

# Hitachi 911 Klinik Kimya Analizörüne Uyarlanan Metod İle Serum Sülfidril Gruplarının Otomatize Tayini

## Automatized Determination of Serum Sulfhydryl Groups by a Method Adapted to Hitachi 911 Clinical Chemistry Analyzer

Mustafa Serteser

Tülay Köken

Ahmet Kahraman

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Afyon

### ÖZET

Biyolojik tiyoller, hücreyi oksidan strese karşı koruyan en önemli antioksidan defans mekanizmalarından birisidir. Biyolojik materyallerde ölçümleri farklı spektrofotometrik yöntemlerle yapılmaktadır. Bu çalışmada, sıklıkla kullanılan spektrofotometrik yöntemlerden bir tanesi Hitachi 911 Klinik Kimya Analizörüne uyarlanmıştır. Metodun doğruluk, kesinlik ve tekrarlanabilirlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İnter-assay kesinlik %1.8-2.6 (n=15) bulunurken, intra-assay değerler %1.4-1.9 (n=15) arasında bulunmuştur. Elde edilen geri kazanım değerleri %94.6-97.5 arasında olmuştur. Metod 9000 µmol/L'ye kadar lineer bulunmuştur. Otomatize metodun spektrofotometrik metod ile iyi korele olduğu gözlenmiş ve regresyon denklemi  $y=0.817x+58.75$  ( $r^2=0.95$ ) olarak bulunmuştur. Sağlıklı gönüllülerde total sülfidril seviyeleri 606-757 µmol/L arasında ölçülmüştür. Bu yöntem tam otomatizedir ve ölçüm 5 dakikada gerçekleşmektedir. Zaman kazandırıcı ve tekrarlanabilirliğinin olması, fazla sayıda numunelerin kısa sürede çalışmasını sağlayacaktır ve farklı patolojilerin izleminde yardımcı olacaktır.

**Anahtar Sözcükler:** Sülfidril, otomasyon, kesinlik, linearite, geri kazanım

### ABSTRACT

Biological thiols are one of the most important anti-oxidant defense mechanism in protecting cells against oxidative stress. Their determination in biological materials is carried out mainly by different spectrophotometric assays. In this study; one of the commonly used spectrophotometric assay was adapted to Hitachi 911 Clinical Chemistry Analyzer. Precision and accuracy studies were performed. Inter-assay precision was between 1.8-2.6% (n=15) while intra-assay precision was found to be between 1.4-1.9% (n=15). The obtained recoveries were between 94.6-97.5%. The linearity of the assay was up to 9000 µmol/L. The automatized assay correlates well to spectrophotometric assay and gave regression equation of  $y=0.817x+58.75$  ( $r^2=0.95$ ). In healthy volunteers, total sulfhydryl levels were found to be ranging from 606-757 µmol/L. This assay is fully automated and assay time is 5 min. As it is time-saving and reproducible, large number of samples could be processed and this assay could aid the follow up of different pathologic conditions.

**Key Words:** Sulfhydryls, automation, precision, linearity, recovery

## GİRİŞ

Biyolojik tiyoller veya sülfidril (SH) grupları hücreyi oksidan strese karşı korumaktadır. Plazma SH grupları proteinler ile ilişkilidir (1). Plazma SH grupları oksidan hasara yatkın olup plazma seviyeleri; koroner arter hastalıkları, Romatoid Artrit (RA), iskemi-reperfüzyon hasarı gibi birçok patolojide düşük bulunmaktadır (2-4). SH gruplarının tayini genelde spektrofotometrik yöntemlerle yapılmakta olup reaktif olarak 2,2-ditiyobisnitrobenzoik asit (DTNB) kullanılmaktadır ve modifiye edilmiş farklı metodlar belirtilmiştir (1). Bu çalışmada Koster ve ark. (5) tarafından tanımlanan spektrofotometrik metod, Hitachi 911 Klinik Kimya Analizörüne (Roche Diagnostics) uyarlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasal malzemeler Sigma (Deisenhofen, Germany) veya Merck (Darmstadt, Germany) firmasından satın alınmıştır.

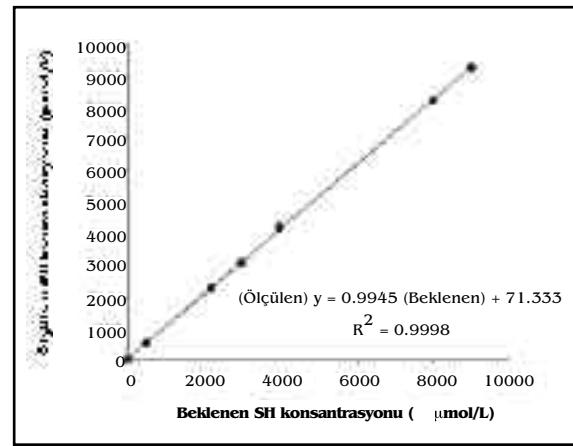
Bu çalışmada Hitachi 911 Klinik Kimya Analizörü şu şekilde kullanılmıştır. 10 µL numune, 350 µL Reaktif 1 (potasyum fosfat tamponu, 0.1 M, pH=7.4) ve 50 µL Reaktif 2 (DTNB solüsyonu, 2 mM, %1 sodyum sitrat içerisinde hazırlanmıştır) ile 5 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Inkübasyon bitiminde 415 nm'de 2 noktalı ölçüm gerçekleştirilmiştir. Distile su içerisinde çözülen redükte glutatyon (GSH) kullanılarak, lineer kalibrasyon metodu uygulanmıştır.

Koster ve ark tarif ettiği spektrofotometrik metod ise şöyledir: 100 µL numune, 1500 µL potasyum fosfat tamponu (pH=7.4, 0.1 M) ile karıştırıldı. 400 µL DTNB solüsyonu (2 mM) ile karıştırıldıktan hemen sonra 5 dakika 37°C'de inkübe edildi. Numunelerin absorbansları Shimadzu UV-1601 spektrofotometresi kullanılarak 412 nm'de reaktif körüne karşı belirlendi. Ekstinksiyon katsayısı,  $\epsilon_{\max} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak konsantrasyonlar tayin edildi ve sonuçlar µmol/L olarak verildi.

## BULGULAR

Linearite, 10000 µM GSH solüsyonunun seri dilüsyonundan elde edilen numuneler ile

belirlenmiştir. Yöntemin 10µmol/L SH seviyelerine kadar hassas olduğu ve linearitesinin 9000 µmol/L'ye kadar olduğu tespit edilmiştir (Grafik 1). İnter-assay kesinlik 15 farklı günde farklı kalibrasyonlar ile numunelerin ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Tablo I'de görülmektedir. İnter-assay kesinlik ise; aynı anda 15 kez ölçülen aynı numuneden elde edilmiştir. Sonuçlar Tablo II'de görülmektedir. Geri kazanım sonuçları Tablo III'te belirtilmiştir.



Grafik 1. SH yöntemi linearitesi.

Tablo I. İnter-assay kesinlik.

| Ortalama sonuç (µmol/L) | 520   | 880   |
|-------------------------|-------|-------|
| CV (%)                  | % 1.8 | % 2.6 |
| S.D.                    | 9.6   | 22.8  |
| n                       | 15    | 15    |

Tablo II. İnter-assay kesinlik.

| Ortalama sonuç (µmol/L) | 316   | 858   |
|-------------------------|-------|-------|
| CV (%)                  | % 1.9 | % 1.4 |
| S.D.                    | 6.1   | 11.9  |
| n                       | 15    | 15    |

Tablo III. Geri kazanım sonuçları.

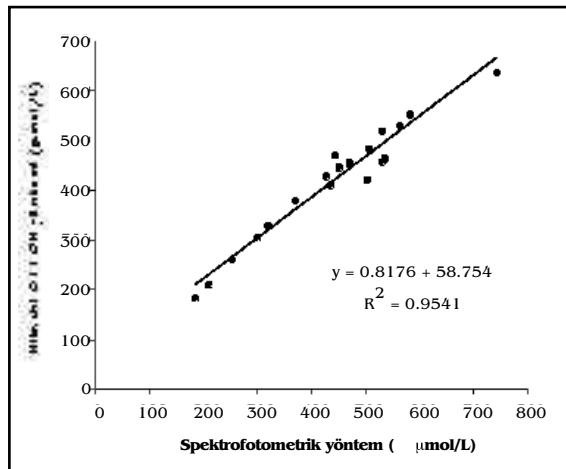
| Beklenen SH konsantrasyonu (µmol/L) | Ölçülen SH konsantrasyonu (µmol/L) | Geri kazanım (%) |
|-------------------------------------|------------------------------------|------------------|
| 570                                 | 567                                | 96.8 %           |
| 951                                 | 925                                | 94.6 %           |
| 2076                                | 2033                               | 97.5 %           |

## TARTIŞMA

Ekstraselüler sıvılar, antioksidan enzimlerden yoksun olsalar bile oksidan hasarı engelleyecek C vitamini, E vitamini, ürik asit ve protein SH grupları gibi birçok molekül içermektedirler (6). Total SH gruplarının serumda belirlenmesi, total antioksidan statüsünün bir bölümünün göstergesi olabilir. Patogenezlerinde oksidan stresin önemli rol oynadığı birçok hastalıkta farklı SH seviyeleri bulunmuştur (2-4,7).

Otomatize klinik kimya analizörlerinin bir hastalığın tanısı ve izleminde kullanılan bir testin ölçümünde kullanılması; hız, zaman kazanımı, tekrarlanabilirlik ve doğruluk açısından önemlidir. Kullandığımız bu yöntem tam otomatize olup ölçüm zamanı 5 dakikadır. Bu ölçüm yöntemi ile 10 µmol/L ye kadar düşük olan SH konsantrasyonları bile belirlenmiştir. Yöntemin linearitesi 9000 µmol/L'ye kadar belirlenmiştir. Kesinlik değerleri kabul edilebilir aralıkta olup %1.4-2.6 arasında bulunmuştur. Otomatize metodun spektrofotometrik metod ile iyi korele olduğu gözlenmiş ve regresyon denklemi  $y=0.817x+58.75$  ( $r^2=0.95$ ) olarak bulunmuştur (Grafik 2).

100 sağlıklı gönüllüde (30-45 yaş arası) ortalamaya serum total SH seviyeleri  $670.07 \pm 56.23$  µmol/L (606-757 µmol/L arası) bulunmuştur. Daha önce yapılan bir çalışmada plazmatotal



**Grafik 2.** Hitachi 911 ölçüm yönteminin spektrofotometrik yöntem ile karşılaştırılması.

SH seviyeleri 400-600µmol/L bulunmuş olup sonuçlarımız bu bulgular ile uyumludur (3). Tablo IV'ten de görülebileceği gibi bazı hastalıklarda serum total SH seviyeleri kontrole göre daha düşük bulunmuştur. Diabetes Mellitus'ta belirlenen düşük SH seviyeleri daha önceki bazı yayınlarda da gösterilmiştir (8, 9). Ayrıca düşük SH seviyeleri, kronik böbrek yetmezlikli ve hemodiyaliz hastalarında da rapor edilmiştir (10). Sonuçlarımız literatürde bulunan bu çalışmalar ile uyumludur. Ayrıca RA, osteoartrit, poliartrit ve gut gibi bağ dokusu hastalıklarında da SH seviyeleri düşük bulunmuştur (11). Farklı tiroid hastalıklarının SH grupları üzerine etkisi de incelenmiştir (12,13).

**Tablo IV.** Serum SH seviyelerinin sağlıklı gönüllülerde (Kontrol) ve bazı hastalıklarda elde edilen değerleri (Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir).

|                          | Serum SH (µmol/L) |
|--------------------------|-------------------|
| Kontrol (n=100)          | 670.07±56.23      |
| Diabetes Mellitus (n=20) | 585.06±56.51*     |
| Hipertiroidizm (n=25)    | 516.33±45.26*     |
| Hipotiroidizm (n=20)     | 480.22±28.59*     |
| RA (n=29)                | 396.26±42.33*     |
| Hemodiyaliz (n=30)       | 402.50±67.49*     |

\*P<0.001 (Kontroller ile karşılaştırıldığında)

Oksidan stresin ve antioksidan defans mekanizmalarının farklı hastalıklardaki rolleri bilinmemektedir. SH gruplarının ölçümünün rutin analizlere eklenmesi, kısmi dahi olsa bu defans mekanizmaları hakkında bilgi edinmemizi sağlayabilir. Bu ölçüm yöntemi hızlı, zaman kazandırıcı ve tekrarlanabilir olduğundan, fazla sayıdaki numunelerde SH gruplarının tayini kısa sürede olacak ve farklı patolojilerin tanı ve izleminde yardımcı olacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* 1994; 233: 380-5.
2. Kadota K, Yui Y, Hattori R, Murohara Y, Kawai C. Decreased sulfhydryl groups of serum albumin in coronary artery disease. *Jpn Circ J* 1991; 55(10): 937-41.
3. Haataja M. Evaluation of the activity of rheumatoid arthritis. A comparative study on clinical symptoms and laboratory tests with special reference to serum sulfhydryl groups. *Scand J Rheumatol Suppl* 1975; 7: 1-54.
4. Hamvas A, Palazzo R, Kaiser L, Cooper J, Shuman T, Velazquez M, et al. Inflammation and oxygen free radical formation during pulmonary ischemia-reperfusion injury. *J Apply Physiol* 1992; 72(2): 621-8.
5. Koster JF, Biemond P, Swaak AJ. Intracellular and extracellular sulfhydryl levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1986; 45(1): 44-6.
6. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.
7. Janiszewski M, Gaweda J, Drzewoski J. Concentration of serum sulphhydryl groups in patients with rheumatoid arthritis dependent on age and duration of disease. *Wiad Lek* 1994; 47(17-18): 654-8.
8. Ceriello A, Bortolotti N, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, et al. Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest* 1998; 28(4): 329-33.
9. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-12.
10. Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000; 58: 2571-8.
11. Lorber A, Pearson CM, Meredith WL, Gantz-Mandell LE. Serum sulfhydryl determinations and significance in connective tissue diseases. *Ann Int Med* 1964; 61: 423-34.
12. Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S, De Leo T. Effects of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences and susceptibility to oxidative stress in rat tissue. *J Endocrinol* 1997; 155(1): 151-7.
13. Petrov NS, Sidorov SA. The diagnostic value of determining free sulfhydryl groups in serum in thyroid gland diseases. *Probl Endokrinol* 1971; 17(5): 54-7.

---

#### Yazışma adresi:

Dr. Mustafa Serteser  
Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı, Afyon  
Tel: 0 272 2171753 Faks: 0 272 2172029  
GSM: 0 532 6742413  
E-posta: serteser@aku.edu.tr

---