

# FİZYOPATOLOJİK ve PATOLOJİK OLAYLARIN ŞEKİLLENMESİNDE ENZİMLERİN ROLLERİ VE HİSTO-ENZİMOLOJİK ARAŞTIRMALARIN BU YÖNDEN MEYDANA GETİRDİĞİ YENİLİKLER

İbrahim AYKAÇ(x)

Canlıda şekillenen biokimyasal olayların çok azını invitro ve yerine göre bazı metodlardan yararlanarak invivo olarak tetkik edebilmek imkânına sahibiz. Ancak vital olayların şekillenmesi çok kompleks ve çeşitli faktörlerin kontrolü altında husule gelmektedir. Canlıda husule gelen olaylar Fiziko-kimyasal kanunlara tabidir. En küçük hayat ünitesi alan hücre ve ondan meydana gelen doku, organ ve sistemlerde hayat hadiselerini doğuran ve onları regüle eden ürünlerin başında enzimler gelir. Araştırmacıları uzun zamandan beri meşgul eden ve etmesine de devam eden; hormon ve enzim problemleri hakkında bu gün için söz henüz söylenmiş değildir.

Bilindiği üzere canlı hücreler, çekirdek ve stoplazmalarının metabolizmaları için lüzumlu olan enzim veya fermentleri ihtiva etmeleri lazımdır. Enzimlerin bir kısmı hücreden dışarı atılarak metabolizmanın husülüne yardım ederler (sindirim sistemi enzimlerinde olduğu gibi). Bu enzimlerin hücre içindeki aktivitelerini stoplazmanın bir bölümünde doze etmek yahut tek bir yumurta hücresinde solunum mekanizmasını ölçmek mikromanometrik teknik ile imkân dahiline gir-

miştir. Ayrıca, hücrenin yapısına giren kısımların sentrifugasyon metodları aracılığı ile izolesiyle üzerlerinde gerekli biyokimik araştırmaları yapabilmek imkânı da mevcuttur (4,5).

Son 20 sene içinde histo-enzimatik ve histo-şimik metodlardan yararlanarak birçok enzimler meydana çıkarılmıştır. Malum olduğu üzere enzimler vücutta biokatalizör vazife gören bileşikler olup, kendi başlarına ve yavaş seyreden reaksiyonların çabuklaştırılmasında önemli rol oynarlar.

Enzimlerin Histo-Şimik özellikleri

Çok nadir hallerde ve bazı enzimler müstesna invivo olarak ancak onların aktivitelerini meydana çıkarabiliyoruz. Direkt olarak immunolojik yahut imminohisto-şimik metodlar ile tefrik edebilmek imkânına sahibiz.

Pankreas enzimleri için chymotripsinogene, ribonuclease ve desoxyribonuclease ile diğer bazı enzimleri, yapılarında mevcut bazı radikallerden (-SH ve S-S) yararlanarak mevcudiyetlerini ortaya koyabilmekteyiz. Bunun dışında histo-şimik olarak pankreasın dış salgı bezleri ve midenin esas hücrelerinde bulunan triptofandan yararlanmaktadır. Enzimler protein tabiatında kataliza-

törlerdir. Bazıları basit, bazıları ise konjuge proteinlerden yapılmıştır. Protein yapısında olanlarına sıkı bir tarzda bağlanmış ve protein olmıyan grupları ihtiva eder. Canlıdaki enzimler iki halde bulunurlar. Birinci halde lyoenzim (suda ve sulu alkolde eriyen), ikinci halde ise hücrede mevcut elementlere bağlanmış ve soluble olmıyan desmoenzim tipindedirler.

Şu hususu hatırdan çıkarmamak lazımdır ki, birçok enzimler bazan aynı bir substrata etki yapabildikleri gibi, bunun tersi olarak, bir enzimin bir çok etkileri olabilir. Enzimatik araştırmalarda üzerinde dikkatli durulması gereken özelliklerin başında, enzimatik aktivitenin muhafazası ve hakiki lokalizasyonlarının belirtilebilmesidir. Hücre içindeki enzim'ler ya çekirdek veya sitoplazmada, bazan da her ikisinde yerleşik olurlar. Stoplasmada lokalize olanlardan bazıları mitokondrialarda (suksindehidrogenase ve cytochrome oxydase), bazıları ise submikroskopik metodlarla ancak tefrik edilebilen lysosomlarda (hidrolitik enzimler) lokalize olmuşlardır. Bu hallerin dışında, dış salgı bezlerinde ve lökositlerde olduğu gibi stoplasmada, serbest granüller halinde akkümüle olurlar. Enzimatik araştırmalarda önem verilmesi gereken bir husus, pH ve ısı derecesinin iyi bir şekilde regülasyonudur. Enzimlerin denatüre olmamaları için ısının optimal seviyede olması gerekir. Buna karşılık enzimler soğuktan etkilenmezler ve bu ortamda reversibilite gösterirler.

Enzimlerin çeşitli klassifikasyonları yapılmış, ancak biz bu konu üzerinde durmıyacağız.

### Enzimlerin çalışma ortamı

Enzimlerin doku veya hücre içinde belirtilmesi için başlıca üç metod'tan yararlanılmaktadır. 1- Fosfat, karbonat gibi bir anyon substratının Ca ve Pb gibi metaller ile kombine olarak erimez hale gelmesi esasına istinat eder ki bu durumda meydana gelen nihai mahsul kobalt veya kurşun sülfür halinde belirir. Mesela alkali fosfatase'ların belirtilmesi için baş vurulan Gomori metodu bu esasa istinat eder.

2.ci metod: Azoik boyalar metodudur (Menten, Jung ve Green, Seligman ve arkadaşlarının) ortaya koydukları metod'tur. Reaksiyonun mekanizması; enzimin diazonium tarafından zaptedilmesi ve onun nihai şekli olarak azoik bir boya renginde boyanarak erimez hale gelmesine istinad eder. Bu metod'ta insoluble olan bir naphtol bileşiğinden faydalanılmak ve onu takiben diazonium ile muamele edilerek azoik bir rengin meydana çıkmasıyle enzimlerin verifikasyonu yapılmaktadır.

3.cü metod: Oksidasyonu temin eden indolik bir derivenin kullanılmasıyle çividimsi (indigoide) bir renkte enzimlerin belirtilmesine yarıyan metod'tur.

Bu metodlarla hidrolase'lar grubuna dahil fosfatase'lar ile karboksil esterase'lar açığı çıkarılabilmektedir.

### Enzimlerin inkubasyonları

Enzimler protein yapısında oldukları için, onların denatürasyonları, şimik yapılarında bazı değişikliklerin meydana gelmesine sebep olur. Bunun sonunda enzimlerin aktivasyon özellikleri inhibisyona uğrar. Metal iyonlarını ihtiva eden enzimler, iyonlarla

birleşerek inhibisyona uğrarlar. Şöyleki: cyanür'ler kültürlü ( $H_2S$ ) hidrojen ve demir ihtiva eden enzimleri, florürler ve oksalatlar ise magnezyum ve kalsiyum ihtiva eden enzimleri inhibe ederler.

Normal metabolik faaliyet esnasında bir çok reaktif olayların hızları, enzimlerin inhibe edilmesi ve inhibisyonun kalkmasıyla regüle edilmektedir. Bunun yanında bazı amin asitlerin, vitamin, pürin ve pirimidin bazlarından faydalanma hali, enzimlerin aracılığı ile husu e gelmektedir. Hatta organizmanın vitalitesinin devamı enzimlerin mevcudiyetine bağlıdır.

Enzimler arasında kristalize edilebilenleri olmuştur. Nitekim Summer 1926 yılında urease enzimini ilk defa kristalize etmeye muvaffak olmuştur. Bunu takip eden çalışmalar sonunda kristalize hale getirilebilen enzim sayısı 50 den fazlayı çıkmıştır. Bu gün için pürifiye edilen enzimler proteik natürde olanlardır. Yani peptidik bağlarla yekdiğerine bağlanmış amin asitlerinden ibaret makromoleküllerdir. Enzimlerin etkisi koenzim yahut koferment adı verilen bazı metabolik iyonların mevcudiyetiyle stimule edilmektedir. Bu faktörün yanında fermenti aktive eden koferment veya biokataliz olayı da mevcuttur ki, buda enzimatik faaliyet proçesinde önemli rol oynar.

Eksperimental çalışmalarla meydana çıkarılan enzimlerin inhibisyon ve stimülasyonları sonunda şekillenen değişiklikler ve bunların metabolik-katabolik olayların husulundeki etkileri

Biokatalizör aktiviteye malik olan enzimlerin inhibisyon veya aktivas-

yon ve hücre içindeki lokalizasyonlarının belirtilmesinde sayısız çalışmalar yapılmıştır. Eksperimental olarak, rat-tusların arteria renalislerine gümüşten bir tel tatbik edilmek suretiyle husule getirilen Hipertonsiyonda, böbrek ve sürrenal korteksinde alkalın fosfatase, suksinohidrojenase, 5-nucleotidase ve asid fosfatase, aktivitelelerinde bir azalmanın şekillendiği görülmüştür. Buna paralel olarak Thionin fosfatasa, Glukoz 1 ve Glukoz-6 fosfatase enzimlerinin böbreğin tubulus contortus proximalislerinde azaldıkları tesbit edilmiştir.

Ancak kolin esterase, ve 5-nucleotidase enzimlerinde normalden yüksek bir aktivasyon tesbit edilmiştir. İnvitro olarak doku kültürlerinde koenzim-A bilişkilerinin krebs çemberinde onun prekürsörü olan pantoteinin önem i belirtilerek, derideki epitel rejenerasyonunu, yani epitelizasyonu aktive ettiğinden mülhem olunarak cornea ülserlerini iyi edici bir etki gösterdiği ve bu amaçla terapötik alanda tatbik imkânı bulunduğ u kaydedilmiştir. Keza pantotenik asidinin alopesia tedavisinde iyi sonuçlar verdiğini, bunun yanında hücre bölünmesinde stimulan bir etki gösterdiği doku kültürleri üzerinde yapılan çalışmalarla ispat edilmiştir (13). Böbrekten doku homojenantlarından izole edilen mitokondriaların, elektronmikroskopik tetkikinde, ATP (Adenosin trifosfatase) enziminin 0,5 molünün bunların dış kompartu-manlarında salgı maddelerini artırıcı bir etki yaptığı, ayrı ca mitokondriaların iç membranlarının diğer membranlardan daha permeable olduğu tesbit

edilmiştir.

Hücrenin sentez faaliyetinin merkezi olarak kabul edilen mitokondriyalarda RNA'nın mevcut olduğu ribonuclease enziminden faydalanılarak meydana çıkarılmıştır. Mitokondriyalarda mevcudiyeti ispat edilen suksindehidrogenase ve cytochrome oxydase enzimlerinden başka, co-enzim desidrogenase dithiolipoique enziminin de mevcut olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan kolinesterase enziminin doku kültürü hücrelerinde bazı hücrelerin perinükleolar bölgesinde ince granüller halinde gruplanmalar gösterdiğini ancak çekirdeksiz olan burjonların distal bölümlerinde kolinesterase enziminin bulunmadığı müşahade edilmiştir (15).

Ayrıca invivo olarak çizgili kaslarda fosfataz aktivitenin Z bandında teripleme gösterdiği de belirtilmiştir (15). İzole edilmiş karaciğer hücreleri nükleuslarında alkalik fosfatase enziminin mevcut olduğu fikri de teyit edilmiştir. Ancak bu enzimin her hücre çekirdeğinde eşit olmayıp, farklı miktarlar halinde bulunduğu görülmüştür. Mitoz fazlarında, özellikle metafaz, ve telofaz peryotlarında intraistoplazmik olarak alkalik fosfatase enziminde bir artma kaydedilmiştir. Hücre içi alkalik fosfatazın, nükleol mitokondriyalarda şekillenip, buradan stoplamaya yayıldığı kanısına varılmıştır.

Enzimatik araştırmalar kromozomlar üzerinde de yapılmış, özellikle kronik myeloid leucemilerin kanından alınan leucocytlerin doku kültürlerinde üretilmesi sonunda 21 çift kromozomlarda Galaktase I-phosphate uru-

diyle-Transferase enziminde bir eksiklik tesbit edilmiştir. Bilindiği üzere bu enzim vücut dahilinde galaktozdan faydalanmayı temin eder. Mongolizmde Galaktase I- Phosphate uradiyle- Transferase enziminde normal hallerde nazaran 50 % bir artma görülür. Erythrocytlerde de galaktokinase enziminde 50% bir artma görülür. Erythrocytlerde de de galaktokinase enziminde % 50 bir artma kaydedilmiştir. Bu farklı durumlar dışında yine mongollarda, lökositlerde, 5-nucleotidase fructase aldolase, fosfatase asit ve lökositlerde de glukose-6- phosphate dehidrogenase enzimlerinde de bir artma müşahade edilmiştir.

Bu hal genetik çalışmalarda, enzimatik çalışmaların yapılması zorunluğunu ortaya koymaktadır. (18)

Enzimler fizyolojik dengenin sabit kaldığı yani şahısların sıhhatte olduğu müddetçe bir harmoni halinde olup bioşimik ve nöro-hormonal denge ile muazene kurarlar. Buna mukabil kongenital veya sonradan kazanılmış hallerde enzimlerde ve hormonal denge ile bioşimik ol aylarda dengesizlik husule gelerek patolojik durum ortaya çıkar. Bu gün için hastalıklı hallerde gerek biopsi ve gerekse vaginal sıvılar üzerinde enzimolojik tetkikler yapılarak hastalıkların teşhisi için yardımcı olmaktadır. Embriyolojik gelişme esnasında şekillenen anomalilerin bazı enzim defektleriyle husule geldiği bugün için anlaşılmıştır. kanın korpüsküler elementlerinden olan eritrocitlerin malik dehidrogenaz ve laktik dehidrogenaz ile karbonik anhidraz, proteolitik enzimleri, peptidaz ve arginase enzimlerini ihtiva ettik-

leri tesbit edilmiştir. Bunların arasında karbonik anhidrase ve katalase, metahemoglobine-reductase enzimleri oksijen ile karbondioksit transportunu temin ederek glukozun parçalanmasında biokatalizatör rol oynarlar. İnsanlarda görülen kongenital metahemoglobinemi hali, metahemoglobino-reductase enzimi noksanlığına bağlı olarak husule geldiği anlaşılmıştır(7). Hemolitik aneminin birinci tipinde genellikle ATP enziminde bir noksanlık mevcuttur.. Sferositer olmayan ikinci tip hemolitik anemide erythrocyt'lerde pyruvate-kinase enzimi noksanlığı meydana gelmektedir. Bugün erythrocytlerde 80 çeşit ve sadece solunma aktivitesi ile ilgili reaksiyon veren enzimlerin mevcut olduğu bildirilmektedir. Trombocytopenie hastalığında enzim defektinin mevcut olmasından ileri geldiği ve bu halde glyceraldehide-phosphohydrogenase ile pyruvatekinase enzimlerinde bir azalma ve ATP de bir düşme hali görülür. Enzimlerin çeşitli metabolik olaylarda oynadıkları rol üzerinde yapılan histo-enzimolojik araştırmalarda, özellikle karaciğer doku kültürü hücrelerinde glikojenden faydalanma ve enerjinin husulü için malik deshidrogenase enzimine ihtiyaç hasıl olduğu sonucuna varılmıştır(12).

Hücre içi enzimlerin verifikasyonunda elektromikroskoptan da yararlanmıştır(11). Bu nevi çalışmalarda, tripsin, ribonuclease, desoxyribonuclease enzimleri üzerinde çalışılarak, bunların hücre içi lokalizasyonları ekzakt bir şekilde tayin edilmiştir. Böbrek tubuli epitelleri üzerinde yapılan Histo-enzimoelektron mikroskopik araştırmalarda, asit fosfatase enziminin proximal tubu-

lus contortus epitelleri içerisinde küçük granüller halinde akkümüle olduğu ve bu akkümülyasyonun lysosomlar seviyesinde toplandığı görülmüştür.

Santral sinir sistemindeki glia hücrelerinde muhtelif dehidrogenase'ların beyaz cevherdeki olygodendroglia ve astrocytlerde değişik bir metabolik aktivite gösterdiği ve bu aktivitenin reaktif olaylar ile ilgili olarak değişmeler gösterdiği tesbit edilmiştir(3,6). Uzun süre su bırakılmış fareler üzerinde yapılan araştırmalarda hipotalamus bölgesinde bir birinden farklı deshidrogenase aktivitesi nörosekresyon fenomeninde bozukluklar tevhit ettiği, halbuki asit fosfatase enzimi çoğunlukla nörosekresyon olayında pozitif bir impuls etkisi gösterdiği müşahade edilmiştir.

Doku kültürlerinde üretilen kas hücreleri üzerinde, tripsin fermentinin çekirdek volumlerinin ve hatta sayılarının artmasına sebep olduğu görülmüştür. Bu fermentin kas hücrelerinde demet teşkil etmeye doğru bir özellik kazandırdığı görülmüştür(2,14). Yine doku kültürleri üzerinde yapılan araştırmalarda laktiko ve malikodeshidrogenase enzimlerinin çoğunlukla enerjitik metabolizmaları kuvvetli olan hücrelerde yerleşme gösterdiği müşahade edilmiştir(17).

Redoks potansiyel düzenlenmesinde hipotalamusun rolü üzerinde yapılan çalışmada kedilerin hipotalamuslarının anterior bölgesi stimule edildikten sonra serom redoks potansiyelini arttırdığı, posterior hipotalamusun ise azalttığı, lateral bölgesinin stimülasyonunun ortada bir durum gösterdiği tesbit olunmuştur(1,9,16).

Hidrolase grubu enzimlerinde, asit ve alkalın fosfatase'ler alkalın bir ortamda özellikle pH 9,2 de çok aktiftirler. Alkalın fosfatase interkinese fazındaki hücrelerde kromozonlarda, mitoz yahut meiose hallerinde çok aktiftir. İnterkinetik fibroblastların ükleoluslarınde de çok fazladır. Osteogenese esnasında normal hallerde sitoplasmada çoğu zaman bulunmayan bu enzim hipertrofiye olan kartilaj hücrelerinde ve osteoblastta bejirmeye başlar. Bu enzimler regenerasyon ve hiperplasiye olaylarının şekillendiği hücrelerde de kantite bakımından artma gösterir, hatta amigdallarda lamina propriada yerleşik lenfositlerin çok katlı yassı epiteli katedip mukoza yüzeyine erişmesi yani migrasyon kapasitesini göstermesi alkalın fosfatase enzimi sayesinde olmaktadır.

Netice itibariyle enzimler gerek in vivo ve gerekse invitro ortamlarda fizyolojik ve patolojik haller karşısında inhibe veya stimule olurlar. Enzim defektleri hereditör ve kromozomal hastalıkların şekillenmesinde, glukolitik ve ve respiratuvar fenomenlerin gelişmesinde

kongenital malformasyonların şekillenmesindeki önemli rolleri yanında, embriyonal gelişme esnasında ve hususiyile piliç embriyonlarından temin edilen materyeller üzerinde yapılan çalışmalarda, aktivasyonlarının belirli bir zaman içinde ve mesela üçüncü haftada husule geldiği tebsit edilmiştir. Araştırmalara göre 4.cü haftada vitellüs kesesinin endodermal hücrelerinde ve aynı zamanda karaciğer, mide, ön ve orta barsak epitellerinde, mezonefroзда mesenkim hücrelerinde, prekartilaginöz blas-tem-

ler ile iskelet kaslarında bazı bölmelerde farklılaşmaya başlarlar. Şu halde embriyonal gelişmede organ ve dokuların enzimatik aktivite belirtileri muntazam ve muayyen bir safhada meydana gelmektedir.

### Bibliografya

- 1- Gession - Fossion A. Tanalp R.: Blocage des enzymes catabolismes le catecholamines et pouvoir vaso-constricteur des dernieres chez le rat Arch, Int. de physiologie et Biochimie. 74: 704 1965.
- 2- Csellik. B. Gerebtzoff M.A Acti vite de lactate deshydrogenase a la jonction myoneurale. C.R. Des seance de la Soc. de Biol. 160: 1966 1968.
- 3- Dimova R. Gerebtzoff M. A.: Reperation de quelques activites deshydrogenasique dans la nevrogylie. C.R. des Seance de la Soc. de Biol. 160: 7 1532 1966.
- 4- Duchesne P.Y.: Quelque aspects histo-enzymologique du systeme hypothalamo-hypophysaire de la souris au cours de la deshydratation. C.R. Des seance de la Soc. de Biol. 162:1629 1968 .
- 5- Eroeale E. Luciano L. : Sur la localisation de la phosphatase acide au microscope electronique j. de microscopie. 2 569 1963.
- 6- Gerebtzoff, MA.: Contribution histochimique a l'etude de la lactate deshydrogenase et des izoenzyme. Path. Biol 16: 601 1968.
- 7- Golden R. All.....: Malathion poisoning with special reference to the effect of cholinesterase inhibition on

erythrocyte survival. The New England J. of. Med. 271 1289 1964.

8- Govarts, A.: Chromosomes humanis et enzymes . Bruxelles-Med.. 347, 1965.

9-Göksan, T. : Neurosecretion'un muhtelif fizyolojik hallerle ilgisinin histolojik olarak araştırılması. Deniz Tıp Bülteni, V, 1, 1959.

10- Heusghem, C. , Gielen, J., Oger A.: Acquisitions recentes en enzymologie chimique. Rev. Med de Liege. XIX: 822, 1964.

11- İzard, J.; Barre, C.: Quelques problemes peses par l' action enzymatique sur les ultrastructures cellulaires. Bull. de L'asoc. des Aeat. XLVIII. Reunios (Toulouse) 1 5-19 Avril, 791,1962.

12- Lageron. All.....: etude comparee des certaines reactions enzymatique et de l'incorporation desr thymidine tritiee dans les hepatocytes

en culture . C.R. Acad. Sc. Paris 263 1156 1969.

13.- Lennes G. , Basleer, R.,: Le test de linearite des syntheses nucleaires premitotique. Path. Biol. 17: 679, 1969.

14- Matagne, D.F.: Effets de la tryptin sur des elements musculaire de rat cultives in vitro. C.R. des Seance de la Soc. de Biol. 162., 1860 1862,18968.

15- Reznec, M., Activite cholinesterasique du muscle strie ischemie. C. R. des Seance de la soc. Biol. CLVI, 1207, 1962.

16- Tanalp, R.: Redokspotans iyce düzenlenmesinde hipotalamusun rolü. A Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 11: 580, 1964.

17- Vendrley, C., Lageron, A., Tournier, P.,: Etude des differentes phases du cycle de generation des cellules en culture. Bull. Cancer. 55:31, 1968