

Melatonin'in intestinal iskemi-reperfüzyonda 6-fosfoglukonat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi*

Burhan Ateş*, H.Ramazan Yılmaz**, Zeliha Selamoğlu***,
Mustafa Iraz****, İsmet Yılmaz*,

*İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü Biyokimya AD, Malatya,

**Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Isparta,

***İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji AD,

****İnönü üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji AD, Malatya.

Özet

Bu çalışmada, intestinal iskemi-reperfüzyon (I/R) sürecinde, intestinal dokuda pentoz fosfat metabolik yolunun anahtar enzimlerinden biri olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6-PGD) enziminin aktivitesi ve melatonin'in iskemi öncesi ve sonrası uygulanmasının enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. 32 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan, herbiri 8^l er denekten oluşan 4 gruba ayrıldı (n: 8). Grup 1: plasebo, grup 2: I/R (Kontrol), grup 3: 10 mg/kg melatonin+I/R ve grup 4: I+10 mg/kg melatonin + R. I/R uygulaması, superior mezenterik arter (SMA)' in 45 dakika diseke edilmesi ve ardından 120 dakika reperfüzyonu ile gerçekleştirildi. Tüm gruplarda enzim spesifik aktiviteleri, volüm aktivite değerleri total protein miktarlarına bölünerek hesaplandı. Elde edilen veriler, intestinal iskemi-reperfüzyon sürecinde 6-PGD aktivitesinde kontrol I/R grubunda plasebo grubuna kıyasla bir azalmanın olduğunu göstermekte, buna karşılık iskemi öncesi melatonin uygulanan grupta aktivite değerinin yükselerek plasebo grubuna yakın bir değer aldığı görülmektedir. İskemiye takiben melatonin verilen grupta ise enzim aktivitesi iskemi öncesi melatonin uygulanan gruptaki kadar bir artış göstermemiştir. Tüm gruplardaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Anahtar Sözcükler: Melatonin, İskemi-reperfüzyon, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz.

Abstract

The effect of melatonin on 6-phosphogluconate dehydrogenase in intestinal ischemia/reperfusion

In this study, enzyme activity of 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD) which is one of the key enzyme in the intestinal tissue for intestinal ischemia/reperfusion (I/R) period in pentose phosphate metabolic pathway was investigated and the effect of melatonin on enzyme activity before and after I/R was determined. A total of 32 young male Sprague Dawley rats were divided into 4 groups (n= 8). Group 1 was placebo and Group 2 was control I/R group. Melatonin (10 mg/kg) and I/R was applied for Group 3 and melatonin (10g/kg) and R was applied for Group 4. I/R was performed by occlusion of superior mezenteric artery for 45 minutes and following reperfusion for 120 minutes. For all groups enzyme specific activity was calculated by dividing volume activity value to total protein amount. The results showed that there is a decrease in the activity of pentose phosphate metabolic pathway key enzyme 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD) for control I/R group during intestinal ischemia- reperfusion period compare to sham group. But the activity values of the group which melatonin was applied before ischemia was close to the values observed for then sham group. There was no obvious increase in the enzyme activity of the group which melatonin was applied after ischemia as compare to group which melatonin was applied before the ischemia. The differences in all groups were not statistically significant.

Keyword: Melatonin, Ischemia-reperfusion, 6-phosphogluconate dehydrogenase.

*Bu çalışma, Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumunda, 26-29 Eylül 2002, Kervansaray Termal Otel / Bursa'da poster olarak sunulmuştur.

Giriş

İntestinal kan akımının azaldığı veya belirli bir süre kesildiği ve sonrasında yeniden normal akımın sağlandığı durumda, iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarları

meydana gelmektedir (1,2). İntestinal I/R sonucunda reaktif oksijen türlerinin üretildiği ve bunların iskemik hasarda önemli rol oynadığı bilinmektedir (3). İskemi esnasında hücrel enerji depolarının tükenmesi, iskemik kaskat olarak bilinen olaylar zincirini tetiklemektedir. İskemik dokunun reperfüzyonu ise bir taraftan iskemi sırasında kaybolan bazı fonksiyonların geri gelmesini sağlarken diğer taraftan oksijen kaynaklı serbest radikallerin oluşumunu hız-

Yazışma Adresi:

Doç.Dr. İsmet YILMAZ

İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

Biyokimya AD Malatya

Tel: 0(90) 422 3410010-25/3860 Fax: 0(90) 422 3410037

E-mail: iyilmaz@inonu.edu.tr

landırarak, daha ileri hasarlara yol açmaktadır (4). İskemi sırasında oksijen yokluğuna bağlı olarak mitokondrial elektron transportu ve oksidatif fosforilasyon kapasitesi giderek azalmaktadır. ATP sentezi durmasına karşın, ATP kullanımı ve ATP hidrolizi sonucu oluşan ADP düzeyi artmaktadır (3,4). Hücre içi ATP düzeyindeki azalış, pentoz fosfat metabolik yolunu etkileyerek NADPH+H⁺ üretimini düşürmektedir. Pentoz fosfat metabolik yolunda üretilen NADPH+H⁺'lar hücrede yağ asidi, redükte glutasyon, kolesterol ve steroid hormon sentezi gibi bir çok biyosentetik yolda indirgeyici görevi yapmaktadır (5). Pentoz fosfat yolu, dolayısıyla da NADPH+H⁺ üretimindeki azalış oksidatif stresi arttırarak iskemik kaskatı genişletmektedir. İskemi sırasında oksidatif mekanizmaların devreye girmesi, bu klinik problemin çözümünde antioksidanların kilit rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda antioksidan olarak kullanılan melatonin diğer antioksidanlara kıyasla daha geniş spektruma sahiptir. Endojen bir hormon olan melatonin'in en önemli özelliklerinden biri lipofilik olmasıdır. Dolayısıyla hücrenin hemen hemen bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabilir. Böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir (6).

Bu çalışmada, intestinal I/R sürecinde pentoz fosfat metabolik yolunun anahtar enzimlerinden olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6-PGD; EC 1.1.1.44) enziminin aktivitesi üzerine melatonin'in iskemi öncesi ve sonrası koruyucu etkisi araştırıldı.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Bu çalışmada 32 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan (200-300 g) kullanıldı. Hayvanlar, kontrollü bir odada (Sıcaklık 20-25 °C, nem % 70-80, 12 saat gündüz / 12 saat gece) ve ayrı kafeslerde tutuldu. Sıçanlara deneye kadar , standart sıçan pellet yem ve çeşme suyu verildi. Çalışmaya alınan sıçanlarda deneylerin bütün aşamalarında "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH Publication 86-23, revised 1985) kurallarına uyuldu.

Her biri 8'er denekten oluşan 4 gruba ayrıldı. Gruplara uygulanan işlemler şu şekilde belirlendi:

Grup 1: Plasebo,

Grup 2: Kontrol I/R,

Grup 3: 10 mg/kg melatonin + I/R,

Grup 4: I + 10 mg/kg melatonin / R.

Yöntem

Standart beslenmeye alınan denekler operasyondan 12 saat önce aç bırakıldı. Tüm operasyonlar ketamin/ksi-

lazin (20/2 mg/kg) anestezisi altında steril koşullarda gerçekleştirildi. Anestezi sonrası ratların karın boşluğu açılarak bağırsaklar çıkarıldı. Plasebo grubu dışındakilerde superior mesenterik arter (SMA) dis-ke edilip bir atravmatik mikroklempten yardımı ile geçici olarak 45 dk. iskemi, ardından 120 dk. reperfüzyon uygulandı. Bu süreler iskemi reperfüzyon makalelerinden alınmış ortalama değerler olup genelde reperfüzyon süresi iskemi süresinin 2-3 katıdır. Steril şartlarda hazırlanan melatonin (10 mg/kg; %10'luk alkolde hazırlandı) hayvanlara intraperitoneal olarak verilmiştir. Grup 3'de, klempten takılır takılmaz yani iskeminin hemen öncesi melatonin intraperitoneal olarak uygulanmıştır, grup 4'de ise 45 dakikalık iskemi süresinin bitiminde melatonin uygulanıp klempten çıkarılmıştır. Reperfüzyonun sonunda intestinal dokunun doudenumdan kolona kadar olan kısmı alındı. Çıkarılan kısım soğuk izotonik sodyum klorür (0.9 % NaCl) ile perfüze edilerek temizlendi. Enzim aktivite tayini yapacağımız doku, fosfat tamponu (pH 7.4) ile homojenize ve sonifiye edildikten sonra 17.000g'de 15 dakika santrifüj işlemi yapıldı ve süpernatant elde edildi. Bu işlemlerin tümü +4 °C'de yapıldı. Ele geçen süpernatant -70 °C'de derin dondurucuda saklandı ve enzim aktivite çalışması için kullanıldı.

6-PGD tayini : Aktivite tayininde spektrofotometre kullanıldı. Aktivite tayini için, kuvars tüpe 0.25 M Tris-HCl tamponu (pH:8), 0.01 M 6-fosfoglukonat (6-PGD), 0.2 M NADP⁺ ve enzim kaynağı olarak süpernatant konularak total hacim 1ml'ye tamamlandı ve bir kez karıştırılarak okundu. Enzim aktivitesi, 6-fosfoglukonat'ın 6PGD'la D- riboluz 5-fosfat'a çevrilmesi sırasında oluşan NADPH'in 30 C'de 340 nm'de artan absorbansı kaydedildi ve dakikadaki absorbans değişiminden hesaplandı (7).

Protein miktar tayini Lowry yöntemiyle yapıldı (8). İntestinal süpernatantlardan elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen protein miktarları standart bovine serum albumin eğrisinden okunarak ml'deki protein miktarı hesaplandı.

Enzimlerin spesifik aktiviteleri, volüm aktivite değerleri total protein miktarlarına bölünerek hesaplandı.

İstatistiksel Analizler: İstatistikler Windows 98 uyumlu SPSS® ile yapıldı. Grupların dağılımları Non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov Test ile değerlendirildi. Grupların normal dağılım göstermesinden dolayı grupların karşılaştırılmasında Parametrik testlerden one-way ANOVA testi ve Post Hoc testlerden LSD kullanıldı. Değerler ortalama ± standart hata olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için p<0.05 olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

İntestinal 6-fosfoglukonat dehidrogenaz aktivite sonuçları tablo 1'de görülmektedir. Tablo 1'de görüldüğü gibi, gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında 6-PGD enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemektedir.

Tablo 1 : 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz aktivite sonuçları.

Gruplar	N	6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Ortalama ± Standart Hata (mU/mg protein)
Plasebo	8	2.95 ± 0.26
Kontrol I/R	8	1.93 ± 0.29
Mel+I/R	8	2.80 ± 0.49
I+Mel/R	8	2.18 ± 0.54

I/R: İskemi-reperfüzyon, Mel: melatonin, N: Sıçan sayısı

Tartışma ve Sonuç

Oksidatif stres sonucu organizmada üretilen toksik moleküller hücre, doku ve organlarda hasarlara yol açmaktadır. Oksijen kullanımı sonucu organizmada serbest radikaller üretilir. Serbest radikaller yüksek enerjili ortaklanmamış elektrona sahip olduklarından lipid, protein ve DNA'da hasarlar oluştururlar. İskemi-reperfüzyon sürecinde reaktif oksijen türlerinin fazla miktarda oluştuğu ve bunların da özellikle reperfüzyonda arttığı, bu nedenle intestinal doku hasarının da reperfüzyonda geliştiği ileri sürülmektedir (9). İskemi sırasında oksidatif mekanizmaların devreye girmesi bu klinik problemin çözümünde antioksidan sistemin kilit rol oynayabileceğini düşündürmüştü ve konuyla ilgili birçok deneysel çalışma yapılmıştır (10-14).

Vitamin E'nin intestinal iskemide reperfüzyon sonrası nötrofil birikiminin sebep olduğu serbest radikal oluşumunu önlediği ve lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Yine bu çalışmada intestinal iskemide reperfüzyon sonrası 15 kat artan miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesini Vitamin E'nin normal düzeyine yaklaştırdığı bulunmuştur (10). Sodyum diklofenak (DS)'in ise iskemik dokuda ATP'nin sentezlenememesi ile oluşan hasarları, özellikle MPO aktivitesini, azaltarak bir koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur (11).

Kafeik asid fenetil ester (12) ve pentoksifilin (13)'in antioksidan karakteri ile ilgili araştırmalarda bu maddelerin intestinal iskemide reperfüzyon hasarını önlediği, antioksidan enzim aktivitelerindeki artış ve lipid peroksidasyonundaki düşüş ile gösterilmiştir.

Diğer bir çalışmada ise melatonin intestinal dokuda iskemide reperfüzyon sonrası oluşan lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (14).

Melatonin pineal bezden salgılanan endojen bir hormondur. Melatonin'in en önemli özelliklerinden biri lipofilik olmasıdır. Dolayısıyla hücrenin hemen hemen bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabilir. Böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Melatonin'in serbest radikal süpürücü özelliğinin yanında hücrenin total antioksidatif savunma sistemini güçlendirdiği de ileri sürülmektedir (15,16).

Enzim aktivite ölçümleri sonucunda elde edilen veriler tablo 1'de verilmiştir. Elde edilen veriler, intestinal iskemide reperfüzyon sürecinde pentoz fosfat metabolik yolu anahtar enzimlerinden 6-PGD aktivitesinde kontrol I/R grubunda (1.93±0.29) plasebo grubuna (2.95±0.26) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma gözlemlendi. İskemi öncesi melatonin uygulanan grupta ise, aktivite değerinin (2.80±0.49) plasebo grubuna yakın bir değer aldığı görüldü. Özellikle iskemide reperfüzyon öncesi melatonin uygulanan gruptaki bu değişim enerji eksikliğinin özellikle iskemide reperfüzyon sürecinde gözlenmesinden kaynaklanmaktadır (17).

Melatoninin lipofilik olması ve hücrenin hemen hemen bütün organellerine ulaşabilmesi bu grupta enzim aktivitesinin yüksek görülmesinde esas etken olabileceğini düşündürmektedir (18,19). İskemiye takiben verilen melatonin grubunda enzim aktivitesinin (2.18±0.54) iskemide reperfüzyon öncesi melatonin uygulanan gruptaki kadar belirgin bir artış göstermemesi; iskemide reperfüzyon sonrası dokuya oksijen akışı ile glikoliz'in normale yaklaşması, bu esnada oluşabilecek serbest oksijen radikallerine karşı melatoninin koruyucu rolü ve enzimin hücre içi aktivite göstermesi ile ilişkilendirilebilir .

Kaynaklar

1. Cabeza J, Motilva V, Martin MJ, De la Lastra CA. Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life Sci* 2001;68:1405-1415.
2. Slavikova H, Lojek A, Hamar J, Duskova M, Kubala L. Total antioxidant capacity of serum increased in early but not late period after intestinal ischemia in rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 9-18.
3. İşlekel H, İşlekel S, Güner G. Biochemical mechanism and tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurol Sci* 2000; 7:2:1984-2000.
4. Liu TZ, Stern A. Assessment of the role oxidative stress in human diseases. *J Biomed Lab Sci* 1998;10:12-28.
5. Gözükara EM. *Biyokimya Cilt-2*, Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri. 2000;923-941.
6. Benot S, Goberna R, Reiter RJ, Carcia MS, Osuna C, Guerrero JM. Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. *J Pineal Res* 1999;27:59-64.
7. Rudack D, Gözükara EM, Chisholm ME, Holten, D. The effect of dietary carbohydrate and fat on the synthesis

- of rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1971;252:305-313.
8. Lowry O, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
 9. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21:1376-1386.
 10. Augustin AJ, Goldstein RK, Milz JL. Influence of anti-inflammatory drugs and free radical scavengers on intestinal ischemia induced oxidative tissue damage. *Advances In Experiment Med Biol* 1992;316:239-251.
 11. Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, Guice KS. Cytoprotection by diclofenac sodium after intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 1994;29:1044-1048.
 12. Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Gültek A. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal ischemia reperfusion injury in rats. *J Ped Surg* 1999;34:1458-1462.
 13. Hammerman C, Goldschmidt D, Caplan MS, Kaplan M. Amelioration of ischemia-reperfusion injury in rat intestine by pentoxifylline-mediated inhibition of xanthine oxidase. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:69-74.
 14. Kazez A, Demirbağ M, Üstündağ B, Özercan İH, Sağlam M. The role of melatonin in prevention of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 2000;35:1444-1448.
 15. Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1980; 1:109-131.
 16. Reiter RJ. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991;79:153-158.
 17. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993;(21):1376-1386.
 18. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Wen-Bo Q, Malgorzata K, Juan RC. Significance of melatonin in antioxidative defense system: Reactions and products. *Biol Signals and Reseptors* 2000;(9):137-159.
 19. Reiter Russel, J. Oxidative damage in the central nervous system: protective by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998;(56):359-384.