



İN VİTRO GLUKOZ KATARAKTI OLUŞTURULMUŞ TAVŞAN LENSLERİNDEKİ GLUTATYON VE LİPİD PEROKSİDASYON DÜZEYLERİNE TAURİN'İN ETKİSİ

THE EFFECTS OF TAURINE ON THE LEVELS OF GLUTATHIONE AND LIPID PEROXIDATION ON *IN VITRO* GLUCOSE INDUCED CATARACTOUS RABBIT LENSES

Sibel KONYALIOĞLU

Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

Anahtar Sözcükler: taurin, glutatyon, lipid peroksidasyon, in vitro glukoz kataraktı

Key Words: taurine, glutathione, lipid peroxidation, glucose-cataract formation *in vitro*

ÖZET

Bu çalışmamızda, taurinin antikataraktojenik etkiye sahip olup olmadığını in vitro glukoz kataraktı oluşturulmuş tavşan lenslerindeki redükte glutatyon (GSH) ve lipid peroksidasyon (LPO) düzeylerine göre saptamaya çalıştık. Bu amaçla, lens örnekleri korteks ve nükleus olarak iki kısma ayrıldı; daha sonra kontrol, katarakt ve taurin çalışma grupları başlıkları altında GSH ve LPO düzeyleri belirlendi. Bulgularımıza göre, katarakt ve taurin gruplarına ait nükleus örneklerindeki GSH düzeyleri kontrollere kıyasla anlamlı bir şekilde değişmemiştir (sıra ile $p=0.413$ ve $p=0.792$), ancak korteks örneklerinde katarakt grubunun GSH düzeyleri kontrollere kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p=0.033$). Korteks örneklerinin taurin grubundaki GSH düzeyleri ise kontrollere kıyasla farklı değildir ($p=0.295$). Nükleus örneklerinin kontrol, katarakt ve taurin gruplarına ait LPO düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık yokken, korteks örneklerinin katarakt gruplarında kontrollere kıyasla LPO düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı dikkat çekmektedir ($p=0.022$). Diğer yandan taurin grubunda elde edilen LPO düzeyleri kontrollere oldukça yakın sonuçlar vermiştir. Taurin grubunun GSH ve LPO sonuçlarına göre, lens membran lipidlerini oksidatif hasara karşı koruduğu gözlenmektedir. Sonuç olarak, taurinin antikataraktojenik bir madde olduğu söylenebilir.

SUMMARY

In this our study, we try to determine whether taurine has anticataractogenic action by the levels of glutathione (GSH) and lipid peroxidation (LPO) in vitro glucose-cataract induced rabbit lenses. With this aim, lens samples were divided into two parts as cortex and nucleus, then the GSH and LPO levels were determined under the headings of control, cataract and taurine study groups. According to our results, in the nucleus samples the GSH levels in the cataract and taurine groups showed no remarkable differences as compared to the controls (respectively $p=0.413$ and $p=0.792$), however, in the cortex samples the GSH levels in the cataract group decreased significantly relative to the controls ($p=0.033$). There was no considerable difference between the GSH levels in the taurine and the control groups of the cortex samples ($p=0.295$). Concerning the LPO levels, the control, cataract and taurine groups of the nucleus samples displayed no significant differences, whereas in the cortex samples, the cataract group was found to have significantly increased LPO levels as compared to the controls ($p=0.022$). On the other hand, LPO levels of the taurine group tended to yield similar results to those of the control group. According to GSH and LPO results in the taurine groups, it can be postulated that taurine may protect lens membrane lipids against oxidative destruction. In conclusion, it may be postulated that taurine is an anticataractogenic substance.

Yazışma adresi: Sibel Konyalıoğlu, Ege Üniversitesi, Eczacılık

Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

Makalenin geliş tarihi: 12.06.2000 kabul tarihi: 04.04.2001

GİRİŞ

Günümüzde diyabetik katarakt patogenezinde, oksidatif hasar büyük önem kazanmıştır. Bir çok araştırmacı çeşitli vitaminlerin ve antioksidan bileşiklerin klinik çalışmalarda oluşturulan diyabetik kataraktların gelişmesini geciktirebileceğini veya önleyebileceğini bildirmektedir (1-3). Bu nedenle son çalışmalar hem antioksidan hem de mükemmel bir antikataraktojenik madde bulmak üzere yoğunlaşmıştır. Oksidatif hasarın önemli göstergelerinden olan GSH, biyolojik sistemlerde serbest radikallerin zararlarını ortaya koymadan etkisiz hale getiren güçlü savunma molekülleridir (1, 3, 5). Ancak hem deneysel hem de insan kataraktlarının hemen hemen her çeşidinde GSH konsantrasyonunun azaldığı bildirilmektedir (1,6,7). Membran proteinleri, GSH ve enzimlerin hayati derecede önemli sülfidril gruplarının oksidasyonu yanında, bir çok araştırmacının deneysel bulguları LPO'nun kataraktın başlangıç mekanizmalarından biri olduğunu da desteklemektedir (8-15). Son zamanlarda taurinin gözün diğer optik bölgeleri üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar bulunmasına karşılık, bu bileşiğin lens üzerindeki etkisi pek bilinmemektedir. Lens dışı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonucu bu maddenin güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (16-18). Biz de bu çalışmamızda taurinin antioksidan etkisinden dolayı diyabetik kataraktın tedavisine uygulanabilirliğinin araştırılması gerektiğini düşündük. Bu amaç doğrultusunda, oksidatif stresin göstergeleri olarak lensin nükleus ve korteks bölgelerinde LPO ve GSH düzeylerini ölçtük.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda deneysel hayvan laboratuvarlarından sağlanan erkek, 2000-3500 g ağırlığında 6-12 aylık pigmentli gözlere sahip (Albino olmayan) 23 adet tavşan kullanıldı. Sağlıklı gözlere sahip tavşanların boyunlarından kesilerek öldürülmelerini takiben, geçen en fazla üç saat içinde göz lensleri çıkarıldı. Gözün en dış bölgesi olan kornea kısmı kesilerek tamamen kaldırıldı. Kornea tabakasının hemen altında bulunan aqueous humorun kendiliğinden akmasına izin verildi. Daha sonra göze renk veren iris tabakası serum fizyolojik ile yıkama ve penslerle sıyırma suretiyle alındı. Iris tabakasının hemen altında bulunan lens penslerle kolay bir şekilde çıkarıldı ve serum fizyolojik ile yıkanıp temiz bir saat karanlık ortamda alındı. Lens korteksi yeni gelişmiş lens fibrilleri bulunmadığından lens nükleusuna göre daha yumuşak ve esnek yapıya sahiptir. Nükleus ise daha serttir. Bu özgülük farkından yararlanarak özel bıçaklar yardımıyla lensin nükleus ve korteks bölgeleri birbirlerinde kolayca ayrıldı (12). LPO ölçümünde kullanılacak korteks ve nükleus örnekleri tartılarak, üzerine 1'er mL 2.26 mM BHT içeren serum fizyolojik, GSH tayini yapılacak korteks ve nükleus örneklerinin üzerlerine 1'er mL 0.1 mM EDTA içeren 50 mM Tris-

HCl tamponu (pH=7.5) ilave edilerek, örnekler plastik kapaklı tüpler içinde deney gününe kadar -70 °C'de saklandı.

Kimyasal Maddeler

Redükte glutatyon (GSH), Butilenmiş hidroksi toluen (BHT), 5, 5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), tiyobarbitürik asit (TBA) "Sigma Chem. Co. St. Louis, USA" dan; Taurin "E. Merck, Darmstadt, Germany" den sağlanmıştır. Deneylerde kullanılan diğer maddeler amaca uygun saflıktadır.

Yöntemler

Kontrol, katarakt ve taurin çalışma gruplarının nükleus ve korteks örneklerinde LPO ve GSH düzeyleri tayin edildi. Lensin nükleus ve korteks örnekleri üç grup altında çalışılmıştır. Buna göre petri kutuları içinde, 37 °C de, karanlıkta ve 10 ml hacminde isosmolar (290-310mOsm) inkübasyon çözeltilerinde 24 saat bekletmek suretiyle gruplar aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır (19)

1. Hiçbir işlem uygulanmamış sağlıklı lensler: Dengelenmiş tuz çözeltisinde inkübe edilmiştir.
2. Katarakt grubu: 55.6mM glukoz içeren dengelenmiş tuz çözeltisinde inkübe edilmiştir.
3. Taurin grubu: 55.6mM glukoz ve 50mM taurin içeren dengelenmiş tuz çözeltisinde inkübe edilmiştir.

Lens GSH tayini için Ellman's yöntemi uygulanmıştır (20). Bu spektrofotometrik yöntemde, DTNB molekülü herbir -SH grubu tarafından bir mol 2-nitro-5-merkaptobenzoik aside redüklenmesi sonucu oluşan yoğun sarı rengin 412 nm'de ölçümü esasına dayanmaktadır. LPO tayini için de tiyobarbitürik asit (TBA) ile lipid peroksidasyon ürünlerinin asidik pH ve sıcakta oluşturduğu pembe renkli kompleksin ölçümü esasına dayalı TBA yöntemi kullanılmıştır (21). ANOVA (one-way) varyans analizinde bulunan farklı ortalamalara sahip olan gruplar arasında Post-hoc (Tukey-HSD) yöntemi uygulanarak, grup ortalamaları karşılaştırılmıştır. Bu işlemler için, bilgisayarda SPSS for Windows istatistik programının Release 6.1 versiyonu (SPSS Inc. USA) kullanıldı.

BULGULAR

Nükleus örneklerinin kontrol, katarakt ve taurin gruplarına ait LPO, GSH düzeyleri ve standart sapma (SD) ile Post-hoc (Tukey-HSD) yöntem karşılaştırma sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

Korteks örneklerinin kontrol, katarakt ve taurin gruplarına ait LPO, GSH düzeyleri ve standart sapma (SD) ile Post-hoc (Tukey-HSD) yöntem karşılaştırma sonuçları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1 Nükleus örneklerinin kontrol, katarakt ve taurin gruplarına ait LPO (nmol/g lens) ile GSH düzeyleri (nmol/mg lens) ve istatistiksel anlamlılık sonuçları (n: örnek sayısı).

	Kontrol Grubu (n=15)	Katarakt Grubu (n=15)	Taurin Grubu (n=15)	İstatistiksel Anlamlılık (p)		
				Kontrol-Katarakt Grubu	Kontrol-Taurin Grubu	Katarakt-Taurin Grubu
LPO (Ort ± SD)	1.155 ± 0.123	1.204 ± 0.247	1.177 ± 0.065	p = 0.499	p = 0.719	p = 0.887
GSH (Ort ± SD)	3.299 ± 0.286	3.207 ± 0.313	3.330 ± 0.348	p = 0.413	p = 0.792	p = 0.323

Tablo 2 Korteks örneklerinin kontrol, katarakt ve taurin gruplarına ait LPO (nmol/g lens) ile GSH düzeyleri (nmol/mg lens) ve istatistiksel anlamlılık sonuçları (n: Örnek sayısı)

	Kontrol Grubu (n=15)	Katarakt Grubu (n=15)	Taurin Grubu (n=15)	İstatistiksel Anlamlılık (p)		
				Kontrol-Katarakt Grubu	Kontrol-Taurin Grubu	Katarakt-Taurin Grubu
LPO (Ort ± SD)	0.742 ± 0.058	4.564 ± 0.449	0.743 ± 0.077	p = 0.022	p = 0.985	p = 0.032
GSH (Ort ± SD)	6.327 ± 0.340	2.974 ± 0.201	6.202 ± 0.286	p = 0.033	p = 0.295	p = 0.047

TARTIŞMA VE SONUÇ

In vitro şartlarda katarakt oluşturmak için, TC-199, MEM ve H₁₀ gibi kültür ortamlarında uzun süreli inkübasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (1, 4, 19). Ancak bu ortamlar pahalı, uygulamaları zahmetli ve katarakt oluşturma zamanları daha uzundur. Çalışmamızdaki inkübasyon ortamı, Barber ve arkadaşlarının çalışmaları temel alınarak hazırlanan dengelenmiş tuz çözeltisi (290-310 mOsm) seçilmiştir. Inkübasyon zamanı da yine aynı literatürde önerilen 24 saatlik inkübasyon süresi tercih edilmiştir (19). Bu sürenin sonunda lensde oluşan opasiteler lensin suda çözünen protein fraksiyonunun total lens proteini içindeki yüzdesine göre sınıflandırılmıştır. Suda çözünen protein yüzdesi %42 ve az olanlar olgunlaşmış katarakt olarak kabul edilmiştir (12).

Lens membranları yüksek oranda doymamış yağ asitleri içermektedir. Bu nedenle, oksidatif strese maruz kaldıklarında çok çabuk bir şekilde oksidasyona uğrayarak, hücre membranında hasara neden olurlar. Diyabetik katarakta olduğu gibi diğer tüm katarakt türlerinde LPO düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (22-26). Bizim bulgularımıza göre de, nükleus örneklerinin katarakt ve taurin gruplarına ait LPO düzeyleri arasında kontrollere kıyasla anlamlı bir farklılık yoktur (sıra ile p = 0.499 ve p = 0.719). Ancak korteks örneklerinin kontrollere kıyasla katarakt gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış LPO düzeyleri dikkat çekicidir (p = 0.022). Korteks örneklerinin katarakt grubundaki bu LPO artışı, taurin grubunda gözlenmemiştir. Bu sonuçtan taurinin lens membran lipidlerini oksidatif hasara karşı koruduğunu söyleyebiliriz. Yine bu sonuç bize, uyguladığımız *in vitro* glukoz katarakt modelinde lensin

nükleus bölgesine oranla korteks bölgesindeki hücre membranlarında oksidatif hasarın daha baskın olduğunu da ortaya koymaktadır.

Deneysel ve insan kataraktlarının hemen hemen her çeşidinde lens GSH düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (27-30). Böylece H₂O₂'nin detoksifikasyonunda görevli olan GSH, membran yapısındaki çoklu - doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna engel olamaz (28, 29). Pek çok çalışma lens içi GSH düzeylerinin azalması ile LPO'nun arasında ilişki olduğunu ortaya koymuştur (4, 27-29). Bizim çalışmamızda da LPO'nun bir göstergesi olarak ölçtüğümüz kataraktlı korteks TBARS düzeyleri, GSH düzeylerinin azalması ile anlamlı bir şekilde artmıştır. Ancak taurin grubunda LPO normal sınırlar içinde bulunmuştur (Tablo 2). Taurinin antioksidan etkisinin LPO'yu azalttığı düşünülebilir. Korteks bölgesinde suda çözünen düşük moleküler ağırlıklı lens proteinlerinin, kataraktın oluşumu esnasında total protein sülfidril (TP-SH) ve protein sülfidril (P-SH) düzeylerinin azaldığı ve protein disülfid (P-S-S-P) düzeylerinin de arttığı bildirilmiştir. Disülfid bağlarında artma sonucu meydana gelen 150x10⁶ Da'dan daha yüksek molekül ağırlığına sahip agregat birikimlerini Jedziniak göstermiştir. Bu durum ise opasifikasyonu başlatan en önemli olay olarak kabul edilmektedir (12, 21, 30). Bu bağlamda GSH, lens protein tiyollerini oksidasyona karşı savunarak, proteinlerin suda çözünürlük özelliklerinin korunmasına yardım eder ve dolayısı ile opasifikasyonun oluşumunu önler. Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanların GSH, LPO düzeylerine besinlerindeki eklenmiş taurinin etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada da besinlere %5 oranında eklenen taurin, artmış olan GSSG/GSH oranı ile LPO düzeylerinde bir iyileşme ortaya koymuştur (23, 24).

