

STANOVENÍ GLUTATHIONU A GLUTATHIONDISULFIDU V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH

ROMAN KANĎÁR

*Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice
roman.kandar@upce.cz*

Došlo 20.11.15, přepracováno 7.3.16, přijato 6.4.16.

Klíčová slova: glutathion, glutathiondisulfid, příprava vzorku, metody stanovení

Obsah

1. Úvod
2. Biologické funkce glutathionu
 - 2.1. Metabolismus glutathionu
 - 2.2. Úloha glutathionu při biotransformaci xenobiotik
 - 2.3. Antioxidační funkce glutathionu
3. Stanovení celkového glutathionu, glutathionu a glutathiondisulfidu v biologických vzorcích
 - 3.1. Referenční hodnoty celkového glutathionu, glutathionu a glutathiondisulfidu v plné krvi a plazmě
 - 3.2. Příprava vzorku před vlastní analýzou
 - 3.3. Metody pro stanovení celkového glutathionu, glutathionu a glutathiondisulfidu v biologických vzorcích
4. Stanovení celkového glutathionu a glutathiondisulfidu v suché kapce krve
5. Závěr

1. Úvod

Zájem o stanovení glutathionu (GSH) a glutathiondisulfidu (GSSG) se neustále zvyšuje vzhledem ke klíčové úloze GSH v ochranném mechanismu proti oxidačnímu stresu. Je mnoho faktorů, díky kterým se hladiny GSH a GSSG tak odlišují u různých autorů. Jedná se především o přípravu vzorku, kde je důležité vhodně volit antikoagulační a precipitační činidlo, rozhodnout, zda použít či nepoužít alkylační činidlo, redukční činidlo, apod., dále pak záleží na použité analytické metodě. Samotná hladina GSH nás dostatečně neinformuje o míře oxidačního stresu, lepším ukazatelem je poměr GSH/GSSG (GSSG/GSH). Za normálních podmínek je koncentrace GSSG podstatně nižší než GSH, což vyžaduje velmi správné a přesné stanovení GSSG v přítomnosti tak vysoké koncentrace GSH.

Kromě toho musíme mít stále na mysli, že během přípravy vzorku může docházet k oxidaci GSH na GSSG a tak k falešnému nadhodnocení hladin GSSG. Některé práce naznačily, že GSSG by mohl být pouze artefaktem nevhodné přípravy vzorku před vlastní analýzou^{1–3}.

2. Biologické funkce glutathionu

2.1. Metabolismus glutathionu

GSH (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin) je v přírodě nejrozšířenější nízkomolekulární thiol. Peptidová vazba mezi γ -karboxylovou skupinou glutamátu a α -aminoskupinou cysteinu podmiňuje rezistenci GSH k degradaci intracelulárními peptidasami a proteasami. Thiolová skupina je zapojena do redukčních a konjugačních reakcí. Syntéza GSH se odehrává v cytosolu. Jde o dvoukrokovou reakci katalyzovanou enzymy γ -glutamylcysteinsynthetasou (EC 6.3.2.2) a glutathionsynthetasou (EC 6.3.2.3), která probíhá především v játrech. Játra tak hrají významnou úlohu v homeostáze GSH. Degradaci GSH katalyzuje enzym γ -glutamyltranspeptidasa (GGT; EC 2.3.2.2), kdy γ -glutamyllový zbytek je přenášen na vhodný akceptor (aminokyseliny, dipeptidy, GSH). Hydrolyza cysteinylglycinu na cystein a glycin je katalyzována specifickou dipeptidasou. Nejdůležitější funkcí γ -glutamyllového cyklu je kontinuální zdroj cysteinu⁴. GSH je tak jakýmsi rezervoárem cysteinu, který může být ve vyšších koncentracích pro buňky toxický⁵.

2.2. Úloha glutathionu při biotransformaci xenobiotik

S nukleofilním GSH může konjugovat celá řada xenobiotik. Konjugační reakce buď probíhají spontánně, nebo za katalýzy glutathion-S-transferasou (EC 2.5.1.18). Odbourávání konjugátů s GSH začíná přenosem γ -glutamyllového zbytku na vhodný akceptor, reakce je katalyzována GGT. Vzniklý cysteinylglycinový konjugát je hydrolyzován za katalýzy specifickou dipeptidasou, vzniká cysteinyllový konjugát. N-Acetylací cysteinyllového konjugátu vzniká kyselina merkapturová, která je vyloučena močí.

2.3. Antioxidační funkce glutathionu

Jednou z hlavních funkcí GSH je ochrana buněk proti oxidačnímu poškození. Působí přímo jako scavenger reaktivních forem kyslíku (ROS) nebo prostřednictvím GSH-dependentních enzymů. GSH je využíván třemi typy glutathionperoxidas a dvěma typy peroxiredoxinů, peroxiredoxinem 2 a 6 (EC 1.11.1.15). Tyto enzymy katalyzují

redukci peroxidu vodíku na vodu a lipidových peroxidů na odpovídající alkoholy, GSH se přitom oxiduje na GSSG. GSSG je pro buňky potenciálně toxický, proto je bezprostředně redukován na GSH za katalýzy NADPH-dependentní glutathionreduktasou (GR; EC 1.8.1.7) nebo transportován ven z buněk.

Erytrocyty jsou poměrně bohaté na GSH. GSH napomáhá udržovat normální strukturu membrán, brání denaturaci hemoglobinu, udržuje ionty Fe^{2+} v redukovaném stavu a je schopen redukovat methemoglobin (Fe^{3+}) na hemoglobin (Fe^{2+}).

Mitochondrie jsou obzvláště vystaveny oxidačnímu stresu. Jelikož postrádají katalasu, je GSH v přítomnosti glutathionperoxidasy jedinou obranou proti ROS. GSH reaguje s různými ROS, vzniká radikál GSH (GS^{\bullet}), který je méně reaktivní než ROS, může však reagovat s disociovaným GSH (GS^-) za vzniku radikálového aniontu GSSG (GSSG^-), který je schopen redukovat kyslík na superoxidový aniontový radikál (O_2^-). Proto je významná návaznost těchto dějů na aktivitu superoxidodismutasy.

Mezi významné antioxidační funkce GSH také patří regenerace α -tokoferolu, askorbátu a ochrana thiolových skupin proteinů. GSH se váže na thiolové skupiny proteinů mechanismem, který se nazývá S-glutathionylace. Tímto procesem jsou thiolové skupiny proteinů chráněny před ireverzibilní oxidací⁶.

3. Stanovení celkového glutathionu, glutathionu a glutathiondisulfidu v biologických vzorcích

Existuje mnoho metod pro stanovení GSH, GSSG a celkového glutathionu (TGSH). Výběr metody často závisí na povaze analyzovaného vzorku, dostupném vybavení laboratoře a potřebě stanovit např. GSH spolu s jinými thioley a GSSG. Stanovení GSH se nejčastěji provádí v plné krvi, hemolyzátu erytrocytů, plazmě nebo přímo ve tkáni. Do dnešního dne bylo vyvinuto mnoho spektrofotometrických, fluorimetrických, elektrochemických, chemiluminescenčních, NMR a separačních metod, jako je HPLC, GC a HPCE.

3.1. Referenční hodnoty celkového glutathionu, glutathionu a glutathiondisulfidu v plné krvi a plazmě

Referenční hodnoty TGSH, GSH a GSSG v plazmě a plné krvi se mezi jednotlivými laboratořemi významně liší (tab. I). Tato odlišnost je dána použitím různých analytických metod, přípravou vzorku, výběrem osob a vlivem nejrůznějších faktorů ovlivňujících koncentrace GSH v plazmě a plné krvi jako jsou nadměrná fyzická zátěž, expozice chladu, kardiovaskulární onemocnění, nádorová onemocnění, *diabetes mellitus* a jiná chronická onemocnění¹. Obecně se hladiny GSH v plné krvi mužů a žen statisticky významně neodlišují, avšak někteří autoři statisticky

významný rozdíl pozorovali. Někteří autoři^{7,8} také zaznamenali u starších osob významně nižší hladiny TGSH a vyšší hladiny GSSG.

3.2. Příprava vzorku před vlastní analýzou

Příprava biologických vzorků pro stanovení GSH a GSSG je zcela zásadní. Je důležité volit vhodná antikoagulační, precipitační a alkylační činidla, která zabrání oxidaci GSH, ale také možným ztrátám GSSG.

Již odběr vzorku může být problematický. Týká se to především stanovení GSH a GSSG v plazmě, kdy hemolýza může hladiny GSH a GSSG nadhodnotit, jelikož např. koncentrace GSH je v erytrocytech o 2 až 3 řády vyšší. Běžně se jako antikoagulační činidlo používá EDTA nebo heparin. Sakhí a spol. používali odběrové zkumavky Stabilyte⁵. Tyto zkumavky obsahují citrát, pH krve klesne na hodnotu asi 5,9. V porovnání se zkumavkami s EDTA nebo heparinem, naměřili v plazmě téměř dvojnásobně vyšší hladiny GSH a nepatrně nižší koncentraci GSSG. Nepatrně nižší hladiny GSSG, ale významně vyšší koncentraci GSH si vysvětlují tím, že při pH kolem 7,4 tvoří GSH disulfidy především s cysteinem a –SH skupinami proteinů. Kleinman a Richie poukazují na to, že zhruba 60–70 % ztráty GSH je dáno vznikem disulfidu s cysteinem⁹. Při pH 7,4 je totiž molekul cysteinu asi stokrát více než při pH 5,9 (Cys^- , $\text{pK}_A = 8,3$). Protože je při pH 7,4 více molekul GSH a cysteinu ve formě aniontů, může to být jedna z příčin nižších hladin GSH v heparinizovaném nebo EDTA plazmě (pH je asi 7,4). Otázkou však je, zda při pH kolem 5,9 nedochází k uvolňování GSH z erytrocytů do plazmy, či dokonce k mírné hemolýze.

Typickými precipitačními činidly, používanými při stanovení GSH a GSSG v plné krvi a plazmě, jsou kyseliny metafosforečná (MPA), chloristá (PCA), trichloroctová (TCA) a 5-sulfosalicylová (SSA). Při precipitaci SSA je GSH nestabilní, MPA je jako precipitační činidlo málo účinná a TCA často interferuje s vlastním stanovením. Jako optimální precipitační činidlo se tak uvádí PCA. Pro odstranění proteinů ze vzorku lze také úspěšně použít ultrafiltraci, vyhneme se tak použití různých kyselin nebo organických rozpouštědel, které mohou interferovat se stanovením¹⁰.

Při stanovení TGSH se využívají různá redukční činidla, nejčastěji pak dithiothreitol (DTT), dithioerythritol, 2-merkapt ethanol (2-ME), tetrahydridoboritan sodný, trialkylfosfíny a dithioničitan sodný. Volba redukčního činidla musí být uvážlivá, protože často reaguje s derivatizačním činidlem a může tak interferovat se stanovením.

Protože jak GSH, tak také GSSG neobsahují ve své molekule žádný silný chromofor nebo fluorofor, je pro zvýšení citlivosti, ale také selektivity, nutná vhodná derivatizace. Existuje celá řada derivatizačních činidel, jako příklad lze uvést *N*-ethylmaleimid (NEM), jodoctovou kyselinu, Ellmanovo činidlo [5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoát); DTNB], 4,4'-dithiopyridin a 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen pro spektrofotometrická stanovení, *ortho*-

Tabulka I

Přehled metod pro stanovení celkového glutathionu, glutathionu a glutathiondisulfidu v biologických vzorcích, referenční hodnoty

Biologický materiál	Metoda	Detekce	Derivatizační činidlo	Referenční hodnoty			Lit.
				TGSH	GSH	GSSG	
DBS	HPLC	FD (466/528 nm)	NDA	9,50±1,89** [♀] 9,47±1,47** [♂]	–	–	13
Seminální plazma	HPLC	FD (350/420 nm)	OPA	1,56±1,20*	–	0,11±0,14*	19
Krev, plazma	HPLC	FD (350/420 nm)	OPA	9,50±1,28** [♀] (krev) 9,67±1,47** [♂] (krev) 4,86±4,87** [♀] (plazma) 5,08±1,14** [♂] (plazma)	4,82±0,87** [♀] (krev) 4,93±1,33** [♂] (krev) (plazma) 0,27±0,20** [♀] (plazma) 0,30±0,12** [♂] (plazma)	0,38±0,08** [♀] (krev) 0,40±0,05** [♂] (krev) 0,35±0,14** [♀] (plazma) 0,38±0,26** [♂] (plazma)	3
Krev	HPLC	ESI-MS/MS	NEM	–	900±140*	1,2±0,4*	20
Krev	HPLC	ED (750/950 mV)	–	–	5,16±1,19**	0,19±0,13**	21
Plazma	HPLC	ESI-MS/MS	–	–	2,94±0,31*	–	22
Erytrocyty	HPLC	UV (330 nm)	DTNB	–	1950±380*	–	23
Plazma	HPLC	FD (260/416 nm)	MIAC	–	–	–	24
Krev, plazma	HPLC	FD (350/420 nm)	OPA	–	4,69±0,93** (krev) 1,82±0,55* (plazma)	0,28±0,12** (krev) 0,15±0,05* (plazma)	25
Plazma	HPLC	FD (390/478 nm) (340/425 nm)	MBB ^{GSH} OPA ^{GSSG}	–	–	–	26
Plazma	HPLC	FD (385/515 nm)	SBD-F	–	–	–	27
Moč	HPLC	ESI-MS/MS	FEM, FMEA	–	–	–	28
Plazma	HPLC	FD (390/478 nm) ED (780 mV) ^{GSSG}	MBB ^{GSH}	–	2,24±0,64*	0,14±0,10*	5
Moč	HPLC	FD (310/375 nm)	MIPBO	–	–	–	29
Krev	HPLC	DAD-CVGAFSD	PHMB	–	539±71*	90,4±52,7*	30
Krev	HPLC	UV (355 nm)	FDNB	–	1401±113*	3,1±0,6*	31
Krev	HPLC	ESI-MS	NEM	–	1310±118*	0,6±0,2*	2
Plazma	HPLC	FD (338/458 nm)	SBD-F	–	–	–	32
Sérum	HPLC	ED	–	–	–	–	33
Plazma	HPLC	FD (390/478 nm)	MBB	12,8±3,6** [♀] 12,8±4,6** [♂]	–	–	34
Krev	HPCE	UV (200 nm)	–	–	596±159*	273±69*	35
Erytrocyty	HPCE	CL	DL	–	50–90***	–	36
Plazma	HPCE	LIF (N/N)	5-IAF	–	–	–	37
Krev	HPCE	UV (200 nm)	–	–	1078±17*	110,6±7,3	38
Krev	HPCE	ED	–	–	–	–	39

Tabulka I
Pokračování

Biologický materiál	Metoda	Detekce	Derivatizační činidlo	Referenční hodnoty			Lit.
				TGSH	GSH	GSSG	
Erytrocyty	HPCE	LIF (488/520 nm)	NDA, DHR	–	–	–	40
Plazma	HPCE	LIF (N/N)	5-IAF	–	3,51±0,38*	–	41
Erytrocyty	HPCE	UV (200 nm)	–	–	–	–	42
Plazma	HPCE	UV (200 nm)	–	–	–	–	43
Plazma	HPCE	LIF (N/N)	5-IAF	–	–	–	44
Erytrocyty	HPCE	UV (200 nm)	–	–	–	–	45
Plazma	HPCE	UV (254 nm)	–	–	–	–	46
Plazma	HPCE	LIF (488/515 nm)	6-IAF	–	7,01±0,51*	–	47
Moč	HPCE	ED	–	–	–	–	48
Erytrocyty	HPCE	UV (214 nm)	–	–	–	–	49
Moč	HPCE	ESI-MS	–	–	–	–	50
Erytrocyty	GC	EI-MS	ECF	–	–	–	51
Erytrocyty	GC	EI-IRMS	ECF	–	–	–	52
Krev	GC	EI-MS	ECF	–	–	–	53
Plazma	GC	ECNICI-MS	PFBB	–	–	–	54

* $\mu\text{mol/l}$; ** $\mu\text{mol/g}$ hemoglobinu; *** amol/buňka ; N, neurčeno

5-IAF, 5-jodoacetamidofluorescein; 6-IAF, 6-jodoacetamidofluorescein; CVGAFSD, atomová fluorescenční spektrometrie metodou studených par (z angl. cold vapor generation atomic fluorescence spectrometry); DBS, suchá kapka krve (z angl. dried blood spot); DHR, dihydrorhodamin-123; DL, diazoluminol; DTBN, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoát); ECF, ethylchloroformiát; ECNICI, negativní chemická ionizace s elektronovým záchytem (z angl. electron capture negative ion chemical ionization); EI, ionizace nárazem elektronu (z angl. electron impact ionization); ESI, ionizace elektrosprejem (z angl. electrospray ionization); FDNB, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen; FEM, *N*-(2-ferrocenethyl)maleimid; FMEA, ferrocenkarboxylová kyselina-(2-maleimidoyl)ethylamid; IRMS, hmotnostní spektrometrie isotopových poměrů (z angl. isotope ratio mass spectrometry); MBB, monobromobiman; MIAC, *N*-(2-akridonyl)maleimid; MIPBO, 5-methyl-2(*m*-jodoacetylaminofenyl)benzoxazol; NDA, naftalen-2,3-dikarboxaldehyd; NEM, *N*-ethylmaleimid; OPA, *ortho*-ftalaldehyd; PFBB, pentafluorobenzylbromid; PHMB, *p*-hydroxyhydrargyriumbenzoát; SBD-F, 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonát (amonná sůl)

ftalaldehyd (OPA), naftalen-2,3-dikarboxaldehyd (NDA), bimany, fluorobenzofurazany, deriváty maleimidu a difluoroboradiaza-s-indaceny pro spektrofluorimetrická stanovení, trifluoroacetanhydrid, pentafluoropropionanhydrid a *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid pro GC-MS, 1-[3-(4-maleimidylfenoxy)propyl] trimethylammoniumbromid pro LC-MS, případně *N*-(2-ferrocenethyl)maleimid pro spojení HPLC s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED).

Pro fluorescenční detekci se běžně používá OPA. OPA spolu s 2-ME jsou běžně používány pro derivatizaci primárních aminů. Zatímco OPA nefluoreskuje, vzniklý derivát 1-alkylthio-2-alkylisoindol fluoreskuje velmi silně. Substituovaný isoindol, vzniklý reakcí GSH s OPA, je stabilnější než derivát vzniklý reakcí aminokyselin s OPA a 2-ME. Ten je při pH 12 stabilní asi jen půl hodiny, při pH 8 byl již během 30 min pozorován 20–30% pokles

intenzity fluorescence¹¹. Naproti tomu stabilita GSH-OPA derivátu není hodnotou pH ovlivněna a intenzita fluorescence se během 30 min nemění. GSH-OPA derivát je dokonce při laboratorní teplotě stabilní více než 24 h (cit.³). V roce 1966 Cohn a Lyle¹² publikovali metodu pro stanovení GSH a GSSG, kdy GSSG reaguje s OPA při pH 12. Toho se dá využít např. při simultánním stanovení GSH a GSSG s postkolonovou derivatizací. Ovšem stabilita GSH-OPA derivátu je mnohem vyšší než samotného GSH a GSSG, proto je vhodnější předkolonová derivatizace. U předkolonové derivatizace je při stanovení GSSG zapotřebí maskovat GSH vhodným alkylačním činidlem, jako je např. NEM. Pravděpodobný mechanismus derivatizace GSSG s OPA spočívá v tom, že při pH kolem 12 dochází k hydrolyze GSSG na GSH, který následně reaguje s OPA. Thiolová skupina GSH je v kyselém prostředí blokována NEM, ovšem při pH 12 je NEM neúčinný, takže

GSH vznikající hydrolyzou GSSG může reagovat s OPA a vzniklý komplex GSH-OPA odpovídá hladinám GSSG. Z důvodu oxidace GSH již během precipitace proteinů, je nutné zpracovávat vzorek tak, že k jednomu dílu vzorku přidáváme MPA a ke druhému dílu MPA spolu s NEM. GSH je následně derivatizován s OPA při pH 12. V prvním případě stanovíme „celkový GSH“ (GSH + GSSG), ve druhém případě pak GSSG (cit.³). Přijatelným postupem pro stanovení GSH a GSSG v plné krvi pak je rychlé zamražení (–80 °C) vzorku po odběru krve, precipitace proteinů MPA (stanovení GSH) nebo MPA spolu s NEM (stanovení GSSG) a co nejrychlejší derivatizace GSH s OPA. GSH je v plné krvi, uchovávané při –80 °C, stabilní po dobu několika měsíců, v supernatantu při 4 °C asi 10 h a GSH-OPA derivát je při 4 °C stabilní minimálně 24 h. Při stanovení GSSG musí být derivatizace provedena co nejrychleji, protože GSH-NEM je v supernatantu nestabilní a nadbytek NEM může mít za následek ztrátu GSSG (cit.^{3,7}). NDA, podobně jako OPA, reaguje s GSH za vzniku stabilního a vysoce fluoreskujícího derivátu. Tento derivát je ještě stabilnější než GSH-OPA a výtěžnost fluorescence je také vyšší¹³.

3.3. Metody pro stanovení celkového glutathionu, glutathionu a glutathiondisulfidu v biologických vzorcích

Nejběžnější spektrofotometrickou metodou je ta, kterou v roce 1969 publikoval Tietze¹⁴. Jedná se o tzv. enzymatické GSH-recyklační stanovení. GSH reaguje s DTNB za vzniku 5-thionitrobenzoátu (TNB) a GS-TNB. GS-TNB je následně redukován za katalýzy GR na GSH a uvolňuje se TNB. Vznikající TNB je monitorován při 412 nm. GSSG přítomný ve vzorku je redukován GR na GSH. Touto metodou tak stanovujeme TGSH. Chceme-li stanovit také GSSG, musíme k oddělenému vzorku přidat NEM. Jedná se o celkem jednoduché stanovení, avšak málo specifické a selektivní.

Pro stanovení GSH a GSSG bylo vyvinuto také několik spektrofluorimetrických metod, využívajících různá derivatizační činidla, jako OPA (cit.¹²), OPA s 1-pyrenmethylaminovými nanočásticemi^{15,16}, apod.

Většina chemiluminescenčních metod je založena na oxidaci GSH silným oxidantem, následuje oxidace luminoforu a měření chemiluminescence. Příklady chemiluminescenčních systémů jsou luminol-H₂O₂, [Ru(phen)₃]²⁺-Ce (IV) a [Ru(phen)₃]²⁺-KMnO₄ (cit.¹⁷). Byla také modifikována enzymatická GSH-recyklační metoda, kdy byla detegována spotřeba NADPH vysoce citlivou luminescenční reakcí (systém FMN-oxidoreduktasa/luciferasa)¹⁸.

Separční techniky (HPLC, GC, HPCE) využívající různé typy detektorů se zdají být nejpřijatelnějšími pro stanovení GSH a GSSG. Z nich nejrozšířenější jsou HPLC metody. Přehled separačních technik použitých pro stanovení TGSH, GSH a GSSG je uveden v tab. I. Při stanovení GSH a GSSG metodou GC se nejčastěji využívá spojení s MS detektorem. Výhody HPCE oproti HPLC jsou krátká doba analýzy, potřeba malého množství vzorku a velmi

účinná separace. Pro stanovení GSH a GSSG byly použity různé typy detekce, jako UV, fluorescenční, MS, elektrochemická nebo velmi citlivá laserem indukovaná fluorescence.

4. Stanovení celkového glutathionu a glutathiondisulfidu v suché kapce krve

Odběr krve na speciální filtrační papír, známý jako technika suché kapky krve (DBS), je známý především ze screeningových vyšetření novorozenců pro vrozené metabolické choroby. Jak už bylo zmíněno výše, GSH a GSSG se nejčastěji stanovují v plazmě a krvi. Bylo prokázáno, že již během několika minut po odběru krve dochází k poklesu hladiny GSH a velkému nárůstu hladiny GSSG. To je důvod, proč prakticky nelze v krvi nebo plazmě stanovit GSH a proč poměr GSH/GSSG (GSSG/GSH) nemůže být akceptovatelným ukazatelem míry oxidačního stresu. Pokud tedy chceme správně kvantifikovat míru oxidačního stresu, lze použít pouze poměr TGSH/GSSG (GSSG/TGSH) a to jen za podmínek, že odebraný vzorek krve bude rozdělen na dvě části, kdy k první části vzorku je nutné přidat činidlo stabilizující GSH, nejlépe redukční činidlo (například DTT), pak měříme TGSH. K druhé části vzorku se přidá vhodné alkylační činidlo (například NEM), které blokuje –SH skupinu GSH, pak měříme GSSG. Takový postup je ale pro klinickou praxi těžko použitelný, nelze totiž zajistit, aby tyto úkony správně a rychle provedla odběrová sestra. Tento problém lze vyřešit technikou DBS, kdy kapka krve, získána po vpichu do prstu, je aplikována na filtrační papír, již předem ošetřený činidly (tedy například DTT pro stanovení TGSH nebo NEM pro stanovení GSSG). Po zaschnutí kapky krve při laboratorní teplotě, jsou GSH i GSSG v DBS vzorku stabilní při –20 °C po dobu několika měsíců¹³. DBS technika je šetrná k pacientovi, nejedná se o tak invazivní zásah jako v případě klasického odběru krve, navíc je zapotřebí jen několik desítek mikrolitrů krve oproti jednotkám mililitrů při klasickém odběru. Lze tedy provést více odběrů v krátkém časovém intervalu. Dalšími výhodami DBS techniky je snadný transport vzorků do laboratoře, s nadsázkou lze říci, že odběrovou kartičku se zaschlou krví můžeme zaslat poštou, a uchovávaní vzorků před vlastní analýzou. Byla prozatím publikována jediná práce zabývající se stanovením GSH v DBS vzorcích. Hladiny TGSH byly v DBS vzorcích asi o 25 % vyšší než v krvi. Po aplikaci krve na filtrační papír zřejmě dochází k rychlé redukci GSH a v zaschlé krvi je GSH stabilnější, než když je rozpuštěn ve vodě (krvi)¹³.

5. Závěr

Úloha GSH jako ukazatele oxidačního stresu je malá. Významnější je sledovat schopnost GSH adekvátně reagovat na oxidační stres vznikem jeho oxidované formy, především GSSG. Když jsou totiž buňky vystaveny oxidační

mu stresu, poměr oxidované a redukované formy GSH se zvyšuje. Jelikož je za fyziologických podmínek hladina GSSG výrazně nižší než hladina GSH, je pro stanovení GSSG v přítomnosti tak vysoké koncentrace GSH zapotřebí dostatečně citlivé a správné metody. Při stanovení GSH a GSSG je příprava vzorku zcela zásadní. Hladina GSSG je totiž obvykle pouze artefaktem nesprávné přípravy vzorku. Technika suché kapky krve se jeví jako užitečný nástroj pro správné stanovení TGS a GSSG. Její nesporné výhody ji jednoznačně předurčují pro použití v různých klinických studiích zabývajících se monitorováním oxidačního stresu při různých patologických stavech.

Seznam použitých zkratk

DBS	suchá kapka krve (z angl. dried blood spot)
DTNB	5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoát), Ellmanovo činidlo
DTT	dithiothreitol
ED	elektrochemická detekce (detektor)
FMN	flavinmononukleotid
GGT	γ -glutamyltransferasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion
GSSG	glutathiondisulfid
2-ME	2-merkaptioethanol
MPA	kyselina metafosforečná (z angl. metaphosphoric acid)
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukována forma)
NDA	naftalen-2,3-dikarboxaldehyd
OPA	ortho-ftalaldehyd
PCA	kyselina chloristá (z angl. perchloric acid)
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
SSA	5-sulfosalicylová kyselina (z angl. 5-sulfosalicylic acid)
TCA	kyselina trichloroctová (z angl. trichloroacetic acid)
TNB	5-thionitrobenzoát

LITERATURA

- Rossi R., Milzani A., Dalle-Donne I., Giustarini D., Lusini L., Colombo R., Di Simplicio P.: *Clin. Chem.* **48**, 742 (2002).
- Steghens J. P., Flourié F., Arab K., Collombel C.: *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **798**, 343 (2003).
- Kandár R., Vrbová M., Čandová J.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **36**, 2013 (2013).
- Lu S. C.: *FASEB J.* **13**, 1169 (1999).
- Sakhi A. K., Russnes K. M., Smeland S., Blomhoff R., Gundersen T. E.: *J. Chromatogr. A* **1104**, 179 (2006).
- Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo G., Giustarini D., Milzani A.: *Trends Biochem. Sci.* **34**, 85 (2009).
- Mills B. J., Richie J. P. Jr., Lang C. A.: *Anal. Biochem.* **222**, 95 (1994).
- Michelet F., Gueguen R., Leroy P., Wellman M., Nicolas A., Siest G.: *Clin. Chem.* **41**, 1509 (1995).
- Kleinman W. A., Richie J. P. Jr.: *Biochem. Pharmacol.* **60**, 19 (2000).
- Terashima C., Rao T. N., Sarada B. V., Kubota Y., Fujishima A.: *Anal. Chem.* **75**, 1564 (2003).
- Morineau G., Azoulay M., Frappier F.: *J. Chromatogr.* **467**, 209 (1989).
- Cohn V. H., Lyle J.: *Anal. Biochem.* **14**, 434 (1966).
- Kandár R., Štramová X., Drábková P., Brandtnerová M.: *J. Chromatogr. Sci.* **53**, 879 (2015).
- Tietze F.: *Anal. Biochem.* **27**, 502 (1969).
- Wang L., Wang L., Xia T., Bian G., Dong L., Tang Z., Wang F.: *Spectrochim. Acta, Part A* **61**, 2533 (2005).
- Huang K. J., Xu C. X., Xie W. Z., Wang H.: *Spectrochim. Acta, Part A* **69**, 437 (2008).
- Rezaei B., Mokhtari A.: *Spectrochim. Acta, Part A* **66**, 359 (2007).
- Romero F. J., Mueller-Klieser W.: *J. Biolumin. Chemilumin.* **13**, 263 (1998).
- Kandár R., Hájková N.: *Andrologia* **46**, 1079 (2014).
- Moore T., Le A., Niemi A. K., Kwan T., Cusmano-Ozog K., Cowan T. M.: *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **929**, 51 (2013).
- Kandár R., Žáková P., Marková M., Lotková H., Kučera O., Červinková Z.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **76**, 277 (2011).
- Jiang Z., Liang Q., Luo G., Hu P., Li P., Wang Y.: *Talanta* **77**, 1279 (2009).
- Garcia S. C., Schott K., Charão M., Moro A., Bulcão R., Grotto D., Valentini J., Bohrer D., Cardoso S., Pombum V.: *Biomed. Chromatogr.* **22**, 460 (2008).
- Benkova B., Lozanov V., Ivanov I. P., Todorova A., Milanov I., Mitev V.: *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **870**, 103 (2008).
- Kandár R., Žáková P., Lotková H., Kučera O., Červinková Z.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**, 1382 (2007).
- Sakhi A. K., Blomhoff R., Gundersen T. E.: *J. Chromatogr. A* **1142**, 178 (2007).
- Nollin T. D., McMenamin M. E., Himmelfarb J.: *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **852**, 554 (2007).
- Seiwert B., Karst U.: *Anal. Chem.* **79**, 7131 (2007).
- Liang S. C., Wang H., Zhang Z. M., Zhang H. S.: *Anal. Bioanal. Chem.* **381**, 1095 (2005).
- Bramanti E., Vecoli C., Neglia D., Pellegrini M. P., Raspi G., Barsacchi R.: *Clin. Chem.* **51**, 1007 (2005).
- Giustarini D., Dalle-Donne I., Colombo R., Milzani A., Rossi R.: *Free Radical Biol. Med.* **35**, 1365 (2003).
- Krijt J., Vacková M., Kožich V.: *Clin. Chem.* **47**, 1821 (2001).
- Norris R. L., Eaglesham G. K., Shaw G. R., Smith M. J., Chiswell R. K., Seawright A. A., Moore M. R.: *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **762**, 17 (2001).
- Pastore A., Massoud R., Motti C., Lo Russo A., Fucci G., Cortese C., Federici G.: *Clin. Chem.* **44**, 825 (1998).

- (1998).
35. Kowalska K., Zalewska M., Milnerowicz H.: *J. Chromatogr. Sci.* **53**, 353 (2015).
 36. Zhao S., Li X., Liu Y. M.: *Anal. Chem.* **81**, 3873 (2009).
 37. Zinellu A., Sotgia S., Scanu B., Usai M. F., Fois A. G., Spada V., Deledda A., Deiana L., Pirina P., Carru C.: *Amino Acids* **37**, 395 (2009).
 38. Zunić G., Spasić S.: *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **873**, 70 (2008).
 39. Yao X., Wang Y., Chen G.: *Biomed. Chromatogr.* **21**, 520 (2007).
 40. Ling Y. Y., Yin X. F., Fang Z. L.: *Electrophoresis* **26**, 4759 (2005).
 41. Carru C., Deiana L., Sotgia S., Pes G. M., Zinellu A.: *Electrophoresis* **25**, 882 (2004).
 42. Carru C., Zinellu A., Sotgia S., Marongiu G., Farina M. G., Usai M. F., Pes G. M., Tadolini B., Deiana L.: *J. Chromatogr. A* **1017**, 233 (2003).
 43. Kong Y., Zheng N., Zhang Z., Gao R.: *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **795**, 9 (2003).
 44. Zinellu A., Carru C., Galistu F., Usai M. F., Pes G. M., Baggio G., Federici G., Deiana L.: *Electrophoresis* **24**, 2796 (2003).
 45. Carru C., Zinellu A., Pes G. M., Marongiu G., Tadolini B., Deiana L.: *Electrophoresis* **23**, 1716 (2002).
 46. Zunić G., Jelić-Ivanović Z., Colić M., Spasić S.: *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **772**, 19 (2002).
 47. Bayle C., Issac C., Salvayre R., Couderc F., Caussé E.: *J. Chromatogr. A* **979**, 255 (2002).
 48. Inoue T., Kirchhoff J. R.: *Anal. Chem.* **74**, 1349 (2002).
 49. Shihabi Z. K., Hinsdale M. E., Cheng C. P.: *Electrophoresis* **22**, 2351 (2001).
 50. He T., Quinn D., Fu E., Wang Y. K.: *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **727**, 43 (1999).
 51. Küster A., Tea I., Sweeten S., Rozé J. C., Robins R. J., Darmaun D.: *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 1403 (2008).
 52. Tea I., Ferchaud-Roucher V., Küster A., Darmaun D., Robins R. J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 3245 (2007).
 53. Captain P., Malmezat T., Breuillé D., Obléd C.: *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **732**, 127 (1999).
 54. Tsikas D., Sandmann J., Rossa S., Gutzki F. M., Frölich J. C.: *Anal. Biochem.* **272**, 117 (1999).

R. Kand'ár (*Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice*): **Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples**

In the present review, methods for the determination of glutathione and glutathione disulfide are discussed. The main topic of this review is the suitable sample preparation prior to analysis which is absolutely crucial. The role of glutathione as a marker of oxidative stress is small; however, the ability of glutathione to adequately respond to oxidative stress by increasing the content of its oxidized form, especially glutathione disulfide, is meaningful. Therefore, methods that can properly quantify both forms of glutathione are essential to monitor the oxidative stress in humans.