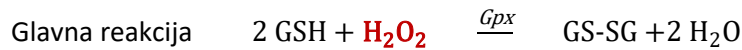


**PROTOKOL ZA ODREĐIVANJA BRZINE ENZIMSKE AKTIVNOSTI
GLUTATION PEROKSIDAZE (Gpx) METODOM PO GÜNZLER-U**

Glutaciona peroksidaza je Se-zavisni enzim koji se može naći u 8 izoenzimskih formi od kojih su za našu vežbu važne Gpx-1 (intracelularni enzim u svim tkivima) i Gpx-3 (deluje u telesnim tečnostima, uključujući i krvnu plazmu). S obzirom da je rad enzima zavisan od esencijalnog mikroelementa selena (Se), određivanje aktivnosti Gpx je dobra mera raspoloživosti Se u organizmu. Biološka uloga ovog enzima je antioksidativna zaštita. Reakcija teče u dva koraka:



Meri se na spektrofotometru ($\lambda=366 \text{ nm}$) pad koncentracije $\text{NADPH} + \text{H}^+$.

RASTVORI U REAKCIONOJ SMEŠI:

Za određivanje aktivnosti Gpx iz pune krvi potrebno je pripremiti sledeće reagense:

1. **Kalijum-fosfatni pufer** – obezbeđuje pH 7
2. **Rastvor glutationa (GSH)** – donor vodonika u glavnoj reakciji glutacione peroksidaze (Gpx)
3. **Rastvor glutacione reduktaze (GR)** – ovaj enzim (koenzim mu je $\text{NADPH} + \text{H}^+$) regeneriše GSH koristeći vodonike sa $\text{NADPH} + \text{H}^+$ i obezbeđuje nesmetani tok glavne reakcije.
4. **Uzorak u Drabkin-ovom rastvoru** – uzorak pune krvi u Drabkinu hemolizuje, čime se sadržaj eritrocita meša sa krvnim serumom i razređuje*.
5. **Rastvor $\text{NADPH} + \text{H}^+$** - kojeg enzim glutacione reduktaze (GR) koristi za regeneraciju glutationa (GSH) utrošenog u glavnoj reakciji
6. **Rastvor tetra-butil hidroperoksida (TBH)** – služi kao substrat za Gpx.

REDOSLED KORAKA PRI IZVOĐENJU METODE	KRATKO OBJAŠNJENJE
Preanalitička faza (priprema reagenasa)	
1.	Priprema gore nabrojanih rastvora. Drabkin, pufer i TBH mogu da se pripreme u većoj količini (za duži period) i čuvaju se na temperaturi 4-5°C. Rastvori GSH, GR i NADPH se pripremaju neposredno pred merenje jer su nestabilni i mogu da potraju svega par sati. Uzorak pune krvi se dodaje u Drabkin-ov reagens – moguće je prilagoditi zapreminski odnos (razrediti uzorak) ukoliko se pokaže da reakcija suviše brzo teče. 15-20 minuta pre merenja uključiti spektrofotometar, termokivetu i vodeno kupatilo.

Analička faza (merenje aktivnosti)		
1.	U epruvetu prvo dodati: - pufer - GSH - GR - uzorak krvi ili eritrocita (u Drabkin rastvoru) - redestilovanu vodu Sve dobro promešati mućkanjem	Prirema reakcione smeše za preikubaciju. NAPOMENA: Prva epruveta je uvek "blank" (kontrola) i priprema se tako što se ne dodaje uzorak, već se njegova zapremina nadomesti destilovanom vodom. Sa blankom se postupa potpuno isto kao sa uzorcima.
2.	Staviti u vodeno kupatilo na 37°C, 10 minuta.	Preinkubacija – reakciona smeša se dovodi na optimalnu temperaturu. NAPOMENA: Pri radu sa velikim serijama vreme preinkubacije se koristi za pripremu narednog uzorka.
3.	U epruvetu dodati: - NADPH - TBH	Dodatkom TBH počinje enzimska reakcija.
4.	Apsorbanca se očitava sa spektrofotometra, sa uključenom termokivetom, tačno svakih 30 sekundi tokom 3 minuta i brojevi se zapisuju u tabelu*.	Tokom očitavanja vrednost absorbance opada brzinom kojom se troši NADPH i to je mera brzine reakcije. Poželjno je da stepen opadanja bude ravnomeran za vreme koje se meri. Nakon 4-5 minuta apsorbance prestaju da opadaju jer se potrošio NADPH.
Izračunavanje aktivnosti iz tabele		
1.	Za "blank" i svaki uzorak pojedinačno izračunava se srednja razlika između izmarenih vrednosti - ΔA_{sr}	Videti primer dole.
2.	Aktivnost svakog uzorka izračunava se oduzimanjem vrednosti blanka: $\Delta A_{sr} - \Delta B_{sr}$ Dobijena vrednost se unosi u odgovarajuću formulu. Rešavanjem formule dobija se aktivnost Gpx izražena u mikrokatalima na litar ($\mu\text{kat/L}$)	NAPOMENA: krajnja formula za izračunavanje aktivnosti menja se u zavisnosti od razblaženja uzorka, količine razblaženog uzorka i međuvremena (intervala) između dva očitavanja. U excel tabelu se unose vrednosti očitavanja B1 i uzoraka

Tabela za unos podataka merenja (primer)

Br.uz.	0"	30"	60"	90"	120"	150"	180"	ΔAsr	$\Delta\text{Asr} - \Delta\text{Bsr}$
Blank	221	210	202	190	180	171	160	8,33	---
1.	634	601	568	536	510	478	435	33,17	24,84
2.	675	640	608	570	538	499	460	35,83	27,50
3.	659	613	564	520	472	424	379	46,67	38,34
4.	682	648					
5.									
6.									

Izgled tabela za unos podataka merenja (rezultati merenja za celu grupu)

Br.uz.	0"	30"	60"	90"	120"	150"	180"	ΔAsr	$\Delta\text{Asr} - \Delta\text{Bsr}$
Blank									
1.									
2.									
3.									
4.									
5.									
6.									

Organizacioni protokol za nastavnike i laborante:

1. Pre prve vežbe u danu "X" pripremiti hemikalije za 20 uzorka (projektovano se troši 2 po grupi i jedan blank.

2. Tokom vežbe, na uvodnom času, ispričati malo o Gpx.

u vežbaonici –

- obeležene epruvetice sa BI, 1 i 2, ependorfići sa 1 i 2. Svi se okupljaju oko stola, ispriča im se o mikropipetama. Jedan odmeri Drapkin u 1, drugi Drapkin u 2. treći krv u 1, četvrti u 2... i tako redom, svi po jednom koriste mikropipetu. nakon svega dodatog, preinkubacija 10 minuta. za to vreme pričam o selenoenzimima i GPx, svi prelazimo u lab

3. Tokom vežbe, u vežbaonici – pripremljeni uzorci se stavljaju u vodeno kupatilo na preinkubaciju 10+ minuta. Nastavnik prelazi u lab. 57 sa preostalim hemikalijama (NADPH i TBH) i mikropipetama.

4. Nakon preinkubacije:

1/2 studenata prelazi u lab. 57 sa epruvetama BI, 1 i 2 (3, 4, i 5 ostaju u vodenom kupatilu); kad završe:

2/2 studenata prelazi u lab. 57 sa epruvetama 3, 4, i 5.

5. Tokom vežbe, lab. 57:

- svaki uzorak treba meriti na aparatu puna 3 minuta (ako je moguće) = 7 merenja po uzorku; 3 merenja obavi nastavnik pokazno, studenti se smenjuju, 3-4 merenja po studentu;

- nastavnik priprema prvi uzorak za merenje (dodaje NADPH i TBH), preostala dva dodaju studenti (*angažovano 2 studenta*);

- dvoje studenata vode evidenciju.

6. Izračunavanje aktivnosti – domaći zadatak.