

Redükte Glutasyon Ölçümünde HPLC ve Spektrofotometrik Yöntemlerin Karşılaştırılması

The Comparison of Spectrophotometric and HPLC Methods in Reduced Glutathione Measurements

Melih Aktaş* Ulaş Değirmenci* Seval Kul Ercan** Lülüfer Tamer* Uğur Atik*

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mersin

* Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, ** Biyoistatistik Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Redükte glutasyon hücre içi ortamın en önemli antioksidan molekülüdür ve ölçümü patogenezinde oksidatif stresin bulunduğu çeşitli hastalıklarda antioksidan savunma mekanizmasının durumu hakkında bilgi edinmemiz için iyi bir belirteçdir. Bu çalışmada eritrosit redükte glutasyon düzeyleri ölçümünde Beutler ve arkadaşları tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntem ile HPLC yöntemi karşılaştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma grubumuzu oluşturan 50 bireyden (15 erkek, 35 kadın) alınan tam kan örneklerinde spektrofotometrik ve HPLC yöntemiyle redükte glutasyon seviyeleri ölçüldü.

Bulgular: Spektrofotometrik ve HPLC ile ölçülen redükte glutasyon sonuçlarının ortalama ve SD değerleri sırayla 953.15 ± 215.91 ve 972.58 ± 230.19 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulundu ve her iki yöntem arasında istatistiksel olarak kabul edilebilir bir ilişkinin varlığı saptandı ($r = 0.9499$, 95% CI $0.913 - 0.971$; $y = 1.018x$).

Sonuç: İş yükünün yoğun olduğu klinik laboratuvarlarda maliyet ve uygulama kolaylığı göz önüne alınarak redükte glutasyon ölçümünde spektrofotometrik yöntem yerine HPLC yönteminin uygun olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Oksidatif stres, redükte glutasyon, spektrofotometre ve HPLC

ABSTRACT

Objective: Reduced glutathione is the most important antioxidant molecule of intracellular medium and a good marker for investigating antioxidant defence mechanism in diseases which are caused by oxidative stress. In this study we compared the spectrophotometric measurement method developed by Beutler and colleagues and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for measuring the levels of reduced glutathione in erythrocyte.

Materials and Methods: For this aim we measured reduced glutathione levels of the whole blood samples collected from fifty individuals (15 male, 35 female) by spectrophotometric and HPLC methods.

Results: The mean and SD values of the reduced glutathione were calculated as 953.15 ± 215.91 $\mu\text{mol/L}$ by spectrophotometric method and 972.58 ± 230.19 $\mu\text{mol/L}$ by HPLC method and we

determined statistically meaningful correlation between both methods ($r = 0.9499$, 95% CI 0.913 – 0.971; $y = 1.018x$).

Conclusion: We concluded that in reduced glutathione measurement HPLC method may be more suitable than spectrophotometric method for busy clinical laboratory when easy application and cost are considered.

Key Words: Oxydative stress, reduced glutathione, spectrophotometry and HPLC

GİRİŞ

Antioksidan savunma mekanizmaları canlılarda normal metabolik işleyiş sırasında sürekli oluşan serbest radikalleri yok eden veya zararlı etkilerini azaltan sistemlerdir. Serbest radikallerin oluşumu ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin serbest radikaller yönünde bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır ve sonuçta lipidler, proteinler, karbohidratlar ve DNA gibi biyolojik moleküllerde oksidatif hasar meydana gelir (1,2,3,4). Karsinogenez, yaşlanma, inflamasyon, postiskemik reperfüzyon hasarı, diyabet, nörolojik, immünolojik, kardiyovasküler ve solunum hastalıklarının patogeneğinde ve ilerlemesinde oksidatif hasarın önemli rolü olduğu kanıtlanmıştır (1,2,3,5).

Hücre içi ortamın en önemli antioksidan molekülü olan redükte glutatyonun antioksidan savunma sisteminde görev almaktan başka ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmesi, aminoasitlerin transportu, proteinlerdeki sülfidril gruplarının redükte halde tutulması, bazı enzimatik reaksiyonlarda koenzim görevi görmesi gibi birçok fizyolojik fonksiyonu vardır (1,6,7). Glutatyon peroksidaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla redükte formdaki glutatyon (GSH) hidrojen peroksit veya lipid peroksidlerle reaksiyona girerek bu moleküllerin detoksifikasyonunda rol alırken kendisi başka bir glutatyon molekülüyle disülfid köprüsü oluşturarak okside glutatyon (GSSG) formuna dönüşür. Hücre içerisinde serbest radikallerin detoksifikasyonunun sürdürülmesi için okside glutatyonun redükte formuna geri dönüştürülmesi gerekir. NADPH'nin kullanıldığı bir reaksiyonla okside glutatyon glutatyon redüktaz enzimi ile tekrar redükte glutatyon formuna çevrilir (1,8).

Serbest radikallerin direkt ölçüm yöntemlerinin zorluğu nedeniyle redükte glutatyon ölçümünün yapılması oksidatif stresin ve antioksidan savunma sisteminin durumu hakkında bize önemli bilgiler sağlar. Bu çalışmada eritrosit redükte glutatyon düzeyinin Beutler ve ark. (9) tarafından tanımlanan spektrofotometrik yöntemle ölçülmesiyle elde edilen sonuçların yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle elde ettiğimiz sonuçlarla arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi kan alma ünitesine gelen 50 poliklinik hastasından (15 erkek – 35 kadın) gerekli izinler alındıktan sonra EDTA'lı (2 mg/ml) tüplere kan örnekleri alındı.

Beutler ve arkadaşları tarafından tanımlanan spektrofotometrik redükte glutatyon ölçüm yöntemine göre 0.2 ml tam kan 2 ml distile su ile karıştırıldı. Elde edilen hemolizattan 2 ml alıp içerisinde 50.1 mg glasiel metafosforik asit, 6 mg disodyum EDTA ve 0.9 g sodyum klorid bulunan 3 ml prespite edici solüsyonla karıştırıldı ve 5 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldıktan sonra filtre kağıdı ile süzüldü. Filtrattan 0.5 ml alınarak 2 ml disodyumfosfat solüsyonu (0.3 M) ile karşılaştırıldı ve Varian Cary 50 (Victoria, Australia) spektrofotometresi kullanılarak 412 nm'de reaktif körüne karşı absorbanı okundu. Daha sonra küvete 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) solüsyonundan (1 mM, %1'lik sodyum sitrat içerisinde hazırlanmıştır) 0.25 ml eklenip karıştırıldı ve tekrar absorbanı okundu. Her bir örneğin DTNB eklendikten sonra elde edilen absorban değerinden ilk okunan absorban değeri çıkarılarak elde

edilen optik dansite farkı 1627 μm ol'ük redükte glutasyon standardının optik dansite farkı ile karşılaştırılarak redükte glutasyon konsantrasyonları $\mu\text{mol/L}$ olarak hesaplandı.

HPLC ile redükte glutasyon ölçümünde Chrom-systems Diagnostics'e (Kit kodu: AV 6600 Gluathione E, Martinsried-Germany) ait kit sistemi ve Agilent Technologies (Waldbronn-Germany) marka HPLC sistemi kullanıldı. Redükte glutasyon analizinde 10 μl tam kana 400 μl prespitsyon reaktifi eklendi, 30 saniye vortekslenildi ve 13000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanttan 50 μl alınıp üzerine 100 μl derivatizasyon reaktifi eklendi ve 50-55°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. HPLC ile analiz aşamasında mobil faz akış hızı 1.3 ml/dk olan yaklaşık 25°C'deki kolon sistemine hazırlanan örnekten 40 μl enjekte edildi ve elde edilen elüattaki redükte glutasyonun ölçümü eksitasyon dalga boyu 385 nm, emisyon dalga boyu 515 nm olarak ayarlanmış floresan dedektörüyle yapıldı. Örneklerden elde edilen redükte glutasyon piklerinin integratör programı ile alanları hesaplandı ve internal standardının pik alanı ile karşılaştırılarak redükte glutasyon konsantrasyonları hesaplandı.

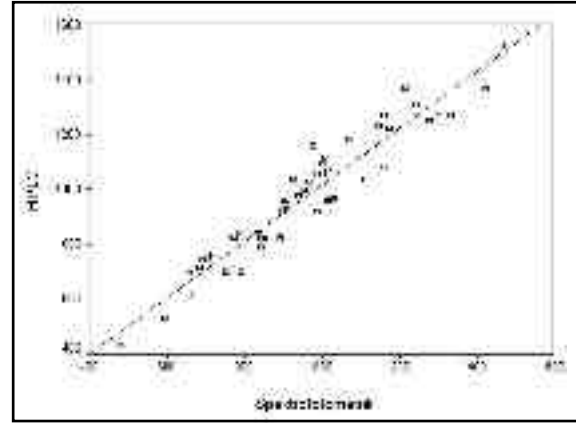
İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS 10,0 programı kullanıldı. İstatistiksel parametreler redükte glutasyon seviyesinin HPLC yöntemiyle ve Beutler ve arkadaşları tarafından tanımlanan spektrofotometrik ölçüm yöntemine göre elde edilen sonuçlar olarak kaydedildi. Her iki yöntem arasındaki uyum intraclass korelasyon (ICC) testi ile araştırıldı ve HPLC yöntemi sonuçlarını Spektrofotometrik yöntem sonuçları yardımıyla tahmin etmek için regresyon denklemi oluşturuldu.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 50 bireyin (15 erkek, 35 kadın) yaşları 1 ile 75 arasında değişmekteydi (41.48±20.05). İstatistiksel değerlendirme neticesinde Beutler ve arkadaşları tarafından geliştirilen spektrofotometrik redükte

glutasyon ölçüm metodu ve HPLC ölçüm metodu ile elde edilen değerlerin ortalamasının sırayla 953.15±215.91 $\mu\text{mol/L}$ ve 972.58±230.19 $\mu\text{mol/L}$ (ortalama ± SD) olduğu belirlendi. İki yöntem sonuçları arasında uyum istatistiksel olarak anlamlı bulundu (ICC = 0.9499, %95 güven aralığı 0.9137 – 0.9712). Her iki yöntem arasında HPLC= 1.018 x Spektrofotometrik gibi bir regresyon denkleminin varlığı belirlendi.

Çalışmaya dahil etmiş olduğumuz 50 hastanın spektrofotometrik ve HPLC ölçüm yöntemleriyle elde edilen redükte glutasyon sonuçları arasındaki ilişki Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1. Spektrofotometrik ve HPLC ölçüm yöntemleriyle elde edilen eritrosit redükte glutasyon düzeyi sonuçları arasındaki ilişki ($\mu\text{mol/L}$).

TARTIŞMA

Biyolojik sistemlerde sürekli oluşan serbest radikaller antioksidan savunma mekanizmaları ile nötralize edilerek zararlı etkileri engellenmeye çalışılır (5). Süperoksid dismutaz, katalaz, glutasyon peroksidaz gibi enzimler ve glutasyon, seruloplazmin, transferrin, haptoglobulin, albümin, bilirubin, ürik asit ve vitaminler gibi moleküller organizmayı serbest radikallerin toksik etkilerinden koruyan antioksidan mekanizmaların önemli bir kısmını oluştururlar (1,10).

Glutamik asit, sistesin ve glisinden oluşan bir tripeptid olan glutasyon (-glutamilsisteinilglisin) hücre içi ortamın en önemli antioksidan

molekölü olmasının yanı sıra ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmesi, aminoasit transportu, proteinlerdeki sülfidril gruplarının redükte halde tutulması, enzimatik reaksiyonlarda koenzim görevi görmesi gibi birçok fizyolojik fonksiyonu vardır (1,11).

Diabet, kronik böbrek yetmezliği, romatoid artrit, osteoartrit gibi patogenezinde oksidatif stresin önemli rol oynadığı birçok hastalıkta redükte glutasyon seviyeleri düşük bulunmuştur (12,13,14). Bu nedenle redükte glutasyon seviyesinin ölçümü patogenezinde oksidatif stresin bulunduğu çeşitli hastalıklarda antioksidan savunma mekanizmalarının durumu hakkında bilgi edinmemiz için iyi bir göstergedir (16,17,18).

Yaptığımız çalışmada tam kanda redükte glutasyon seviyesinin HPLC yöntemi ile Beutler ve arkadaşları tarafından tanımlanan spektrofotometrik yöntemle ölçülmesiyle elde edilen sonuçların uyumluluğu açısından anlamlı bir korelasyonun olduğu saptanmıştır.

Noctor ve Foyer'in (19) yaptıkları yapraklardan elde ettikleri ekstrelerde glutasyon seviyesinin spektrofotometrik ve iki farklı florometrik HPLC yöntemiyle ölçüm karşılaştırması çalışmasında her üç yöntemle elde ettikleri sonuçların birbirleriyle uyumlu olduğunu bulmuşlar ve HPLC yöntemiyle tek bir okuma işlemi ile glutasyon, -glutamilsistein ve 16 amino asidin ölçümünü gerçekleştirmişlerdir. Neuschwander-Tetri ve Roll (20) rat karaciğer homojenatı, safrası ve plazmasında glutasyon seviyesinin HPLC yöntemiyle florometrik ölçümü üzerine yaptıkları çalışmada elde ettikleri sonuçların kütle spektrometrisi ile elde ettikleri sonuçlarla uyumlu olduğunu göstermişlerdir. Floreani ve ark. (21) guinea-pig kalp ve karaciğer dokularında yaptıkları çalışmada enzimatik, florometrik ve kolorimetrik glutasyon ölçüm yöntemlerini HPLC yöntemiyle karşılaştırmış ve kalp dokusunda bu yöntemlerle elde ettikleri sonuçların HPLC ile uyumlu olduğu, karaciğer dokusunda florometrik yöntemin diğer yöntemlere göre daha yüksek değerler ölçtüğü saptamışlardır.

HPLC yöntemiyle redükte glutasyon ölçümünün spektrofotometrik yöntemle göre daha az örnek hacmine ihtiyaç duyması, daha az manuel işlem gerektirmesi ve analiz aşamasının tam otomatize olması gibi avantajları bulunmakla birlikte yöntemin maliyetinin pahalı olması ve kalifiye teknik personel gerektirmesi dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle az sayıda örneğin çalışıldığı klinik laboratuvarlarda spektrofotometrik redükte glutasyon ölçüm yönteminin, çok sayıda örneğin çalışıldığı iş yükünün yoğun olduğu klinik laboratuvarlarda ise HPLC ölçüm yönteminin kullanımının daha uygun olabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Sözmen EY. Yaşlanma biyokimyası. In: Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık; 2002: 665-74.
2. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Amos BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and humar disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 526-45.
3. Stohs SJ. The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Phrmcol* 1995; 6: 205-28.
4. Chappey O, Dosoquet C, Wautier MP. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur Clin Invest* 1997; 27: 97-108.
5. Halliwell B. Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med* 1987; 107: 526-45.
6. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jügens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341-90.
7. Arrick B, Nathan C. Glutathione metabolism as determinant of the therapeutic efficacy: a review. *Cancer Res* 1984; 33: 4224-32.
8. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yay; 1995.
9. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-90.
10. Sinclair AJ, Barnett AH, Junec J. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Bri J Hosp Med* 1990; 43: 334-344.
11. Byung P.Y. Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiol Rev* 1994; 74: 139-72.
12. Koster JF, Biemond P, Swaak AJ. Intracellular and extracellular sulphhydryl levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1986; 45(1): 44-6.

13. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-12.
14. Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000; 58: 2571-8.
15. Yagi K. Lipid peroxidase and related radicals in clinical medicine. In: Armstrong D. Free radicals in diagnostic medicine. New York: Plenum Pres; 1994: 17-27.
16. Katoda 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.
17. Hamvas A, Palazzo R, Kaiser L, Cooper J, Shuman T, Velazquez M. Inflammation and oxygen free radical formation during pulmonary ischemia-reperfusion injury. *J Apply Physiol* 1992; 72(2): 621-8.
18. 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.
19. Noctor G, Foyer CH. Simultaneous measurement of foliar glutathione, -glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. *Anal Biochem* 1998; 264: 98-110.
20. Neuschwander-Tetri BA, Roll FJ. Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorometric detection of the glutathione-orthophthalaldehyde adduct. *Anal Biochem* 1989; 179(2): 236-41.
21. Floreani M, Petrone M, Debetto P, Palatini P. A comparison between different methods for the determination of reduced and oxidized glutathione in mammalian tissues. *Free Radic Res* 1997; 26(5): 449-55.

Yazışma adresi:

Dr. Melih Aktaş
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin
Tel : 0.324 337 43 00
GSM: 0.536 652 64 28
Fax : 0.324 337 43 05
E-mail: melihaktas2003@yahoo.com
