



PLAZMA GLUTAMİN DÜZEYLERİNİN İKİ YÖNTEM İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

THE EVALUATION OF PLASMA GLUTAMINE LEVELS BY TWO METHODS

Sibel KONYALIOĞLU Abdullah ÖZYER

Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Bornova, izmir

Anahtar Sözcükler: ince tabaka kromatografisi, İTK-okuyucu aleti, glutamin.

KeyWords: thin layer chromatography, TLC-scanner Instrument, glutamine.

ÖZET

Kan plazması glutamin analizinde kullanılan ince tabaka kromatografisi ile kombine bir spektrofotometrik yöntem (İTK-SPK) bilinmektedir. Amacımız, bu yöntem ile ince tabaka kromatografisinde özel okuyucu (İTK-Okuyucu) yardımıyla geliştirdiğimiz yöntemi kıyaslamaktır. Bu amaçla, 35 sağlıklı bireyden kan alınıp plazmaları ayrılmıştır. Ekstraksiyondan sonra, ince tabaka kromatografisi ile ayrılmış glutaminin spektrofotometrik ve İTK-okuyucu' aletinde miktar tayinleri yapılmıştır. Sağlıklı kişilerden alınan kan plazma örneklerinin İTK-okuyucu ve spektrofotometrik yöntemle bulunan glutamin düzeyleri arasında uygunluk bulunmuştur (korelasyon katsayısı, r: 0.883).

SUMMARY

It has been known a method used analysis of glutamine in blood plasma combined with thin layer chromatography (TLC-SPC). Our aim was to compare this method (TLC-SPC) with 'TLC-Scanner' procedure combined with thin layer chromatography developed by us. With this aim, we collected blood from 35 healthy volunteer controls and separated their plasma. After the extraction procedure, glutamine was separated by thin layer chromatography and quantitative analysis was carried out in "TLC-Scanner" and spectrophotometer. Glutamine results, obtained by spectrophotometric procedure in plasma samples taken from healthy controls were complied with the results of 'TLC-Scanner' (correlation coefficient, r: 0.883).

GİRİŞ

Glutamin insan vücudunda en yüksek düzeyde bulunan amino asid olup (1), amonyak metabolizmasında önemli role sahiptir (1, 2, 3). Glutamin hızlı bir şekilde proliferere olabilen hücreler için önemli bir metabolik substrattır (1). Pürin, pirimidin ve fosfolipidler ile glutatyon molekülü için bir prekürsördür (2). Ayrıca ısı-şok proteinlerinin sentezini uyarır (1, 2). Bunlara ek olarak, glutamin hücre volümünün osmotik regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Hem hücre içi protein sentezini uyarır hem de proteinlerin fosforilasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (2, 3). Bu amino asidin eksikliği sonucu, lenfositlerde antijenlere karşı gelişen Yavaşma adresi: Sibel Konyalıoğlu, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Bornova, izmir
Makalenin geliş tarihi: 03. 01. 2000; kabul tarihi:18. 04. 2000

şecek aktivasyon sinyalinin oluşmadığı; monositlerde ise antijenleri tanıma ve fagositozda bazı aksaklıklara neden olabileceği ileri sürülmüştür (1). Deneysel çalışmalar, yine glutamin eksikliğinin nekrotik enterokolite neden olduğunu ortaya koymaktadır (1). İlk klinik çalışmalar, kemik iliği transplantasyonu yapılmış bireylere glutamin verilmesi sonucu, hastaların hastanede kalış sürelerinin kısaltıldığı ve enfeksiyon insidanslarında da bir düşme olduğunu göstermiştir. Ayrıca hiperamonemi ile karakterize edilen hepatik ansefalopati ve Reye Sendromu ile üre siklusunda doğuştan olan metabolizma bozukluklarında plazma glutamin düzeyleri artmaktadır. Siroz, respiratuvar ve metabolik asidoz ile belirli kanser türlerinde ise plazma glutamin miktarı azalmaktadır (2, 4). Literatür taramaların-

dan edindiğimiz tüm bu bilgiler ışığında, patolojik olgular-
da tanıyı destekleme ve hastalığın seyrini izleme, ayrıca
glutaminin girdiği normal veya patolojik metabolik olayların
mekanizmalarını aydınlatma açısından glutamin tayini
önem kazanmaktadır.

Günümüzde amino asit tayinlerinde İTK'dan çok, yüksek
performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (5, 6), gaz
kromatografisi (GC) (7, 8), anyon ve katyon değiştirici
kromatografiler ile kombine çalışan amino asit analizörleri,
fluorometrik ve radyoaktif metodlar gibi yüksek teknoloji
gerekiren yöntemler uygulanmaktadır (9, 10). Yine de İTK
kısa, ucuz ve basit olduğu için günümüzde hala kullanıl-
abilmektedir. Glutamin tayini için bilinen İTK ile kombine
spektrofotometrik bir yöntem ile yine bizim sunduğumuz
İTK ile kombine İTK-okuyuculu yöntemi uyguladık. Bu
araştırmanın amacı iki yöntemin sonuçlarını kendi arala-
rında kıyaslayarak, yeni yöntemin geçerliliği hakkında bilgi
edinmektir

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasal Maddeler: Glutamin (Sigma, G 9003), ninhidrin
(Merck, 6762), kadmiyum asetat dihidrat (Merck, 2003),
isopropanol (Merck, anhidroz 405-7), aseton (Merck, 14),
silikagel 60G (Merck, 7731).

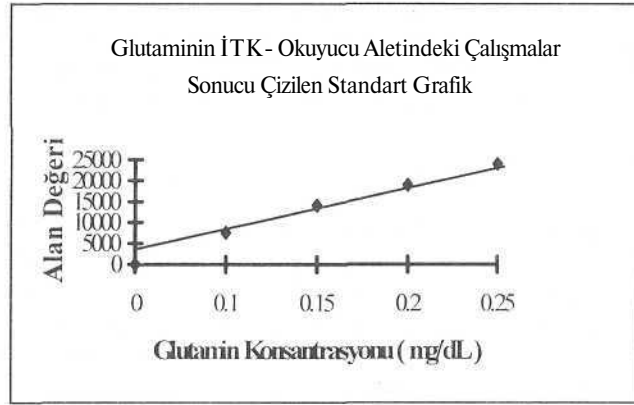
Gereçler: 20x20 cm boyutlarında cam plaklar, ince tabaka
kromatografisi (İTK) tankı, İTK yayma aksesuarları, mikro-
enjektör, santrifüj, otomatik karıştırıcı, etüv, spektrofoto-
metre (Perkin Elmer Spectrophotometer Coleman 295),
İTK-okuyucusu (TLC-Scanner Model CS 920 Shimadzu).

Çalışma Materyali: Hiçbir hastalığı olmayan ve herhangi
bir ilaç kullanmayan 20 kadın 15 erkek toplam 35 kişiden
3'er mL kan heparinli tüplere alınır. Kan örneklerinin 3000
rpm'de 10 dakika santrifüj işlemini takiben, elde edilen
plazmadan 1 mL alınarak temiz bir santrifüj tüpüne konur.
Üzerine %1 HCl içeren 8 mL aseton konup tüpün ağzı
parafinlenerek 2 saat oda ısısında tutulur. Bu sürenin
sonunda tekrar 3000 rpm'de santrifüj edilir ve süzülür.
Süzülen süpernatant 37 °C'de kuruluğa kadar uçurulur.
Geriye kalan artık 0.5 mL distile su ile sulandırılıp, aynı
miktar eter ile bir kaç kez ekstrakte edilir. Sulu faz tekrar
37 °C'de etüvde uçurulur. Kalıntı 100 jL distile suda çö-
zündürülerek İTK'ya uygulanacak duruma getirilmiş oldu.
Buradan alınan 10 µL hacmindeki örnek, mikroenjektör
yardımı ile aktive edilmiş silikagel 60G plağına tatbik edilir,
isopropanol : %10 Amonyak (70:30) (v/v) solvent sistemi
ile doyurulmuş İTK tankında amino asitlerin ayrılması
sağlandı. Plak [arıktan çıkarılarak asgari 105 °C'de iki saat
hava akımlı etüvde kurutulur. Lekeyi belirlemek için
ninhidrin püskürtülerek tekrar 105 °C'de 20 dakika daha
etüvde tutulur (11).

Yöntemler: Bu aşamadan sonra örneklere iki farklı işlem
uygulanmıştır.

1. İTK-SPK Yöntemi: Bu yöntem için, Esser (12), Voight
(13) ve Wollenweber'in (14) çalışmaları esas alınmıştır.
Yöntemde, İTK'da ayrılan glutamine ait leke plaktan kazı-
nır. Bir santrifüj tüpüne konur. Üzerine metanol içinde 0.5
g/ dL kadmiyum asetat içeren çözeltiden 2 mL ilave edilir.
Pembe renkli kadmiyum-glutamin-ninhidrin kompleksinin
oluşumu için 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten
sonra 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilir. Daha sonra
spektrofotometrede 500 nm dalga boyunda köre karşı
okunur (Kör tüpü : Plaktan kazınan boş silikagei 60G ve
metanoldeki 0.5 g / dL kadmiyum asetat çözeltisinin 2
mL'sinden ibarettir).

2. "İTK-Okuyucu" Yöntemi: Bizim yöntemimiz, tanktan
çıkarılan plağa ninhidrin belirteci püskürttükten sonra,
koyu pembe renkli glutamin lekesinin İTK-okuyucu aletin-
de 413 nm dalga boyundaki alan değerinin ölçülmesi
esasına dayanmaktadır. Plazmaya ait glutamin düzeyleri,
glutamin standartlarının (0.1 - 0.15 - 0.20 - 0.25 mg / dL)
10°L'sinin plaklara tatbik edilmesi suretiyle çizilen stan-
dard grafikten yararlanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 1. İTK-Okuyucusundan elde edilen standart grafik.

BULGULAR

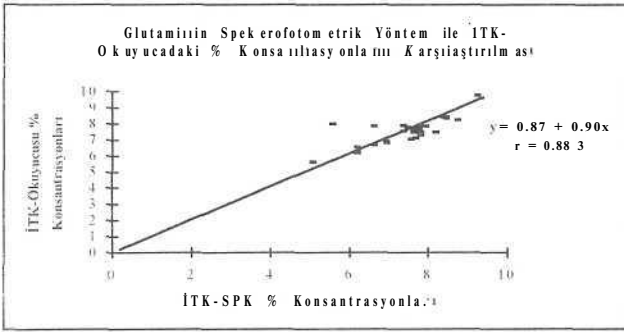
Her iki yöntem ile 35 sağlıklı bireye ait glutamin düzeyleri
ve bu iki yöntemin karşılaştırılmasında nonparametrik
eşleştirilmiş t testi yapılarak iki yöntem arasında farkın
anlamli olmadığı ortaya konmuştur.

Tablo 1. Her iki yöntemle göre saptanan ortalama plazma değerleri
(mg/dL) ile standart hataları (S.H.) ve istatistiksel değerlendirme sonucu.

	İTK-SPK	İTK-Okuyucu	Eşleştirilmiş t-testi
Ort±S.H.	7.583 ±0.015	7.711±0.067	p>0.05

Tüm istatistiksel analizlerimiz SPSS Windows programı-
nın 5.01 versiyonundaki paket programlar kullanılarak

bilgisayarda yapılmıştır. İTK-Okuyucu yöntemine ait performansı belirlemek amacıyla plaklara uygulanan değişik glutamin standartlarını ölçerek, bu yöntemin 0.05-100 mg/dL konsantrasyon aralığında lineer olduğu gözlemlendi. Tekrarlanabilirlik çalışmasında, 9.1, 7.5 ve 5.6 mg/dL glutamin içeren plazma örnekleri kullanılarak 10 tekrarlı çalışma sonucunda hesaplanan ort ± S.D ve CV değerleri sırasıyla; 9.1 ± 0.5 , CV: %0.5; 7.5 ± 0.7 , CV: %1.2 ve 5.6 ± 0.8 , CV: %1.3 olarak bulundu. Verimlilik çalışmaları için glutamin değeri bilinen plazma havuzuna eklenerek yapılan çalışmalarda ortalama verim %93 olarak saptandı. İTK-SPK ölçüm yönteminin (x), İTK-Okuyucu (y) yöntemi ile sağlıklı bireylerde alınan kan örnekleri ile yapılan karşılaştırmada iki yöntem arasında iyi bir korelasyon olduğu gözlemlendi (Şekil 2, $y = 0.87 + 0.90x$, $a \pm 2Sa = 0.714$, $b \pm 2Sb = 0.044$, $Sy/x = 1.94$, $r = 0.883$).



Şekil 2. İTK-Okuyucu aleti ve İTK-SPK yönteminin karşılaştırılmasına ilişkin regresyon grafiği.

TARTIŞMA

Tüm amino asitlerin kimyasal yapısı ve kromatografik davranışları arasında korelasyon vardır. Glutamin oldukça polar olduğu için, kullanılacak plak ve mobil faz seçiminde

de oldukça polar sistemler önerilmiştir (1, 2, 3, 11, 12). Silikagel 60G plağı ve isopropanol: %10 amonyak (70:30) (v/v) solvent sistemi bizim laboratuvar şartlarımızda en iyi ayrımı sağlayan sistem olarak belirlenmiştir.

Bu araştırmada uygulamaya çalıştığımız her iki yöntemin tüm ekipman ve materyalleri hemen hemen tüm araştırma laboratuvarlarında bulunur ve diğer yöntemlere kıyasla daha az miktarda plazma gerektirir. İTK-SPK'ya göre İTK-okuyucusu ile geliştirdiğimiz yöntemin taşıdığı bazı avantajlar vardır. Bu avantajlardan biri glutamin lekesini plaktan kazımaya ihtiyaç yoktur. Böylece daha kolay ve az da olsa glutamin miktarında kayıp olmaksızın ölçümü mümkün olmaktadır. Ayrıca İTK-SPK'da olduğu gibi kompleksleştirmeye gerek olmadığı için de başka kimyasal maddeye (kadmiyum asetat) gereksinim duyulmamaktadır. Plakda renklenme işlemi bitirildikten sonra lekeler 30 saniye gibi kısa bir zamanda okunabilmektedir. Bu yüzden diğer yöntemlere göre bizim yöntemimiz daha kısa zamanda ve daha az maliyetle glutamin miktar tayinine olanak sağlamaktadır. Bir plağa bir çok plazma tatbiki ve tanka iki veya üç plak konması suretiyle çok daha fazla sayıda örnek çalışması yapılabilir.

Kontrol grubundaki plazma glutamin düzeyleri" İTK-okuyucu" yönteminde (ort ± S.H) 7.711 ± 0.067 mg, İTK-SPK yönteminde 7.583 ± 0.015 mg bulunmuştur. Her iki yöntemde bu amino asit düzeyleri literatürlere benzerlik göstermektedir (15). Ayrıca bu iki yöntemde bulunan glutamin düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$). Sonuç olarak, ince tabaka kromatografisi ve İTK-okuyucusu ile kombine olarak geliştirdiğimiz yöntemin, plazmada glutamin tayininde kullanılabilecek bir yöntem olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Roth E, Spittler A, Oehler R, Glutamin: Wirkungen auf das Immunsystem, auf Eiweißhaushalt und Darmfunktionen. Wien Klin Wochenschr 1996; 108(21): 669-76.
2. Roth E, Kamer J, Intracellular amino acid concentrations in various disease states. Infusionsther Klin Ernähr 1987; 14(4): 147-50.
3. Fischer CP, Bode BP, Abcouwer SF, Lukaszewicz GC, Souba WW, Hepatic uptake of glutamine and other amino acids during infection and inflammation. Shock 1995; 3(5): 315-22.
4. Patience JF, A review of the role of acid-base balance in amino acid nutrition. J Anim Sci 1990; 68(2): 398-408.
5. Halawa I, Baig S, Oureshi GA, Use of high performance liquid chromatography in defining the abnormalities in the free amino acid patterns in the cerebrospinal fluid of patients with aseptic meningitis. Biomed Chromatogr 1991; 5(5): 216-20.
6. Bhagavan NV, A Comprehensive Review, New York, JB Lipincott Company, 1974.
7. Williams BD, Chinkes DL, Wolfe RR, Alanine and glutamine kinetics at rest and during exercise in humans. Med Sci Sports Exerc 1998; 30(7): 1053-58.
8. Collins FS, Summer GK, Determination glutamine and glutamic acid in biological fluids by gas chromatography. J Chromatogr 1978; 145:456-463.
9. Nahorski SR, Fluorometric measurement of glutamine and asparagine using enzymic methods. Anal Biochem 1971; 42: 136-142.
10. Hofford JM, Milakofsky L, Vogel WH et al., The nutritional status in advanced emphysema associated with chronic bronchitis. A study of amino acid and catecholamine levels. Am Rev Respir Dis 1990; 141 (4 Pt 1) : 902-8.
11. Stahl E, Thin Layer Chromatography, New York, Springer-Verlag Company, 1969; 583-584.

12. Esser K, Ein dunnschichtchromatographisches verfahren zur quantativen bestimmung von aminosauern und aminozuckern im mikromassstab. J Chromatogr 1965; 18:414-416.
13. Voigt S, Solle M, Konitzer K, Dünnschichtomatographicce Abtrennung von GABA aus hir naxtrakten. J Chromatogr 1962; 9: 369-371.
14. VVollerweber P, Dünnschicht-Chromatographische trenungen an cellulose-schichten. J Chromatogr 1962; 9: 372-3
15. Damaun D, Mattheus DE, Bier DM, Glutamine and glutamate kinetics in humans. Am J Physiol 1986; 251 (E): 117—126.