

ERZURUM VE ÇEVRESİNDE SAĞLAM ŞAHISLARDA ANJİYOTENSİN KONVERTİNG ENZİM (ACE) AKTİVİTE SEVİYELERİNİN TESBİTİ

Dr. Nuri BAKAN (x)

Dr. Ebubekir BAKAN (xx)

Dr. Mecit SÜERDEM (xxx)

Uz. Necati KAYA (xxxx)

Uz. İbrahim PİRİM (xxxxx)

ÖZET

Bu çalışmada, renin anjiyotensin sisteminde görev alan ve anjiyotensin I den Anjiyotensin II oluşturan anjiyotensin konverting enzimin Erzurum ve Çevresi için normal değerleri tesbit edilmiştir. 123 Normal şahıstan alınan serum örneklerinde subsrat olarak hippuril glisilglisin (HGG) kullanılarak Neels ve arkadaşlarının kolorimetrik metoduna göre ACE aktivitesi tayin edilmiştir. ACE aktivitesi 296.6 ± 69 U/L olarak bulunmuştur. Aktivite seviyesinin yaş ile ilişkisi araştırılmış hiçbir ilişki bulunamamıştır.

GİRİŞ

Anjiyotensin konverting enzim (ACE; E.C.: 3.4.15.1) veya Kininaz II birdipeptidil karboksipeptidazdır. Anjiyotensin I ve Bradikinin C-terminal ucunu parçalar. İlk defa 1954 yılında Skeggs ve arkadaşları tarafından keşfedilmiş ve konverting enzim adı verilmiştir (1,2). Asidik bir glikoproteindir. İzoelektrik noktası yaklaşık 4,5 molekül ağırlığı 150.000 kadardır (3). Pulmoner vasküler yatakta endotel hücrelerin vakuollerinde lokalize olmuştur. Az miktarda plazmada bulunur. En fazla akciğerde bulunur. Belkide en önemli üretim yeri akciğerdir. Bundan başka, karaciğer, böbrek ince barsak, dalak, adienaller ve pankreas gibi organların damar endotellerinde de sentezlenir (3,4,5,6,7).

x) A.Ü. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Araş. Gör.

xx) A.Ü. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Doç. Dr.

xxx) A.Ü. Tıp Fak. Göğüs Hastalıkları Bilim Dalı Yrd. Doç. Dr.

xxxx) A.Ü. Kars Vet. Fak. Biyokimya Bilim Dalı Öğretim Görevlisi

xxxxx) A.Ü. Tıp. Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Arş. Gör.

Bir amino asit zincirinden ibaret olan enzim % 8-26 kadar karbonhidrat bileşeni taşımaktadır (8). ACE membrana bağlı bir enzimdir (9). Aktif merkezinde çinko bulunur (2,6,10,11). Çinko mol başına A Atom gramdır (12). ACE biyosentezinin 3 ana sebebi vardır (13). 1) Glikokortikoid tedavisi 2) Makrofaj aktivasyonu 3) ACE inhibitörleri.

En önemli fonksiyonu, anjiyotensin I'in C-ucundan histidin-Lösine amino asitlerini kopararak, merkezi sinir sisteminde etkili olan arteriyel kan basıncını ve su alımını artıran, antidiüretik hormon (ADH), oksitesin veya adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgılanmasını stimüle eden anjiyotensin II'yi meydana getirmektedir (11,14).

Serum doku ACE aktivite seviyelerinin tayini, ile birçok hastalıkların teşhis ve tedavisinin gidişini takip yönünden önemlidir. Aktif sarkoidozlu hastalarda artmış enzim seviyeleri tesbit edilmiştir (15). Hipertroidizmde yüksek, hipotroidizmde düşük aktivite seviyeleri elde edilmiştir (16,17). Ayrıca diyabetlilerde de yüksek seviyeler tesbit edilmiş ve diyabetik retinopati ile paralellik gösterdiği açıklanmıştır (18).

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada toplam 123 sağlam şahıstan 2 ml venöz kan alınarak enzim aktivitesi tayin edildi. Alınan kanlar, alınıp alınmaz kuru buzla dolu termos içersine konularak pıhtılaşması için 1 saat bekletildi ve 3000 x g'de 15 dak. santrifüj edilerek serum ayrıldı. Serum örnekleri ya hemen deneye tabi tutuldu ya da 1 haftadan fazla olmamak kaydıyla -25°C'de bekletildi.

Kullanılan Çözeltiler:

Tamponlanmış Substrat Çözeltisi: 20 ml lik bir balon jöjeye şu maddeler kondu : 0,238 gr HEPES, 0,351 gr NaCl, 1,136 gr Na₂SO₄ ve 0,179 gr Hippurilglisilisin. Bir miktar redistile su ve 50 mikrolitre doymuş NaOH ilave edildi. Çözöldükten sonra pH'ı NaOH ile 8.15'e ayarlandı. Hacmi 20 ml'ye tamamlandı. 0.5 ml lik kısımlar halinde kullanılacağı güne kadar -25°C'de saklandı.

Sülfirik asit: (0.33 M): 18.3 ml d-H₂SO₄ (d: 1.841, % 96, MA : 98) alınarak hacmi 1 litreye tamamlandı.

Sodyum Tungstat Çözeltisi: (100 gr/L): 100 gr Na-tungstat 1 litre suda çözöülerek hazırlandı.

Glisilglisin Çözeltisi: 52.9 mg glisilglisin 10 ml redistile suda çözöülerek 40 mM lik stok standart hazırlandı. Bu stok seyreltilerek bir seri (0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02 mikro mol/10 mikrolitre) dilüe standartlar elde edildi.

Trinitrobenzensülfonik asit çözeltisi (TNBS, 60 mM): 406 mg TNBS 20 ml redistile suda çözööldü, 0.5'er ml lik kısımlar halinde -25°C'de saklandı.

Borat Tamponu (0.1M) : 3.812 gr $N_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi 100 ml ye tamamlandı. pH ı doygun NaOH ile 9.6 ya ayarlandı.

Aktivite Tayini:

Serum ACE aktivitesi Neels ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş hassas bir kolorimetrik metod (19) yardımıyla tayin edildi. Deney prosedürü tablo I de görüldüğü gibidir.

Deneyin Prensibi:

Serum hippuril glisil-glisin ile 30 dak. inkübe edilir. Folin-Wu deproteini- zasyonundan sonra (Na tungstat + H_2SO_4), serbest bırakılmış glisil glisin, borat tamponu ile (pH: 9.6) tampone edilmiş trinitrobenzen sülfonik asid çözeltisi ile trinitrofenilglisil glisin oluşturacak şekilde reaksiyona sokulur. Oluşan renkli kompleksin absoransı, numune körüne karşı okunur.

Tablo I. Serumda ACE aktivitesi tayini

Reaktifler	T Ü P L E R		
	Kör	Numune	Standart
Tampon-Reaktif Karışımı	100	100	100
Sodyum Tungstat Çözeltisi	100	—	100
H_2SO_4	100	—	100
37°C de 5 dakika inkubasyon			
Serum	10	10	10
Gly-gly Standardı	—	—	—
Karıştırılır. 37°C de 30 dakika inkubasyon yapılır			
Sodyum Tungstat Çözeltisi	—	100	—
H_2SO_4	—	100	—
10 saniye karıştırılır			
Redistile su	1000	1000	990
Karıştırılır. Santrifüjle çökelek ayrılır			
Berrak Suparnatan	750	550	750
Borat Tamponu	1000	1000	1000
TNBS Çözeltisi	50	50	50
Karıştırılır. 37°C de 15 dakika inkubasyon yapılır 405 nm de absoranslar okunur.			

Not : Hacimler mikrolitre cinsindendir.

Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi:

Kalibrasyon eğrisi glisil glisin standardı yardımıyla hazırlandı. Hazırlanan stok standarttan 0,4,0,3,0,2,0,1,0,08,0,06,0,04,0,02 µmol/10 µL lik bir seri standart hazırlandı. Bunlarda deney protokolüne göre aktivite tayin edildi. Hazırlanan bu standartlara tekabül eden aktivitelerle karşılaştırıldı.

Sonuçların Hesaplanması :

Serum ACE aktivitesi

$$\text{ACE (U/L)} = \frac{\Delta A \times 10^6 \times 1310 \times 1.8 \times 10^{-3}}{13200 \times 1 \times 30 \times 10^{-5} \times 750} = \Delta A \times 794$$

Formülüne göre hesaplandı. A; Numune absorbansı-Kör absorbansı, 106; Beer kanunundaki mol/L biriminden ACE ünitesi elde etmek için dönüşüm faktörü, 750/1310; Renklendirme basamağında arilasyon için alınan miktar, 1.8×10^{-3} , son dilüsyon hacmi, 13200 ; ϵ 405 trinitrofenil glisilglisin (Molar absorbtivite, L mol⁻¹ cm⁻¹), 1; kuvvet mesafesi (cm), 30; inkubasyon süresi, 10-5 deneyde kullanılan serum hacmi (L).

Enzim Ünitesinin Tarifi:

1 ünite ACE aktivitesi, 1 litre serum başına dakikada 1 µmol hippurik asit açığa çıkaran enzim miktarı olarak tarif edildi.

BULGULAR

Bölge normal değerlerini tesbit etmek amacıyla yapılan bu çalışmada, toplam 123 sağlıklı (36 Kadın, 87 erkek; yaş aralığı 27-70; ortalama 56,7) kişiden alınan kan örneklerinde ACE aktivitesi tayin edilmiştir. Ortalama ACE aktivitesi, kadınlar için $284,3 \pm 47$, erkekler için 299 ± 74 U/L olarak tesbit edilmiştir. Bütün çalışma grubuna ait ortalama ACE aktivitesi değeri ise $296,6 \pm 69$ U/L olarak bulunmuştur. Kadın-Erkek ACE aktivite seviyeleri istatistiki yönden analiz edilmiş ve önemli bir fark bulunamamıştır. Yaş ile enzim aktivitesi arasında da istatiki bir önemlilik tesbit edilememiştir.

TARTIŞMA

Çalışmamızda Neels ve arkadaşlarının kolorimetrik metodunu kullandık. ACE aktivitesi tayin için biyoassay, radyoizotopik, florometrik, yüksek basınçlı likid kromatografisi ve likid kromatografisi gibi metodlar kullanılmıştır. Ancak bu metodların hepsinin pahalı ekstraksiyon ve yeniden çözme (20), radyoizotopik substratlara gerek duyulması (19), zararlı reaktiflerin kullanılması ve özel ekipman ve pahalı aletler gerektirmesi gibi (19,21). dezavantajları vardır. Bu dezavan-

tajlar ACE tesbitlerinin klinikte rutin uygulamalarını sınırlamakta ve yaygınlık kazanmasını engellemektedir. Kullandığımız metod küçük bir klinik laboratuvarı da kolaylıkla uygulanabilecek ve 10 µL serumla uygun ve doğru sonuçlar verebilecek kadar hassastır.

Kullanılan metodla elde edilen aktivite değerleri, bir tarama metodu olan Lieberman'ın metoduna (20) göre elde edilen aktivite değerlerinden 10 kat daha yüksektir. Bu hidroliz hızı, basit bir parçalanma işlemi yardımıyla yeterli miktarda peptidin ayrılmasına müsaade etmesi yönünden önemlidir. Boya maddesi olarak peptid ve amino asitleri boyamak için 1-floro, 2,4 dinitro benzen kullanılmasına rağmen biz 2,4,6-trinitrobenzensülfonik asid kullandık. Çünkü dinitrotürevlerinin aksine alkoller, şekerler ve lipidlerle reaksiyon vermez. Optimum pH 9.3 e ayarlanmıştır. Çünkü daha düşük değerler reaksiyonu yavaşlatır. Deneyin lineerlik sınırı oldukça geniştir (4-900 U/L).

Serum enzim aktivitesi için bulunan değer daha önce yapılan benzer çalışmalarla (19,21,22) tamamen uygunluk içerisinde. Bulunan bu aktivite seviyesi daha sonra yapılacak olan çalışmalar için referans teşkil edeceği inancındayız. Hastalık hallerinin ayırıcı tanısında önemli bir parametre olan ACE aktivite seviyeleri konusunda çalışmalarımız devam etmektedir.

THE LEVELS OF SERUM ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME IN HEALTHY SUBJECTS IN ERZURUM AND SURROUNDING

SUMMARY

In this study, the normal values of angiotensin converting enzyme (ACE) that functions in renin-angiotensin system and converts angiotensin I to angiotensin II were determined in serum samples from 123 healthy subjects. ACE activity was determined by Neels and co-workers' colorimetric method using hippurylglycylglycine as substrate. ACE activity was found to be 296.6 ± 69 U/L. The relationship between age and activity levels were investigated and was found no correlation.

KAYNAKLAR

- 1- Skeggs, L.T., Marsh, W.H., Kahn, J.R., Shumway, N.P.: The existence of two forms of hypertension II. J. Exp. Med. , 99: 275, 1957.
- 2- Ersoy, F.F., Ercan, Z.S., Türke, R.K.: Anjiyotensin konverting enzim. Doğa II: 283, 1978.
- 3- Erdös, E.G.: Conversion of angiotensin I to angiotensin II. Am. J. Med., 60: 749, 1976.

- 4- Issell, B.F., MacFaydan, B.V., Gum, E.T.: Serum zinc levels in cancer patients. *Cancer*, 47: 1845, 1981.
- 5- Fyhrequist, F., Riska, C.G., Forslund, T., Hortling, L.: Physiological and pharmacological aspects of angiotensin converting enzyme. *Scand. J. Urology and Nephrology*. 79: 39, 1984.
- 6-oAlpacar, Z., Numanoğlu, G., Bulutoğlu, S.: Renin anjiyotensin sistemi ve anjiyotensin konverteng enzim. *Haydarpaşa Numune Has. Tıp Dergisi*, 26:70,1986.
- 7- Haboubi, N.A.A., Bignel, A.H.C., Habouibi, N.Y.: Serum angiotensin converting enzymes activity incigarette smokers., *Clin. Chim. Acta*. 154: 69, 1986.
- 8- Scharpe, S., Sande, M., Hedriks, D.: Influence of neurominidase treatment on the electrophoretic behavior of angiotensin converting enzyme from human tissues., *J. Clin. Chem. Biochem*. 24: 597, 1986.
- 9- Nishimura, K., Yoshida, N., Hıwada, K., Ueda, E., Kokubu, AT.: Properties of three forms of angiotensin converting enzyme from human lung. *Biochim et Biophys. Acta*. 552:229, 1978.
- 10- Lazo, J.S., Lynch, J.V., Mc Callister, J.: Bleomycine inhibition of angiotensin converting enzyme activity in endothelial cells., *Am. Rev. Res. Dis*. 134:73,1986.
- 11- Bunning, P., Riordan, J.F.; The functional role of zinc in angiotensin converting enzyme: Implications for the enzyme mechanism, 1. *Inorg. Biochem*. 24: 183, 1985.
- 12- Dorer, F.E., Kahn, J.E., Lentz, K.E., Levine, M., Skeggs, T.: Kinetic properties of pulmonary angiotensin converting enzyme: Hydrolysis of hypaurilyglycylglycine. *Biochem. Biophys. Acta*. 429:220, 1976.
- 13- Erdös, E.G.: Angiotensin Converting enzyme. *Circ. Res*. 36: 247, 1975.
- 14- Takada, Y., Hiveda, K., Yokoyama, M.: Angiotensin converting enzyme: A possible histologic indicator for human renal carcinoma. *Cancer*, 56: 130, 1985.
- 15- Lieberman, J., Nosal, A., Leopold, A.S., Adrinana, S.: Serum angiotensin converting enzyme for diagnosis and therapeutic evaluation of sarcodosis. *Am. Rev. Respir. Dis*. 120: 239, 1979.
- 16- Leeper, L.D.: EffeJt of throid hormone on human serum ribonuclease. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 23: 426, 1983.
- 17- Robert, C.S., Bart, C., Richard, S.: Angiotensin converting enzyme. A potential marker of tissue hypothyroidisim in critical illness. *Arc. Intern. Med*. 145: 1829, 1985.
- 18- Lieberman, J., Sastre, A.: Serum angiotensin converting enzyme: Elevation in diabetes meli tus. *Ann. Int. Med*. 9d: 825., 1980.

- 19- Neels, H.M., Van Sande, M.E., Scharpe, S.L. : Sensitive colorimetric assay for angiotensin converting enzyme in serum. Clin. Chem. 29: 1399, 1983.
- 20- Lieberman, J.: Evaluation of serum angiotensin converting enzyme (ACE) levels in sarcoidosis. Am. J. Med. 59: 365, 1975.
- 21- Neels, M.M., Scharpe, S.L., Van Sande, M.E., Verkerk, R.M., Acker, J.V.: Improved micromethod for assay of serum angiotensin converting enzyme. Clin. Chem. 28: 1352, 1982.
- 22- Reeves, P.G., O'Dell, B.L.: An experimental study of the effect of zinc on the activity of angiotensin converting enzyme in serum. Clin. Chem. 31: 581, 1985.