

ELASTAZ'IN ELASTİNİ SİNDİRME ÖZELLİĞİNE BAZI POTASYUM TUZLARININ ETKİSİ

Kenan ONSUN

*Edirne Tıp Fakültesi, Biokimya Kürsüsü,
Fatih - İstanbul.*

ÖZET

Bu çalışmada, sigır pankreas elastazının elastini sindirme özelliği üzerine, çeşitli potasyum tuzlarının etkisi incelenmiştir.

K_2SO_4 , K_2HPO_4 , CH_3COOK ve KCl 'in, 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 yana⁵, enzimin özelliklerinin açığa kavuşturulması yolunda önemli adımlar atılmıştır. Bu konuda yapılan araştırmalar, enzimin substrat spesifikliği ve çeşitli maddelerce inhibe veya aktive edilebilirliği yönünde yoğunlaştırlılmıştır.

1949 yılında *Balo* ve *Banga*'nın¹ insan ve hayvan serumlarının elastaz'ın elastin'i sindirme özelliğini azalttığını saptamalarından sonra, bu defa *Lewis* ve *ark.*⁴ 1956 yılında çeşitli iyonların aktivite üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmalar, Zn, Mn, Co, Mg, Ca ve Na gibi iyonların etkileri hakkında geniş bir bilgi vermelerine karşın, potasyuma çok kısa olarak degeinmeye yetinmişlerdir. Bunu takip eden yıllarda birçok araştırcı çeşitli iyonların etkilerini inceleyip yaynlarken, potasyuma çalışmalarında yer vermemişlerdir.

Olanaklarımıza 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.ının² NaOH ile kaynatma yöntemi esas alınarak sığır aortundan izole edilmiştir. İnce dissekşyonla 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 ısıtılıarak kollajen ve diğer proteinler hidrolize edildi. Hidrolize uğramayan elastin santrifüje çöktürme yoluyla elde edildi ve kurutularak toz haline getirildi.

II — Elastaz eldesi

Elastaz, *Grant* ve *Robbins'in*³, *Yenson* ve ark.nca⁴ 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 düzenlenmesi

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

Deneylede 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. *Inhibisyon deneyleri* : Deneyle aynen kontrol deneyleri gibi düzenlenledi. Aneak 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 etti. 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 yakanarak 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.

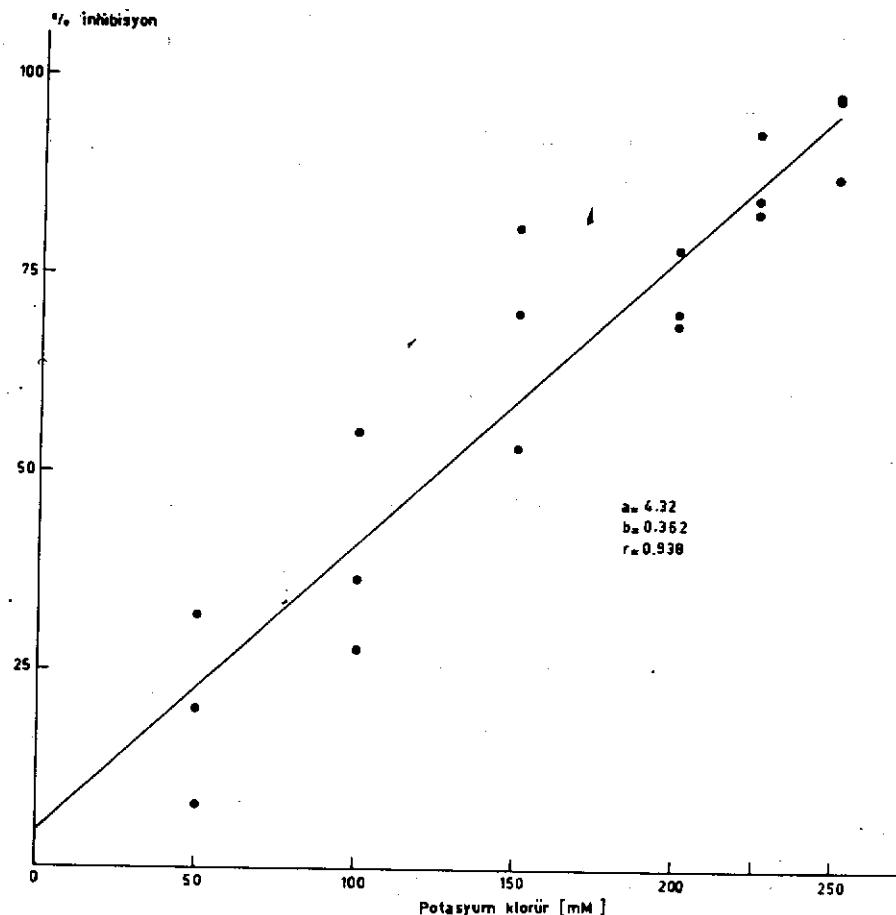
B = Kör deneylere ait tartım farkları aritmetik ort.

C = Kontrol deneylere ait tartım farkları aritmetik ort.

BULGULAR

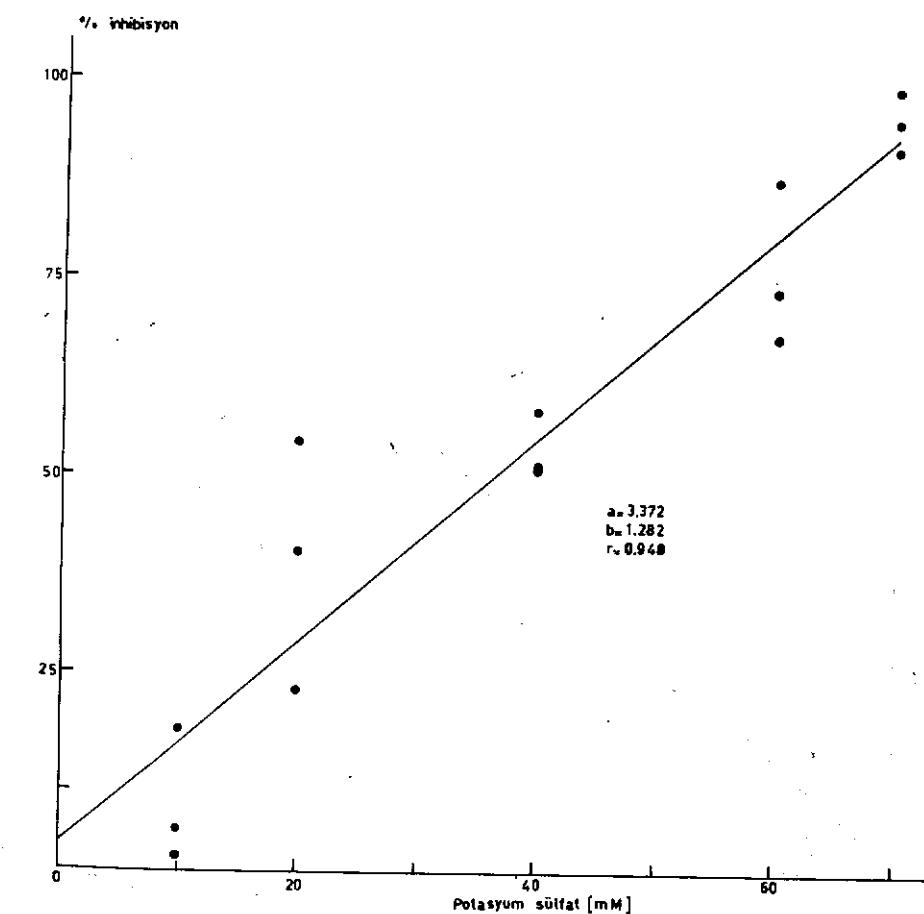
Farklı konsantrasyonlarda çeşitli potasyum tuzlarının elastaz aktivitesini değişik derecede inhibe ettiği saptanmış ve çalışmamızın sonuçları Şekil 1-4 de toplu olarak sunulmuştur.

I. Farklı konsantrasyonlardaki potasyum klorür ile yapılan deneylerde, 50 mM KCl % 20.38 inhibisyon, 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 inhibisyon'a 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.



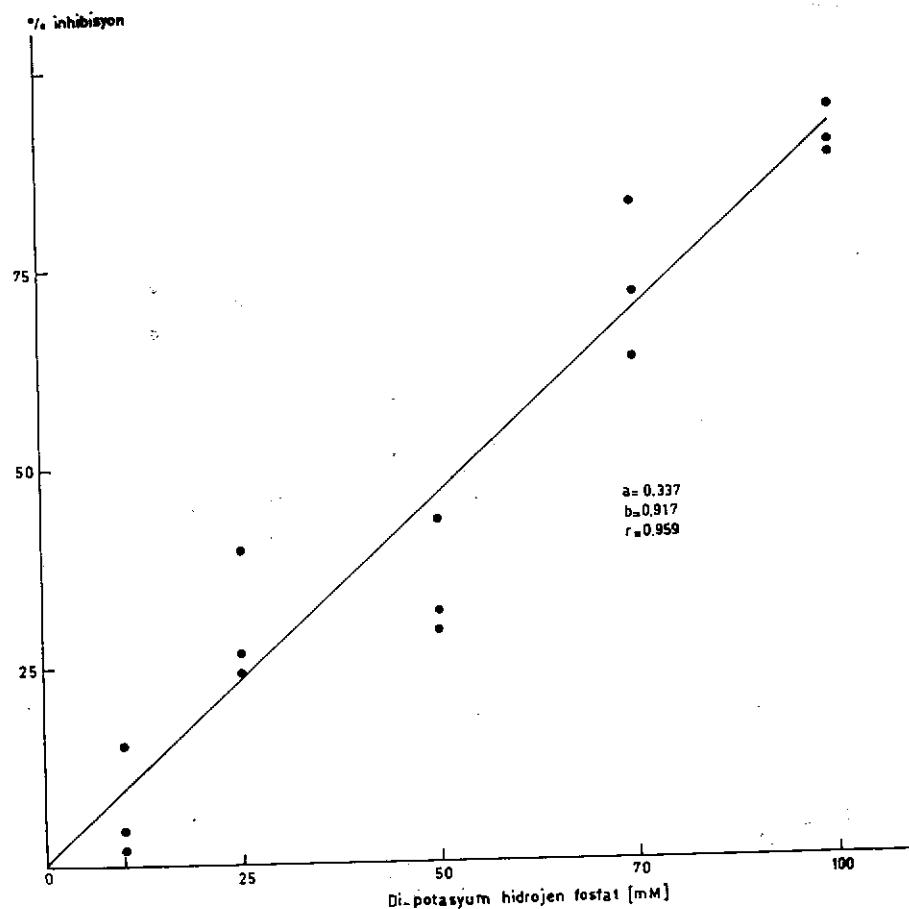
Şekil 1. Ortama katılan potasyum klorür konsantrasyonu ile inhibisyon yüzdesi arasındaki ilişki.

II. Potasyum sülfat'ın elastaz aktivitesi üzerine inhibitör etkisi araştırıldığından; 10, 20, 40, 60 ve 70 mM K_2SO_4 'nın 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:



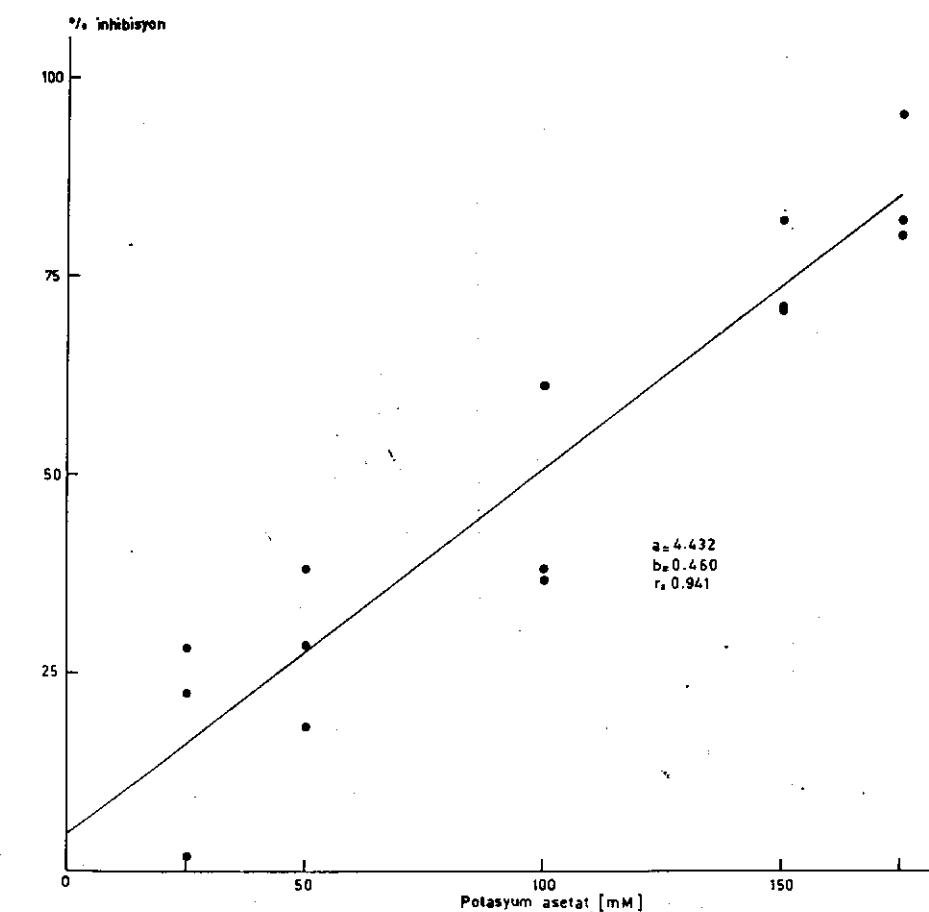
Şekil 2. Ortama katılan potasyum sülfat konsantrasyonu ile inhibisyon yüzdesi arasındaki ilişki.

III. 10, 25, 50, 75 ve 100 mM di-potasium 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 K₂HPO₄ 0.05 den büyük (P) değeri verdiginden, bu konsantrasyonda oluşan inhibisyon anlamsız bulunmuştur. Buna karşın 25 ve 50 mM K₂HPO₄ anlamlı; 75 ve 100 mM K₂HPO₄ ise ileri derecede anlamlı bir inhibisyon göstermiştir. Di-potasium hidrojen fosfat'ın inhibisyon eğrisi Şekil 3'de gösterilmiştir.



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

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

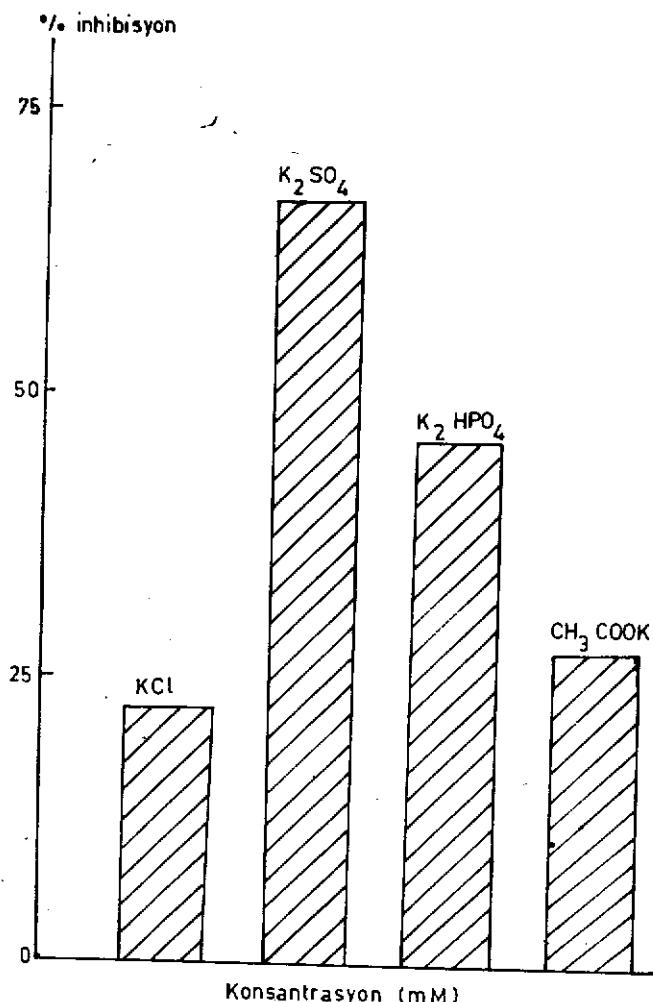


Şekil 4. Ortama katılan potasium asetat konsantrasyonu ile inhibisyon yüzdesi arasındaki ilişki.

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-potasum hidrojen fosfat'ın inhibitör etkisi, potasyum sülfat'a oranla daha düşük fakat, potasyum asetat ve potasyum klorür'e göre daha yüksektir. 70 mM K_2SO_4 'nın oluşturduğu inhibisyon oranı ancak 100 mM K_2HPO_4 ile elde edilebilmektedir.

c. Potasyum asetat'ın inhibitör etkisinin potasyum sülfat ve di-potasum 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 vermemiştir, etkisinin NaCl'e benzediğini bildirmiştirlerdir. Bizim çalışmamızda ise 70 mM KCl'ün % 23 oranında inhibisyonaya 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-potasum hidrojen fosfat ve potasyum sülfat'ın oluşturukları inhibisyon oranları sırasıyla, % 23, % 27.5, % 46, % 67 dir (Şekil 5).

Görülüyör 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.: *Elastolizin doymuş sodyum karbonat veya sodyum klorür eriyikleriyle verdiği bulanıklığın spesifik bir elastolizat reaksiyonu olarak değeri.* İst. Tıp Fak. Mecm., **26**, 215-227, 1963.