

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**POROVNÁNÍ METOD PRO STANOVENÍ GLUTATHIONU  
V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**AUTOR PRÁCE:** Bc. Kateřina Davidová

**VEDOUCÍ PRÁCE:** doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

**2018**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**COMPARISON OF ASSAYS FOR MEASUREMENT OF  
GLUTATHIONE LEVELS IN BIOLOGICAL MATERIAL**

THESIS

**AUTHOR:** Bc. Kateřina Davidová

**SUPERVISOR:** doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

**2018**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne: 26. 4. 2018

Bc. Kateřina Davidová

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Davidová**  
Osobní číslo: **C16441**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Porovnání metod pro stanovení glutathionu v biologickém materiálu**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

A. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na podrobný popis antioxidačních funkcí glutathionu a lokalizaci všech jeho forem v buňce. Dále popište přehled možností stanovení glutathionu, zejména se zaměřením na spektrofluorimetrické metody a možnosti zpracování biologického materiálu. Ke zpracování teoretické práce využijte elektronické databáze (ScienceDirect, NCBI Pubmed, HighWire).

B. V rámci praktické části:

- 1) použijte zavedené metody stanovení glutathionu pomocí MCB a OPA v biologickém materiálu z in vitro a in vivo pokusů;
- 2) takto zavedené metody využijte pro stanovení koncentrací glutathionu v několika druzích biologického materiálu (lyzáty buněk a tkání; periferní krev);
- 3) výsledky získané oběma metodami mezi sebou porovnejte, popř. optimalizujte podmínky stanovení pro získání srovnatelných výsledků.

C. Získaná experimentální data zpracujte a diskutujte. Svě výsledky následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Jan Čapek**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup, trpělivost, užitečné rady a také čas strávený při zpracování této diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat celé své rodině, příteli a přátelům za jejich pomoc a podporu během celého studia.

## SOUHRN

Glutathion je tripeptid, složený z glycinu, cysteinu a kyseliny glutamové. Jedná se o nízkomolekulární antioxidant, který má mnoho důležitých funkcí. V buňkách je přítomen v oxidované (GSSG) nebo redukované formě (GSH). V současné době existuje mnoho metod ke stanovení GSH i GSSG.

Cílem naší práce bylo využít a porovnat dvě metody využívající o-ftaldialdehyd (OPA) a monochlorobiman (MCB) při stanovení GSH v různých druzích biologického materiálu. Při stanovení GSH v myších jaterních homogenátech byla zjištěna velmi silná korelace mezi použitými metodami ( $r = 0,94$ ). Absolutně vyjádřené koncentrace GSH neřaděných homogenátů byly vyšší u OPA metody. Absolutně vyjádřené koncentrace GSH u homogenátů řaděných 10x deionizovanou vodou byly podobné u obou metod, v některých případech byly vyšší u MCB metody.

Před stanovením GSH v buňkách periferní krve byly optimalizovány podmínky stanovení. U obou metod bylo optimalizováno ředění krve. U MCB metody byla navíc optimalizována aktivita glutathion-S-transferázy (GST) a excitační vlnová délka. Metody mezi sebou velmi dobře korelovaly ( $r = 0,91$ ). Absolutně vyjádřené koncentrace GSH byly vyšší u MCB metody.

V poslední části naší práce byly pomocí obou metod stanovovány koncentrace GSH v kultivovaných buňkách A549 a HK-2. Korelační koeficient byl v tomto případě také velmi vysoký ( $r = 0,97$ ). Absolutně vyjádřené koncentrace GSH byly vyšší u OPA metody.

Rozdíly v absolutně vyjádřených koncentracích GSH byly pravděpodobně způsobeny dodatečně přidanou GST, která katalyzovala rychlou a specifickou reakci mezi MCB a GSH. GST byla přidána do vzorků periferní krve, proto mohly být absolutně vyjádřené koncentrace GSH vyšší právě u MCB metody. Naopak v případě jaterních homogenátů a kultivovaných buněk nebyla GST přidána.

## KLÍČOVÁ SLOVA

glutathion, stanovení glutathionu, o-ftaldialdehyd, monochlorobiman, jaterní homogenát, periferní krev, buněčná kultura.

## **SUMMARY**

Glutathione is a tripeptide consisting of glycine, cysteine and glutamic acid. It is a low molecular weight antioxidant that has many important functions. It is present in oxidized (GSSG) or reduced (GSH) forms in cells. Currently, there are a number of methods determining GSH and GSSG.

The aim of our work was to use and to compare two methods using o-phthaldialdehyde (OPA) and monochlorobimane (MCB) determining GSH in various biological material. When GSH was determined in mouse liver homogenates, a very strong correlation was found between used methods ( $r = 0.94$ ). Absolute concentrations of GSH in undiluted homogenates were higher in the OPA method. Absolutely expressed concentrations of GSH in homogenates diluted 10x with deionized water were similar for both methods, in some cases higher in the MCB method.

Before the determination of GSH in peripheral blood, the assay conditions were optimized. Dilution of blood was optimized for both methods. In addition, the activity of glutathione-S-transferase (GST) and excitation wavelength were optimized in MCB method. The methods correlated each other strongly ( $r = 0.91$ ). Absolute concentrations of GSH were higher in the MCB method.

In the last part of our work, the concentrations of GSH were determined in cultured A549 and HK-2 cells. The correlation coefficient was also very high in that case ( $r = 0.97$ ). Absolutely expressed concentrations of GSH were higher when used the OPA method.

The differences between absolutely expressed concentrations of GSH in both methods were likely caused due to the addition of GST, which catalyzed a rapid and specific reaction between MCB and GSH. The GST was added to samples of peripheral blood, therefore absolutely expressed concentrations of GSH were higher in the MCB method. Conversely, in the case of liver homogenates and cultured cells, GST was not added.

## **KEY WORDS**

glutathione, glutathione assay, o-ftaldialdehyde, monochlorobimane, liver homogenate, peripheral blood, cell culture.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	13
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	14
2.1	Reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS).....	14
2.2	Oxidační stres .....	14
2.2.1	Stanovení ROS.....	14
2.2.2	Stanovení produktů oxidačního stresu .....	15
2.2.3	Stanovení hladin antioxidantů .....	16
2.3	Glutathion.....	17
2.3.1	Struktura glutathionu .....	17
2.3.2	Výskyt glutathionu .....	18
2.3.3	Syntéza glutathionu .....	19
2.3.4	Faktory ovlivňující syntézu glutathionu .....	21
2.3.5	Funkce glutathionu .....	22
2.3.6	Glutathionový metabolismus .....	25
2.4	Stanovení glutathionu .....	26
2.4.1	Odběr vzorku .....	26
2.4.2	Redukce disulfidických vazeb.....	26
2.4.3	Deproteinace vzorku.....	27
2.4.4	Derivatizace funkčních skupin .....	29
2.4.5	Metody stanovení glutathionu.....	32
3	CÍL PRÁCE .....	37
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	38
4.1	Pomůcky a přístroje .....	38
4.2	Použité chemikálie a biologický materiál.....	39
4.3	Příprava roztoků.....	40
4.4	Stanovení glutathionu pomocí o-ftaldialdehydu (OPA).....	42
4.4.1	Příprava kalibrační řady standardních roztoků glutathionu.....	42
4.4.2	Deproteinace vzorku.....	42
4.4.3	Postup stanovení glutathionu pomocí OPA.....	43

4.5	Stanovení glutathionu pomocí monochlorobimanu (MCB).....	44
4.6	Stanovení glutathionu v jaterních homogenátech .....	44
4.6.1	Příprava vzorku pro OPA stanovení .....	44
4.6.2	Příprava vzorku pro MCB stanovení.....	44
4.6.3	Porovnání metod OPA a MCB.....	44
4.7	Stanovení glutathionu v buňkách periferní krve .....	45
4.7.1	Stanovení glutathionu pomocí OPA.....	45
4.7.2	Stanovení glutathionu pomocí MCB .....	45
4.7.3	Porovnání metod OPA a MCB.....	46
4.8	Stanovení glutathionu v kultivovaných buňkách.....	46
4.8.1	Příprava vzorku pro OPA stanovení .....	46
4.8.2	Příprava vzorku pro MCB stanovení.....	46
4.8.3	Porovnání metod OPA a MCB.....	46
5	VÝSLEDKY .....	47
5.1	Stanovení glutathionu v jaterních homogenátech .....	47
5.1.1	Porovnání metod OPA a MCB.....	47
5.2	Stanovení glutathionu v buňkách periferní krve .....	48
5.2.1	Stanovení glutathionu pomocí OPA.....	48
5.2.2	Stanovení glutathionu pomocí MCB .....	48
5.2.3	Porovnání metod OPA a MCB.....	52
5.3	Stanovení glutathionu v kultivovaných buňkách.....	53
5.3.1	Porovnání metod OPA a MCB.....	53
6	DISKUZE .....	54
7	ZÁVĚR.....	58
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	59

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
DEM	diethylmalonát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> , fosfátový pufr podle Dulbecca
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, Ellmanovo činidlo
DV	deionizovaná voda
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EPR (ESR)	elektronová paramagnetická rezonanční spektrometrie (elektronová spinová rezonanční spektrometrie)
FDNB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzen
GC	<i>Gas Chromatography</i> , plynová chromatografie
GCS	$\gamma$ -glutamylcysteinsyntetáza ( $\gamma$ -glutamylcysteinligáza)
GGT	$\gamma$ -glutamyltransferáza ( $\gamma$ -glutamyltranspeptidáza)
GPx	glutathionperoxidáza
GR	glutathionreduktáza
GS	glutathionsyntetáza
GSH	redukováný glutathion, $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyglycin
GSSG	oxidovaný glutathion, glutathiondisulfid
GST	glutathion-S-transferáza
HCl	kyselina chlorovodíková
HK-2	<i>Human Kidney 2</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	kyselina jodoctová
MAPEG	<i>Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism</i> , membránově vázané proteiny spojené s metabolismem eikosanoidů a glutathionu
MBB	monobromobiman
MCB	monochlorobiman
MPA	kyselina metafosforečná
MRP	<i>Multidrug Resistance Protein</i>

MS	<i>Mass Spectrometry</i> , hmotnostní spektrometrie
NaCl	chlorid sodný
NAD(H)	nikotinamidadeninukleotid
NADP(H)	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimid
$O_2^{\cdot -}$	superoxid
$\cdot OH$	hydroxylový radikál
$ONOO^-$	peroxynitrit
OPA	o-ftaldialdehyd
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> , reaktivní formy dusíku
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , reaktivní formy kyslíku
TBP	tributylfosfin
TNB	5-thionitrobenzoát
TPP	trifenylfosfin

# 1 ÚVOD

Během buněčného dýchání dochází ke vzniku ATP v procesu zvaném oxidativní fosforylace. U eukaryotických buněk je tento proces lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně. V rámci dýchacího řetězce vzniká malé množství superoxidu, který je prekurzorem většiny reaktivních forem kyslíku. Dalšími zdroji reaktivních forem kyslíku může být například mikrobiální infekce zahrnující aktivaci fagocytů, cigaretový kouř, alkohol, ionizující i UV záření apod. Reaktivní formy kyslíku a dusíku jsou produkty fyziologického buněčného metabolismu a mají v organismu mnoho významných funkcí. Při jejich nadměrné produkci však dochází k oxidačnímu stresu a následnému poškození buněčných struktur, jako jsou nukleové kyseliny, lipidy či bílkoviny. Z tohoto důvodu mají buňky vyvinut účinný obranný systém zahrnující enzymové i neenzymové antioxidanty.

Glutathion je hlavní intracelulární neenzymový antioxidant, který má celou řadu významných funkcí. Z tohoto důvodu jsou jeho koncentrace v buňkách poměrně vysoké (0,5–10 mmol.l<sup>-1</sup>). Strukturálně se jedná o tripeptid, obsahující unikátní  $\gamma$ -peptidovou vazbu a -SH skupinu. Vzhledem k významné úloze a zvyšujícímu se zájmu o tuto biomolekulu bylo vyvinuto mnoho metod ke stanovení koncentrací GSH v nejrůznějších biologických materiálech.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS)

Mezi reaktivní formy kyslíku (*Reactive Oxygen Species* = ROS) a dusíku (*Reactive Nitrogen Species* = RNS) patří volné radikály i látky, které volnými radikály nejsou. Pod pojmem volný radikál si lze představit atom, molekulu či ion, obsahující jeden či více nepárových elektronů, díky kterým jsou tyto sloučeniny velice reaktivní [1].

### 2.2 Oxidační stres

Během buněčného metabolismu vzniká fyziologicky určité množství ROS a RNS. Pokud jsou porušeny antioxidační mechanismy či je produkce ROS/RNS příliš vysoká, může docházet k oxidačnímu stresu. Během tohoto procesu dochází k poškození různých buněčných struktur (například proteinů, lipidů či DNA) [2, 3]. V mnoha publikacích se uvádí souvislost mezi oxidačním stresem a různými typy onemocnění. Mezi onemocnění, k jejichž rovoji může oxidační stres přispívat, patří ateroskleróza, cystická fibróza, rakovina, hypertenze apod. [4].

Metody měření oxidačního stresu lze obecně rozdělit na 3 skupiny: stanovení ROS, produktů oxidačního stresu a hladin antioxidantů. Stanovení ROS bývá poměrně obtížné vzhledem k jejich vysoké reaktivitě, proto se upřednostňuje stanovení produktů poškození lipidů, proteinů a DNA [5, 6].

#### 2.2.1 Stanovení ROS

Elektronová spinová rezonanční spektrometrie (ESR), známá také jako elektronová paramagnetická rezonanční spektrometrie (EPR), je velmi citlivá metoda, která umožňuje přímou detekci a identifikaci volných radikálů [7]. Vzorek je umístěn v silném magnetickém poli a kolmo na směr tohoto pole je vystaven mikrovlnnému záření. Sledují se změny kmitočtu tohoto záření při průchodu vzorkem v závislosti na měnící se intenzitě magnetického pole. Energetické přechody nepárových elektronů (tj. malých magnetků) se projeví jako typický signál na osciloskopu, podle kterého lze identifikovat radikál. Nicméně ESR detekuje pouze poměrně stabilní radikály [5, 6].

Další metoda se nazývá „spin trapping“ (angl. *trap* = past), díky které je možné detekovat i vysoce reaktivní radikály, které mají nízkou koncentraci a krátkou životnost [7]. Principem je reakce vysoce reaktivního radikálu (např.  $\cdot\text{OH}$  – hydroxylového radikálu) s vhodnou sloučeninou (např. 5,5-dimetyl-1-pyrolin-*N*-oxid) za vzniku stabilního radikálového aduktu, který může být detekován pomocí ESR. Touto metodou je možné stanovit radikály v biologických tekutinách a tkáňových extraktech, ale nemá rutinní charakter [5, 6, 8].

Ke stanovení ROS lze také využít fluorescenční sondy. Existuje široká škála sond určených k detekci jednotlivých druhů ROS, případně jejich celkové produkce, na bázi fluoresceinu, rhodaminu apod. Při setkání nefluorescenční sondy např. s  $\text{H}_2\text{O}_2$  dochází k její oxidaci a vzniku fluorescence [7, 9].

## **2.2.2 Stanovení produktů oxidačního stresu**

### **2.2.2.1 Markery poškození lipidů**

Peroxidace lipidů zahrnuje iniciaci, propagaci a terminaci, dochází při ní k poškození polynenasycených mastných kyselin [5]. Při tomto procesu vzniká směs různých produktů, neboť řetězce modifikovaných mastných kyselin se snadno štěpí na kratší produkty, včetně uhlovodíků, které vydechujeme (etan, pentan) a toxických aldehydů (malondialdehyd a 4-hydroxy-2-nonenal) [6, 10].

Malondialdehyd se stanovuje například reakcí s kyselinou thiobarbiturovou, zatímco 4-hydroxy-2-nonenal reaguje s 2,4-dinitrofenylhydrazinem [11, 12]. Při stanovení těkavých uhlovodíků je vydechovaný vzduch zachycen sorbentem, dále se desorbuje a analyzuje plynovou chromatografií. Dalším významným markerem neenzymové peroxidace kyseliny arachidonové jsou  $\text{F}_2$ -izoprostany, které lze stanovit plynovou chromatografií a imunochemicky [5, 6, 11, 13].

### **2.2.2.2 Markery poškození proteinů**

Některé ROS a RNS mohou oxidovat aminokyselinové zbytky, následkem toho proteiny ztrácí svou enzymovou, signální nebo transportní funkci. Řada aminokyselin může být hydroxylována  $\cdot\text{OH}$  či nitrována peroxyinitrem ( $\text{ONOO}^-$ ) [6]. Při reakci 4-hydroxy-2-nonenalu s histidinem, lyzinem a -SH skupinami jsou do proteinu adovány karbonylové skupiny (-CO-).

Při stanovení karbonylových skupin proteinů se využívá 2,4-dinitrofenylhydrazin [14, 15].

### 2.2.2.3 Markery poškození nukleových kyselin

Nukleové kyseliny jsou poškozovány především hydroxylovým radikálem [5], který reaguje s deoxyribózou nebo se připojuje na báze, čímž vznikají hydroxy- a oxoderiváty. Tyto modifikované báze jsou vylučovány močí ve formě nukleosidů, jako je 5-hydroxydeoxyguanozin, který se stanovuje pomocí HPLC a GC-MS i v moči [6, 11].

### **2.2.3 Stanovení hladin antioxidantů**

Posledním přístupem při hodnocení oxidačního stresu je stanovení hladin jednotlivých antioxidantů (např. GSH) a enzymů (např. kataláza). Testování celkové antioxidační kapacity hodnotí schopnost systému uměle generovanou radikálovou reakci zastavit nebo zpomalit. Antioxidační kapacita se přepočítává na kapacitu Troloxu. Existuje celá řada metodik, nyní se však nejvíce využívá metoda ABTS založená na inhibici vzniku radikálového kationtu 2,2-azinobis(3-etylbenzothiazolin-6-sulfonátu (ABTS<sup>+</sup>) antioxidanty obsaženými ve vzorku [6].

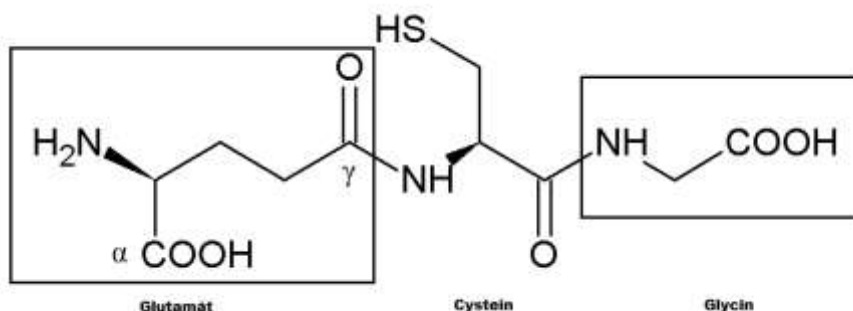
## 2.3 Glutathion

Glutathion je tripeptid, který se skládá z cysteinu, glycinu, a kyseliny glutamové. Jedná se o intracelulární antioxidant, který je významný pro savce, houby, rostliny i některé prokaryotické organismy. Díky své obranné funkci zajišťuje ochranu buněk před nežádoucími oxidacemi vyvolanými účinkem ROS i RNS [16, 17].

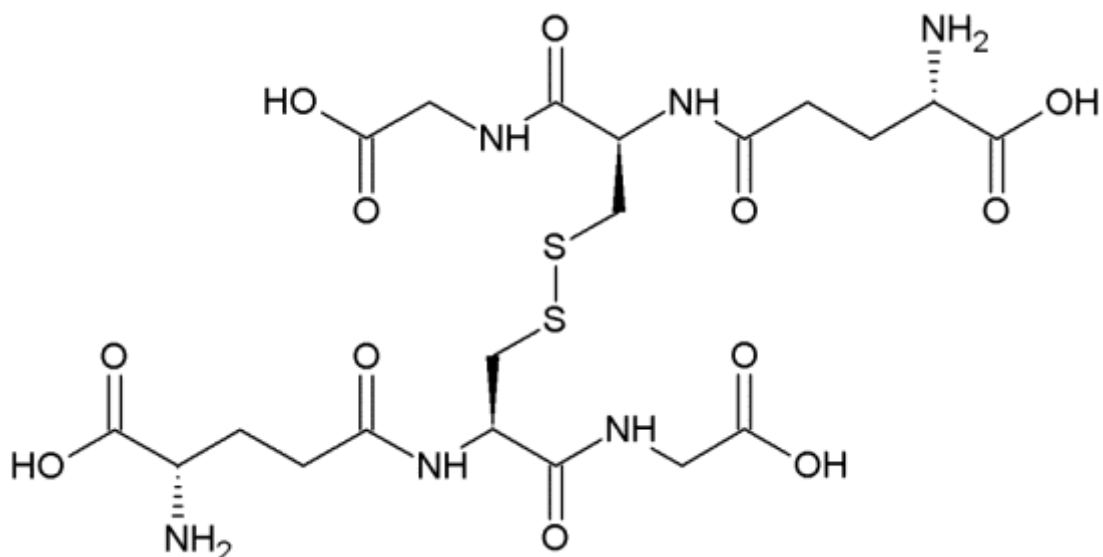
V buňkách může být glutathion volný nebo vázaný na bílkoviny [18]. Zároveň se může vyskytovat v redukované (GSH - obr. 1) či oxidované formě (GSSG - obr. 2). Poměr těchto dvou forem (GSH/GSSG) musí být udržován v optimálním rozmezí a slouží jako indikátor oxidačního stresu [19]. Za fyziologických podmínek odpovídá GSH/GSSG poměru 100 : 1. K poklesu tohoto poměru dochází během oxidačního stresu, kdy dochází ke kumulaci GSSG, který je potenciálně toxický pro buňky [20].

### 2.3.1 Struktura glutathionu

Glutathion ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinylglycin) obsahuje neobvyklou  $\gamma$ -peptidovou vazbu mezi aminoskupinou cysteinu a  $\gamma$ -karboxyskupinou glutamátového postranního řetězce [21, 22]. Díky přítomnosti vazby s  $\gamma$ -karboxyskupinou (místo běžné  $\alpha$ -karboxyskupiny) může být tato peptidová vazba hydrolyzována pouze membránovou  $\gamma$ -glutamyltransferázou. Z tohoto důvodu je glutathion odolný vůči intracelulární degradaci a je degradován pouze extracelulárně [23]. Hlavním funkčním místem glutathionu je sulfhydrylová (thiolová) skupina cysteinu. Při působení kyslíkových radikálů je přítomná sulfhydrylová skupina oxidována a dochází ke vzniku oxidované formy glutathionu [21].



**Obr. 1:** Strukturní vzorec redukované formy glutathionu (GSH).



**Obr. 2:** *Strukturní vzorec oxidované formy glutathionu (GSSG).*

### 2.3.2 Výskyt glutathionu

U buněk a tkání ve fyziologickém stavu více než 95 % z celkového množství glutathionu zaujímá GSH, méně než 5 % GSSG. Glutathion se nachází v každé buňce lidského těla v koncentraci 0,5–10 mmol.l<sup>-1</sup>. 85–90 % je přítomno v cytosolu, zbytek (10–15 %) je distribuován v intracelulárních organelách, jako jsou peroxizomy, mitochondrie, jádro či endoplazmatické retikulum. V játrech je přítomna nejvyšší koncentrace glutathionu (až 10 mmol.l<sup>-1</sup>), vysoké hladiny jsou nalézány také ve slezině, ledvinách, oční čočce, erythrocytech a leukocytech [18, 21, 22].

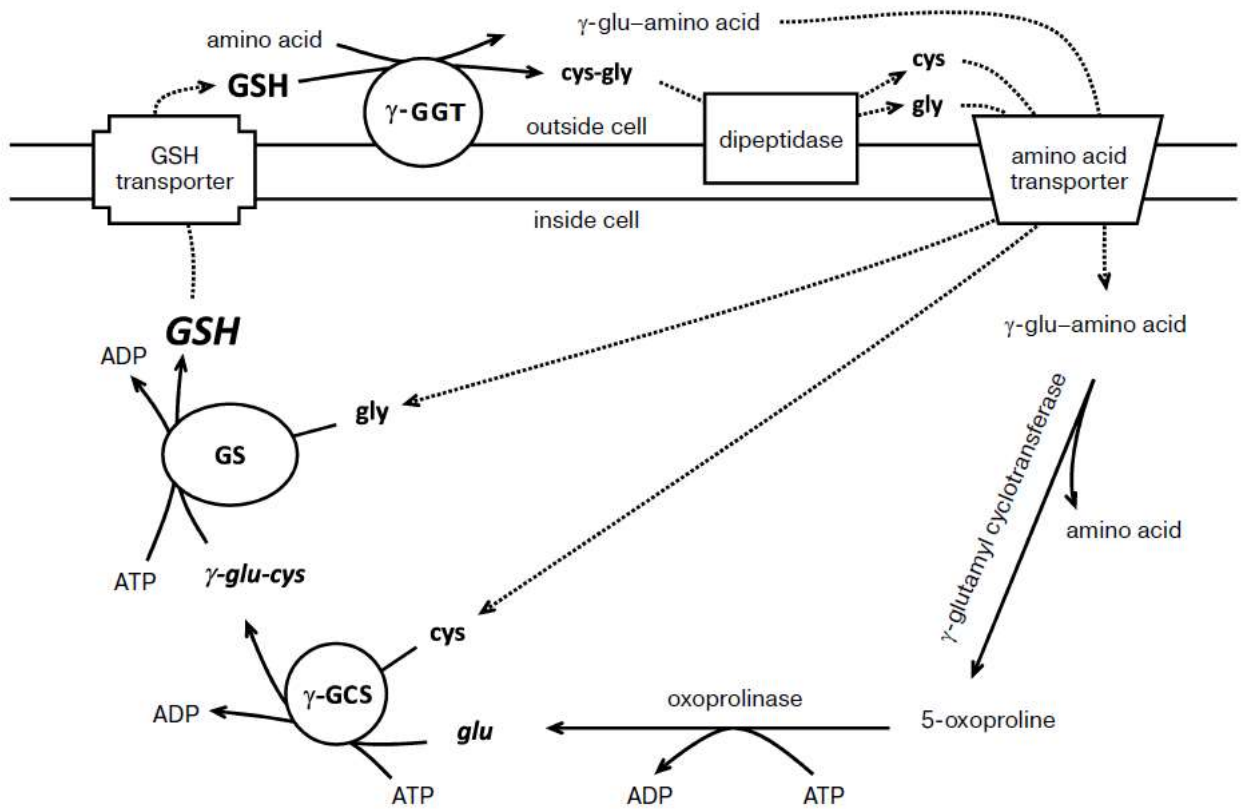
Glutathion je potřebný i mimo buňky, ačkoliv v extracelulárním prostředí je jeho koncentrace relativně nízká, např. v plazmě se nachází v koncentracích 2–20 μmol.l<sup>-1</sup>. Nicméně v některých extracelulárních prostorech, jako je obalová tekutina plic (což je tenká vrstva tekutiny pokrývající vzduchové prostory, kde dochází k výměně plynů) je poměrně vysoká koncentrace glutathionu, jelikož je sekretován epiteliálními buňkami. U osob, které kouří nebo vdechují částice či jiné oxidanty, probíhá potencionální zánět zahrnující invazi neutrofilů z krve přes endoteliální a epiteliální buňky do vzduchových prostor. Glutathion tedy přispívá k ochraně epiteliálních buněk před oxidačním stresem také v této oblasti [20].

### 2.3.3 Syntéza glutathionu

Glutathion může být syntetizován téměř ve všech buňkách organismu. Největší syntéza však probíhá v hepatocytech, ze kterých může být následně transportován. Tento mechanismus je fyziologicky velice důležitý, jelikož sérový GSH, který byl exportován z jater, může být využit jako zdroj cysteinu pro syntézu GSH v jiných buňkách. Z tohoto důvodu je plazmatická koncentrace GSH nízká [20]. Syntéza GSH *de novo* zahrnuje dvě ATP-dependentní reakce, které jsou součástí  $\gamma$ -glutamylvého cyklu. Tento cyklus zahrnuje šest enzymaticky katalyzovaných reakcí (obr. 3). Během  $\gamma$ -glutamylvého cyklu dochází k syntéze i degradaci glutathionu. V prvním kroku vzniká peptidová vazba mezi cysteinem a glutamovou kyselinou za katalýzy enzymem  $\gamma$ -glutamylcysteinsyntetázy (GCS), kdy vzniká  $\gamma$ -glutamylcystein. Ve druhém kroku reaguje  $\gamma$ -glutamylcystein a glycin za katalýzy glutathionsyntetázou (GS) a vzniká GSH. Vytvořený GSH se dostává ven z buňky pomocí specifického transportního proteinu v cytoplazmatické membráně [21].

Enzym, který je schopen hydrolyzovat vazby mezi cysteinem a glutamovou kyselinou v molekule GSH, se nazývá  $\gamma$ -glutamyltransferáza (GGT) a je lokalizovaný na vnější straně cytoplazmatické membrány. Dochází k odpojení  $\gamma$ -glutamylvé části a vzniku cysteinylglycinu.  $\gamma$ -glutamyltransferáza přenáší  $\gamma$ -glutamylový zbytek na aminokyselinu, čímž je umožněna přeprava komplexu dovnitř buňky. Uvolněný dipeptid, cysteinylglycin, je rozštěpen dipeptidázou, vzniká cystein a glycin, které jsou využity jako substráty pro GCS a GS.  $\gamma$ -glutamylcyklotransferáza rozštěpí vazbu komplexu  $\gamma$ -glutamyl-aminokyselina a uvolní se aminokyselina a 5-oxoprolin. Působením oxoprolinázy se 5-oxoprolin převede na kyselinu glutamovou, která je substrátem pro GCS [21].

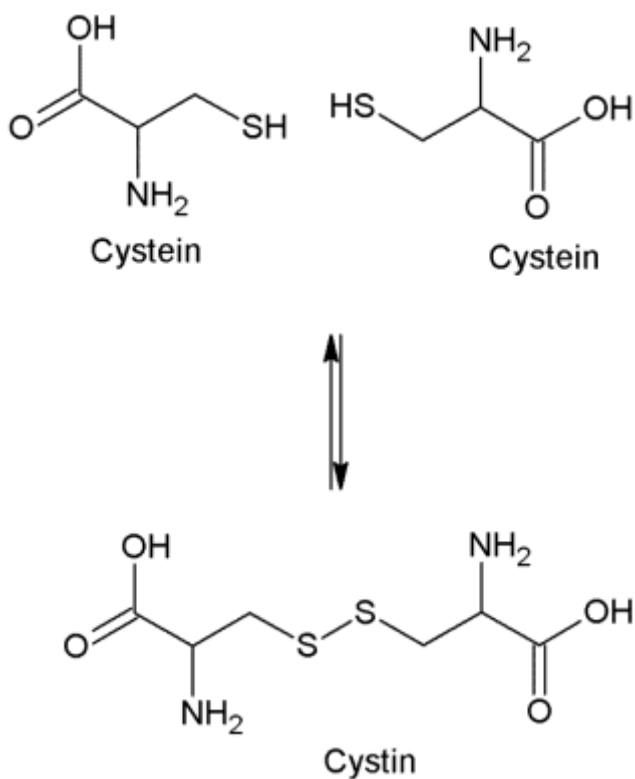
Tímto způsobem může být extracelulární GSH rozštěpen k získání aminokyselin, které jsou schopné proniknout do buňky, kde jsou znovu využity pro syntézu nové molekuly GSH. Obnova obsahu GSH je zajištěna nejen syntézou *de novo*, ale také recyklací GSSG na GSH za katalýzy glutathionreduktázy v přítomnosti NADPH jako kofaktoru [21].



**Obr. 3:** Schéma  $\gamma$ -glutamylového cyklu (gly – glycin, glu – kyselina glutamová, cys – cystein, cys-gly – cysteinylglycin,  $\gamma$ -glu-amino acid – komplex  $\gamma$ -glutamyl-aminokyselina, GS – glutathionsyntetáza,  $\gamma$ -GCS –  $\gamma$ -glutamylcysteinsyntetáza,  $\gamma$ -GGT –  $\gamma$ -glutamyltransferáza), upraveno dle [21].

### 2.3.4 Faktory ovlivňující syntézu glutathionu

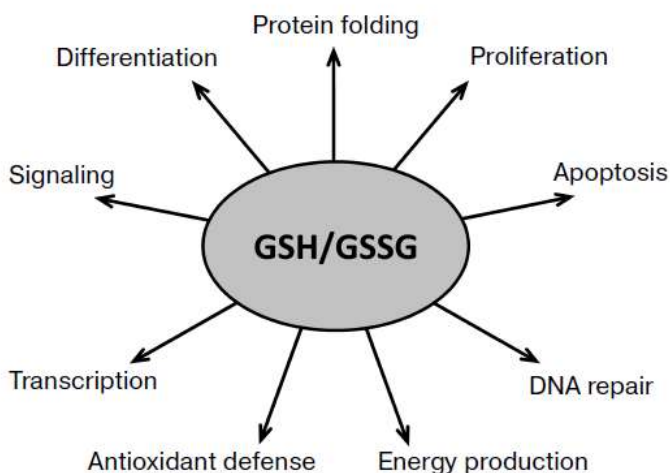
Homeostáza glutathionu v buňce je regulována rychlostí jeho syntézy, využitím a exportem z buňky. Syntéza glutathionu vyžaduje dostatečné množství stavebních aminokyselin (cysteinu, glycinu a kyseliny glutamové) a enzymy, katalyzující oba kroky vlastní syntézy, jak již bylo uvedeno výše. Rychlost syntézy GSH je však řízena zejména dostupností cysteinu a aktivitou  $\gamma$ -glutamylcysteinsyntetázy [24]. Cystein se liší od ostatních aminokyselin tím, že se intracelulárně vyskytuje ve formě sulfhydrylu, zatímco extracelulárně se vyskytuje ve formě disulfidu jako cystin (obr. 4). Mimo buňku totiž dochází k snadné autooxidaci cysteinu na cystin, který je však po vstupu do buňky rychle redukován zpět na cystein. Mezi hlavní faktory ovlivňující množství dostupného cysteinu patří zejména jeho příjem ze stravy, ale také aktivita transsulfurační cesty. V rámci transsulfurační cesty, která bývá také nazývána jako cystathioninová cesta, dochází v hepatocytech k přeměně methioninu přes meziproduct homocystein až na konečný cystein, který je využit při syntéze GSH [25].



**Obr. 4:** Oxidace dvou molekul cysteinu na cystin.

### 2.3.5 Funkce glutathionu

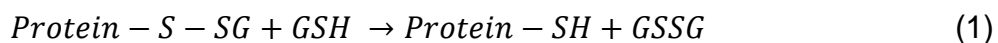
Glutathion je multifunkční molekula, která je nepostradatelná pro normální fungování buněk. V současné době nejsou úplně všechny principy, týkající se mechanismů fungování glutathionu v buňce, plně objasněny, jsou však předmětem stále probíhajících výzkumů [26, 27]. Přehled nejvýznamnějších funkcí GSH je uveden v obr. 5.



**Obr. 5:** Přehled funkcí glutathionu v buňce [26].

#### 2.3.5.1 Udržování thiolového stavu proteinů

Glutathion je nezbytný pro udržení intracelulární redoxní rovnováhy a základního thiolového stavu proteinů. Z tohoto důvodu podstupuje oxidaci za vzniku GSSG v reakci katalyzované thioltransferázami (rovnice 1) [28].

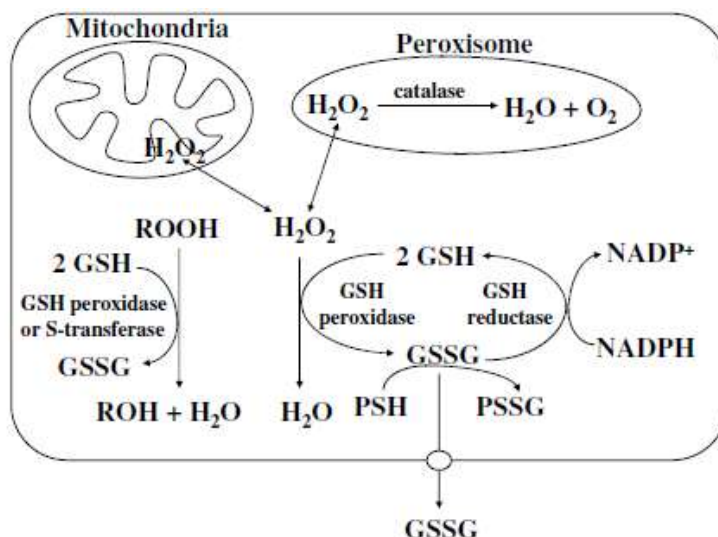
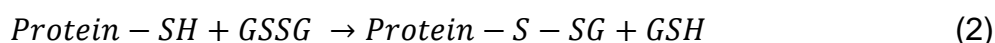


Vzhledem k tomu, že je tato reakce vratná, je rovnováha určující redoxní stav buněk závislá na koncentraci GSH a GSSG. Za normálních podmínek je hladina GSSG velice nízká, a proto je i tvorba smíšeného disulfidu omezena [27].

#### 2.3.5.2 Antioxidační funkce

V důsledku mitochondriální respirace dochází ke vzniku superoxidu ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), který vede ke vzniku peroxidu vodíku či dalších kyslíkových radikálů. Tyto látky mohou způsobit peroxidaci lipidů a tím poškodit buňky. Tomu

zabraňuje glutathion díky své antioxidační funkci. Peroxid vodíku je odstraňován pomocí glutathionperoxidázy nebo katalázy, jak je znázorněno na obr. 6. Kataláza je přítomna v peroxizomech, v mitochondriích přítomna není, proto má mitochondriální GSH velký význam. Organické hydroperoxydy mohou být redukovány glutathionperoxidázou nebo glutathion-S-transferázou. Při oxidačním stresu by mohlo docházet k hromadění GSSG. Aby se zabránilo posunu redox rovnováhy, GSSG může být aktivně transportován z buňky pomocí specifického, ATP dependentního MRP přenašeče (*Multidrug Resistance Protein*), nebo může reagovat s -SH skupinou proteinu za vzniku smíšeného disulfidu glutathionu, jak znázorňuje rovnice 2 [20, 27, 29].

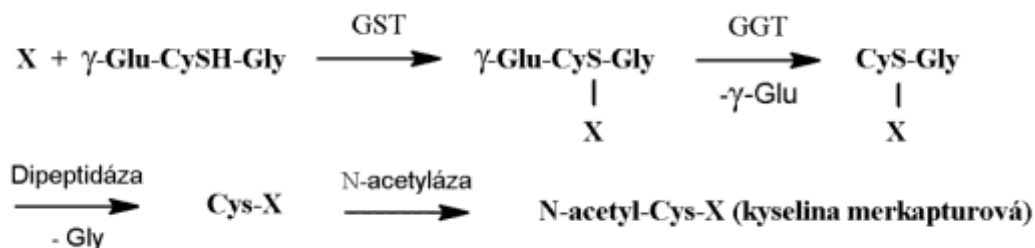


**Obr. 6:** Antioxidační funkce GSH (ROH – alkylalkohol, ROOH – organický hydroperoxid, PSSG – smíšený disulfid glutathionu, PSH – sulfhydrylová skupina proteinu) [27].

### 2.3.5.3 Detoxikační funkce

Glutathion detoxikuje xenobiotika (cizorodé látky), nebo jejich metabolity. Tyto sloučeniny jsou často elektrofilní a prostřednictvím konjugace vytváří s GSH konjugáty přímo, nebo za katalýzy glutathion-S-transferáz. Takto vzniklé sloučeniny prochází další přeměnou znázorněnou na obr. 7. Konečným produktem je substituovaná kyselina merkapturová, která je vylučována močí [27, 28]. Příkladem cizorodých látek detoxikovaných glutathionem je brombenzen, formaldehyd a acetaminofen. Mezi endogenní substráty řadíme

estrogen, melanin, prostaglandiny a leukotrieny. Konjugace s GSH vede v převážně většině k detoxikaci výchozích látek, nicméně občas může dojít ke vzniku produktů, které jsou oproti výchozí látce vysoce reaktivní [27, 28].



**Obr. 7:** Schéma syntézy kyseliny merkapturové (X – sloučenina s elektrofilním centrem).

#### 2.3.5.4 Regenerace vitamínu A a C

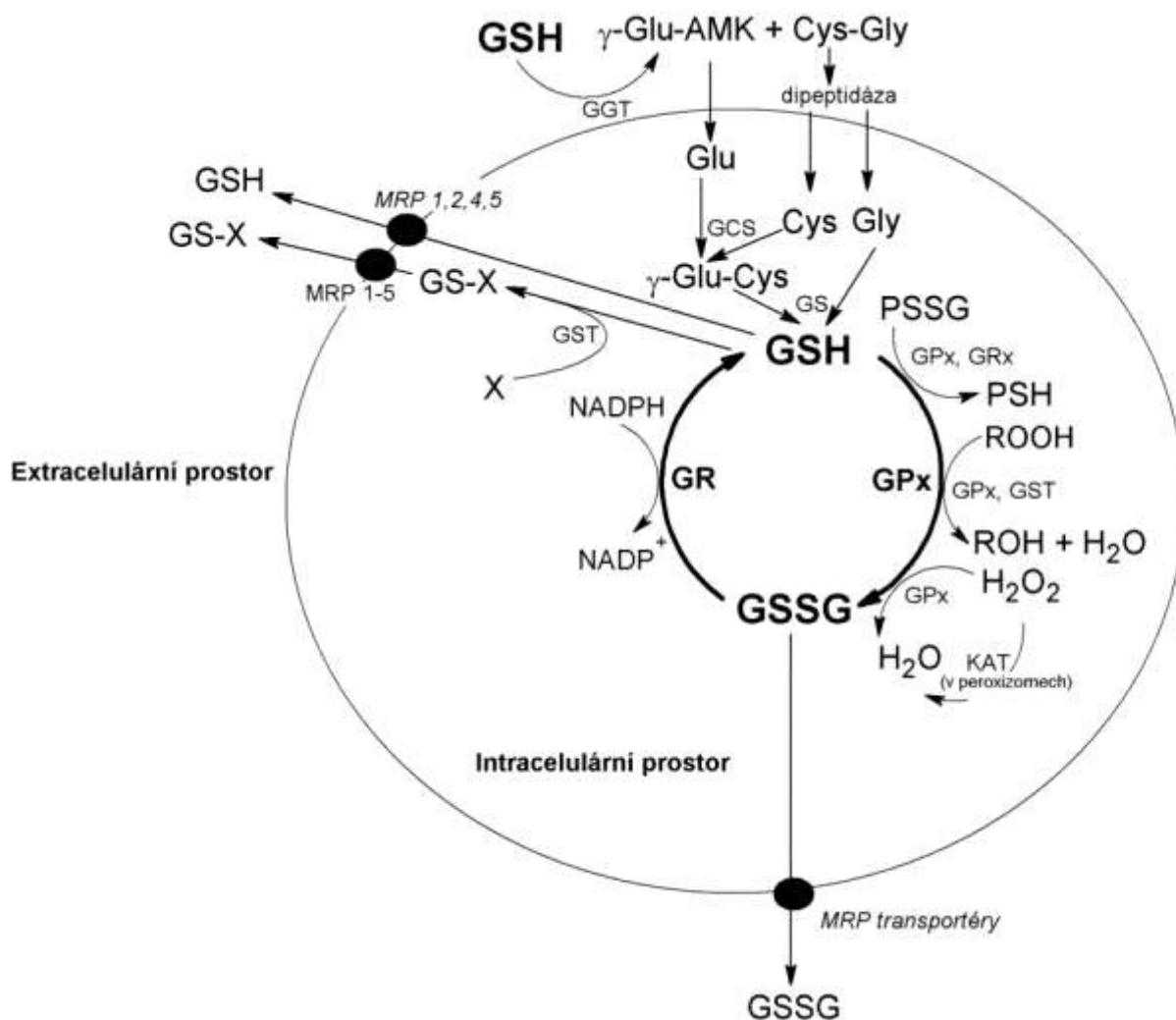
Glutathion je nízkomolekulární antioxidant vytvářený v buňkách, ale existují i další antioxidanty, které musí organismus přijímat potravou – vitamin E a vitamin C. Vitamin E odstraňuje například lipidové hydroxylově radikály tvořené z polynenasycených mastných kyselin. Oxidovaný vitamin E je poté redukován vitaminem C neenzymatickou, ale rychlou reakcí. Oxidovaný vitamin C je převeden zpět na redukovanou formu enzymatickými reakcemi, jedna z nich využívá GSH jako substrát [30].

#### 2.3.5.5 Další funkce GSH

Další velice významnou funkcí glutathionu je, že působí jako zásobní forma cysteinu [26, 27]. Glutathion se také podílí na regulaci buněčného cyklu, apoptózy, buněčné diferenciaci a proliferaci. V nervovém systému působí také jako neuromodulátor a neurotransmitter [31]. Dále moduluje buněčné procesy (syntéza DNA, syntéza proteinů), aktivuje T-lymfocyty a polymorfonukleární leukocyty. Nelze také opomenout velice důležitý proces, kterým je S-glutathionylace. Jedná se o reverzibilní posttranslační modifikaci zahrnující vazbu GSH (popř. GSSG) s -SH skupinou proteinu za vzniku smíšeného disulfidu. Díky S-glutathionylaci je zabráněno ireverzibilní oxidaci proteinů během oxidačního stresu. Deglutathionylace může být katalyzována glutaredoxinem nebo thioredoxinem [28, 32, 33].

### 2.3.6 Glutathionový metabolismus

Glutathionový metabolismus je složitý cyklus, ve kterém je zapojena řada enzymů (obr. 8). Některé enzymy hladiny GSH snižují, jedná se například o  $\gamma$ -glutamyltranspeptidázy, glutathion-S-transferázy a glutathionperoxidázy. Některé enzymy naopak hladiny GSH zvyšují, jako příklad lze uvést glutathionsyntetázu,  $\gamma$ -glutamylcysteinsyntetázu a glutathionreduktázu [28].



**Obr. 8:** Glutathionový metabolismus (GS – glutathionsyntetáza, GCS –  $\gamma$ -glutamylcysteinsyntetáza, GR – glutathionreduktáza, GGT –  $\gamma$ -glutamyltranspeptidáza, GPx – glutathionperoxidáza, GST – glutathion-S-transferáza, GRx – glutaredoxin, KAT – kataláza, Glu – glutamát, Cys – cystein, Gly – glycin, Glu-Cys –  $\gamma$ -glutamylcystein, Cys-Gly – cysteinylglycin, PSSG – glutathionylovaný protein, ROOH – organický hydroperoxid, PSH – redukováný protein, ROH – alkylalkohol, MRP – Multidrug Resistance Protein, X – xenobiotikum) [28].

## 2.4 Stanovení glutathionu

Zájem o stanovení GSH a GSSG se neustále zvyšuje vzhledem ke klíčové úloze GSH v ochranném mechanismu vůči oxidačnímu stresu. Referenční hodnoty koncentrací jednotlivých forem glutathionu v plazmě a plné krvi se mezi jednotlivými laboratořemi liší. Tato odlišnost je dána použitím různých analytických metod, přípravou vzorku, výběrem osob a vlivem nejrůznějších faktorů ovlivňujících koncentraci GSH. Mezi faktory ovlivňující koncentraci GSH patří nadměrná fyzická zátěž, expozice chladu, kardiovaskulární onemocnění, nádorová onemocnění, *diabetes mellitus* či jiná chronická onemocnění. Obecně se hladiny GSH v plné krvi mužů a žen statisticky významně neodlišují, ačkoliv někteří autoři rozdílů pozorovali [34].

Významným problémem při stanovení GSH je jeho velmi snadná autooxidace při  $\text{pH} > 7$  a také enzymatická proteolýza zprostředkovaná GGT, která vykazuje nejvyšší aktivitu při neutrálním  $\text{pH}$ . Z tohoto důvodu je důležité udržovat  $\text{pH}$  média v kyselé oblasti. K dosažení správných výsledků je nebytné dobře provést odběr vzorku, případnou redukci disulfidických vazeb, deproteinaci a derivatizaci thiolů [35].

### 2.4.1 Odběr vzorku

Příprava vzorku je pro stanovení glutathionu zcela zásadní. Nevhodné skladování vzorku může být zdrojem chyb, jelikož dochází k autooxidaci a proteolýze přítomného GSH. Jako příklad lze uvést erytrocyty, jejichž koncentrace GSH je 500x vyšší ve srovnání s plazmou. Hemolýza erytrocytů může tedy způsobit nadhodnocení plazmatických hladin GSH. Přítomnost kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), která slouží jako antikoagulační a chelatační činidlo, zabraňuje také probíhajícím oxidačním reakcím [19].

### 2.4.2 Redukce disulfidických vazeb

Při stanovení volného a vázaného GSH i dalších nízkomolekulárních aminothiólů je nutné redukovat přítomné disulfidické vazby. Nicméně glutathion vzniklý během redukce může být reoxidován ještě před derivatizací, což by vedlo k chybným výsledkům. Tomuto jevu je možné předejít přidáním thiol-maskujících látek, jako je *N*-ethylmaleimid (NEM), kyselina jodoctová (IAA), případně 2-vinylpyridin [18, 19].

Redukce disulfidu může být provedena buď enzymaticky přidáním GR a NADPH ke vzorku, elektrolýzou, nebo chemicky. Při chemické redukci je velmi důležitým krokem výběr redukčního činidla. Redukční činidla obsahující -SH skupiny, jako je například dithioerythritol, dithiothreitol a 2-merkptoethanol mohou negativně ovlivňovat daná stanovení, jelikož reagují s monobromobimanelem nebo o-ftaldialdehydem za tvorby interferujících fluorescenčních sloučenin [35]. Borohydrid sodný nebo draselný jsou silná redukční činidla, přičemž doba trvání redukce je závislá na použité koncentraci. Jejich hlavními nevýhodami jsou nestabilita ve vodném prostředí a nadměrné pění, což způsobuje problémy při přípravě vzorku. Tvorba plynu a pění může být překonáno přidáním povrchově aktivního činidla, například oktanolu [18].

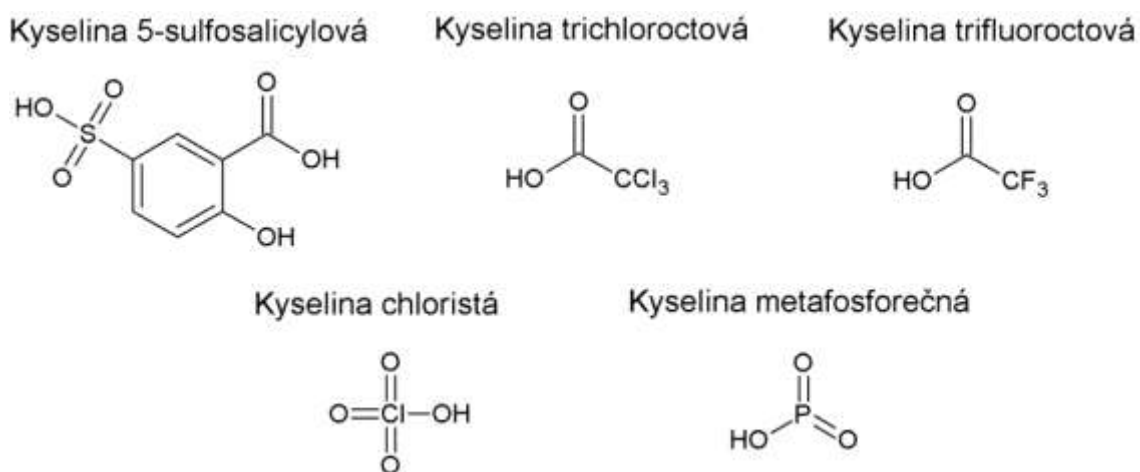
Trialkylfosfiny, například tributylfosfin (TBP) nebo trifenyfosfin (TPP), jsou silná redukční činidla, která musí být přítomna pouze v malém molárním přebytku pro úplnou redukci disulfidů. Výhodou je, že většina trialkylfosfinů nereaguje s thiol-specifickými činidly a nevede k tvorbě plynu během reakce [19]. Nicméně TBP je méně využíván kvůli jeho výbušným vlastnostem při vyšších koncentracích. Z tohoto důvodu je díky větší bezpečnosti a dostatečné reaktivitě vhodnější TPP [35]. Dalším členem této skupiny je tris-(2-karboxyethyl)-fosfin, který je oproti TBP dobře rozpustný ve vodě, netěkavý a jeho použití může poskytnout více reprodukovatelné výsledky než TBP či TPP [19].

### **2.4.3 Deproteinace vzorku**

Biologické vzorky obsahují velké množství proteinů, které musí být ve většině případů před analýzou odstraněny. Jejich přítomnost ve vzorcích může způsobovat vážné problémy při stanovení. Například při kapilární elektroforéze jsou proteiny snadno adsorbovány na stěnu kapiláry, což silně ovlivňuje migrační čas, tvar píku, rozlišení a detekční odezvu analyzovaných látek [35]. Naopak existuje pouze několik metod (například nukleární magnetická rezonance) vhodných k měření koncentrace GSH v intaktních buňkách či nedeproteinizovaných vzorcích. K deproteinaci lze využít okyselení vzorku, přidání organického rozpouštědla (např. acetonitril, aceton, metanol) či ultrafiltraci [36].

Mezi typické kyseliny využívané k odstranění proteinů patří kyselina 5-sulfosalicylová, kyselina trichloroctová, kyselina trifluoroctová, kyselina chloristá a kyselina metafosforečná, jejichž vzorce jsou znázorněny na obr. 9. Po následné centrifugaci je získán čistý supernatant bez proteinů. Okyselení způsobí zároveň eliminaci enzymů, které by mohly narušit analýzu, jako je GGT katalyzující degradaci GSH [36]. Nicméně oxidace thiolů během acidifikace představuje hlavní problém. Rossi *et al.* zjistili, že použití vysokého množství NEM společně s krátkou inkubační dobou před precipitací kyselinou trichloroctovou v koncentraci 80–100 g.l<sup>-1</sup> jsou ideální podmínky k zabránění časově závislé oxidace během acidifikace [18]. Ačkoliv je odstranění proteinů pomocí kyselin neúčinnější, nevýhodou je, že musí dojít opět k alkalizaci vzorku na pH>9 před derivatizací chromofory nebo fluorofory [35].

Při použití hmotnostního spektrometru jako detektoru je vhodnější k deproteinaci použít organická rozpouštědla. Ultrafiltrace také slouží k velice účinnému odstranění proteinů a výhodou je, že nevyžaduje přidání kyselin nebo organických rozpouštědel, která by mohla ovlivnit separaci, derivatizaci či detekci [36].



**Obr. 9:** Kyseliny využívané k deproteinaci vzorku.

#### 2.4.4 Derivatizace funkčních skupin

Jelikož GSH ani GSSG neobsahují ve své molekule žádný silný chromofor ani fluorofor, je často nutná derivatizace analyzované sloučeniny. Jedná se o zavedení vhodné značky do cílové molekuly sloužící ke zlepšení meze detekce pro UV-VIS i fluorescenční detekci. Ideální derivatizační činidlo by mělo poskytovat vysokou citlivost, specifitu a nemělo by reagovat s matricí vzorku za vzniků interferencí. GSH obsahuje tři funkční skupiny, které je možné derivatizovat. Jedná se o karboxy-, amino- a thiolové skupiny. Při stanovení GSH je upřednostňováno značení volné thiolové skupiny díky její specifitě a ochranné funkci. Zatímco při stanovení GSSG je možné značit pouze amino- a karboxy- skupiny [35]. Nicméně u některých metod stanovení GSH založených na elektrochemické detekci není nutná derivatizace. I přes to existuje celá řada derivatizačních činidel jejichž přehled je uveden v tabulce I [34].

**Tab. I:** Derivatizační činidla používaná v jednotlivých metodách [34].

Metoda	Vhodné derivatizační činidlo
<b>Spektrofotometrické metody</b>	<i>N</i> -ethylmaleimid (NEM)
	Kyselina jodoctová (IAA)
	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB, Ellmanovo činidlo)
	4,4'-dithiodipyridin
	1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB)
<b>Spektrofluorimetrické metody</b>	o-ftaldialdehyd (OPA)
	Naftalen-2,3-dikarboxaldehyd
	Bimany
	Fluorobenzofurazany
	Deriváty maleimidu
	Difluoroboradiaza-S-indaceny

##### 2.4.4.1 Využití chromoforů

Analytické metody využívající kolorimetrická činidla a detekci absorbance v UV oblasti jsou méně citlivé, ale zároveň jednodušší ve srovnání s fluorescenční či elektrochemickou detekcí. Existuje řada thiol-reaktivních

činitel, která reagují s thiolovou funkční skupinou za vzniku derivátu absorbujícího UV záření [36].

Nejběžněji používanými sloučeninami jsou NEM, IAA a jodacetamid vedoucí ke vzniku thioetherů. S využitím svých thiol-maskujících vlastností byl NEM použit v kombinaci s fluorescenční detekcí a hmotnostní spektrometrií ke stanovení GSSG. Při použití NEM v kombinaci s enzymatickou GSH-recyklační metodou stanovující GSSG má NEM inhibiční účinky na GR. Z tohoto důvodu musí být přebytek činidla odstraněn extrakcí rozpouštědlem, nebo extrakcí na pevné fázi. Při  $\text{pH} > 7,5$  se NEM váže s aminoskupinami, ačkoliv pomaleji ve srovnání s thiolovými skupinami. IAA a jodacetamid jsou využívány jako thiol-maskující alkylační činidla pro měření koncentrace GSSG. Dalším alkylačním činidlem je 2-vinylpyridin, jehož reakce vyžadují velký přebytek tohoto činidla a na rozdíl od NEM neinhibuje GR [36]. V poslední době se jako thiol-maskující činidla testovaly také 1-methyl-2-vinylpyridiniumtrifluormethansulfonát a 1-methyl-4-vinylpyridiniumtrifluormethansulfonát. Jejich výhodou je, že neinhibují GR, nereagují s aminoskupinami a nevyžadují tudíž extrakční krok [19].

Ellmanovo činidlo, neboli 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB), je široce používaným činidlem pro derivatizaci GSH a GSSG ve spektrofotometrii při enzymatické GSH-recyklační metodě. Pro kvantifikaci proteinových thiolů a dithiolů v pikomolárních množstvích lze využít 4,4'-dithiodipyridin, který má hydrofobní povahu, malou velikost a může být využit při nižším pH ve srovnání s DTNB. Dalším derivatizačním činidlem je 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB). FDNB zajišťuje derivatizaci aminoskupiny a jeho výhodou je, že umožňuje současně hodnotit hladiny GSH a GSSG [19].

#### 2.4.4.2 Využití fluoroforů

Fluorescenční detekce poskytuje mnohem nižší detekční limity ve srovnání s UV detekcí a umožňuje měřit i pikomolární množství GSH. Principem je vytvoření aduktu vhodného fluoroforu s GSH za vzniku fluorescence, která je detekována. Ideální fluorofor by měl být nefluorescenční v nezareagované formě a měl by rychle a specificky reagovat s GSH, popř. někdy i s dalšími thioley, za vzniku stabilní fluorescenční sloučeniny. Fluorofory reagující s thiolovou skupinou jsou nejselektivnější, ale neumožňují detekci

GSSG. Fluorofory reagující s aminoskupinou jsou méně selektivní, ale umožňují současné stanovení GSH a GSSG [18, 36].

Běžně používaným fluoroforem je o-ftaldialdehyd (OPA). OPA je nefluorescenční, dokud nereaguje jako heterobifunkční činidlo s amino- a thiolovou skupinou GSH za vzniku fluorescenčního isoindolového produktu. Výhodami při použití OPA jsou mírné reakční podmínky, rozsáhlé zkušenosti s jeho použitím a možnost stanovení i jiných aminothioliů [18, 35]. Další možností je využití naftalen-2,3-dikarboxaldehydu, což je činidlo podobné OPA, využívané k současnému hodnocení produkce ROS a hladin GSH [19]. Velmi významnou skupinou fluorochromů jsou bimany. Příkladem je monobromobiman (MBB), který reaguje s thiolovou skupinou rychle, ale méně specificky, lze ho tedy využít k současnému stanovení GSH a dalších thioliů. Naproti tomu monochlorobiman (MCB) reaguje výhradně s GSH [35, 37]. Výhodou MBB je relativně vysoká fluorescenční emise umožňující detekci i nízkých koncentrací ( $2 \times 10^{-5} \text{ mmol.l}^{-1}$ ) thiolových sloučenin. Nevýhodou jeho použití je však vlastní fluorescence a fotodegradace [35].

Skupina fluorobenzofurazanů se také využívá k derivatizaci thioliů. Nezaregovaná činidla nejsou fluorescenční, thiolové adukty jsou stabilní a netvoří se fluorescenční produkty hydrolýzy. Nicméně tyto fluorochromy reagují velmi pomalu a tudíž derivatizace s touto skupinou vyžaduje drastické podmínky (pH = 9,5 a 60 °C po dobu jedné hodiny), což představuje značnou nevýhodu [36].

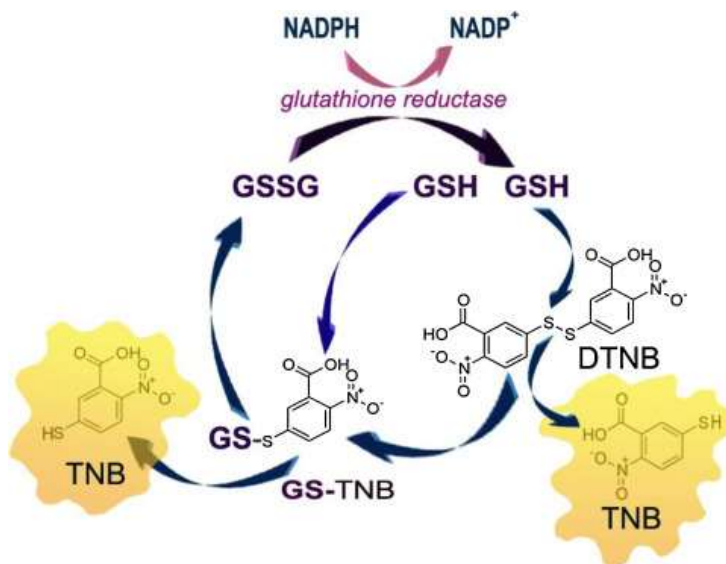
Mezi deriváty maleimidu patří ThioGlo (9-acetoxy-2-(4-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-1H-pyrol-1-yl)fenyl)-3-oxo-3H-nafto[2,1-b]pyran) a fluorescein-5-maleimid. Tyto deriváty vykazují afinitu k thiolové skupině. V neposlední řadě je také možné využít skupinu difluoroboradiaza-S-indacenů [19].

## 2.4.5 Metody stanovení glutathionu

Existuje mnoho metod pro stanovení redukovaného a oxidovaného glutathionu. Navíc se může glutathion v buňkách vyskytovat ve formě smíšeného disulfidu, kdy je molekula GSH spojena s -SH skupinou proteinu či peptidu – vznikají tak glutathionylované proteiny. Proto se po předchozí redukci veškerého glutathionu na formu GSH může stanovovat i celkový glutathion [38]. Výběr vhodné metody závisí na povaze analyzovaného vzorku, dostupném vybavení laboratoře a formě glutathionu, kterou chceme stanovit. Stanovení se nejčastěji provádí v plné krvi, hemolyzátu erytrocytů, plazmě nebo přímo ve tkáni. Do dnešního dne bylo vyvinuto mnoho spektrofotometrických, spektrofluorimetrických, elektrochemických, chemiluminiscenčních či separačních metod, přičemž nejvýznamnější z nich budou popsány v následujících kapitolách [34].

### 2.4.5.1 Spektrofotometrické metody

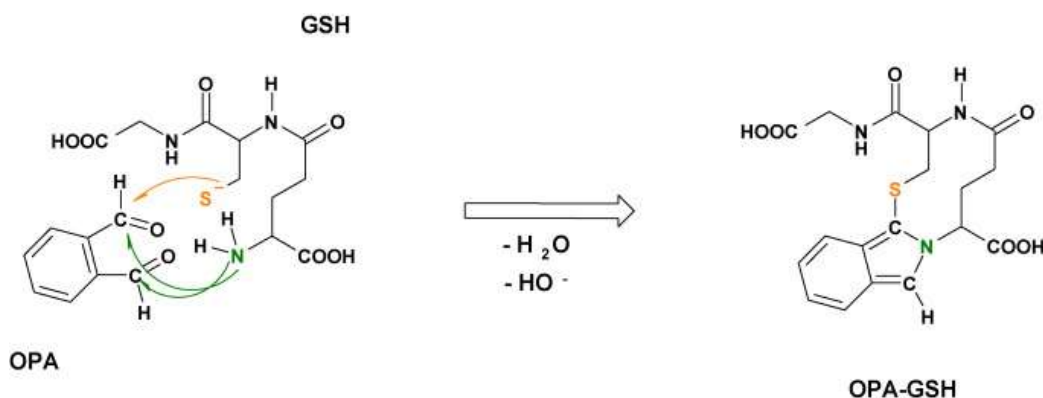
Mezi spektrofotometrické metody patří enzymatická GSH-recyklační metoda. Toto stanovení původně vyvinuté Owensem a Belcherem [39] upravil roku 1969 Tietze [40]. Principem stanovení je redukce GSSG pomocí GR doprovázená oxidací další molekuly, u které je měřena změna absorbance. Mezi látky, které se využívají pro detekci redukce GSSG, patří  $\text{NAD}^+$  či  $\text{NADP}^+$  (u nichž je detekována změna absorbance při 340 nm) či DTNB. V současné době je nejčastěji využívaným postupem ten, kde se v reakčním roztoku kromě DTNB a GR nachází také  $\text{NADP}^+$ , čímž se zvyšuje citlivost stanovení. GSH přítomný ve vzorku reaguje s DTNB za vzniku GS-TNB a 5-thionitrobenzoátu (TNB) (obr. 10). Při této reakci vzniká GSSG, který je následně redukován pomocí GR a NADPH. Nárůst míry absorbance uvolněného TNB je měřen při 412 nm a poskytuje informaci o koncentraci celkového GSH. Po přidání thiol-maskujícího činidla je možné stanovit koncentraci pouze pro GSSG. Výhodou této metody je poměrně vysoká senzitivita, specifita a možnost stanovení obou forem glutathionu. Zásadní nevýhodou je nemožnost automatizace a problémy související s použitím NEM zvyšující komplikovanost stanovení [38, 41].



**Obr. 10:** Schéma zobrazující enzymatickou GSH-recyklační metodu [41].

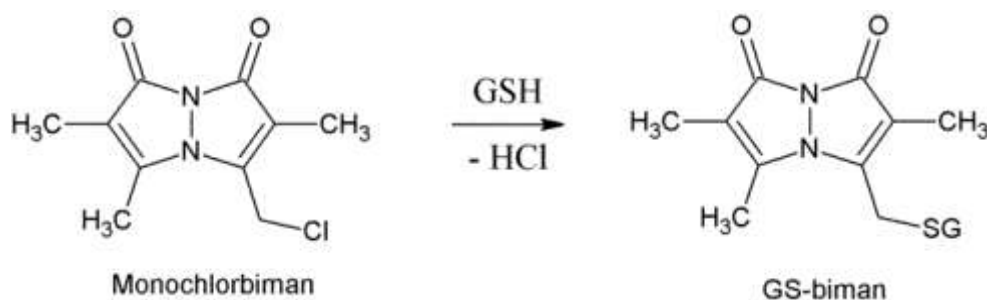
#### 2.4.5.2 Spektrofluorimetrické metody

Cohn a Lyle jako první popsali reakci GSH a OPA a následně i její využití pro fluorimetrické stanovení GSH [42]. S použitím minimálních změn v přípravě vzorku, podmínek stanovení a instrumentace tuto metodu později Hissin a Hilf [43] modifikovali pro stanovení GSH i GSSG [18]. Principem stanovení je reakce thiolové a aminové skupiny GSH s aldehydovými skupinami OPA za vzniku vysoce fluorescenčního isoindolového produktu OPA-GSH (obr. 11). Tato reakce probíhá v mírně alkalickém prostředí při laboratorní teplotě. V porovnání s chromatografickými metodami jsou fluorimetrické metody velmi rychlé, levné a na přípravu vzorku méně náročné. Při zachování požadovaných podmínek (teplota, pH) se jedná o velmi citlivé, a díky derivatizaci specifické metody [38].



**Obr. 11:** Reakce OPA a GSH za vzniku isoindolového produktu OPA-GSH [44].

Další možností stanovení GSH je s využitím bimanů. MBB reaguje s thiolovou skupinou GSH, tato reakce je však méně specifická a je možné ho využít k detekci GSH i dalších thiolů. Z tohoto důvodu je výhodnější použít monochlorbiman, který reaguje výhradně s glutathionem za katalýzy glutathion-S-transferázy [37, 45]. Principem stanovení je reakce nefluorescenčního MCB s GSH za vzniku fluorescenčního aduktu GS-biman (obr. 12). Velkou výhodou bimanů je jejich schopnost pronikat přes buněčnou membránu, lze je tedy využít jako sondy měřící GSH v intaktních buňkách. Tato schopnost byla využita v průtokové cytometrii a fluorescenční mikroskopii. Výhodami derivatizace MCB je jednoduchost, rychlost, citlivost a specifita stanovení. Nevýhodou je, že výsledky musí být prezentovány pouze jako procentní podíl koncentrace GSH vztažený ke kontrolám [46, 47].



**Obr. 12:** Reakce MCB a GSH za vzniku aduktu GS-biman.

#### 2.4.5.3 Kapalinová chromatografie

Ke stanovení GSH byla vyvinuta řada analytických metod, v současné době se nejvíce využívají metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s různými typy detekcí (UV/VIS, fluorescenční, elektrochemická). Další možností je spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS). Do přípravy vzorku je většinou nutno zahrnout derivatizaci, která může být provedena před nebo po chromatografické separaci [38, 48]. Při spojení HPLC s UV detekcí se využívá například DTNB či FDNB, tato metoda je méně citlivá, ale jednoduchá. HPLC s fluorescenční detekcí využívá například OPA či MBB. Při spojení HPLC s elektrochemickou detekcí není nutná derivatizace [18, 49], výhodou je současné stanovení GSH s GSSG a vysoká citlivost. Obecnou výhodou chromatografických metod je možnost separace GSH od potenciálně interferujících látek, vysoká senzitivita a díky separaci i specifita. Nevýhodou

těchto metod je nemožnost analýzy více vzorků najednou, vysoké finanční náklady a dlouhá doba analýz [38].

#### 2.4.5.4 Plynová chromatografie

Literatura uvádí pouze několik metod pro stanovení GSH a GSSG s využitím plynové chromatografie (GC). Většina těchto GC metod je spojena s hmotnostní detekcí. Při tomto stanovení dochází k zplynění vzorku, který je po následné separaci ionizován a detekován v hmotnostním spektrometru. Nicméně GSH je polární sloučenina, která při vysoké teplotě snadno degraduje. Z tohoto důvodu je nutná derivatizace. Jako derivatizační činidlo je v tomto případě možné použít anhydrid kyseliny trifluoroctové či etylchloroformiát. Při použití prvního činidla dochází k tvorbě komplexu bicykloglutarimidu a GSH. Při použití druhého činidla je GSH přeměněn na *N,S*-etoxykarbonylmetylesterový derivát [35]. Tato metoda nenašla příliš velké uplatnění při stanovení GSH, nevýhodou jsou vysoké pořizovací náklady [18].

#### 2.4.5.5 Bioluminiscenční metody

První bioluminiscenční metodu použitou k měření GSH vyvinul Hinze roku 1984 [50]. Roku 1998 Romero a Mueller-Klieser [51] detekovali GSH tím, že spojili enzymatickou GSH-recyklační metodu s vysoce citlivou luminiscenční reakcí, čímž detekovali spotřebu  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  [19]. Principem metody je měření chemiluminiscence bakteriální luciferázy. GSH je spojen s redoxním systémem  $\text{NADP}/\text{NADPH} + \text{H}^+$  prostřednictvím specifických enzymů. Tento redoxní systém je prostřednictvím flavinmononukleotidu kvantitativně propojen s bakteriální luciferázou. Výhodou je, že stanovení vyžaduje pouze malé množství kapalného vzorku a poskytuje široký rozsah měřitelných koncentrací GSH. Nevýhodou je, že se jedná o semikvantitativní metodu neumožňující stanovení GSSG [18]. Od té doby byly vyvinuty další bioluminiscenční systémy pro stanovení celkového glutathionu, jako příklad lze uvést luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$  či  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ - $\text{KMnO}_4$  [19].

#### 2.4.5.6 Kapilární elektroforéza

Ke stanovení GSH ale i dalších thiolů byly vyvinuty také metody kapilární elektroforézy [52]. Mezi výhody kapilární elektroforézy patří krátká doba analýzy, potřeba malého množství vzorku, velmi účinná separace, snadná automatizace a široká použitelnost [19]. Nevýhodou těchto metod může být nedostatečná citlivost. Ke zvýšení citlivosti stanovení se provádí derivatizace. Zároveň je důležité zvolit vhodný typ detekce. Pro stanovení GSH byly použity různé typy detekce (například UV, fluorescenční, MS a velmi citlivá laserem indukovaná fluorescence) [34].

#### 2.4.5.7 Elektrochemické metody

Další možností stanovení GSH je využití elektrochemických metod. Obecnými výhodami elektrochemických metod je jednoduchost, rychlost, vysoká citlivost a nízké náklady. Většina těchto metod je založena na redukci GSSG na visící rtuťové kapkové elektrodě. Další možností může být oxidace GSH a GSSG na nemodifikovaných nebo chemicky modifikovaných elektrodách. Hlavním problémem elektrochemických metod je nadměrně vysoký potenciál pro oxidaci těchto látek na společných uhlíkových elektrodách [53].

Kizek *et al.* [54] měřili GSH a GSSG metodou cyklické voltametrie při použití visící rtuťové kapkové elektrody jako pracovní elektrody. Ag/AgCl/3 mol.l<sup>-1</sup> KCl sloužila jako referenční elektroda a Pt drát jako pomocná elektroda [19]. Inoue a Kirchhoff detekovali GSH pomocí elektrody, která byla modifikována koenzymem pyrrolochinolin/chinonem [55].

### **3 CÍL PRÁCE**

Cílem naší práce bylo využít dvě spektrofluorimetrické metody využívající OPA a MCB ke stanovení glutathionu v několika druzích biologického materiálu – v jaterních homogenátech, vzorcích periferní krve a vybraných buněčných kulturách – a následně výsledky získané z obou použitých metod mezi sebou porovnat, zda poskytují srovnatelné hodnoty glutathionu.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy ARJ 120-4M (Kern, Německo)

Dávkovač Multipette stream (Eppendorf, Německo)

Laboratorní sklo (Simax, Česká republika)

Lednice s mrazákem (-20 °C), (Liebherr, Česká republika)

Magnetické míchadlo IKA Big squid (Star, Německo)

Mikrotitrační destičky 96 jamek (Nunc, Dánsko)

Mikrozkušavky objem 0,5; 1,5 a 2 ml (Eppendorf, Německo)

Nitrilové rukavice Titan (Genesee, Česká republika)

Odběrové zkumavky s K3 EDTA objem 9 ml (Vacuette, Česká republika)

Odstředivka Mikro 22 R (Hettich, Německo)

pH měrná elektroda Sen Tix 81 (Fisher Scientific, Rakousko)

pH metr InoLab pH 720 (Fisher Scientific, Německo)

Pipety Finnpiquette (Thermo, Finsko)

Plastové špachtle

Software: Microsoft Office 2007 (Word, Excel), Tecan i-control, AB 2

Spektrofluorimetr Aminco Bowman 2 (Thermo, USA)

Spektrofotometr a spektrofluorimetr Infinite M200 (Tecan, Rakousko)

Stojany

Špičky na pipety Labtip (Thermo Scientific, Finsko)

Termostatovaná třepačka PST-100 HL (Biosan, Lotyšsko)

Váhy 440-35N (Kern, Německo)

Vortex (Heidolph Reax top, Německo)

## 4.2 Použité chemikálie a biologický materiál

Cisplatina ( $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ , Mr = 300,05, Sigma-Aldrich, Německo)

Deionizovaná voda, DV ( $G < 0,1 \mu\text{S}$ )

Diethylmalonát, DEM ( $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_4$ , Mr = 160,16, Sigma-Aldrich, Německo)

Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , Mr = 46,07, Merck, Německo)

DPBS (10x), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Gibco, USA)

Glutathion redukovaný, GSH ( $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ , Mr = 307,33, Sigma-Aldrich, Německo)

Glutathion-S-transferáza, GST (45–50 kDa, Sigma-Aldrich, Německo)

Hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Mr = 141,96, Sigma-Aldrich, Německo)

Chlorid sodný ( $\text{NaCl}$ , Mr = 58,443, Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Kyselina etylendiamintetraoctová, EDTA ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , Mr = 372,24, Fluka Biochemika, Německo)

Kyselina chlorovodíková ( $\text{HCl}$ , Mr = 36,46, Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina metafosforečná, MPA ( $\text{HPO}_3$ , Mr = 79,98, Sigma-Aldrich, Německo)

Monochlorobiman, MCB ( $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2$ , Mr = 226,66, Sigma-Aldrich)

o-ftaldialdehyd, OPA ( $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$ , Mr = 134,14, Sigma-Aldrich, Německo)

Buněčné kultury: HK-2 (*Human Kidney 2*), plicní A549

Lidská periferní krev

Myší jaterní homogenáty

### 4.3 Příprava roztoků

#### Fosfátový pufr podle Dulbecca, DPBS (1x)

Fosfátový pufr podle Dulbecca – DPBS (1x) byl připraven smícháním 20 ml DPBS (10x) se 180 ml deionizované vody. Takto připravený pufr byl skladován v lednici při 4 °C.

#### Fosfátový pufr (100 mmol.l<sup>-1</sup>) s kyselinou etylendiamintetraoctovou (5 mmol.l<sup>-1</sup>)

Pufr byl připraven rozpuštěním 0,7098 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 0,0931 g EDTA v 50 ml deionizované vody. Následně bylo pH pufru upraveno na hodnotu pH = 8. Tento pufr byl připraven čerstvý před každým měřením.

#### Glutathion-S-transferáza

Byly připraveny tři roztoky GST o aktivitách 0,1, 0,05 a 0,01 U.ml<sup>-1</sup>. Roztoky GST o požadovaných aktivitách byly připraveny ředěním zásobního roztoku GST o aktivitě 1 U.ml<sup>-1</sup> deionizovanou vodou, jak je uvedeno v tabulce II. Roztoky GST byly připraveny čerstvé před každým měřením.

**Tab. II:** Příprava roztoků glutathion-S-transferázy o různých aktivitách.

Aktivita GST (U.ml <sup>-1</sup> )	V <sub>GST</sub> (1 U.ml <sup>-1</sup> ; µl)	V <sub>DV</sub> (µl)
0,1	20	180
0,05	20	380
0,01	20	1800

#### Chlorid sodný (1%)

Roztok byl připraven rozpuštěním 1 g NaCl ve 100 ml deionizované vody. Takto připravený roztok byl skladován v lednici při 4 °C.

#### Kyselina chlorovodíková (1 mol.l<sup>-1</sup>)

Roztok byl připraven napipetováním 1,9 ml HCl (32%) do 18,1 ml deionizované vody. Vzniklý roztok byl skladován v lednici při 4 °C.

Kyselina chlorovodíková (1 mmol.l<sup>-1</sup>)

Roztok byl připraven napipetováním 50 µl HCl (32%) do 500 ml deionizované vody. Vzniklý roztok byl skladován v lednici při 4 °C.

Kyselina metafosforečná (5%)

Roztok byl připraven rozpuštěním 0,5 g MPA v 10 ml deionizované vody. Takto připravený roztok byl skladován v lednici při 4 °C.

Monochlorobiman (240 µmol.l<sup>-1</sup>)

Roztok MCB byl připraven smícháním 30 µl zásobního roztoku MCB (10 mmol.l<sup>-1</sup>, jenž byl skladován v mrazáku při -20 °C), s 1220 µl DPBS (1x). Tento roztok byl připraven čerstvý před každým měřením.

o-ftaldialdehyd (0,1%)

Roztok byl připraven rozpuštěním 0,04 g OPA ve 40 ml metanolu. Takto připravený roztok byl rozpipetován do mikrozkušavek a skladován v mrazáku při -20 °C.

## 4.4 Stanovení glutathionu pomocí o-ftaldialdehydu (OPA)

### 4.4.1 Příprava kalibrační řady standardních roztoků glutathionu

Pro stanovení GSH pomocí metody využívající OPA bylo nutné připravit kalibrační řadu standardních roztoků glutathionu. Zásobní roztok GSH ( $1000 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) byl připraven navážením 0,0307 g GSH a doplněním na objem 100 ml pomocí HCl ( $1 \text{ mmol.l}^{-1}$ ). Následně byla připravena kalibrační řada (0, 5, 20, 50, 100, 200, 500 a  $1000 \mu\text{mol.l}^{-1}$  GSH) pomocí ředění zásobního roztoku GSH, jak je uvedeno v tabulce III. Z každé koncentrace standardu bylo odpipetováno 300  $\mu\text{l}$  do další mikrozkušavky a následně přidáno 600  $\mu\text{l}$  MPA (5%). Po promíchání bylo z každého standardu odpipetováno 50  $\mu\text{l}$  do nové mikrozkušavky. Takto připravená kalibrační řada byla použita ihned pro fluorimetrické stanovení GSH, popřípadě mohla být zamrazena při  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  pro pozdější použití.

**Tab. III:** Příprava kalibrační řady standardních roztoků glutathionu.

$c_{\text{GSH}} (\mu\text{mol.l}^{-1})$	$V_{\text{GSH}} (1000 \mu\text{mol.l}^{-1}; \mu\text{l})$	$V_{\text{HCl}} (1 \text{ mmol.l}^{-1}; \mu\text{l})$
1000	1000	0
500	500	500
200	200	800
100	100	900
50	50	950
20	20	980
5	10	1990
0	0	1000

### 4.4.2 Deproteinace vzorku

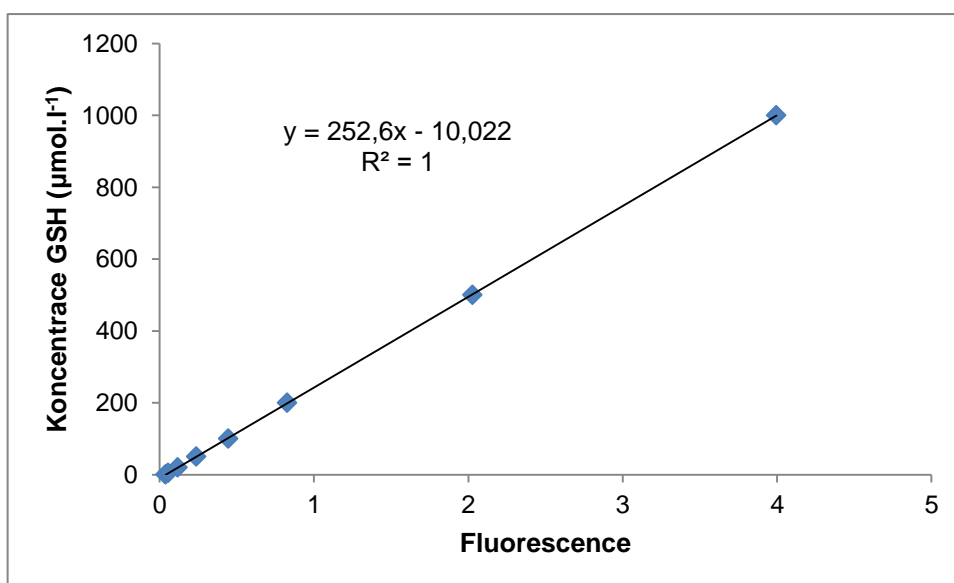
Před vlastním stanovením glutathionu pomocí OPA bylo nutné vzorek nejprve deproteinovat. Pro deproteinaci bylo napipetováno 300  $\mu\text{l}$  vzorku k 600  $\mu\text{l}$  MPA (5%). Vzniklá směs byla promíchána a inkubována 10 minut při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po proběhlé inkubaci byla směs centrifugována 10 minut při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (16 tis. RPM). Po centrifugaci bylo odpipetováno 50  $\mu\text{l}$  supernatantu do nové mikrozkušavky. Tento vzorek byl následně využit pro stanovení glutathionu pomocí OPA.

#### 4.4.3 Postup stanovení glutathionu pomocí OPA

Pro stanovení koncentrace GSH bylo k 50  $\mu\text{l}$  standardů nebo vzorků připipetováno 1000  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru (pH = 8). Po promíchání bylo následně odebráno 60  $\mu\text{l}$  směsi do další mikrozkušavky a připipetováno 900  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru (pH = 8) a 60  $\mu\text{l}$  OPA. Po promíchání byly všechny mikrozkušavky inkubovány 15 minut. Po proběhlé inkubaci bylo připipetováno 75  $\mu\text{l}$  HCl ( $1 \text{ mol.l}^{-1}$ ). Obsah mikrozkušavek byl promíchán a následně byla měřena fluorescence jednotlivých standardů a vzorků na přístroji Aminco Bowman 2. Podmínky stanovení jsou uvedeny v tabulce IV. Koncentrace GSH přítomného ve vzorcích byla vypočtena pomocí rovnice kalibrační přímky. Vzorová rovnice kalibrační přímky je zobrazena v grafu 1.

**Tab. IV:** Podmínky spektrofotometrického stanovení GSH pomocí OPA.

Vlnová délka excitace	335 nm
Vlnová délka emise	420 nm
Celková doba měření	5000 ms



**Graf 1:** Kalibrační přímka pro spektrofotometrické stanovení koncentrace GSH pomocí OPA (lineární v rozsahu 0–1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  GSH).

## 4.5 Stanovení glutathionu pomocí monochlorobimanu (MCB)

Při stanovení GSH pomocí monochlorobimanu bylo ke 100  $\mu\text{l}$  vzorku přítomného v jamce mikrotitrační destičky přidáno 20  $\mu\text{l}$  roztoku MCB. Výsledná koncentrace monochlorobimanu v jamce byla 40  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Následně byla měřena fluorescence na přístroji Tecan Infinite M200. Podmínky stanovení jsou uvedeny v tabulce V. Koncentrace GSH přítomného ve vzorcích byla pomocí směrníc vyjádřena jako procentní podíl koncentrace GSH vztážený ke kontrolám.

*Tab. V: Podmínky spektrofluorimetrického stanovení GSH pomocí MCB.*

Teplota detekce	37 °C
Vlnová délka excitace	394 nm
Vlnová délka emise	490 nm

## 4.6 Stanovení glutathionu v jaterních homogenátech

### 4.6.1 Příprava vzorku pro OPA stanovení

Vzorky jaterních homogenátů byly po rozmrazení použity neředěné a 10x ředěné deionizovanou vodou. Následně byla provedena deproteinace vzorků, jejíž postup byl popsán v kapitole 1.4.2.

### 4.6.2 Příprava vzorku pro MCB stanovení

Stejně vzorky jaterních homogenátů byly využity také pro metodu využívající MCB. Jednotlivé vzorky byly, stejně jako v předchozím případě, použity neředěné a 10x ředěné deionizovanou vodou.

### 4.6.3 Porovnání metod OPA a MCB

Pro porovnání metod bylo hodnoceno deset vzorků myších jaterních homogenátů připravených výše uvedenými způsoby pomocí metod OPA a MCB. Postup stanovení GSH pomocí metody využívající OPA byl popsán v kapitole 1.4.3. Postup stanovení GSH pomocí metody využívající MCB byl popsán v kapitole 1.5.

## **4.7 Stanovení glutathionu v buňkách periferní krve**

### **4.7.1 Stanovení glutathionu pomocí OPA**

#### **4.7.1.1 Příprava vzorku - optimalizace ředění krve**

Nejprve bylo nutné optimalizovat ředění krevního vzorku pro metodu využívající OPA. Krevní vzorek byl naředěn 10x, 20x a 40x pomocí DV. Následně byla provedena deproteinace jednotlivých vzorků (kapitola 1.4.2) a vlastní stanovení pomocí OPA (kapitola 1.4.3).

### **4.7.2 Stanovení glutathionu pomocí MCB**

#### **4.7.2.1 Příprava vzorku - optimalizace ředění krve**

Prvním optimalizovaným parametrem v případě metody využívající MCB byl výběr roztoku vhodného k ředění krve. Krevní vzorek byl naředěn 5x, 20x, 80x a 320x pomocí DV a NaCl (1%). Před vlastním stanovením pomocí MCB (kapitola 1.5) bylo do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky přidáno 20  $\mu\text{l}$  GST (0,05  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

Následně bylo optimalizováno ředění krevního vzorku. Krevní vzorek byl naředěn 5x, 20x, 80x, 120x, 160x, 240x, 320x, 640x, 1280x, 2560x a 5120x pomocí DV. Před vlastním stanovením pomocí MCB (kapitola 1.5) bylo do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky přidáno 20  $\mu\text{l}$  GST (0,05  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

#### **4.7.2.2 Optimalizace aktivity glutathion-S-transferázy a excitační vlnové délky**

Dalším optimalizovaným parametrem byla aktivita GST. Byly hodnoceny tři aktivity GST (0,1; 0,05 a 0,01  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Krevní vzorek byl naředěn 5x, 10x a 20x pomocí NaCl (1%). Před vlastním stanovením pomocí MCB (kapitola 1.5) bylo do odpovídajících jamek mikrotitrační destičky přidáno 20  $\mu\text{l}$  GST dané aktivity.

Při optimalizaci excitační vlnové délky byla hodnocena vlnová délka 394 a 370 nm. Krevní vzorek byl naředěn 160x, 320x, 640x, 1280x, 2560x a 5120x pomocí DV. Před vlastním stanovením pomocí MCB (kapitola 1.5) bylo do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky přidáno 20  $\mu\text{l}$  GST (0,05  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). V takto připravených jamkách byla následně měřena fluorescence při dvou excitačních vlnových délkách (394 a 370 nm), emisní vlnová délka byla 490 nm.

### **4.7.3 Porovnání metod OPA a MCB**

Pro porovnání metod byly hodnoceny koncentrace GSH ve vzorcích periferní lidské krve odebraných do zkumavek s antikoagulačním činidlem EDTA. Po centrifugaci bylo z jednotlivých zkumavek odebráno a přeneseno 100  $\mu$ l krve k 100  $\mu$ l NaCl (1%). Takto připravené vzorky byly v případě metody využívající OPA ředěny 10x deionizovanou vodou, následně byla provedena deproteinace (kapitola 1.4.2) a stanovení pomocí OPA (kapitola 1.4.3). V případě metody využívající MCB bylo šestnáct vzorků ředěno 160x deionizovanou vodou a sedmnáct vzorků 320x deionizovanou vodou. Před vlastním stanovením pomocí MCB (kapitola 1.5) bylo do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky přidáno 20  $\mu$ l GST (0,05 U. $\text{ml}^{-1}$ ).

## **4.8 Stanovení glutathionu v kultivovaných buňkách**

### **4.8.1 Příprava vzorku pro OPA stanovení**

Před stanovením GSH v kultivovaných buňkách A549 a HK-2 bylo ze všech jamek mikrotitrační destičky pomocí multikanálové pipety odebráno 80  $\mu$ l média. Pro deproteinaci bylo do každé jamky napipetováno 40  $\mu$ l MPA (5%) a buňky byly seškrábány. Po proběhlé inkubaci byl lyzát buněk centrifugován 10 minut při 4 °C (16 tis. RPM). Po centrifugaci byl odpipetován vzorek pro vlastní stanovení glutathionu pomocí OPA.

### **4.8.2 Příprava vzorku pro MCB stanovení**

Před vlastním stanovením GSH v kultivovaných buňkách (A549 a HK-2) pomocí metody využívající MCB nebylo nutné provádět žádnou přípravu vzorku.

### **4.8.3 Porovnání metod OPA a MCB**

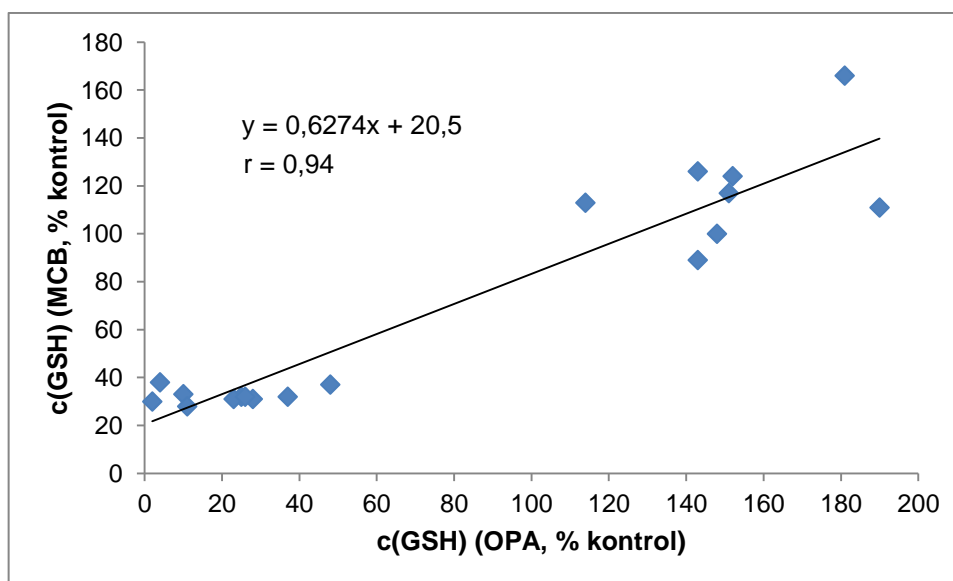
Pro porovnání metod byly hodnoceny koncentrace GSH v buňkách A549 a HK-2. Následující postup stanovení pomocí OPA byl uveden v kapitole 1.4.3. Postup stanovení glutathionu pomocí metody využívající MCB byl popsán v kapitole 1.5.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Stanovení glutathionu v jaterních homogenátech

#### 5.1.1 Porovnání metod OPA a MCB

Nejprve byly stanoveny hladiny GSH ve vzorcích myších jaterních homogenátů. Vzorky neředěné a 10x ředěné deionizovanou vodou byly využity ke stanovení GSH pomocí obou metod – OPA a MCB. Výsledky získané z obou metod byly vyjádřeny jako % kontrol GSH, kdy za kontrolu byl vybrán první vzorek z celé sady jaterních homogenátů. Z výsledků byla vytvořena korelační závislost, která je zobrazena v grafu 2. Korelační koeficient ( $r = 0,94$ ) ukazuje, že korelace mezi výsledky získanými oběma metodami je velmi vysoká. Metody OPA a MCB tedy poskytují odpovídající si koncentrace GSH ve vzorcích myších jaterních homogenátů. Při vlastním zhodnocení absolutně vyjádřených koncentrací GSH lze však pozorovat, že v případě neředěných vzorků jsou koncentrace GSH vyšší u OPA metody. U vzorků ředěných 10x deionizovanou vodou jsou koncentrace GSH podobné u obou metod.



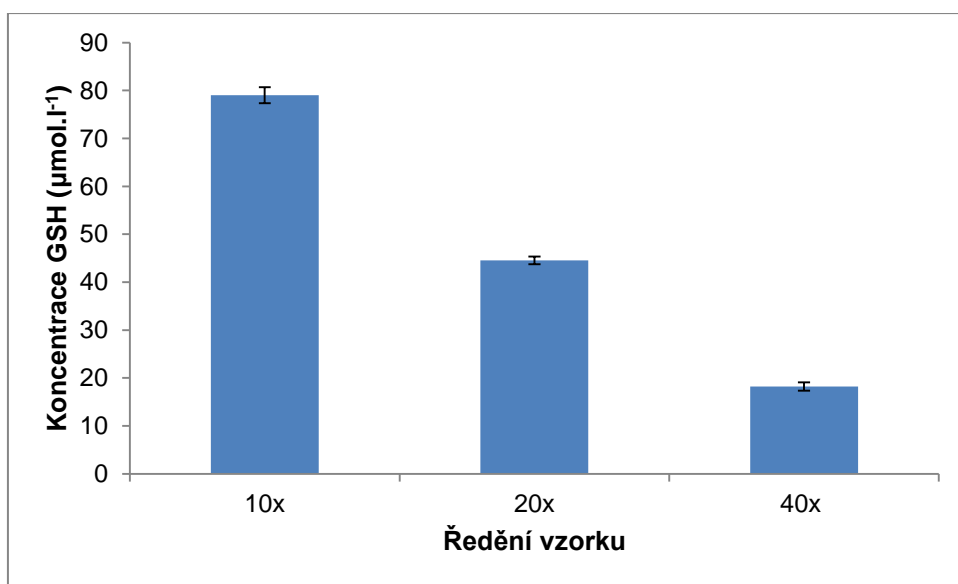
**Graf 2:** Korelace koncentrací GSH měřených pomocí dvou metod (OPA a MCB) ve vzorcích myších jaterních homogenátů ( $n = 18$ ). Hodnoty koncentrací GSH jsou uvedeny v příloze 1.

## 5.2 Stanovení glutathionu v buňkách periferní krve

### 5.2.1 Stanovení glutathionu pomocí OPA

#### 5.2.1.1 Optimalizace ředění krve

Nejprve bylo nutné optimalizovat ředění krve pro metodu využívající OPA. Za tímto účelem byl vzorek krve naředěn 10–40x pomocí DV. Jako vhodné ředění pro následující práci bylo vybráno 10násobné ředění pomocí DV (graf 3) z důvodu docílení optimálního signálu fluorescence při stanovení GSH.



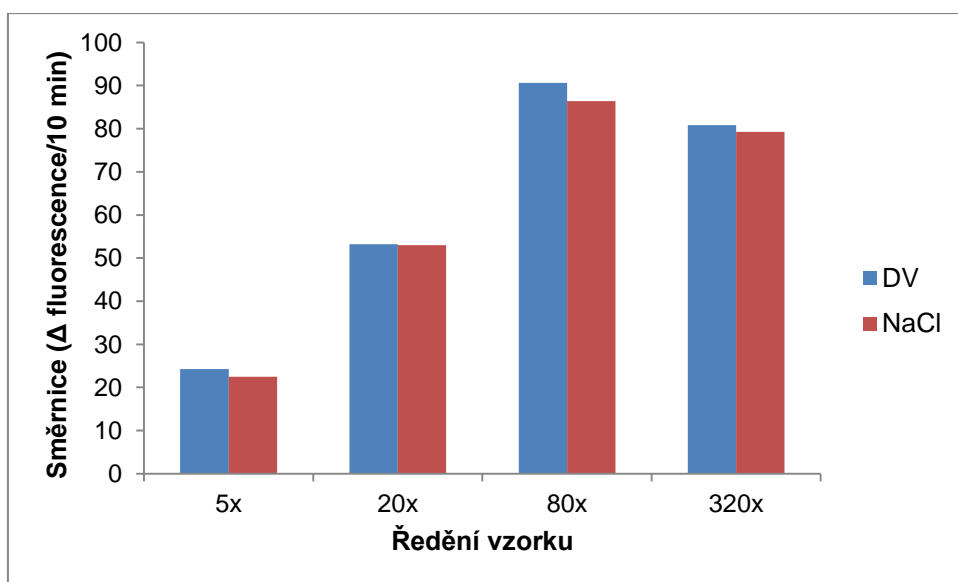
**Graf 3:** *Optimalizace ředění krve pomocí DV – metoda OPA. Příprava vzorků: vzorek naředěn 10x, 20x a 40x DV (průměr ± SD, n = 5). Hodnoty koncentrací GSH jsou uvedeny v příloze 2.*

### 5.2.2 Stanovení glutathionu pomocí MCB

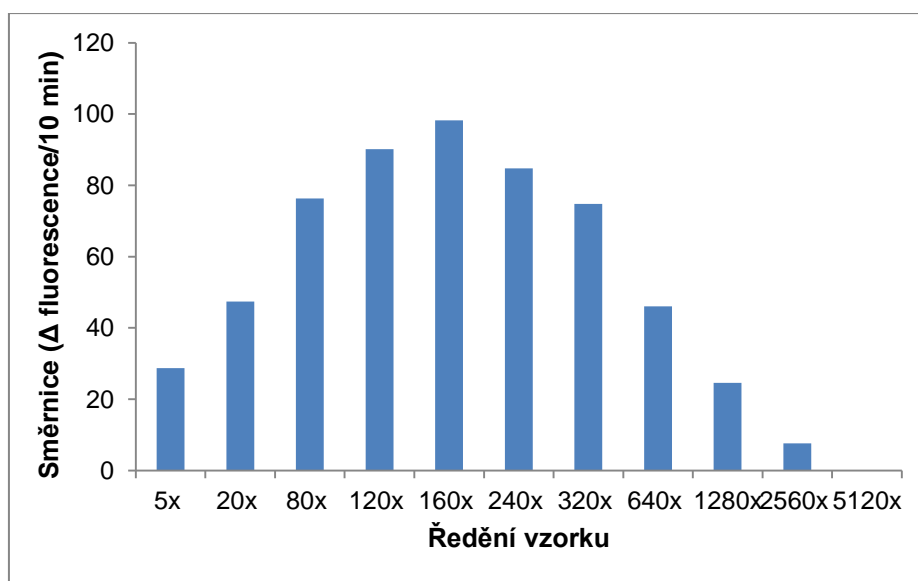
#### 5.2.2.1 Optimalizace ředění krve

V případě metody využívající MCB bylo nejprve nutné vybrat roztok, pomocí něhož byly vzorky krve ředěny. Za tímto účelem byl krevní vzorek naředěn 5–320x pomocí DV a NaCl (1%). Po stanovení hladin GSH v jednotlivých ředěních bylo zjištěno, že ředění vzorku pomocí DV a NaCl (1%) poskytuje prakticky shodné hodnoty GSH (graf 4). Pro následující práci bylo jako optimální zvoleno ředění vzorků deionizovanou vodou z důvodu větší podpory nutné hemolýzy erytrocytů oproti 1% NaCl.

Následně byla optimalizována míra ředění krevního vzorku. Krevní vzorek byl naředěn 5–5120x pomocí DV. Pro následné použití bylo vybráno jako optimální 160x a 320x ředění vzorku DV. 160x ředění bylo zvoleno z důvodu poskytnutí optimálního signálu fluorescence (graf 5). 320x ředění bylo použito z důvodu zajištění správného stanovení GSH v případě výskytu vzorku, jenž by obsahoval mnohem vyšší koncentrace GSH.



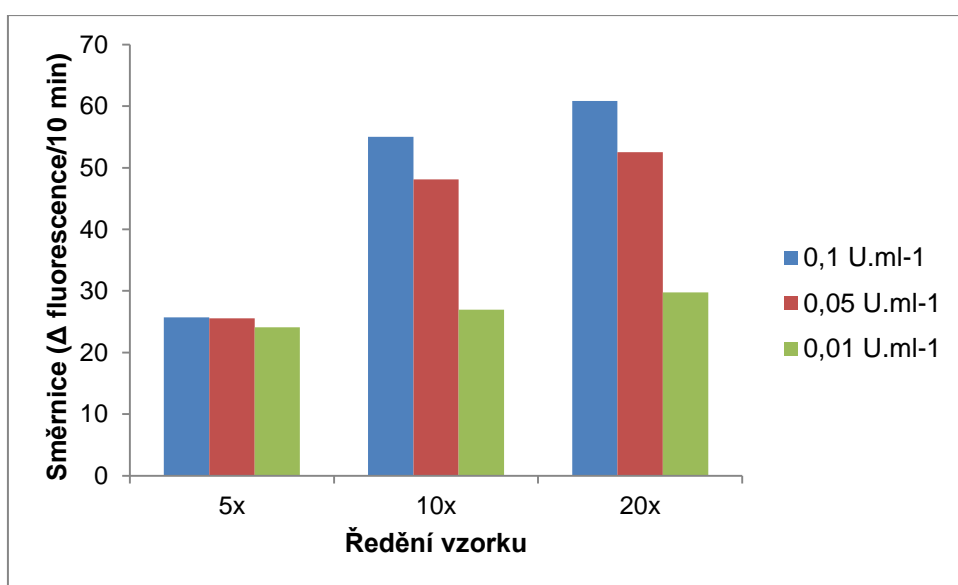
**Graf 4:** Ředění krve pomocí DV a NaCl (1%) – metoda MCB. Hodnoty směrníc jsou uvedeny v příloze 3.



**Graf 5:** Optimalizace ředění krve pomocí DV – metoda MCB. Hodnoty směrníc jsou uvedeny v příloze 4.

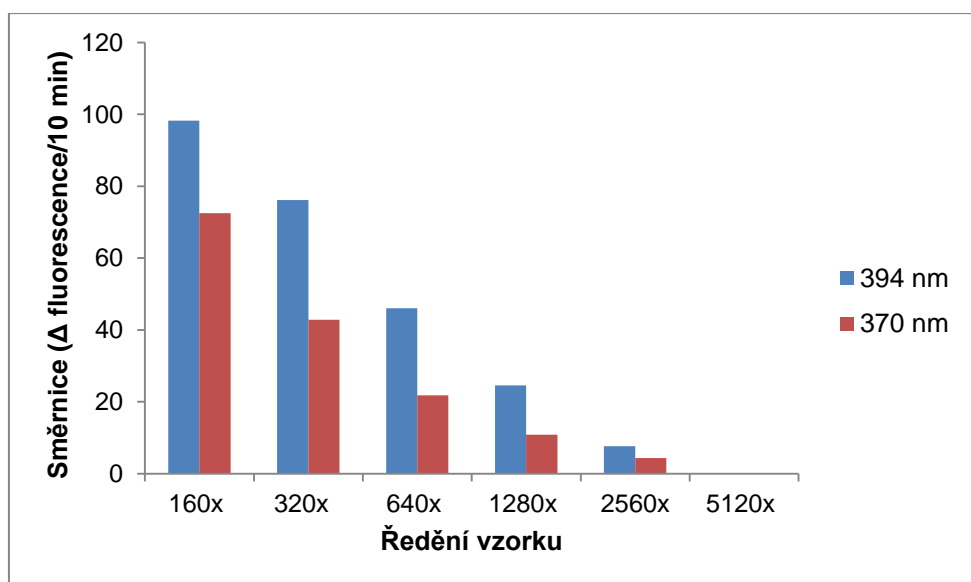
### 5.2.2.2 Optimalizace aktivity glutathion-S-transferázy a excitační vlnové délky

Dalším optimalizovaným parametrem byla aktivita GST. Krevní vzorek byl naředěn 5–20x pomocí NaCl (1%) a testovány byly aktivity 0,1; 0,05 a 0,01 U.ml<sup>-1</sup> GST. Z grafu 6 je patrné, že aktivita 0,01 U.ml<sup>-1</sup> GST není dostačující při zvyšující se koncentraci GSH v krevním vzorku. Při zvyšujícím se ředění krevního vzorku totiž klesá intenzita jeho zabarvení a interference hemoglobinu, který není přítomen v tak vysokých koncentracích. Další dvě zvolené aktivity GST (0,1 a 0,05 U.ml<sup>-1</sup>) poskytovaly srovnatelné výsledky. Z důvodu dostačujících výsledků byla pro následující pokusy jako optimální vybrána aktivita GST 0,05 U.ml<sup>-1</sup>.



**Graf 6:** Optimalizace aktivity GST ve vzorku krve – metoda MCB. Hodnoty směrníc jsou uvedeny v příloze 5.

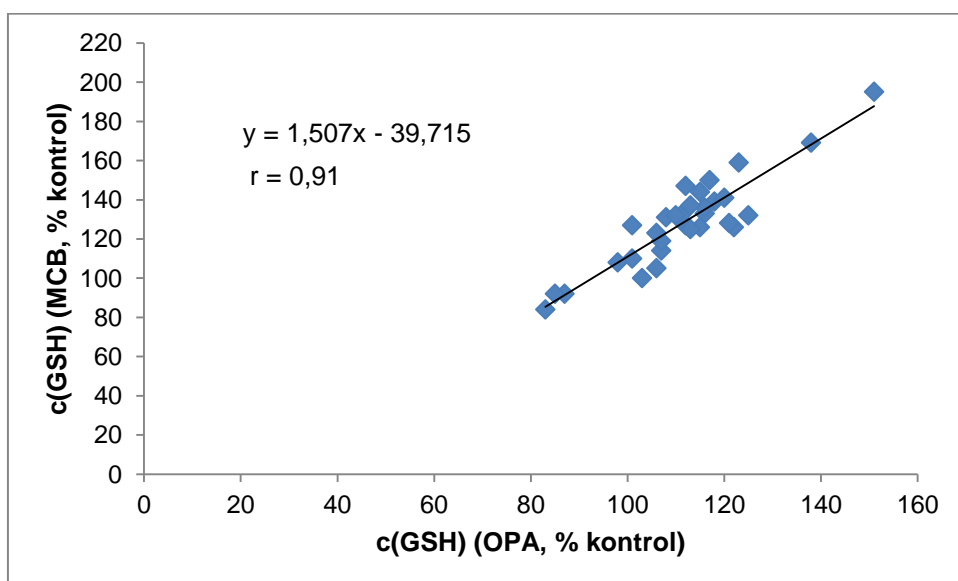
Posledním optimalizovaným parametrem u MCB stanovení byla excitační vlnová délka. Krevní vzorek byl naředěn 160–5120x pomocí DV. Při měření fluorescence byla použita excitační vlnová délka 370 nebo 394 nm. Emisní vlnová délka byla 490 nm. Bylo zjištěno, že excitační vlnová délka 394 nm poskytuje vyšší signál fluorescence (graf 7), tudíž byla využívána i v následující práci.



**Graf 7:** Optimalizace excitační vlnové délky ve vzorku krve – metoda MCB. Hodnoty směrnic jsou uvedeny v příloze 6.

### 5.2.3 Porovnání metod OPA a MCB

Následně byly stanovovány hladiny GSH v neznámých vzorcích lidské periferní krve. Po optimalizaci výše uvedených podmínek stanovení byly hodnoceny hladiny GSH pomocí obou metod. Vzorky stanovované pomocí metody využívající OPA byly ředěny 10x deionizovanou vodou. V případě metody využívající MCB byly vzorky ředěny 160x nebo 320x pomocí deionizované vody. Výsledky získané z obou metod byly vyjádřeny jako % kontrol GSH, přičemž jako kontrola byl využit první vzorek z celé série vyšetřovaných vzorků. Výsledky, které byly získány výše uvedeným způsobem, byly následně využity k vytvoření korelační závislosti, která je zobrazena v grafu 8. Jak ukazuje korelační koeficient ( $r = 0,91$ ), výsledky získané pomocí optimalizované metody využívající MCB a OPA ve vzorcích lidské periferní krve velmi dobře korelují. Absolutně vyjádřené koncentrace GSH jsou ve většině případů vyšší u MCB metody, což potvrzuje i rovnice přímky v uvedeném grafu.

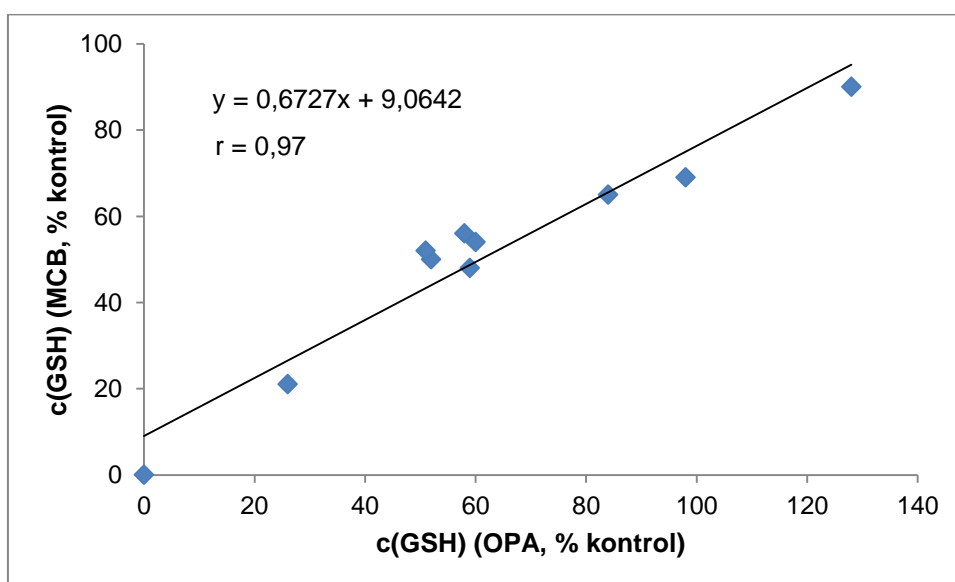


**Graf 8:** Korelace koncentrací GSH měřených pomocí dvou metod (OPA a MCB) ve vzorcích lidské periferní krve ( $n = 31$ ). Hodnoty koncentrací GSH jsou uvedeny v příloze 7.

## 5.3 Stanovení glutathionu v kultivovaných buňkách

### 5.3.1 Porovnání metod OPA a MCB

Poslední částí naší práce bylo stanovení hladin GSH v kultivovaných buňkách. Pomocí dvou metod (OPA a MCB) byly stanoveny hladiny GSH v lidských plicních adenokarcinomových buňkách (A549) a lidských ledvinných buňkách (HK-2). Získané výsledky byly vyjádřeny jako % kontrol GSH, kdy za kontrolu byl vybrán, stejně jako v předchozích případech, první vyšetřovaný vzorek. Z výsledků byla vytvořena korelační závislost, která je zobrazena v grafu 9. Jak je z tohoto grafu patrné, korelační koeficient je velmi vysoký ( $r = 0,97$ ), tudíž metody OPA a MCB poskytují srovnatelné výsledky také v námi použitých buňkách. Absolutně vyjádřené koncentrace GSH jsou v tomto případě vyšší u OPA metody, jak potvrzuje i uvedená rovnice přímky.



**Graf 9:** Korelace koncentrací GSH měřených pomocí dvou metod (OPA a MCB) v buněčných kulturách A549 a HK-2 ( $n = 10$ ). Hodnoty koncentrací GSH jsou uvedeny v příloze 8.

## 6 DISKUZE

Glutathion je hlavní intracelulární nebílkovinný thiol, který se vyskytuje u savců, rostlin, hub a některých prokaryotických organismů. Tento tripeptid je přítomen ve všech buňkách lidského těla v koncentracích v řádech  $\text{mmol.l}^{-1}$ . Největší syntéza GSH probíhá v játrech, kde může být v přítomnosti koncentracích až  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Vysoké hladiny jsou nalézány také například v ledvinách, slezině, erythrocytech či leukocytech. GSH je pro fungování buněk zcela nepostradatelný, jelikož vykonává mnoho důležitých funkcí. Jedná se o významný antioxidant, jehož funkcí je také udržování thiolového stavu proteinů, detoxikace xenobiotik, regenerace vitaminů A a C, regulace buněčného cyklu i apoptózy a v neposlední řadě působí jako zásobní forma cysteinu. Do dnešního dne byla vyvinuta široká škála spektrofotometrických, spektrofluorimetrických, elektrochemických, chemiluminiscenčních a separačních metod, které se využívají ke stanovení koncentrace GSH v nejrůznějších druzích biologického materiálu [18, 28, 34].

V naší práci byly využity dvě zavedené spektrofluorimetrické metody (OPA a MCB) ke stanovení glutathionu v jaterních homogenátech, buňkách periferní krve a kultivovaných buňkách. Cílem bylo zjistit, zda tyto metody poskytují srovnatelné výsledky při použití v uvedených biologických materiálech. Fluorimetrické stanovení GSH pomocí OPA je v současné době velmi často využíváno díky jeho vysoké citlivosti a specifitě. V případě této metody se díky derivatizaci s OPA vyskytuje pouze relativně nízká či žádná interference. Použitá MCB metoda je rychlá a jednoduchá. V porovnání s OPA metodou je velkou výhodou schopnost MCB pronikat přes buněčné membrány a reagovat specificky s GSH uvnitř intaktních buněk [38, 43, 47].

Nejprve byly námi stanoveny koncentrace GSH ve vzorcích myších jaterních homogenátů. Hissin a Hilf modifikovali stanovení původně popsané Cohnem a Lylem a využili jej ke stanovení koncentrace GSH v jaterních homogenátech [42, 43]. V literatuře je možné nalézt srovnání OPA a enzymatické GSH-recyklační metody [56], případně MCB a HPLC metody [47] ve vzorcích jaterních homogenátů. Prozatím však nebyla publikována práce srovnávající metody OPA a MCB při stanovení GSH v jaterních homogenátech. Z našich výsledků vyplývá, že korelace mezi oběma použitými metodami je

velmi vysoká ( $r = 0,94$ ). Při zhodnocení absolutně vyjádřených koncentrací GSH lze však pozorovat, že v případě neřaděných homogenátů jsou koncentrace GSH vyšší u OPA metody. Tyto výsledky byly pravděpodobně způsobeny nepřítomností dodatečně přidané GST u MCB metody, ačkoliv vzorky homogenátů jater zbytkovou aktivitu GST obsahovaly. V případě větší aktivity tohoto enzymu by byla pravděpodobně katalyzována rychlejší a specifická reakce mezi MCB a přítomným GSH, která by zapříčinila naměření vyšších absolutně vyjádřených koncentrací GSH právě u MCB metody. Jak je také obecně známo, GSH velmi snadno podléhá oxidaci při alkalickém pH, proto je vhodné udržovat pH v kyselé oblasti [35, 47]. Z tohoto důvodu bylo usouzeno, že další možnou příčinou získání těchto výsledků mohlo být zabránění oxidace GSH díky okyselení vzorků u OPA metody. V literatuře bývá uváděno použití různých druhů činidel zabraňujících oxidaci GSH. Jako příklad lze uvést dithioerythritol, dithiothreitol či 2-merkapt ethanol [35]. Během naší práce však žádné z těchto činidel využito nebylo a z tohoto důvodu nelze zhodnotit jejich účinnost. Při zhodnocení vzorků homogenátů řaděných 10x deionizovanou jsou koncentrace GSH srovnatelné u obou metod, případně vyšší u MCB metody. Vliv na tyto nejednoznačné výsledky mohlo mít tedy i naředění vzorků deionizovanou vodou.

V následující části diplomové práce byly hodnoceny koncentrace GSH v lidské periferní krvi. Jak již bylo uvedeno, játra jsou primárním orgánem syntézy GSH *de novo* a jsou zodpovědné za přísun 90 % cirkulujícího GSH. Nicméně kosterní svaly a erythrocyty také spolupracují s udržováním hladiny GSH. V lidské krvi je většina GSH lokalizována uvnitř erythrocytů (intracelulární koncentrace je  $3 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) jelikož leukocyty, které obsahují  $2\text{--}4 \text{ mmol.l}^{-1}$  GSH, jsou přítomny ve srovnání s erythrocyty v menším počtu. Některé publikace uvádějí, že erythrocyty se podílejí až na 10 % celkové syntézy GSH [57]. V současné době neexistuje standardní metoda pro stanovení GSH v erythrocytech, nicméně někteří autoři, jako například Garcia *et al.* a Kandžár *et al.* využili ke kvantifikaci GSH v lidských erythrocytech HLPC metodu [49, 58]. Vedle toho Raththagala *et al.* hodnotili koncentraci GSH v králičích erythrocytech s využitím MCB při spektrofotometrickém stanovení [59].

Při použití OPA metody bylo nejprve optimalizováno ředění krevního vzorku. Správné naředění krevního vzorku bylo velice důležité, neboť

v neřaděném vzorku by díky vysoké koncentraci hemoglobinu nemohl být obsah GSH správně stanoven. Jako optimální bylo v případě OPA metody vybráno 10násobné ředění deionizovanou vodou díky docílení optimálního signálu fluorescence. Následně byly optimalizovány podmínky stanovení pro MCB metodu. Důležitým zjištěním u MCB metody bylo, že při stanovení GSH v erythrocytech musí být dodatečně přítomna GST. Toto zjištění se shoduje s prací Raththagala *et al.*, kteří rovněž GST ke vzorkům přidávali [59]. Ředění vzorku bylo v případě MCB metody provedeno deionizovanou vodou z důvodu zajištění nutné hemolýzy erythrocytů přítomných ve vzorku. Při vlastním výběru vhodného ředění krevního vzorku byla jako vhodná zvolena dvě různá ředění. Jako ideální bylo z důvodu poskytnutí optimálního signálu fluorescence identifikováno 160x ředění pomocí DV. Pokud by se však vyskytl vzorek, obsahující mnohem vyšší koncentrace GSH v porovnání s ostatními vzorky, nemusela by být jeho koncentrace GSH správně stanovena, a proto z tohoto důvodu bylo v dalších experimentech využito vyšší ředění krevního vzorku pomocí DV, a to 320x.

Dalším důležitým optimalizovaným parametrem byla aktivita GST. V rámci našich experimentů byly hodnoceny tři vybrané aktivity GST. Aktivity 0,1 a 0,05 U.ml<sup>-1</sup> poskytovaly srovnatelné výsledky, nicméně nejnižší testovaná aktivita GST (0,01 U.ml<sup>-1</sup>) neposkytovala dostatečné výsledky při zvyšujícím se ředění krevního vzorku a proto byla vyloučena jako první. Následně bylo vybíráno mezi aktivitami 0,1 a 0,05 U.ml<sup>-1</sup>. Ačkoliv v práci autorů Raththagala *et al.* byla využívána opravdu vysoká aktivita GST – 50 U.ml<sup>-1</sup> [59], pro naši další práci byla za optimální, z důvodu z dostačujících výsledků, vybrána aktivita 0,05 U.ml<sup>-1</sup>. Posledním optimalizovaným parametrem v rámci MCB metody byla excitační vlnová délka. Raththagala *et al.* ve své práci uvedli, že při použití excitační vlnové délky 390 nm může docházet k interferenci s hemoglobinem z důvodu jeho vysokého molárního extinkčního koeficientu. Snížením excitační vlnové délky z 390 na 370 nm by měla být absorbance hemoglobinu výrazně snížena při zachování dostatečné excitace i emise MCB [59]. Z našich výsledků ale vyplývá, že excitační vlnová délka 394 nm poskytuje dostatečný a specifický signál fluorescence, a proto byla využívána i v následující práci.

Po optimalizaci výše uvedených parametrů byly stanoveny hladiny GSH v buňkách lidské periferní krve s využitím metod OPA a MCB. Naše výsledky

ukazují, že tyto metody mezi sebou velmi dobře korelovaly ( $r = 0,91$ ). Při zhodnocení absolutně vyjádřených koncentrací GSH se ve většině případů nacházejí vyšší hodnoty u MCB metody. Tyto výsledky byly způsobeny námi přidanou GST o aktivitě  $0,05 \text{ U.ml}^{-1}$ , která katalyzovala rychlou a specifickou reakci MCB s přítomným GSH [37, 45, 60].

V poslední části naší práce byly hodnoceny hladiny GSH v kultivovaných buňkách. V rámci experimentů byly využity lidské plicní adenokarcinomové buňky (A549) a lidské ledvinné buňky (HK-2) [61, 62]. V těchto buňkách, které byly ošetřeny po dobu 24 hodin diethylmalonátem či cisplatinou, byly následně stanoveny koncentrace GSH pomocí obou metod. Bylo zjištěno, že korelační koeficient je velmi vysoký ( $r = 0,97$ ), tudíž metody OPA a MCB poskytují srovnatelné výsledky. Toto zjištění potvrzuje výsledky autorů Čapek *et al.*, kteří porovnávali metody OPA a MCB při stanovení GSH ve stejných typech buněk [46]. Absolutně vyjádřené koncentrace GSH jsou v tomto případě vyšší u OPA metody. Tyto výsledky byly pravděpodobně zapříčiněny tím, že u stanovení GSH pomocí MCB nebyla opět použita GST, která by zajistila dostatečnou reakci MCB s GSH [63].

## 7 ZÁVĚR

Během naší práce byly využity dvě zavedené spektrofluorimetrické metody (OPA a MCB) ke stanovení hladin GSH v myších jaterních homogenátech, buňkách lidské periferní krve a kultivovaných buňkách A549 a HK-2. Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit korelaci výsledků získaných z obou použitých metod ve vybraných druzích biologického materiálu.

Ačkoliv muselo být v průběhu naší práce optimalizováno několik parametrů, zejména u MCB stanovení glutathionu ve vzorcích lidské periferní krve, je možné závěrem říci, že bylo dosaženo velice podobných výsledků. Všechny námi získané korelační koeficienty se pohybovaly v rozmezí 0,91–0,97, což vypovídá o velmi silné korelaci získaných výsledků. Mírné rozdíly absolutně vyjádřených koncentrací GSH byly nejspíše způsobeny dodatečně přidanou GST, která katalyzuje probíhající reakci mezi MCB a GSH. Jelikož byl tedy tento enzym po přidání přítomen ve vyšetřovaných vzorcích periferní krve, byly nalezeny absolutně vyjádřené koncentrace GSH vyšší u MCB metody. Naopak v případě jaterních homogenátů a kultivovaných buněk byly nalezeny absolutně vyjádřené koncentrace GSH nižší u MCB metody, z důvodu nepřítomnosti tohoto enzymu.

Stanovení GSH pomocí OPA je v současnosti velice často využíváno díky jeho vysoké citlivosti a specifitě, v porovnání s MCB metodou se však jedná o pracnější a časově náročnější metodu. MCB metoda vyniká schopností monochlorobimanu pronikat přes cytoplazmatické membrány buněk, čímž umožňuje stanovit obsah GSH uvnitř intaktních buněk. V naší práci však bylo prokázáno, že výsledky získané MCB metodou mohou být ovlivněny přítomností GST ve vyšetřovaném materiálu. Dalším významným faktorem ovlivňujícím hladiny přítomného GSH může být přítomnost GGT, která katalyzuje degradaci extracelulárního GSH. Nelze však opomíjet ani autooxidaci GSH spojenou s přípravou vzorku, která může významně snížit hladiny přítomného GSH. Z tohoto důvodu je vhodné brát v potaz doporučení udržovat pH v kyselé oblasti, či využít vhodná redukční činidla, která by případné oxidaci GSH zabránila.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **Carocho M., Ferreira I. C.:** *A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives.* Food and Chemical Toxicology, 2013, 51, 15 - 25.
2. **Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D. et al.:** *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39, 44 - 84.
3. **Radomska-Leśniewska D. M., Hevelke A., Skopiński P., Bała B. et al.:** *Reactive oxygen species and synthetic antioxidants as angiogenesis modulators: Clinical implications.* Pharmacological Reports, 2016, 68, 462 - 471.
4. **Rao S. P., Kalva S., Yerramilli A., Mamidi S.:** *Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants.* Free Radicals and Antioxidants, 2011, 1, 2 - 7.
5. **Kohen R., Nyska A.:** *Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification.* Toxicologic Pathology, 2002, 30, 620 - 650.
6. **Štípek S. a kol.:** *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci.* Grada Publishing, 2000, 76 - 83, 253 - 265, ISBN 80 - 7169 - 704 - 4.
7. **Tarpey M. M., Wink D. A., Grisham M. B.:** *Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations.* American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2004, 286, 431 - 444.
8. **Halliwell B., Whiteman M.:** *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean.* British Journal of Pharmacology, 2004, 142, 231 - 155.
9. **Pavelescu L. A.:** *On reactive oxygen species measurement in living systems.* Journal of Medicine and Life, 2015, 8, 38 - 42.

10. **Majewski W., Krzyminiewski R., Stanisic M., Iskra M. et al.:** *Measurement of Free Radicals Using Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy During Open Aorto-Iliac Arterial Reconstruction.* Medical Science Monitor, 2014, 20, 2453 - 2460.
11. **Jackson M. J.:** *An overview of methods for assessment of free radical activity in biology.* Proceedings of the Nutrition Society, 1999, 58, 1001 - 1006.
12. **Marnett L. J.:** *Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde.* Mutation Research, 1999, 424, 83 - 95.
13. **Czerska M., Mikołajewska K., Zielinski M., Gromadzinska J. et al.:** *Today's oxidative stress markers.* Medycyna Pracy, 2015, 66, 393 - 405.
14. **Thanan R., Oikawa S., Hiraku Y., Ohnishi S. et al.:** *Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer.* International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16, 193 - 217.
15. **Aruoma O. I.:** *Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease.* Journal of the American Oil Chemists' Society, 1998, 75, 199 - 212.
16. **Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J.:** *Biochemie pro studující medicíny I. díl.* Karolinum, 2004, 83, 238, ISBN 80 - 246 - 0849 - 9.
17. **Lushchak V. I.:** *Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Intervention.* Journal of Amino Acids, 2012, 2012, 1 - 26.
18. **Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F.:** *Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification.* Clinica Chimica Acta, 2003, 333, 19 - 39.
19. **Monostori P., Wittmann G., Karg E., Túri S.:** *Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review.* Journal of Chromatography B, 2009, 877, 3331 - 3346.
20. **Forman H. J., Zhang H., Rinna A.:** *Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis.* Molecular Aspects of Medicine, 2009, 30, 1 - 12.
21. **Kalinina E. V., Chernov N. N., Novichkova M. D.:** *Role of Glutathione, Glutathione Transferase, and Glutaredoxin in Regulation of Redox - Dependent Processes.* Biochemistry, 2014, 79, 1562 - 1583.

22. **Bains V. K., Bains R.:** *The antioxidant master glutathione and periodontal health.* Dental Research Journal, 2015, 12, 389 - 405.
23. **Rae C. D., Williams S. R.:** *Glutathione in the human brain: Review of its roles and measurement by magnetic resonance spectroscopy.* Analytical Biochemistry, 2017, 529, 127 - 143.
24. **Franklin Ch. C., Backos D. S., Mohar I., White C. C. et al.:** *Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase.* Molecular Aspects of Medicine, 2009, 30, 86 - 98.
25. **Lu S. C.:** *Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies.* Faseb Journal, 1999, 13, 1169 - 1183.
26. **Wang W., Ballattori N.:** *Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions.* Pharmacological Reviews, 1998, 50, 335 - 355.
27. **Lu S. C.:** *Regulation of glutathione synthesis.* Molecular Aspects of Medicine, 2009, 30, 42 - 59.
28. **Nýdlová E., Vrbová M., Roušar T.:** *Glutathion a jeho enzymový systém.* Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2014, 17, 202 - 208.
29. **Backos D. S., Franklin C. C., Reigan P.:** *The role of glutathione in brain tumor drug resistance.* Biochemical Pharmacology, 2012, 83, 1005 - 1012.
30. **Forman H. J., Zhang H., Rinna A.:** *Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis.* Molecular Aspects of Medicine, 2009, 30, 1 - 12.
31. **Kotlářová L. a kol.:** *Glutathion známý, neznámý.* Biotherapeutics, 2013, 3, 32 - 35.
32. **Dringen R.:** *Metabolism and functions of glutathione in brain.* Progress in Neurobiology, 2000, 62, 649 - 671.
33. **Greetham D., Vickerstaff J., Shenton D., Perrone G. G. et al.:** *Thioredoxins function as deglutathionylase enzymes in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* BMC Biochemistry, 2010, 11, 1 - 10.
34. **Kand'ár R.:** *Stanovení glutathionu a glutathiondisulfidu v biologických vzorcích.* Chemické listy, 2016, 110, 754 - 760.

35. **Camera E., Picardo M.:** *Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes.* Journal of Chromatography B, 2002, 781, 181 - 206.
36. **Błońska-Sikora E., Oszczudłowski J., Witkiewicz Z., Widel D. et al.:** *Glutathione: methods of sample preparation for chromatography and capillary electrophoresis.* CHEMIK, 2012, 66, 929 - 942.
37. **Stevenson D., Wokosin D., Girkin J., Grant M. H.:** *Measurement of the intracellular distribution of reduced glutathione in cultured rat hepatocytes using monochlorobimane and confocal laser scanning microscopy.* Toxicology in Vitro, 2002, 16, 609 - 619.
38. **Roušar T., Červinková Z., Mužáková V., Kučera O. a kol.:** *Glutathion a metody stanovení.* Acta Medica Supplementum, 2005, 48, 15 - 20.
39. **Owens C. W. I., Belcher R. V.:** *A Colorimetric Micro-Method for the Determination of Glutathione.* The Biochemical Journal, 1965, 94, 705 - 711.
40. **Tietze F.:** *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues.* Analytical Biochemistry, 1969, 27, 502 - 522.
41. **Giustarini D., Tsikas D., Colombo G., Milzani A. et al.:** *Pitfalls in the analysis of the physiological antioxidant glutathione (GSH) and its disulfide (GSSG) in biological samples: An elephant in the room.* Journal of Chromatography B, 2016, 1019, 21 - 28.
42. **Cohn V. H., Lyle J.:** *A fluorometric assay for glutathione.* Analytical Biochemistry, 1966, 14, 434 - 440.
43. **Hissin P. J., Hilf R.:** *A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues.* Analytical Biochemistry, 1976, 74, 214 - 226.
44. **Michaelsen T. J., Dehnert S., Giustarini D., Beckmann B. et al.:** *HPLC analysis of human erythrocytic glutathione forms using OPA and N-acetyl-cysteine ethyl ester: Evidence for nitrite-induced GSH oxidation to GSSG.* Journal of Chromatography B, 2009, 877, 3405 - 3417.
45. **Yakubu S. I., Yakasai I. A., Musa A.:** *Spectrofluorimetric assay method for glutathione and glutathione transferase using monobromobimane.* Journal of Basic and Clinical Pharmacy, 2011, 2, 151 - 158.

46. **Čapek J., Hauschke M., Brůčková L., Roušar T.:** *Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells.* Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2017, 88, 40 - 45.
47. **Kamencic H., Lyon A., Paterson P. G., Juurlink B. H. J.:** *Monochlorobimane Fluorometric Method to Measure Tissue Glutathione.* Analytical Biochemistry, 2000, 286, 35 - 37.
48. **Yoshida T.:** *Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection.* Journal of Chromatography B, 1996, 678, 157 - 164.
49. **Kand'ár R., Žáková P., Lotková H., Kučera O. a kol.:** *Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 43, 1382 - 1387.
50. **Hinze W. L., Riehl T. E., Singh H. N., Baba Y.:** *Micelle-Enhanced Chemiluminescence and Application to the Determination of Biological Reductants Using Lucigenin.* Analytical Chemistry, 1984, 56, 2180 - 2191.
51. **Romero F. J., Mueller-Klieser W.:** *Semiquantitative Bioluminescent Assay of Glutathione.* Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, 1998, 13, 263 - 266.
52. **Russell J., Rabenstein D. L.:** *Speciation and Quantitation of Underivatized and Ellman's Derivatized Biological Thiols and Disulfides by Capillary Electrophoresis.* Analytical Biochemistry, 1996, 242, 136 - 144.
53. **Safavi A., Maleki N., Farjami E., Mahyari F. A.:** *Simultaneous Electrochemical Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide at a Nanoscale Copper Hydroxide Composite Carbon Ionic Liquid Electrode.* Analytical Chemistry, 2009, 81, 7538 - 7543.
54. **Kizek R., Vacek J., Trnková L., Jelen F.:** *Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris(2-carboxyethyl)phosphine.* Bioelectrochemistry, 2004, 63, 19 - 24.

55. **Inoue T., Kirchhoff J. R.:** *Electrochemical Detection of Thiols with a Coenzyme Pyrroloquinoline Quinone Modified Electrode.* Analytical Chemistry, 2000, 72, 5755 - 5760.
56. **Roušar T., Kučera O., Lotková H., Červinková Z.:** *Assessment of reduced glutathione: Comparison of an optimized fluorometric assay with enzymatic recycling method.* Analytical Biochemistry, 2012, 423, 236 - 240.
57. **Giustarini D., Colombo G., Garavaglia M. L., Astori E. et al.:** *Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells.* Free Radical Biology and Medicine, 2017, 112, 360 - 375.
58. **Garcia S. C., Schott K., Charao M., Moro A. et al.:** *Quantification of reduced glutathione by HPLC-UV in erythrocytes of hemodialysis patients.* Biomedical Chromatography, 2008, 22, 460 - 468.
59. **Raththagala M., Root P. D., Spence D. M.:** *Dynamic Monitoring of Glutathione in Erythrocytes, without a Separation Step, in the Presence of an Oxidant Insult.* Analytical Chemistry, 2006, 78, 8556 - 8560.
60. **Cook J. A., Iype S. N., Mitchell J. B.:** *Differential Specificity of Monochlorobimane for Isozymes of Human and Rodent Glutathione S-Transferases.* Cancer Research, 1991, 51, 1606 - 1612.
61. **Foster K. A., Oster Ch. G., Mayer M. M., Avery M. L.:** *Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism.* Experimental Cell Research, 1998, 243, 359 - 366.
62. **Ryan M. J., Johnson G., Kirk J., Fuerstenberg S. M. et al.:** *HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney.* Kidney International, 1994, 45, 48 - 57.
63. **Anderson M. E.:** *Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples.* Methods in enzymology, 1985, 113, 548 - 555.