

## GLUTATYONUN RAT LENSİNDE GLİKOLİZİS VE HEKZOZ MONOFOSFAT GEÇİDİNİN KONTROLÜNDEKİ ROLÜ

Nihat MERT\*

### ÖZET

*Bu çalışmada, lens ekstraktının monofosfat geçidi üzerine glutatyon oksidasyonunun etkisi, indirekt olarak glikoz-NADPH<sub>2</sub> kullanımı ve laktat üretimi yoluyla araştırılmıştır. Kullanılan oksidan madde t-butyl hidroperoksittir ki bu glutatyon peroksidaz enzimine bir ko-substrat görevi sunup glutatyonu enzimatik olarak oksitler.*

*Düşük ATP/ADP'li ortamda kullanılan glikoz miktarı artmış olup laktik asit birikimi fazladır. Buna karşın yüksek ATP/ADP'li ortamda kullanılan glikoz miktarı ve üretilen laktik asit miktarı azdır. TBHP ilavesi ile NADPH ve NADH üretimi artar.*

### SUMMARY

#### Role of Glutathione in The Regulation of Glycolysis and Hexose Monophosphate Shunt in The Rat Lens

*In this study the effect of glutathione oxidation on the hexose monophosphate shunt activity of the lens extract had been determined indirectly from the extend of glucose and NADPH<sub>2</sub> utilization and lactate production. The oxidant employed were t-butyl hydroperoxide, a compound which oxidizes glutathione enzymatically by serving as a co-substrate for glutathione peroxidase. The utilization of glucose amount and the accumulation of lactate were increased in low ATP/ADP medium. But, in high ATP/ADP medium utilized glucose amount and lactate accumulation were decreased. The production of NADPH and NADH were also increased by addition of TBHP.*

*Key words: Lens, glutathione, NADPH hexose monophosphate shunt, TBHP, lactate, glucose.*

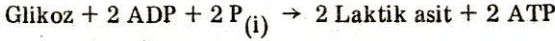
### GİRİŞ

Biyolojik sistemler genellikle glikoz veya diğer monosakkaritleri enerji kaynağı olarak kullanırlar. Glikolizis ise bunların yıkımını ve ATP şeklinde enerji elde edilmesini tanımlar. Son ürün, olayın olduğu organizmaya veya dokuya ve ortamda

\* Yrd. Doç. Dr.; Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fak. Öğretim Üyesi, Van-TÜRKİYE.

oksijen olup olmamasına bağlıdır. Glikoliziste 11 enzim rol oynar. Bunlar kristalize edilerek, yapı ve kinetikleri tamamen incelenmiştir. Sitoplazmanın soluble kısmında yer aldıklarına inanılmaktadır. Bazıları da multienzim komplekslerle ilişkilidirler.

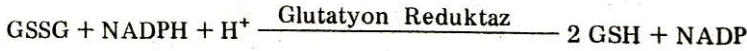
Anaerobik şartlar altında belirli organizmalar, özellikle küfler, etanol ve karbondioksit, memeli dokuları ise laktik asit üretirler. Deneysel şartlarla memeli dokularında anaerobik ortam hazırlanabilir. Anaerobik dokularda glikolizisin total denklemi şöyledir.



Anaerobik glikolizisin olabilmesi için şu şartların da sağlanması gereklidir. İnorganik fosfat kaynağı (Trioz fosfat dehidrogenaz için), fosfoglisero kinaz ve piruvat kinaz için ADP kaynağı, heksokinaz ve fosfofruktokinaz reaksiyonları için başlangıç ATP kaynağı, devamlı bir  $\text{NAD}^+$  sağlanması ve düşük enerji yükü (Energy charge). Bunların bir tanesinin sağlanmasındaki başarısızlık tüm glikolitik işlemi bozar veya değiştirir.

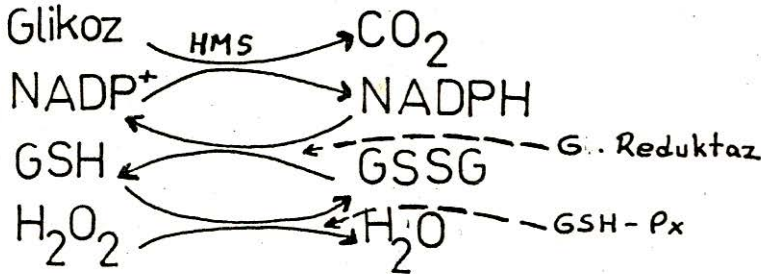
Birçok hücre glikolitik ve trikarboksilik asit sikluslarına ilave olarak glikozu heksoz monofosfat (pentoz fosfat veya fosfoglukonat) geçidi ile parçalar. Bu geçidin temel görevi  $\text{NADPH}$  şeklinde ekstrasitoplazmik sitoplazmada redükleyici güç üretmektir. Genellikle lens ve eritrositlerde rastlanır. Kalp ve iskelet kaslarında da çok az oksidasyon heksoz monofosfat geçidi ile olmaktadır<sup>1</sup>.

Fosfoglukonat geçidinde üretilen  $\text{NADPH}$ , glutatyon redüktaz tarafından katalizlenen bir reaksiyonla redükte glutatyon rejenerasyonunda da kullanılır.



Redükte glutatyon sellüler enzimlerde ve membranda yer alan tiyollerini stabilize ederek hücrelerin devamına yardım eder. Ara metabolizmadan oluşan hidrojen peroksidin yıkımı glutatyon peroksidaz enzimi ile gerçekleşir. Bu enzim  $\text{CN}^-$  ile inhibe edilir.

Artan oksitlenmiş glutatyonun, heksoz monofosfat geçidi aktivitesini uyardığı gösterilmiştir<sup>2</sup>. Heksöz monofosfat geçidi,  $\text{NADPH}$  üretimi ve glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin arasındaki ilişki şöyle şematize edilmiştir<sup>3</sup>.



Bu çalışmada lens ekstraktının heksöz monofosfat geçidi üzerine, glutatyon oksidasyonunun etkisi araştırılmıştır. Bu işlem dolaylı olarak glukoz,  $\text{NADPH}_2$  kul-



lanımı ve laktik asit üretimi ile anlaşılmaya çalışılmış olup oksidant olarak t-butyl-hidroperoksida (TBHP) kullanılmıştır<sup>4</sup>.

## MATERYAL VE METOD

### Hücreden Arınmış Lens Ekstraktının Hazırlanması

Kapalı bir kutu içinde 4 rat karbondioksit gazı verilerek öldürüldü. Gözleri, göz küresini zedelemekten çıkarıldı. Islak bir filtre kağıdı üzerine kondu. Nervus opticus'un giriş yerinden başlayıp göz küresinin ekvatoruna doğru ensizyon yapıldı. Sonra yavaşça sıkıp lens bir penset yardımı ile içinde 6 ml. soğuk 0.01 M Tris sulfat solusyonu pH 7,4 bulunan 10 ml.lik, buz içinde soğutulmuş homogenizer içine alındı. Lens iyice homogenize edildi. 15000 g devirle 10 dakika (Sorval SS 34 Rotor) santrifüj edildi. Supernatant temiz bir tüp içine alınıp kullanılmaya kadar buz içinde saklandı. Pellet atıldı.

### Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanması

Kontroller, reaksiyon karışımları ve blank şu şekilde hazırlandı (ml olarak).

Tüp No	1	2	3	4	5	6	7	8
Reaksiyon ortamı	1	1	1	1	1	1	1	1
Düşük ATP/ADP	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—	—	—
Yüksek ATP/ADP	—	—	—	—	0.5	0.5	0.5	0.5
TBHP	—	—	0.5	0.5	—	—	0.5	0.5
0.1 M Tris Sulfat	1	1.5	0.5	1	1	1.5	0.5	1
Lens ekstraktı	0.5	—	0.5	—	0.5	—	0.5	—

Reaksiyon ortamında bulunan maddelerin final konsantrasyonları şöyledir: 20 mM glikoz, 1 mM NAD, 8,05 mM NADP, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 3 mM MnCl<sub>2</sub>.

Düşük ATP/ADP = 2 mM/ 4mM 0.5,

Yüksek ATP/ADP = 4 mM/ 2 mM 2

TBHP 1 mM

Tabloda verilen şekilde hazırlanan karışımlar 37 C de 60 dakika inkube edildi. Blankler hariç diğer karışımlar 15000 g de 15 dakika süre ile santrifüj edilip supernatant dikkatle temiz bir deney tübüne alındı. Kullanıma kadar buz içinde veya derin dondurucuda saklandı.

### Redüklenmiş Glutasyon Tayini

Polypropilen mikrosantrifüj tüpüne 0.5 ml. supernatant (ayrıca karşılığı olan blankler de hazırlanır) alındı ve 0.5 ml. % 10 soğuk triklor asetik asit ilave edildi. Karıştırılıp buz içinde 10 dakika inkube edildi. Bunu takip eden santrifüjden sonra berrak supernatanttan 0.5 ml alınıp temiz bir tüpe kondu. Üzerine 1 ml. 0.5 M Tris EDTA (0.5 M tris base— 0.05 M Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.0) ve 0,5 M Ellman's ayırıcı (10 mM 5-5' Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) 10 ml. etanol içinde) ilave edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkube edildi. 412 nm. de uygun olarak hazırlanmış blanklere karşı kontrol ve reaksiyon karışımlarının absorbansları okundu.

### NADH ve NADPH Tayini

0.5 ml. supernatanta 1 ml 0.01 M Tris sulfat çözeltisi ilave edildi. Uygun olarak hazırlanmış blanke karşı 340 nm de absorbans okundu.

### Laktik Asit Tayini

Laktik asit enzimatik olarak LDH (Laktik asit dehidrogenaz) kullanılarak tayin edildi. 0.2 ml. supernatanta 3 ml. glycine semicarbazid (0.5 M glycine, 0.4 M semicarbazid HCL, pH IN NaOH ile 9 a ayarlanır.), 0.1 m NAD (3 mg/0.1 ml) ve 0.1 ml LDH (400 İÜ/0.1 ml) ilave edildi. 37 derecede 30 dakika inkube edildi ve 340 nm. de uygun blanke göre absorbansı okundu.

### Glukoz Tayini

0.05 ml. supernatanta 2 ml. glukoz çalışma solusyonu eklenip (Sigma stock no 15-15 adet çalışma viali, kullanmadan evvel her birine 4 ml. distile su ilave edildi) 37 C de 10 dakika inkube edildi. Absorbans uygun blanke karşı (50 ml. Tris sulfat, 2 ml. glukoz çalışma solusyonu) 340 nm de okundu.

## BULGULAR

Düşük ATP/ADP li ortam sağlandığı zaman redüklenmiş glutatyon seviyesi 1 nolu tüpte 0.02352 mM olup 3 nolu tüpte bütün glutatyon seviyesi 1 nolu tüpte 0.02352 mM olup 3 nolu tüpte bütün glutatyon TBHP tarafından oksitlenmiştir.

Yüksek ATP/ADP ortamında ise glutatyon konsantrasyonları 5 nolu tüpte 0.0177 mM olup TBHP ilavesi ile bütün glutatyonlar oksitlenmiştir.

Laktik asit üretimi için yapılan ölçümlerde 1, 3, 5, 7 nolu tüplerde sırası ile şu değerler bulunmuştur. 0.07123, 0.01625, 0.0900, 0.05882 mM.

NADH ve NADPH<sub>2</sub> konsantrasyonları ise 1, 3, 5, 7 numaralı tüplerde sırası ile 5, 52.10<sup>-3</sup>, 7,72.10<sup>-3</sup>, 5, 74.10<sup>-3</sup> ve 9,49.10<sup>-3</sup> mM olduğu bulunmuştur.

Glukoz ölçümlerinde 1, 3, 5, 7 numaralı tüplerde sırası ile 6.810, 7.390, 5.125 ve 4.221 mM değerleri bulunmuştur.

## TARTIŞMA

Glutatyon lenste yüksek konsantrasyonda bulunan ve oksidatif tahribata karşı önemli bir rol oynadığı dikkati çeken bir tripeptiddir<sup>1</sup>. Glutatyonun bu fonksiyonu ile hekzoz monofosfat geçidi arasında çok yakın bir ilgi vardır. Hekzoz monofosfat geçidinde üretilen NADPH oksitlenmiş glutatyon (GSSG)'un redüklenmesi için gereklidir<sup>1</sup>.

Oksidatif stres sıralarında Hekzoz monofosfat aktivitesi, yüksek glutatyon elde etmek suretiyle artabilir. Kinoshita<sup>2</sup> Lens homojenizatına GSSG ilave edilince C-1 işaretlenmiş glukozun oksidasyonunun arttığını gözlemiştir.

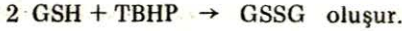
Hekzoz monofosfat geçidinde her mol karbondioksite karşılık 2 mol NADPH üretilir.

Lens karışımı t-butyl hidroperoksidi (TBHP) ile inkube edildiği zaman artmış hekzoz monofosfat aktivitesi lenste GSSG birikmesini minimal düzeye indirir ve oksidatif hasarı engeller.

Düşük ATP/ADP konsantrasyonu kullanıldığı zaman ortamda yüksek miktarda laktik asit birikmesi gözlenir. Zaten bilindiği gibi anaerobik hücre suspansiyonla-

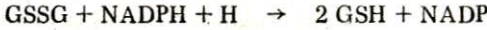


rında glikoz kullanım hızı anaerobik oluş orantılarına göre hızlı bir düşüş gösterir. Aynı zamanda laktat birikmesi sifıra yaklaşır, bu fenomen Pasteur etkisi olarak bilinir. Pasteur etkisi solunum sırasında üretilen yüksek sitrat ve ATP'in fosfo-fruktoz reaksiyonunu allosterik inhibe etmesi nedeniyle TBHP'nin oksidan etki ile

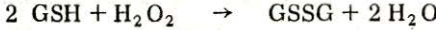


Bu şartlarda GSH, GSSG haline oksitlenir ve laktik asit oluşma hızı artar.

Fakat yüksek ATP/ADP oranı kullanıldığı zaman ortamda 0,090 mM gibi bir değer elde edildi. Yalnız TBHP kullanıldığı zaman oksidan etki ile laktik asit birikimi hızı azalır. Absorbanstaki yüksek değerler, laktat ve piruvatın oksidasyonundan elde edilen NADH'ın stökiyometrik üretimi ile ilgilidir. Artan NADPH düzeyi "Feed back" inhibisyon ile hekzoz monofosfat geçidi enzimlerinden Glukoz-6-fosfataz ve fosfoglukonat dehidrogenazı inhibe eder. Fosfoglukonate geçidinde üretilen NADPH redüklenmiş glutatyon elde edilmesinde kullanılır.



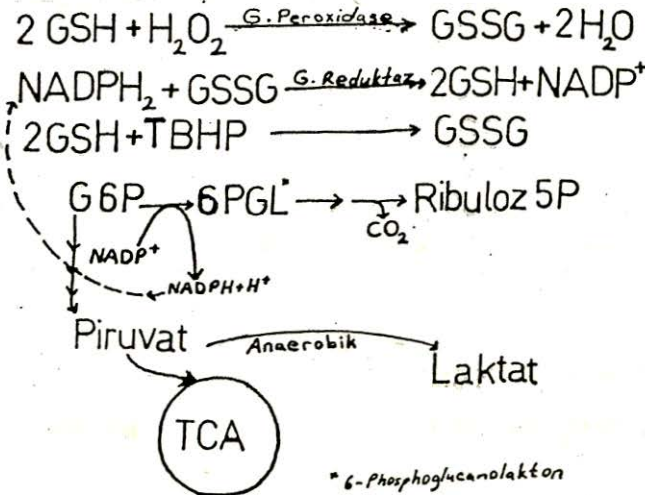
TBHP ilave edildiği zaman hekzoz monofosfat aktivitesi ve redükleyici güç (NADPH<sub>2</sub> ve NADH) üretimi artar. Redükte glutatyon, oksidatif metabolizma sırasında oluşan hidrojen peroksida karşı detoksifiye edici ajan olarak rol oynar.



GSSG de meydana gelen bu artış da hekzoz monofosfat geçidi aktivitesini artırır.

Düşük ATP/ADP kullanılması halinde TBHP ilave edildiği zaman artan NADPH konsantrasyonuna ilave olarak kullanılan glikoz miktarı da artar. Bu hekzoz monofosfat hızının arttığını gösterir.

Yüksek ATP/ADP kullanılması halinde ise ortamda hali hazırda fazlaca ATP varolduğu için TBHP ilavesi ile kullanılan glikoz miktarında artma gözlenmez. Bilakis düşme gözlenir. Böylece ortamda bulunan ATP konsantrasyonu feed back inhibisyon ile hekzoz monofosfat geçidini engellemiş olur. Tüm bulgulardan şöyle bir şema çizebiliriz.



GSSG miktarındaki artış hekzoz monofosfat aktivitesini stimule eder. Yapılan işlemler ile TBHP ilave edilmesiyle artan NADPH ve azalan laktik miktarının hekzoz monofosfat aktivitesini artırdığı görülmektedir. Hekzoz monofosfat geçidi sırasında üretilen NADPH glutasyon reduktaz enzimini katalize ettiği GSSG'nın redüklenmesi reaksiyonunda kullanılır. Yani lenste glikolizis ve hekzoz monofosfat geçidi, glutasyon tarafından indirekt bir kontrol altındadır. Böylece lensin kendisini hekzoz monofosfat, geçidi, glutasyon peroksidaz, GSH, NADPH ve glutasyon reduktaz arasındaki ilişkiler ile koruyabildiği ve GSSG üretimi ve hekzoz monofosfat geçidi arasında bir ilgi olduğu görülmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. REEDY, V.N., GIBLIN, F.J. and MATSUDA, H.: Defense system of the lens against oksidative damage. In "Red Blood Cells and Lens Metabolism" (Ed. Srivastove S. pp. 139-54. Elseveir/Nort Holland Inc. (1980).
2. KINOSHITA, J.H.: Carbohydrate metabolism of lens, AMA, Arc. Ophthalmol 54, 360-368 (1955).
3. GIBLIN, F.J., NIES, D.E. and REDDY, V.N.: Stimulation of the hexose monophosphate shunt in rabbit lens in response to oxidation of glutathione. Exp. Eye. Res. 33. 289-298 (1981).
4. SIES, H. GERSTENECKER, C. MENZEL, H, and FLOKE, L.: Oxidation in the NADPH system and release GSSG from hemoglobin free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides, FEBS letters, 27, 171-175 (1972).