

DEVELOPMENT OF METHODIC OF TOTAL GLUTATHIONE AMOUNT DETERMINATION

VÝVOJ METODIKY PRO STANOVENÍ CELKOVÉHO GLUTATHIONU

Komínková M.¹, Zítka O.^{1, 3}, Merlos Rodrigo M.A.³, Zehnálek J.³, Havel L.², Adam V.^{1, 3}, Kizek R.^{1, 3}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

³Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: kominkova.marketa@gmail.com

ABSTRACT

Glutathione plays important role in biochemical processes associated with oxidative stress in bacterial, plant and animals cells. Glutathione is occurring in the reduced (GSH) and oxidized form (GSSG) in the organism. The ratio between GSH and GSSG is considered as a marker of oxidative stress. During the sample preparation the destabilization of the GSH and GSSG forms is occurring which might be a problem for subsequent analysis. Aim of this study was the optimization and of quantitative reduction GSSG to GSH for HPLC-ED determination using tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The efficiency of reduction of GSSG was analyzed using high pressure liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED). For GSH and GSSG determination we used gradient elution with methanol on reversed-phase column and coulometric detection. Limit of detection for GSH and GSSG was determined as 30 nM and 200 nM respectively. For qualitative reduction of GSSG to GSH we optimized the concentration of reducing agent (1, 2, 4, 6 mM), time of reaction (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60 minutes) and pH range of tested buffers (Britton-Robinson, Borate buffer, Phosphate buffer and Acetate buffer). The influence of addition of EDTA was also tested. We determined the optimal condition of the reducing reaction as 2 mM TCEP in Borate buffer (pH 9) and reaction time 15 minutes. No influence of EDTA addition on the reducing reaction was observed. The usage of the method was estimated for concentration range 60 nM – 200 µM of GSSG.

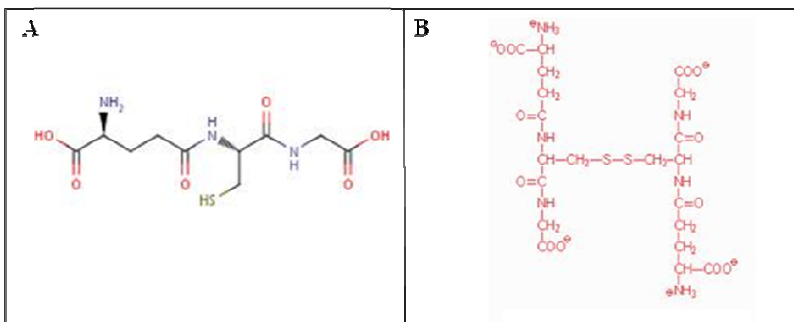
Key words: Total GSH determination; Oxidized glutathione (GSSG); Tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP); ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA);

Acknowledgments: This work was supported by project NanoBioTECell GA ČR P102/11/1068, IGA TP6/2012, and CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068.

ÚVOD

Glutathion je ve většině organismů vyskytující se tripeptid, který byl objeven v roce 1921 F. G. Hopkinsem (Hopkins, 1921). Jeho systematickým názvem je L- γ -glutamyl-L-cysteinyglycine. Ve své molekule obsahuje –SH skupinu, která je velice reaktivní (Kizek, a kol., 2004). V živých organismech se vyskytuje v redukované (GSH) a oxidované formě (GSSG) (Obr.1) (Meister a Anderson, 1983).

Obr. 1 Strukturální vzorec (A) redukovaného a (B) oxidovaného glutathionu.



Při působení stresových faktorů dojde k celkové buněčné odpovědi. (Cullinan, a kol., 2003) Důsledkem této aktivace stresovým faktorem dojde ke snížení syntézy bílkovin a zvýšení syntézy glutathionu. Ten má hlavní roli pro umožnění tvorby přirozených disulfidových vazeb, ale také vyrovnává redoxní reakce, a tím chrání buňky před oxidativním stresem. Je tedy považován za jeho marker oxidativního stresu (Chakravarthi, a kol., 2006). Pro kvantifikaci thiolových sloučenin je nezbytná efektivní redukce disulfidických vazeb (Hansen, a kol., 2007). Mezi v současné době nejpoužívanější redukční činidla se řadí ditiotritol (DTT) (Han a Han, 1994), sodium borohydrid (Hansen, a kol., 2007) a zejména tris-(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP). TCEP je činidlo redukující –SH skupiny (Visser, a kol., 2004) a jako takové má pro tento účel mnoho výhod. Jeho redukční vlastnosti lze využít pro vzorky v širokém rozmezí pH, a to od 1,5 do 11,1 pH. Je vysoce rozpustný ve vodných roztocích, netěkavý a vykazuje lepší reprodukovatelnost než další podobná redukční činidla patřící do této skupiny (Krijt, a kol., 2001), jako jsou tributylfosfin (TBP) a trifenyfosfin (TPP) (Alwael, a kol., 2010). Pro stabilizaci tiolových sloučenin a tím pádem kvantitativní detekci se také využívá přídavek kyseliny etylendiamintetraoctové (EDTA) v různých koncentracích (Guo, a kol., 2009, Visser, a kol., 2004). Jedná se o polyaminokarboxylovou kyselinu obsahující čtyři

karboxylové skupiny a dvě aminoskupiny. Vyznačuje se chelatačními vlastnostmi, kdy sice ionty kovů zůstávají v roztoku, ale vykazují nižší reaktivitu (Banfi, a kol., 2007) a tudíž je potlačeno přispění kovů ke katalýze oxidace GSH na GSSG. Tato práce je zaměřena na optimalizaci redukce GSSG na GSH za použití redukčního činidla TCEP a chelatačního činidla EDTA. Pro stanovení celkového glutathionu byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Standard oxidovaného a redukováného glutathionu, cystein i standardy redukčních činidel byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Standardy fytochelatinů (PC₂, PC₃, PC₄ a PC₅) byly zakoupeny od firmy Clonestar (Brno, Česká republika) K přípravě standardních roztoků byla použita voda ACS čistoty (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Při přípravě pufrů byly pH hodnoty měřeny pomocí přístroje InoLab pH 730 WTW (Weilheim, Germany).

Podmínky HPLC-ED analýzy

HPLC-ED systém byl složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA) (pracovní rozsah 0,001-9,999 ml min⁻¹) a chromatografické kolony s reverzní fází Zorbax eclipse AAA C18 (150 × 4.6; 3,5 μm velikost částic, Agilent Technologies, USA) a dvanácti-kanálového CoulArray elektrochemického detektoru (Model 5600A, ESA, USA). Detektor je složen ze dvou průtočných analytických komůrek (Model 6210, ESA, USA). Každá komůrka obsahuje čtyři analytické cely. Jedna analytická cela obsahuje dvě referentní (hydrogen paladiové), dvě pomocné a jednu porézní grafitovou pracovní elektrodu. Elektrochemický detektor je uložen v řídicím modulu, jehož celý prostor je termostatován. Vzorek (20 μl) byl injektován automaticky pomocí autosampleru (Model 542, ESA, USA), který má v sobě zabudován i termostatovaný prostor pro kolonu. Vzorky byly během analýzy uchovány v karuselu při teplotě 8 °C. Kolona byla termostatována na 30 °C. Průtok mobilní fáze byl 1 ml·min⁻¹. Mobilní fáze se skládala z A: kyseliny trifluoroctové (80 mM) a B: 100% Met-OH. Látky byly eluovány následujícím lineárně vzestupným gradientem:

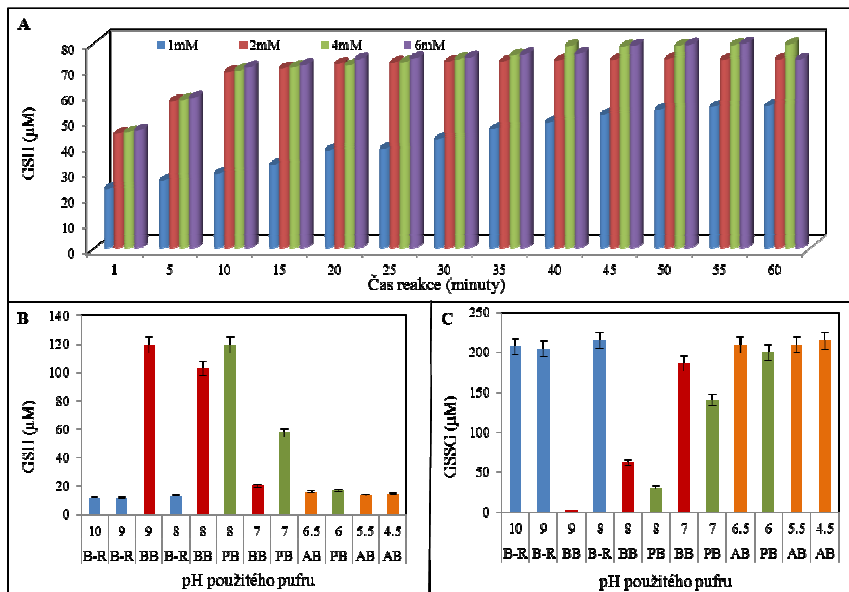
Gradient pro stanovení GSH a GSSG: 0 - 1 min (3 % B), 1 → 2 min (10 % B), 2 → 5 min (30 % B), 5 → 6 min (98 % B). Detekce separovaných látek probíhala při aplikovaném potenciálu 900 mV. Doba jedné analýzy byla 20 minut.

Gradient pro stanovení thiolů: 0 - 7 min (3 % B), 8 → 15 min (15 % B), 25 min (30 % B), 28 → 33 min (98 % B), 37 → 45 min (3 % B). Detekce separovaných látek probíhala při aplikovaném potenciálu 900 mV. Doba jedné analýzy byla 45 minut (Diopan, a kol., 2010).

VÝSLEDKY A DISKUZE

V prvním kroku optimalizace jsme zaměřili pozornost na dobu působení redukčního činidla na 100 μM standard GSSG a současně na koncentraci TCEP, jež bylo rozpuštěno v borátovém pufru o pH 9. Podmínka borátového pufru byla odvozena z literatury (Kizek, a kol., 2004). Hodnocení výtěžnosti reakce probíhalo tak, že přidaná známá koncentrace GSSG byla při variantních podmínkách redukována na GSH jehož výsledná hodnota byla chromatograficky analyzována stejně jako koncentrace zbytkového GSSG. Z výsledků uvedených na Obr. 2A je patrné, že vhodných podmínek je docíleno již v koncentraci TCEP 2 mM při době reakce 15 minut. Při těchto nejvhodnějších podmínkách byl v dalším kroku optimalizace porovnáván vlivů jednotlivých pufrů. Mezi testované pufrы byly pufrы zvoleny tak, aby byla pokryta celá pracovní škála pH daného pufru a to zejména pokud to bylo možné, v bazické oblasti. Byly tedy použity pufr Britton-Robinson (pH 10, 9 a 8), borátový pufr (pH 9, 8 a 7), fosfátový pufr (pH 9, 8 a 7) a acetátový pufr (pH 6,5; 5,5 a 4,5). Po analýze všech těchto variant bylo patrné, že obsah GSH uvedený na Obr. 2B je nejvyšší při použití borátového pufru pH 9, a také u fosfátového pufru pH 8. Je zde patrný i fakt, že pH pufru není jedinou rozhodující vlastností, která má vliv na redukci, jelikož u pufru Britton-Robinson, který byl použit v stejných pH, jako dva nejvhodnější pufrы došlo jen k nepatrné redukci. Na Obr. 2C je uvedena zbytková koncentrace GSSG po redukci. Díky těmto hodnotám byl jako nejvhodnější zvolen borátový pufr pH 9, jelikož obsah GSSG po redukci byl zanedbatelný. Z výsledků vyplývá, že borátový i fosfátový pufr o nižších pH neposkytuje vhodné podmínky pro redukci, stejně jako pufrы Britton-Robinson a acetátový pufr, které mají ve svých pH téměř srovnatelné výsledky, které ukazují na nevhodnost jejich použití.

Obr. 2 (A) Vliv doby reakce na redukci GSSG (100 μ M) na GSH, při každé době použity různé koncentrace TCEP v borátovém pufru pH 9. (B) Vliv pufrů Britton-Robinson (B-R), Boratový pufr (BB), Fosfátový pufr (PB) a Acetátový pufr (AB) o různých pH na koncentraci GSH, které je redukováno z GSSG. Jako redukční činidlo bylo použito 2 mM TCEP a koncentrace GSSG byla 200 μ M. (C) Zůstatek GSSG po redukci 2 mM TCEP z 200 μ M GSSG v prostředí různých pufrů.



Dále byl testován i přidavek chelatačního činidla EDTA (aplikované koncentrace 2; 1; 0,5 a 0,1 mM), která je v literatuře uváděna jako vhodné chelatační činidlo (Guo, a kol., 2009, Visser, a kol., 2004). Podle našich stanovení nevykazovalo téměř žádný vliv na kvalitu redukce u použitých standardů. Lze však předpokládat, že vliv EDTA při použití redukce u reálných vzorků bude patrný. Při získaných optimálních podmínkách byla měřena kalibrační řada a sestrojena kalibrační křivka. Redukční kalibrační křivka je lineární v rozsahu 0,4 – 200 μ M GSSG, hodnoceno dle redukovaného GSH. Dále byla provedena analýza směšného standardu thiolových sloučenin podle naší předchozí publikace (Diopan, a kol., 2010) při optimálních podmínkách a následovalo jejich porovnání s analýzou v původních neoptimalizovaných podmínkách. Z porovnání vyplývá, že hodnoty thiolových sloučenin jsou při použití optimalizovaných podmínek redukce srovnatelné, nebo vyšší, nežli při použití původních podmínek. Dalším rozdílem je, že GSSG není na chromatogramu patrné vůbec, tzn., že došlo k celkové redukci GSSG na GSH.

ZÁVĚR

V této práci se nám podařilo optimalizovat podmínky pro redukci GSSG na GSH. Účinnost redukce byla hodnocena pomocí HPLC-ED, kdy bylo po provedení redukce analyzováno množství GSH a zbytkové GSSG. Při použití optimalizovaných podmínek, kterými bylo použité redukční činidlo TCEP o koncentraci 2 mM v prostředí borátového pufru o pH 9, doba inkubace vzorku 15 minut, dochází k téměř úplné redukci GSSG na GSH. Limit detekce vstupního GSSG je 60 nM a maximální koncentrace GSSG, které je možné při těchto podmínkách redukovat na 200 μ M, což je pro další použití v reálných vzorcích dostatečné. Dále jsme zjistili, že optimalizované podmínky nemají negativní vliv na detekci dalších thiolových sloučenin.

LITERATURA

Alwael H., Connolly D., Barron L., Paull B. (2010): Development of a rapid and sensitive method for determination of cysteine/cystine ratio in chemically defined media. *Journal of Chromatography A*, 1217(24): 3863-3870.

Banfi G., Salvagno G. L., Lippi G. (2007): The role of ethylenedimine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45(5): 565-576.

Cullinan S. B., Zhang D., Hannink M., Arvisais E., Kaufman R. J., Diehl J. A. (2003): Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Molecular and Cellular Biology*, 23(20): 7198-7209.

Diopan V., Shestivska V., Zitka O., Galiova M., Adam V., Kaiser J., Horna A., Novotny K., Liska M., Havel L., Zehnalek J., Kizek R. (2010): Determination of Plant Thiols by Liquid Chromatography Coupled with Coulometric and Amperometric Detection in Lettuce Treated by Lead(II) Ions. *Electroanalysis*, 22(11): 1248-1259.

Guo X. F., Wang H., Guo Y. H., Zhang Z. X., Zhang H. S. (2009): Simultaneous analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using a new probe, 1,3,5,7-tetramethyl-8-phenyl-(4-iodoacetamido)difluoroboradiazas-indace ne. *Journal of Chromatography A*, 1216(18): 3874-3880.

Han J. C., Han G. Y. (1994): A procedure for quantitative-determination of tris (2-carboxyethyl) phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol *Analytical Biochemistry*, 220(1): 5-10.

Hansen R. E., Ostergaard H., Norgaard P., Winther J. R. (2007): Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical Biochemistry*, 363(1): 77-82.

Hopkins F. G. (1921): On an Autoxidisable Constituent of the Cell. *Biochem J*, 15(2): 286-305.

Chakravarthi S., Jessop C. E., Bulleid N. J. (2006): The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *Embo Reports*, 7(3): 271-275.

Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Jelen F. (2004): Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris(2-carboxyethyl)phosphine. *Bioelectrochemistry*, 63(1-2): 19-24.

Krijt J., Vackova M., Kozich V. (2001): Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: Advantages of using tris(2-carboxyethyl)phosphine as reductant compared with tri-n-butylphosphine. *Clinical Chemistry*, 47(10): 1821-1828.

Meister A., Anderson M. E. (1983): Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52(711-760).

Visser C. C., Voorwinden L. H., Harders L. R., Eloualid M., Van Bloois L., Crommelin D. J. A., Danhof M., De Boer A. G. (2004): Coupling of metal containing homing devices to liposomes via a maleimide linker: Use of TCEP to stabilize thiol-groups without scavenging metals. *Journal of Drug Targeting*, 12(9-10): 569-573.