

# Değişik Glukoz Konsantrasyonlarının Eritrosit Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Aydın AKGÜN<sup>1</sup>, Erol ÇAKIR<sup>2</sup>, Şendoğan GÜLEN<sup>3</sup>

## ÖZET:

**Amaç :**Bu çalışmamızda, tip II diabetik hastaların eritrosit arginaz aktiviteleri üzerine, inkubasyon ortamında bulunan insülin, NaF (Sodyum Florür) ve değişik konsantrasyonlardaki glukozun etkilerini araştırmayı amaçladık.

**Gereç ve yöntemler :**10 Diabetik hasta ve 10 sağlıklı kişi grubundan alınan eritrositler, serumlarıyla birlikte 37 °C'de 24, 48 ve 72 saat inkilbe edilmiştir. Ayrıca inkubasyon ortamındaki serumların bir bölümünü NaF, bir bölümünü insülin ve değişik miktarlarda glukoz konmuştur.

Inkubasyon süreleri sonunda, eritrosit arginaz aktiviteleri TDMU (Thiosemicarbazid Diasetil Monoksim Ure) yöntemiyle, ortamda kalan glukoz düzeyleri heksokinaz yöntemiyle spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

**Istatistiksel analizler için NCSS program ile "Mann Whitney-U-" testi kullanılmıştır.**

**Bulgular:**Diabetik hasta grubu ile kontrol grubunun başlangıç değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Inkubasyon sürelerine göre gruplar karşılaştırıldığında 24. saatte NaF eklenen gruplarda daha fazla olmak üzere, bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir. 48. ve 72. saatlerde NaF eklenen gruplar, yüksek arginaz aktivitelerini korurken, diğer gruplarda aktivite düşmeye başlamaktadır, ancak bu düşüş glukoz konsantrasyonu yükseldikçe daha az olmaktadır.

İnsülinin, diabetik grup ve kontrol grubu arginaz aktiviteleri üzerine anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir.

**Tartışma:**İnsülin varlığı, eritrositlerde arginaz aktivitesini ve glukoz kullanımını değiştirmemektedir. Buna karşın, inkubasyon ortamındaki glukoz düzeyinden enzim aktivitesi etkilenmektedir. Bu etki, glikolizi inhibe eden NaF ilavesinden sonra, enolaz'ın inhibisyonuna bağlı olarak glukoz birikimine neden olması sonucunda açıkça gözlenmektedir.

**Bu bulgular, eritrosit arginaz aktivitesinin kan glukoz düzeyi ile düzenlenebileceğini göstermektedir.**

**Anahtar sözcükler:**Arginaz, glukoz, insülin, sodyum florür(NaF), diabet.

## SUMMARY:

### THE EFFECT OF VARYING GLUCOSE CONCENTRATIONS UPON THE ERYTHROCYTE ARGINASE ACTIVITY

**Purpose:** In this work we intended to investigate the effect of insulin, NaF (sodium fluoride) and different glucose concentrations, added to the incubation media, upon the activities of the erythrocyte arginases of type II diabetic subjects.

**Materials and Methods:** The erythrocytes obtained from 10 type II diabetic patients and 10 healthy persons, were incubated in their serums at 37°C for 24, 48 and 72 hours. Some of the serums also contained NaF, insulin and glucose in different concentrations. At the end of the incubation periods, erythrocyte arginase activities were measured by TDMU (Thiosemicarbazide diacetil monooxim urea) method. Glucose levels, on the other hand determinations were carried out by the hexokinase procedure; spectrophotometrically. The statistical analyses were accomplished by using NCSS programme and Mann whitney U test.

**Results:** At the beginning, no significant differences were found between the diabetic and healthy groups. When the groups were compared with each other on the basis of incubation periods, each group showed significant increases. NaF addition augmented the elevations, drastically without any doubt. At the end of 48<sup>th</sup> and 72<sup>nd</sup> hours, whereas NaF added fractions remained high. Increased glucose concentrations prevented the decrease in the enzyme activities. Insulin did not show significant effect upon the activities of erythrocyte arginase levels of the both groups.

**Conclusion:** The presence of insulin did not change arginase activities in erythrocytes and the utilization of glucose. On the contrary, the glucose level of incubation medium influenced the activity of the enzyme. This effect was

<sup>1</sup> Uzm.Dr. Çanakkale Devlet Hastanesi

<sup>2</sup> Doç.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.D.

<sup>3</sup> Prof.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.D.

*clearly observed after the addition of NaF which inhibits glycolysis, eventually leading to glucose accumulation due to block of enolase.*

*The results indicated that erythrocyte arginase activity might be regulated by blood glucose level.*

**Key words:**Arginase, glucose,insulin,sodium fluoride(NaF),diabetes.

### GİRİŞ

Arginaz (L-Arginin aminohidrolaz E.C 3.5.3.1), üre döngüsünün son basamağında argininin, üre ve ornitine dönüşümünü katalize eden enzimdir.<sup>1,2</sup> Arginaz enziminin yarılanma ömrü 4-5 gündür ve en çok olarak üre sentezinin gerçekleştiği karaciğerde bulunmaktadır.<sup>3</sup> Fakat üre döngüsünün gerçekleşmediği birçok dokuda da arginaz aktivitesine rastlanmaktadır.(2,4-7)

Diabette insülinin yetersizliği veya etkinliğinin azalması sonucu proteinlerin yıkımı artmıştır.<sup>8-10</sup> Ayrıca hipergliseminin varlığı proteinlerin non-enzimatik glikozillenmesine yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda bazı enzimlerin ve düzenleyici moleküllerin de glikozillendikleri ve bu olayın hem *in vivo*, hem *in vitro* gerçekleştiği gösterilmiştir.(11)

Bu çalışmamızda tip II diabetik hastaların eritrosit arginaz aktiviteleri ve 37°C inkübasyon ortamındaki değişimleri incelenmiştir. Ayrıca inkübasyon ortamında farklı glukoz konsantrasyonlarının ve insülin ile glikolizi enolaz aşamasında inhibe eden sodyum florürün (NaF)<sup>12</sup> eritrosit arginaz aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

### GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bu çalışmaya tip II diabetli hastalar ve kontrol grupları alınmıştır. Tip II diabetli

hastalar en az 3 yıl önce diabet tanısı konmuş ve Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Polikliniğinde izlenmekte olan, insülin tedavisi gerektirmeyen yaş ortalamaları  $55 \pm 7,4$  olan 36-68 yaşlar arasındaki hastalardan, kontrol grubu ise yaş ortalamaları  $48 \pm 5,3$  olan 17-65 yaşlar arasında yer alan sağlıklı kişilerden oluşmaktadır. Bu kişilerin, gece boyu açlık sonrası sabah saat 9.00-11.00 arasında venöz kanları antikoagulant olarak heparin içeren tüplere toplanmıştır. Diabetli hasta ve kontrol grubu olarak onar kişilik gruplar incelemeye alınmıştır. Alınan tüm örneklerin öncelikle glukoz ölçümleri yapılmıştır.

Her iki grubun başlangıç eritrosit arginaz aktivitelerini ölçmek üzere birer tüpe hemolizat hazırlanmıştır. Sonra inkübasyon ortamında insülin ve NaF'ün etkilerini saptamak amacıyla her iki grup üçe ayrılarak bir bölümne 0,16 ünite/ml.kan insülin, bir bölümne de 2 mg/ml.kan NaF eklenmiş, diğer alt gruba ise herhangi birşey eklenmeden 37°C'ta su banyosunda inkübe edilmişlerdir. Bu kanlardan 24. saat, 48. saat ve 72. saatlerde hemolizat hazırlanarak eritrosit arginaz aktiviteleri ölçülmüş, ayrıca glukoz kullanımını saptamak amacı ile elde edilen plazmalardan glukoz ölçümleri yapılmıştır.

### DENEY DÜZENİ

#### KONTROL

İlaveler	Insülin	NaF
-24 saat	-24 saat	-24 saat
-48 saat	-48 saat	-48 saat
-72 saat	-72 saat	-72 saat

#### DIYABET

İlaveler	Insülin	NaF
-24 saat	-24 saat	-24 saat
-48 saat	-48 saat	-48 saat
-72 saat	-72 saat	-72 saat

Glukozun inkübasyon ortamında eritrosit arginaz aktivitesi üzerine etkisini inceleyebilmek amacı ile de kontrol grubu kanları kendi içinde yeniden 4 alt gruba ayrılmış, 1. alt gruba glukoz eklenmemiş ve kendi içerdiği glukoz miktarıyla inkübasyona bırakılmış, 2. alt grup 200 mg/dl, 3. alt grup 400 mg/dl ve 4. alt grup 800 mg/dl glukoz içerecek

78

miktarda glukoz eklenmiştir. Bunlarda, yine hem insülinli, hem NaF'lu gruplara ayrılarak 37 °C'ta su banyosunda inkübe edilerek 24.saat, 48. saat ve 72. saatlerde eritrosit arginaz aktivitelerine bakılmak üzere hemolizat hazırlanmış ve plazmalarından da glukoz

## DEĞİŞİK GLUKOZ KONSANTRASYONLARININ ERİTROSİT ARGİNAZ...

kullanımını septamak amacıyla glukoz ölçümü yapılmıştır.

Ayrıca inkübasyon ortamında bakteriyel kontaminasyonun etkilerinden korumak amacıyla bütün tüplere 10.000 U/ml. kristalize penisilin ve 0.4 mg/ml. gentamisin konmuştur.

Eritrositlerin arginaz aktivitesi, substrat olarak kullanılan argininin, arginaz enzimiyle hidrolizi sonucu oluşan üre miktarının TDMU (Tiyosemikarbazid Diasetil Monoksim Üre) yöntemi uygulanarak spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile saptanmıştır.(13)

Arginaz aktivitesinin 1 ünitesi; gram hemoglobin başına  $\mu\text{mol}$  üre/ml./dk. olarak hesaplanmıştır.

Hemoglobin ölçümü, Drabkin çözeltisi ile manuel olarak; glukoz ölçümü Dupont ES Dimension marka otoanalizörde

Dupont'un heksokinaz yöntemi ile ölçüm yapan kitleriyle çalışılmıştır.

İstatistiksel analizler için NCSS programı ile "Mann Whitney'U" testi kullanılmıştır.

### BULGULAR

Çalışmamızda tip II diabetik hastaların ve kontrol gruplarının eritrosit arginaz aktiviteleri üzerine inkübasyon ortamındaki insülin ile eritrositlerde glikolizisi inhibe eden sodyum florürün ( $\text{NaF}$ ) ve değişik glukoz konsantrasyonlarının etkileri incelenmiştir. Diabet ve kontrol gruplarının arginaz aktiviteleri, inkübasyon süreleri ve glukoz konsantrasyonları açısından birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Diabetik hasta grubu ile kontrol grubunun başlangıç eritrosit arginaz aktiviteleri birbirine çok yakındır ve anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ).

**Tablo I:** Diabetli ve kontrol grubunun başlangıç ve inkübasyon sürelerine göre eritrosit arginaz aktiviteleri. (U/gr.Hb/dk)

		<b>İNKÜBASYON SÜRESİ</b>	Başlangıç			24 Saat	48 Saat	72 Saat
			( - )	61.6±11.2	76.0±12.2	61.6±11.4	48.4±8.1	48.2±10.5
<b>DIABETİK</b>	İnsülin(+)	61.6±11.2	74.6±13.5	65.2±14.4	48.4±8.1	48.2±10.5	74.3±12.6	
	NaF (+)	61.6±11.2	81.5±15.1	81.3±16.0	48.4±8.1	48.2±10.5	74.3±12.6	
	( - )	60.9±6.7	71.6±7.3	58.1±7.0	46.6±4.7	45.8±4.3	75.2±9.7	
<b>Kontrol</b>	İnsülin(+)	60.9±6.7	71.7±7.5	57.9±7.4	45.8±4.3	45.8±4.3	75.2±9.7	
	NaF (+)	60.9±6.7	78.4±8.7	75.0±7.6	45.8±4.3	45.8±4.3	75.2±9.7	

*İnsülin (+) 0.16 U/ml insülin eklenmiş, NaF (+) 2 mg/ml NaF eklenmiş, (-) ikisinden herhangi biri eklenmemiş.*

**Tablo II:** Glukoz konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine göre eritrosit arginaz aktiviteleri (U/gr.Hb/dk)

		<b>İNKÜBASYON SÜRESİ</b>	Başlangıç			24 Saat	48 Saat	72 Saat
			( - )	60.9±6.7	71.3±7.5	61.3±5.5	50.9±5.4	53.4±5.8
<b>Kontrol I</b> (200mg/dl glukoz)	İnsülin(+)	60.9±6.7	73.0±6.6	62.5±6.8	53.4±5.8	53.4±5.8	53.4±5.8	78.8±8.1
	NaF (+)	60.9±6.7	76.5±5.8	77.6±8.2	78.8±8.1	78.8±8.1	78.8±8.1	78.8±8.1
	( - )	60.9±6.7	72.8±6.8	68.5±5.2	56.3±4.4	56.3±4.4	56.3±4.4	56.3±4.4
<b>Kontrol II</b> (400 mg/dl glukoz)	İnsülin(+)	60.9±6.7	69.3±5.5	67.5±5.7	58.1±4.8	58.1±4.8	58.1±4.8	58.1±4.8
	NaF (+)	60.9±6.7	79.8±9.6	78.2±8.6	77.6±8.9	77.6±8.9	77.6±8.9	77.6±8.9
	( - )	60.9±6.7	72.1±6.3	68.2±9.7	62.2±8.7	62.2±8.7	62.2±8.7	62.2±8.7
<b>Kontrol III</b> (800 mg/dl glukoz)	İnsülin(+)	60.9±6.7	69.5±6.0	67.0±6.0	61.6±8.9	61.6±8.9	61.6±8.9	61.6±8.9
	NaF (+)	60.9±6.7	79.3±10.1	78.2±8.4	80.5±9.2	80.5±9.2	80.5±9.2	80.5±9.2

*İnsülin (+) 0.16 U/ml insülin eklenmiş, NaF (+) 2 mg/ml NaF eklenmiş, (-) ikisinden herhangi biri eklenmemiş.*

Tablo I ve Tablo II'de; inkübasyon sürelerine göre gruplar karşılaştırıldığında 24.saatte, NaF eklenen grplarda daha fazla olmak üzere bütün grplarda arginaz aktivitesinde artma görülmüş ve bu artış başlangıç aktivitesine göre NaF eklenen grplarda ( $p<0.005$ ) ve diğer grplarda ( $p<0.05$ ) istatistiksel olarak anamlı değerlerde bulunmuştur.

48. ve 72. saatlerde NaF eklenen grplar yüksek arginaz aktivitelerini korurken,

diger grplarda aktivite düşmeye başlamakta, ancak aktivitedeki bu düşüş ortamındaki glukoz konsantrasyonu yükseldikçe daha az olmakta ve arginaz aktivitesi glukoz konsantrasyonuna paralel olarak daha fazla korunmaktadır.

İnkübasyon ortamındaki insülinin ise hiçbir kontrol grubu ve diabetik grubun arginaz aktivitesi üzerine anamlı bir etkisi gözlenmemiştir( $p>0.05$ ).

**Tablo III:** Grupların inkübasyon sürelerine göre ortamda kalan glukoz miktarları (mg/dl)

		GLUKOZ ORTALAMALARI			
		Başlangıç	24 Saat	48 Saat	72 Saat
<b>DIABETİK</b>	( - )	182	24	0	0
	İnsülin (+)	182	17	0	0
	NaF (+)	182	146	136	116
<b>Kontrol</b>	( - )	82	0	0	0
	İnsülin (+)	82	0	0	0
	NaF (+)	82	59	54	40
<b>Kontrol I</b> (200mg/dl glukoz)	( - )	200	33	0	0
	İnsülin (+)	200	30	0	0
	NaF (+)	200	155	146	115
<b>Kontrol II</b> (400mg/dl glukoz)	( - )	400	200	103	53
	İnsülin (+)	400	189	86	58
	NaF (+)	400	308	293	266
<b>Kontrol III</b> (800mg/dl glukoz)	( - )	800	529	441	366
	İnsülin (+)	800	536	452	341
	NaF (+)	800	639	579	553

İnsülin (+) 0.16 U/ml insülin eklenmiş, NaF (+) 2 mg/ml NaF eklenmiş, (-) ikisinden herhangibiri eklenmemiştir.

Çalışmamızda tespit ettiğimiz diğer bir sonuç ta, 37°C'de inkübasyona bırakılan kanlara 2 mg/ml NaF eklendiğinde, glukozun 24 saatte % 75-80, 48 saatte % 65-70 ve 72 saatte de % 50-60 oranlarında korunduguudur. İnsülinin eritrositlerin glukoz kullanımına bir etkisi görülmemiştir.

#### TARTIŞMA VE SONUÇ

Bulgularımız değerlendirildiğinde eritrosit arginaz aktivitesinin glukoz konsantrasyonuna paralel olarak etkilendiği görülmektedir.

Pankreas adacıklarının inkübasyon ortamında değişik glukoz konsantrasyonlarında poliamin düzeyleri ile ilgili yapılan bazı çalışmalarla yüksek glukoz konsantrasyonlarında poliamin düzeylerinin de daha yüksek olduğu saptanmıştır(14,16). Ayrıca poliaminlerin arginaz enzimi üzerine aktivatör etkisinin olduğu ileri sürülmüştür.<sup>17</sup> Dolaşımındaki poliaminlerin % 95'ten fazlasının eritrositlerde bulunduğu, ancak ornithinden putresinin ve dolayısıyla poliaminlerin sentezlenmesini sağlayan ornitin dekarboksilaz aktivitesinin eritrositlerde saptanmadığı ve Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 15(2):1998

eritrositlerin, poliamin taşıyıcısı gibi görev yaptığı bildirilmiştir.(18)

Diğer yandan yüksek glukoz konsantrasyonlarında, eritrositlerdeki birçok madde ve eritrosit membran proteinleri glikozillenebilmekte, yapı ve işlevleri değiştirmektedir (11,19,20). Arginazın aktivitesini etkileyen bazı bileşiklerin de glikozillenebileceği ve yüksek glukoz konsantrasyonlarında arginaz aktivitesinin artışından sorumlu olabileceği düşünülebilir.

Sonuç olarak bu çalışmamızda, eritrosit arginaz aktivitesinin ortamdaki glukoz konsantrasyonundan güçlü bir şekilde etkilendiği, ortama NaF katılımlıda, eritrositlerdeki glikolizisin enolaz basamağında inhibe edilmesi nedeniyle (12) ortamdaki glukozun kullanılamayarak daha yüksek kalması sonucu arginaz aktivitesinin de yüksek düzeyde olduğu, ortama insülin eklenmesinin ise eritrositlerin arginaz aktivitesine ve glukoz kullanımına bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

#### KAYNAKLAR

- Holmes FL: Hans Krebs and the discovery of the ornithine cycle. *Federation Proceedings*. 1980;39(2):216-225.
- Jackson JM, Beaudet LA and O'Brien EW: Mammalian urea cycle enzymes. *Ann Rev Genet*. 1986;20: 431-464.
- Schimke RT: The importance of both synthesis and degradation in the control of arginase levels in rat liver. *J Biol Chem*. 1964;239: 3808-3815.
- Pohjanpelto P and Holtta E: Arginase activity of different cells in tissue culture. *Biochim Biophys Acta*. 1983;757(2): 191-195.
- Matsuzaki S, Suzuki M and Hamana K: A possible role of arginase in the regulation of polyamine biosynthesis in the rat thyroid. *Acta Endocrin*. 1981;98: 57-61.
- Pau MY and Milnes JA: Arginine deficiency during gestation and lactation in the rat. *J Nutr*. 1981;111: 184-193.
- Konarska L, Tomaszewski L and Rolczyk U: Studies on arginase in developing rat small intestine, brain and kidney. II. Effect of hydrocortisone and thyroxine. *Biochem Med and Met Biol*. 1986;35(2) : 170-178.
- Kahn CR, Weir GC: Joslin's Diabetes Mellitus. 13th edition, Pennsylvania. Chap. 7. Alterations in protein metabolism in diabetes mellitus. 1994;116-138.
- Sacks,D.B:Carbohydrates.In.Burtis CA,Ashwood ER.(Eds).Tietz textbook of clinical chemistry.2 nd ed.Philadelphia:WB Saunders Co.1994;928-1001.
- Galloway JA: Diabetes Mellitus. 9th edition. Eli Lilly and Company. Indianapolis. Chap. 3.Pathophysiology of Diabetes Mellitus. 1988;29-35.
- Brownlee M, Vlassara H and Cerami A: Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Annals of Internal Medicine*. 1984;101: 527-537.
- Young,DS:Specimen collection and processing;Sourac of biological variation.In.Buntis CA,Aschwood ER(Eds).Tietz textbook of clinical chemistry.2nd ed.Philadelphia:WB Saunders Co.1994;58-101.
- Geyer JW and Dabich D: Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Analitic Biochem*. 1986;39: 412-417.
- Hougaard DM, Nielsen JH and Larsson L: Localization and biosynthesis of polyamines in insulin-producing cells. *Biochem J*. 1986;238: 412-417.
- Welsh N and Sjöholm A: Polyamines and insulin production in isolated mouse pancreatic islets. *Biochem J*. 1988;252: 701-707.
- Welsh N: A role for polyamines in glucose-stimulated insulin gene expression. *Biochem J*. 1990;271: 393-397.
- Kang JH and Cho DY: Purification and properties of arginase from soybean, glycine max, axes. *Plant Physiol*. 1990;93:1230-1234.
- Moulinoux J, Quemener V and Khan NA: Biological significance of circulating polyamines in oncology. *Cell Mol Biol*. 1991;37(8): 773-783.
- Hatemi H: Diabetes Mellitus. İstanbul. Bölüm 12. Proteinlerin nonenzimatik glikozillenmeleri. 1988;117-128.
- Day JF, Ingebretsen CG, Ingebretsen WR, Baynes J Wand Thorpe SR: Nonenzymatic glucosylation of serum proteins and hemoglobin: Response to changes in blood glucose levels in diabetic rats. *Diabetes*. 1980;29: 524-527.