

I.3.4.4. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII GLUTATION PEROXIDAZEI

Glutation peroxidaza (glutation redus: H_2O_2 – oxidoreductaza, EC 1.11.1.9) este o peroxidază descoperită în plasma sanguină, eritrocite și diferite țesuturi animale (ficat, mușchi, creier, plămâni etc.). Glutation peroxidaza (GPX) catalizează reducerea hidroperoxizilor, inclusiv a peroxidului de hidrogen, cu ajutorul glutatationului redus. În organismul viu GPX îndeplinește un rol important de protecție a membranelor celulare împotriva prejudiciului oxidativ produs de peroxidarea lipidică. Deci, funcția biologică a GPX constă în reducerea hidroperoxizilor lipidici la alcoolii corespunzători și în reducerea peroxidului de hidrogen la apă. Cu excepția GPX fosfolipid-hidroperoxidului care este un monomer, toate celelalte GPX sunt tetrameri alcătuiți din 4 subunități glicoproteice identice. Fiecare subunitate conține un rest de selenocisteină în centrul activ care participă direct în reducerea bi-electronică a substratului peroxidic. GPX utilizează glutatationul ca ultimul donor de electroni pentru regenerarea formei reduse a selenocisteinei. Dacă integritatea membranelor celulare și subcelulare depinde puternic de GPX, sistemul protector antioxidant al enzimei este condiționat de prezența seleniului.

I.3.4.4.1. Determinarea activității glutatation peroxidazei în serul sanguin (metoda Fukuzawa și Tokumura adaptată de Costel Darie și Vlad Artenie)

Principiul metodei. Glutation peroxidaza catalizează descompunerea peroxidului de hidrogen (H_2O_2) cu participarea glutatationului redus (G-SH) ca reducător, rezultând glutatationul oxidat (G-S-S-G) și apă :



Glutationul redus rămas în exces reacționează cu acidul 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) formând un complex colorat în galben. Intensitatea culorii complexului se măsoară spectrofotometric la 412 nm. Diferența dintre cantitatea inițială și cea finală de glutatation redus este direct proporțională cu activitatea glutatation peroxidazei.

Reactivi. 1) *Soluție tampon de fosfați de sodiu 0,4 M cu pH 7,0.* Se dizolvă 5,3425 g fosfat monosodic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) și 21,8525 g fosfat disodic ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) în 150 ml apă bidistilată într-un balon cotat de 250 ml. După verificarea și eventual corectarea pH-ului la 7 se aduce volumul soluției la 250 ml cu apă bidistilată.

2) *Soluție de glutatation redus 5 mM.* Se dizolvă 0,0384162 g glutatation redus (G-SH) în 25 ml apă bidistilată. Această soluție se prepară în momentul utilizării.

3) *Soluție de apă oxigenată 4 mM.* Se diluează 0,04533 ml apă oxigenată concentrată (30%) la 100 ml cu apă bidistilată.

4) *Soluție de acid metafosforic 7%*. Se dizolvă 35 g acid metafosforic [$(\text{HPO}_3)_n$] în 500 ml apă distilată.

5) *Soluție de fosfat disodic 0,3 M*. Se dizolvă 107,451 g de fosfat disodic ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) în 1000 ml apă distilată.

6) *Soluție tampon de fosfați de sodiu 0,1 M cu pH 7,0*. Se amestecă 1 volum de soluție tampon de fosfați de sodiu 0,4 M cu pH 7,0 și 3 volume de apă distilată.

7) *Soluție de acid 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic 0,04 % în soluție tampon de fosfați de sodiu 0,1 M cu pH 7,0*. Se dizolvă 0,040 g de acid 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) în 100 ml soluție tampon de fosfați 0,04 M cu pH 7,0.

Modul de lucru. În două eprubete – probă (P) și martor (M) – se măsoară următoarele volume de reactivi:

Reactiv	Probă (P)	Martor (M)
Soluție tampon fosfați 0,4 M cu pH 7,0 (ml)	1	2
Ser / plasmă (ml)	0,1 - 0,2	0,1 - 0,2
Apă bidistilată (ml)	0,1 - 0,0	0,1 - 0,0
Soluție de glutatión redus 5 mM (ml)	1	-
Proba se incubează timp de 5 minute la 37°C		-
Soluție de apă oxigenată 4 mM (ml)	1	-
Proba se incubează din nou timp de 5 minute la 37°C		-

În două eprubete de centrifugă se măsoară câte 4 ml soluție de acid metafosforic 7%. În prima eprubetă se introduce 1 ml din incubatul corespunzător probei. În cealaltă eprubetă se pipetează 0,6875 ml din incubatul martorului, apoi 0,3125 ml soluție de glutatión redus 5 mM. Conținutul eprubetelor se agită cu atenție și se lasă în repaus 10 minute. După trecerea timpului menționat, eprubetele se centrifughează timp de 15 minute la 3.000 rotații per minut.

În supernatantele separate se determină conținutul de glutatión redus conform specificațiilor din tabelul următor:

Reactiv	Probă	Martor	Control
Apă distilată (ml)	-	-	1
Supernatant după centrifugare (ml)	1	1	0
Soluție de fosfat disodic 0,3 M (ml)	4	4	4
Soluție de DTNB 0,04 % (ml)	0,5	0,5	0,5

Se agită cu atenție și se lasă 5 minute în repaus la temperatura camerei. Se citește extincția probei și martorului la spectrofotometru la 412 nm, față de controlul reactivilor.

Calculul rezultatelor. O unitate de activitate a GPX se definește ca acea cantitate de enzimă care catalizează oxidarea unui micromol de G-SH per minut. Activitatea glutathion peroxidazei exprimată în micromoli de glutathion redus transformați de enzima dintr-un ml de ser/plasmă în timp de un minut ($\mu\text{M G-SH/ml/min}$) se calculează cu ajutorul formulei:

$$\mu\text{M G-SH} / \text{ml} / \text{min} = (a_{\text{martor}} - a_{\text{proba}}) \times \frac{5 \times 3,2}{v \times 5 \times 1000 \times 307,33},$$

unde: a_{martor} - micrograme de glutathion redus (G-SH) corespunzătoare extincției martorului, citite pe curba etalon;

a_{proba} - micrograme de glutathion redus (G-SH) corespunzătoare extincției probei, citite pe curba etalon;

v - ml ser sau plasmă luați în lucru;

307,33 - masa unui micromol de G-SH, în mg.

Pentru aflarea microgramelor de glutathion redus se construiește o curbă etalon folosind cantitățile de 10, 20, 40, 60, 80, 100 și 120 micrograme de glutathion redus într-un ml de apă distilată. În fiecare etalon se pipetează 4 ml soluție de fosfat disodic 0,3 M și câte 0,5 ml soluție de DTNB 0,04%. Conținutul eprubetelor se agită și se lasă în repaus timp de 5 minute. Se citesc extincțiile etaloanelor la 412 nm, față de un control al reactivilor realizat cu 1 ml de apă distilată în loc de soluție de glutathion.

I.3.4.4.2. Determinarea activității glutathion peroxidazei în țesuturile animale (metoda Fukuzawa și Tokumura)

Principiul metodei. Același ca la *Lucrarea I.3.8.4.1.*

Reactivi. 1) *Soluție de clorură de potasiu 0,154 M.* Se dizolvă 1,1482 g de KCl în 100 ml apă bidistilată, la balon cotat.

2) *Soluție tampon de fosfați de sodiu 0,25M cu pH 7,4.* Se dizolvă 1,6388 g fosfat monosodic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) și 18,1359 g fosfat disodic ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) în 150 ml apă bidistilată într-un balon cotat de 250 ml. După verificarea și eventual corectarea pH-ului la 7,4 se aduce volumul soluției la 250 ml cu apă bidistilată.

3) *Soluție de glutathion redus 50 mM.* Se dizolvă 0,1536 g glutathion redus (G-SH) în 10 ml apă bidistilată. Această soluție se prepară în momentul utilizării.

4) *Soluție de apă oxigenată 50 mM.* Se diluează 0,1419 ml apă oxigenată concentrată (30%) la 25 ml cu apă bidistilată.

5) *Soluție de EDTA 25 mM.* Se dizolvă 0,9305 g dietilendiamintetraacetat disodic (Na_2EDTA) în 100 ml apă bidistilată.