

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Studij primjenjene kemije

Dijana Čakarić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, kolovoz 2009.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI STUDIJ PRIMJENJENE KEMIJE

Dijana Čakarić

Primjena cikličke voltametrije u određivanju antioksidativne aktivnosti
bioloških uzoraka

ZAVRŠNI RAD

Voditelj završnog rada: Dr.sc. Sanja Martinez

Zagreb, kolovoz 2009.

Primjena cikličke voltametrije u određivanju antioksidativne aktivnosti bioloških uzoraka

SAŽETAK

Polinuklearni kompleksi željezo(III) iona sa polimernim ugljikohidratima kao što je dekstran ili šećerima kao što su saharoza ili glukoza, korišteni u liječenju anemije, predstavljaju mogući izvor redoks-aktivnog željeza u krvnoj plazmi. To željezo koje je “slabo vezano” na površinu proteina, DNA i drugih makromolekula ili kelata smatra se odgovornim za nastanak oksidativnog stresa i oštećenje stanica. Ono može sudjelovati u Haber-Weiss reakciji ili biti reducirano u željezo(II) ion djelovanjem askorbinske kiseline i ući u Fentonovu reakciju, čime u oba slučaja nastaje redoks ciklus koji konstantno proizvodi $\text{OH}^\bullet$ radikale.

$\text{OH}^\bullet$ radikal je izrazito jako oksidativno sredstvo koje velikom brzinom reagira sa većinom organskih i anorganskih molekula i osiromašuje količinu antioksidansa niske molekularne mase (LMWA) u plazmi koji predstavljaju prvu liniju obrane od oksidativnog stresa.

Iscrpljivanje zaliha antioksidansa dospjelih u plazmu uvođenjem parenteralnog željeza kao stimulativnog sredstva za stvaranje hemoglobina u slučaju kroničnih bubrežnih bolesnika, utvrđeno je ranije, korištenjem raznih tehnika kao što su biokemijske, imunohistološke i spektroskopske.

U ovom radu, elektrokemijska metoda cikličke voltametrije (CV), koja daje informacije o antioksidativnom kapacitetu plazme, primijenjena je kako bi se detektirala promjena u oksidativnom statusu pacijenata oboljelih od anemije i liječenih intravenoznom infuzijom željezo glukonata. Za usporedbu je korištena i spektrofotometrijska FRAP metoda.

Obje metode pokazale su smanjenje ($p < 0.05$) antioksidativne aktivnosti između uzoraka sakupljenih neposredno prije i 10 minuta poslije i.v. infuzije željezo glukonata.

Ključne riječi: ciklička voltametrija, krvna plazma, željezo glukonat, oksidativni stres

Application of cyclic voltammetry in determination of antioxidant activity in biological samples

ABSTRACT

Polynuclear complexes of ferric iron with polymeric carbohydrates like dextran or sugars like sucrose or glucose, used for the treatment of anemia in various diseases, represent a possible source of nonferritin-bound, redox-active iron in blood plasma. This iron, “loosely bound” to surface of proteins, DNA, and other macromolecules or chelates, is implicated in oxidative stress and cell injury. It can undergo metal mediated Haber-Weiss reaction or may be reduced to Fe(II) state by ascorbic acid and enter a Fenton-type reaction, in both cases establishing a redox cycle that continuously produces OH[•] radicals.

OH[•] being a powerful oxidizing agent that reacts at a high rate with most organic and inorganic molecules, scavenges the plasma low-molecular-weight antioxidant (LMWA) pool – its first line of defence against oxidative damage.

Depletion of plasma antioxidants due to administration of parenteral iron as an erythropoiesis-stimulating agent in the case of chronic renal failure patients, has been evaluated previously using a variety of techniques including biochemical, immunohistological and spectroscopical.

In the present study, the electrochemical method of cyclic voltammetry (CV), that provides information on the LMWA capacity, has been used to detect the change in the oxidative status of iron deficiency anemia patients introduced by i.v. infusion of ferric gluconate.

For comparison, spectrophotometric ferric reducing antioxidant power (FRAP) method has also been used.

Both, CV and FRAP showed a decrease ($p < 0.05$) in plasma antioxidant activity between samples collected immediately before and 10 minutes after i.v. infusion of ferric gluconate.

Key words: cyclic voltammetry, blood plasma, ferric gluconate, oxidative damage

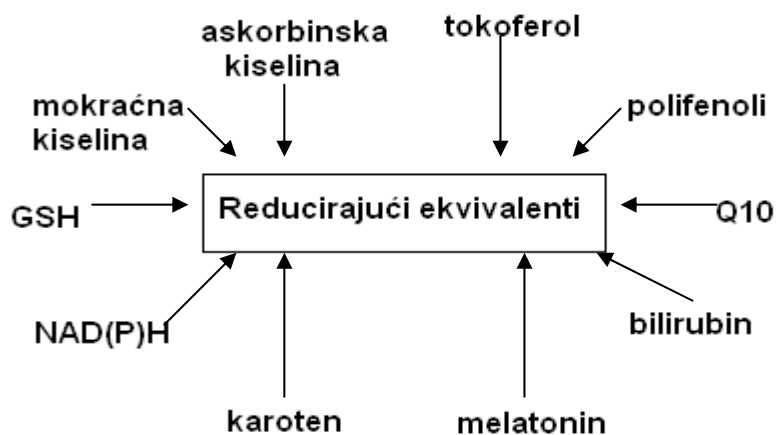
SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Anemija	3
2.1.1. Prepoznavanje manjka i simptomi anemije	4
2.1.2. Liječenje anemije	4
2.1.3. Liječenje rekombiniranim humanim eritropoetinom	4
2.1.4. Peroralna primjena željeza	5
2.1.5. Primjena intravenskog željeza	5
2.2. Metabolizam i apsorpcija željeza	6
2.2.1. Oksidativni stres	9
2.2.2. Antioksidansi	10
2.3. Metode određivanja	11
2. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Aparatura	14
3.2. Postupak mjerenja	14
3. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. Snimanje cikličkih voltamograma	15
4. ZAKLJUČAK	23
5. LITERATURA	24

1. UVOD

Posljednjih godina nakupilo se mnogo dokaza o ulozi reaktivnih oksidativnih specija (ROS) u inicijaciji i propagaciji biološkog oštećenja tkiva, organa i biološki iznimno bitnih molekula¹. Pokazalo se je da su reaktivne oksidativne tvari uzročnici mnogih kliničkih poremećaja kao što su razne upale, bolesti vezane uz procese starenja i rak. Uobičajeni postupci za procjenu oksidativnog oštećenja bioloških uzoraka baziraju se uglavnom na histološkim i biokemijskim parametrima, te je očita potreba za metodom koja može kvantificirati njihovu antioksidativnu aktivnost prije nastanka biološke štete.

Antioksidansi se mogu klasificirati u dvije grupe; antioksidativni enzimi i antioksidansi niske molekularne mase (LMWA). LMWA (slika 1.) imaju nekoliko bioloških prednosti nad antioksidativnim enzimima. Između ostalog, to su prilično male molekule hidrofilne ili lipofilne prirode i zato vrlo lako mogu doprijeti na specifične lokacije unutar stanica gdje mogu biti prisutne u vrlo visokim koncentracijama i tako spriječiti oksidativna oštećenja.²



SLIKA 1. Antioksidansi niske molekularne mase (LMWA) koji izravno reagiraju sa reaktivnim oksidativnim tvarima i posjeduju reducirajuća svojstva

Postoji više metoda za procjenu antioksidativnog statusa bioloških tekućina i tkiva, a jedna od najnovijih i najmanje istraženih je elektrokemijska metoda cikličke voltametrije (CV)^x.

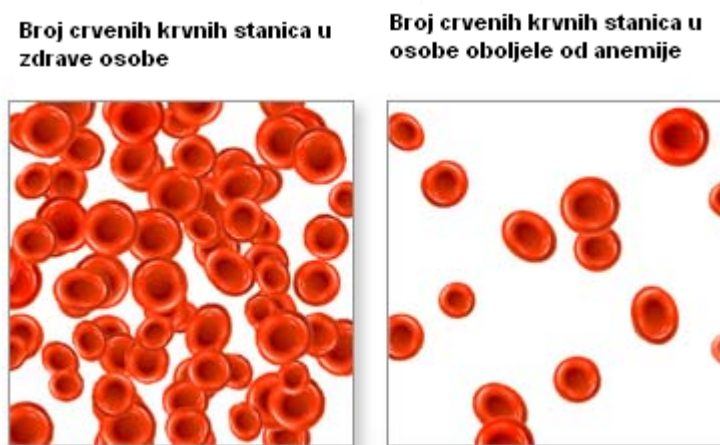
Ova metoda je interesantna jer omogućava jednostavno i brzo "snimanje" integralnog LMWA statusa krvne plazme, odnosno omogućava istovremeno: (i) mjerenje sposobnosti plazme da donira elektron/e (preko oksidacijskog potencijala) i (ii) izračunavanje ukupne koncentracije (preko utrošenog naboja) reducirajućih tvari prisutnih u krvnoj plazmi bez potrebe za određivanjem doprinosa pojedinačnih komponenti.

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene cikličke voltametrije u slučaju utjecaj intravenozne (i.v.) infuzije komercijalnog pripravka željezo glukonata (*Ferrlecit*) na antioksidativni status krvne plazme. U tu svrhu uzorkovana je krv od pacijenata neposredno prije primanja terapije i 10 minuta nakon terapije. Antioksidativni status krvne plazme mjeren je cikličkom voltametrijom i, za usporedbu, spektrofotometrijskom, FRAP (ferric reducing antioxidant power) metodom^x.

2. OPĆI DIO

2.1. Anemija

Anemija je opće prihvaćeni naziv za smanjeni broj eritrocita u cirkulaciji, smanjenu količinu krvi u tijelu te za smanjenu količinu hemoglobina u eritrocitima ^x (slika 1).



SLIKA 2. Prikaz krvne slike u zdrave osobe i osobe oboljele od anemije

Najčešće nastaje kao posljedica gubitka krvi, no može biti uzrokovana i smanjenom produkcijom uslijed poremećene hematopoeze ili nedostatka tvari neophodnih za stvaranje eritrocita.

Prema vrijednosti hemoglobina anemija se dijeli na:

- ❖ blagu (Hb veći od 100 g/L),
- ❖ umjerenu (Hb između 80 – 100 g/L),
- ❖ tešku (Hb između 60 do 79 g/L)
- ❖ i opasnu po život (Hb ispod 60 g/L).³

U stanju anemije javlja se kronični umor, smanjuje se kvaliteta života i nameće se potreba za liječenjem. Najbrži način nadoknade krvi i uklanjanja tegoba je transfuzija eritrocita.

2.1.1. Prepoznavanje manjka i simptomi anemije

Manjak željeza postupno se razvija. U prelatentnoj fazi postoji samo iscrpljivanje rezervi željeza bez smanjivanja željeza u plazmi, dok je u latentnoj fazi željezo sniženo, a zasićenje transferina smanjeno. U trećoj fazi manjka željeza nastaje manifestan oblik sideropenične anemije. Srednja do teška anemija uzrokuje simptome kao što su glavobolje, smanjeni apetit,

bljedilo kože, izrazita slabost i malaksalost, nepodnošenje normalnih fizičkih napora, lupanje srca, omaglice i tzv. listanje noktiju (krhki i slabi nokti). Najsigurniji pokazatelj deficita željeza u organizmu je snižena vrijednost feritina.

Tablica 1. Diferencijalna dijagnoza sideropenične anemije i anemije zbog kronične upalne bolesti:⁴

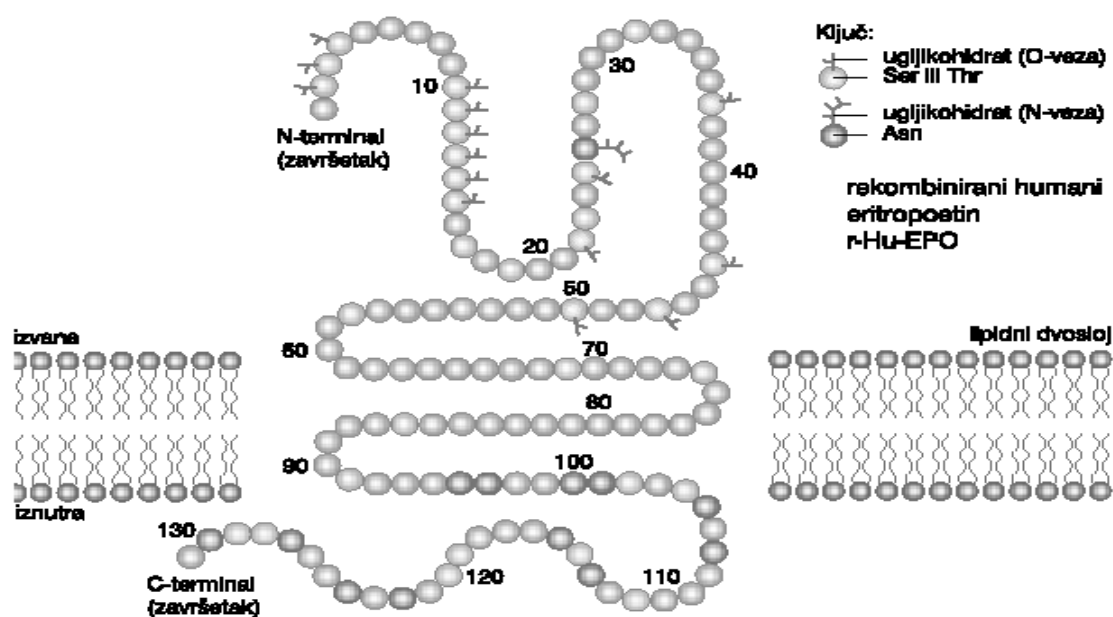
	Sideropenična anemija	Anemija zbog kronične upalne bolesti
MCV	smanjen	smanjen ili normalan
željezo	smanjeno	smanjeno
TIBC	povišen	smanjen
Feritin	smanjen	normalan ili povišen

2.1.2. Liječenje anemije

Liječenje anemije uslijed manjka željeza ima za cilj suzbijanje anemije ubrzanom normalizacijom koncentracije hemoglobina u krvi, popunjavanje zaliha u organizmu i izbjegavanje neželjenih djelovanja terapije željezom.

2.1.3. Liječenje rekombiniranim humanim eritropoetinom (rHuEPO)

Eritropoetin je hematopoetski činitelj rasta koji regulira eritrocitopoezu stimulirajući proliferaciju i diferencijaciju nezrelih stanica crvene loze. Luče ga specijalizirane stanice u peritubularnom intersticiju kore bubrega. Mala se količina eritropoetina sintetizira u jetri, plućima, slezeni, endotelu kapilara i spolnim žlijezdama. Anemija i hipoksija potiču lučenje eritropoetina. Eritropoetin je glikoprotein molekulske mase od 34.000 daltona s udjelom od približno 40% ugljikohidrata. Sastavljen je od 165 aminokselina. Četiri lanca ugljikohidrata vezana su na protein preko tri N-glikozidne veze i jedne O-glikozidne veze. Za biološku aktivnost eritropoetina presudne su dvije disulfidne veze između aminokiselina 29 i 33, odnosno 7 i 161 te udio ugljikohidrata s terminalnim kiselinama (N-acetil-neuraminska kiselina), koje štite molekulu od brze razgradnje u jetri.⁵



SLIKA 3. Molekulska struktura glikoproteinskog lanca rHuEPO

Primjena eritropoetina u svrhu povećanja eritrocitne mase zahtijeva puno veće doze od onih koje se primjenjuju kod bolesnika na dijalizi. Iz najranijih kliničkih ispitivanja pomoću rHuEPO bilo je očito da je nedostatak željeza jedan od najčešćih uzroka slabog odgovora bolesnika na liječenje. Nedostatak željeza je ili apsolutan, pri čemu su iscrpljene tjelesne rezerve, ili funkcionalan, pri čemu u tijelu postoji nedovoljna ili čak prevelika količina željeza koja se, međutim ne može aktivirati dovoljno brzo da bi zadovoljila potrebe koštane srži. Kada se identificira apsolutni ili funkcionalni nedostatak željeza ili se na to sumnja, potrebna je nadoknada željeza kako bi se postigli maksimalni učinci rHuEPO liječenja. Željezo se bolesnicima može davati peroralno ili intravenski. Intravenska nadoknada željeza najčešća je korištena metoda u bolesnika koji primaju rHuEPO. Tom se metodom korigira apsolutni i funkcionalni nedostatak željeza i koštanoj srži osigurava odgovarajuća opskrba. Postoje dokazi da čak i bolesnici s normalnim rezervama željeza imaju koristi od intravenskog primanja željeza tijekom liječenja rHuEPO.

2.1.4. Peroralna primjena željeza

Ukoliko se utvrdi sideropenični oblik anemije potrebno je početi s nadoknadom željeza. Većinu se bolesnika može liječiti peroralnim pripravcima željeza, koji sadržavaju željezo u dvovalentnom ili trovalentnom obliku. Od lijekova koji sadrže željezo u dvovalentnom obliku najčešći su ferosulfat, feroglukonat i ferofumarat, a od oblika s trovalentnim željezom prisutni su ferihidroksi-polimaltozat i feriproteinsukcinilat.



2.1.5. Primjena intravenskog željeza

Indikacije za primjenu iv. željeza su teška anemija, nepodnošenje peroralnog željeza, malapsorpcija, funkcionalni deficit željeza tijekom primjene eritropoetina, kontinuirani gubitak krvi i slab učinak peroralne terapije. S obzirom da se intravenskom primjenom u organizam unosi definirana količina željeza potrebno je znati koliko željeza organizmu nedostaje. Od lijekova koji se najčešće koriste u ovu svrhu je željezo(III)-sorbitol glukonska kiselina trgovačkog naziva *Ferrlecit*.



SLIKA 4. Ampule željezo III-sorbitol glukonske kiseline za intravenoznu primjenu

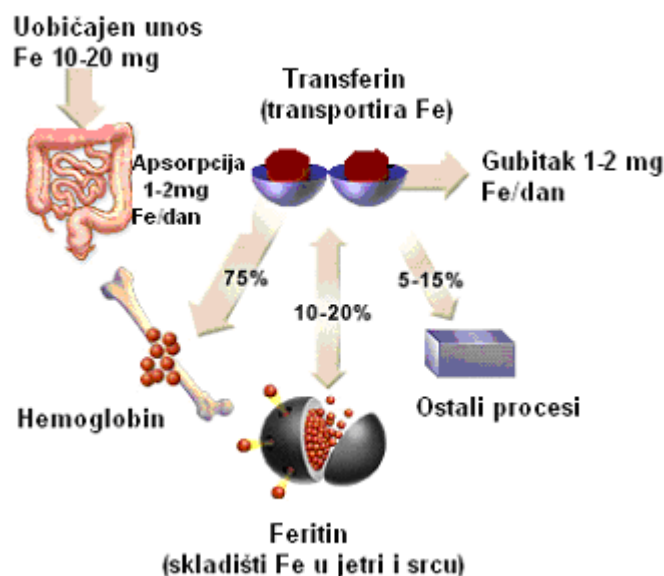
Manjak željeza u organizmu može se izračunati pomoću formule:

$$\text{Deficit željeza (mg)} = \text{tjelesna masa (kg)} \times \text{ciljni hemoglobin (g/L)} - \text{aktualni hemoglobin (g/L)} \times 0.24 + \text{pričuva (mg)}$$

2.2. Metabolizam i apsorpcija željeza

Iako je željezo u prirodi vrlo rasprostranjeno, u ljudskom organizmu ga ima oko 45 mg/kg tjelesne mase, ili 3-4 g. Prema metaboličkoj ulozi u organizmu željezo je podijeljeno u 4 oblika:

1. Najveći dio željeza u tijelu, 75% nalazi se u crvenim krvnim stanicama, eritrocitima, kao vitalan sastojak hemoglobina, a 5% javlja se kao sastojak mišićnog hemoglobina, mioglobina.
2. U plazmi željeza ima vrlo malo, a vezano je na bjelančevinu nosač, β -globulin, koji se zbog transportne uloge naziva transferin.
3. Oko 20% željeza vezano je na bjelančevinu feritin i pohranjuje se u jetri, slezeni, sluznici crijeva i koštanoj srži.
4. Preostalih 5% ukupnog željeza u tijelu rašireno je u svim stanicama u enzimskom sustavu, bitnom za proizvodnju energije.



SLIKA 5. Prikaz kruženja željeza u tijelu

U organizmu željezo slijedi jedinstven krug apsorpcije, transporta, skladištenja i pohranjivanja. Jedinstven je jer se stalna razina željeza ne održava izlučivanjem viška putem mokraće, već ravnotežom apsorpcije, transporta i pohranjivanja.

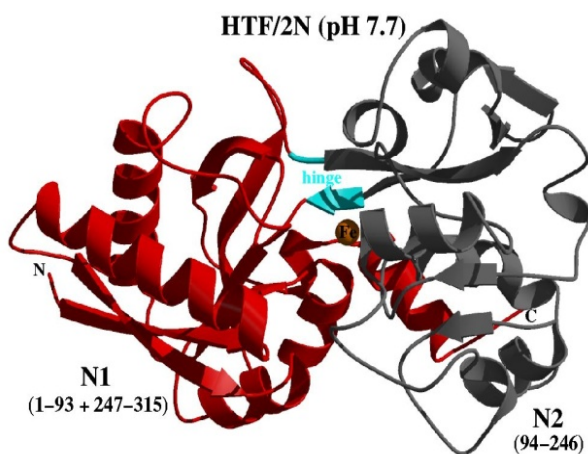
Čimbenici koji potiču apsorpciju željeza:

- ❖ vitamin C
- ❖ meso
- ❖ limunska i mliječna kiselina iz hrane
- ❖ solna kiselina iz želuca.

Čimbenici koji ometaju apsorpciju željeza:

- ❖ fitati i prehrambena vlakna
- ❖ kalcij i fosfor (iz mlijeka)
- ❖ neke komponente prisutne u aditivima
- ❖ taninska kiselina (i drugi polifenoli npr. iz čaja, kave)
- ❖ oksalati

Željezo (iz hrane ili farmaceutskog pripravka) apsorbira se u cijelom probavnom sustavu kao nehemsko i hemsko. Apsorbirano Fe se oksidira u Fe^{3+} i veže s β -globulinom plazme u transferin, kojim se transportira do tjelesnih stanica.



Najveći dio željeza u plazmi vezan je za specifični protein-**transferin**.

Transferin⁶ (slika xx) je globulin koji čvrsto veže ione željeza u neutralnoj ili slabo alkalnoj sredini. Molekularna težina mu je oko 7080,000; predstavlja približno 3% svih enzimskih proteina.

Slika xx.

Molekula transferina veže 2 atoma trovalentnog željeza. Kad se Fe u organizmu brzo oslobađa transferin plazme sprečava nagli porast, a time i toksično djelovanje slobodnih iona željeza. Spoj željeza i transferina zapravo je mali netoksični depo željeza u krvi.

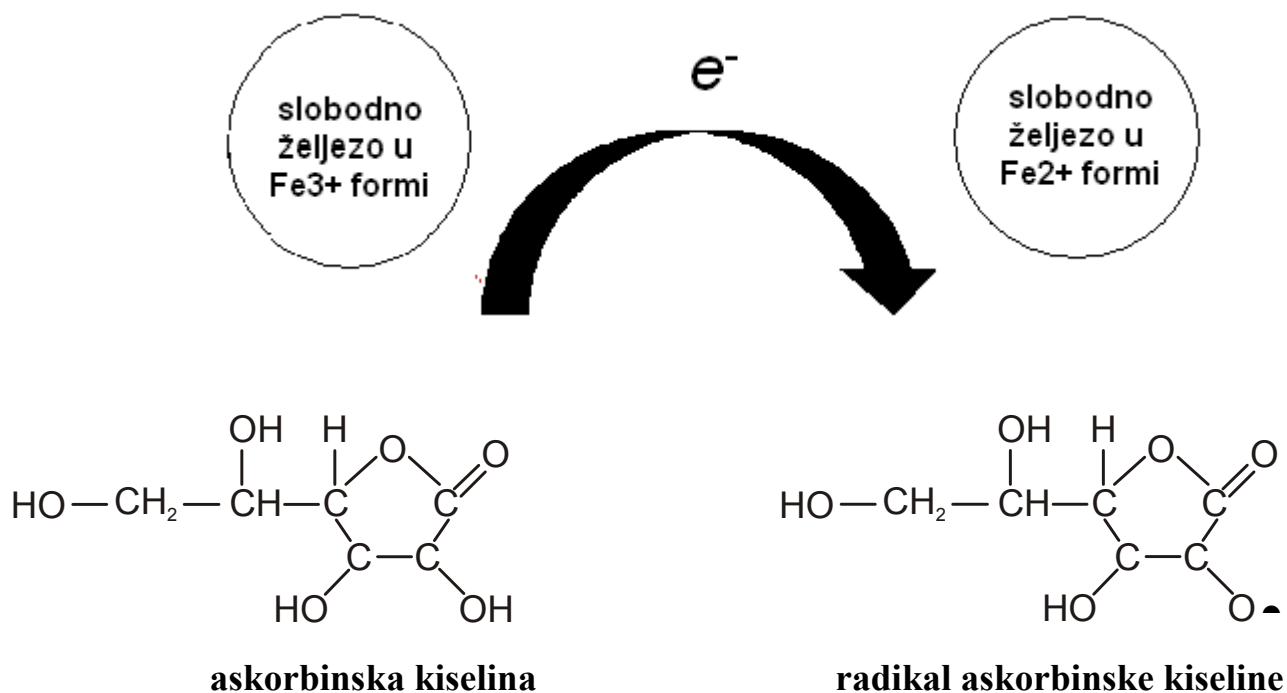
Približno 1/3 transferina veže Fe, a 2/3 su slobodne, tj. transferin je u plazmi slobodan (UIBC=unsaturated iron binding capacity; IBC=iron binding capacity). Ukupni transferin

(TIBC=total iron binding capacity) je zbroj vrijednosti željeza s transferinom (Fe/S) i vrijednost transferina bez željeza. Neutralizacija slobodnih iona željeza ovisi o količini nezasićenog transferina plazme. Transferin u stanovitoj mjeri djeluje kao pufer te sprečava nagle promjene u aktivitetu iona željeza plazme. Kvantitativno su dominantni pufer-sistemi apoferitin-feritin i apohemosiderin-hemosiderin; spajanje transferina i željeza odvija se brzo, a vezivanje u druga dva sistema odvija se relativno sporo. Pri nedostatku željeza, naročito ako ovakvo stanje dulje traje, vrijednost transferina raste. Sniženje transferina javlja se kod akutnih i kroničnih infekcija. Kvocijent slobodnog i vezanog transferina mjerilo je aktivnosti iona željeza u plazmi. Ako je količina odloženog željeza u tkivima abnormalno velika (hemokromatoza, transfuziona sideroza itd.) ili kad je razgradnja hemoglobina veća od stvaranja, kvocijent je povećan. Kod deficita željeza i stanja kada osim koštane srži i ostala tkiva pokazuju natprosječni afinitet za željezo (npr. aktivna infekcija) ovaj je kvocijent snižen. Ako je vrijednost serumskog željeza snižena zbog nedostatka željeza, vrijednost nezasićenog transferina povišena je; kod infekcije je snižena ili normalna. Istodobno određivanje željeza u serumu i nezasićenog transferina omogućuje uvid u intermedijalni metabolizam željeza.

Čovjek vrlo racionalno gospodari željezom; kako se željezo fiziološki uvijek veže u velikomolekularni proteinski spoj, eliminacija željeza mokraćom nije moguća (nema ekskretornog organa za željezo).⁷

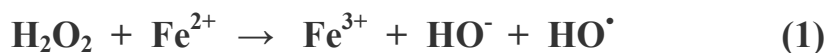
Najnovija istraživanja, međutim, pokazuju i neke potencijalno štetne učinke iv. željeza. Naime pokazalo se da tijekom liječenja značajno raste koncentracija slobodnog (nevezanog) željeza u plazmi koje je izrazito štetno u dva slučaja:

1. slobodno željezo u Fe^{3+} stanju reagira sa askorbinskom kiselinom i prima od nje jedan elektron i prelazi u Fe^{2+} stanje. S druge strane askorbinska kiselina prelazi u slobodni radikal koji može izazvati oštećenje stanica

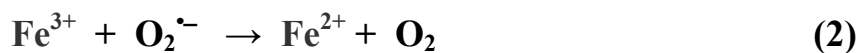


SLIKA 6. Nastanak radikala kao posljedica nevezanog željeza u krvnoj plazmi

2. slobodno željezo u Fe^{2+} stanju generira $\text{OH}^\bullet$ radikale prema Fenton i Haber-Weiss reakcijama.



$\text{OH}^\bullet$ radikali su iznimno toksični i najčešći su reaktivni radikali koji uzrokuju oksidativni stres. U Haber-Weiss reakciji oni nastaju iz vodikova peroksida i superoksida .

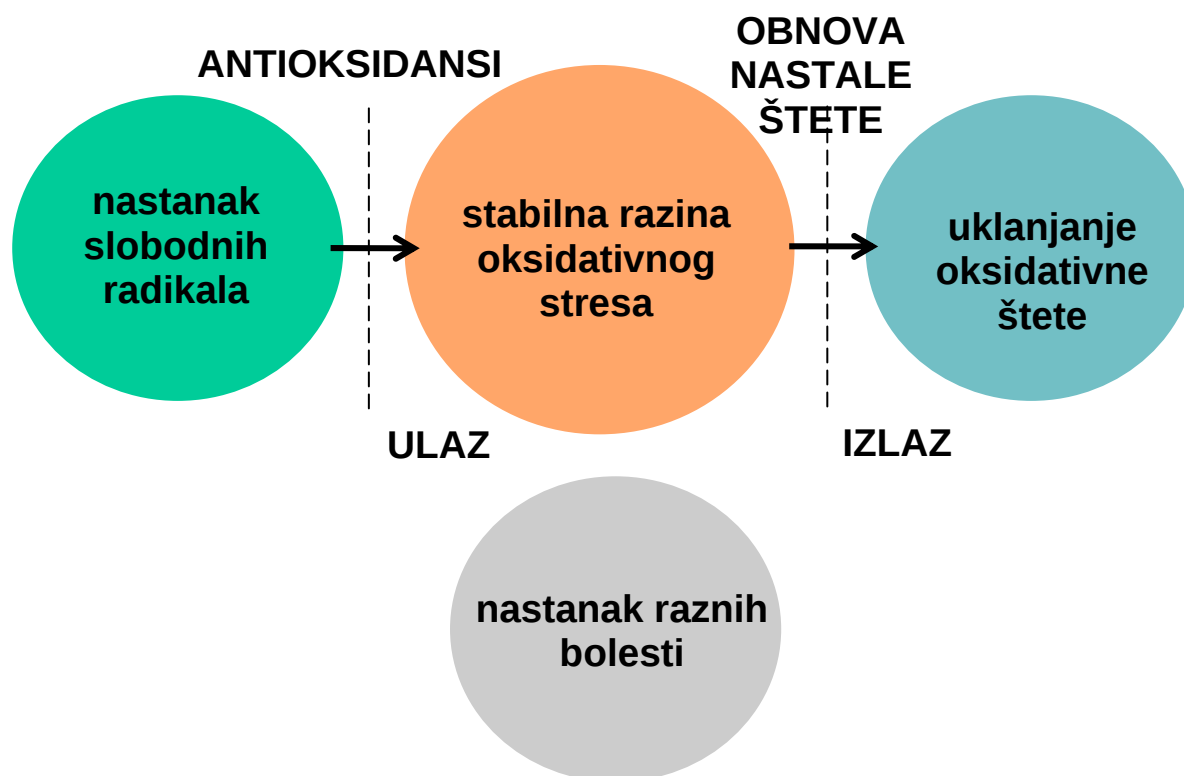


Haber-Weiss reakcija je termodinamički moguća ali vrlo spora pa je zbog toga katalizirana željezom. Slobodno ili labilno željezo može nanijeti mnogo štete sudjelujući u redoks ciklusu i kontinuiranom stvaranju $\text{OH}^\bullet$



2.2.1. Oksidativni stres

Oksidacijski stres definira se kao pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Riječ je o stanju prekomjernog stvaranja slobodnih radikala kisika, pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti neke stanice da ih razgradi, a rezultira promjenama vezanim uz oštećenje stanica. Drugim riječima, oksidacijski stres može se definirati kao oštećenje tkiva uvjetovano poremećajem ravnoteže pro- i anti-oksidativnoga sustava.⁸



SLIKA 7. Prikaz ravnoteže pro- i anti-oksidativnog sustava

Oksidacijsko oštećenje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih biomolekula (polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina), što konačno rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa. Tako nastala oštećenja mogu narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici, gensku transkripciju i dovesti do drugih poremećaja. Oksidacijski stres ima značajnu ulogu u etiopatogenezi kardiovaskularnih i

infektivnih bolesti, karcinoma, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, fibroze, hemolize, procesa starenja.

2.2.2. Antioksidansi

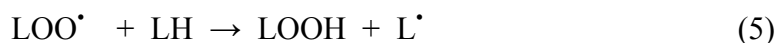
Antioksidansi su raznorodna skupina molekula koje, ako su prisutne u niskim koncentracijama u usporedbi s koncentracijama oksidativnog supstrata, značajno zadržavaju ili priječe oksidaciju tog supstrata, kontroliraju odnos između stanja reduciranja ili oksidiranja u biološkom sustavu. Antioksidansi nastaju u stanici, a djeluju na nekoliko načina: onemogućuju stvaranje novih slobodnih radikala u organizmu, ili uništavaju u organizmu stvorene radikale (engl. scavengers – “čistači”), ili popravljaju oštećenja u stanici nastala djelovanjem radikala. Među brojnim podjelama antioksidansa najjednostavnija je ona na antioksidacijske enzime i malene molekule antioksidansa.

Npr., tipična autooksidacija inicirana azo spojem i inhibicija reakcije uključuje sljedeće reakcije (1-8) (R_2N_2 = azo spoj; LH = supstrat; AH = antioksidans):⁹

Inicijacija:



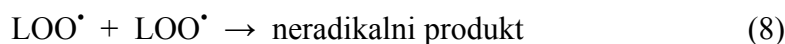
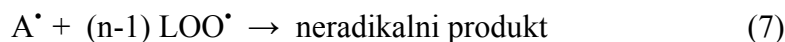
Propagacija



Inhibicija



Terminacija

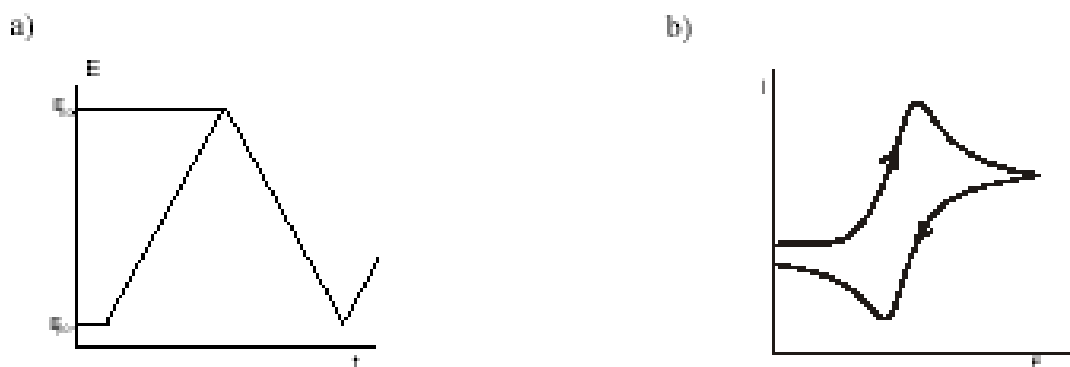


2.3. Metode određivanja

Jedna od najnovijih metoda za određivanje koncentracije i oksidacijsko-redukcijskih svojstava molekula u otopini je ciklička voltametrija^x (ista referenca s početka). Ciklička voltametrija pripada skupini elektroanalitičkih tehnika mjerenja, u kojima je signal pobude linearno promjenljivi potencijal. Signal odziva je struja, koja se mjeri kao funkcija narinutog

potencijala. Osnovni je princip, da se potencijal radne elektrode linearno mijenja s vremenom i to od početnog potencijala, $E_{poč}$, do konačnog potencijala, E_{kon} , i natrag (SLIKA 8.a).

Rezultat ovakve linearne trokutaste pobude (SLIKA 8.b), je elektrokemijska reakcija na elektrodi, a registrira se kao struja-potencijal krivulja. Brzina promjene potencijala može se mijenjati u širokom opsegu, pa se ovom tehnikom mogu ispitivati kako spore, tako i vrlo brze elektrodne reakcije.¹⁰



SLIKA 8. Signal a) pobude i b) odziva u cikličkoj voltametriji

Primjena metode se zasniva na analizi anodnog strujnog vrha koji daje dva skupa podataka:

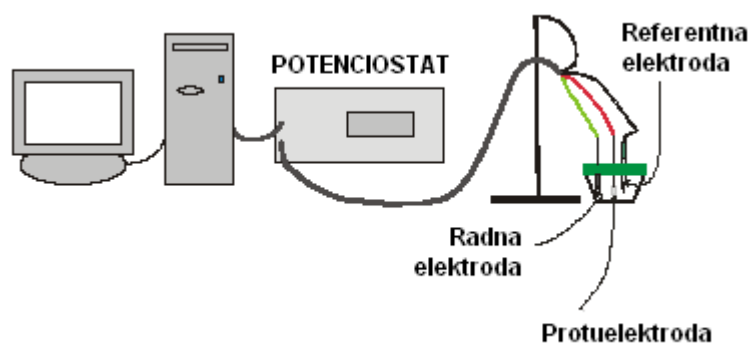
1. potencijale strujnih vrhova koji se vežu za biološki oksidacijski potencijal svake od individualnih komponenti antioksidansa niske molekularne mase te odražavaju njihovu redukcijsku moć
2. naboj dobiven integracijom strujnog vrha koji predstavlja površinu ispod voltametrijskog vala, a koji odražava koncentraciju antioksidansa niske molekularne mase

Kada se koristi ciklička voltametrija kao metoda mjerenja antioksidativnog statusa u nekom sustavu, poželjno je napraviti usporedna mjerenja jednom od spektrofotometrijskih metoda. U ovom istraživanju korištena je FRAP metoda koja je direktan test "totalne antioksidativne snage."

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Aparatura

Mjerenja su provedena na aparaturi prikazanoj na slici 10, koja se sastoji od računala, potencijostata i elektrokemijske ćelije.



SLIKA 10 . Shema aparature za snimanje cikličkih voltamograma

Mjerenja su provedena u troelektrodnoj ćeliji, koja se sastoji od radne, referentne protuelektrode. Kao radna elektroda korištena je elektroda od staklastog ugljika, kao referentna zasićena kalomel elektroda dok je kao protuelektroda korišten platinski lim.

Kako bi se dobili što precizniji ciklički voltamogrami, prije svakog mjerenja radna elektroda je brušena brusnim papirom, polirana Al_2O_3 prahom veličine čestica $1\text{ }\mu\text{m}$, $0,3\text{ }\mu\text{m}$ i $0,05\text{ }\mu\text{m}$. Elektroda je zatim odmašćena etanolom u ultra zvučnoj kupelji, te isprana destiliranom vodom. Platinska protuelektroda žarena je prije svakog mjerenja.

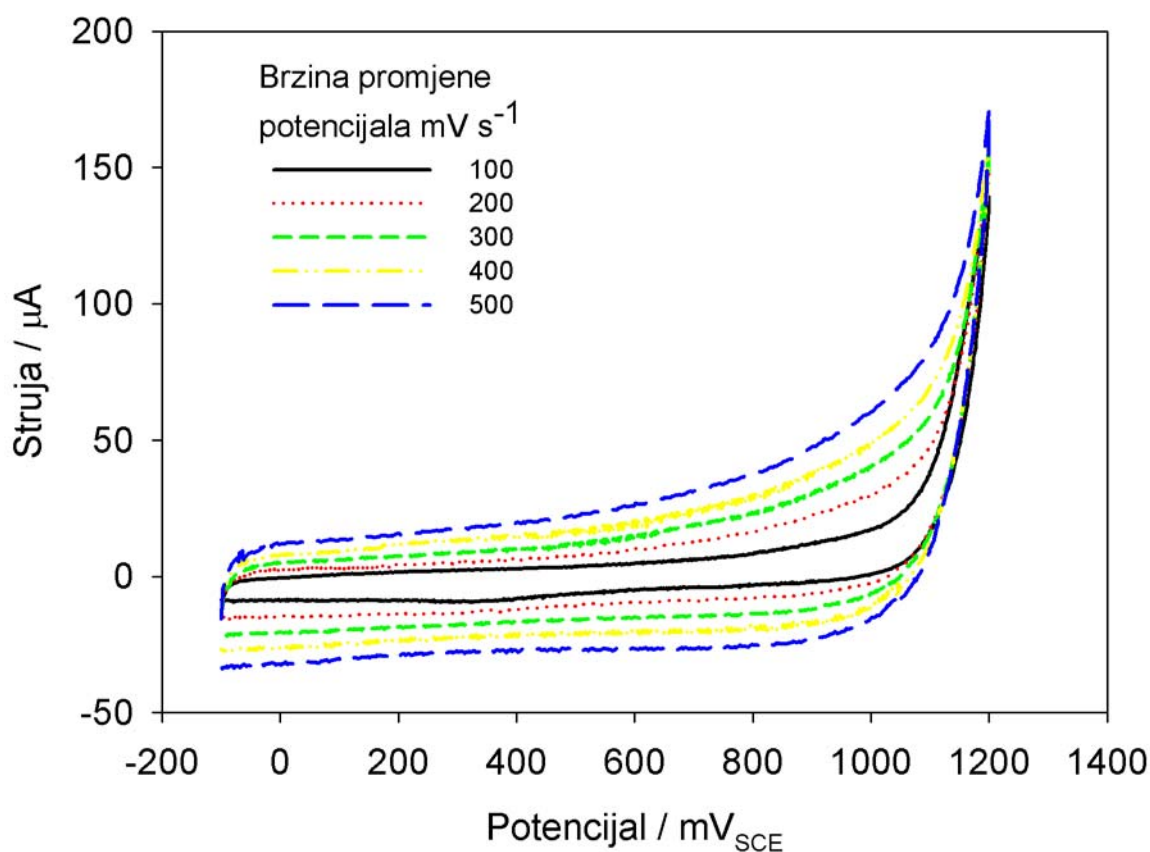
3.2. Postupak mjerenja

Ciklički voltamogrami snimani su u čistoj otopini fosfatnog pufera pH 7.1, te u otopinama ljudske krvne plazme razrijeđene 10 puta u otopini fosfatnog pufera i to prije i poslije intravenozne terapije sa $62,5\text{ mg Ferrlecita}$.

Mjerenja su provedena u rasponu potencijala od -100 do $+1200\text{ mV}$ brzinom promjene potencijala od 400 mV/s . U tu svrhu analizirani su uzorci od 30 pacijenata.

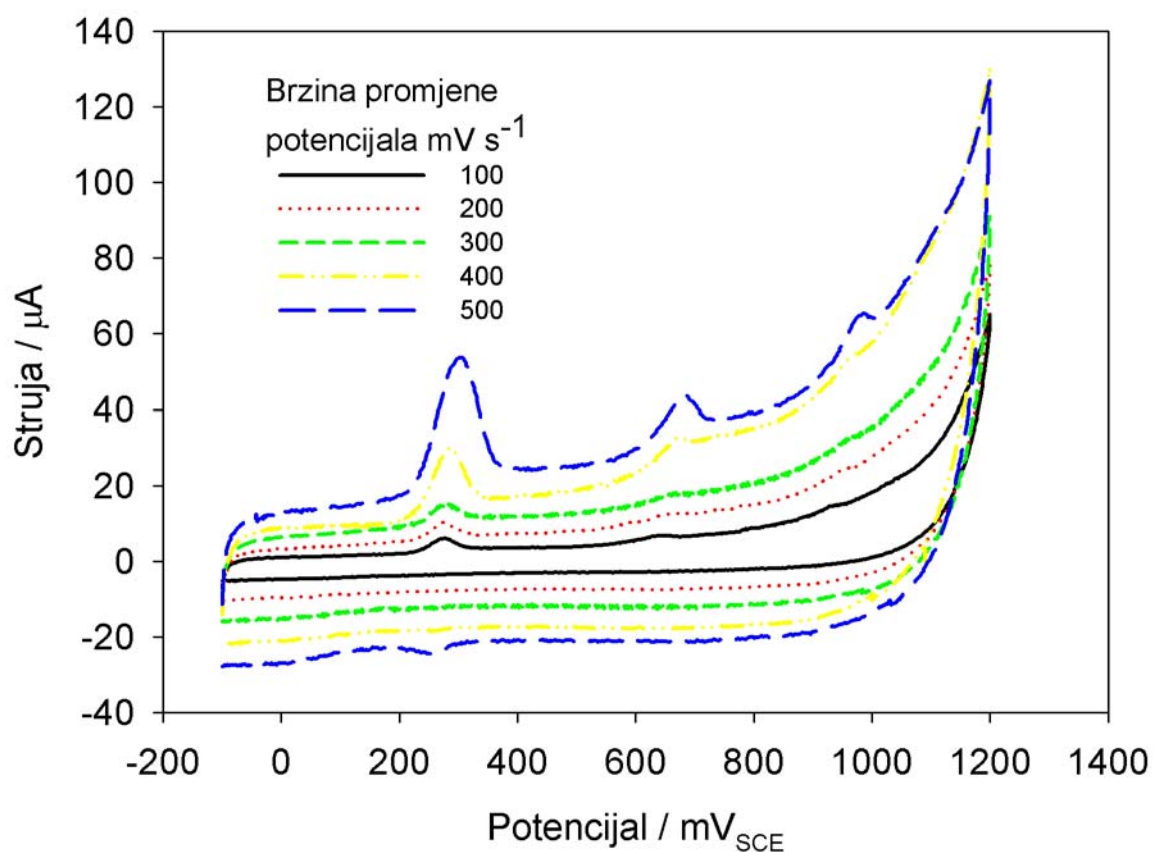
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Snimanje cikličkih voltamograma



SLIKA 11. Ciklički voltamogrami snimljeni u čistoj otopini fosfatnog pufera pH 7.1.

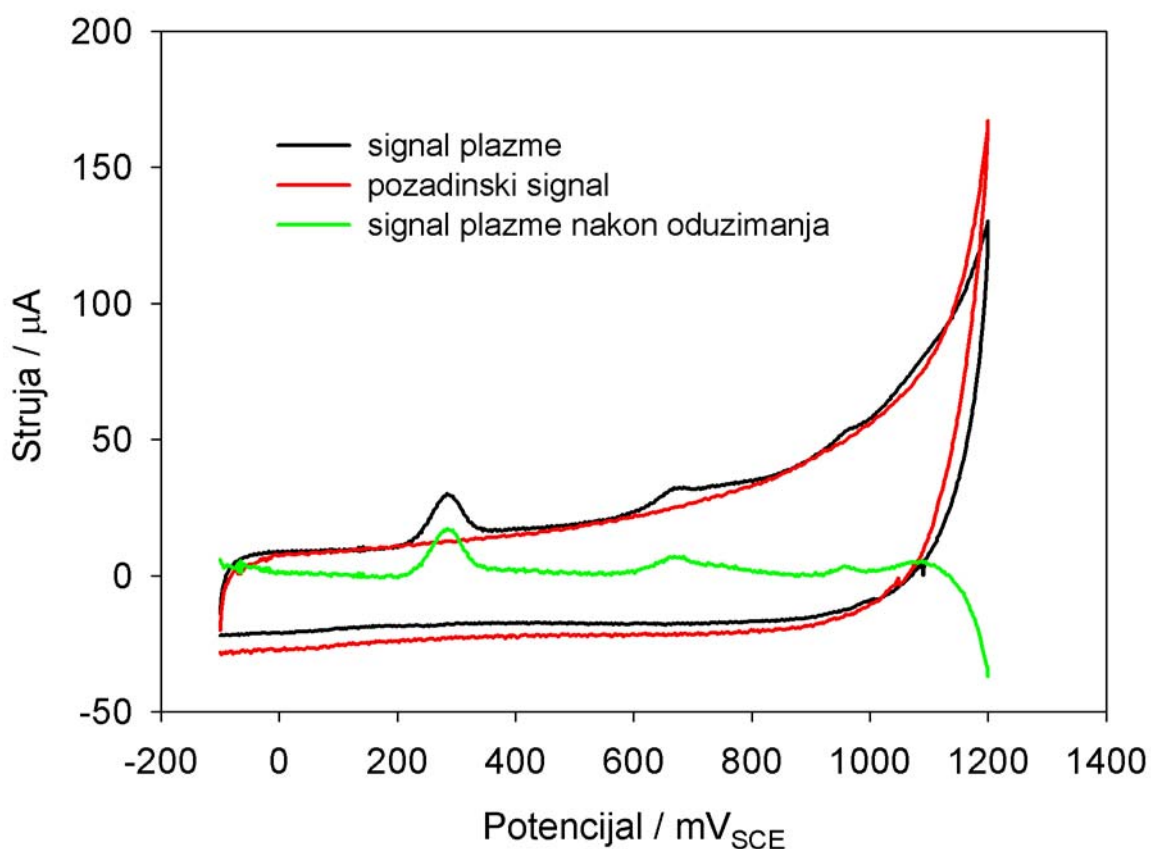
Slika 11. pokazuje cikličke voltamograme mjerene u fosfatnom puferu pH 7.1 pri različitim brzinama promjene potencijala od 100 do 500 mV/s , koji služe kao pozadinski signali. Na slici se može primjetiti da nisu prisutni nikakvi strujni vrhovi ili voltametrijski valovi. Povećanje struje pri visokim potencijalima je povezano sa razvojem kisika, a pri niskim potencijalima, s razvijanjem vodika.



SLIKA 12. Ciklički voltamogrami snimani u razrijeđenoj otopini krvne plazme

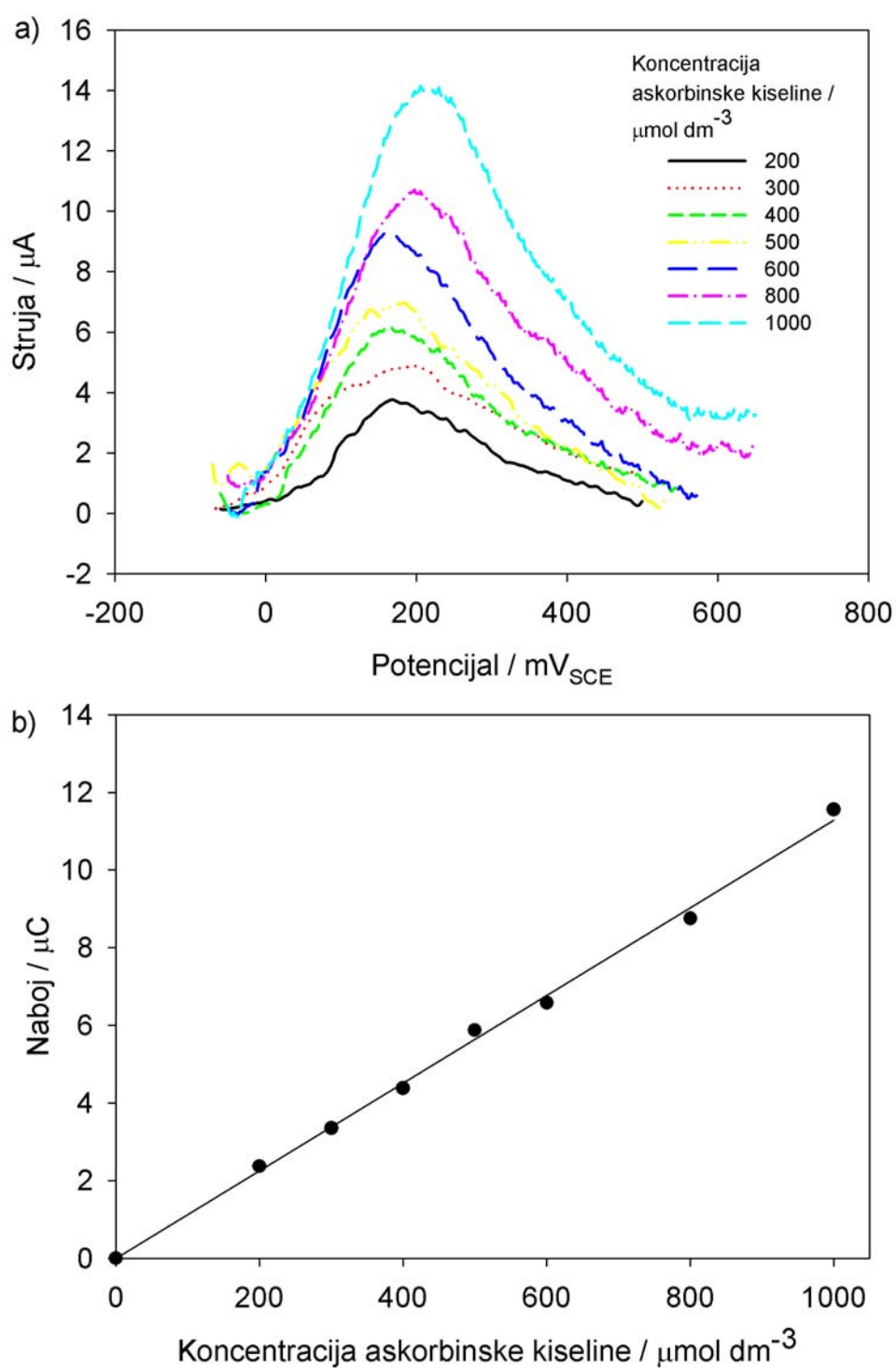
Na slici 12. su prikazani ciklički voltamogrami krvne plazme koja je $10\times$ razrijeđena u fosfatnom puferu pH 7.1, izmjereni pri različitim brzinama promjene potencijala od 100 do 500 mV/s. U ovom slučaju prisutna su tri voltametrijska vala. Brzina promjene potencijala od 400 mV/s je izabrana za daljnja mjerenja budući da su tada signali dovoljno izraženi, a ta je brzina promjene potencijala i često korištena u literaturi, što naknadno omogućava usporedbu rezultata s literaturnim podacima.

Oduzimanje pozadinskog signala od signala izmjenjenog u plazmi, za reprezentativni uzorak plazme, prikazano je na slici 13. Nakon oduzimanja pozadinskog signala, analiziran je samo rezultat dobiven promjenom potencijala u pozitivnom smjeru.

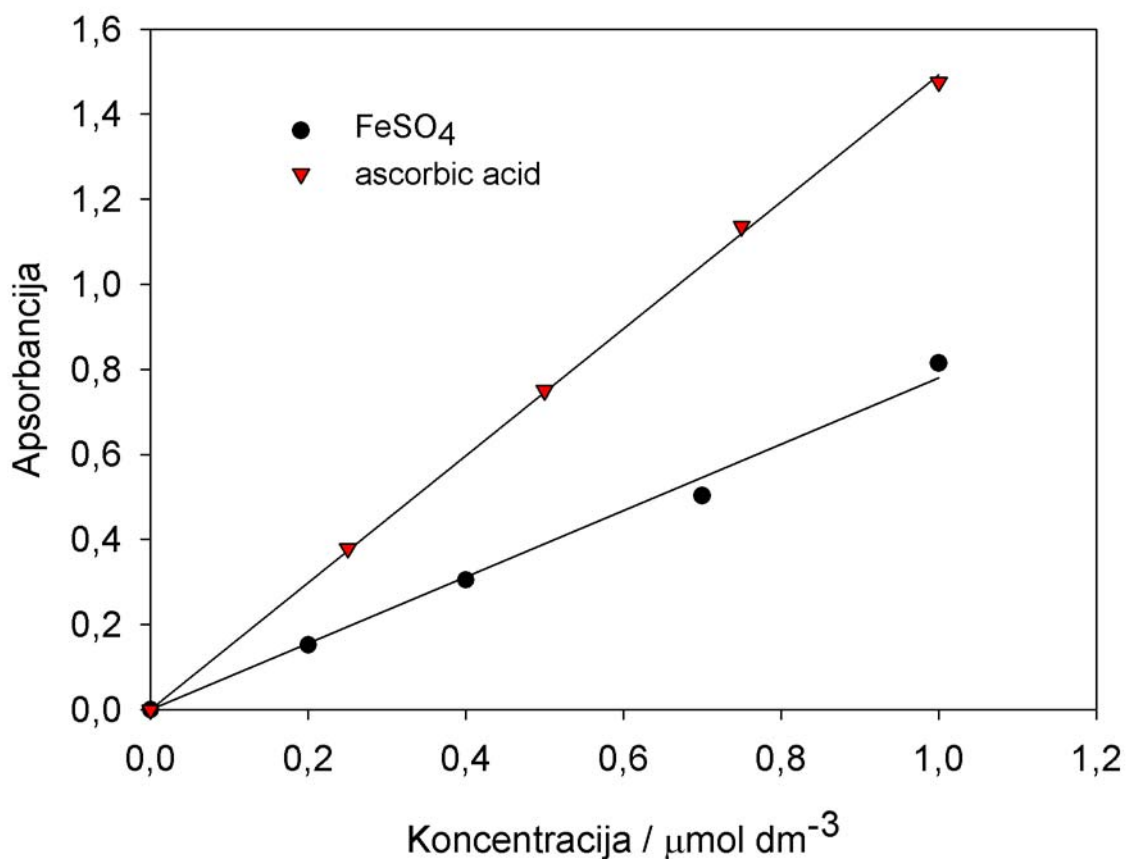


SLIKA 13. Oduzimanje pozadinskog signala za reprezentativni uzorak plazme

Askorbinska kiselina je korištena kao antioksidativni standard i ciklički voltamogrami otopine askorbinske kiseline različitih koncentracija u otopini fosfatnog pufera pH 7.1(oduzet pozadinski signal) prikazani su na slici 14.a. Slika 14.b prikazuje kalibracijski pravac dobiven iz prethodnog mjerenja – linearnu promjenu naboja ispod voltametrijskih valova u ovisnosti o koncentraciji askorbinske kiseline.

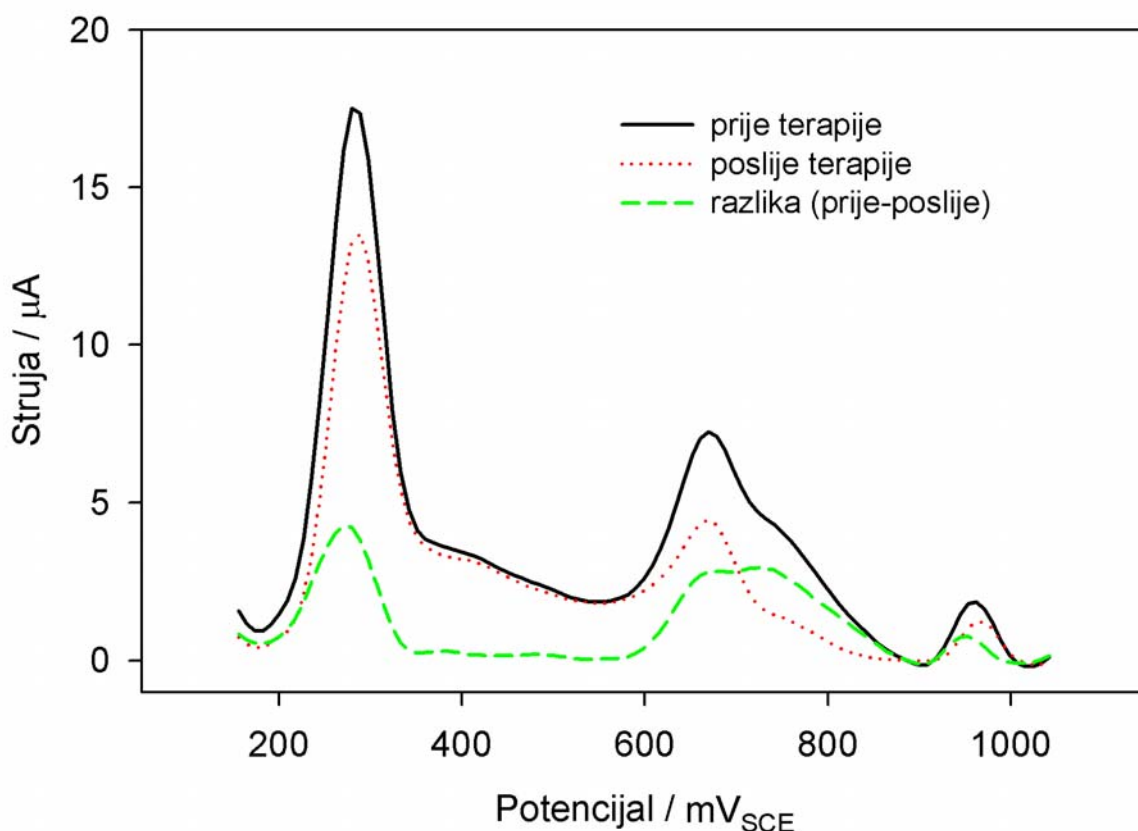


SLIKA 14. a) Ciklički voltamogrami otopina askorbinske kiseline različitih koncentracija u otopini fosfatnog pufera pH 7.1 (oduzet pozadinski signal) i b) Linearna promjena naboja u ovisnosti o koncentraciji askorbinske kiseline.



SLIKA 15. Kalibracijski pravac za askorbinsku kiselinu i FeSO₄ postignut FRAP metodom

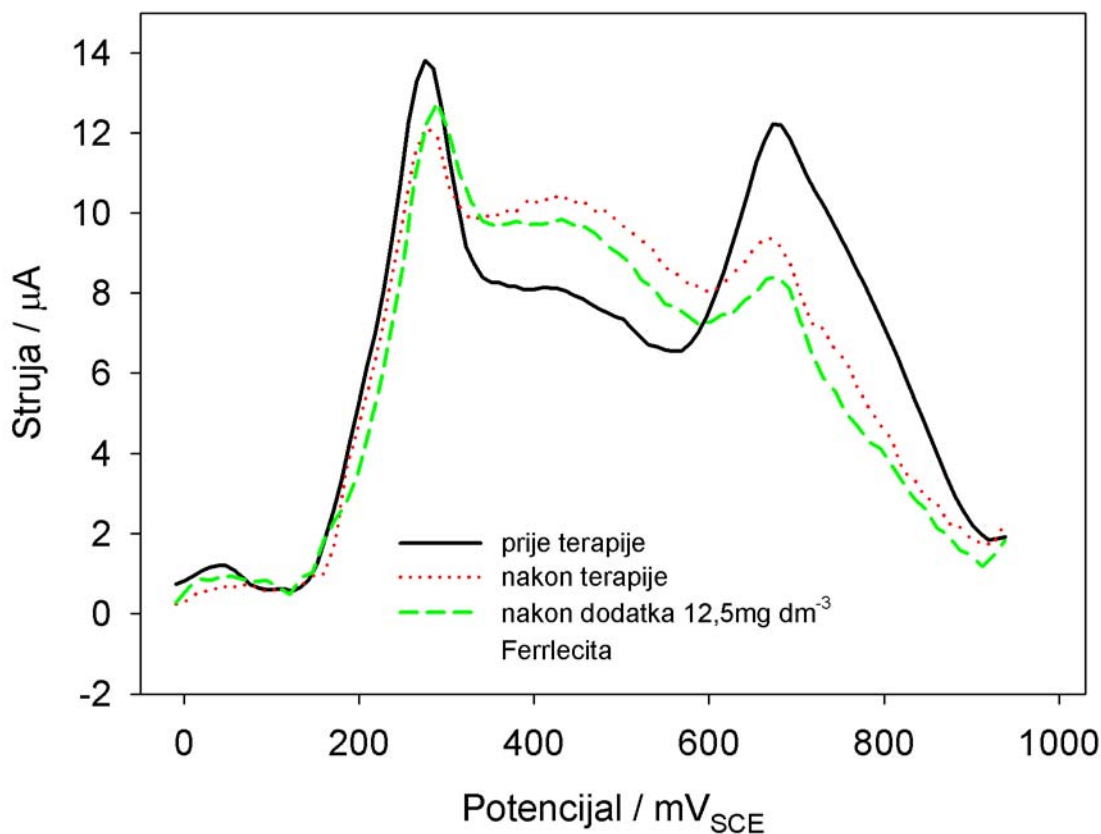
Kalibracijski pravci za askorbinsku kiselinu i FeSO₄ izmjereni FRAP metodom prikazani su na slici 15. Iz grafa se vidi da je nagib kalibracijskog pravca približno dva puta veći za askorbinsku kiselinu nego za FeSO₄, zbog toga što su u prvom slučaju izmijenjena dva elektrona sa FRAP reagensom, dok je u drugom slučaju izmjenjen jedan elektron sa FRAP reagensom. Premda je u FRAP metodi željezo (II) sulfat uobičajeno korišten kao standard, mi u ovom radu FRAP rezultati izraženi su u ekvivalentima askorbinske kiseline kako bismo ih usporedili sa CV rezultatima



SLIKA 16. Reprezentativni voltamogrami uzoraka plazme prije i poslije i.v. infuzije željezo III-sorbitol glukonske kiseline i njihova razlika

Snimani su i reprezentativni voltamogrami uzoraka plazme prije i poslije i.v. infuzije željezo III-sorbitol glukonske kiseline i njihova razlika kao što je prikazano na slici 16.

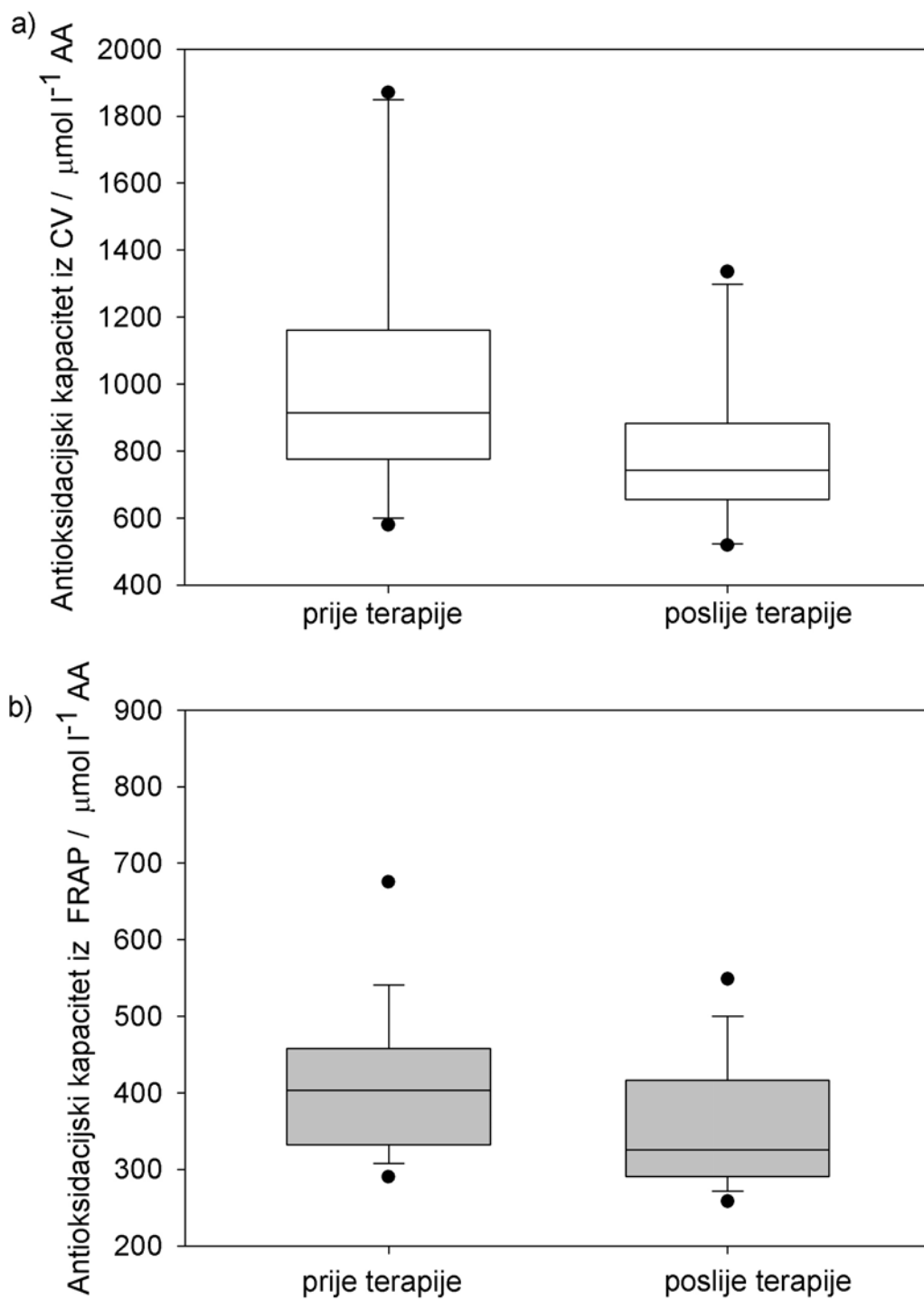
HPLC-om^x je dokazano da prvi val predstavlja askorbinsku i mokraćnu kiselinu, sa poluvalnim potencijalima koji su približno jednaki 300 mV. Drugi val se vjerojatno odnosi na NADH sa potencijalom od oko 500mV, dok su najnovija istraživanja pokazala da se treći val koji u sklopu ovog rada nije uočen u svim uzorcima, odnosi na tiolnu kiselinu.



SLIKA 17. Usporedba *in vivo* i *in vitro* dodatka željezo III-sorbitol glukonske kiseline uzorku plazme

Za uzorak plazme koji pokazuje samo dva voltametrijska vala načinjena je usporedba između *in vivo* (crvena linija) i *in vitro* (zelena linija) dodatka željezo III-sorbitol glukonske kiseline. Može se uočiti da *in vitro* dodatak željezo III-sorbitol glukonske kiseline uzorku sakupljenom prije infuzije daje sličan rezultat kao i uzorak sakupljen poslije *in vivo* dodatka željezo III-sorbitol glukonske kiseline.

Općenito, ciklički voltamogrami razlikuju se za različite uzorke plazme, a različit je i utjecaj željezo III-sorbitol glukonske kiseline na različite grupe antioksidansa male molekularne mase za svaki pojedini uzorak plazme, bilo da se radi o dodatku *in vivo* ili *in vitro*.



SLIKA 18. Statistički obrađeni rezultati mjerenja antioksidacijskog kapaciteta dobiveni CV i FRAP metodama.

Nakon statističke analize primjećeno je značajno smanjenje ($p < 0.05$) antioksidacijskog kapaciteta plazme mjerenog CV i FRAP metodom. Budući da se radi o različitim metodama mjerenja, različiti su i rezultati, ali su obje metode pokazale trend smanjenja. CV metoda pokazala je više rezultate (oko $900 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ekvivalenata AA) sa prosječnim smanjenjem od $170 \mu\text{mol dm}^{-3}$ dok je FRAP metoda pokazala niže rezultate (oko $400 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ekvivalenata AA) sa prosječnim smanjenjem antioksidativnog statusa od $76 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

5. ZAKLJUČAK

Mjerenje antioksidativnog statusa bioloških uzoraka značajno je za predviđanje štetnog djelovanja različitih endogenih i egzogenih faktora koji mogu izazvati oksidacijski stres. U ovom radu korištene su metode cikličke voltametrije i FRAP. Ciklička voltametrija koristi se kao instrument za procjenu sjedinjenog utjecaja antioksidansa male molekularne mase, koji se ponašaju kao reducirajući ekvivalenti u plazmi dok FRAP metoda služi kao direktan test «totalne antioksidativne snage» te za razliku od drugih indirektnih testova za mjerenje antioksidativne snage ne koristi dugotrajne faze priprema za mjerenje. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da su obje metode, CV i FRAP, pogodne za ispitivanje promjene antioksidativnog statusa krvne plazme izazvane i.v. infuzijom željezo III-sorbitol glukonske kiseline.

Iako daju brojčano različite rezultate, obje metode pokazale su smanjenje ($p < 0.05$) antioksidativne aktivnosti između uzoraka sakupljenih neposredno prije i 10 minuta poslije terapije.

6. LITERATURA

1. R. Kohen: The Use of Cyclic Voltammetry for the Evaluation of Oxidative Damage in Biological Samples,1-2
2. R. Kohen, E .Beit-Yannai, E. Berry, O. Tirosh: Overall Low Molecular Weight Antioxidant Activity of Biological Fluids and Tissues by Cyclic Voltammetry,1-2
3. Dicato MD, Harper P: Evolving Issues in Oncology:What is the Optimal Hemoglobin Level?,1-66
4. www.poliklinikaanaliza.hr
5. Finch CA: Erythropoiesis, erythropoietin and iron,1241-124
6. 6. Hoffbrand V. Iron deficiency anaemia u Postgraduate Haematology, ed. A. V. S. M. Lewis, William Heinemann Medical Books LTD London, 1986
7. Boggen DL, Duggan AK, Dover GJ, Wilson MH. Screening for iron deficiency anemia by dietary history in a high risk population. Pediatrics:105(6):1254:9, 2000
8. www.belupo.hr/Default.aspx?sid=4763
9. D. Huang, B. Ou, R.L.Prior, J.Agric. Food Chem. 53(2005) 1841-1856
10. Piljac, I: Elektroanalitičke metode, RMC, Zagreb, 1995., 255-288

