

Reaktif Oksijen Türlerinin Üretiminde Süksinat Dehidrogenaz Enziminin Rolü

The Role of Succinate Dehydrogenase Enzyme in the Production of Reactive Oxygen Species: Review

Derya GÜLEÇ^a

^aDoku Tiplendirme Laboratuvarı,
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
İzmir

Geliş Tarihi/Received: 17.01.2017
Kabul Tarihi/Accepted: 06.06.2017

Yazışma Adresi/Correspondence:
Derya GÜLEÇ
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Doku Tiplendirme Laboratuvarı, İzmir,
TÜRKİYE/TURKEY
eryaglc@yahoo.com.tr

ÖZET Reaktif oksijen türlerinin homeostazında mitokondri önemli rol oynamaktadır. Özellikle iskemi reperfüzyon sürecinde mitokondriyal reaktif oksijen türleri (ROT) nin üretiminde elektron transport zincirinde görevli Kompleks I ve III enzimleri ile birlikte Kompleks II [süksinat dehidrogenaz (SDH)] de etkilidir. Son çalışmalarda bu enzimin etkisinin mitokondriyal ROT üretimine ve kontrolüne katkısının önemli oranlarda olduğu gösterilmiştir. SDH enzimi, iskemi sürecinde biriken fumaratı süksinata indirgemesi ile birlikte biriken süksinat, reperfüzyon ile fumarata oksidize edilmektedir. Bu enzimatik aktivite, süksinat dehidrogenaz enziminin kontrolünün anlaşılması ve mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin üretiminin nasıl kontrol altına alınabileceği hakkında bilgi vermektedir.

Anahtar Kelimeler: Reperfüzyon hasarı; süksinat dehidrogenaz; süksinik asid

ABSTRACT Mitochondria plays an important role in homeostasis of reactive oxygen species. Complex II (succinate dehydrogenase) is also effective on mitochondrial reactive oxygen species production besides Complex I and III enzymes which play roles in electron transport chain especially during ischemia reperfusion process. In recent studies, it has been shown that succinate dehydrogenase enzymatic activity has a crucial contribute to mitochondrial reactive oxygen species production and control. The succinate, which is accumulated by reduction of fumarate to succinate, is oxidized to fumarate by reperfusion during succinate dehydrogenase enzyme ischemia reperfusion process. This enzymatic activity provides information on the understanding of succinate dehydrogenase enzyme control and how mitochondrial reactive oxygen species production can be brought under control.

Keywords: Reperfusion injury; succinate dehydrogenase; succinic acid

Oksidatif stres, organizmada hücrel metabolizma sırasında bazı biyokimyasal yollarda oluşabilen serbest radikaller [örneğin; reaktif oksijen türleri (ROT)] ile onları temizleyen antioksidan savunma sistemleri (örneğin; süperoksit dismutaz, vitamin E) arasındaki dengenin bozulması ile oluşmaktadır. ROT; hücrenin yapı taşları olan yağ asitleri, proteinler ve nükleik asitlere saldırarak onların kimyasal yapılarını değiştirip fonksiyonlarını bozabilen moleküllerdir ve normal hücrel metabolizmanın yanı sıra çevresel faktörlerin etkisi ile de üretilebilmektedirler. Tüm hücrelerde üretilebilen ROT'nin ana kaynağı, oksijenin asıl kullanım yeri olan mitokondrideki elektron transport zinciri (ETZ) dir.¹ ETZ dışında diğer pek çok hücrel metabolizmada görevli enzimler ROT üretebilme kapasite-

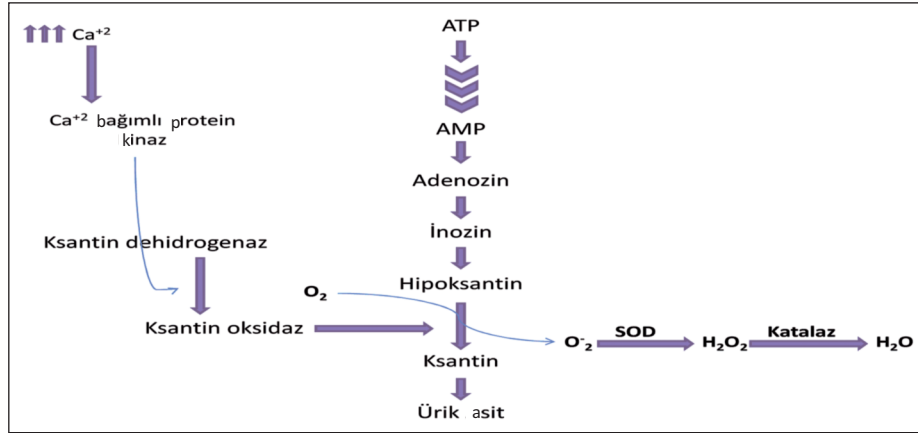
tesine sahiptir. Bunlardan bazıları; nikotinamid adenin dinükleorid fosfat oksidaz, ksantin oksidaz, α -ketoglutarat dehidrogenaz, miyeloperoksidaz, d-aminoasit oksidaz ve dihidrolipoamid dehidrogenazdır.²

ROT, normal metabolizma dışında tekli organ iskemisi reperfüzyonu (İR) (akut koroner sendrom, akut böbrek hasarı, intestinal iskemisi, inme vs.), multipl organ İR (travma ve resüsitasyon, sirkülatuar arrest, orak hücreli anemi, uyku apnesi vs.) ve majör cerrahi sırasında İR (kardiyak, torasik, periferik vasküler, majör vasküler cerrahi ve solid organ transplantasyonu vs.) ile inflamasyon, apoptoz, kimyasal ajanlar, solid tümörler ve yüksek oksijen basıncına maruz kalınan durumlarda da ortaya çıkmaktadır.³⁻⁵ Ayrıca, bazı ROT'ler devamlı stres, ultraviyole ışığı veya X-ışınlarına⁶ maruz kaldığı durumlarda vücutta hücresele aerobik metabolizmanın yan ürünleri olarak üretilmektedir. Moleküler etkileri DNA mutagenesi, gen transkripsiyonunun aktivasyonunu ve proteinlerin inhibisyonunu veya aktivasyonunu içermektedir. Hücresele etkileri ise inflamasyon, bağışıklık ve karinogenezin artırılması veya bastırılmasıdır.⁷

İR hasarı, doku veya organlara giden kan akımının azalması veya kesilmesi nedeni ile perfüzyonun bozulması sonucu oluşan iskemisi, sonraki süreçte de kan akımının yeniden sağlanması ile oluşan reperfüzyon sonucunda gelişmektedir. Kompleks bir kaskad olan İR'de iskemiyi takiben vasküler endotelyum, interstisyel komponent, sirkülatuar hücreler ve çeşitli biyokimyasal moleküller arasında etkileşimleri içeren olaylar gerçekleşmektedir.⁸ İskemi sürecinde mevcut adenosin trifosfat [adenosine triphosphate (ATP)]'ın tüketilmesi ve ATP üretiminin durması nedeni ile artan adenosin difosfat [adenosine diphosphate (ADP)] katabolize olmaktadır. Adenosin monofosfat [adenosine monophosphate (AMP)], adenosin, inozin ve hipoksantin açığa çıkmaktadır. Ayrıca, anaerobik metabolizmanın hâkim olduğu bu süreçte hücrenin pH'sinde düşme olmaktadır. Biriken hidrojen iyonlarını tamponlamak için, Na^+/H^+ değiştiricisi fazla H^+ iyonunu hücre dışına atar iken, Na^+ iyonlarının hücre içine akışını sağlamaktadır. Azalan hücresele ATP'ler nedeni ile ATPaz (örneğin; Na-K

ATPaz)'lar inaktive olmaktadır. Hücreden azalan aktif Ca^{+2} çıkışı ile endoplazmik retikülden Ca^{+2} 'nin geri alınmasının sınırlanması hücre içine Ca^{+2} 'nin aşırı yüklenmesine neden olmaktadır.⁹ Bu değişikliklere oksidanlara fazlaca hassas mitokondriyal permeabilite geçiş porlarının açılması eşlik etmekte ve mitokondriyal membran potansiyeli bozulmaktadır. Sonuç olarak, ATP üretimi daha da azalmaktadır. Hücre içinde artan Ca^{+2} , hücre içi proteazları aktive etmektedir (örneğin, kalpainler).¹⁰ Aktiflenen proteazlar ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürmektedir. Oluşan ksantin oksidaz, reperfüzyonda artan oksijeni kullanarak iskemik dönemde bolca artan hipoksantini ürik asite kadar yıkamakta ve bu arada süperoksit radikali (O_2^-) oluşmaktadır. Normal şartlarda süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz enzimleri ile suya indirgenerek temizlenen oksijen radikalleri, antioksidan kapasiteyi aştığı için temizlenememektedir (Şekil 1). Süperoksit radikalinden oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2), Fe^{+2} gibi geçiş metalleri veya süperoksit radikalleri (O_2^-) ile fenton ve haber-weiss reaksiyonlarına girmekte ve en saldırgan radikal olan hidroksil radikalini ($\text{OH}\cdot$) oluşturmaktadır.^{10,11} Mitokondride oksijenin %85-90'ı ATP üretiminin primer metabolik yolu olan oksidatif fosforilasyonda kullanılmaktadır. %1-2'lik bir kısmı da yine ETZ'de öncelikle Kompleks I ve III enzimleri tarafından kullanılmakta ve süperoksit radikali oluşmaktadır. Bu da normal şartlarda hücre içinde oluşan O_2^- 'nin başlıca kaynağıdır ve SOD ile katalaz tarafından temizlenmektedir.

Oksijen konsantrasyonu 37°C 'de hava ile doyurulmuş sulu tampon solüsyonunda yaklaşık 200 μM 'dır.¹² Hipoksi seviyesine göre hücreler anaerobik koşullara farklı adaptasyonlar oluşturmaktadır. Normal aerobik koşullardaki oksijen saturasyonunun %5-0,5'lik miktarına karşılık gelen düşük oksijen konsantrasyonuna sahip bir atmosfere maruz kalındığında, hücreler hayatta kalmak için kolaylıkla indüklenabilen AMP-aktive protein kinaz (AMPK) yolağı yoluyla adaptif reaksiyonlar geliştirmektedirler.¹²⁻¹⁴ Örneğin; fosfofruktokinaz-1 ve piruvat kinaz gibi bazı enzimlerin katalitik etkinliği artırılarak glikolizin sürdürülebilirliği artırılmakta ve böylece hücredeki düşük ATP/ADP+ P_i fosfori-



ŞEKİL 1: Ksantin oksidaz kaynaklı reaktif oksijen türleri üretim yolu.

lasyon potansiyeli ve fizyolojik redoks durumu nedeni ile oksidatif akım termodinamik olarak sürdürülebilmektedir. Fakat, bu yanıt kısa süreli hipoksilerde etkindir.

Uzamış hipoksilere hücreler hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörleri [hypoxia-inducible factor (HIF) üzerinde en çok çalışılan HIF-1)] nin stimülasyonu ile yanıt vermektedirler. Oksijen seviyesi kritik düzeylerin altına inince kompleks mekanizmalar ile hipoksilerin majör düzenleyicisi olan hipoksi ile indüklenebilir faktörler aktive olmakta, hipoksi yanıt elemanlarına bağlanmakta ve 200'den fazla genin transkripsiyonu ile hücreler hipoksik ortama adapte olmaktadır.^{15,16} Hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörleri-1'in, oksijen sensitiv HIF-1 α subüniti heterodimerize olduğu HIF-1 β subüniti ile DNA'ya bağlıdır. Yüksek O₂ konsantrasyonlarında oksijene hassas olan HIF, trikarboksilik asit [tricarboxylic acid (TCA)] siklusunda sentezlenen α -ketoglutarat enziminden derive olan prolin hidroksilaz (PHD) enzimiyle oksidize (hidroksile) olmaktadır. Hidroksile HIF-1 α subüniti, E3 ubiquitin ligaz kompleksinin kritik bir üyesi olan von Hippel-Lindau proteini ile etkileşmekte ve poliubikitinlenmektedir. Böylece proteozomlarla katabolize olur. Normoksik koşullarda HIF-1 α devamlı olarak sentezlenmekte ve yıkılmaktadır.¹⁵ Hipoksi altında ise α subüniti hidroksilasyonu gerçekleşmeyeceği için HIF-1 stabilize olmaktadır. Stabilize HIF-1 kompleksi çeşitli biyolojik süreçleri içeren geniş varyasyondaki genlerdeki hipoksi yanıt elemanına

bağlanır iken glikolitik enzim genlerini direkt aktive etmektedir.¹⁷ Hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörlerinin hücrelerin enerji homeostazına majör etkisi anabolizmanın inaktivasyonu, anaerobik glikolizin aktivasyonu ve mitokondriyal aerobik metabolizmanın (TCA siklusunu ve oksidatif fosforilasyonu) inhibisyonudur. Özellikle O₂ konsantrasyonu, TCA siklusunu ara ürünleri ile ROT'yi içeren pek çok mitokondriyal ürün, PHD aktivitesini koordine edebilmektedir. PHD 1-3 şeklinde izoformları olan bu enzimin PHD1 izoformu inhibe edilince peroksizom çoğaltıcıyı aktive eden reseptör- α yolağının aktivasyonu ile glukoz metabolizması ATP üretimi için daha çok anaerobik rotaya yönelmektedir.¹⁸ Bu arada yetersiz TCA siklusunu akışı, özellikle eğer süksinat dehidrogenaz enzimi disfonksiyonu nedeni ile gerçekleşmiş ise hem ETZ ve TCA siklusunun her ikisinden kaynaklanan enerji kaybı hem de aşırı serbest radikallerin üretimi ile sonuçlanmaktadır.¹⁹ TCA döngüsünün yetersizliği hipoksiye maruz kalan mitokondride meydana gelen süksinat birikiminin PHD enzimini inhibe etmesi gibi metabolik değişiklikler ile de ilgili olabilmektedir.²⁰ Sonuçta HIF-1 kompleksinin stabilizasyonu ile hipoksik ortama adaptasyon artmaktadır. HIF-1'in düzenlediği mekanizmalardan biri de sitokrom C oksidaz [cytochrome C oxidase (COX)/Kompleks IV] enzim etkinliğidir. Hipoksik hücrelerde COX'in subünit kompozisyonu değişmektedir. Stabil HIF-1, COX bileşimi içinde COX 4-1 izoformundan COX 4-2 izoformuna geçişi indüklemektedir. Aerobik koşullarda COX'in opti-

mizasyonunu sağlayan COX 4-1 subünitinin, hipoksik koşullarda degradasyonu artar iken, hipoksik koşullarda COX optimizasyonunu sağlayan COX 4-2 subünitinin ekspresyonu artmaktadır. Normalde O₂, COX'ten elektronları alan son akseptördür.¹⁷ Hipoksi durumunda ETZ'de elektronlar redoks merkezlerine kaçmakta ve COX'e ulaşamayan moleküler oksijen süperoksit anyon radikaline indirgenmektedir.²¹ ROT üretiminin çoğunun Kompleks I ve III'de olduğu ve Kompleks I'in katkısının daha yaygın olduğu kabul edilmektedir.²² Kompleks I tarafından üretilen ubikinol (koenzim Q), hipoksik koşullarda elektronları ETZ'de son e⁻ alıcısı olan moleküler oksijen yerine terminal e⁻ akseptörü gibi davranan süksinat dehidrogenaz (SDH) enzimine aktarmaktadır. Bu sırada TCA siklusunda sentezlenen ara ürün fumarat süksinata indirgenmekte ve süksinat birikimi olmaktadır. Respiratuar zincirin geri kalanındaki e⁻ akışının azalması sonucunda yetersiz ATP üretimi nedeni ile ADP'den AMP'ye katabolizasyon artmaktadır.

Reperfüzyonun başlaması ile O₂ ile restore edilen süksinat dehidrogenaz enzimi aşırı süksinatı metabolize eder. Bu esnada AMP'nin ADP'ye geçişi rejenerasyonu, reperfüzyonun ilk dakikalarında ATP senteze akımı sınırlamaktadır. Bu durumda süksinat dehidrogenaz tarafından ubikinole aktarılan e⁻lerin tümünü Kompleks III, yetersiz ADP nedeni ile tüketememekte ve membran hiperpolarize olmaya başlamaktadır. Ubikinolün ve protonların aşırı akışı Kompleks I'i ters çalışmaya indüklemekte ve ters ETZ (TETZ) tarafından Kompleks I üzerinden ROT üretilmektedir. Geç reperfüzyondan sonra normal oksijen seviyelerine ulaşınca süksinat birikimi normal düzeylere dönmekte ve TCA siklusu ve ETZ birikimleri normale çevirmektedir.²³ Sonuç olarak İR sürecinde hipoksizde artan süksinat, reperfüzyonla düşmeye başlamakta ve normal oksijen saturasyonuna ulaşınca normal düzeylere gelmektedir.

SÜKSİNAT DEHİDROGENAZ

Süksinat-ubikinon oksidoredüktaz, Kompleks II ya da yaygın olarak bilinen süksinat dehidrogenaz, (Kompleks II, EC 1.3.5.1 ve SDH EC 1.3.99.1)

ROT'nin üretiminin önemli bir bölümünü oluşturan bir enzim kompleksidir. İç mitokondriyal membranda yerleşmektedir. Hem TCA hem de ETZ'de görevli tek enzimdir. Süksinatı fumarata okside ederken ubikinonu (UQ) ubikinole (UQH₂) indirgemektedir. Süksinat dehidrogenaz enzimi nükleer genom tarafından kodlanan dört alt birim içermektedir. Mitokondriyal genom tarafından kodlanmayan ve katalitik siklusunda membranlar arası boşluğa proton pompalamayan tek respiratuar kompleks enzimidir.²⁴ *Escherichia coli* ve hayvanlarda SDHA-SDHD, maya ve bitkilerde SDH1-SDH4 olarak adlandırılan dört subünitten oluşmaktadır. SDHA/1 dikarboksilat (süksinat) bağlama alanı içeren bir flavoprotein subünitidir ve kovalent bağlı kofaktör flavin adenin dinükleotid bulundurmaktadır. SDHB/2 bir demir-sülfür subünitidir ve üç Fe-S kümesi içermekte ve ubikinona e⁻ transferine aracılık etmektedir. Diğer iki hidrofobik, membrana gömülü SDHC/3 ve SDHD/4 subünitleri UQ bağlama alanı (Q-site) içerirler.²⁵ SDH izole mitokondride doğrudan ROT kaynağıdır ve ROT üretim oranı, flavin grubunun azaltılması ile orantılıdır.²⁶

Süksinatın SDHA subüniti içinde fumarata oksidasyonundan sonra elektronlar SDHB/C/D proteinleri tarafından oluşturulan CoQ bağlama alanlarına, SDHB subünitindeki Fe/S merkezleri aracılığı ile geçmektedir. Redükte ubikinol Kompleks III tarafından oksidize edilmekte ve e⁻ler COX vasıtası ile Kompleks IV'e transfer edilmektedir. Burada moleküler O₂ suya indirgenmektedir. Bu redoks reaksiyonlar zincirindeki herhangi bir engel elektronların kaçağı ile sonuçlanmakta ve moleküler O₂ etkileşimi ile süperoksit oluşmaktadır.²⁷

SDH hücre siklusu ve stres yanıtları gibi farklı hücre sinyal süreçlerini de düzenlemektedir. SDH inhibitörleriyle ROT üretiminin indüksiyonu, mitokondriyal oksijen tüketimini inhibe bu etkiye, hücre döngüsü genlerinin negatif düzenlenmesi ve strese bağlı genlerin pozitif regülasyonu da eşlik etmektedir. Yarışmalı inhibitor malonatın kullanıldığı kısmi SDH inhibisyonu durumunda süksinat oksidasyonunun inhibisyonu ile hidrojen peroksit (H₂O₂) üretimi azalmakta ve bu durum stresle ilişkili genlerin indüksiyonunun yetersizliğine karşın bitki büyümesinde artışa sebep olmaktadır.²⁶

Rasoala ve ark. 2014 yılında çeşitli tümör hücre tiplerinde mitokondriyal şaperon TRAP1'in yüksek oranda ifade edildiğini göstermişlerdir.²⁸ Bu durumun Kompleks II'de SDH'nin enzimatik aktivitesini azalttığını ve böylece solunumun inhibe olduğunu belirtmişlerdir. SDH inhibisyonu ile artan süksinat, transkripsiyon faktör HIF1 α 'yı stabilize etmekte ve tümör büyümesi artmaktadır.²⁹ Herediter paraganglioma/feokromasitoma sendromlarında mutasyon nedeni ile SDH'nin fonksiyon kaybı bulunmaktadır, bireylerde ciddi erken başlangıçlı nörodejenerasyona yol açmaktadır. Bu sendromlar bazı gastrointestinal stromal tümörler ya da renal tümörler ile ilişkilidir. Bu neoplazmlarda HIF1 α 'nın süksinat bağımlı stabilizasyonunun pro-neoplastik role sahip olduğu düşünülmektedir. Guzzo ve ark., mitokondriyal şaperon TRAP1 tarafından SDH inhibisyonunun tümör hücrelerinde anti apoptotik ve antioksidan etkiye sahip olduğunu gösterdikleri çalışmalarında, SDH'nin inhibisyonunun solunumda direkt olarak Kompleks III'e e⁻ akışını azalttığını, indirekt olarak da SDH'nin TCA'nın bir parçası olması, dolayısıyla solunum yakıtlarının eş değerlerini düşürdüğünü belirtmişlerdir.²⁷ Yani hücreler oksidatif hasardan ve takibinde de oksidanlara çok hassas ölümcül mitokondriyal permeabilite geçiş porlarının açılmasından korumaktadır. Böylece geri dönüşümsüz mitokondriyal hasar ve hücre ölümünden korunmuş olmaktadır. SDH inhibisyonu ile ortaya çıkan süksinat bağımlı HIF1 α stabilizasyonu da pseudohipoksik bir durum oluşturmakta ve neoplastik büyümeyi artırmaktadır.

SÜKSİNAT

İR hasarı çalışmalarında, organizmada antioksidan savunma sistemlerinin yeterli çalışıp çalışmadığını araştırmak için çeşitli dokularda veya biyolojik sıvılarda çeşitli antioksidanların konsantrasyonları veya aktiviteleri ölçülmüştür. Bu amaçla klinik çalışmalarda pek çok preparat denenmiştir. Çoğunluğu deney hayvanları üzerinde yapılan bu çalışmalarda, farklı İR hasarına neden olan durumlarda farklı organlarda farklı preparatların antioksidan etkileri araştırılmıştır. Chouchani ve ark.nın 2014 yılında "Nature" dergisinde yayımladıkları ça-

lışmalarında; iskemi, reperfüzyon ve normal oksijen konsantrasyonunda in vivo metabolitlerin analizini yapıp bu süreçlerdeki düzeylerini birbirleri ile kıyaslamışlardır. Çalışmalarında beklenmedik şekilde İR hasarında mitokondriyal reaktif oksijen türleri (mROT) üretiminden sorumlu olan, geniş oranda korunmuş metabolik yollar olduğunu saptamışlardır.²³ Bu çalışmada, in vivo iskemik fare böbrek, karaciğer, kalp ve beyin dokusunda, sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi [Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)] tekniği ile pek çok metabolit analiz edilmiştir. Karşılaştırmalı analizlerde sadece üç metabolitin tüm dokularda arttığı görülmüştür. Artan metabolitlerden ikisinin iskemide pürin nükleotid metabolizmasının yıkım ürünü olan ksantin ve hipoksantin olduğu bulunmuştur. Üçüncü metabolitin ise mitokondriyal TCA ara ürünü olan süksinat (süksinik asit) olduğu ve süksinat konsantrasyonunda 3-19 (61-729 ng/mg ıslak doku ağırlığı) kat arasında artış olduğu saptanmıştır. Bu bulgular ışığında, sadece mitokondriyal kaynaklı olması ve tüm dokularda artış göstermesinden dolayı İR sürecinde süksinatın mROT üretimindeki potansiyel rolü üzerinde durulmuştur. mROT üretimi reperfüzyonun erken safhalarında meydana gelmektedir ve bunu, ROT metabolitlerinin hızlı oksidasyonu takip etmektedir. Bu çalışmada da özellikle iskemide artan süksinat düzeylerinin ex vivo kalp, in vivo kalp, beyin ve böbrek dokularında reperfüzyonun ilk 5 dk'sı içinde normal oksijen konsantrasyonundaki seviyeye indiği saptanmıştır. İn vivo kalp dokusunda süksinat birikiminin iskemi süresi ile orantılı, süksinattaki değişikliklerin İR hasarlı alana sınırlandırılmış olduğu ve diğer TCA siklus metabolitlerinin miktarlarında değişiklik olmadığı bulunmuştur. Özellikle ex vivo kalp dokusu üzerinde yapılan çalışmada, süksinatın kaynağını araştırmak için üretildiği TCA siklusunun yakıt olarak kullandığı karbonların kaynağı olan glukoz, yağ asiti, glutamat ve GABA şantı üzerinde ¹³C-izotop bağlı deneyler yapılmıştır. Ardından LC-MS ile metabolitleri analiz edilmiştir. Fakat, bunların hiçbirinin süksinat birikimine katkıda bulunmadığı saptanmıştır. Bunun üzerine, daha önceki çalışmalarda speküle edilen anaerobik metabolizma sıra-

sındaki SDH enziminin revers olarak fumaratı süksinata indirgeyebileceği üzerinde durulmuştur.³⁰ Bu enzime fumarat desteği iki yoldan gelmektedir. İlki; malat/aspartat şantı ki iskemik sırasında yüksek NADH/NAD⁺ oranı malat oluşumunu sürdürmekte, o da fumarata çevrilmektedir. Bir diğeri de pürin nükleotid siklusunun AMP bağımlı aktivasyonu ile fumarat üretimidir. Bu varsayımı deneysel olarak açıklamak için fareye SDH enziminin kompetitif inhibitörü olan malonatın membran permeabl prekürsörü dimetil malonat (DMM) infüzyonu yapılmıştır. İskemik miyokardiyumda DMM infüzyonunun süksinat düzeylerini önemli oranda düşürdüğü bulunmuştur. İskemide süksinat birikimine fumarat kaynaklarının katkısını değerlendirmek için de malat-aspartat şantındaki aspartat aminotransferaz enzimi amino oksiasetat ile pürin nükleotid siklusundaki adenilo süksinat liyaz, 5-amino-1-b-D-ribofuranosil-imidazol-4-karboksamid ile inhibe edilmiştir. Her iki inhibitörün iskemik süksinat düzeyini de düşürdüğü görülmüştür. Bu nedenle malat/aspartat şantı ve pürin nükleotid siklusunun yollarının iskemide artan fumarat üretimi nedeni ile SDH enzimini revers çalışmaya yönlendirdiği düşünülmüştür. Süksinat kaynaklı mROT üretiminin altta yatan mekanizmasını araştırmak için reperfüzyon sonrası iskemik kardiyak metabolizma değişikliklerini içeren “in silico” modeli oluşturulmuştur. Bu simülasyonla biriken süksinatı SDH'nin oksidize ettiği, Kompleks III ve IV'ün tam kapasite çalıştığı ve TETZ'nin Kompleks I'e doğru çalıştığı öngörülmüştür. Süksinatın in vitro TETZ ile yoğun olarak Kompleks I'den süperoksit formasyonu oluşumunu sağladığı, İR'de mROT oluşumunun potansiyel kaynağı olduğu düşünülmüştür. İskemide biriken süksinatın reperfüzyonda TETZ ile Kompleks I'e yönlendirip yönlendiremeyeceğini görmek için İR hasarlı bir primer kardiyomiyosit modelde dihidroetidyum (DHE) floresan prob ile mROT, potansiyel sensitiv floresan tetrametilrodamin metil ester ile mitokondriyal membran potansiyeli izlenmiştir. Reperfüzyon sonrası DHE hızla okside olur iken süperoksit üretimini artırdığı gözlenmiştir. SDH aracılı iskemik süksinat birikiminin, DMM ile inhibisyonu ile reperfüzyonda DHE oksidasyonunun

düştüğü gözlenmiştir. Süksinatın ROT üretimindeki rolünü daha iyi anlamak için süksinatın hücreden geçebilen türevi dimetil süksinat (DMS) kullanılmıştır. Hücrelere hızla alınan DMS hidrolize olmakta ve hücrede süksinat düzeyleri artmaktadır. İskemik primer kardiyomiyositte eklenen DMS'nin reperfüzyonda DHE oksidasyonunu artırdığı gözlenmiş ve süksinat düzeyinin reperfüzyonda ROT oluşum derecesini kontrol ettiği sonucuna varılmıştır. Wijermars ve ark.nın, 2016 yılında yayımlanan çalışmalarında, insan renal graft nakli sonrası soğuk iskemik doku biyopsi materyallerinde hem kontrol grubuna göre iskemik dokularda hem de iskemik süresi arttıkça doku süksinat düzeylerinin kontrol grubuna göre düştüğünü bulmuşlardır. Ancak, farelerde yaptıkları çalışmada, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında soğuk iskemide doku süksinat düzeyleri kontrole göre düşük iken, sıcak iskemide süksinat düzeylerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır.³¹ Bu çalışmada buldukları sonuçların Chouchani ve ark.nın çalışmalarında bulunan sonuçlar ile paradoks oluşturduğunu iddia etmişlerdir.

İR hasarını doğrudan gösterebilecek bir biyokimyasal belirteci saptamak ve bir preparat ile bu hasarı önleyebilmek tıp dünyasının uzun süredir üzerinde çalıştığı bir konudur ve hâlen de yoğun olarak çalışılmaktadır. Fakat, henüz kullanıma girmiş İR hasarını önleyici bir uygulama veya preparat bulunmamaktadır. İskemik dokuda SDH enzim aktivitesinin kontrolü ve süksinat düzeylerinin takibi ile organdaki oksidatif stres durumunun kontrol altına alınabileceği düşünülmektedir. Hâlen de SDH enzim basamağının kontrolü ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmalar ile sadece organ nakillerinde değil tüm İR hasarı durumlarında, hasarın tayini ve DMM kullanımını ile yeni hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazar herhangi bir çıkar çatışması veya finansal destek bildirmemiştir.

Yazar Katkıları

Bu çalışma Derya Güleç tarafından hazırlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol* 2012;942:93-136.
2. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(11):4405-9.
3. Yan LJ, Sohal RS. Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(22):12896-901.
4. Douzinas EE, Livadioti O, Tasoulis MK, Prigouris P, Bakos D, Goutas N, et al. Nitrosative and oxidative stresses contribute to post-ischemic liver injury following severe hemorrhagic shock: the role of hypoxemic resuscitation. *PLoS One* 2012;7(3):e32968.
5. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* 2011;17(11):1391-401.
6. Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoelle K, et al. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci* 2011;16(6):300-9.
7. Nathan C, Cunningham-Bussell A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* 2013;13(5):349-61.
8. Schofield ZV, Woodruff TM, Halai R, Wu MC, Cooper MA. Neutrophils--a key component of ischemia-reperfusion injury. *Shock* 2013;40(6):463-70.
9. Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2009;104(2):181-8.
10. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301(5):H1723-41.
11. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011;283(2-3):65-87.
12. Reynafarje B, Costa LE, Lehninger AL. O2 solubility in aqueous media determined by a kinetic method. *Anal Biochem* 1985;145(2):406-18.
13. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 2007;581(19):3582-91.
14. Viollet B, Athes Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, et al. AMPK: lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009;14:19-44.
15. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3(10):721-32.
16. Kaluz S, Kaluzová M, Stanbridge EJ. Rational design of minimal hypoxia-inducible enhancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;370(4):613-8.
17. Semenza GL. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* 2007;405(1):1-9.
18. Aragonés J, Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Dresselaers T, Mazzone M, et al. Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet* 2008;40(2):170-80.
19. Eng C, Kiuru M, Fernandez MJ, Aaltonen LA. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat Rev Cancer* 2003;3(3):193-202.
20. Koivunen P, Hirsilä M, Remes AM, Hassinen IE, Kivirikko KI, Myllyharju J. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J Biol Chem* 2007;282(7):4524-32.
21. Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2010;1797(6-7):1171-7.
22. Lenaz G, Baracca A, Fato R, Genova ML, Solaini G. New insights into structure and function of mitochondria and their role in aging and disease. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(3-4):417-37.
23. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 2014;515(7527):431-5.
24. Rutter J, Winge DR, Schiffman JD. Succinate dehydrogenase-assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion* 2010;10(4):393-401.
25. Yankovskaya V, Horsefield R, Tömröth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, et al. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 2003;299(5607):700-4.
26. Jardim-Messeder D, Caverzan A, Rauber R, de Souza Ferreira E, Margis-Pinheiro M, Galina A. Succinate dehydrogenase (mitochondrial complex II) is a source of reactive oxygen species in plants and regulates development and stress responses. *New Phytol* 2015;208(3):776-89.
27. Guzzo G, Sciacovelli M, Bernardi P, Rasola A. Inhibition of succinate dehydrogenase by the mitochondrial chaperone TRAP1 has antioxidant and anti-apoptotic effects on tumor cells. *Oncotarget* 2014;5(23):11897-908.
28. Rasola A, Neckers L, Picard D. Mitochondrial oxidative phosphorylation TRAP1 in tumor cells. *Trends Cell Biol* 2014;24(8):455-63.
29. Sciacovelli M, Guzzo G, Morello V, Frezza C, Zheng L, Nannini N, et al. The mitochondrial chaperone TRAP1 promotes neoplastic growth by inhibiting succinate dehydrogenase. *Cell Metab* 2013;17(6):988-99.
30. Niatsetskaia ZV, Sosunov SA, Matsukevich D, Utkina-Sosunova IV, Ratner VI, Starkov AA, et al. The oxygen free radicals originating from mitochondrial complex I contribute to oxidative brain injury following hypoxia-ischemia in neonatal mice. *J Neurosci* 2012;32(9):3235-44.
31. Wijermars LG, Schaapherder AF, Kostidis S, Wüst RC, Lindeman JH. Succinate accumulation and ischemia-reperfusion injury: of mice but not men, a study in renal ischemia-reperfusion. *Am J Transplant* 2016;16(9):2741-6.