

# MALONDİALDEHİT ÖLÇÜMÜNDE HPLC VE SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Melih Aktaş\*, Ulaş Değirmenci\*, Hatice Yıldırım\*, Seval Kul Ercan\*\*, Lülüfer Tamer\*,  
Uğur Atik\*

\*Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı

\*\*Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı

## ÖZET

Biyolojik sistemlerde oksidatif hasarın in vivo göstergesi olarak en çok kullanılan belirteç malondialdehit'tir (MDA). Bu çalışmada MDA düzeyinin belirlenmesinde Yagi tarafından geliştirilen spesifik olmayan spektrofotometrik ölçüm yöntemiyle daha spesifik olan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) yöntemi arasında karşılaştırılma yapılması amaçlandı. Bu amaçla 50 hastadan alınan serum örneklerinde spektrofotometrik ve HPLC yöntemiyle MDA seviyeleri ölçüldü. Spektrofotometrik ve HPLC sonuçlarının ortalama  $\pm$  SD değerleri sırayla  $16,36 \pm 20,231$  ve  $0,304 \pm 0,143$   $\mu\text{mol/L}$  olarak bulundu. Her iki yöntem sonuçları ile yapılan intraclass korelasyon analizinde korelasyon saptanmadı ( $r = -0,2325$ ). Spektrofotometrik MDA ölçüm yönteminde serumda bulunan bazı glikoproteinler, aminoasitler ve benzeri bileşiklerin interferansa neden olarak yanlış yüksek MDA düzeylerinin ölçülmesine ve HPLC yöntemiyle ölçtüğümüz değerlerden 5 ile 225 kat yüksek sonuçların bulunmasına neden olduğu görüldü. Bu nedenle klinik laboratuvarlarda MDA ölçümünde HPLC yönteminin kullanılmasının daha uygun olabileceği sonucuna varıldı.

*Anahtar kelimeler: Oksidatif hasar, malondialdehit, spektrofotometre ve HPLC*

## SUMMARY

### THE COMPARISON OF SPECTROPHOTOMETRIC AND HPLC METHODS IN MDA MEASUREMENTS

Malondialdehyde (MDA) is the most used marker as an in vivo indicator of the oxydative

*Yazışma adresi:*

*Melih Aktaş*

*Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi*

*Biyokimya Anabilim Dalı*

*Mersin / TÜRKİYE*

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi  
2004;4:365-370

damages in biologic systems. In this study we aim to compare the nonspecific spectrophotometric measurement method developed by Yagi and spesific High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for measuring the level of the MDA. For this aim we measured MDA levels of the serum samples collected from fifty patients by spectrophotometric and HPLC methods. The median and SD values of MDA were determined as  $16,36 \pm 20,231 \mu\text{mol/L}$  by spectrophotometric method and  $0,304 \pm 0,143 \mu\text{mol/L}$  by HPLC method. By using intraclass correlation analysis we can't determine correlation between both methods ( $r = -0,2325$ ). Some glycoproteins, aminoacids and similar molecules found in the serum gives interference in spectrophotometric MDA measurement method and causes wrong high MDA measurements. Because of this effect we measured from 5 to 225 times higher MDA results than the results measured by HPLC method. We concluded that for MDA measurements HPLC method may be more suitable for clinical laboratories.

*Key words: Oxidative damages, malondialdehyde, spectrophotometry and HPLC*

#### GİRİŞ

Canlılarda normal metabolik reaksiyonlar sırasında ve radyasyon, toksik kimyasal maddeler, ilaçlar gibi dış etkenlerle sürekli oluşan serbest radikaller antioksidan savunma mekanizmaları ile nötralize edilirler. Fizyolojik koşullarda serbest radikal üretimi ile antioksidan mekanizmalar arasında bir denge vardır. Bu dengenin serbest radikaller yönünde bozulması sonucunda serbest radikal düzeyi artar ve lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA gibi biyolojik moleküllerde oksidatif hasar oluşur. Karsinogenez, yaşlanma, inflamasyon, postiskemik reperfüzyon hasarı, diyabet, nörolojik, immünolojik, kardiyovasküler ve solunum hastalıklarının patogeneğinde ve ilerlemesinde oksidatif hasarın önemli rolü olduğu kanıtlanmıştır (1-5).

Hücre membranlarının yapısında büyük miktarlarda bulunan doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerin etkisiyle peroksidasyonu oksidatif doku hasarının en önemli nedenlerinden biridir. Doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaşması sonucu oluşan lipid radikali moleküler oksijenle birleşerek lipid peroksil radikalini meydana

getirir. Başka bir doymamış yağ asidi ile tepkimeye giren lipid peroksil radikali yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendisi de lipid hidroperokside dönüşür. Çeşitli metal iyonlarının katkısı ve bazı enzimatik tepkimeler sonucunda lipid hidroperoksid molekülü malondialdehit (MDA), etan, pentan gibi çeşitli yıkım ürünlerine parçalanır (2,6).

Serbest radikallerin direkt ölçüm yöntemlerinin zorluğu nedeniyle serbest radikal aracılı doku hasarının göstergesi olarak daha çok oksidatif hasar sonucu oluşan ürünlerin ölçülmesi yoluna gidilmektedir. Bu amaçla lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden biri olan MDA oksidatif hasarın in vivo göstergesi olarak en sık ölçülen parametredir (7).

Günümüzde MDA düzeyinin belirlenmesinde kullanılan spektrofotometrik yöntemler tiyobarbitürik asidin MDA ile reaksiyona sokulması sonucu oluşan pembe renkli bileşiğin ölçümüne dayanmaktadır. Bu yöntemde tiyobarbitürik asit MDA dışında bazı glikoproteinler, aminoasitler ve benzeri bileşiklerle de aynı reaksiyona girmekte ve yanlış yüksek ölçümlerin yapılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle MDA ölçümüne spesifik

olmayan bu yöntemde tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddeleri (Thiobarbituric Acid Reactive Substances - TBARS) ölçen yöntem adı da verilmektedir.

Yapılan çalışmalarda MDA ölçümlerinde florometrik HPLC yönteminin spektrofotometrik yönteminden doğruluğunun ve hassasiyetinin daha yüksek olduğunun gösterilmesi nedeniyle son yıllarda MDA ölçümlerinde HPLC yönteminin kullanımı giderek artmaktadır (8,9). Bu yöntemde MDA'nın kromatografik ayrımının ve florometrik ölçümünün yapılması daha doğru sonuç elde edilmesini sağlamaktadır.

Bu çalışmada 50 poliklinik hastasının serum örneklerinden Yağ tarafından geliştirilen spektrofotometrik MDA ölçüm yöntemi (10) ile elde ettiğimiz sonuçlar ile yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle elde ettiğimiz sonuçların karşılaştırılması ve istatistiksel değerlendirilmesinin yapılması amaçlandı.

#### GEREÇ VE YÖNTEM

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi kan alma ünitesine gelen 50 poliklinik hastasından (16 erkek- 36 kadın) gerekli izinler alındıktan sonra kan örnekleri biyokimya tüplerine alındı, 1300 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve serumları ayrılarak -20 0C'de ölçüm işleminin yapılacağı güne kadar saklandı.

Spektrofotometrik serum MDA düzeyi ölçümünde Yağ tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı (10). Bu yöntem lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden biri olan MDA'nın tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girecek 532 nm'de maksimum absorbans veren pembe renkli bileşik oluşturmasına dayanır. Yağ tarafından geliştirilen spektrofotometrik MDA ölçüm yönteminde 50 µl hasta serumuna 100 µl sodyumdodesilsülfat solüsyonu (%8.1'lik), 750 µl asetik asit solüsyonu (% 20'lik),

750 µl tiyobarbitürik asit solüsyonu (%0,8'lik, pH=3.5), 350 µl distile su eklendi, vorteksle karıştırıldı ve 30 dakika 950C'de su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hemen soğutulan tüplere 500 µl distile su, 2.5 ml piridin-n bütanol solüsyonu (1:14) eklendi ve tüp içeriği homojen oluncaya kadar vortekslendi. Daha sonra 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilen tüplerin üst kısmından alınan pembe renkli bileşiğin absorbansı Varian Cary 50 (Victoria, Australia) spektrofotometresi kullanılarak 532 nm'de reaktif körüne karşı okundu. Ölçümde standart olarak 1,1,3,3 tetrametoksiopropan kullanıldı ve örneklerin MDA konsantrasyonları 6.05 µmol/luk standartla karşılaştırılarak µmol/L olarak hesaplandı.

HPLC ile serum MDA ölçümünde Chromsystems Diagnostics'e (Martinsried-Germany) ait kit sistemi ve Agilent Technologies (Waldbronn-Germany) marka floresan dedektörlü isocratic HPLC sistemi kullanıldı. MDA analizinde 100 µl serumda 500 µl prespitasyon reaktifi eklendi, 10 saniye vortekslendi ve 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek serumdaki proteinler çöktürüldü. Elde edilen süpernatanttan 500 µl alınıp başka bir tübe aktarıldı, üzerine 100 µl derivatizasyon reaktifi eklendi, tüplerin ağzıları kapatıldı ve 10 saniye vortekslendikten sonra 950C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hemen soğutulan örnekler 500 µl nötralizasyon tamponu eklenerek karıştırıldı. HPLC ile analiz aşamasında mobil faz akış hızı 1 ml/dk olan yaklaşık 20-25 0C 'deki kolon sistemine hazırlanan örnekten 40µl enjekte edildi ve elde edilen elüattaki MDA'nın ölçümü eksitasyon dalga boyu 515 nm, emisyon dalga boyu 553 nm olarak ayarlanmış floresan dedektörüyle yapıldı. Serum örneklerinden elde edilen MDA piklerinin integratör programı ile alanları hesaplandı ve kalibrasyon standardının

pik alanı ile karşılaştırılarak serum MDA konsantrasyonları  $\mu\text{mol/L}$  olarak hesaplandı.

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS 10,0 programı kullanıldı. İstatistiksel parametreler serum MDA seviyesinin HPLC yöntemiyle ve Yagi tarafından geliştirilen spektrofotometrik ölçüm yöntemine göre elde edilen sonuçlar olarak kaydedildi. Her iki yöntem arasındaki uyum intraclass korelasyon testi ile araştırıldı.

#### SONUÇLAR

Çalışmaya dahil edilen 50 hastanın (16 erkek, 34 kadın) yaşları 16 ile 71 arasında değişmekteydi ( $42,9 \pm 15,7$ ). İstatistiksel değerlendirme neticesinde Yagi tarafından geliştirilen spektrofotometrik MDA ölçüm metodu ve HPLC ölçüm metodu ile elde edilen değerlerin ortalamasının sırayla  $16,36 \pm 20,231 \mu\text{mol/L}$  ve  $0,304 \pm 0,143 \mu\text{mol/L}$  (ortalama  $\pm$  SD) olduğu belirlendi. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar ile yapılan intraclass korelasyon analizinde korelasyon saptanmadı ( $r = -0,2325$ ).

#### TARTIŞMA

Serbest radikaller bir orbitalinde paylaşılmamış elektron taşıyan oldukça reaktif atom ve moleküllerdir (1,3). Biyolojik sistemlerde sürekli oluşan serbest radikaller antioksidan savunma mekanizmaları ile nötralize edilerek zararlı etkileri engellenmeye çalışılır (5). Serbest radikallerin üretimi ve antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki denge bozulduğunda serbest radikallerin düzeyi artar ve lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA gibi biyolojik moleküllerde oksidatif hasar meydana gelir(2,11). Karsinogenez, yaşlanma, inflamasyon, postiskemik reperfüzyon hasarı, diyabet, nörolojik, immünolojik, kardiyovasküler ve solunum hastalıklarının patogeneğinde ve ilerlemesinde oksidatif

hasarın önemli rolü olduğu kanıtlanmıştır (1,2,3,5,11-18).

Oksidatif hasarın derecesinin belirlenmesinde serbest radikallerin direkt ölçüm yöntemlerinin zorluğu nedeniyle daha çok serbest radikallerin biyolojik moleküllerle girdiği reaksiyonlar sonucu oluşan ürünlerin ölçülmesi yoluna gidilmektedir(7). Bu amaçla oksidatif hasarın in vivo göstergesi olarak en çok kullanılan belirteç serbest radikallerin doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girmesiyle meydana gelen lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden birisi olan malondialdehit'tir. Oksidatif hasar üzerine yapılan çok sayıda çalışma serbest radikallerin aktivitelerinin artışının bir göstergesi olarak MDA düzeylerinde belirgin artışların olduğu kanıtlanmıştır (19,20,21). Bununla birlikte MDA'nın hücre membranlarının geçirgenliğini arttırdığı, membranların iyon alışverişine etki ederek hücre içi iyon dengesini bozduğu, enzim aktivitelerinin bozulmasına, DNA'nın yapısında kırılmalara ve baz değişimlerine neden olduğu gösterilmiştir (2,6).

MDA düzeyinin spektrofotometrik ölçümü genellikle tiyobarbitürik asit ile MDA'nın reaksiyona girerek pembe renkli bileşik oluşturmaya dayanır. MDA dışında başka bazı bileşiklerin de aynı reaksiyonu vermesi nedeniyle bu yönteme tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddeleri (Thiobarbitüric Acid Reactive Substances - TBARS) ölçen yöntem adı da verilmektedir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar MDA'ya spesifik olmamakta ve yanlış yüksek sonuçlar ölçülmektedir. HPLC yöntemiyle MDA ölçümünde MDA'nın kromatografik ayrımının ve MDA'ya spesifik dalga boylarında florometrik ölçümünün yapılması spektrofotometrik yöntemle göre daha doğru sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır.

Çalışmaya dahil ettiğimiz 50 hastanın serumlarından yaptığımız MDA ölçüm

çalışmasında Yagi tarafından geliştirilen spesifik olmayan spektrofotometrik ölçüm yöntemi ve daha spesifik olan HPLC yöntemi ile elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir korelasyonun olmadığı ve spektrofotometrik yöntemle ölçtüğümüz MDA düzeylerinin HPLC yöntemi ile elde ettiğimiz değerlerden 5 ile 225 kat yüksek olduğu saptanmıştır.

Yu-Lun Hong ve arkadaşlarının 16 Tayvanlı kolej öğrencisinin plazma örneklerinde yaptıkları spektrofotometrik ve HPLC florometrik ölçüm yöntemleriyle elde ettikleri plazma MDA değerleri arasında bizim yaptığımız çalışmaya benzer şekilde bir korelasyonun olmadığı saptanmıştır ( $r = -0,346$ ) (22).

Spektrofotometrik MDA ölçüm yönteminin spesifik olarak MDA'yı ölçmeyerek birçok maddeyle interferansa uğraması, yanlış yüksek sonuçların okunmasına neden olması ayrıca çok fazla manuel işlem gerektirmesi nedeniyle daha spesifik MDA ölçümü yapılabilmesini sağlayan HPLC yönteminin klinik laboratuvarlarda kullanımının daha uygun olabileceği sonucuna varılmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987;107:526-45.
2. Sözmen EY. Yaşlanma biyokimyası. In: Onat T, Emerk K, Sözmen EY, eds. *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002:665-74.
3. Stohs SJ. The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Phrmcol* 1995;6:205-28.
4. Chappay 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. Moslen MT. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In: Armstrong D, ed. *Free radicals in diagnostic medicine*. New York: Plenum Press, 1994;1-15.
7. Holley AE, Cheeseman KH. Measuring free radical reactions in vivo. *Br Med Bul* 1993;49:494-505.
8. Volpi N, Tarugi P. Improvement in the high-performance liquid chromatography malondialdehyde level determination in normal human plasma.
9. Fenaille F, Mottier P, Turesky RJ, et al. Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders.
10. Yagi K. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. In: Armstrong D, ed. *Free Radicals in diagnostic medicine*. New York: Plenum Pres, 1994;1-15.
11. Ames BN, Gold LS, Willet WC. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5258-65.
12. Çimen MYB, Tataroğlu C, Büyükkakılı B, et al. Effects of erythropoetin on antioxidant status of diabetic rats. *ME.Ü Tıp Fak Dergisi* 2003;4:1-45-50.
13. Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalibam S, et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in type-II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci* 1996;90:255-60.
14. Haffner SM, Agil A, Mykkanen L, et al. Plasma oxidizability in subjects with normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance and NIDDMT. *Diabetes Care* 1995;18:646-53.
15. Öztürk HS, Çimen MYB, Çimen ÖB, et al. Oxidant/antioxidant status of plasma samples from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1999;19:35-7.
16. Wolf SP. Diabetes mellitus and free radicals. In: Cheeseman KH, Slater TF, eds. *Free radicals in medicine*. Churchill Livingstone: The British Council, 1993:642-52.
17. Zukowska-Szczepkowska E, Czerwik W.