

BAZI AĞIR METAL TUZLARININ ELASTOLİZ ÜZERİNE ETKİLERİ

Ahmet AKER

Edirne Tıp Fakültesi, Biokimya Kürsüsü
Fatih - İstanbul

ÖZET

Sığır pankreas elastazının aort elastinini sindirme özelliği (elastoliz) üzerine ağır metallerin inhibitör etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, kadmiyum, cıva ve gümüşün, suda çözünen çeşitli tuzları kullanılmıştır. Kadmiyum, kadmiyum klorür, kadmiyum nitrat, kadmiyum asetat ve kadmiyum sülfat; cıva, cıva-II - klorür ve cıva-II - asetat; gümüş ise, suda çözünebilen tek tuzu gümüş nitrat ile denenmiştir.

Elde edilen bulgulardan,

- 1 — Denenen her üç metalin de elastolizi inhibe ettiği saptanmıştır.
- 2 — İnhibisyon gücü, bu metaller arasında cıva > gümüş > kadmiyum sırasını izlemektedir.
- 3 — Ağır metal yanında, kullanılan anyon türünün de inhibisyonda etkili olduğu gözlenmiştir.

GİRİŞ

Bir endopeptidaz olan pankreatik elastaz, öteki endopeptidazlardan farklı olarak, elastin üzerine güçlü bir sindirim etkisi gösterir. Pankreatik elastazın bu elastolitik aktivitesiyle ilgili ilk bilgiler, yüzyl kadar önce verilmiştir^{1,2}. Ancak, 1949 yılında Banga ve ark. tarafından elastazın, pankreas ekstraktından izole edilmesiyle bu enzim üzerine ayrıntılı bilgi edinme olanağı doğmuştur⁴. Daha sonraları, bir yandan enzimin yapısı, fiziksel ve kimyasal özellikleri araştırılırken^{8,9,10}, öte yandan, elastaz-elastin ilişkisinin klinik değeri belirlenmeye çalışılmıştır^{1,2,5,6}. Elastazın, elastin için spesifik bir enzim olduğu kesinlikle belirdikten sonra, bu ilişkinin ortam koşullarındaki değişmelerle nasıl etkilendiği araştırılmış, değişik iyonların inhibitör ve aktivatör

etkileri incelenmiştir. Bu konuda Lewis ve ark.ının yaptığı çalışmalar önemli yer tutar¹⁰.

Ağır metallerin enzimlerle ilişkileri, ötedenberi araştırılan bir konudur. Olanaklarımız ölçüünde yaptığımdır literatür taramasında, 1960 yılında Mandl ve Cohen'in, gümüş nitrat, cıva klorür ve kadmiyum asetatın, *Flavobakterium elastazı* üzerine inhibitör etkilerini araştırdıkları bir çalışmaya saptayabildik¹¹. Bakteriyel elastazın, pankreatik elastazdan birçok özellikleri açısından farklı olduğu göz önüne alırsak, Mandl ve Cohen'in bulgularından pankreatik elastaz ile ilgili sonuçlar çıkarmanın olanaksızlığı görülür. Bu nedenle, çalışmamızın pankreatik elastazın elastini sindirimi üzerine yapılan çalışmalara bir katkısı olacağına inanıyoruz.

YÖNTEM VE GEREÇLER

I — Tamponlar

1. Asetat tamponu : pH 4.7

3.85 g Amonyum Asetat 800 ml destile su içinde çözüldü, bu çözelti %3 Asetik Asid ve destile su ile pH 4.7 olacak şekilde 1000 ml'ye tamamlandı.

2. Karbonat - HCl Tamponu: pH 8.8, iyonik kuvvet 0.05³.

23 ml 0.1 M Na₂CO₃, 20 ml 0.1 N HCl alınarak destile su ile 86 ml'ye tamamlandı. Bu tampon kullanulmadan önce destile su ile 1:1 oranında seyreltildi.

II — Elastin eldesi

Elastinin saflaştırılması, Banga ve ark. larınca uygulanan NaOH ile kaynatma yöntemi temel alınarak yapıldı³.

Tunica adventitiaları disseke edilerek temizlenen taze sığır aortları kıyma haline getirildi. Önce aseton sonra dietil eter ile bir kaç saat çalkalandı. Böylece yağı ve suyu uzaklaştırılan aort parçacıkları kurutulup, toz haline getirildi. Bu toz, 0.1 N NaOH ile bir saat 98 °C de ısıtılarak hidroliz ile kollajen ve öteki proteinler ortamdan uzaklaştırıldı. Karışım santrifüj edilerek elastin çöktürüldü. Saflaştırma işlemi tamamlanan elastin, kurutularak toz toz haline getirildi. +4 °C de saklandı.

III — Elastaz eldesi

Elastaz, Grant ve Robbins'in bildirdiği⁷ Yenson ve ark.larınca değiştirilen yöntemle¹³ elde edildi.

Makroskopik olarak disseke edilen taze sığır pankreasları, yıkamış, kıyama makinasından geçirildi. Önce asetonla, sonra dietil eter ile bir kaç saat çalkalanıp süzüldü. Yağı ve suyu uzaklaştırılan pankreas parçacıkları kurutulup toz haline getirildi. Aynı işlemler uygulanarak taze bulbus duodenilerden sağlanan 1.25 g duodenum tozu, 12.5 g pankreas tozu ve 1 g NaCl, 500 ml asetat tamponu içinde karıştırılıp, 5 saat süre ile 15°C de çalkalandı. Santrifüj edildi, üst sıvı 96° etanol ile çöktürüldü. Çökelti kurutulup toz haline getirildi ve +4°C de saklandı. Çalışmadan hemen önce bu tozdan alınarak %0.9 NaCl içinde 25 mg/ml olacak şekilde suspansiyonlar hazırlandı, santrifüj edildi. Üst sıvı elastaz ekstresi olarak kullanıldı.

IV — Deneyler

1. Deneylerin hazırlanması

Deneyleerde, Banga ve ark.larının uyguladığı gravimetrik yöntem⁵ esas almıştır.

a) Kör deneyler: Tüplere 20 mg elastin, 4.5 ml karbonat-HCl tamponu ve 0.5 ml destile su konuldu.

b) Kontrol deneyleri: Tüplere 20 mg elastin, 4.5 ml karbonat-HCl tamponu, 0.3 ml destile su ve 0.2 ml elastaz konuldu. Elastazın sindirdiği elastin miktarı, kör deney sonuçları göz önünde tutularak saptandı. Bulunan değerler %100 elastaz aktivasyonu olarak alındı.

c) İnhibisyon deneyleri: Elastoliz üzerine etkileri araştırılacak ağır metal tuzlarının destile su ile 30 mM'lik ana çözeltileri hazırlandı. Bunlardan, istenilen konsantrasyon sağlanacak şekilde seyreltmeler yapılarak çalındı. Tüplere 20 mg elastin, 4.5 ml karbonat-HCl tamponu, 0.3 ml metal tuzu çözeltisi ve 0.2 ml elastaz konuldu.

2. Deney işlemi

Bütün tüpler boş olarak sabit tartıma getirilip tartıldı. Daha önce anlatıldığı şekilde hazırlanan kör, kontrol ve deney tüpleri, 37°C deki su banyosunda bir saat, ara sıra çalkalanarak tutuldu. Böylece elastazın elastin üzerine etkisi sağlandı. İnhibisyon tüplerinde ağır metal hidroksidlerinin

oluşturduğu bulanıklık kayboluncaya dek ortama, 0.1 N HCl katıldı ve pH saptandı. Böylece, sindirimmemiş elastinle birlikte, hidroksid çökeltisinin de tartılmasından doğacak yanlış değerlendirme önledi. Kör ve kontrol tüpleri 0.1 N HCl ile, aynı pH'ya getirildi. Tüpler santrifüj edildi, üst sıvı atıldı. Çökelti 5 ml 96°C etanol ile yıkarak yeniden santrifüj edildi. Üst sıvı dışarı alındı. Bütün tüpler sabit tartıma getirilerek elastolizden kurtulan elastin miktarı tartıldı ve ilk konulan mikardan çıkartıldı. Elde edilen değerlerden kör deneylerdeki kayıp çıkartılıp, inhibisyon oranları,

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

*I ± İnhibisyon

A : İnhibisyon deneylerine ait tartım farkları aritmetik ortalaması

B : Kör deneylere ait tartım farkları aritmetik ortalaması

C : Kontrol deneylerine ait tartım farkları aritmetik ortalaması

BULGULAR

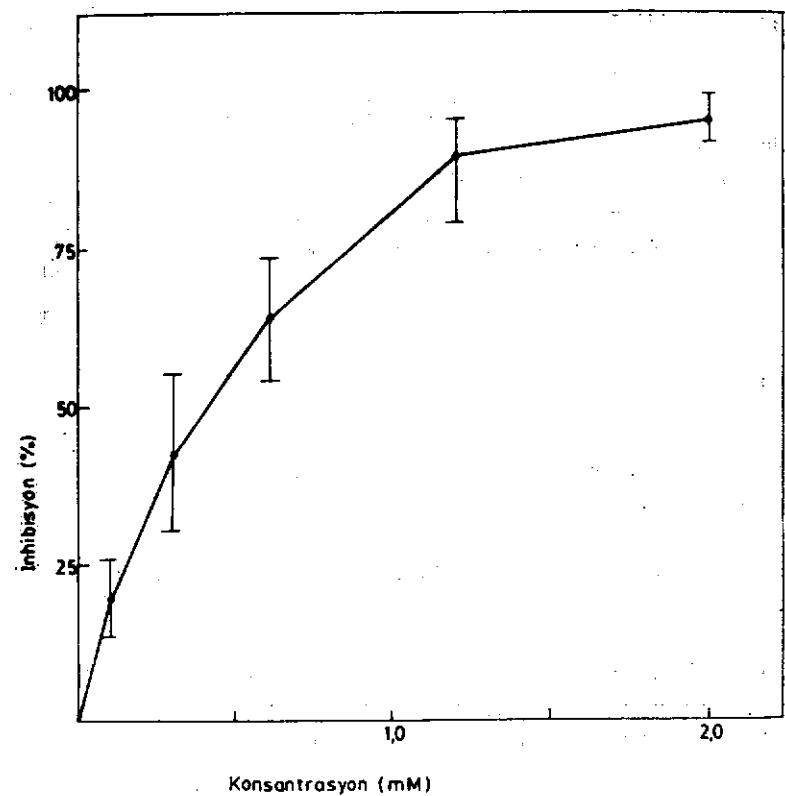
Bu çalışmada, kadmiyum, cıva ve gümüş tuzlarının elastoliz üzerine inhibitör etkileri araştırıldı.

1 — Kadmiyumun, -sülfat, -klorür, -nitrat ve -asetat bileşikleri ile çalışıldı.

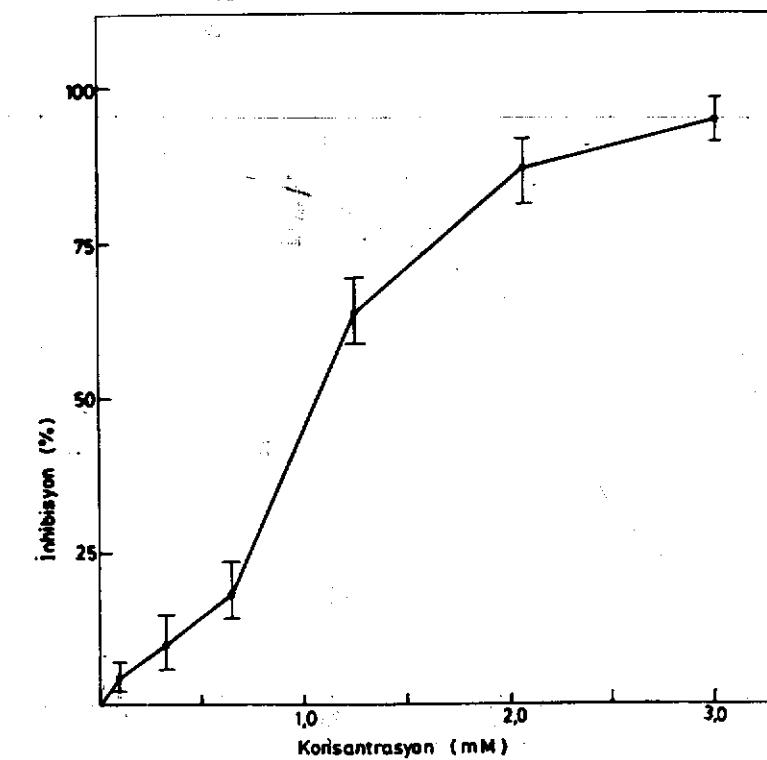
a) Kullanılan deney koşullarında kadmiyum sülfat ile sağlanan inhibisyon, 0.1 mM'da %18.7, 0.3 mM'da %42.46, 0.6 mM'da %65.12, 1.2 mM'da %90.62 ve 2.0 mM'da %94.94 olarak saptandı (Şekil: 1).

b) 0.1, 0.3, 0.6, 1.2, 2.0 ve 3.0 mM konsantrasyonlarda denenen kadmiyum klorür ile sırasıyla, %4.64, %11.44, %18.9, %62.29, %83.34 ve %94.78 oranlarında inhibisyon görüldü (Şekil: 2).

Şekilden de izlenebileceği gibi, kadmiyum klorür ile değişik konsentrasyonlarda sağlanan inhibisyonda, 0.6 mM konsantrasyonda sağlanan %18.9 değeri, 1.2 mM değerine çıktıığında %62.29 gibi çok büyük bir artış göstermektedir.

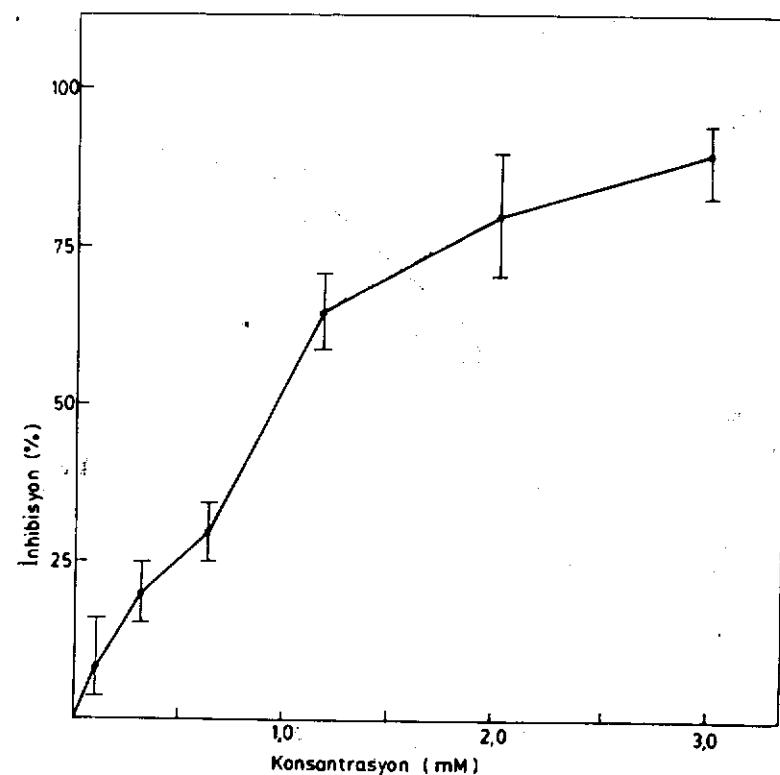


Şekil : 1 Kadmiyum sülfatın her konsantrasyon için bulunan ortalama inhibisyon değerleri ile çizilen inhibisyon eğrisi.



Şekil : 2 Kadmiyum klorürün her konsantrasyon için bulunan ortalama inhibisyon değerleri ile çizilen inhibisyon eğrisi.

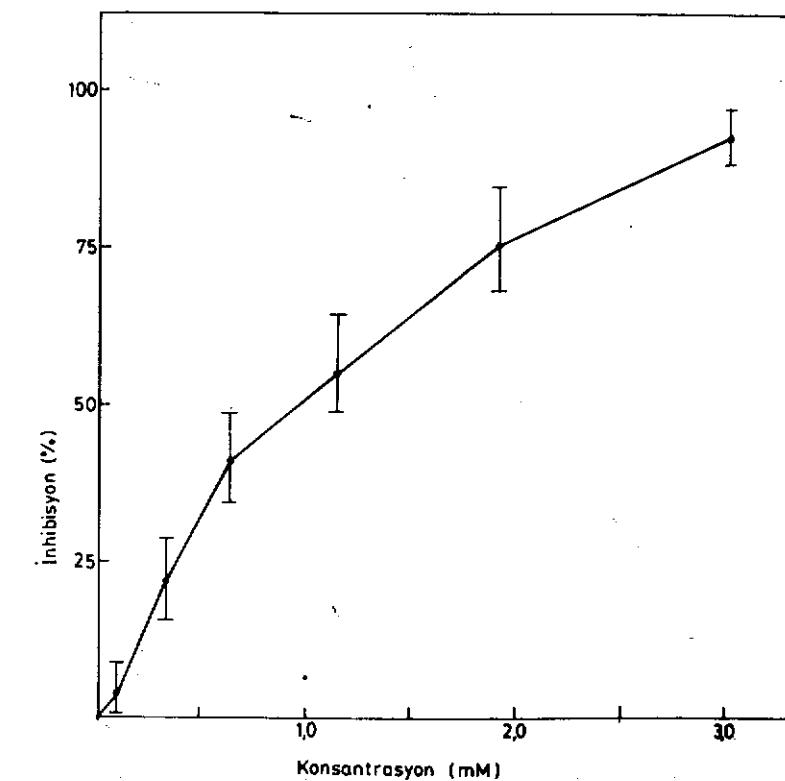
c) Kadmiyum nitrat, 0.1 mM'da %7.72, 0.3 mM'da %20.3, 0.6 mM'da %30.24, 1.2 mM'da %65.12, 2.0 mM'da %79.78 ve 3.0 mM'da %90.74 inhibisyonu neden oldu (Şekil : 3). Burada da en büyük inhibisyon artışı, 0.6 mM konsantrasyondan 1.2 mM konsantrasyona çıktıığında görülmekte ve %30.24 değerinden %65.12 değerine yükselmektedir.



Şekil : 3 Kadmiyum nitratın her konsantrasyon için bulunan ortalama inhibisyon değerleri ile çizilen inhibisyon eğrisi.

d) Kadmiyum asetatin 0.1, 0.3, 0.6, 1.2, 2.0 ve 3.0 mM konsantrasyonlarda elastaz aktivitesi üzerine yaptığı inhibisyon ise, sırasıyla, %3.6, %21.64, %41.16, %56.1, %75.4 ve %92.52 dir (Şekil : 4).

Konsantrasyonlar arasındaki inhibisyon artışlarını incelediğimizde, konsantrasyon yükseltildikçe, görülen inhibisyon değerlerinin, dengeli bir şekilde arttığını, bir konsantrasyondan ötekine çıktıığında, inhibisyonda çok büyük artış olmadığını gördük.

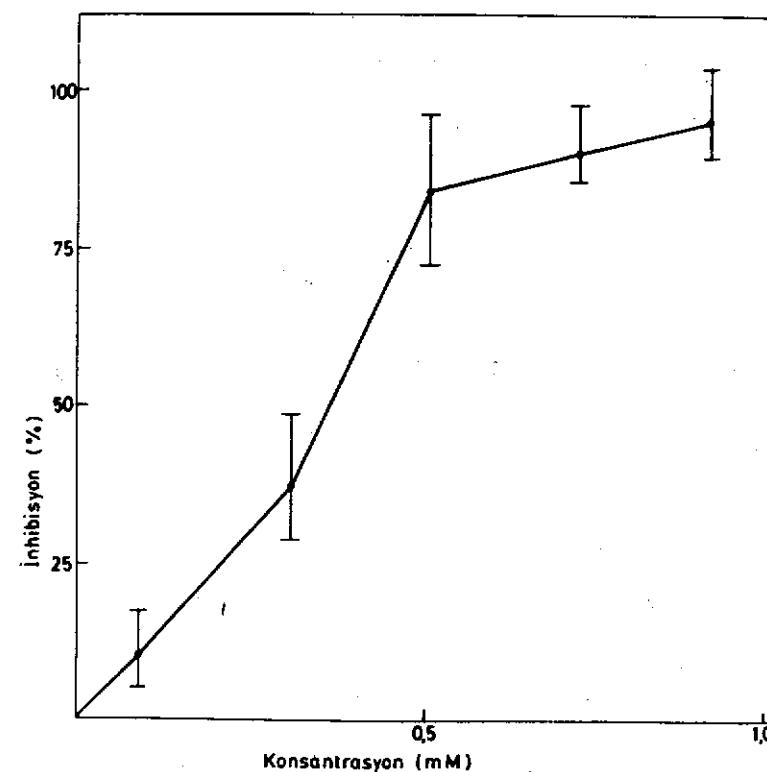


Şekil : 4 Kadmiyum asetatinin her konsantrasyon için bulunan ortalama inhibisyon değerleri ile çizilen inhibisyon eğrisi.

2 — Denenen ikinci ağır metal, civa, civa-II-klorür ve civa-II-asetat tuzları şeklinde kullanıldı.

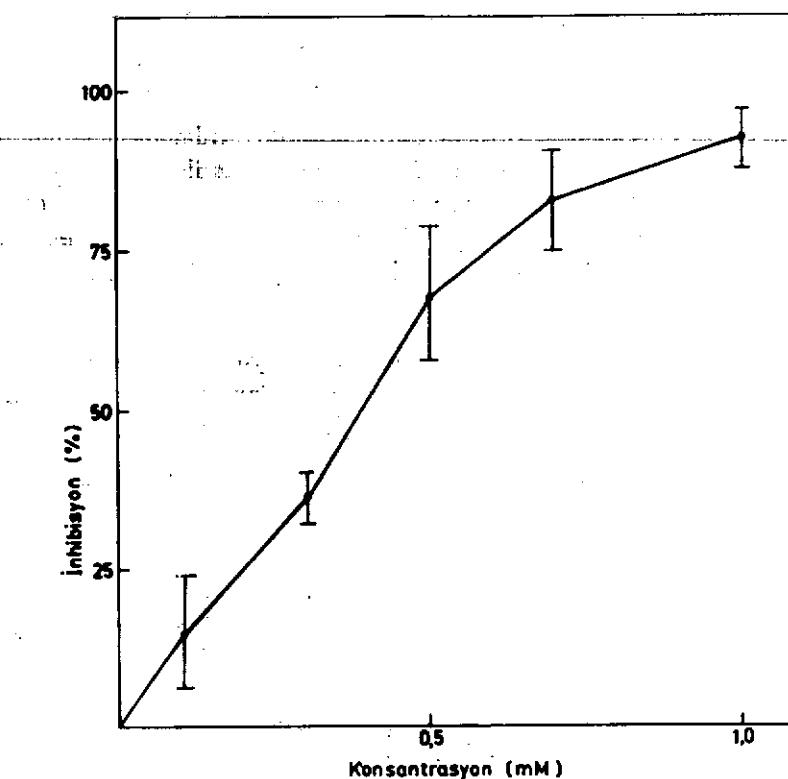
a) Civa-II-klorür, elastaz aktivitesi üzerine güçlü bir inhibisyon gösterdi. 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 ve 0.9 mM konsantrasyonlarda saptanan inhibisyon değerleri, sırasıyla, %10.84, %34.96, %82.16, %90.3 ve %95.14 oldu (Şekil : 5).

Civa-II-klorür ile sağlanan inhibisyonda en büyük artış, görüldüğü gibi 0.3 mM konsantrasyondan, 0.6 mM konsantrasyona çıktığında oldu ve %34.96 dan %82.16'ya yükseldi.



Şekil : 5 Civa - II - klorürün her konsantrasyon için bulunan ortalama inhibisyon değerleri ile çizilen inhibisyon eğrisi.

b) 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 ve 1.0 mM konsantrasyonlarda denenen civa-II-asetatin, civa-II-klorüre benzer bir etkisi olduğu gözlandı. Saptanan inhibisyon değerleri sırasıyla, %15.34, %34.0, %65.52, %84.12 ve %93.48 olup, 0.3 mM'daki %34.0 inhibisyonundan 0.5 mM'da %65.52 değerinde ulaşılması dikkat çekici bulundu (Şekil : 6).



Şekil : 6 Civa - II - asetatinin her konsantrasyon için bulunan ortalama inhibisyon değerleri ile çizilen inhibisyon eğrisi.

3 — Gümüş nitratın 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ve 2.5 mM konsentrasyonları ile çalışıldı. İnhibisyonun, 0.1 mM konsantrasyonda %10.72 gibi bir değere ulaştığı görüldü. 1.0 - 1.5 mM konsantrasyonlar arasında büyük bir artışla inhibisyon, %26.76 dan %68.8 e yükseldi. Bu konsantrasyonlar arasındaki değişiklik, çok anlamlı bir yükselmeyi vurgulamaktadır.

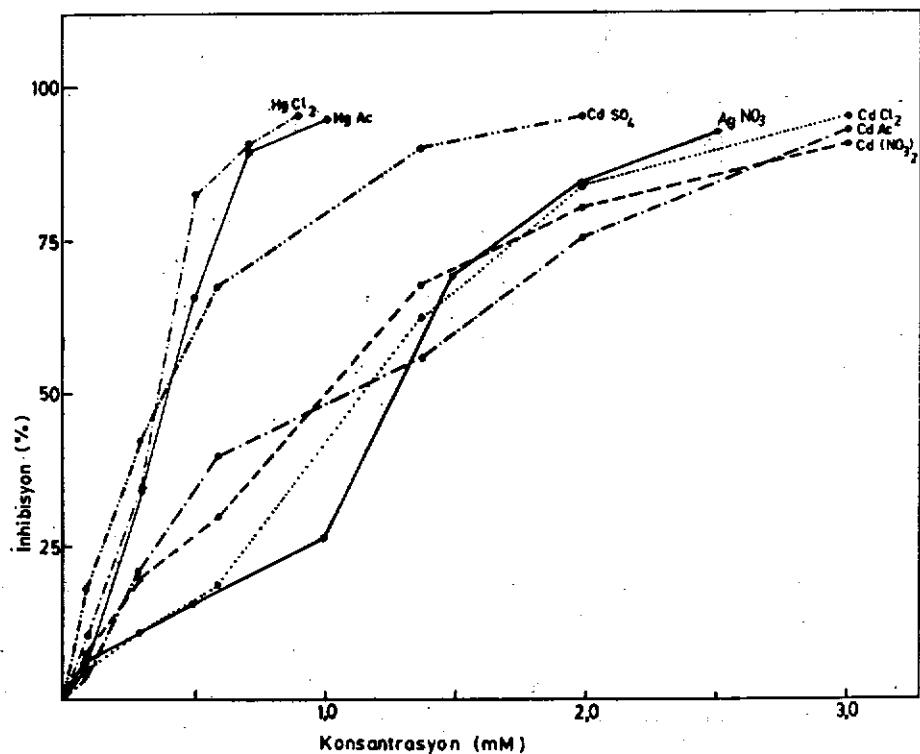
İnhibisyon, 2.0 mM'da %84.02, 2.5 mM'da %91.76 değerlerine ulaşmaktadır.

İRDELEME VE SONUÇ

Elastoliz üzerine inhibitör etkileri incelenen ve değişik anyonlar içeren cıva, kadmiyum ve gümüş tuzları, farklı inhibisyonlara yol açmaktadır.

Kadmiyumun dört değişik tuzu ile görülen inhibisyonlar incelendiğinde, enzim inhibisyonunun, en güçlü olarak kadmiyum sulfat ile sağlandığı saptandı. 2.0 mM konsantrasyonda kadmiyum sulfat ile varılan noktaya (%95 inh.), kadmiyum asetat ve kadmiyum klorür ile 3.0 mM konsantrasyonda yaklaşıldığı, kadmiyum nitratın ise 3.0 mM'da %90.74 inhibisyon ile en düşük düzeyde kaldığı görüldü.

Cıva-II-klorür ve cıva-II-asetatinin yaptığı inhibisyonlar kıyaslandığında, yüksek konsantrasyonlara gidildikçe aralarında anlamlılık derecesi artan bir fark olduğu ve cıva-II-klorürün daha güçlü inhibisyon yaptığı saptandı.



Şekil : 7 Çeşitli kadmiyum, cıva ve gümüş tuzlarının elastoliz üzerine inhibitör etkilerinin kıyaslanması.

Ağır metallerin değişik tuzları ile görülen inhibisyonların anyonlarla ilişkisine açıklık getirmesi yönünden, aynı anyonu kapsayan ağır metal tuzlarının aynı konsantrasyonda yaptıkları inhibisyonlar kıyaslandı. Bu inceleme sonucu vardığımız kamı, her üç ağır metalin de, anyonlara bağlı olmaksızın, farklı inhibisyonlar yaptıkları şeklindedir. Ancak, kadmiyum ve cıvanın değişik anyonlar kapsayan tuzlarının, aynı konsantrasyonlarda farklı inhibisyon değerleri göstermeleri, inhibisyonda anyonların da etkili olduğunu düşündürmektedir (Şekil : 7).

SUMMARY

EFFECTS OF SOME HEAVY METAL SALTS ON ELASTOLYSIS

Bovine pancreatic elastase is known to produce elastolytic activity on aorta elastin. In this study we have investigated the inhibitor effects of heavy metal ions including cadmium, mercury and silver. Water soluble chloride, nitrate, acetate, sulfate salts of cadmium, chloride, acetate salts of mercury and nitrate salt of silver were employed.

Cadmium, mercury and silver ions effectively inhibited elastolysis in the order of $Hg > Ag > Cd$. The type of anion in the water soluble salts of these metals modified the degree of inhibition.

KAYNAKLAR

- 1 — BANGA, I. ve SCHULER, D.: Contributions to the structure of elastin with special reference to the action of elastase. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 4, 13-24, 1953.
- 2 — BANGA, I., SCHULER, D. ve LASZLO, J.: Change of elastase inhibitor in the blood of ammonium hydroxide treated rabbits. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 1-6, 1954.
- 3 — BANGA, I., BALO, J. ve HOWARTH, M.: Nephelometric determination of elastase activity and method for elastolytic measurement. *Biochem. J.*, 71, 544 - 551, 1959.
- 4 — BALO, J. ve BANGA, I.: Elastase and elastase inhibitor. *Nature*, 164, 491, 1949.
- 5 — BALO, J. ve BANGA, I.: Change in the elastase content of the human pancreas in relation to arteriosclerosis. *Acta. Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 13, 188-193, 1953.
- 6 — BUNEAUX, J. J., BUNEAUX, F. ve FABIANI, P.: Dosage automatique de l'activité élastasique et de la capacité d'inhibition élastasique du sérum. *Ann. Biol. Clin.*, 35, 125 - 131, 1977.
- 7 — 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).
- 8 — HARTLEY, B. S. ve SHOTTON, D. M.: *Pancreatic elastase. The enzymes*. Vol. 3, (BOYER, P. D. ed.), Academic Press, 3.ed. New York, London, 1971, s.323 - 375.

172 AKER - BAZI AĞIR METAL TUZLARININ ELASTOLİZ ÜZERİNE ETKİLERİ

- 9 — LAMY, F., CRAIG, C. P. ve TAUBER, S.: *Studies on elastase and elastin. I. Assay and properties of elastase.* J. Biol. Chem., **236**, 86 - 91, 1961.
- 10 — LEWIS, U. J., WILLIAMS, D. E. ve BRINK, N. G.: *Pancreatic elastase: Purification, properties and function.* J. Biol. Chem., **222**, 705-720, 1956.
- 11 — MANDL, I. ve COHEN, B. B.: *Bacterial elastase. I. Isolation, purification, and properties.* Arch. Biochem. Biophys., **91**, 47-53, 1960.
- 12 — WAELCHLI, G.: *Über die Fäulniss des Elastin und Mucin.* J. Pract. Chem., **17**, 71-78, 1878.
- 13 — YENSON, M., ÖZ, H. ve BABAN, N.: *Elastolizat'ın doymus sodyum karbonat veya sodyum klorür eriyikleriyle verdiği bulanıklığın spesifik bir elastolizat reaksiyonu olarak değeri.* İst. Tip. Fak. Mec., **26**, 215 - 227, 1963.