

## ARAŞTIRMA

# Demir (III) varlığında trombosit gama-glutamil transferazının pro-oksidan etkisi

Azize Şener<sup>1</sup>, Özge Çevik<sup>1</sup>, Derya Özsvacı<sup>1</sup>, Gülderen Yanıkkaya-Demirel<sup>2</sup>

**ÖZET:** Gama-glutamiltransferaz (GGT), indirgenmiş glutatyonun (GSH) metabolizmasında önemli rol oynayan bir membran enzimidir. GSH'ın katabolizması sırasında, GGT aktivitesi sonucu güçlü demir redükleyici etkisi olan tiyol dipeptid sisteinilglisin oluşur. Son araştırmalar artmış serum GGT aktivitesinin oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir. GGT aktivitesi trombositlerde de bulunur. Redoks reaksiyonları trombosit fonksiyonlarını değiştirebilir. Ancak, trombositlerdeki redoks reaksiyonlarında GGT aktivitesinin rolü bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı trombosit-GGT aktivitesinin demir(III) varlığında, oksidatif modifikasyonları ve apoptotik uyarıları başlatıcı etkisinin olup olmadığını belirlemektir. Çalışmamızda, trombosit GGT aktivitesi demir(III) varlığında inhibitörlerle inhibe edildikten sonra ve/veya substratları ile uyarıldıktan sonra lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, GSH, kaspaz-3 düzeyleri ve fosfatidilserin (PS) translokasyonu incelenmiştir. Sonuçlar, demir (III) varlığında GGT aktivitesi uyarılan trombositlerin lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu düzeylerinin GGT aktivitesi inhibe edilen trombositlere göre anlamlı olarak daha yüksek düzeylerde olduğunu göstermiştir. GGT aktivitesi uyarılan trombositlerin GSH içeriği anlamlı ölçüde azalmıştır. Trombositlerin kaspaz-3 aktivitelerinde anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Ancak, GGT aktivitesi uyarılan trombositlerde PS translokasyonu, GGT aktivitesi inhibe edilen trombositlere göre erken apoptoz-aktivasyon fazında artmıştır. Sonuç olarak, trombosit-GGT/GSH/demir(III) sistemi trombositlerde oksidatif modifikasyonları ve trombosit PS translokasyonunu tetikleyebilir. Böylece, trombosit-GGT'si bulunduğu çevrede reaktif oksijen türlerinin (ROT) artışına katkıda bulunabilir ve kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde rol oynayabilir.

**ANAHTAR KELİMELE:** trombosit, gama-glutamiltransferaz, oksidatif stres, apoptoz, demir toksisitesi

## KURUM

<sup>1</sup>Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
<sup>2</sup>Yeditepe Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji-İmmunoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

## İLETİŞİM

Azize Şener  
E-posta: azizesener@hotmail.com

Gönderilme:  
16.12.2010

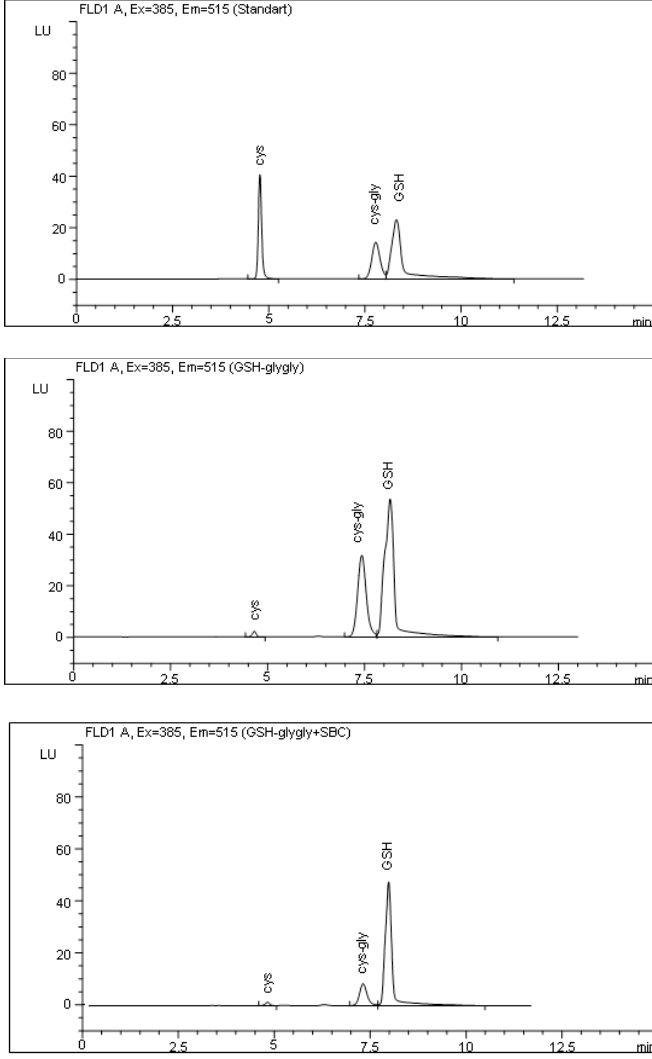
Revizyon:  
21.12.2010

Kabul:  
27.12.2010

## GİRİŞ

Gama-glutamil transferaz (GGT, EC 2.3.2.2) hücre membranının dış yüzeyinde bulunan ektoaktiviteye sahip bir enzimidir. GGT'nin ana fonksiyonu hücre membranından bütün halde geçişi güç olan ekstrasellüler indirgenmiş glutatyonun (GSH) hidrolizidir. Böylece hücre içinde yeniden GSH sentezi için gerekli sisteini sağlayarak GSH hemostazında önemli rol oynar ve antioksidan etki gösterir (1, 2). GSH diğer hücrelerde olduğu gibi trombositlerde de oksidatif strese karşı savunmada ve redoks reaksiyonlarının düzenlenmesinde kritik rol oynar. GSH ve okside glutatyon (GSSG) oranındaki dengenin bozulması sıklıkla kardiyovasküler hastalıklar gibi trombosit agregasyonu ve aktivasyonun bozulduğu durumlara eşlik eder (3, 4).

Son yıllarda özellikle hücre kültürleri ile yapılan çalışmalar GGT tarafından GSH'ın hidrolizi sırasında ve demir, bakır gibi geçiş metallerinin varlığında reaktif oksijen türlerinin oluşabileceğini de göstermiştir (2, 5, 6). GSH'ın GGT tarafından hidrolizi sırasında oluşan ana metabolit sisteinilglisinin -SH grubunun kuvvetli redükleyici etkisi bu durumdan sorumlu tutulmaktadır. Normalde sistein ve sisteinilglisinin yapısında bulunan -SH gruplarının da antioksidan özelliği olduğu bilinmektedir. Sisteinilglisinin -SH grubu ortamın pH değerlerine bağlı olarak kolaylıkla tiyolat anyonuna dönüşebilir. Oluşan tiyolat anyonu demir gibi geçiş metallerinin varlığında reaktif oksijen türlerinden (ROT) biri olan tiyil radikalinin (-S<sup>•</sup>) oluşmasına yol açar. Oluşan tiyil radikalini ferrik demiri (Fe III) ferröz demire (Fe II)

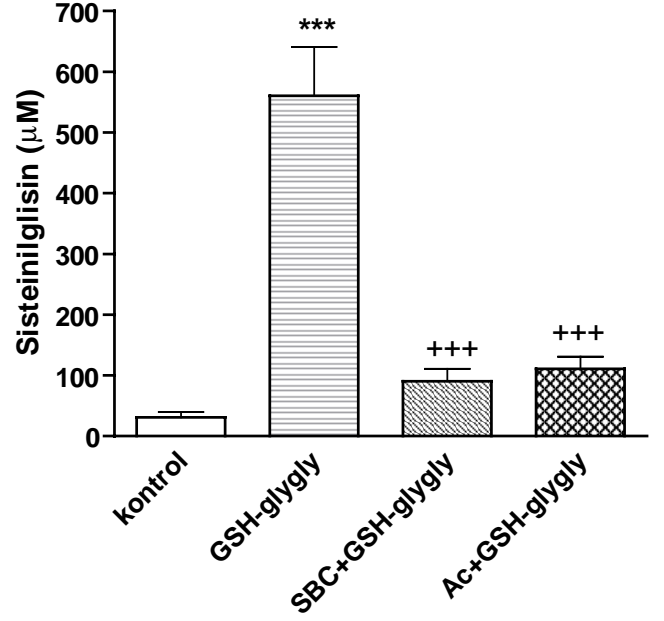


**ŞEKİL 1.** İnkübasyon ortamında oluşan sisteinilglisin düzeylerinin HPLC ile ölçümüne ait kromatogram örnekleri. a) standart karışım (sistein, sisteinilglisin, GSH) b) GSH-glygly grubu c) SBC+GSH-glygly grubuna ait kromatogram.

indirgerek Fenton reaksiyonu ile ROT'ların oluşmasına neden olabilir (7, 8).

Fizyolojik ve patolojik şartlarda açığa çıkan ROT'lar trombosit fonksiyonlarında önemli rol oynar. Trombositler dolaşımında diğer kaynaklardan açığa çıkan ROT'ların yanında kendi ürettikleri için de hedef hücrelerdir. Endojen olarak trombosit aktivasyonu sırasında üretilen süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi ROT'lar otokrin ve parakrin olarak etki gösterirler (3, 4). İntraselüler ve ekstraselüler ROT üretiminin artması redoks dengesinin bozulmasına neden olarak hücreleri apoptoz veya nekroza yönlendirebilir (8).

Apoptoz çekirdekli hücrelerde gözlenen programlanmış hücre ölümüdür. Çekirdek içermemelerine karşın trombositlerde apoptotik göstergeler (normalde hücre membranının iç yüzeyinde yer alan bir fosfolipid olan fosfatidil serinin hücre membranının dış yüzeyine hareketi (translokasyonu), kaspaz-



**ŞEKİL 2.** İnkübasyon ortamında oluşan sisteinilglisin düzeyleri (Ac: Aklivisin, SBC: L-serin-borik asit karışımı, \*\*\*p<0.001, kontrole göre anlamlı; +++p<0.001, GSH-glygly grubuna göre).

ların aktivasyonu, mikropartikül oluşumu gibi) belirlenmiştir (9).

Bu çalışmada demir(III) varlığında, trombosit GGT aktivitesinin eksojen GSH ilavesi ile uyarılmasının trombositlerde oksidatif değişikliklere, trombosit apoptozuna ve trombosit aktivasyonuna etkisi araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

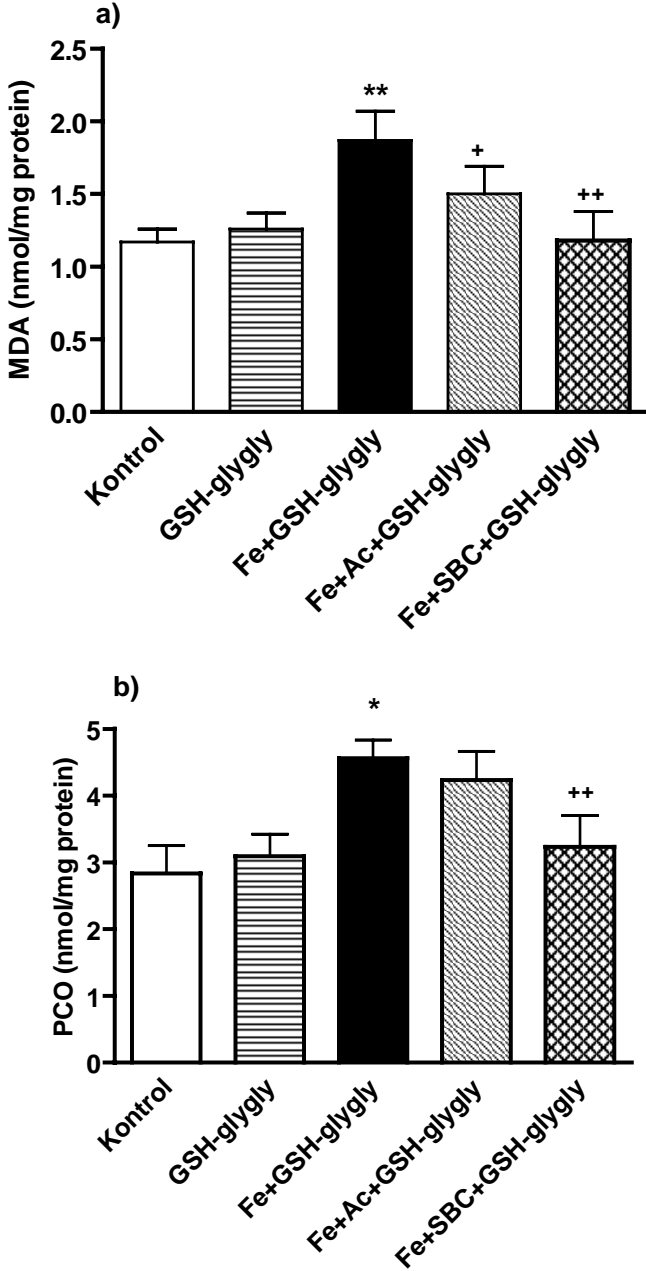
Çalışmamızda sağlıklı, gönüllü 12 kişiden alınan kanlardan elde edilen trombositler kullanılmıştır. Çalışmaya alınan kişilerin son 10 gün içinde trombosit fonksiyonlarını etkilediği bilinen bir ajana maruz kalmamış olmasına özen gösterildi. Çalışma için, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/983 sayı ile onay alınmıştır. Deneylerde kullanılan kimyasallar Sigma (St. Louis, MO, USA) ve Merck (Darmstadt, Germany) firmasının ürünleridir.

### Trombositlerin ayrılması

Çalışmamızda, trombositler aferez yöntemi ayrıldıktan sonra 5000 rpm'de 15 dakika 22°C 'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Çöken trombositler Tris-NaCl-EDTA (0.03 M Tris, 0.12 M NaCl, pH: 7.4; 5 mM EDTA, 1 U/ml apiraz içeren) tamponu ile süspende edilerek yıkandı. Santrifüj sonrası tamponda (0.03 M Tris; 0.12 M NaCl, 5mM glukoz, pH:7.4) süspende edilerek analizler için kullanıldı.

### GGT aktivitesinin inhibisyonu

GGT aktivitesini inhibe etmek için GGT'nin geri dönüşümsüz inhibitörü olan aklivisin ve spesifik geri dönüşümlü yarışmalı inhibitörü olan L-serin/borik asit karışımı (SBC) olmak üzere etki mekanizmaları farklı iki inhibitör kullanıldı (1). İnhibitör-



**ŞEKİL 3.** Trombosit malondialdehit (MDA) düzeyleri (a) (\*\* p<0.01, GSH-glygly ve kontrol grubuna göre; +p<0.05, ++p<0.01, Fe+GSH-glygly grubuna göre ) ve protein karbonil (PCO) içerikleri (b) (\*p<0.05, GSH-glygly ve kontrol grubuna göre; ++p<0.01, Fe+GSH-glygly grubuna göre).

ler, 500 µM akivisin veya SBC (5 mM L-serin/10mM borik asit) 1ml Tris-NaCl tamponu ile süspande edilmiş trombositlere ilave edilerek 37 °C' de 15 dakika bekletildi. İnkübasyon sonrası örneklerde GGT aktivitesi tayin edilerek (10) inhibisyon oranları belirlendi. GGT aktivitesinin tayini için substrat olarak gama-glutamil p-nitroanilid kullanıldı. Reaksiyon sonunda açığa çıkan p-nitroanilin verdiğimiz renk 405 nm' de spektrofotometrede okundu ve GGT aktivitesinin inhibisyon oranı % inhibisyon olarak verildi.

### Sisteinilglisin düzeylerinin belirlenmesi

İnhibitör uygulanan ve uygulanmayan örneklerde GGT aktivitesi sonucu açığa çıkan sisteinilglisin düzeyleri belirlendi (11). Yöntemin esası tiyol gruplarına karşı seçici özelliği olan floresan bir madde ile (7-floro 2-benzo 2-okso 1,3-diazol 4-sülfonat, SBDF) ile tiyol gruplarının türevlendirilmesidir. Bu amaçla, 50 µL örnek 25 µL fosfat tamponu (PBS, pH 7.4) ve 1 mM ditiyotreitil (DTT) ile 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra örneklerin proteinleri trikloro asetik asit (TCA) ile çöktürüldü ve üst fazları alındı. Üst fazdan alınan 50 µL örnek üzerine 1.55 M NaOH ve 0.125 M borat tamponu (pH:9.5) ilave edildi. Karışıma SBDF (1 g/L) ilave edilerek 60 °C' de 60 dakika bekletildi. Daha sonra 10 µL örnek floresan detektörlü (385 nm eksitasyon, 515 nm emisyon) ve 5 µm Kromasil C18 kolon (15cm×4.6 mm, Hi Chrom, Berkshire, UK) taşıyan HPLC (Agilent, Mississauga, Canada) sistemine uygulandı. Mobil faz olarak 30 mL/L metanol içeren asetik asit-asetat tamponu (0.1 mol/L, pH 5.5) kullanıldı. Kromatografi 0.7 ml/dakika akış hızı ve 29 °C sıcaklık değerlerinde yapıldı. Standart olarak ticari sistein, sisteinilglisin ve GSH kullanıldı. Standartlar kolona ayrı ayrı ve karışım halinde enjekte edilerek sisteinilglisin için retansiyon zamanı belirlendi. Sonuçlar µM sisteinilglisin olarak ifade edildi.

### Oksidatif parametreler için yapılan inkübasyonlar

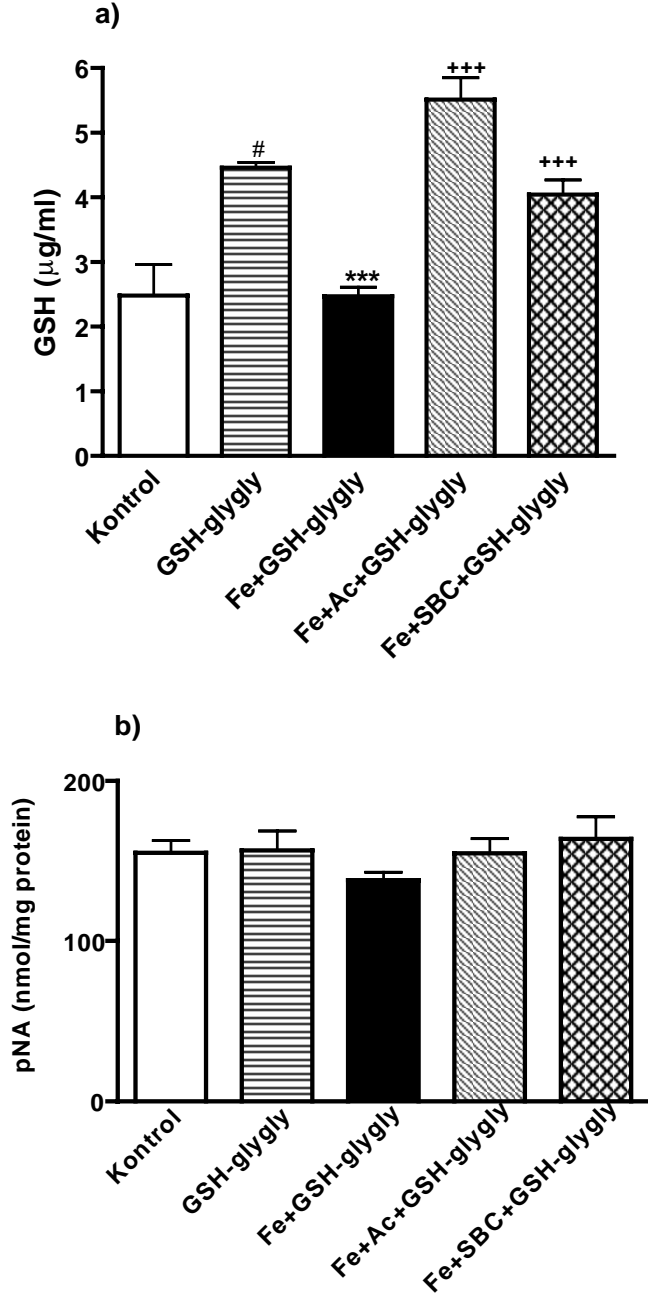
Trombositler 5 mM glukoz içeren Tris-NaCl (0.03 M Tris, 0.12 M NaCl) tamponu içinde süspande edildi ve 1 ml'lik trombosit süspansiyonları hazırlandı. GGT aktivitesini uyararak fizyolojik substratı olan GSH (2.5 mM) ve akseptör glisilglisin (glygly, 25 mM) kullanıldı. Demir kaynağı olarak FeCl<sub>3</sub> (150 µM, nitroasetik asit (NTA) ile komplekslenmiş) kullanıldı. Ortama GGT inhibitörleri ilave edilerek ve edilmeden inkübasyonlar yapıldı. Gruplar (tüm gruplar için n:12) aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

1. Kontrol grubu (trombosit+tampon)
2. GSH-gly-gly grubu (trombosit+GSH+glygly)
3. Fe+GSH-glygly grubu (trombosit +demir (III)+GSH+glygly)
4. Fe+ SBC+GSH-glygly (trombosit+ demir (III)+SBC+GSH+glygly)
5. Fe+Ac (akivisin)+GSH-glygly (trombosit+demir (III)+akivisin+GSH+glygly)

GGT inhibitörleri (500 µM akivisin, 5/10 mM SBC) inkübasyon ortamına 15 dakika önceden ilave edildi. İnhibitör içermeyen gruplara aynı hacimde tampon ilave edilerek bekletildi. Tüm ajanların ilavesinden sonra 37°C de 45 dakika inkübasyon sonrası trombositler 1200xg' de 10 dakika santrifüj edildi. Çöken trombositler tamponda süspande edildi ve sonikasyonla patlatılarak analizler için kullanıldı.

### Lipid peroksidasyonu (LPO), protein oksidasyonu ve GSH düzeylerinin belirlenmesi

Trombosit LPO düzeyleri Beuge ve Aust'un yöntemi ile belirlendi (12). Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 532 nm' de maksimum absorban veren renkli bir bileşik oluşturur. Oluşan bu bileşiğin miktarı MDA ile doğ-



**ŞEKİL 4.** Trombosit indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri (a)(# p<0.001, kontrol grubuna göre; \*\*\*p<0.001, GSH-glygly grubuna göre; +++p<0.001, Fe+GSH-glygly grubuna göre). Trombosit kaspaz-3 aktivitesi (b) 1 saat inkübasyon sonrası salınan p-nitroanilin (pNA) düzeyleri ile ölçüldü (gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir).

ru orantılıdır. Sonuçlar standart grafik kullanılarak nmol MDA/mg protein olarak ifade edildi.

Protein oksidasyonu, protein karbonil içeriklerinin (PCO) tayini ile belirlendi. Trombosit karbonil içeriğinin ölçülmesinde Levine ve ark (13) yöntemi esas alındı. Bu yöntemin prensibi, protein karbonil grupları ile 2,4 dinitrofenil hidrazinin (DNPH) reaksiyonu sonucu oluşan kararlı hidrazon bileşiklerinin 360

nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Sonuçlar ekstinksiyon katsayısı ( $2200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) kullanılarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Trombositlerde GSH düzeyleri Mergel ve Ark (14) yöntemine göre yapıldı. Bu yöntemde, hafif alkali ortamda, 5,5 ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB, Ellman reaktifi), ortamdaki alifatik tiyol bileşikleriyle tepkimeye girer. Tiyol başına oluşan, p-nitrofenol miktarı  $412 \text{ nm}'de$  spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar standart olarak GSH ( $5 \mu\text{g/ml} - 30 \mu\text{g/ml}$ ) kullanılarak hesaplandı ve  $\mu\text{g/ml}$  olarak ifade edildi.

#### Kaspaz-3 düzeylerinin ölçülmesi

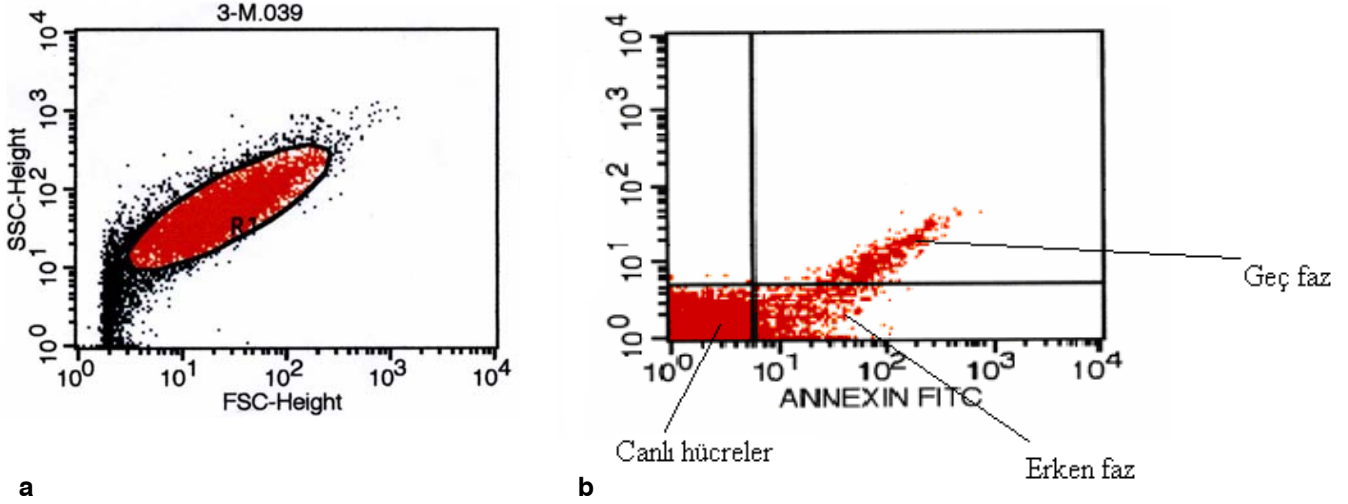
Kaspaz-3 aktivitesi Chemicon kaspaz-3 kolorimetrik ölçüm kiti (Chemicon, Temecula, CA, USA, Kat. No: APT165) kullanılarak yapıldı. Yöntemin prensibi kaspaz-3'ün substratı olan N-Asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid'den (Ac-DEVD-pNA) kromofor p-nitroanilin (pNA) serbestleşmesinin spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır. Kaspaz-3'ü kaspaz-3 benzeri aktivite gösteren enzimlerden ayırt edebilmek için kaspaz 3'ün spesifik inhibitörü olan N-Asetil-Asp-Glu-Val-Asp-CHO (Ac-DEVD-CHO) kullanılarak da ölçümler yapıldı. Reaksiyon sonunda serbestleşen pNA'nın absorbansı ELISA okuyucusu (Thermo, Multiskan EX, Vantaa, Finland) kullanılarak  $405 \text{ nm}'de$  ölçüldü ve sonuçlar 1 saatlik inkübasyon sonucu açığa çıkan nmol pNA/mg protein olarak ifade edildi.

Örneklerin protein içerikleri Bradford yöntemine göre (15) tayin edildi.

#### Trombosit PS translokasyonunun ölçülmesi

PS'nin hücre membranının iç yüzeyinden membranın dış yüzeyine hareketinin ölçümü için kapaklı konik tipli polipropilen tüpler kullanıldı. Ölçüm akım sitometresinde (EPICS XL-MCL, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) yapıldı. Öncelikle, trombosit örnekleri tampon ile süspand edildi.  $100 \mu\text{l}'lik$  trombosit örnekleri alındı. İnhibitör ilave edilecek gruplara aktivisin veya SBC ilave edilerek 15 dakika ön inkübasyon yapıldı. Daha sonra GGT'nin substratları olan GSH ( $2.5 \text{ mmol/L}$ ), glisilglisin ( $25 \text{ mmol/L}$ ) ve  $\text{FeCl}_3$  ( $150 \mu\text{M}$ ) ilave edilerek karışım reaksiyona girmesi için 45 dakika  $37^\circ\text{C}'de$  bekletildi. İn-kübasyon sonrasında her örnek tüpü üzerine floresein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenmiş anneksin-V (fosfolipidlere bağlanan protein,  $25 \mu\text{g/ml}$ ) eklenerek 10 dakika soğuk ortamda karanlıkta bekletildi. Üzerine  $100 \mu\text{l}$  bağlama tamponu ( $10 \text{ mM}$  HEPES/NaOH pH:7.4;  $140 \text{ mM}$  NaCl,  $2.5 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$  içeren) eklenip akım sitometresinde ölçüm yapıldı.

CaliBrite boncuklar (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) günlük kalite kontrolü için kullanıldı. Her tüpte 50.000 hücre sayıldı. Trombositlerin tespitinde FITC işaretli CD41a kullanıldı. Trombosit örnekleri akım sitometresinden geçirilirken FSCLog (Log. Forward Scatter: Boyut) ve SSCLog (Log. Side Scatter: granülarite) oranlarına göre trombositler bir kapı içine alınarak kontamine olan diğer kan hücrelerinden ayrıldılar. Hücre yüzeyine PS'nin hareketi ile floresan bir madde olan FITC ile işaretlenmiş anneksin-V ticari kit (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA, Kat. No:556547) kullanılarak anneksin-V pozitifliği gösteren apoptotik/aktive hücreler saptandı. Sonuçlar anneksin-V bağlanma yüzdeleri olarak verildi.



**ŞEKİL 5.** Akım sitometresinde elde edilen fosfatidilserin (PS) translokasyonuna ait örnek grafikler: (a); kapı içine alınmış trombositler, (b); trombositlerin akım sitometresinden elde edilen dağılım grafiği.

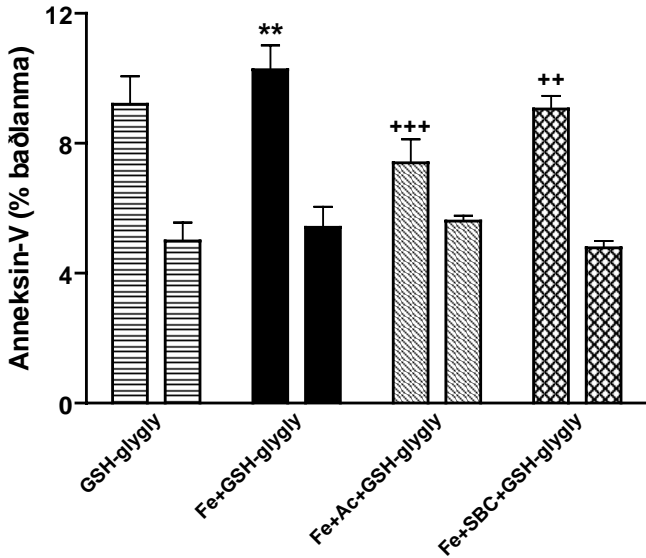
### İstatistik Analiz

Veriler, SPSS (version 11.5, Chicago, IL, USA) programı kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar "repeated measures ANOVA" ve onu izleyen "Student-Newman Keuls" testi ile değerlendirilmiştir. Anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir.

### BULGULAR

#### GGT aktivitesinin inhibisyonu

İnhibisyon çalışmaları sonucu GGT aktivitesinin 500  $\mu$ M aktivinin ile %  $90 \pm 5.6$  oranında 5/10 mM SBC ile %  $92 \pm 6.8$  oranında



**ŞEKİL 6.** Annexin-V bağlanma yüzdeleri üzerinden trombosit fosfatidilserin (PS) translokasyonu (1. sütunlar erken, 2. sütunlar geç apoptoz/aktivasyon fazlarını temsil etmektedir. \*\* $p < 0.01$ , GSH-glygly grubuna göre; ++ $p < 0.01$ , +++ $p < 0.001$  Fe+GSH-glygly grubuna göre).

inhibe olduğu belirlendi. Şekil 1 ve 2'de görüldüğü gibi GGT aktivitesinin inhibe edildiği örneklerde sisteinilglisin düzeylerinin inhibe edilmeyen örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi ( $p < 0.001$ ).

#### LPO, PCO ve GSH düzeyleri

GGT aktivitesinin GSH ile uyarılması kontrole göre trombosit MDA düzeylerinde ve PCO içeriklerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 3a, 3b). Ancak demir(III) varlığında, GSH-glygly ile GGT aktivitesinin uyarılması trombosit MDA düzeylerini ve PCO içeriklerini, kontrol grubuna ve sadece GSH-glygly uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdı ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ , sırasıyla). GGT aktivitesinin her iki inhibitörle de inhibisyonu trombosit MDA düzeylerinde Fe-GSH-glygly grubuna göre anlamlı azalmaya neden oldu ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  sırasıyla). İnhibitör olarak SBC kullanılan grupta PCO düzeyleri azalırken ( $p < 0.01$ ) aktivinin, PCO düzeylerinde anlamlı değişikliğe neden olmadı.

Trombosit GSH içerikleri ortamda demir yokken GGT aktivitesinin GSH ile uyarılması sonucu kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken ( $p < 0.001$ ), demir varlığında kontrol düzeylerinde kalmıştır. Demir varlığında GGT aktivitesinin her iki inhibitörle inhibisyonu ile GSH düzeyleri Fe-GSH-glygly grubuna göre artış gösterdi ( $p < 0.001$ , Şekil 4a).

#### Trombosit kaspaz-3 düzeyleri

Trombosit GGT aktivitesinin demir varlığında trombosit apoptozuna etkisini incelemek amacıyla bir saatlik inkübasyon sonrası kaspaz-3 düzeyleri belirlendi. Ortamda demir bulunmadan GGT aktivitesinin uyarılması kontrol grubuna göre anlamlı değişikliğe neden olmazken demir varlığında GGT aktivitesinin uyarılması kaspaz-3 düzeylerinde düşük düzeyde bir azalmaya neden oldu. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. GGT aktivitesinin inhibisyonu (her iki inhibitörle de) istatistiksel olarak anlamlı değişikliklere neden olmadı (Şekil 4b).

### PS Translokasyonu

Trombositler için aktivasyon/apoptoz göstergesi olan fosfatidil serin translokasyonu FITC işaretli anneksin-V kullanılarak akım sitometresinde ölçüldü. Demir varlığında GGT aktivitesinin uyarılması trombositlerde erken aktivasyon/apoptozda PS translokasyonunun artmasına neden olurken ( $p<0.05$ ), GGT'nin aktivitesinin ve SBC ile inhibisyonu PS cevabının azalmasına neden oldu ( $p<0.001$ ,  $p<0.01$ , sırasıyla). Aktivasyon/apoptozun geç fazında ise GGT aktivitesinin uyarılması ve inhibe edilmesi trombosit PS cevabında değişikliğe neden olmadı (Şekil 5, Şekil 6).

### TARTIŞMA

Stark ve arkadaşları (16) karaciğer kanserine bağlı olarak gelişen lezyonlarda GGT/GSH kaynaklı radikallerin oksidatif hasarı artırdığını bildirmişlerdir. Hepatositlerde (5) yapılan çalışmalarda, ortamda demir varken GGT aktivitesinin prooksidan etkiye sahip olabildiği gösterilmiştir. Fibroblast hücre kültüründe yapılan bir çalışmada, GGT gibi GSH'nin hidrolizini gerçekleştiren ve membranda yer alan GGT-rel enziminin (yapısı %79 oranında GGT'ye homolog) prooksidan rolü demir (III) varlığında incelenmiştir. Bu çalışmada GGT-rel pozitif olan hücrelerin ekstraselüler ortamdaki ROT ve MDA düzeylerini sadece demir varlığında GGT-rel negatif hücrelere göre belirgin olarak artırdığı gösterilmiştir (17). İn vitro şartlarda ve demir varlığında, saf GGT aktivitesi LDL oksidasyonuna da neden olabilir (18) ve eritrosit membranlarında oksidatif değişiklikleri artırarak fonksiyonlarını bozabilir (19). GGT'nin çeşitli hücrelerde ROT artışına katkıda bulunması ile ilgili çalışmalar mevcut olmasına karşın trombosit GGT'sinin pro-oksidan aktivitesi ile ilgili çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Daha önce yaptığımız bir çalışmada ortamda herhangi bir geçiş metali yokken yıkanmış trombositlerde GGT aktivitesinin oksidatif reaksiyonların artışına neden olmadığını belirledik (20). Bu çalışmamızda ise demir(III) varlığında GGT aktivitesinin pro-oksidan rolünü araştırdık. Bulgularımız in vitro şartlarda ortamda demir varlığında trombosit GGT'sinin pro-oksidan etki göstererek trombositlerde oksidatif değişiklikleri (LPO ve PCO artışı, GSH düzeylerinde azalma) tetikleyebildiğini göstermektedir.

Ekstraselüler ve intraselüler ROT'ların artışı sitotoksik etki gösterir ve oksidasyona duyarlı sinyal yollarını tetikler (3, 4, 21). Hidrojen peroksit, trombosit fonksiyonlarında önemli rolü olan trombosit membran glikoproteini Gp IIb/IIIa'nın hücre içi kısmında tirozin fosforilasyonuna neden olarak trombosit aktivasyonuna ve trombosit agregasyonuna neden olabilir (22). GP IIb/IIIa'nın membran dış yüzeyinde yer alan uçları disülfid bağlarından zengindir ve redüksiyonla birlikte aktive olur. Gp IIb/IIIa'daki serbest tiyol grupları ekstraselüler GSH / GSSG oranıyla kontrol edilir (23). Dolayısıyla hem intraselüler ve ekstraselüler ROT konsantrasyonu ve GSH / GSSG oranı trombosit fonksiyonlarının önemli düzenleyicileridir. Bu durumda eksojen GSH ilavesinin antitrombosit etki göstermesi beklenir. Ancak trombositlere eksojen GSH ilavesinin konsantrasyona bağlı olarak trombosit agregasyonunu farklı şekilde etkileyebileceği bildirilmektedir. Milimolar düzeylerinde GSH ilavesinin antioksidan etki gösterdiği mikromolar konsantrasyonlarda ise antiagregan etki gösterdiği belirlenmiştir (24, 25). Bizim kullandığımız GSH konsantrasyonu milimolar düzeyinde olmasına karşın, demir varlığında tam tersi-

ne oksidatif reaksiyonların artışına neden oldu. GGT inhibitörlerinin ilavesi ile oksidatif reaksiyonlardaki artışın engellenmesi GSH ve demir ilişkili redoks reaksiyonlarında GGT aktivitesinin rolünün olduğunu göstermektedir. Ayrıca inhibe edilen örneklerdeki sisteinilglisin düzeylerinin çok düşük olması redoks reaksiyonlarında GSH etkisinden çok metabolitlerinin rolünü açık bir şekilde göstermektedir.

Melanoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada nontoksik düzeylerde üretilen GGT aracılı  $H_2O_2$ 'in hücre proliferasyonunu uyardığı, yüksek konsantrasyonlarda ise apoptoz ve hücre nekrozuna neden olduğu gösterilmiştir (8). Biz çalışmamızda apoptoz göstergesi olarak kaspaz-3 düzeylerini ve PS translokasyonunu ölçtük. İnkübasyon ortamında demir(III) varlığında, GSH-glygly ile GGT aktivitesinin uyarılması trombosit kaspaz 3 düzeylerinde 1 saat inkübasyonu takiben anlamlı değişikliğe neden olmadı. Kaspaz-3 düzeylerinde artış yerine tam tersi düşük düzeyde ve istatistiksel olarak anlamsız azalma gözlemlendi. Bu durum demirin kaspaz-3 aktivasyonunu inhibe edici etkisinden kaynaklanmış olabilir (26). Demir(III) varlığında GGT aktivitesinin uyarılması erken apoptoz/aktivasyon fazında PS translokasyonunda artışa, GGT aktivitesinin inhibisyonu ise azalmaya neden oldu. Buna karşın geç apoptoz/aktivasyonda PS translokasyonunda anlamlı farklılıklar gözlenmedi. Son yıllarda yapılan çalışmalar PS translokasyonu için de kaspazların aktivasyonun gerekli olduğunu bildirmektedir (27). Geç aktivasyon/apoptozda transloke olan PS miktarında bir değişiklik gözlenmemesi demir ve kaspazlar arası etkileşimden kaynaklanmış olabilir. Erken apoptoz/aktivasyonda gözlenen PS artışından trombosit aktivasyonun veya apoptozun hangisinin sorumlu olduğunu ayırt etmek güçtür. Çekirdekli hücrelerde PS'in hücre zarı dış yüzeyine hareketi tam olarak bir apoptoz belirteci iken trombositlerde apoptozdan ziyade aktivasyonu düşündürmektedir. Trombosit aktivasyonu ve apoptozu benzer özellikler gösterirler (PS translokasyonu, mikropartikül oluşumu gibi) ki bu durum trombosit aktivasyonunun apoptoza ilerlediğini düşündürmektedir (28, 29). Ancak, trombosit apoptozunun ve aktivasyonunun birbirinden farklı ilerleyebileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (30).

GGT'nin pro-oksidan etkisi için ortamda geçiş metallerine ihtiyaç vardır. Normal fizyolojik şartlarda dolaşımında serbest demir çok düşük konsantrasyonda bulunur. Fizyolojik şartlarda proteinlere (transferin, hemoglobin) bağlı haldedir. Proteinlere bağlı olan geçiş metalleri redoks reaksiyonlarına genellikle neden olmazlar (31). Tam tersine transferrin dolaşımında demiri bağlayabildiği için demirle doygun olmadığı durumlarda antioksidan etki gösterir (32). Ancak bazı şartlarda (ortamda askorbat, tiyoller, indirgenmiş flavinler,  $O_2^{\bullet -}$  varlığı, inflamasyon, aktive fagositik hücrelerin çevresinde olmak ve diyabet gibi proteinlerin glikozilasyonunun arttığı durumlar gibi) proteinlere bağlı geçiş metallerinin salınımı gerçekleşebilir. GSH metaboliti olan sisteinilglisinin transferrin ve ferritin varlığında da oksidatif reaksiyonlara neden olabildiği gösterilmiştir (33-35)

Sonuç olarak trombosit GGT aktivitesi in vitro şartlarda ve demir varlığında oksidatif değişiklikleri ve trombosit aktivasyonunu tetikleyebilir. Bu in vitro çalışma, trombosit GGT'sinin bazı patolojik durumlarda (aşırı demir yüklenmesi, kan transfüzyonları sonrası, inflamasyon, diyabet) bulunduğu çevrede



## The pro-oxidant effect of platelet gamma-glutamyltransferase in the presence of iron(III)

**SUMMARY:** Gamma-glutamyltransferase (GGT), a plasma membran enzyme, plays important role in the reduced glutathione (GSH) metabolism. GGT activity during the catabolism of GSH originates the thiol dipeptide cysteinylglycine, whose-SH group is provided in particular with a much stronger iron-reducing ability. Recent research indicates that increased serum GGT activity could be used as a marker for increased oxidative stress in human. GGT activity is also found in platelets. Redox reactions can modify platelet functions. However, the role of platelet-GGT activity on its redox environment is unknown. The objective of the present work is to determine whether the platelet-bound GGT activity initiates oxidative modifications and apoptotic stimuli in presence of iron(III). In our study, lipid peroxidation, protein oxidation, GSH, phosphatidylserine (PS) and caspase-3 levels of platelets were investigated after inhibiting platelet GGT activity with inhibitors and/or stimulating platelet GGT activity with its substrates in the presence of iron(III). The resulting data showed significantly higher levels of lipid peroxidation and protein oxidation in the GGT activity-stimulated platelets in comparison with the GGT activity inhibited platelets in the presence of iron(III). GSH contents of the GGT activity-stimulated platelets were significantly reduced. No significant difference was observed caspase-3 activities of platelets. However, PS externalization in GGT activity stimulated platelets were increased compared to the GGT activity-inhibited platelets in the early stage apoptosis/activation. Platelet-GGT/GSH/iron(III) system can induce oxidative modifications and PS externalization on human platelets. Thus, platelet bound-GGT may contribute to the increase of reactive oxygen species (ROS) in its environment and promote cardiovascular diseases.

**KEY WORDS:** platelet, gamma-glutamyl transferase, glutathione, oxidative stress, apoptosis, iron toxicity

ROT üretimini artırarak ateroskleroz ve koroner kalp hastalıkları gibi hastalıkların gelişimine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Ancak fizyolojik şartlarda, trombosit GGT aktivitesinin pro-oksidan etkisinin tam olarak belirlenebilmesi için ilave in vivo ve ex vivo çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür: Bu çalışma Marmara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından SAG-YLS-120707-0128 numaralı proje ile desteklenmiştir.

### KAYNAKLAR

1. Yaman A. Gamma-glutamyltransferaz. *Biyokimya Dergisi*, 4: 27-37, 1997.
2. Whitfield JB. Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 38: 263-355, 2001.
3. Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24: 1988-96, 2004.
4. Freedman JE. Oxidative Stress and Platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28: 11-16, 2008.
5. Paolicchi A, Tongiani R, Tonarelli P, Comporti M, Pompella A. Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation in isolated hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. *Free Radic Biol Med*, 22: 853-860, 1997.
6. Dominici S, Valentini M, Maellaro E, Del Bello B, Paolicchi A, Lorenzini E, Tongiani R, Comporti M, Pompella A. Redox modulation of cell surface protein thiols in U937 lymphoma cells: the role of gamma-glutamyl transpeptidase-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and S-thiolation. *Free Radic Biol Med*, 27: 623-635, 1999.
7. Spear N, Aust SD. Thiol-mediated NTA-Fe (III) reduction and lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 312: 198-202, 1994.
8. Pieri L, Dominici S, Del Bello B, Maellaro E, Comporti M, Paolicchi A, Pompella A. Redox modulation of protein kinase/phosphatase balance in melanoma cells: the role of endogenous and gamma-glutamyltransferase-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. *Biochim Biophys Acta*, 1621: 76-83, 2003.
9. Li J, Xia Y, Bernito AM, Coburn JP, Kuter DJ. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion*, 40: 1320-329, 2000.
10. Szasz G. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin Chem*, 15: 124-136, 1969.
11. Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem*, 45: 290-292, 1999.
12. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52: 302-310, 1978.
13. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 186: 464-478, 1990.
14. Mergel D, Andermann G, Andermann C. Simultaneous spectrophotometric determination of oxidized and reduced glutathione in human and rabbit red cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 1: 277-283, 1979.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 7: 248-254, 1976.
16. Stark AA, Russell JJ, Langenbach R, Pagano DA, Zeiger E, Huberman E. Localization of oxidative damage by a glutathione-gamma-glutamyl transpeptidase system in preneoplastic lesions in sections of livers from carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis*, 15: 343-348, 1994.
17. Enoiu M, Aberkane H, Salazar JF, Leroy P, Groffen J, Siest G, Wellman M. Evidence for the pro-oxidant effect of gamma-glutamyltranspeptidase-related enzyme. *Free Radic Biol Med*, 29: 825-833, 2000.
18. Paolicchi A, Minotti G, Tonarelli P, Tongiani R, De Cesa-

- re D, Mezzetti A, Dominici S, Comporti M, Pompella A. Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent iron reduction and LDL oxidation-a potential mechanism in atherosclerosis. *J Investig Med*, 47:151-160, 1999.
19. Aberkane H, Stoltz JF, Galteau MM, Wellman M. Erythrocytes as targets for gamma-glutamyltranspeptidase initiated pro-oxidant reaction. *Eur J Haematol*, 68: 262-71, 2002.
  20. Sener A, Özsavcı D, Yanikkaya-Demirel G, Aksoy H, Oba R, Uras F, Yardımcı T. The role of gamma-glutamyltransferase (GGT) activity on early platelet apoptotic process. *Turk J Hematol*, 22:272, 2005.
  21. Sener A, Ozsavci D, Bingol-Ozakpinar O, Cevik O, Yanikkaya-Demirel G, Yardimci T. Oxidized-LDL and Fe<sup>3+</sup>/ascorbic acid-induced oxidative modifications and phosphatidylserine exposure in human platelets are reduced by melatonin. *Folia Biol (Praha)*, 55:45-52, 2009.
  22. Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Phillips DR. Outside-in integrin signal transduction. Alpha IIb beta 3-(GP IIb/IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation. *J Biol Chem*, 271: 10811-10815, 1996
  23. Essex DW, Li M, Feinman RD, Miller A. Platelet surface glutathione reductase-like activity. *Blood*, 104: 1383-1385 2004.
  24. Essex DW. Redox control of platelet function. *Antioxid Redox Signal*, 11:1191-1225, 2009.
  25. Essex DW, Li M. Redox control of platelet aggregation. *Biochemistry*, 42:129-136, 2003.
  26. Sliskovic I, Mutus B. Reversible inhibition of caspase-3 activity by iron(III):potential role in physiological control of apoptosis. *FEBS Lett*, 580: 2233-37, 2006.
  27. Cohen Z, Davis-Gorman G, McDonagh PF, Ritter L. Caspase inhibition of platelet activation. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 19: 305-309, 2008.
  28. Trombosit apoptozu ve aktivasyonu arasındaki ilişki. *Turk J Hematol*, 24: 171-176, 2007.
  29. Sener A, Ozsavci D, Oba R, Demirel GY, Uras F, Yardimci KT. Do platelet apoptosis, activation, aggregation, lipid peroxidation and platelet-leukocyte aggregate formation occur simultaneously in hyperlipidemia? *Clin Biochem*, 38: 1081-1087, 2005.
  30. Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, Mykhaylov S, Lyubimov E, Freedman J. Platelet activation and apoptosis are different phenomena: evidence from the sequential dynamics and the magnitude of responses during platelet storage. *Br J Haematol*, 142: 494-497, 2008.
  31. Prakash M. Role of non-transferrin-bound iron in chronic renal failure and other disease conditions. *Ind J Nephrol*, 17: 188-93, 2007.
  32. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*, 280: 1-8, 1990.
  33. Lamb DJ, Leake DS. Iron released from transferrin at acidic pH can catalyse the oxidation of low density lipoprotein. *FEBS Lett*, 352: 15-18, 1994.
  34. Abdalla DS, Campa A, Monteiro HP. Low density lipoprotein oxidation by stimulated neutrophils and ferritin. *Atherosclerosis*, 97: 149-159, 1992.
  35. Van Campenhout A, Van Campenhout CM, Lagrou AR, Manuel-y-Keenoy B. Transferrin modifications and lipid peroxidation: implications in diabetes mellitus. *Free Radic Res*, 37:1069-1077, 2003.