

ELASTAZ'IN ELASTİN'İ SİNDİRME ÖZELLİĞİNE BAZI POTASYUM TUZLARININ ETKİSİ

Kenan ONSUN

Edirne Tıp Fakültesi, Biokimya Kürsüsü,
Fatih - İstanbul.

Ö Z E T

Bu çalışmada, sığır pankreas elastaz'ının elastini sindirme özelliği üzerine, çeşitli potasyum tuzlarının etkisi incelenmiştir.

K_2SO_4 , K_2HPO_4 , CH_3COOK ve KCl 'ün, çalışma koşullarımızda elastaz aktivitesini inhibe ettiği görülmüş ve inhibisyon ile tuz konsantrasyonu arasında doğru bir orantı olduğu saptanmıştır.

Etkisi araştırılan tuzlar arasında; potasyum sülfat en büyük, potasyum klorür en düşük inhibitör etkiyi göstermektedir. Di-potasyum hidrojen fosfat ve potasyum asetat'ın inhibitör etkileri potasyum sülfat'tan daha düşük, potasyum klorür'e oranla daha yüksektir.

GİRİŞ

Pankreas elastazının (Pancreato peptidase E, EC. 3.4.4.7) elastolitik aktivitesi hakkında ilk bilgilerin verildiği 1870 lerden bu yana ⁵, enzimin özelliklerinin açıklığa kavuşturulması yolunda önemli adımlar atılmıştır. Bu konuda yapılan araştırmalar, enzimin substrat spesifikliğı ve çeşitli maddelerce inhibe veya aktive edilebilirliğı yönünde yoğunlaştırılmıştır.

1949 yılında *Balo* ve *Banga*'nın ¹ insan ve hayvan serumlarının elastaz'ın elastin'i sindirme özelliğini azalttığı saptamalarından sonra, bu defa *Lewis* ve *ark*. ⁴ 1956 yılında çeşitli iyonların aktivite üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, Zn, Mn, Co, Mg, Ca ve Na gibi iyonların etkileri hakkında geniş bir bilgi vermelerine karşın, potasyuma çok kısa olarak değinmekle yetinmişlerdir. Bunu takip eden yıllarda birçok araştırmacı çeşitli iyonların etkilerini inceleyip yayınlarken, potasyuma çalışmalarında yer vermemişlerdir.

Olanaklarımız ölçüsünde yaptığımız literatür taramalarında potasyum tuzlarının elastaz aktivitesine etkisi üzerinde yeterince durulmadığını saptamamız, bizi çeşitli metabolizma olaylarında çok etken rol oynayan bu iyonun elastoliz olayındaki yerini aydınlatmaya yöneltti.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

I — Elastin eldesi

Elastin, *Banga ve ark.* nın ² NaOH ile kaynatma yöntemi esas alınarak sığır aortundan izole edilmiştir. İnce disseksiyonla tunica adventitia'dan temizlenen aortlar kıyma haline getirilip, önce aseton daha sonra dietil eter ile uzunca bir süre çalkalandı. Böylelikle yağ ve suyu uzaklaştırılan aort parçacıkları kurutulup toz haline getirildi. Elde edilen aort tozu 0.1 N NaOH ile 60 dakika, 98°C de ısıtılarak kollajen ve diğer proteinler hidrolize edildi. Hidrolize uğramayan elastin santrifüjle çöktürme yoluyla elde edildi ve kurutularak toz haline getirildi.

II — Elastaz eldesi

Elastaz, *Grant ve Robbins'in* ³, *Yenson ve ark.nca* ⁶ yeniden düzenlenen yöntemine göre izole edildi.

Birkaç kez kıyma makinasından geçirilen sığır pankreasları aseton ve dietil eter ile muamele edilerek yağ ve sudan kurtarıldı. Parçacıklar kurutularak toz haline getirildi.

12.5 g yağsızlaştırılmış pankreas tozu, aynı yöntemle elde edilen 1.25 g duodenum tozu ve 1 g NaCl ile birlikte asetat tamponu (pH 4.7 0.05 M) içinde beş saat süreyle 15°C de çalkalandı ve santrifüj edildi. Üst sıvı etanol (96°) ile çöktürüldü ve çökelek kurutulup toz haline getirildi. +4°C de saklanan bu toz her çalışmadan önce % 0.85 NaCl içinde süspansiyon edildi ve çözünmeyen kısımlar ayrıldı. Üst sıvı elastaz ekstresi olarak kullanıldı.

III — Deneylerin düzenlenişi

Banga ve ark. ² geliştirdikleri gravimetrik yöntem kullanılarak elastaz'ın elastin'e etkisi üzerine, ortama katılan çeşitli potasyum tuzlarının etkisi incelendi.

Deneylerde kullanılan cam tüpler 105°C lik etüvde 45 dakika tutularak sabit tartıma getirildi ve tartıldı.

a. *Kör deneyler* : Tüplere 20 mg elastin, 4.8 ml karbonat-HCl tamponu ve 0.2 ml destile su katıldı.

b. *Kontrol deneyler* : Tüplere 20 mg elastin, 4.8 ml karbonat-HCl tamponu ve 0.2 ml elastaz katıldı ve tamponlanmış bir ortamda elastazın sindirdiği elastin miktarı kör deney sonuçları göz önünde tutularak saptandı. Elde edilen değerler % 100 aktivasyon (% 0 inhibisyon) olarak kabul edildi.

c. *İnhibisyon deneyleri* : Deneyler aynen kontrol deneyleri gibi düzenlendi. Ancak burada kullanılan karbonat-HCl tamponu belirli konsantrasyonlarda potasyum tuzları içermekte idi.

Karbonat-HCl tamponu; pH 8.8, iyonik kuvvet 0.05. 23 ml 0.1 M Na₂CO₃ ve 20 ml 0.1 M HCl karıştırılarak destile su ile 86 ml ye tamamlandı. Bu tampon destile su ile 1:1 oranında seyreltilip kullanıldı.

IV — Deney işlemi

37°C deki su banyosunda bir saat tutulan tüpler, sık sık karıştırılarak elastin süspansiyon halinde tutuldu ve elastaz çözünmez elastin üzerine etki ettirildi. Oda ısısına getirilen tüpler 5000 g de 15 dakika santrifüje edildi. Elastaz etkisiyle çözünen elastin kısımlarını içeren üst sıvı uzaklaştırıldı. Çökelek 5 ml etanol (96°) ile yıkanarak tekrar santrifüjlendi ve üst sıvı dekante edildi. Tüpler sabit tartıma getirilerek elastolizden kurtulan elastin miktarı tartıldı ve reaksiyona sokulan elastin miktarından çıkartıldı. İnhibisyon oranları ;

$$I = 100 - \left(\frac{A - B}{C - B} \times 100 \right) \text{ formülüyle saptandı.}$$

I = % inhibisyon

A = İnhibisyon deneylerine ait tartım farkları aritmetik ort.

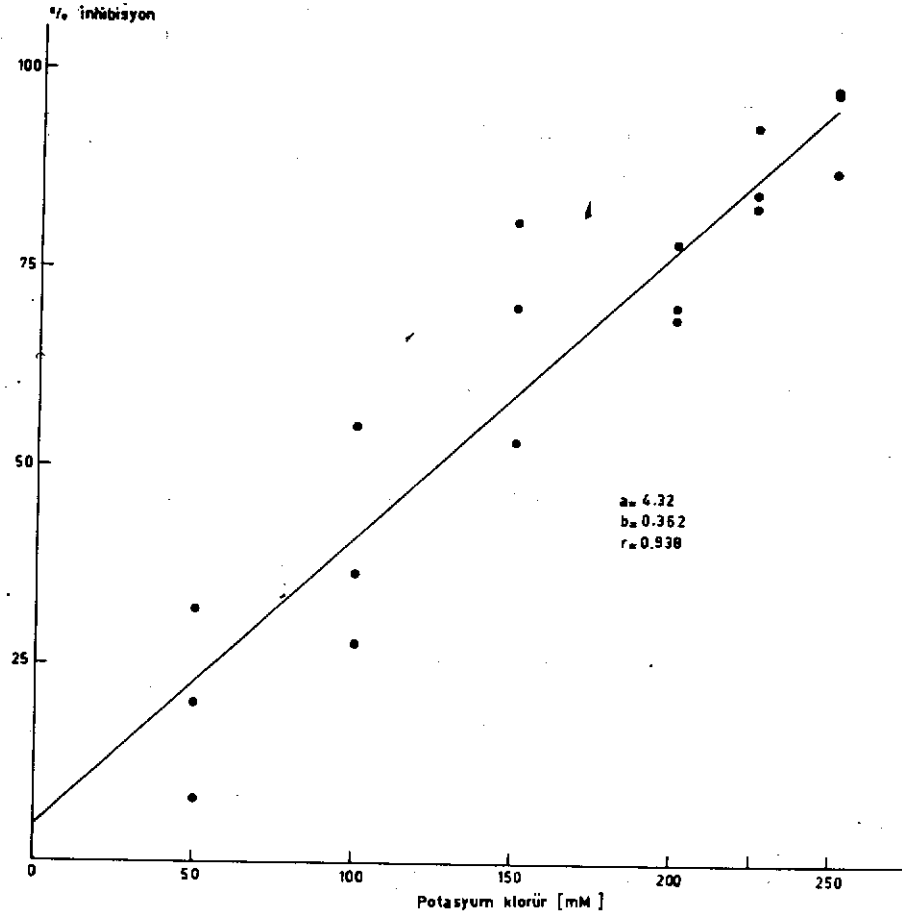
B = Kör deneylere ait tartım farkları aritmetik ort.

C = Kontrol deneylere ait tartım farkları aritmetik ort.

BULGULAR

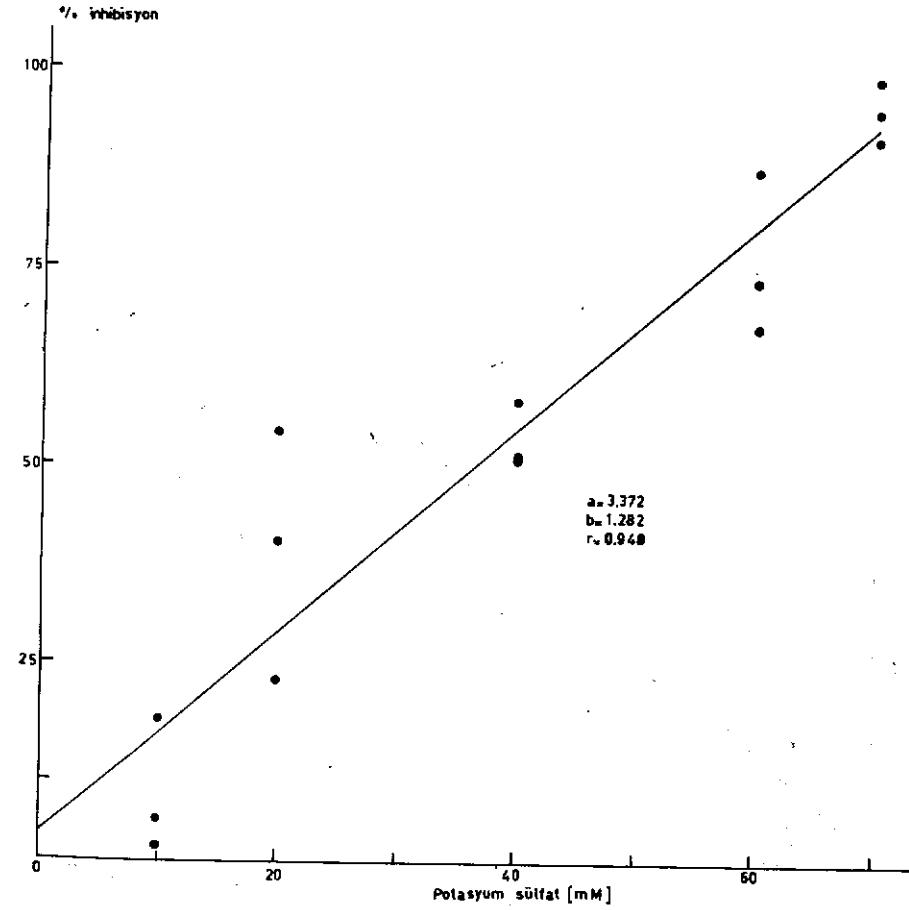
Farklı konsantrasyonlarda çeşitli potasyum tuzlarının elastaz aktivitesini değişik derecede inhibe ettiği saptanmış ve çalışmamızın sonuçları Şekil 1-4 de toplu olarak sunulmuştur.

I. Farklı konsantrasyonlardaki potasyum klorür ile yapılan deneylerde, 50 mM KCl % 20.38 inhibisyona, 100 mM KCl % 39.12, 150 mM KCl % 68.1, 200 mM KCl % 72.4, 225 mM KCl % 87.1 ve 250 mM KCl % 94.2 inhibisyona neden olmuştur. Hesaplanan (P) değerlerinden potasyum klorür'ün 50 mM konsantrasyonda anlamsız, 100 ve 150 mM konsantrasyonlarda anlamlı ve daha yüksek konsantrasyonlarda ileri derecede anlamlı inhibisyonlara neden olduğu görülmüştür. Şekil 1'de potasyum klorür'ün inhibisyon eğrisi görülmektedir.



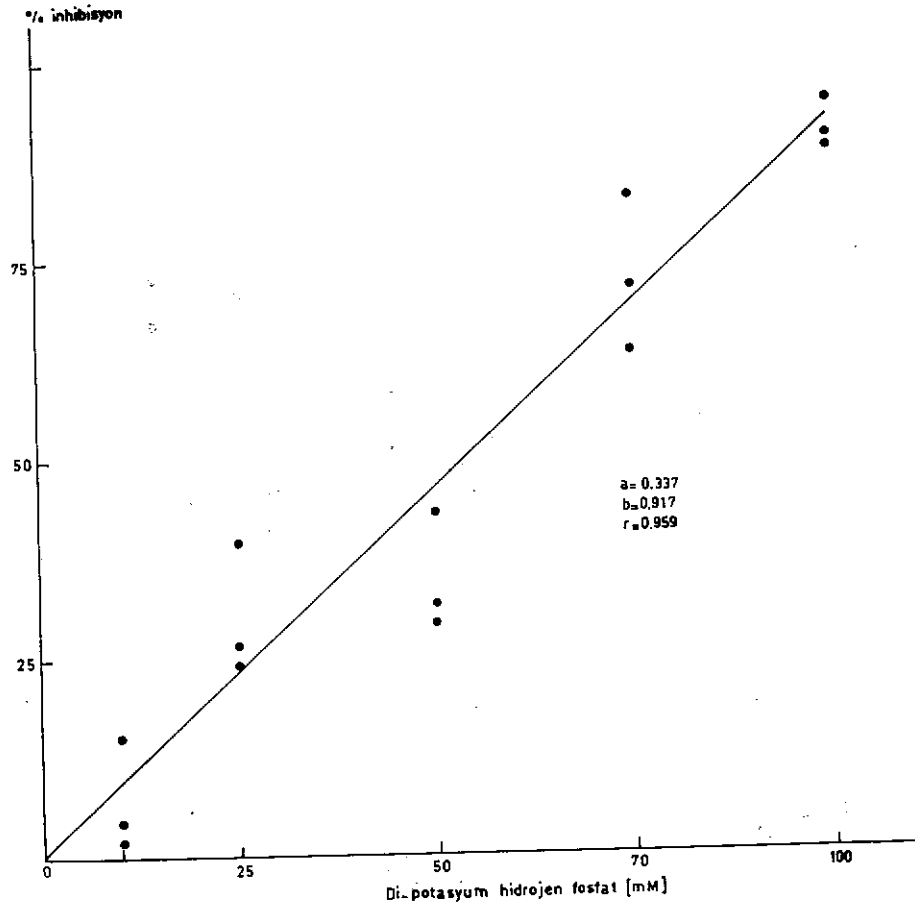
Şekil 1. Ortama katılan potasyum klorür konsantrasyonu ile inhibisyon yüzdesi arasındaki ilişki.

II. Potasyum sülfat'ın elastaz aktivitesi üzerine inhibitör etkisi araştırıldığında; 10, 20, 40, 60 ve 70 mM K_2SO_4 'ün sırasıyla % 8.8, % 39.3, % 53.5, % 76.3 ve % 95.3 inhibisyonlara neden olduğu saptanmıştır. İnhibisyon oranlarının incelenmesinden, (P) değerinin artan potasyum sülfat konsantrasyonlarına paralel olarak küçüldüğü ve dolayısıyla inhibisyonun çok ileri derecede anlamlılık kazandığı saptanmıştır. *Bravais-Pearson* formülüyle çizilen inhibisyon eğrisi Şekil 2'de sunulmuştur.



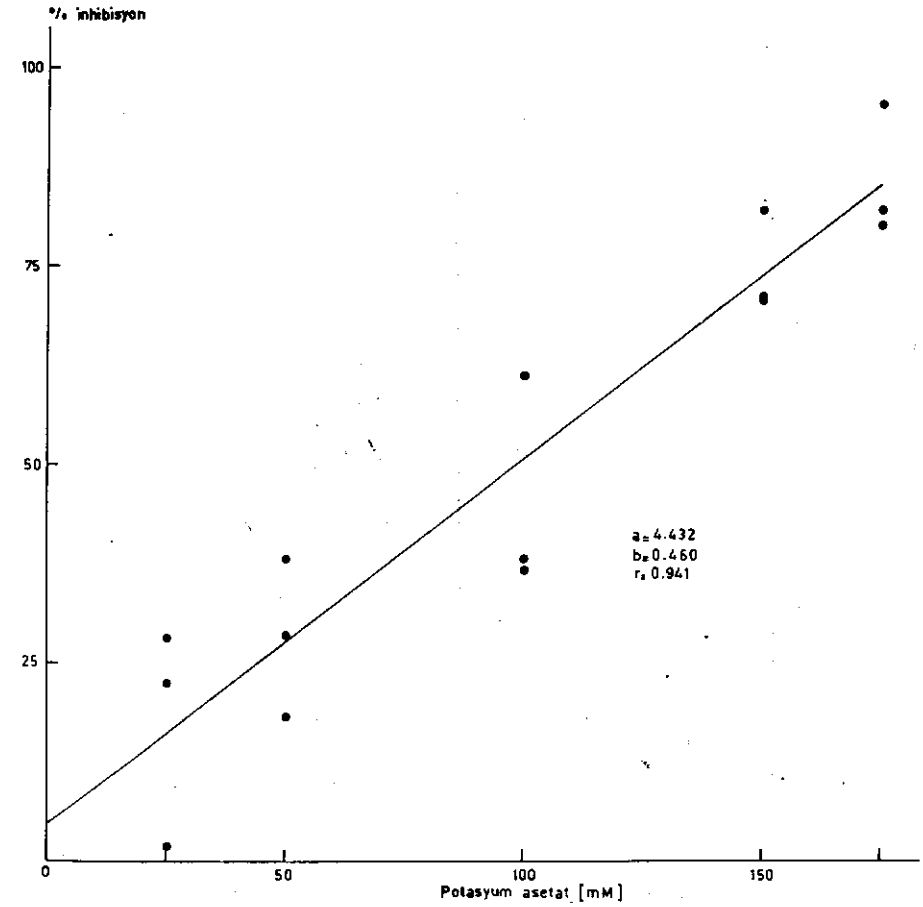
Şekil 2. Ortama katılan potasyum sülfat konsantrasyonu ile inhibisyon yüzdesi arasındaki ilişki.

III. 10, 25, 50, 75 ve 100 mM di-potasyum hidrojen fosfat, elastaz aktivitesini sırasıyla, % 7.4, % 30.1, % 34.6, % 72.5 ve % 92.02 oranında inhibe etmiştir. Oluşan inhibisyonların anlamlılık derecesi saptanmış, 10 mM K_2HPO_4 0.05 den büyük (P) değeri verdiği için, bu konsantrasyonda oluşan inhibisyon anlamsız bulunmuştur. Buna karşın 25 ve 50 mM K_2HPO_4 anlamlı, 75 ve 100 mM K_2HPO_4 ise ileri derecede anlamlı bir inhibisyon göstermiştir. Di-potasyum hidrojen fosfat'ın inhibisyon eğrisi Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Ortama katılan di-potasyum hidrojen fosfat konsantrasyonu ile inhibisyon yüzdesi arasındaki ilişki.

IV. Ortamdaki konsantrasyonu 25-175 mM arası değişecek şekilde kullanılan potasyum asetat % 17.5 ten % 86.06 ya varan inhibisyonlara neden olmuştur. Elde edilen inhibisyon yüzdelere t-testine uygulanması ile saptanan (P) değerleri, potasyum asetat konsantrasyonları arttıkça küçülmüş ve inhibisyonlar gittikçe anlamlılık kazanmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki potasyum asetat'ın elastaz aktivitesi üzerindeki etkisi *Bravais-Pearson* formülü yardımıyla çizilen inhibisyon eğrisinde gösterilmiştir (Şekil 4).

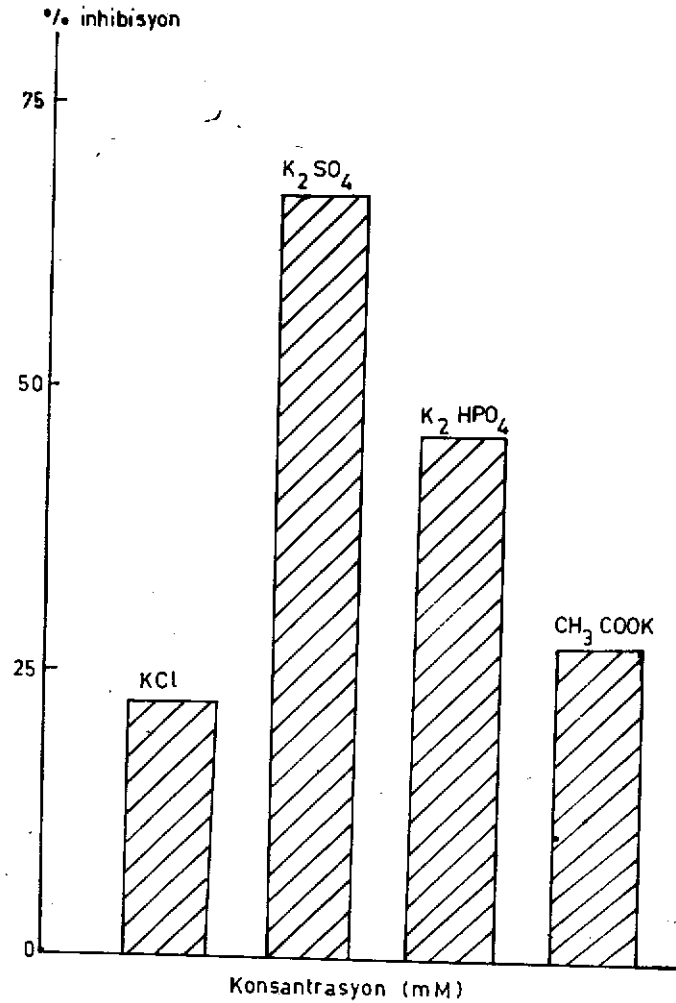


Şekil 4. Ortama katılan potasyum asetat konsantrasyonu ile inhibisyon yüzdesi arasındaki ilişki.

İRDELEME VE SONUÇ

Farklı anyonlar içeren potasyum tuzlarının elastaz üzerine etkisi, çeşitli oranlarda inhibisyon meydana getirmiştir. Elde edilen sonuçlar, regresyon eğrileri üzerinde incelendiğinde :

I — a. Elastaz aktivitesi üzerine etkisi araştırılan potasyum tuzları arasında en yüksek inhibisyon etkisine potasyum sülfat'ın sahip olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 5. 50 mM konsantrasyonda dört ayrı potasyum tuzu ile elde edilen inhibisyon yüzdeleri.

b. Di-potasyum hidrojen fosfat'ın inhibitör etkisi, potasyum sülfat'a oranla daha düşük fakat, potasyum asetat ve potasyum klorür'e göre daha yüksektir. 70 mM K₂SO₄'ın oluşturduğu inhibisyon oranı ancak 100 mM K₂HPO₄ ile elde edilebilmektedir.

c. Potasyum asetat'ın inhibitör etkisinin potasyum sülfat ve di-potasyum hidrojen fosfat'tan oldukça düşük fakat, potasyum klorür'den yüksek olduğu anlaşılmıştır.

d. Elastaz aktivitesi üzerine etkisi araştırılan potasyum tuzları arasında, potasyum klorür'ün en düşük inhibitör etkiyi gösterdiği anlaşılmıştır. 1956 yılında Lewis ve ark. 70 mM NaCl ile % 50 oranında bir inhibisyon elde etmişlerdir⁴. Araştırmacılar KCl için kesin bir rakam vermemişler, etkisinin NaCl'e benzediğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 70 mM KCl'ün % 23 oranında inhibisyona neden olduğu görülmüştür.

II — Aynı konsantrasyonda dört ayrı potasyum tuzunun sağladığı inhibisyonun birbirinden oldukça farklı olduğu görülmektedir. Örneğin, 50 mM konsantrasyonlarda potasyum klorür, potasyum asetat, di-potasyum hidrojen fosfat ve potasyum sülfat'ın oluşturdukları inhibisyon oranları sırasıyla, % 23, % 27.5, % 46, % 67 dir (Şekil 5).

Görülüyor ki, çeşitli potasyum tuzları elastaz aktivitesini farklı oranlarda inhibe etmektedirler. Aktivite üstüne etkisi araştırılan dört potasyum tuzunun da in vitro inhibisyon göstermesi ve inhibisyon oranlarının artan tuz konsantrasyonlarına paralel olarak yükselmesi, potasyum iyonunun spesifik bir elastaz inhibitörü olduğunu kanıtlamaktadır. Fakat bu inhibitör etki potasyuma bağlı anyonun türüne göre değişim göstermektedir.

SUMMARY

EFFECTS OF VARIOUS POTASSIUM SALTS ON THE ELASTASE DIGESTION OF ELASTIN

In this present study, the effects of various potassium salts on the digestion of elastin by bovine pancreatic elastase, has been carried out.

Potassium sulphate, di-potassium hydrogen phosphate, potassium acetate and potassium chloride have shown an inhibitory effect on elastase activity. Inhibitions were directly proportional with salt concentrations.

The effects of the salts can shortly be summarized as follows :

1. Potassium sulphate appeared as having the maximal inhibitory effect.

2. The inhibitory effects of di-potassium hydrogen phosphate and potassium acetate were weaker than potassium sulphate.
3. Potassium chloride seemed to have minimal inhibitory effect in respect to others.

As a result, potassium ions can be regarded as specific elastase inhibiting agents. And it has been established that, this inhibitory effect varies according to the anion bounded to potassium.

KAYNAKLAR

- 1 — BALO J. ve BANGA I.: *Elastase and elastase inhibitor*. Nature, **164**, 491, 1949.
- 2 — BANGA I., BALO J. ve HORVATH M.: *Nephelometric determination of elastase activity and method for elastoproteolytic measurements*. Biochem. J., **71**, 544-551, 1959.
- 3 — GRANT N.H. ve ROBBINS K.C.: *Elastase* (Armour and Co.) U.S. **2**, 886, 489, May 12, 1959. (L. Cit. CA-Biochemistry Sections, 53, 15171c. 1959).
- 4 — LEWIS U.J., WILLIAMS D.E. ve BRINK N.G.: *Pancreatic elastase. Purification, properties and function*. J. Biol. Chem.; **222**, 705-720, 1956.
- 5 — WÄLCHLI G.: *Über die Fäulniss des Elastin und Mucin*. J. Pract. Chem., **17**, 71-78, 1978.
- 6 — YENSON M., ÖZ H. ve BABAN N.: *Elastolizatin doymuş sodyum karbonat veya sodyum klorür eriyikleriyle verdiği bulanıklığın spesifik bir elastolizat reaksiyonu olarak değeri*. İst. Tıp Fak. Mecm., **26**, 215-227, 1963.