

**PRİMER AKCİĞER KANSERLİ HASTALARIN SERUM VE AKCİĞER
DOKUSU ANJİYOTENSİN KONVERTİNG ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNE METAL +2 İYONLARININ ETKİSİ**

Dr. Nuri BAKAN (x)
Dr. Ebubekir BAKAN (xx)
Dr. Mecit SÜERDEM (xxx)
Dr. İdris AKKUŞ (xxxx)
Dr. M. Ramazan YİĞİTOĞLU (x)

ÖZET ;

Anjiyotensin I i anjiyotensin II ye çeviren ve bradikininini inaktive eden anjiyotensin konverting enzim dipeptidil karboksipeptidazdır. Aktivite gösterebilmesi için özellikle klörür olmak üzere halujenürlere ve +2 değerlikli metal iyonlarına ihtiyacı vardır. Metal +2 iyonlarının en önemlileri Zn^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Ca^{+2} dir. Ancak bunlar arasınca tercih edilen iyon Zn^{+2} dir. Bu çalışmada Zn^{+2} , Co^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının anjiyotensin konverting enzim aktivitesi üzerine olan etkileri incelenmiştir. Sonuçta, serum enzim aktivitesinin, özellikle çinko iyonları ile belirgin olmak üzere, metal +2 iyonları tarafından düzeltildiği ve çinko ile kobalt iyonlarının belirli bir konrantrasyondan sonra serum enzim aktivitesinde inhibitör etki gösrdiği gözlemlendi. Ayrıca her üç iyonun konrantrasyonları artııkça doku enzim aktivitesini düşürdükleri belirlendi.

GİRİŞ :

Anjiyotensin konverting enzim (ACE; EC 3.4.15.1) klörüre bağımlı bir dipeptidil karboksipeptidazdır. Oligopeptidlerin karboksil ucundan peptidlerin hidrolitik ayrılışını katalize eder (1). Bu etkisi enzimi sıvı dengesinin regülasyonunda ve dolaylı olarak sistemik ve lokal hemodinaminin regülasyonunda bir anahtar enzim haline getirir (2).

x) Atatürk Üniv. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Araş. Gör.

xx) Atatürk Üniv. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Öğ. Üyesi.

xxx) Atatürk Üniv. Tıp Fak. Göğüs Hastalıkları Bilim Dalı Öğ. Üyesi.

xxxx) Biyokimya Uzmanı.

ACE membrana bağı bir enzimdir (2,3,4,5,6). İlk defa böbreğin mikrozomal kısmından ekstrakte edilmiş ve konsantre hale getirilmiştir. Daha sonra plazmadan saflaştırılmıştır. Akciğerden saflaştırılması ise 1972 yılında değişik araştırma grupları tarafından başarılmıştır. (2,7,8).

Enzimin aktif merkezinde çinko bulunmaktadır (1,2,7,9). Çinko mol başına 1 atom gramdır (5,10). Bunun yanısıra enzim aktivitesi için diğer + 2 yüklü iyonlara da ihtiyaç vardır (11). Biz bu çalışmamızda, metal + 2 iyonlarının serum ve akciğer dokusu ACE aktivitesi üzerine olan etkilerini araştırmayı planladık.

MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda, kesin primer akciğer kanseri teşhisi konulmuş 10 hasta ile akciğer kanseri olmadığı kesinlik kazanmış ve başka bir sebepten dolayı ameliyata alınmış 12 normal akciğerli hastadan alınan serum ve akciğer dokusu örnekleri kullanılarak, serum ve akciğer dokusu homojenatında enzim aktivitesi ve bu aktiviteye Zn^{+2} , Co^{+2} ve Mn^{+2} iyonu konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir.

Akciğer kanserli hastalardan ve normal kabul edilen hastalardan ameliyat esnasında alınan kan ve doku örnekleri kuru buz doldurulmuş bir termos içerisinde laboratuara getirildi. Termos içerisinde 1 saat bekletilen kan 3000 xg de 15 dakika müddetle santrifüj edilerek serumu ayrıldı. Serum hemen deneye tabi tutuldu ya da deney gününe kadar $-25^{\circ}C$ de bekletildi.

Ameliyat esnasında alınan akciğer doku örnekleri derhal ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Ekstraksiyon işlemi Tani ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı (5). Küçük parçalara kesilen doku örneği 55 misli soğuk tampon ile (50) mM potasyum fosfat, pH:8,3) homojenizatör içerisine homojenize edildi. İki kat gazlı bezden tromp yardımıyla süzüldü. Elde edilen süzüntüye Triton X-100 (%0,2 v/v) ilave edilerek, 1 saat $4^{\circ}C$ de çalkalamak suretiyle çözünür hale getirildi. Soğutmalı santrifüjde $4^{\circ}C$ de 1 saat 10000 X g de santrifüj edildi. Elde edilen berrak homojenat ekstraksiyon tamponuna (50 mM potasyum fosfat, pH: 8,3) karşı $4^{\circ}C$ de 24 saat müddetle dializ edildi. Böylece elde edilen homojenat deneylerde kullanılır hale getirildi.

Serum ve doku ACE aktivitesi Neels ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edildi (6). Serumda enzim aktivitesi 1 litre serum başına dakikada 1 μ mol hip-purik asit açığa çıkaran enzim miktarı (U/L) olarak, doku homojenatında ise spesifik aktivite (U/gr protein) olarak tarif edildi.

Metal +2 iyonlarının aktiviteye etkisini incelemek için, serum ve doku homojenat örnekleri deneye tabi tutulmadan önce değişik konsantrasyonlarda (10^{-3} — 10^{-10}) Zn^{+2} , Co^{+2} ve Mn^{+2} çözeltileriyle 1 saat müddetle $37^{\circ}C$ de inkübe edilerek aktivite tayinleri yapıldı.

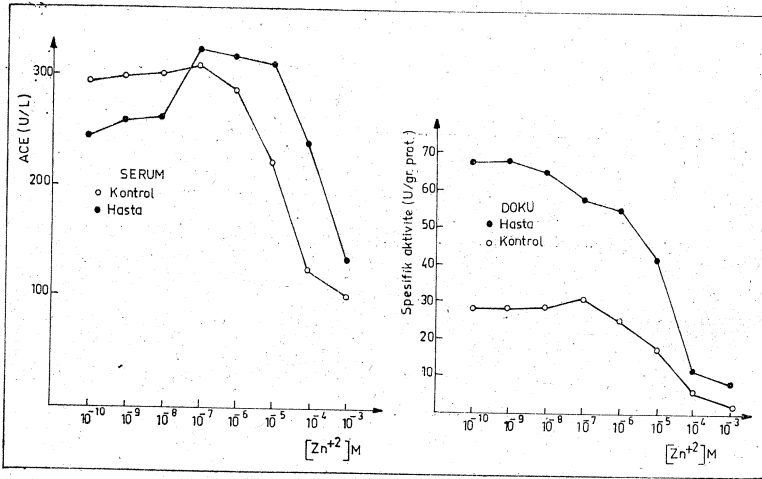
BULGULAR

Kontrol ve hasta grubunun serum ve doku homojenatı ACE aktivitesi değerleri ile dokuya ait protein ve spesifik aktivite değerleri tablo 1 de gösterildi. Hasta grubun serum ACE aktivitesi kontrole oranla düşük bulunmasına rağmen ($p<0.01$), doku ACE aktivitesi ve spesifik aktivite hasta grupta önemli derecede yüksekti ($p<0.01$).

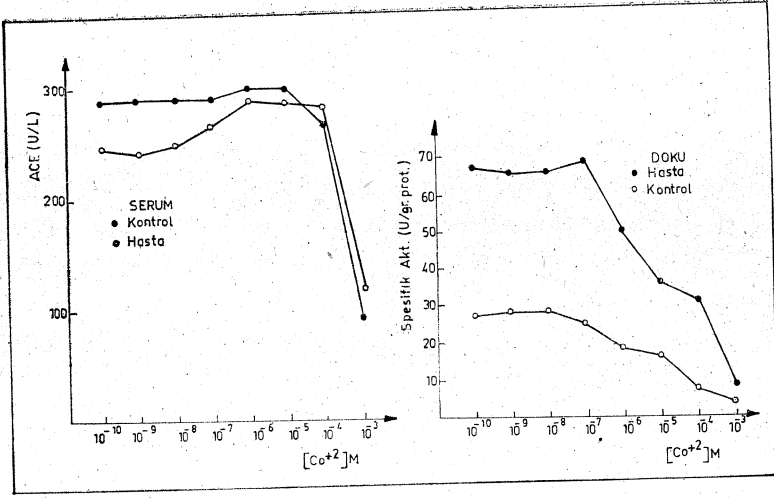
Tablo 1: İncelenen parametrelerin serum ve doku homojenat değerleri.

Materyaller	Parametreler	Kontrol n=12		Hasta n=10		P
		$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
Serum	ACE(U/L)	293	29	243	53	$p<0.01$
Doku Hom.	Protein (%gr)	12,6	2,6	18,2	1,7	—
	ACE (U/L)	367	73	1221	455	—
	SP. Aktivite (U/gr prot.)	29	6	67	28	$p<0.01$

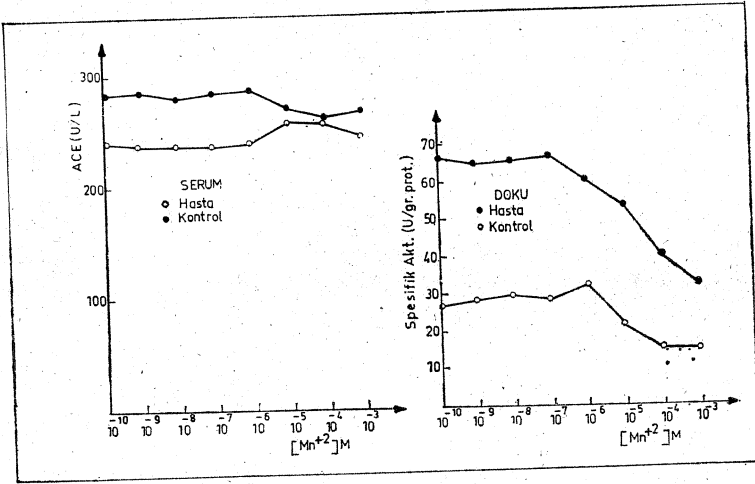
Ayrıca metal $+2$ iyonlarından Zn, Co ve Mn'nin serum ve doku enzim aktivitesine olan etkileri incelendi. Zn^{+2} iyonları tarafından 10^{-7} M konsantrasyonunda kanserli hastaların serum enzim aktivitesini düzelttiği ve bu artışın normallerin değerinin üzerine de çıktığı ve bu konsantrasyondan sonra süratli bir inhibisyon olduğu gözlemlendi. Aynı şekilde, çinko ile olduğu kadar bariz olmasa da, hasta grupta serum ACE aktivitesine Co^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının da düzeltici etkisi bulundu. Co^{+2} ile 10^{-4} konsantrasyondan sonra hızlı inhibitör etki olmasına rağmen, Mn^{+2} iyonunun değişik konsantrasyonları serum enzim aktivitesinde önemli bir sapma ortaya çıkarmadı. Dokuya ait spesifik aktivitede, her üç metal $+2$ iyonun konsantrasyonları arttıkça her iki grupta düşme saptandı. Bütün bu sonuçlarımız şekil 1,2 ve 3 de çizgisel grafiklerle özetlendi.



Şekil 1: Zn^{+2} iyonlarının serum ve akciğer dokusu ACE aktivitesine etkisi.



Şekil 2: Co⁺² iyonlarının serum ve akciğer dokusu ACE aktivitesine etkisi.



Şekil 3: Mn⁺² iyonlarının serum ve akciğer dokusu ACE aktivitesine etkisi.

TARTIŞMA

Akciğer kanserli hastalarda serum ACE aktivitesi, diğer çalışmalarla paralellik göstererek, (6,11,12,13), normallere göre düşük bulundu ($p < 0.01$). Doku örneklerinde ise tam tersi gözlenerek, normal doku aktivitesinin kanserli dokudakinden önemli derecede düşük olduğu tespit edildi ve dokuya ait spesifik aktivite normale oranla anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0.01$). Literatür ta-

ranmasında kanserli akciğer dokusuna ait ACE aktivitesi ile ilgili bir çalışma tespit edilmemiş olup, normal akciğer dokusu için bulunan enzim aktivitesi ortalama değerimiz Lenzillo ve arkadaşlarının sonuçlarına uygunluk göstermekteydi (14).

Kanserli akciğer dokusu enzim aktivitesindeki bu yükselmenin sebebi, dokuda üretilen veya toplanan, enzimin hücresel fonksiyonlardaki bozukluk dolayısıyla pulmoner dolaşıma verilemeyişi olabilir. Serum enzim seviyesinin aynı hastalarda düşük oluşu da bu sonucu desteklemektedir.

İncelenen bütün metal +2 iyonları, belirli bir konsantrasyona kadar enzimin serum aktivitesini artırmakta, daha yüksek konsantrasyonlarda ise inhibitör etki göstermektedir. Kanserli doku örneklerinde ise zaten yüksek seviyede olan enzim aktivitesinde bir artış olmaksızın belirli iyon konsantrasyonunun dan sonra inhibitör etki oluştuğu gözlenmektedir.

Enzimin, kofaktör olarak metal iyonuna doyduktan sonra dönüm noktasının başlaması gerekir. Sonuçlarımıza göre, bu doyumluk noktası 10^{-7} M Zn^{+2} , 10^{-6} M Co^{+2} ve 10^{-5} M Mn^{+2} ile elde edilmekte ve ortama 10^{-3} M Zn^{+2} ve Co^{+2} ilave edildiği zaman aktivite yarısına hatta daha aşağıya inmektedir. Bu değerler, enzimin aktivite gösterebilmesi için metal iyonlarına ihtiyacı olduğunu göstermektedir.

SONUÇ :

Bu sonuçlarımız, kanserli hastalardaki düşük serum enzim aktivitesinden sorumlu bir etkenin de kanserli hastalardaki çinko eksikliği olabileceğini akla getirmektedir. Ayrıca, kanserli hastaların serumlarındaki düşük enzim aktivitesinden tümör dokusu tarafından enzimin sentezine bir inhibisyonun olmadığı ortaya çıkmaktadır.

Bu konuda yapılacak olan çalışmalarla akciğer kanserli hastalarda serum enzim seviyesinin düşük, dokuda ise yüksek olmasının nedeni ve ACE aktivitesi ile bronş kanseri arasındaki ilişkinin daha iyi belirlenebileceği kanaatindeyiz.

THE EFFECT OF METAL -2 IONS ON THE ACTİVİTY OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME IN SERUM AND TISSUE OF PATIENTS WITH PRIMARY LUNG CANCER

Summary

Angiotensin converting enzyme is a dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I to angiotensin II and inactivates bradykinine. For the enzyme to be activated, halides (especially chlorides) and metal +2 ions are need. Metal ions include Zn^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , and Ca^{+2} . Of these, of Zn^{+2} , Co^{+2} , and

Mn⁺² on the enzyme activity was studied. The results show the more ion concentrations, the higher activity in serum, but this was not linear, i.e., any more enhancement in Zn⁺² and Co⁺² resulted in lowered activity, an inhibitor effect. Also, the increase in three ions caused inhibition in tissue enzyme.

KAYNAKLAR

- 1- Bunning P, Riordan JF. The functional role of zinc in angiotensin converting enzyme: Implications for the enzyme mechanism. *J Inorg Biochem* 1985; 24: 183-198.
- 2- Fyhrequist F, Riska CG, Forslund T, Hortling L. Physiological and pharmacological aspects of angiotensin converting enzyme. *J Urology and Nephrology* 1984; 79: 39-43.
- 3- Lenzillo JJ, Dasarathy Y, Stevens J, Berdin CW, Fanburg BL. Testicular angiotensin converting enzyme is a mixture of two molecular weight forms. Only one is similar to seminal plasma enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 128: 457-463.
- 4- Nishimura K, Yoshida N, Hiwada K. Properties of three forms of angiotensin converting enzyme from human lung. *Biochem Biophys Acta* 1978; 552: 229-237.
- 5- Tani M, Mizuno K, Mashimoto S. Demonstration and characterization of angiotensin converting enzyme in human pituitary tissue. *Life Science* 1986; 38: 2277-2284.
- 6- Neels HM, Sande ME, Scharpe SL. Sensitive colorimetric assay for angiotensin converting enzyme in serum. *Clin Chem* 1983; 29: 1399-1403.
- 7- Erdös EG. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Am J Med* 1976; 60: 749-749.
- 8- Ersoy FF, Ercan ZS, Türker RK. Anjiyotensin konvertirg enzim. *Doğa* 1978; 2: 283-287.
- 9- Lazo JS, Lynch JL, Mc Calister J. Bleomycine inhibition of angiotensin converting enzyme activity in endothelial cells. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 73-78.
- 10- Dorer FE, Kahn JR, Lentz KE, Levine M, Skeggs T. Kinetic properties of pulmonary angiotensin converting enzyme: Hydrolysis of hippurylglycylglycine. *Biochem Biophys Acta* 1976; 429: 220-228.
- 11- Neels HM, Scharpe SL, Sande ME, Verkerk RM, Acker JV. Improved micro-method for assay of serum angiotensin converting enzyme. *Clin Chem* 1982; 28: 1352-1355.

- 12- Ashutosh K, Keighley JFH. Diagnostic value of serum angiotensin converting enzyme activity in lung disease. *Thorax* 1976; 31: 552-556.
- 13- Synder HM. Brain enzymes as receptors: Angiotensin converting enzyme and enkephalin convertase. *Ann Acad Sci* 1986; 466: 21-30.
- 14- Lenzillo JJ, Stevens J, Dasarathy Y, Yotsumoto H, Fanburg BL. Angiotensin converting enzyme from human tissues: Physicochemical, catalytic, and immunological properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 14938-14944.