

STRESE BAĞLI MİDE MUKOZASI HASARINDA ENDOJEN GLUTATYON TÜKENİŞİNİN ENERJİ METABOLİZMASI İLE İLİŞKİSİ*

Emel ZENGİN ULAKOĞLU, M. Koray GÜMÜŞTAŞ,
Ahmet BELCE, Tuncay ALTUĞ, Emine KÖKOĞLU

Background.- Reactive oxygen species may play an important role in gastric ulceration induced by several kinds of stress. Detoxification of these radical species involves conversion of reduced glutathione to oxidized glutathione. Endogenous glutathione has been reported as a possible mediator in gastric mucosal protection. Stress-induced ischemia may adversely affect gastric energy metabolism, an important factor in mucosal self-defense against injury. The objective of this study was to examine the relationship between endogenous glutathione and ATP levels in stress-induced gastric mucosal ulceration.

Design.- On 20 male Wistar type albino rats, who were subjected to stress by the immobilization, ATP levels were determined by the modified Bucher technique, reduced glutathione levels by the method of Fairbanks and glutathione peroxidase activities by the spectrophotometric assay of Paglia and Valentine.

Results.- Significant decreases were found in ATP, reduced glutathione levels and glutathione peroxidase activities in the rats subjected to stress.

Conclusion.- Regeneration and de novo synthesis of reduced glutathione might be reduced as a consequence of decreased availability of ATP and some cofactors induced by the ischemic episode.

Zengin Ulakoğlu E, Gümüşttaş MK, Belce A, Altuğ T, Kökoğlu E. The relationship between endogenous glutathione depletion and energy metabolism in stress-induced gastric mucosal injury. *Cerrahpaşa J Med* 1998; 29 (3): 127-131.

GİRİŞ ▲

Glutatyon (γ -glutamilsistein glisin), organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptiddir.^{1,2} DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücre fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır.^{1,3,4}

İndirgenmiş glutatyon (GSH) içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur. Glutatyon peroksidaz (GPx) isimli enzimin kofaktörlüğünü yaparak, hidrojen peroksidi metabolize eder.^{1,2,4,5}

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, çeşitli stres modellerinin reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) oluşumunu hızlandırdığı ve lipid peroksidasyonlarına yol açtığı gösterilmiştir.^{6,7} ROS'un oluşturduğu oksidatif hasar oksidan stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidan stres ile GSH düzeylerinin azaldığı bilinmektedir. *In vivo*⁸ ve *in vitro*⁹ yapılan deneylerde, endojen GSH'ın çeşitli hasarlarda mide mukozası bütünlüğünün korunmasında önemli bir mediatör olabileceği görüşü ileri sürülmektedir. Diğer yandan stres ülserine bağlı iskeminin, hasara karşı savunmada önemli bir faktör olan mukozal enerji metabolizmasını azalttığı da gösterilmiştir.^{10,11} Ancak literatür araştırmamızda, stres ülserine bağlı hem glutatyon hem de

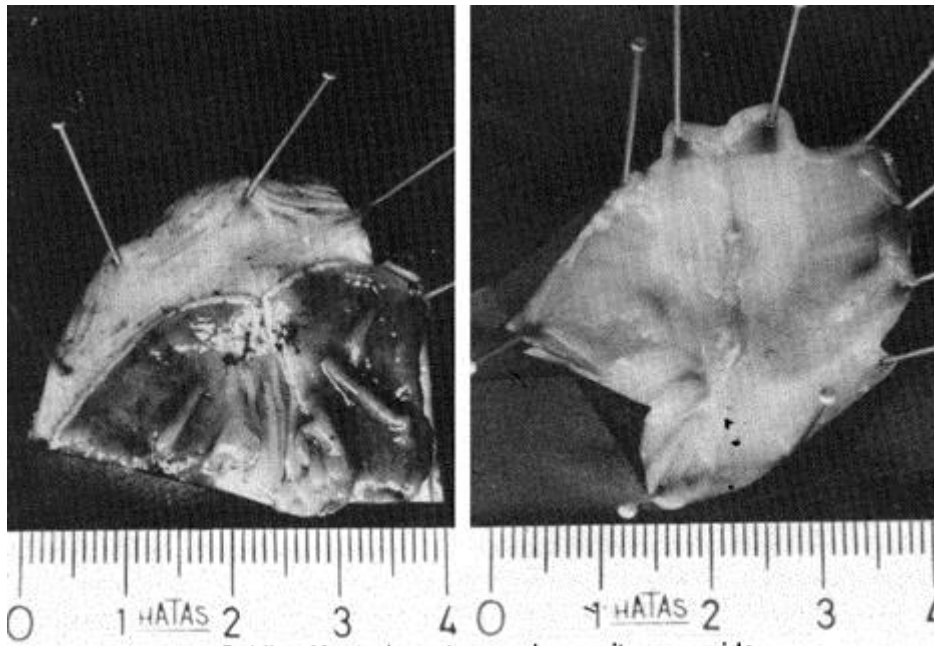
ATP düzeylerinin azalması ile ilgili mekanizmaların yeterli olarak izah edilmediğini görmekteyiz.

Bu çalışmadaki amacımız, hareketsizlik yöntemiyle stres ülseri geliştirdiğimiz sıçan mide mukozalarında, glutasyon düzeylerine ATP değişimlerinin ne şekilde etki ettiği, ayrıca serbest radikallerin detoksifikasyonu esnasında indirgenmiş glutasyonun (GSH) oksitlenmiş glutatyona (GSSG) dönüşümünü katalizleyen GPx aktivitelerinin incelenmesidir.

YÖNTEM VE GEREÇLER ▲

Deneyler, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarından sağlanan 200-250 gr ağırlığında 20 adet erkek Wistar Albino sıçan ile yapıldı. Tüm deney hayvanları oda sıcaklığında 24 saat aç bırakıldıktan sonra, 10 tanesine 6 saat hareketsizlik yöntemiyle stres uygulandı. Bu sürenin sonunda, genel eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edilen sıçanların laparotomi yoluyla mideleri çıkartıldı. Elde edilen mideler, buzlu zemin üzerinde büyük kurvaturları boyunca açıldı. Mide içeriği soğutulmuş serum fizyolojik ile yıkandı ve mide buzlu zemin üzerine gerildi.

Ülser indeksi tayini: Mide mukozasında meydana gelen hasar skalada verilen kriterlere göre değerlendirildi: 0= hiç hasar yok; 1= küçük; 1/2 mm ülser; 2= orta, 3-4 mm ülser; 4=geniş, 5-6 mm ülser. Her bir grubun total skor derecesinin deney hayvanı sayısına bölünmesiyle ortalama ülser indeksi saptandı (Şekil 1).



Şekil 1. Kontrol ve stres grubuna ait sıçan mide mukozalarından birer örnek

Doku çalışmaları: Mide mukozaları buz üzerinde bistüri yardımıyla kazındı ve elde edilen örnekler derhal -70°C'da donduruldu.

ATP düzeyi tayini: Doku tartıldıktan sonra, buz içinde teflon uçlu homojenizatör yardımıyla PGA (3-fosfoglisirik asid) tampon çözeltisi ile % 20'lik (w/v) homojenatı hazırlandı. Hazırlanan homojenat üzerine TCA (triklorasetik asid) çözeltisi % 12 (v/v) ilave edilerek proteinler çöktürüldü. Bu karışım 4°C'da ve 3000 rpm devirde 10 dak. santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Süpernatant içinde ATP düzeyi, Bucher'in Adams¹² tarafından modifiye edilen yöntemine dayanan Sigma diagnostik kitine uygun olarak çalışıldı (Sigma Kat No. 366).

GSH düzeyi ve GPx aktivitesi tayinleri: Doku tartıldıktan sonra, teflon uçlu homojenizatör ile soğuk 20 mM Tris-HCl tampon içinde (pH 7.4) % 33 (w/v) olacak şekilde homojenize edildi. Homojenat buz içinde 30 saniyelik aralıklarla 3 kez sonikasyona tabi tutuldu (MSE sonikator, güç çıkışı 38 watt) ve daha sonra 4°C'da ve

5000 rpm devirde 20 dak. santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantta GSH düzeyi DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asid)] ile renklendirme temeline dayanan yöntem¹³ ile, GPx aktivitesi ise Paglia ve Valentine'nin kinetik spektrofotometrik esasa dayanan Randox kit yöntemiyle¹⁴ tayin edildi.

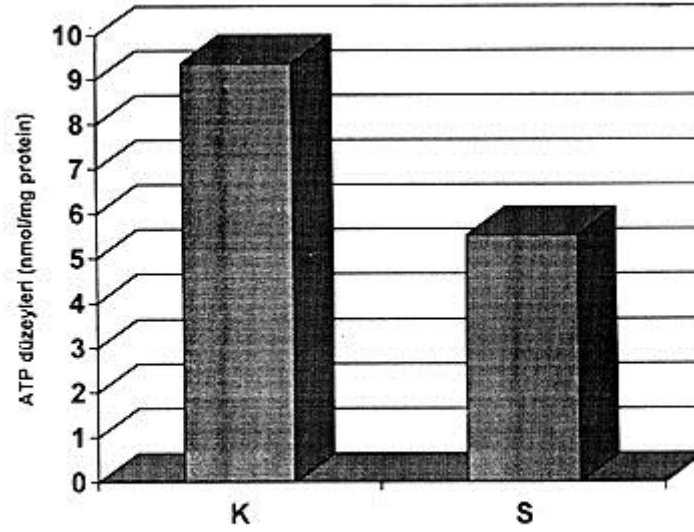
Süpernatantta protein miktarları Lowry'nin spektrofotometrik yöntemine uygun olarak ölçüldü.¹⁵

BULGULAR ▲

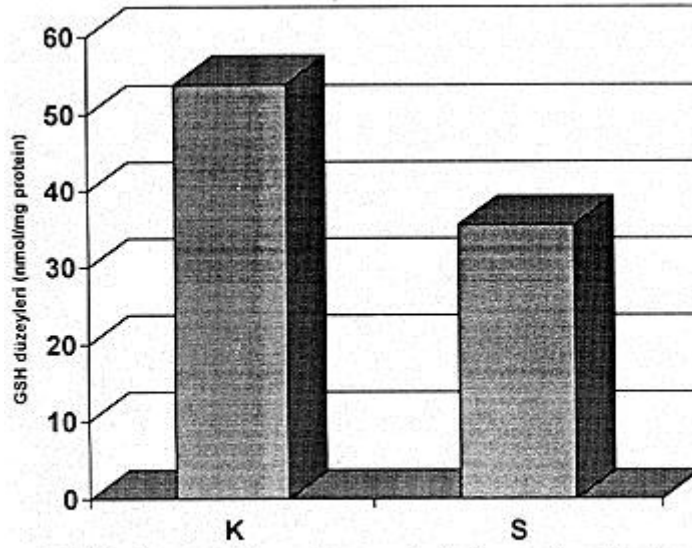
Uygulanan stres modeli ile elde edilen sonuçlar Tablo I'de verilmektedir. Kontrol grubu ve stres grubu sıçanların mide mukozası ATP ve GSH düzeyleri, GPx aktiviteleri Şekil 2, 3 ve 4'te gösterilmektedir.

Tablo I. Deney Gruplarında ATP, İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Düzeyleri, Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktiviteleri ve Ülser İndeksi Değerleri

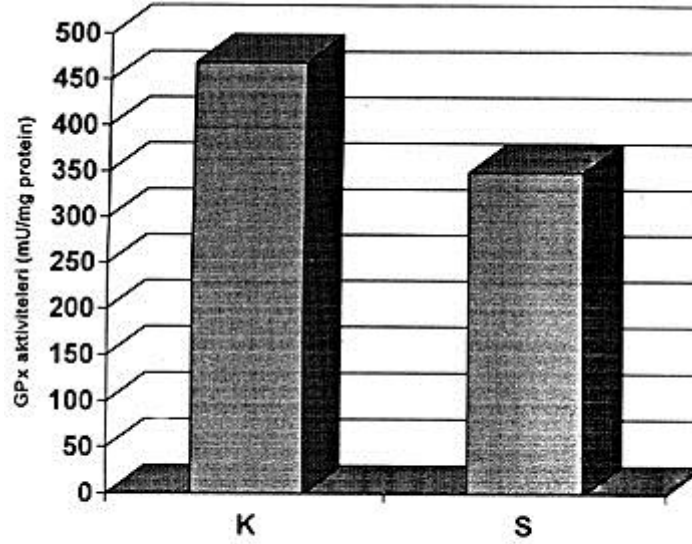
Deney grupları	ATP (nmol/mg protein)	GSH (nmol/mg protein)	GPx (mU/mg protein)	Ülser indeksi
Kontrol grubu	9.5±0.84	53.80±4.63	468.41±33.29	0
Stres grubu	5.50±1.17	35.51±3.06	349.60±32.93	5.8±0.79
p	<.001.	<.001	<.001	<.001



Şekil 2. Sıçan mide mukozasında ATP düzeyleri (K: Kontrol S: Stres grupları).



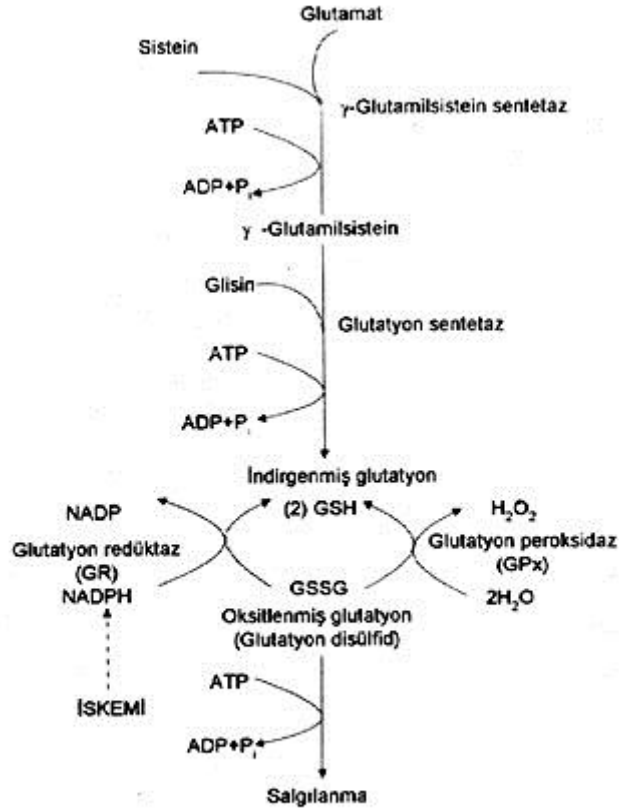
Şekil 3. Sıçan mide mukozasında indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri (K: Kontrol, S: Stres grupları).



Şekil 4. Sıçan mide mukozasında glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri (K: Kontrol, S: Stres grupları).

TARTIŞMA ▲

GSH, tüm memeli hücrelerinde bol miktarda (0.5-10 mM) sentezlenir. Bu sentez 2 basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, γ -glutamilsistein sentetaz isimli enzim GSH'ın prekürsör amino asitleri olan glutamat ve sisteinden, γ -glutamilsisteinin oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise, glutatyon sentetaz, glisin ve γ -glutamil-sisteinden glutatyonu oluşturur. GSH negatif feed-back ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini de denetler. Bu sentezde bir molekül GSH için 2 molekül ATP'nin hidrolizi gerekir.^{9,16} (Şekil 5) GSH sürekli olarak hücreler tarafından kullanıldığından, sentezinin inhibisyonu hızlı tükenmesine yol açabilir.^{1,3,4}



Şekil 5. Glutasyon sentezi ve siklusu

Oksidan stres sonucunda artan ROS oluşumunun hücre hasarlarındaki etkileri bilinmektedir. Bu ürünlerin detoksifikasyonu, glutasyonun indirgenmiş formunun (GSH) oksitlenmiş dimer formuna (GSSG) dönüşümü ile sağlanmaktadır. Glutasyon peroksidazın (GPx) katalizlediği bu reaksiyonda, GSH'nin enzim aktivitesi için esas olduğu açıktır. Oksidasyon sonucunda oluşan GSSF (Glutasyon disülfid) ise glutasyon redüktaz isimli enzim aracılığıyla ile geri dönen bir siklusla GSH'a rejenere olmaktadır.^{5,9}

Hücre yüksek miktarda oksidana maruz kaldığında, GSSG oluşumu metabolik sınırını aşmakta ve oksidatif stres oluşmaktadır. Detoksifiye olamayan oksidanlar membran lipidlerinin ve hücrenin çeşitli fonksiyonel ve yapısal proteinlerinin bozulmasına neden olmaktadır.^{5,16} Ayrıca GSSG'nin kendisi de, proteinlerin sülfhidril gruplarıyla (-SH) reaksiyonlaşarak kalıcı zararlı etkiler meydana getirmektedir.^{5,17} Bu son olaya bağlı hücre içi GSSG birikiminin, ATP'ye bağımlı bir taşıyıcı mekanizmanın varlığı ile bertaraf edildiği bildirilmiştir.¹⁸ Diğer taraftan gastrik mukozada glikojen depolarının az olduğu ve devamlı glikoz ihtiyacının karşılanması gerektiği bilinmektedir.¹⁹

Stresin yol açtığı iskemi sonucunda oluşan H₂O₂ ve serbest radikaller, glikoliz ve oksidatif fosforilasyonu inhibe ederek ATP miktarının düşmesine yol açarlar.¹⁶ Tümör hücrelerinde yapılan deneylerde, glikolitik yolun GAPDH (gliseraldehid-3P04 dehidrogenaz) seviyesinde inhibe olduğu gösterilmiştir.¹⁶ Çalışmamızda stres grubu sıçanların mide mukozası ATP miktarlarında elde ettiğimiz düşük sonuçlar (p<.001) literatür bilgileriyle^{10,11} uyumluluk göstermektedir.

Literatür araştırmamızda sterese bağlı glutasyon miktarının tükennesiyle ilgili mekanizmaların ise yeterli izah edilmediğini görmekteyiz. Stresin neden olduğu mukozal GSH düzeylerinde elde ettiğimiz azalmaları řu faktörlere bağlayabiliriz. GSH; artan ROS oluşunun önlemede GPx'a substrat teşkil ettiğinden hızla tükennemektedir.^{1,3,4} Diğer taraftan iskemi sonucunda mukozada ATP konsantrasyonundaki düşmeler, bir yandan GSH sentezinin yavaşlamasına yol açarken, diğer yandan GSSG'nin salgılanmasındaki azalmaya da neden olmaktadır. Böylece hücre içinde GSSG birikiminin bir kez daha artarak, ROS'un oluşturduğu hasarlara ilaveten GSSG'ye bağlı etkilerin de kamçılındığını düşünmekteyiz. Gerçekten de stres erozyonları ile ilgili bulgularımız bu izaha uymaktadır. Stres grubunun ülser indeksinde saptadığımız artmalar ($p < .001$) ATP ve GSH düzeylerindeki azalmalarla uyumluluk göstermektedir (Tablo I ve şekil 2, 3).

İskemik dokunun enerji metabolizmasıyla ilgili değişiklikleri arasında; hücrede NADPH oluşumunun inhibisyonu da yer almaktadır.⁵ Glutasyon redüktaza kofaktörlük teşkil eden NADPH miktarı azalmasının, mide mukoza hücrelerinde GSH düzeylerinin düşmesinin bir başka nedenini oluşturabileceğini düşünmekteyiz.

Stresin oksidatif doku hasarındaki etkileri incelendiğinde, ROS'un peroksidaz aktivitesini oksidatif olarak inaktive ettiği bildirilmektedir.²⁰ Stres sonucunda mide mukoza hücrelerinde artan ROS'a karşı GPx aktivitelerinde saptadığımız azalmalar (Tablo I ve şekil 4), hücre hasarının diğer nedenleri arasında olabilir.

ÖZET ▲

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, stresin yol açtığı doku hasarında reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) rolü üzerinde durulmakta, indirgenmiş glutasyonun (GSH) ise antioksidan savunmada önemli bir mediatör olduğu ileri sürülmektedir. Bu çalışmada hareketsizlik yöntemiyle strese maruz bırakılan sıçan mide mukozalarında GSH düzeylerinin ATP değişimleriyle ne şekilde etkilendiği araştırılmıştır. Ayrıca etkili diğer faktörler de incelenmiştir.

Stres grubu sıçanlarda mide mukozası GSH ve ATP düzeylerinde kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı azalmalar kaydedildi ($p < .001$). Bu anlamlı azalmalar glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitelerinde de saptandı ($p < .001$).

Strese bağlı iskemi sonucunda oluşan ROS, glikoliz ve oksidatif fosforilasyonu inhibe eder. ROS oluşumunun enerji metabolizmasındaki negatif etkileri, bir yandan GSH sentezinin ve rejenerasyonunun azalmasına neden olurken, diğer yandan okside glutasyonun salgılanma kusuruna da yol açmaktadır. Ayrıca, ROS, H₂O₂'in detoksifikasyonunda rol oynayan GPx'in da oksidatif inaktivasyonuna neden olmaktadır. Tüm bu değişiklikler dokuda lezyon oluşumunu kamçılmaktadır.

KAYNAKLAR ▲

1. Meister A, Anderson ME. Glutathione. Ann Rev Biochem 1983; 52: 711-760.
2. Meister A. Glutathione, ascorbate and cellular protection. Cancer Res Suppl 1994; 954: 1969s-1975s.
3. Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. Am J Physiol 1989; 257: L163-L173.
4. Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. Science 1983; 220: 472-477.
5. Ambrosio G, Santoro G, Tritto I et al. Effects of ischemia and reperfusion on cardiac tolerance to oxidative stress. Am J Physiol 1992; 262: H23-H30.
6. Das D, Banerjee RK. Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. Mol Cell Biochem 1993; 125: 115-125.

7. Goldin E, Ardite E, Elizalde JI et al. Gastric mucosal damage in experimental diabetes in rats: role of endogenous glutathione. *Gastroenterology* 1997; 112: 855-863.
8. Loguercio C, Taranto D, Beneduce F et al. Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. *Gut* 1993; 34: 161-165.
9. Mutoh H, Hiraishi H, Ota S et al. Protective role of intracellular glutathione against ethanol-induced damage in cultured rat gastric mucosal cells. *Gastroenterology* 1990; 98: 1452-1459.
10. Menguy R. Role of gastric mucosal energy metabolism in the etiology of stress ulceration. *World J Surg* 1981; 5: 175-180.
11. Mozsik GY, Kraly A, Suto G et al. ATP breakdown and resynthesis in the development of gastrointestinal mucosal damage and its prevention in animals and human. *Acta Physiol Hung* 1992; 80: 39-80.
12. Adams H. Adenosine 5'-triphosphate determination with phosphoglycerate kinase. In *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed. Bergmeyer HU. New York, Academic Press, 1963; 539-543.
13. Fairbanks V, Klee GG. Biochemical aspects of hematology. In: *Textbook of Clinical Chemistry*. Ed: Tietz NW, Philadelphia, Saunders Company, 1986; 1508-1510.
14. Paglia DE, Valetine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
16. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991; 3C23S-3C30S.
17. Scherer NM, Deamer DW. Oxidative stress impairs the function of the sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulphhydryl groups in the Ca⁺⁺-ATPase. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 589-601.
18. Ishikawa T, Zimmer M, Sies H. Energy-linked cardiac transport system for glutathione disulfide. *FEBS Lett* 1986; 200: 128-132.
19. Menguy R, Desbaillets L, Masters YF. Mechanism of stress ulcer: influence of hypovolemic shock on energy metabolism in the gastric mucosa. *Gastroenterology* 1974; 66: 46-55.
20. Das D, De PK, Banerjee RK. Thiocyanate a plausible physiological electron donor of gastric peroxidase. *Biochem J* 1995; 305: 59-64.

-
- *Anahtar Kelimeler:* Stres ülseri, Glutasyon, Adenozin trifosfat, Glutasyon peroksidaz; *Key Words:* Stress ulcer, Glutathione, Adenosine triphosphate, Glutathione peroxidase; *Alındığı Tarih:* 06 Mayıs 1998; Doç. Dr. Emel Zengin Ulakoğlu, Doç. Dr. M. Koray Gümüştas, Doç. Dr. Ahmet Belce, Prof. Dr. Emine Kökoğlu: İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı; Doç. Dr. Tuncay Altuğ: İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Bölümü. *Yazışma Adresi (Address):* Dr. E. Zengin Ulakoğlu, İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı, 34303, Cerrahpaşa, İstanbul.