

3.3.6. Optimalizace času dávkování

Dávkování standardního vzorku GSH a GSSG o koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$ jsme prováděli tlakem po dobu 1 – 10 sekund.

3.3.7. Optimalizace parametrů kapiláry

Zkoušeli jsme použít kapiláry o vnitřních průměrech 50 μm a 75 μm a různé délce (37 cm, 47 cm, 57 cm). Pro měření byl použit standardní roztok GSH a GSSG o koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$. Borátový pufr měl koncentraci 300 mmol/l a pH 7,8.

3.4. Validace metody na CE Beckman

Metoda byla validována za optimálních podmínek.

3.4.1. Stanovení limitu detekce glutathionu

Při stanovení limitu detekce jsme udělali koncentrační řadu standardů. Počáteční koncentrace GSH a GSSG byla 500 $\mu\text{mol/l}$. Standardní roztok jsme ředili dvojkovou řadou až do poslední koncentrace s dobře viditelným signálem.

3.4.2. Kalibrace metody

Pro kalibraci jsme si připravili zásobní roztok GSH a GSSG o koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$.

Ze zásobního roztoku GSH a GSSG o koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ byly naředěny kalibrační roztoky (0; 1; 2,5; 5; 10; 20; 50; 100; 150 a 200 $\mu\text{mol/l}$). Jednotlivé přídavky roztoku GSH a GSSG a 0,01 mol/l roztoku HCl jsou uvedeny v tabulce (Tab. č. 3).

Tab. č. 3 - Přidávky 200 $\mu\text{mol/l}$ roztoku GSH a 0,01 mmol/l HCl

c GSH a GSSG ($\mu\text{mol/l}$)	0	1	2,5	5	10	20	50	100	150	200
$V_{\text{GSH+GSSG}}$ (ml)	0	0,02	0,05	0,1	0,2	0,4	1	2	3	4
V_{HCl} (ml)	4	3,98	3,95	3,9	3,8	3,6	3	2	1	0

Po promíchání byly všechny vzorky analyzovány.

3.4.3. Výpočet koncentrace z kalibračního faktoru

Nejdříve byl vypočítán kalibrační faktor, podle kterého jsme z plochy pod píkem vypočítali koncentraci glutathionu.

Kalibrační faktor byl stanoven proměřením standardu o známé koncentraci. Byl vypočten podle vzorce (rovnice č. 1):

$$\text{Faktor} = c / \text{AUC} \quad (1)$$

Pro určení kalibračního faktoru jsme použili dva standardy o koncentracích 5 a 10 $\mu\text{mol/l}$, z vypočítaných faktorů jsme získali průměrnou hodnotu a tu pak použili jako výsledný kalibrační faktor. Kalibrační faktor jsme měřili před každou analýzou.

3.4.4. Přesnost a správnost metody

Pro měření přesnosti a správnosti jsme použili standardní vzorky GSH a GSSG o koncentracích: 100 $\mu\text{mol/l}$ a 10 $\mu\text{mol/l}$.

Pro měření přesnosti v sérii (intra-assay) jsme provedli 10 měření stejného vzorku pro každou koncentraci během jednoho dne. Přesnost měření sledovaných analytů mezi sériemi (inter-assay) jsme zjišťovali opakovaným měřením téhož vzorku, který byl skladován v lednici. Provedli jsme 10 měření v průběhu deseti dnů. Vypočítali jsme průměry, směrodatné odchylky a variační koeficienty.

Správnost jsme určili jako chybu relativní vztaženou ke správné hodnotě. Pro výpočet jsme použili průměrné hodnoty koncentrací z 10 měření a známé koncentrace standardních vzorků.

3.5. Kapilární elektroforéza firmy Prince Technologies

K optimalizaci metody byla použita kapilární elektroforéza PrinCE (Prince Technologies B.V., Holandsko), která používala softwarový systém DAX 3D. Stanovované látky byly detekovány pomocí DAD detektoru (Prince Technologies B.V., Holandsko).

U těchto stanovení jsme vycházeli z výsledků předchozí optimalizace a doplnili je o optimalizaci parametrů: integrační čas, velikost skupiny diod, průměr skenů a vlnová délka z důvodu odlišného softwarového vybavení a principu detekce. Při optimalizaci jsme použili roztok GSH a GSSG o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$.

Pro optimalizaci integračního času jsme volili hodnoty: 3, 20, 50, 500 ms.

Pro stanovení vhodné velikosti skupiny diod jsme měřili hodnoty: 1, 10, 20, 30, 40, 50 diod/pixel. Dále jsme proměřili oblast kolem hodnot 5-25 diod/pixel.

V průběhu optimalizace jsme se snažili zvolit i vhodnou frekvenci. Začali jsme na hodnotě 0,01 Hz a postupovali směrem nahoru dokud signál a šum nebyli optimální míře únosnosti.

Tato kapilára nám umožňuje měření celého spektra vlnových délek díky mřížce monochromátoru. Z tohoto důvodu jsme mohli optimalizovat i vlnovou délku.

3.6. Validace metody na CE Prince Technologies

3.6.1. Kalibrace

Kalibrace metody byla provedena podobně jako u předchozí kapilární elektroforézy Beckman. Byl použit standardní roztok GSH a GSSG o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$. Jednotlivé přídavky roztoku GSH a GSSG a 0,01 mol/l roztoku HCl jsou uvedeny v tabulce (Tab. č. 4).

Tab. č. 4 - Přidavky 100 $\mu\text{mol/l}$ roztoku GSH a 0,01 mol/l HCl

c GSH a GSSG ($\mu\text{mol/l}$)	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50	100
$V_{\text{GSH+GSSG}}$ (ml)	0	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4
V_{HCl} (ml)	4	3,94	3,87	3,75	3,5	3	2	0

3.6.2. Přesnost a správnost metody

Přesnost a správnost byly měřeny stejně jako u kapilární elektroforézy Beckman.

3.6.3. Výtěžnost

Výtěžnost (recovery) byla měřena ve třech vzorcích krve, které jsme pipetovali dle tabulky (Tab. č. 5). Celkový objem byl 500 $\mu\text{mol/l}$.

Tab. č. 5 - Pipetovací protokol stanovení výtěžnosti GSH a GSSG
v hemolyzátech erytrocytů

	V hemolyzátu erytrocytů (μl)	V vody (μl)	V standardu, c = 100 $\mu\text{mol/l}$ (μl)
Vzorek	450	50	0
Vzorek s přidavkem	450	0	50

Takto připravené vzorky jsme za použití ultrafiltračních kolonek deproteinovali a hned změřili koncentraci GSH a GSSG v jednotlivých vzorcích.

3.7. Stanovení GSH a GSSG v biologickém materiálu

Po zavedení a optimalizaci metody jsme začali stanovovat GSH a GSSG v hemolyzátech z plné krve nebo propraných erytrocytů. Získané hodnoty koncentrace GSH a GSSG v $\mu\text{mol/l}$ jsme přepočítali na g Hb v hemolyzátu, abychom získali reprodukovatelné výsledky.

4. VÝSLEDKY

4.1. Kapilární elektroforéza Beckman

4.1.1. Optimalizace podmínek

Souhrn výsledků z optimalizace podmínek je uveden v následující tabulce (Tab. č. 6).

Tab. č. 6 - Výsledky optimalizace metody kapilární elektroforézou Beckman

Parametr	Podmínky
Polarita	od + k -
Teplota	25 °C
Napětí	28 kV
Vlnová délka	200 nm
Proud	90 μ A
Čas dávkování	2 s
Doba analýzy	5 min.
pH BP	7,8
Koncentrace BP	300 mmol/l
Délka kapiláry	47 cm
Průměr kapiláry	75 μ m
Podmínky ekvilibrace	1 min. 0,01 mol/l HCl za vysokého napětí
	10 min. borátovým pufrem za vysokého napětí
	3 min. borátovým pufrem při 13 kV
	10 min. borátovým pufrem při 20 kV
	10 min. borátovým pufrem za vysokého napětí
Proplach kapiláry mezi stanoveními	1 min. 0,1 mol/l NaOH
	1 min. 0,01 mol/l HCl

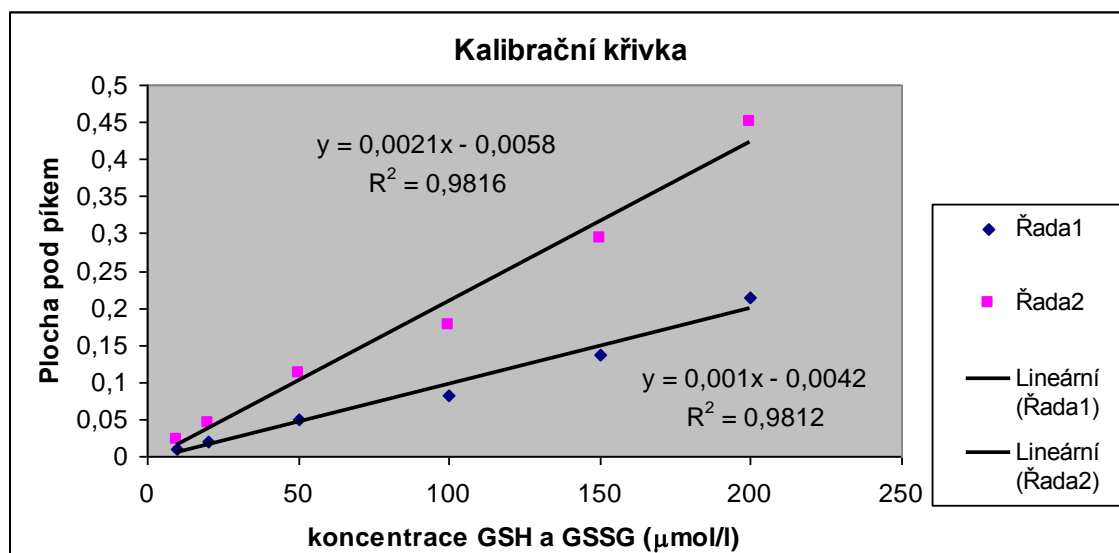
4.1.2. Limit detekce stanovení GSH a GSSG

Nejnižší koncentrace, kdy byly na záznamu dobře vidět oba píky GSH i GSSG byla 4 $\mu\text{mol/l}$. Pro další práce se standardem GSH a GSSG jsme použili koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$ a 100 $\mu\text{mol/l}$.

4.1.3. Kalibrace metody

Kalibrační křivka je znázorněna na obrázku (Obr. č. 9). Kalibrace je lineární v celém měřeném rozsahu koncentrací.

V přílohách je tabulka (Tab. č. 7), ve které jsou uvedeny migrační časy GSH a GSSG a jejich plochy pod píky pro jednotlivé koncentrace ve vzorku.



Obr. č. 9 - Kalibrační křivka pro GSH a GSSG změřená pomocí CE Beckman

4.1.4. Přesnost a správnost metody

Souhrnná tabulka výsledků měření přesnosti a správnosti je uvedena v tabulce (Tab. č. 8) Podrobněji jsou výsledky uvedeny v příloze (Tab. č. 9 – 12). Jsou v ní

uvedené výsledky měření přesnosti (směrodatná odchylka a variační koeficient) a správnosti (BIAS) u dvou koncentrací standardu.

Tab. č. 8 - Výsledky měření přesnosti a správnosti na CE Beckman

Intra-assay				
	c = 10 $\mu\text{mol/l}$		c = 100 $\mu\text{mol/l}$	
	GSH	GSSG	GSH	GSSG
SD	0,24	0,53	1,18	1,04
CV (%)	2,24	5,48	1,14	1,08
BIAS (%)	2,53	-1,55	1,14	-2,77
Inter-assay				
	c = 10 $\mu\text{mol/l}$		c = 100 $\mu\text{mol/l}$	
	GSH	GSSG	GSH	GSSG
SD	4,19	1,22	40,38	21,98
CV (%)	11,72	29,47	15,73	28,89
BIAS (%)	4,92	30,81	3,12	28,60

4.1.5. Měření reálných vzorků krve

K měření GSH a GSSG byly použity hemolyzáty z plné krve s filtrací a bez filtrace ultrafiltrační kolonkou. Elektroforeogramy byly vyhodnocovány kvantitativní metodou z ploch píku (AUC) GSH a GSSG v biologickém materiálu. K výpočtu byl použit kalibrační faktor.

Na obrázku (Obr. č. 10) je ukázka elektroforeogramu GSH a GSSG ve filtrovaném hemolyzátu s přidavkem standardu o $c = 100\mu\text{mol/l}$ v poměru 1:1. Tabulka (Tab. č. 13) následně shrnuje migrační časy a plochy pod píky odpovídající GSH a GSSG.

Tab. č. 13 - Migrační časy GSH a GSSG

Migrační čas (min.)	Identifikace	Plocha pod píkem
3.49	GSH	0,10966
3.95	GSSG	0,15914

4.2. Kapilární elektroforéza Prince Technologies

4.2.1. Optimalizace podmínek

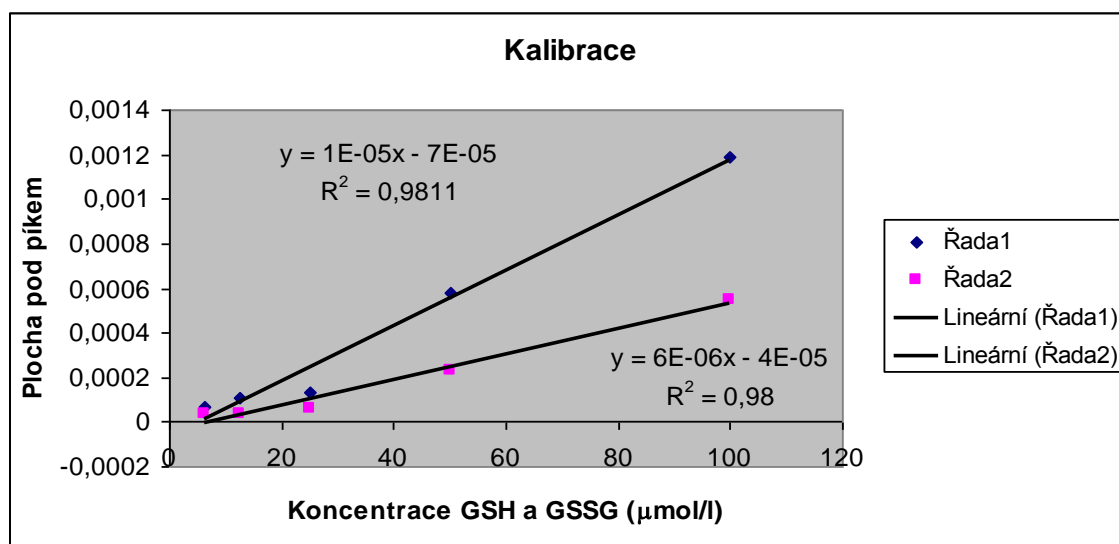
Výsledky optimalizace podmínek jsou shrnuty a zaznamenány v tabulce (Tab. č. 14). Ostatní podmínky jsou stejné jako u kapilární elektroforézy Beckman.

Tab. č. 14 - Výsledky optimalizace metody CE Prince

Parametr	Podmínky
Integrační čas	20 ms
Velikost skupiny	10 diod/points
Frekvence	0,5 Hz
Průměr skenů	5

4.2.2. Kalibrace metody

Tabulka (Tab. č. 15), která je uvedena v příloze, shrnuje výsledky měření kalibrace. Jsou zde uvedeny plochy pod píky pro jednotlivé koncentrace GSH a GSSG ve vzorku. Kalibrační křivka je na obrázku (Obr. č. 11).



Obr. č. 11 - Kalibrační křivka pro GSH a GSSG měřená pomocí CE Prince Technologies

4.2.3. Přesnost a správnost

Výsledky měření přesnosti jsme shrnuli do tabulek (Tab. č. 16 – 20).

Tab. č. 16 - Výsledky měření přesnosti a správnosti na CE Prince Technologies

Intra-assay				
	c = 10 $\mu\text{mol/l}$		c = 100 $\mu\text{mol/l}$	
	GSH	GSSG	GSH	GSSG
SD	0,663	0,74	22,43	7,20
CV (%)	6,22	9,43	19,61	7,53
BIAS (%)	0,22	-11,42	14,86	-6,13
Inter-assay				
	c = 10 $\mu\text{mol/l}$		c = 100 $\mu\text{mol/l}$	
	GSH	GSSG	GSH	GSSG
SD	0,94	1,46	5,89	3,66
CV (%)	8,88	17,12	5,46	3,82
BIAS (%)	1,39	-3,25	8,41	-6,10

4.2.4. Výtěžnost

Výtěžnost stanovení GSH a GSSG v promytých hemolyzátech erytrocytů uvádí tabulka (Tab. č. 21).

Tab. č. 21 - Výtěžnost stanovení GSH v hemolyzátu erytrocytů

	AUC GSH s přídávkem 50 μl vody	AUC GSH s přídávkem 50 μl standardu	Koncentrace GSH s přídávkem vody ($\mu\text{mol/l}$)	Koncentrace GSH s přídávkem standardu ($\mu\text{mol/l}$)	Recovery (%)
Vzorek 1	0,0000604	0,0001227	9,46	19,23	95,8
Vzorek 2	0,0000536	0,0001118	8,42	17,51	89,1
Vzorek 3	0,0000782	0,0001403	12,25	21,97	95,3
Průměrná recovery (%)					91,2

Výtěžnost pro GSSG nebyla stanovena z důvodu velmi nízké koncentrace v hemolyzátu bez přídavku, která byla pod detekčním limitem této metody.

4.2.5. Měření reálných vzorků

K měření GSH a GSSG byly použity hemolyzáty z plné krve a erytrocytů promytých fyziologickým roztokem. Vzorové ukázky elektroforeogramů jsou uvedeny v příloze (Obr. č. 12 – 14). Elektroforeogramy byly vyhodnocovány kvantitativní metodou pomocí plochy píku GSH a GSSG. K výpočtu byl použit kalibrační faktor.

Tabulka (Tab. č. 22) shrnuje koncentrace GSH a GSSG v hemolyzátu a přepočítá naměřené koncentrace na g hemoglobinu.

Tab. č. 22 – Výsledky měření deseti vzorků hemolyzátů z promytých erytrocytů

vzorek	AUC GSH	c GSH v $\mu\text{mol/l}$	c GSH v $\mu\text{mol/g Hb}$
1	0,00013422	21,02	6,01
2	0,00013445	21,06	5,69
3	0,00008482	13,28	4,28
4	0,00007573	11,86	4,74
6	0,00007940	12,44	3,66
7	0,00007160	11,21	3,50
8	0,00009938	15,56	4,72
9	0,00002230	3,49	0,97
10	0,00009910	15,52	4,43

5. DISKUZE

Stanovení glutathionu pomocí kapilární elektroforézy s UV/VIS detekcí je jednou z mnoha metod, které se v praxi využívají. V odborné literatuře můžeme najít, že nejpoužívanější nebo nejrozšířenější metodou pro stanovení glutathionu je HPLC. Avšak stanovení pomocí HPLC metody je ve srovnání s kapilární elektroforézou zdlouhavé a často mu předchází zdlouhavá preanalytická úprava vzorku (deproteinace, derivatizace). Další nevýhodou HPLC je dlouhá kondicionace chromatografické kolony před analýzou vzorků a velká spotřeba mobilní fáze. Z těchto důvodů jsme se snažili využít možnosti měření forem glutathionu pomocí kapilární elektroforézy. Našli jsme postup [60, 61], který nám po optimalizaci podmínek dovoluje měřit GSH a GSSG přímo v hemolyzátu erytrocytů bez zdlouhavých preanalytických úprav a v krátkém čase.

V naší práci jsme se snažili tuto metodu stanovení glutathionu aplikovat do praxe a nalézt vhodné podmínky analýzy. Pro stanovení jsme vybrali dva různé systémy kapilární elektroforézy: CE Beckman a CE Prince Technologies. Oba systémy mají své výhody a nevýhody.

Velkou výhodou CE Beckman je možnost jednoduché výměny kapilár. Ačkoliv se u této kapilární elektroforézy musí kapilára náležitě smotat a nainstalovat do kartidže, která chrání kapiláru před zlomením, je proto možné mít pro každou metodu jinou kapiláru a při změně metodiky ji jednoduše vyměnit. Tato možnost výměny kapilár nám chybí u druhé kapilární elektroforézy, u které existuje pouze jeden držák na kapiláru. Je pravdou, že je jednodušší kapiláru do držáku uchytit, ale kapilára není chráněna pevným obalem kartridže.

Také je u kapilár Beckman lépe vyřešen způsob termostatování kapiláry, ve které probíhá separace analyzovaného vzorku. Jak je známo, že teplota ovlivňuje pohyblivost molekul a proto má i vliv na stanovení látek. Kartridže s kapilárou jsou plněné kaplinou, která udržuje teplotu na požadované hodnotě. U systému Prince technologies je držák s kapilárou upevněn do komůrky termostatované vzduchem v okolí. Problém nastává je-li kapilára delší a do komůrky se nevejde. Pak je vysunutá do prostředí a tak stanovení probíhá při laboratorní teplotě. Můžeme se tak setkat s rozdíly ve stanovení stejné látky, které jsou ovlivněny teplotními rozdíly okolí.

Novější typ kapilární elektroforézy firmy Prince Technologies má však na druhou stranu nesporně celou řadu výhod. Nejdůležitější je možnost stanovení analytu při jakékoli vlnové délce v rozsahu 190-720 nm a snímání 3D spektra. Můžeme tak lépe zvolit vlnovou délku pro detekci látek. Kapilární elektroforéza Beckman nám toto neumožňuje, protože používá k vyčlenění určitých vlnových délek pouze optické filtry. Měření probíhá pouze při čtyřech vlnových délkách – 180, 200, 214 a 254 nm. Detektor diodového pole u systému Prince technologies má také vyšší citlivost, kterou lze upravit pomocí nastavení počtu diod snímajících signál. Další výhodou této kapilární elektroforézy je pracovní program, který umožňuje uživatelsky příjemnější práci a libovolné úpravy elektroforeogramů, včetně identifikace píků, nastavení limitu detekce atd.

Při prvních analýzách jsme veškeré podmínky navolili podle publikovaných dat [60, 61]. Zaměřili jsme na optimalizaci parametrů, validaci metody a její aplikaci pro stanovení v biologickém materiálu.

Jako první jsme začali s optimalizací podmínek u CE Beckman. Nejdříve bylo nutné nalézt optimální vlnovou délku. Ověřili jsme, že při vlnové délce 200 nm dosahuje nejvyšší citlivosti. Tato hodnota je shodná s publikovanou hodnotou a nadále byla použita pro další optimalizaci.

Z literárního zdroje [60, 61] jsme zjistili, že vhodné pH borátového pufru je od 7,8 a výš. Zjistili jsme, že s rostoucím pH se postupně prodlužoval migrační čas. Při hodnotě pH 6,2 byl retenční čas roven 3,03 min. pro GSH a 3,55 min. pro GSSG. Pro pH 7,8 byl migrační čas 3,37 min. pro GSH a 3,81 min. pro GSSG. Dále se vzrůstajícím pH se začala zmenšovat plocha pod píkem. Kupříkladu u pH nad 8 byly již píky poloviční oproti pH nižším. Tudíž jsme se rozhodli pro kompromis a volili také pH 7,8.

U borátového pufru jsme dále zkoumali vliv různých koncentrací na stanovení glutathionu. Proměřili jsme roztoky o různé koncentraci borátového pufru. U vzorků s molaritou 100 a 200 mmol/l se v záznamu neobjevily žádné signály. Píky GSH a GSSG se objevily až ve zbylých dvou koncentracích. Zjistili jsme, že vliv koncentrace borátového pufru na výskyt signálu byl nevýrazný. Pro další stanovení jsme používali roztok pufru o koncentraci 300 mmol/l.

Při hodnocení elektroforeogramů, získaných z optimalizace teploty, nám jako nejlepší teplota vyšla 23°C. Teplotní změny během měření ovlivňují migrační časy.

Se zvyšující se teplotou, se prodlužovaly migrační časy a zvyšoval se proud. Pro 23°C byly migrační časy: 3,22 min. pro GSH a 3,63 min. pro GSSG.

Optimalizovali jsme napětí a zjistili, že se zvyšujícím napětím se zkracoval migrační čas. Ze záznamů nejlépe vyhovovalo 28 kV a nadále ho použili pro další stanovení.

Obecně platí, že se zvyšujícím dávkováním roste koncentrace měřené látky. Tuto teorii jsme potvrdili a navíc jsme zjistili, že se také zkracuje migrační čas. Dostačující doba nástřiku pro odečítání elektroforeogramů byla 1 a 2 sekundy. Pro další pokusy jsme používali 2 sekundy.

Při optimalizaci parametrů kapiláry jsme se snažili najít nejvhodnější délku a průměr kapiláry tak, aby migrační čas, píky a jejich vzdálenost byli vhodné pro stanovení krevních vzorků. Migrační čas se zkracoval s kratší kapilárou a s menším průměrem. Při použití průměru 75 μm a délky 57 cm je migrační čas příliš dlouhý. Naopak při použití délky 37 cm a průměru 50 μm je migrační čas výborný, ale zvyšuje se proud, který způsobuje zmenšení plochy pod píkem. Tato ztráta citlivosti má vliv na detekční limit stanovení. Pro naše účely nejlépe vyhovuje délka kapiláry 47 cm o průměru 75 μm .

Po zavedení těchto podmínek jsme celou metodu nakalibrovali. Použili jsme k tomu standard GSH a GSSG o koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$. Ze získaných údajů z analýzy jsme sestrojili kalibrační křivku, která byla v celém rozsahu měřených koncentrací lineární.

Následně jsme testovali přesnost a správnost. Pro určení přesnosti jsme měřili opakovatelnost (intra-assay) a reprodukovatelnost (inter-assay). V obou případech jsme provedli deset měření při dvou koncentracích standardu (10 a 100 $\mu\text{mol/l}$). Vypočítali jsme faktory, koncentrace, směrodatné odchylky a variační koeficienty.

U opakovatelnosti byly průměrné hodnoty variačního koeficientu pro koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ 2,24% a 5,48% pro GSH a GSSG. Pro koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ byly hodnoty variačního koeficientu 1,18% a 1,04 % pro GSH a GSSG.

Při měření reprodukovatelnosti byly průměrné hodnoty variačního koeficientu pro koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ 11,71% a 29,47% pro GSH a GSSG a dále pro koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ byly 15,73% a 28,89% pro GSH a GSSG. Nedostatečné výsledky reprodukovatelnosti mohly být způsobeny špatnou stabilitou vzorku, který jsme skladovali při 4-8°C. Při skladování dochází postupně k oxidaci glutathionu, proto je

potřeba používat vždy čerstvě připravený materiál a vzorky skladovat při nižší teplotě.

Správnost jsme určili jako chybu relativní vztaženou ke správné hodnotě. Pro výpočet jsme použili průměrné hodnoty koncentrací z deseti měření a známé koncentrace standardních vzorků. Správnost pro koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ byla vyhovující: 2,5% a 1,5% pro GSH a GSSH. Správnost u koncentrace 100 $\mu\text{mol/l}$ měla hodnoty velice podobné.

Pro první analýzu pomocí CE Prince Technologies jsme použili již optimalizované podmínky. Navíc jsme museli upravit integrační čas, velikost skupiny, průměr skenů a frekvenci. Následně jsme testovali přesnost a správnost stejně jako u předchozí kapiláry. Variační koeficienty při stanovení opakovatelnosti byly vyhovující. Jejich hodnota byla pro koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ 6,22% a 9,43% pro GSH a GSSG a pro koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ 19,62% a 7,53% pro GSH a GSSH. Podobně to bylo také u reprodukovatelnosti. Variační koeficient byl pro koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ 8,88% a 17,12% pro GSH a GSSG, a pro koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ byl 5,46% a 3,82% pro GSH a GSSG. Správnost měření byla také v pořádku.

Po nastavení všech vhodných pomínek a validaci metody jsme se soustředili na nalezení optimálního způsobu zpracování vzorků hemolyzátů, tak abychom identifikovali GSH a GSSG a eliminovali interferující píky. Měřili jsme vzorky hemolyzovaných erytrocytů deproteinované ultrafiltrací.

Zkoušeli jsme glutathion separovat z hemolyzátů o různé koncentraci plné krve. Ideální hemolyzát z plné krve byl připraven pipetováním 10 μl krve do 1 ml destilované vody. Elektroforeogramy z takto připraveného materiálu obsahovali jeden interferující pík, který znemožňoval identifikaci GSH. Tento pík bylo možné odseparovat prodloužením kapiláry na 87 cm, což ale prodloužilo analýzu na 20 minut.

Prvních dobře hodnotitelných výsledků jsme se dopracovali až analýzou hemolyzátů připravených z propraných erytrocytů. Pro promytí erytrocytů jsme pipetovali 150 μl erytrocytů a 200 μl fyziologického roztoku. Promyté erytrocyty jsme pak použili pro přípravu hemolyzátu. Stejně jako u vzorků z plné krve jsme použili 10 μl krve a 1 ml destilované vody. Tímto postupem úpravy vzorku jsme

získali elektroforeogram analýzy zbavený balastních píků. Mohli jsme se tak vrátit zpět ke kratší kapiláře a tím také zkrátit dobu analýzy.

Jedním z posledních kroků této diplomové práce bylo změření výtěžnosti metody v hemolyzátu z propraných erytrocytů. Z důvodu velmi nízké koncentrace GSSG nebylo možné stanovit jeho výtěžnost. Průměrná recovery činila pro GSH 91%.

Nakonec jsme změřili koncentrace glutathionu v sérii deseti vzorků. Koncentrace GSH se pohybovaly v rozmezí 3,5 – 21 $\mu\text{mol/l}$. Koncentraci v $\mu\text{mol/l}$ jsme museli přepočítat na gramy hemoglobinu, abychom vyloučili rozdíly v množství erytrocytů v připravených hemolyzátech.

6. ZÁVĚR

Stanovení GSH pomocí kapilární elektroforézy s UV/VIS detekcí je jednou z mnoha metod, které se pro analýzu glutathionu používají. Cílem této diplomové práce bylo nalézt optimální podmínky pro stanovení GSH v hemolýzátu erytrocytů pomocí kapilární elektroforézy. V experimentální části byly ověřeny poznatky vycházející ze současné odborné literatury. Měření bylo provedeno na dvou kapilárních elektroforézách: CE Beckman a CE Prince Technologies.

Po optimalizaci všech parametrů jsme provedli kalibraci metody a následně jsme testovali její přesnost (opakovatelnost a reprodukovatelnost), správnost a výtěžnost.

Dále jsme se soustředili na úpravu krevních vzorků. Obrovským přínosem bylo stanovení glutathionu v hemolýzátu propraných erytrocytů.

Metoda na stanovení forem glutathionu kapilární elektroforézou s UV/VIS detekcí je dostatečně citlivá a reprodukovatelná. Variační koeficienty měření v sérii a mezi sériemi vzorků vyhovují současným kritériím pro stanovení analytu v biologických materiálech. Pro použitelnost této metody v praxi jsou výsledky validace uspokojivé.

Tato metoda je vhodná pro stanovení GSH a GSSG v klinických laboratořích.

7. PŘÍLOHY

7.1. Seznam příloh

Výsledky měření kalibrační křivky

Tab. č. 7 - Výsledky kalibrace provedená na CE Beckman

Tab. č. 15 - Výsledky kalibrace provedená na CE Prince Technologies

Záznamy měření

Obr. č. 10 – Záznam měření vzorku hemolyzátu plné krve s přidavkem standardu ($c = 100 \mu\text{mol/l}$) v poměru 1:1 měřené pomocí CE Beckman

Obr. č. 12 – Záznam analýzy standardu GSH a GSSG ($c = 100 \mu\text{mol/l}$) měřené pomocí CE Prince Technologies

Obr. č. 13 – Elektroforeogram stanovení GSH a GSSG v hemolyzátu z plné krve měřené pomocí CE Prince Technologies

Obr. č. 14 - Elektroforeogram stanovení GSH a GSSG v hemolyzátu z promytých erytrocytů měřené pomocí CE Prince Technologies

Tabulky s přesností měření

- CE Beckman

Tab. č. 9 – Přesnost měření (Intra-assay) pro $c = 10 \mu\text{mol/l}$

Tab. č. 10 – Přesnost měření (Intra-assay) pro $c = 100 \mu\text{mol/l}$

Tab. č. 11 – Přesnost měření (Inter-assay) pro $c = 10 \mu\text{mol/l}$

Tab. č. 12 – Přesnost měření (Inter-assay) pro $c = 100 \mu\text{mol/l}$

- CE Prince Technologies

Tab. č. 17 – Stanovení přesnosti a správnosti v sérii pro $c = 10 \mu\text{mol/l}$

Tab. č. 18 – Stanovení přesnosti a správnosti v sérii pro $c = 100 \mu\text{mol/l}$

Tab. č. 19 – Stanovení přesnosti a správnosti mezi sériemi pro $c = 10 \mu\text{mol/l}$

Tab. č. 20 – Stanovení přesnosti a správnosti mezi sériemi pro $c = 100 \mu\text{mol/l}$

7.2. Výsledky měření kalibrační křivky

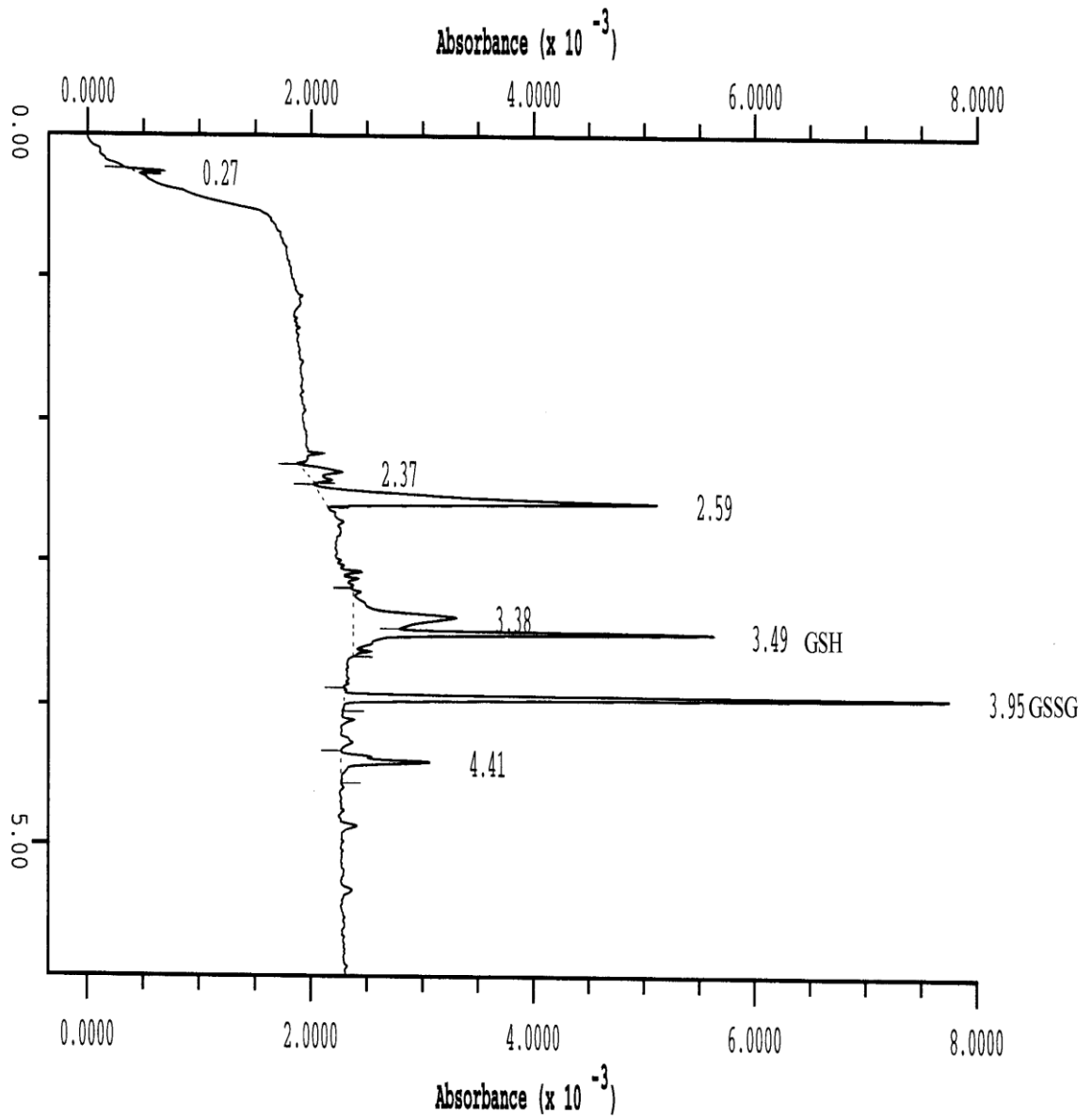
Tab. č. 7 - Výsledky kalibrace provedená na CE Beckman

Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Retenční čas GSH (min.)	Retenční čas GSSG (min.)	Plocha pod píkem GSH	Plocha pod píkem GSSG
200	3,17	3,52	0,21293	0,45111
150	3,13	3,47	0,13784	0,29417
100	3,11	3,46	0,08251	0,17721
50	3,11	3,45	0,05083	0,11276
20	3,11	3,46	0,02045	0,04506
10	3,12	3,48	0,00918	0,02136

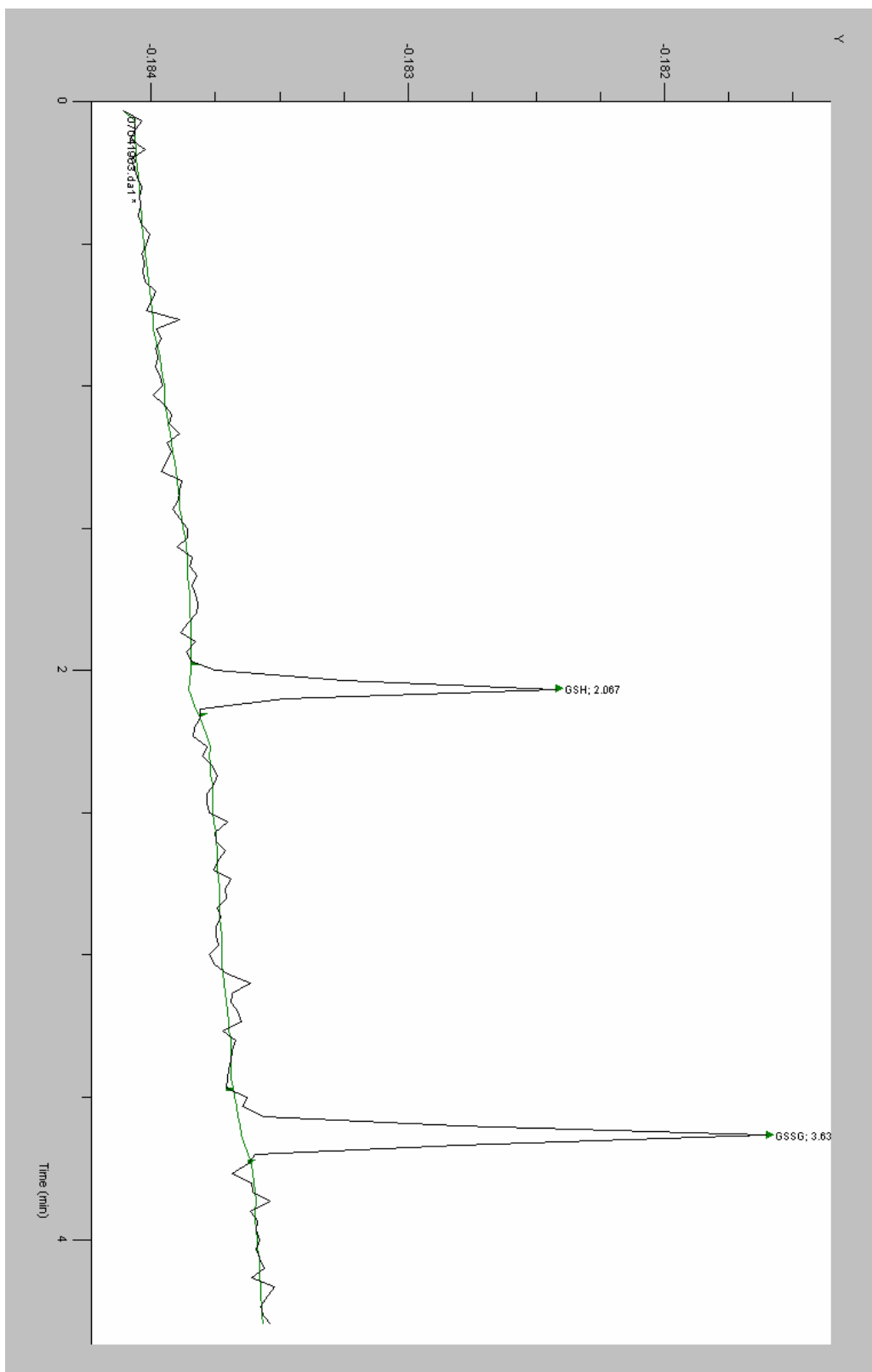
Tab. č. 15 - Výsledky kalibrace provedená na CE Prince Technologies

Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Plocha pod píkem GSH	Plocha pod píkem GSSG
100,0	0,000549	0,001186
50,0	0,000230	0,000575
25,0	0,000060	0,000130
12,5	0,000035	0,000106
6,25	0,000035	0,000069

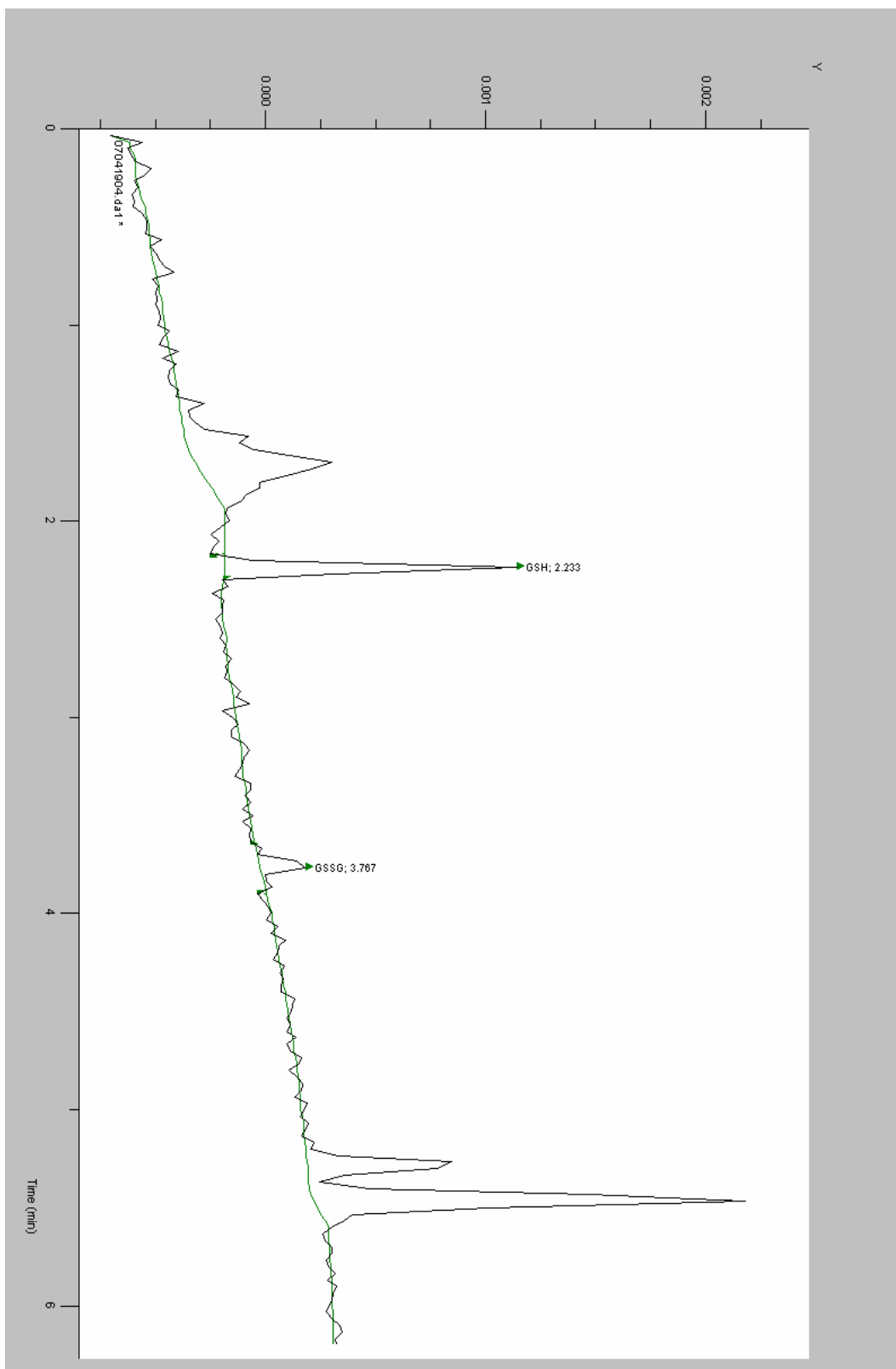
7.3. Záznamy měření



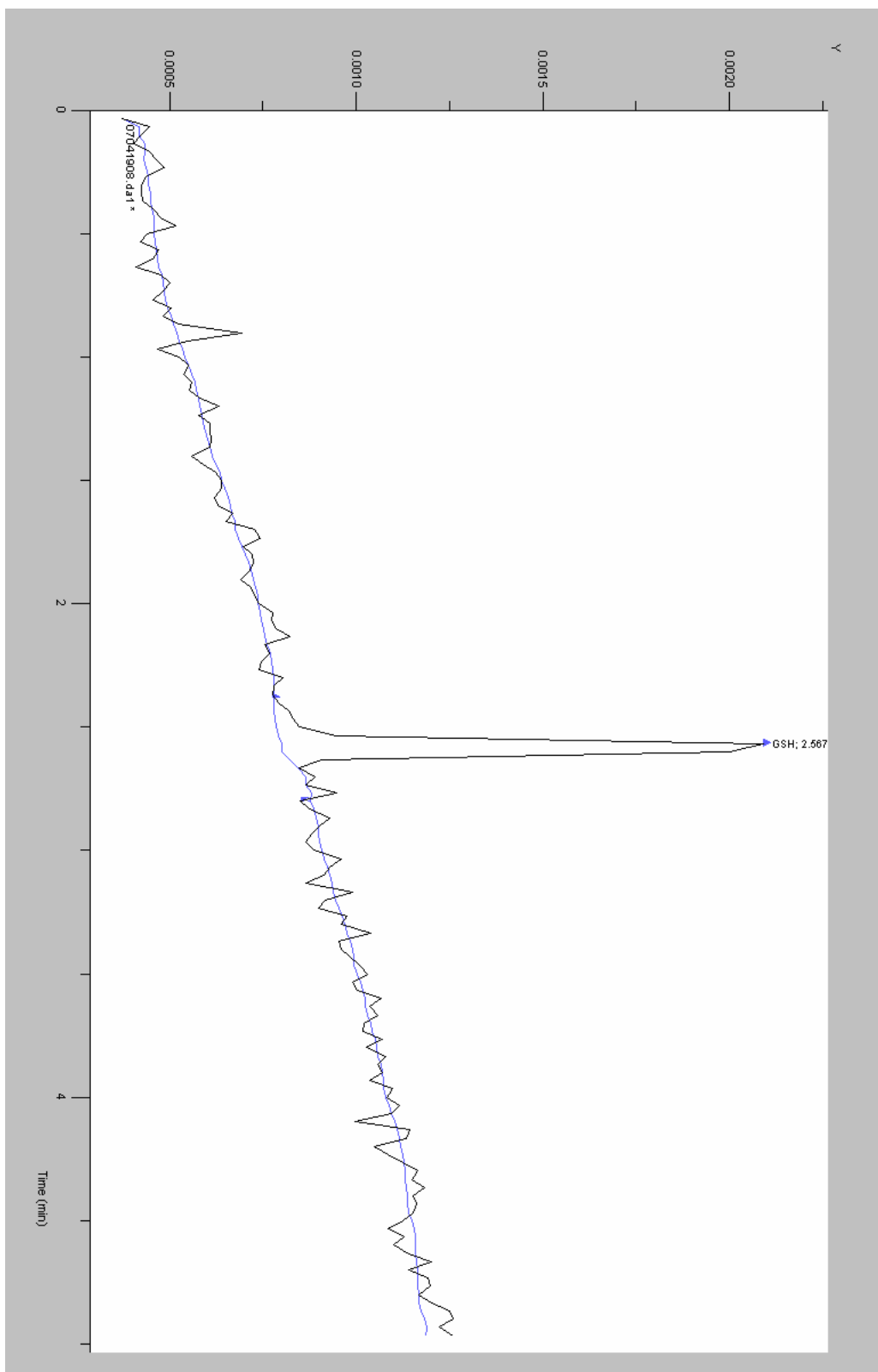
Obr. č. 10 – Záznam měření vzorku hemolyzátu plné krve s přidavkem standardu ($c = 100 \mu\text{mol/l}$) v poměru 1:1 měřené pomocí CE Beckman



Obr. č. 12 – Záznam analýzy standardu GSH a GSSG ($c = 100 \mu\text{mol/l}$)
měřené pomocí CE Prince Technologies



Obr. č. 13 – Elektroforeogram stanovení GSH a GSSG v hemolyzátu z plné krve měřené pomocí CE Prince Technologies



Obr. č. 14 - Elektroforeogram stanovení GSH a GSSG v hemolysátu z promytých erytrocytů měřené pomocí CE Prince Technologies

7.4. Tabulky s přesností měření

7.4.1. CE Beckman

Tab. č. 9– Přesnost měření (Intra-assay) pro $c = 10 \mu\text{mol/l}$

číslo měření	c GSH ($\mu\text{mol/l}$)	c GSSG ($\mu\text{mol/l}$)
1	11,04	9,74
2	10,64	9,29
3	10,390	9,25
4	10,56	9,30
5	10,62	9,15
6	10,85	9,35
7	11,15	10,08
8	10,83	10,11
9	11,13	10,29
10	10,87	10,82
průměr	10,81	9,74
SD	0,24	0,53
CV (%)	2,24	5,48
Bias (%)	2,53	-1,55

Tab. č. 10 – Přesnost měření (Intra-assay) pro $c = 100 \mu\text{mol/l}$

číslo měření	c GSH ($\mu\text{mol/l}$)	c GSSG ($\mu\text{mol/l}$)
1	103,50	96,94
2	101,78	96,12
3	104,81	97,44
4	104,910	97,93
5	102,96	96,54
6	102,86	95,38
7	102,69	94,86
8	101,07	94,74
9	104,13	96,60
10	102,55	95,29
průměr	103,13	96,18
SD	1,18	1,04
CV (%)	1,14	1,08
Bias (%)	-2,18	-2,77

Tab. č. 11 – Přesnost měření (Inter-assay) pro $c = 10 \mu\text{mol/l}$

číslo měření	c GSSG ($\mu\text{mol/l}$)	c GSH ($\mu\text{mol/l}$)
1	11,20	18,68
2	9,92	18,52
3	13,50	20,85
4	10,30	17,03
5	9,94	14,68
6	9,50	13,30
7	9,10	9,15
8	10,06	8,22
9	9,42	10,95
10	11,19	10,77
průměr	10,41	14,22
SD	1,22	4,19
CV (%)	11,72	29,47
Bias (%)	4,92	30,81

Tab. č. 12 – Přesnost měření (Inter-assay) pro $c = 100 \mu\text{mol/l}$

číslo měření	c GSSG ($\mu\text{mol/l}$)	c GSH ($\mu\text{mol/l}$)
1	108,80	172,09
2	89,78	142,38
3	163,44	228,12
4	110,44	158,77
5	97,40	144,18
6	84,180	120,48
7	86,62	98,33
8	89,95	101,32
9	94,43	106,79
10	98,43	105,83
průměr	102,35	139,76
SD	21,98	40,38
CV (%)	15,73	28,890
Bias (%)	3,12	28,60

7.4.2. CE Prince Technologies

Tab. č. 17 – Stanovení přesnosti a správnosti v sérii pro $c = 10 \mu\text{mol/l}$

číslo měření	c GSH ($\mu\text{mol/l}$)	c GSSG($\mu\text{mol/l}$)
1	9,88	7,52
2	10,51	9,06
3	10,49	6,87
4	11,58	6,93
5	10,72	8,48
6	10,83	6,83
7	11,83	8,31
8	9,95	7,52
9	9,73	8,78
10	11,01	8,02
průměr	10,65	7,83
SD	0,66	0,74
CV (%)	6,22	9,43
Bias (%)	0,22	-11,42

Tab. č. 18– Stanovení přesnosti a správnosti v sérii pro $c = 100 \mu\text{mol/l}$

číslo měření	c GSH ($\mu\text{mol/l}$)	c GSSG($\mu\text{mol/l}$)
1	117,29	96,65
2	107,18	91,55
3	122,21	91,19
4	177,33	106,25
5	110,34	108,68
6	98,95	91,50
7	97,35	87,96
8	96,72	102,39
9	110,55	87,49
10	105,7	92,52
průměr	114,36	95,62
SD	22,43	7,20
CV (%)	19,61	7,53
Bias (%)	14,86	-6,13

Tab. č. 19 – Stanovení přesnosti a správnosti mezi sériemi pro $c = 10 \mu\text{mol/l}$

číslo měření	c GSH ($\mu\text{mol/l}$)	c GSSG($\mu\text{mol/l}$)
1	10,96	6,94
2	12,60	11,09
3	10,83	11,31
4	9,62	8,21
5	10,30	8,90
6	10,52	8,78
7	9,88	7,52
8	11,58	6,93
9	9,30	7,72
10	9,97	8,14
průměr	10,56	8,55
SD	0,94	1,46
CV(%)	8,88	17,12
Bias (%)	1,40	-3,25

Tab. č. 20 – Stanovení přesnosti a správnosti mezi sériemi pro $c = 100 \mu\text{mol/l}$

číslo měření	c GSH ($\mu\text{mol/l}$)	c GSSG($\mu\text{mol/l}$)
1	110,09	91,72
2	117,29	96,65
3	107,02	99,45
4	101,75	102,08
5	108,34	92,85
6	110,92	97,67
7	98,95	91,50
8	117,29	96,65
9	102,21	97,51
10	105,52	90,37
průměr	107,94	95,64
SD	5,89	3,66
CV(%)	5,46	3,82
Bias (%)	8,41	-6,10

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Mary E. Anderson : Determination of glutathione and glutathione bisulfide in biological sample. *Methods in Enzymology*, vol. 113, **1985**, 548-555.
2. Laure D. Deleve, Neil Kaplowitz : Glutathion metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharm. Ther.* Vol. 52, **1991**, 287-305.
3. Chai Y. C., Ashraf S. S., Rokutan Jr. R. B., Thomas J. A. : S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1994**, 310, 273.
4. Ralf Dringen : Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* 62, **2000**, 649-671.
5. Christine L. Hammond, Thomas K. Lee, Nazzareno Ballatori : Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J. of Hepatology* 34, **2001**, 946-954.
6. Hwang C., Sinsky A. J., Lodish H.F. : Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257, **1992**, 1496-1502.
7. Meredith M. J., Reed D. J. : Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J. Biol. Chem.* 257, **1982**, 3747-3753.
8. Griffith O. W., Meister A. : Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 4668, 72.
9. www.vscht.cz
10. Cotgreave I. A., Gerges R. G. : Recent trends in glutathione biochemistry: Glutathione protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1998**, 242.
11. Meister A., Tate S. : Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem*, **1976**, 45: 559-604.
12. Shelly C. Lu : Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. 1169, **1999**, 1169-1183.

13. Meister A. : Current status of the γ -glutamyl cycle. Functions of glutathione in liver and kidney. Berlin, **1978**, 43-59.
14. http://cs.wikipedia.org/eiki/Glutathione_peroxid%C3%A1za
15. Meister A. : Glutathione in the liver: Biology and Pathology. **1988**, 401-417, Raven Press, New York.
16. DeLeve LD, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther.* 1994 Dec; 52; 3; 287-305.
17. Huang C. S., He W., Meister A., Anderson M. E. : Amino acid sequence of rat kidney glutathione synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, **1995**, 1232-1236.
18. Shi Z. Z., Carter B. Z., Habib G. H., He X., Sazar S., Lebovitz R. M., Lieberman M. W. A. : A single mouse glutathione synthetase gene encode six mRNA with different 5' ends. *Arch. Biochem. Biophys.* 331, **1996**, 215-224.
19. Lu S. C., Kuhlenkamp J., Garcia-Ruiz C., Kaplowitz N. : Hormone-mediated down regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat. **1991**, 280-269.
20. Chandan K. Sen : Nutritional biochemistry of cellular glutathione. 8 **1997**, 660-672 (Review).
21. Huang C., Chang L., Anderson M. E., Meister A. : Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* 268, **1993**, 19675-19680
22. Gipp J. J., Bailay H. H., Mulcahy R. T. : Cloning and sequence of the cDNA for the light subunit of human liver γ -glutamylcysteine synthetase and relative mRNA levels for heavy and light subunits in human normal tissues. *Biophys. Res. Commun.* 206, **1995**, 584-589.
23. Chang L., Chang C. : Biochemical regulation of the activity of γ -glutamylcysteine synthetase from rat liver and kidney by glutathione. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, **1994**, 697-703.
24. Bannai S, Ishii T., Takada A., Noriko T. : Regulation of glutathione level by amino acid transport. In *Glutathione Centennial*. Academic Press, San Diego, **1989**, 407-421.

25. Deneke S., Steiger V., Fanburg B. L. : Effect of hyperoxia on glutathione levels and glutamic acid uptake in endothelial cells. *J. Appl. Physiol.* 63, **1987**, 1966-1971.
26. Bannai S. : Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261, **1986**, 2256-2263.
27. Binkley F. : Synthesis of cystathionine by preparations from rat liver. *J. Biol. Chem.* 191, **1951**, 531-534.
28. Ormstad K., Jones D. P., Orrenius S. : Characteristics of glutathione biosynthesis by freshly isolated rat kidney cells. *J. Biol. Chem.* 255, **1980**, 175-181.
29. Moldeus P., Ormstad K., Reed D. J. : Turnover of cellular glutathione in isolated rat kidney cells. *Eur. J. Biochem.* 116, **1981**, 13-16.
30. Bartoli G. M., Sies H. : Reduced and oxidized glutathione: Efflux from liver. *FEBS Lett.* 86, **1978**, 89-91.
31. Sies H., Graf P. : Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopresine, phenylephrine and adrenaline. *Biochem. J.* 226, **1985**, 549-549.
32. Abbott W. A., Meister A. : Intrahepatic transport and utilization of biliary glutathione and its metabolism. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 83, **1986**, 1246-1250.
33. Ballatori N., Jacob R., Boyer J. L. : Intrabiliary glutathione hydrolysis: a source of glutamate in bile. *J. Biol. Chem.* 261, **1986**, 7860-7865.
34. Alexander C. White, Victor J. Thannickal, and Barry L. Fanburg : Glutathione deficiency in human disease. *J. Nutr. Biochem.*, **1994**, 218-226.
35. Lew H. Pyke S., Quintanilha A. : Changes in the glutathione status of plasma, liver, skeletal muscle following exhaustive exercise in rats. *FEBS Lett.* 185, **1985**, 262-266.
36. Lauterburg BH, Adams JD, Mitchel JR. : Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology*, **1984**, 586-590.
37. Fernandez-Checa et al. : The regulation of hepatic glutathione, **1992**, 363-369.

38. Sen C. K., Hanninen O. : Physiological antioxidants. In Exercise and oxygen toxicity (C.K. Sen, L. Packer, and O. Hanninen, eds.) pp. 89-126. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, **1994**.
39. Yin S. A., Sato I., Hosokawa Y., Niizeki S., Tojo H., Yamaguchi K. : The necessity of dietary vitamin B₆ to selenium biopotency for tissue selenium and glutathione peroxidase in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo) 37, **1991**, 509-516.
40. Fang Y. Z., Yang S., Wu G. : Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition 18, **2002**, 872-879.
41. Guoayo Wu, Yun-Zhong Fang, Sheng Yang, Joanne R. Lupton and Nancy D. Turner : Recent Advances in Nutritional Science, **2004**, 489-492.
42. <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz>
43. Noskova V., Hajdúch M., Mihál V.1, Cwiertka K., Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi II. Atypická MDR, www.linkos.cz
44. Glutathione functions, <http://web.instate.edu/thcme>
45. Holeček V., Volné radikály a antioxidanty, www.celostnimediceina.cz
46. Christine Parmentier, Pierre Leroy, Maria Wellman, Alain Nicolas : Determination of cellular thiols and glutathione-related enzyme activities: versatility of high performance liquid chromatography – spectrometric detection. J. of Chrom. B., 719, **1998**, 37-46.
47. Maura Floreani, Marcella Petrone, Patricia Debetto a Pietro Palatini : A comparison between different methods for the determination of reduced and oxidized glutathione in mammalian tissues. **1996**, 449-455.
48. Cotgreave I. A., Gerges R. G. : Recent trends in glutathione biochemistry: Glutathione protein interaction: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? Biochem. Biophys. Res. Commun. 242, **1998**, 1-9.
49. Rossi R., Milzani A, Dalle-Donne I., et al. : Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? Clin. Chem. 48, **2002**, 742.
50. Anna Pastore, Giorgio Federaci, Enrico Bertini, Fiorella Piemonte : Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. Vlinica Chemica Acta 333, **2003**, 19-39 (Review).

51. Katrustak M., Paterson P. G., Huse K., Shoker A., Lyon A. W. : Pre-column derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl-glycine, homocysteine and glutathione in plasma and cell extracts. *J. Chromatogr. B* 758, **2001**, 207-212.
52. Johanes Martensson : Method for determination of free and total glutathione and γ -glutamylcystein concentrations in human leukocytes and plasma, **1987**, 152-157.
53. Lada M. W., Kennedy R. T.: In vivo monitoring of glutathione and cysteine in rat caudate nucleus using microdialysis on-line with capillary zone electrophoresis-laser induced fluorescence detection, *J. Neuroscience Methods* 72, **1997**, 153 – 159.
54. Paroni R., de Vecchi F., Cighetti G. et al. : HPLC with o-phthalaldehyde precolumn derivatization to measure total oxidized and protein-bound glutathione in blood, plasma and tissue. *Clin. Chem.* 41, **1995**, 448-454.
55. Cereser C., Guichard J., Drai J. et al. : Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *J. Chromatogr. B* 752, **2001**, 123-132.
56. Owens C. W., Belcher R. V. : A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochem. J.* 94, **1965**, 705-711.
57. E. Beutler, C. West : Comment concerning a fluorometric assay for glutathion. *Analytical Biochemistry* 81, **1977**, 458-460.
58. Paul J. Hissin, Russel Hilf : A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74, **1976**, 214-226.
59. Romero F. J., Mueller-Klieser W. : Semiquantitative bioluminescent assay of glutathione. *J Biolumin Chemilumin* 13, **1998**, 263-266.
60. Piccoli G., Fiorany M., Biagiarelli B. et al. : Simultaneous high-performance capillary electrophoretic determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells in the femtomole range. *J. Chromatogr. A* 676, **1994**, 239-246.

61. Jin W., Li W., Xu Q. : Quantitative determination of glutathione in single human erythrocytes by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Electrophoresis* 21, **2000**, 774-779.
62. Carru C., Zinellu A., Mario Pes G. et al. : Ultrarapid capillary electrophoresis method for the determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells. *Electrophoresis* 23, **2002**, 1716.
63. Victor H. Cohn, Jerry Lyle : A fluorometric assay for glutathione. *Analytical Biochemistry* 14, **1966**, 434-440.
64. Russel C. Scaduto, Jr. : Dithiotreitol and amino acids interfere with the fluorometric determination of glutathione with orthophtaldialdehyd. *Analytical Biochemistry* 174, **1988**, 265-270.
65. Kamera E., Picardo M.: Analytical methods to investigate glutathionu and related compounds in biological and pathological processes, . *J. Chromatogr. B*, 781, **2002**, 181 – 206.
66. Melným S., Pogribna M., Pogribny I., Hine R. J., James S. J.: A new HPLC Method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma aminothiols using coulometric elektrochemical detection, *J. Nutr. Biochem.* 10, **1999**, 490 – 497.
67. Kleinman W. A., Richie J. P. Jr.: Determination of thiols and disulfides using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B*, 672, **1995**, 73 – 80.
68. Carru C., Zinellu A., Sotgia S., Marongiu G., Farina M. G., Usai M. F., Pes G. M., Tadolini B., Deiana L.: Optimization of the principal parameters for the ultrarapid electrophoretic separation of reduced and oxidized glutathione by cypillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1017, **2003**, 233 – 238.
69. Carru C., Zinellu A., Pes G. M., Marongiu G., Tadolini B., Deiana L.: Ultrarapid capillary electrophoresis metod for the determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells, *Electrophoresis* 2002, 23, **2002**, 1716 – 1721.
70. Bárta P.: Diplomová práce, Univerzita Pardubice, Pardubice 2006
71. D. Voet, J. G. Voetová, *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha 1990

ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

Název práce	Stanovení oxidovaného a redukováného glutathionu metodou kapilární elektroforézy s UV/VIS detekcí
Autor práce	Martina Anderlová
Obor	Zdravotnická bioanalýtika
Rok obhajoby	2007
Vedoucí práce	prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.
Anotace	Charakteristika, funkce a metody analýzy glutathionu. Stanovení redukované a oxidované formy glutathionu kapilární elektroforézou.
Klíčová slova	Glutathion GSH Glutathion and capillary electrophoresis GSSG