

Sağlıklı Erkek Farelerde (*Mus musculus*) Eritrosit ve Karaciğer Antioksidan Sistemlerin Referans Değerleri

Ergül BELGE KURUTAŞ

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Adana - TURKEY

Figen DORAN, Seyhan VARİNLİ

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Adana - TURKEY

Geliş Tarihi: 24.05.2000

Özet: Bu çalışmada, ileride yapılacak toksikolojik araştırmalar için temel kontrol verilerini sağlamak amacıyla eritrosit ve karaciğer dokusunda glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ve redükte glutatyon (GSH) düzeyleri için referans değerlerini bulmak amaçlanmıştır. Ayrıca, karaciğer G6PDH enziminin en iyi saklanma koşulları saptanmıştır. Çalışma kapsamına karaciğer bulgusu normal bulunan (histopatolojik veri) sağlıklı erkek *Mus musculus* (38) alınmıştır. Eritrosit ve karaciğer dokusunda G6PDH, GPX aktivitesi ve GSH düzeyi Beutler metoduyla, SOD aktivitesi Fridovich metoduyla saptanmıştır. Eritrositte GR aktivitesi Beutler metoduyla, karaciğer dokusunda GR aktivitesi Staal metoduyla saptanmıştır. Eritrosit ve karaciğer dokusunda enzimlerin ve redükte glutatyon düzeylerinin ortalama değerleri (SD) sırasıyla; G6PDH: 22,28 (3,53) Ü/g Hb, 2,38 (1,09) Ü/g karaciğer; GPX: 134,88 (16,83) Ü/g Hb, 22,34 (4,70) Ü/g karaciğer; GR:7,23 (1,58) Ü/g Hb, 2,47 (1,31) Ü/g karaciğer; SOD: 4062,94 (929,41) Ü/g Hb, 553,71 (214,25) Ü/g karaciğer; GSH: 9,70 (1,64) µmol/g Hb, 0,94 (0,22) µmol/g karaciğer bulunmuştur. Karaciğer G6PDH enziminin en iyi saklanma koşulları; +4°C 'de 7 gün ve -70°C ve -20°C'de 30 gün olarak saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Mus musculus*, eritrosit, karaciğer, antioksidan sistemler, referans değerler

Reference Values for Erythrocyte and Liver Antioxidant Systems in Healthy Male Mice (*Mus musculus*)

Abstract: The aim of the present study was to define the reference values for erythrocyte and liver tissue glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD) activities and also reduced glutathione (GSH) levels in order to obtain basal data for subsequent toxicological investigations. In addition, the best storage conditions were determined for liver G6PDH enzyme. Male, apparently healthy *Mus musculus* (38) specimens that had normal livers (histopathological data) were included in the study. G6PDH and GPX activities and GSH levels were measured by the Beutler method, and SOD activity was measured by the Fridovich method in the erythrocyte and liver tissues. GR activity in the erythrocyte was measured by the Beutler method, and GR activity in the liver was measured by the Staal method. The mean value (SD) of the levels of the enzymes and reduced glutathione in erythrocyte and liver tissues were as follows: G6PDH: 22.28 (3.53) U/g Hb, 2.38 (1.09) U/g liver; GPX: 134.88 (16.83) U/g Hb, 22.34 (4.70) U/g liver; GR:7.23 (1.58) U/g Hb, 2.47 (1.31) U/g liver; SOD: 4062.94 (929.41) U/g Hb, 553.71 (214.25) U/g liver; and GSH: 9.70 (1.64) µmol/g Hb, 0.94 (0.22) µmol/g liver. The best storage conditions for the liver the G6PDH enzyme were seven days at +4 °C, thirty days at -70 °C and thirty days at -20 °C.

Key Words: *Mus musculus*, erythrocyte, liver, antioxidant systems, reference values

Giriş

Yaşayan organizmalar için önemli bir komponent olan oksijen (O₂) "serbest oksijen radikalleri (SOR)" olarak bilinen reaktif türlerini (süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali) birçok kez üretebilmektedir. Bu radikaller O₂'nin suya redüksiyonu ile oluşmaktadır. Normalde bu radikallerin üretimi yavaş

olup, ortamdaki hücre içerisinde bulunan "serbest radikal temizleyicileri (SRT)" tarafından yok edilir. SRT'nin bir grubunu enzimatik antioksidanlar [glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX) ve glutatyon redüktaz (GR)], diğer grubunu non-enzimatik antioksidanlar [redükte glutatyon (GSH), ürik asit,

vitamin E,C,A] oluşturmaktadır (1,2). Bununla birlikte, SOR miktarları yaşlanma, infeksiyon, radyasyon, kanser, ateroskleroz ve yaralanma gibi çeşitli patofizyolojik durumlarda artmaktadır (3).

Bu çalışma insan genetik yapısına benzerlik gösterdiği bilinen *Mus musculus*'ta eritrosit ve karaciğer antioksidan sistemlerinde referans değerlerin belirlenmesi, toksikolojik çalışmalara temel kontrol verilerini sağlamak amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Çukurova Üniversitesi Tıbbi Deneysel Cerrahi Araştırma Merkezi'nde (TIBDAM) üretimi ve bakımı yapılan, sağlıklı görünen ve hiç bir hastalığı olmayan 4 aylık, 30-40 g ağırlığında 38 erkek *M.musculus* referans bireyler olarak seçilmiştir. Referans bireyler Uluslararası Klinik Biyokimya Federasyonu'nun (IFFC) belirlediği sağlık kriterlerine uygun olarak seçilmiştir (4).

Kan örnekleri, farelerin kalbinden alınarak 1mg/ml EDTA içeren tüplere konmuş ve yapılacak deneyin çeşidine göre hemolizat hazırlanmıştır. Karaciğer doku örnekleri ise alınır alınmaz soğuk %1,15 KCl (Merck) ile 1:5 oranında (w/v) homojenizatörde (Heidolph 50110 R2R0) 15-20 dakika homojenize edilmiştir. Homojenatlar 14000 rpm'de +4 °C'de 30 dakika santrifüj (Sorvall RC 2B) edilerek süpernatantta enzim aktivitelere ve GSH düzeylerine bakılmıştır.

G6PDH aktivitesi, süpernatant ve hemolizatta Beutler yöntemiyle saptanmıştır (5). Reaksiyon karışımı 3 ml' lik total volümde 0,3 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0 tampon, 0,3 ml 6mM glukoz-6-fosfat (G6P), 0,3 ml 2mM nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), 0,3 ml 0,1M MgCl₂, belirli miktarda saf su ve enzim içeren süpernatant ya da hemolizattan oluşmaktadır. Tepkime, 37°C'de enzim tarafından indirgenen 1µmol NADP'nin 340 nm dalga boyunda ışık yolu 1cm olan kuvars küvetlerde 10 dakika süreyle her 5 dakikadaki absorbans değişimi izlenerek gerçekleştirilmiştir.

Hemolizatta GR aktivitesi Beutler yöntemiyle saptanmıştır (5). Reaksiyon karışımı 1ml'lik total volümde 50µl 1M Tris-HCl, pH 8,0 tampon, 10µl flavin adenin dinükleotid (FAD) ve belirli miktarda saf su ve enzim içeren hemolizat 37°C'de 10 dakika inkübe edilecek 100µl okside glutatyon (GSSG) konur ve tekrar 37°C'de 10 dakika inkübe edilir. Reaksiyon 50µl 2mM redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)

konulduktan sonra başlatılır. 340 nm dalga boyunda ışık yolu 1cm olan kuvars küvetlerde 5 dakika süreyle her 2,5 dakikadaki absorbans değişimi izlenerek gerçekleştirilmiştir.

Süpernatantta GR aktivitesi Staal yöntemiyle saptanmıştır (6). Reaksiyon karışımı 1 ml'lik total volümde 900 µl 100 mM Na-P tampon pH 6,8 içinde 1mM NADPH ve 1mM GSSG'den oluşan substrat ve 100µl enzim içeren süpernatant'tan oluşmuştur. Tepkime 37°C'de enzimin NADPH varlığında GSSG'yi redüklerken oluşan NADP'nin 340 nm dalga boyunda ışık yolu 1cm olan kuvars küvetlerde 5 dakika süreyle her 2,5 dakikadaki absorbans değişimi izlenerek gerçekleştirilmiştir.

GPX aktivitesi süpernatant ve hemolizatta Beutler yöntemiyle saptanmıştır (5). Reaksiyon karışımı 1 ml' lik total volümde 100µl 1M Tris-HCl pH 8,0 tampon, 20µl 0,1M GSH, 100µl 10U/ml GR, 100µl 2mM NADPH ve belirli miktarda saf su ve enzim içeren hemolizat ya da süpernatant 37°C'de 10 dakika inkübe edildikten 10µl 7mM t-butül hidroperoksit konulduktan sonra başlatılır. Tepkime, 37°C'de enzim tarafından oksitlenen 1µmol NADPH'in 340 nm dalga boyunda ışık yolu 1cm olan kuvars küvetlerde 10 dakika süreyle her 5 dakikadaki absorbans değişimi izlenerek gerçekleştirilmiştir.

SOD aktivitesi süpernatant ve hemolizatta Fridovich yöntemiyle saptanmıştır (7). SOD aktivite tayini için süpernatant 1:65 oranında ya da hemolizat 1:20 oranında 0,01M fosfat tampon pH 7,0 ile dilue edilir, bu dilüsyonda aktivite tayini yapılır. Reaksiyon karışımı 1ml' lik total volümde 25µl enzim içeren süpernatant ya da hemolizat, 850µl ksantin ve INT (p-iyodonitrotetrazolium viyolet) içeren mix substrat ve 125µl ksantin oksidazdan oluşur. Kör de tıpkı numune gibi hazırlanır fakat örnek yerine fosfat tamponu konur. Tepkime, 37°C'de ışık yolu 1cm olan kuvars küvetlerde numunenin 37°C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı ilk 30 saniyedeki başlangıç absorbansları (A1) okunur. Aynı anda kronometre çalıştırılarak 3 dakika sonra son absorbansları (A2) tekrar okunur ve değerler standart eğriden değerlendirilir.

GSH düzeyi süpernatant ve hemolizatta Beutler yöntemiyle saptanmıştır (5). Reaksiyon karışımı 10 ml'lik total volümde 2,0 ml filtrat, 8 ml fosfat tampon ve 1,0 ml DTNB (5,5'dithiobis 2-nitrobenzoic acid) 'den oluşmaktadır. Kör 1,2 ml presipite edici solüsyon, 0,8 ml distile su, 8 ml fosfat tampon ve 1 ml DTNB'den

hazırlanmaktadır. Spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda DTNB öncesi ve DTNB sonrası absorbanslar okunarak değerler standart eğriden değerlendirilmiştir.

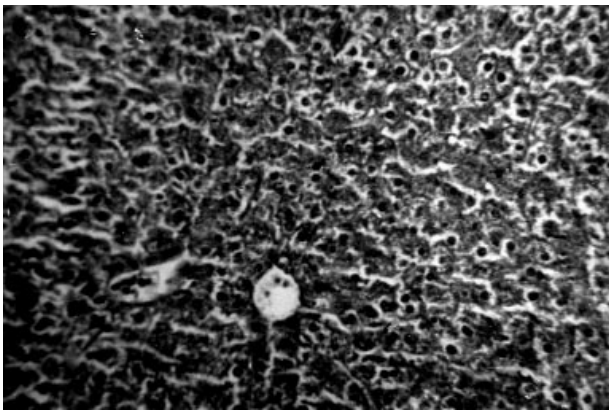
Hemolizatta hemoglobin (Hb) miktarı, syanomethemoglobin yöntemiyle saptanmıştır (5). Yöntemde, kana pıhtılaşmayı engelleyen % 1'lik heparinli tüplere kan alınmıştır. Hemoglobin tayininde, 5 ml drabkin üzerine 20 mikrolitrelik heparinli kan eklenmiştir. Bu şekilde 10 dakika bekledikten sonra spektrofotometrede (Bausch and Lomb. Spectronic 20) 540 nm dalga boyunda örnek içermeyen drabkine karşı okunmuştur.

Dokuların histopatolojik incelenmesi için doku kesitleri %10'luk formaldehidde (Merck) fikse edilmiş ve rutin işlemlerden sonra 5 µm kalınlığındaki doku kesitleri Harris hematoksilen-eosin boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir (8). Bu çalışmada karaciğer histopatolojisi normal olan denekler kullanılmıştır.

Referans değerlerin belirlenmesinde IFFC tarafından önerilen istatistiksel yöntemler kullanılmıştır (4). Çalışmamızda elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizlerinde SPSS (Version 6.0) istatistik programı kullanılmıştır.

Bulgular

Referans bireylerine ait normal karaciğer olgusu Şekil 1'de gösterilmiştir. Tablo 1 ve 2'de *M. musculus* eritrosit ve karaciğer dokusunda antioksidan sistemler için referans değerler (%95 güvenirlilik aralığında, $X \pm 2SD$)



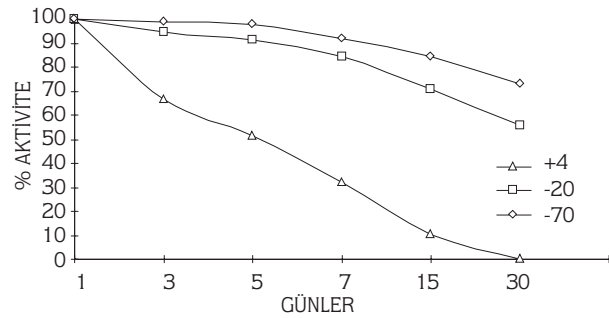
Şekil 1. Referans bireylere ait normal karaciğer olgusu (Hematoksilen-eosin x200).

sunulmuştur. Eritrosit ve karaciğer dokusunda en yüksek antioksidan enzim aktivitesi ve antioksidan düzeyi sırasıyla; SOD, GPX, G6PDH, GR ve GSH'dır. Eritrosit ve karaciğer dokusu antioksidan sistemlerin *M. musculus* bireyleri arasında farklılık gösterdiği gözlenmiştir. *M. musculus* bireyleri arasında en büyük farklılık karaciğer SOD enzim aktivitesinde görülmüştür.

Karaciğer G6PDH enzim aktivitesi, +4 °C, -20 °C, -70 °C'de günlere bağlı olarak farklılık gösterdiği varyans analizi ile saptanmıştır ($p < 0,05$). Şekil 2'de, G6PDH enzim aktivitesinin +4 °C 'de 7 gün, -20 °C ve -70 °C'de ise 30 gün dayandığı görülmektedir.

Tartışma

Bu çalışmada, karaciğer histopatolojik bulgusu normal olan sağlıklı *M. musculus* bireylerin eritrosit ve karaciğerinde G6PDH, GR, GPX ve SOD aktivitelerinin ve GSH düzeylerinin toksikolojik çalışmalar için gerekli referans değerler elde edilmiştir. Çalışmamızda, eritrosit ve karaciğer antioksidan sistemlerinin aynı tür içindeki bireyler arasında farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Aynı tür içindeki en büyük farklılık karaciğer SOD enzim aktivitesinde görülmüştür. Yüregir ve ark. (9) insan eritrosit G6PDH aktivitesinin, İnal ve ark. (10) ise insan eritrosit GSH düzeyinin bireyler arasında farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Aynı şekilde Delebar ve ark. (11) aynı fare türü içindeki bireyler arasında SOD aktivitesinin de bireyler arasında farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Fare bireyleri arasındaki farklılığa, antioksidan enzimlerinin mRNA stabilitesi, transkripsiyon farklılığı ve özellikle eritrosit G6PDH aktivitesini



Şekil 2. *Mus musculus* karaciğer G6PDH aktivitesinin günlere bağlı değişimi.

Tablo 1. *Mus musculus* eritrosit antioksidan sistemlerde referans değerler ve referans değerlerin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonuçları.

	N	X	SD	SE	Medyan	range	min-max	Referans Değerler
G6PDH	38	22,28	3,53	0,57	21,84	13,30	15,70-29,00	15,22 - 29,34
GPX	38	134,88	16,83	2,73	135,50	59,00	106,00-165,00	101,22 - 168,54
GR	38	7,23	1,58	0,25	7,45	4,86	5,00-9,86	5,65 - 10,39
SOD	38	4062,94	929,41	150,77	3964,50	3439,00	2578,00-6017,00	2204,12 - 5921,76
GSH	38	9,70	1,64	0,26	9,56	5,90	7,00-12,90	6,42 - 12,98

G6PDH, GR, GPX ve SOD aktiviteleri Ü/g Hb, GSH düzeyi µmol/g Hb birimleri olarak verilmiştir.

Tablo 2. *Mus musculus* karaciğer antioksidan sistemlerde referans değerler ve referans değerlerin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonuçları.

	N	X	SD	SE	Medyan	range	min-max	Referans Değerler
G6PDH	38	2,38	1,09	0,17	2,22	4,16	0,38-4,54	0,2 - 4,56
GPX	38	22,34	4,70	0,76	21,97	16,05	15,08-31,13	12,94 - 31,74
GR	38	2,47	1,31	0,21	2,12	4,60	0,38-4,98	0 - 5,09
SOD	38	553,71	214,25	34,75	567,50	707,00	205,00-912,00	125,21 - 982,21
GSH	38	0,94	0,22	0,03	0,92	0,76	0,66-1,42	0,5 - 1,38

G6PDH, GR, GPX ve SOD aktiviteleri Ü/g karaciğer, GSH düzeyi µmol/g karaciğer birimleri olarak verilmiştir.

düzenleyen Gdr-1 ve Gdr-2 olarak adlandırılan allel genlerin etki ettiği ileri sürülmüştür (12). Bu farklılıkların organizmaların aynı yaşam koşullarına farklı cevap verdikleri ile ilgili olabileceği ve bu konudaki bilgilerin çevre ve insan biyoloji ve toksikoloji dallarında yararlı olabileceği düşünülmektedir. Antioksidan sistemler tür, organ, yaş, cinsiyet ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir (13). Çalışmamızda *M. musculus*'taki antioksidan enzim aktiviteleri ve GSH düzeyleri en fazla eritrositte, en az karaciğerde bulunmuştur. *Rattus norvegicus*'ta SOD aktivitesinin en fazla karaciğerde, en az ince barsakta olduğu bildirilmiştir (14). *M. musculus*'ta GSH miktarının en fazla karaciğerde, en az kalpte (15) ve *M. musculus*'ta G6PDH aktivitesinin en fazla eritrositte, en az karaciğerde olduğu bildirilmiştir (12). Bu durum, *M. musculus*'ta eritrosit antioksidan aktiviteyi regüle eden allel genlerin bulunması, karaciğerde ise bu tip genlerin bulunmama olasılığı ile açıklanabilir (12). Sonuç olarak, bu çalışmada *M. musculus*'ta eritrosit ve karaciğer antioksidan sistemlerde belirlenen referans değerler ve aynı tür içindeki farklılıkların toksikolojik araştırmalarda

oksidatif hasarla ilgili olarak yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Karaciğer G6PDH aktivitesi +4 °C, -20 °C ve -70 °C'de günlere bağlı olarak farklılıklar göstermiştir. G6PDH enziminin en iyi saklanma koşulları; +4 °C 'de 7 gün, -20 °C ve -70 °C'de 30 gün olarak saptanmıştır. Enzim +4 °C'de 7. günde %32,1 oranında aktivite gösterirken, 30. günün sonunda +4 °C, -20 °C ve -70 °C'de sırasıyla %0, %55,93 ve %72,98 oranında aktivite gösterdiği saptanmıştır. Frederiks ve ark. (16) sıçan karaciğer G6PDH enzim aktivitesinin -20 °C'de 7 günden fazla dayandığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar ışığında, karaciğer G6PDH enzim aktivitesinin en iyi saklama koşulunun -70 °C olduğu, dokuların bu ortamda saklanarak zamanında yapılamayan analizlerin daha sonraki zamanlarda da yapılabileceği ortaya konmuştur.

Teşekkür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu SBE.93.16 ve TF.98.76 no'lu projelerle desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Cerutti, P.A.: Oxy-radical and cancer. *Lancet* 1994; 344: 862-863.
2. Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T. : Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Der.* 1997; 3-4: 92-95.
3. Chandra, M., Chandra, N., Agrawal, R., Kumar, A., Ghatak, A., Pandey, V.C. : The free radical system in ischemic heart disease. *Int. J. Cardiol.* 1994; 43: 121-125.
4. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH). Approved recommendation (1986) on the theory of reference values: Part 1. The concept of reference values. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1987; 25:337-342.
5. Beutler, E.: *Red Cell Metabolism* Grune and Stratton Inc., London, 66-71, 1984.
6. Staal, G.E., Visser, J., Weeger, C.: Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1969; 185: 39-48.
7. Fridovich, I.: Superoxide dismutase. *Adv. Enzyme.* 1974; 41: 35-97.
8. Bancroft, J.D., Stevens, A.: *Theory and Practice of Histological Techniques.* Churchill Livingstone, Edinburgh, 1-15, 1977.
9. Yüregir, G.T., Aksoy, K., Arpacı, A., Ünlükurt, İ., Tuli, A.: Studies on red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase: evaluation of reference values. *Ann. Clin. Biochem.* 1994; 31:50-55.
10. İnal, T.C., Tuli, A., Yüregir, G.T.: Evaluation of reference values for erythrocyte glutathione. *Clin. Chim. Acta.* 1996; 256: 189-196.
11. Delebar, J., Nicole, A., D'auriol, L., Jacop, Y., Meunier-Rotial, M., Galibert, F., Sinet, P., Jerome, H.: Cloning and sequencing of a rat Cu-Zn superoxide dismutase cDNA. *Eur. J. Biochem.* 1987; 166: 181-187.
12. Hutton, J.: Genetic regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the inbred mouse. *Biochem. Genet.* 1971; 5: 315-331.
13. Prohaska, J.R., Sunde, R.A.: Comparison of liver glutathione peroxidase activity and mRNA in female and male mice and rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 1993; 105:111-116.
14. Etiobio, B.O.I., Oraedu, A.C.I., Ugochukwu, E.N.: A comparative study of superoxide dismutase in various animal species. *Comp. Biochem. Physiol.* 1990; 95: 521-523.
15. Hazelton, G.A., Lang, C.A.: Glutathione peroxidase and reductase activities in the aging mouse. *Mech. Ageing. Develop.* 1985; 29: 71-81.
16. Frederiks, W., Klazina, J., Quwerkerk, M., Marx, F., Kooji, A.: The effects of storage on the retention of enzyme activity in cryostat section: A quantitative histochemical study on rat liver. *Histochem. J.* 1993; 25: 119-122.