

**MİDE SUYUNDA 5'NÜKLEOTİDAZ (5NT) VE Cu, Zn
SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) ENZİMLERİNİN AKTİVİTELERİ
ÜZERİNE SICAKLIK VE ZAMANIN ETKİSİ :
DENEYSSEL BİR ÇALIŞMA**

Ömer Akyol* **Mustafa Kavutçu*** **Orhan Canbolat***
Necati Örmeci** **İlker Durak***

Mide suyunda enzim aktivitelerinin ölçülmesi klinik gastroenterolojide bazı hastalıkların teşhisinde noninvazif bir test olarak kullanılmaktadır. Özellikle mide kanserinin teşhisinde yardımcı olabilecek bu enzim aktivite tayinleri son yıllarda ilgi çekmeye başlamıştır. Bu çalışmalardan biri Rogers K ve arkadaşları tarafından (2) laktat dehidrojenaz (LDH) ve β -Glukuronidaz enzimleri üzerine yapılmıştır.

Mide suyu enzimler için elverişsiz bir ortam olduğundan birçok metodolojik problem ortaya çıkmaktadır. Çünkü mide suyunda belirli bir iyon kuvveti, pH, alınan besinlerin içerdiği metaller, mikroorganizmalar ve diğer birçok faktörler bulunmaktadır. Ölçümden önce mide suyu örneklerinin toplanması ve saklanması esnasında enzim aktivitesinin stabilitesine ait büyük bazı güçlükler vardır. Toplama esnasında mide suyu örneklerinin hangi işlemlerden geçirileceği ve nasıl muhafaza edileceği hakkında detaylı bilgiye rastlanmamıştır. Belli bir prosedür izlenmediği takdirde, protein tabiatlı enzimler ortamın etkisiyle aktivite kaybına uğramakta ve yanlış değerlendirmelere neden olmaktadır. Bundan dolayı mide suyunda bulunan enzimlerin aktivite tayinleri sırasında, her enzim için ayrı ve uygun standardize edilmiş işlemlere ihtiyaç vardır.

Biz bu çalışmada, sağlıklı ve hasta farkı gözetmeksizin değişik şahıslardan toplayıp bir havuz oluşturduğumuz mide suyunda Cu,Zn SOD ve 5NT enzimleri üzerine sıcaklık ve zamanın etkisini inceledik.

* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı

Geliş Tarihi : 1 Ocak 1993 Kabul Tarihi : 7 Temmuz 1993

MATERYAL VE METOD

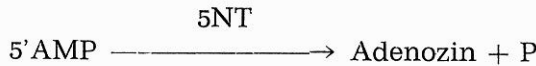
Enzimler :

Çalışmada, iki ayrı metabolizmada görev alan iki enzimi inceledik :

a - Cu,Zn SOD (EC. 1.15.1.1) : Serbest radikal metabolizmasında, radikalleri yok edici olara görev almaktadır. Katalizlediği reaksiyon :



b - 5NT (EC. 3.1.3.5.) : DNA turn-overinde görev almakta olup mononükleotidlerdeki fosfat grubunun ayrılmasını katalizlemektedir. Buna örnek olarak aşağıdaki reaksiyon verilebilir :



Bu enzimler, kanser ve serbest radikal metabolizması üzerine çalıştığımız için örnek olarak seçilmiştir.

Cihazlar :

Çalışmamızda Hitachi Model (100 - 30) spektrofotometre, termosatlı Grant Instruments TBI type su banyosu, Sorvall superspeed (Type SS-1) marka santrifüj, Beckman Model 4500 digital pHmetre kullanılmıştır. Numunelerin saklanması için +2°C ısıya ayarlanmış buzdolabı ve -25°C ısıya ayarlanmış derin dondurucu kullanılmıştır.

Enzim Aktivite Tayinleri :

Cu,Zn SOD aktivitesi (3) : Deney ortamında üretilen süperoksit radikalinin Nitroblue tetrazolium'u (NBT) redüklemesi sonucu % 50 inhibisyona sebep olan enzim miktarı 1 ünite olarak tarif edilmektedir. NBT'un redüklenmesi sonucunda oluşan formazanın 560nm'deki absorbansı spektrofotometrik olarak ölçülerek SOD aktivitesi tayin edilmiştir.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{OD}) \text{ kör} - (\text{OD}) \text{ numune}}{(\text{OD}) \text{ kör}} \times 100$$

Sonuçlar Ü/ml cinsinden ifaded edilmiştir.

5NT aktivitesi (4) : Campbell metodu : Adenozin 5' monofosfatın 5NT'in katalizi ile pH 7.5'da adenozin ve inorganik fosfat'a hidrolitik parçalanması reaksiyonu sonucunda açığa çıkan inorganik fosfatın 680 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Sonuçlar Ü/L cinsinden ifade edilmiştir.

Çalışma Planı

Gastroenteroloji bilim dalına aynı gün muayene ve kontrol amacıyla gelen 16'sı erkek 8'i kadın (yaş aralığı 24 - 51) 24 hastanın mide suları endoskopik muayene esnasında endoskopun biyopsi kanalından gönderilen bir katater vasıtasıyla alındı. Muayene ve kontrolleri yapılan hastaların klinik durumları şöyle idi :

- 2 mide kanseri
- 3 atrofik gastritis
- 8 duodenal ülser
- 11 sağlıklı

Alınan numuneler muayene işlemleri bitinceye kadar + 4 °C'de bekletildi. Her bir tüpteki mide suyunun pH'sı pH stikleriyle (Toyo Rosh. Co. Ltd) kabaca ölçüldü ve birbirine çok yakın değere sahip olanlar aynı gruba dahil edildi. Bu numunelerin daha sonra pH metre ile ölçülen pH değerleri sırasıyla şöyle bulundu : 1.5, 3.2, 5.3.

Tüpler 3000xg'de +4°C'de 30 dakika santrifüj edilip üstte kalan berrak kısım (süpernatant) alındı ve daha sonra her nümune 3 kısma ayrıldı :

1. kısım derin dondurucuya (-25°C)
2. kısım buzdolabına (+2°C)
3. kısım oda sıcaklığı ortamına (+25°C) konuldu.

Derin dondurucuya konulan kısım ayrıca 3 kısma ayrıldı ve küçük tüplere konularak saklandı. Burada amacımız mükerrer dondurup çözme işlemlerinin enzimin aktivitesini azaltmasını önlemektir.

Ayrıca oda sıcaklığında bekletilen 3 ayrı tüpe bakteriyel kontaminasyonu ve hava ile teması engellemek ve böylece deneyin sonucunu olumsuz yönde etkileyebilecek faktörleri yoketmek veya azaltmak amacıyla koruyucu olarak toluen, tüpteki sıvının yüzeyinde ince bir tabaka yapacak şekilde ilave edildi.

Her pH grubundan alınıp 3 ayrı ortamda saklanan mide suyunda 0,1,2,3,6,10,16 ve 37. günlerde 5NT ve Cu,Zn SOD enzim aktiviteleri tayin edildi. Tayinler yapılırken numuneler 5NT enzimi için barbitürat tamponu (pH 7.5) ve SOD enzimi için fosfat tamponu (pH 7.5) ile 1/1 oranında tamponlandı.

SONUÇLAR

Değişik pH değerlerine sahip, farklı ortamlarda saklanan numunelerde zamana göre enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler tablolar halinde verilmiştir (Tablo II : +25°C, Tablo III : +2°C, Tablo IV : -25°C). Mide suyunun alındığı gün tesbit edilen aktivite değerleri Tablo I'de verilmiştir.

Tablo I : Mide suyu alındıktan hemen sonra yapılan analizlerde bulunan enzim aktiviteleri.

pH	1.5		3.2		5.3	
	5NT (U/L)	SOD (U/ml)	5NT (Ü/L)	SOD (U/ml)	5NT (U/L)	SOD (U/L)
Aktivite	0.040	0.415	0.0121	0.634	0.0121	0.902

Tablo II'ye göre 25°C'de bekletme esnasında ve pH 1.5'da 5NT aktiviteleri azalma ve artmalar göstererek 37. günde 0.025 Ü/L seviyesi-

Tablo II : 25°C'de bekletilen mide suyunda enzim aktivitelerinin zamana göre değişmesi. A.Y. = aktivite yok

Gün	25°C					
	pH 1.5		pH 3.2		pH 5.3	
	5NT (U/L)	SOD (U/ml)	5NT (U/L)	SOD (U/ml)	5NT (U/L)	SOD (U/ml)
1	0.032	0.368	0.0428	0.526	0.0107	0.789
2	0.045	0.405	0.045	0.649	0.0136	0.649
3	0.040	0.861	0.021	0.778	0.0215	1.028
6	0.054	0.748	0.032	0.790	0.0382	0.950
10	0.011	0.774	0.026	0.903	0.0106	0.903
16	0.042	0.813	0.047	A.Y.	0.0210	0.875
37	0.025	0.591	A.Y.	A.Y.	A.Y.	A.Y.

ne gelmiştir. Yapılan ilk ve son ölçüm arasında çok anlamlı bir fark bulunamamıştır. SOD aktivitesi de artma ve azalmalar göstererek 37. günde 0.591 Ü/ml değerine gelmiştir. Aktivitede anlamlı bir değişme gözlenmemiştir.

pH 3.2'de 16. güne kadar 5NT aktivitesi gözlenmiş, 37. günde yok olmuştur. Aynı durum SOD için 10. günden sonra gözlenmiştir. On-altıncı ve 37. günlerde yapılan ölçümlerde aktivite bulunamamıştır. pH 5.3'de 5NT ve SOD aktiviteleri artma ve azalmalarda 16. güne kadar bulunmasına karşılık 37. günde aktivite kaybolmuştur.

Tablo III, +2°C'de bekletmenin enzimle aktiviteleri üzerine etkisini göstermektedir. pH 1.5 ortamında 1. günden itibaren 5NT aktivitesi kaybolmuştur. SOD aktivitesi ise 37. günde kaybolmuştur. pH 3.2'de 6. günde 5NT aktivitesi kaybolmuştur. SOD aktivitesi ise 16. günde minimal seviyede azalmış, 37. günde aktivite kaybolmuştur. pH 5.3'te 5NT aktivitesi 16. gün kaybolurken SOD aktivitesinde bir miktar azalma gözlenmiş ancak aktivite tamamen kaybolmamıştır.

Tablo III : +2°C'de bekletilen mide suyunda enzim aktivitelerinin zamana göre değişmesi. A.Y. = aktivite yok

Gün	+2°C					
	pH 1.5		pH 3.2		pH 5.3	
	5NT (U/L)	SOD (U/ml)	5NT (U/L)	SOD (U/ml)	5NT (U/L)	SOD (U/ml)
1	A.Y.	0.553	0.0428	0.526	0.0161	0.789
2	A.Y.	0.510	0.0112	0.324	0.0130	0.703
3	A.Y.	0.444	0.0050	0.722	0.0101	0.472
6	A.Y.	0.325	A.Y.	0.721	0.0660	0.953
10	A.Y.	0.806	A.Y.	0.903	0.0260	1.032
16	A.Y.	1.594	A.Y.	0.313	A.Y.	0.656
37	A.Y.	A.Y.	A.Y.	A.Y.	A.Y.	0.364

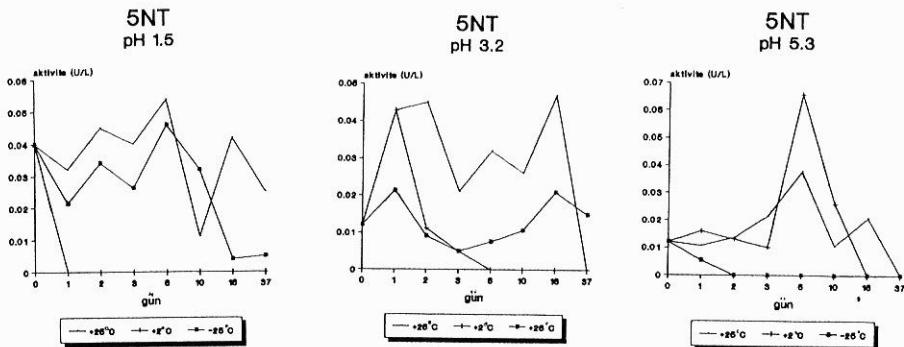
Tablo IV, -25°C'de bekletmenin enzim aktivitesi üzerine etkisini göstermektedir. pH 1.5'da 5NT aktivitesi 37. günde 1. güne oranla azalma göstermiştir. Ancak pH 3.2'de 1. ve 37. günler arasındaki aktivite azalması minimaldir. pH 5.3'de ise 2. günden itibaren aktivite tamamen

kaybolmuştur. SOD enzim aktivitesi pH 1.5 ve 3.2'de, 16. güne kadar artan-azalan değerler halinde tesbit edilmiş olup 37. günde aktivite tamamen kaybolmuştur. pH 5.3'de ise 37. güne kadar aktivitede düzensiz bir azalma olmuş ancak tamamen kaybolmadığı gözlenmiştir.

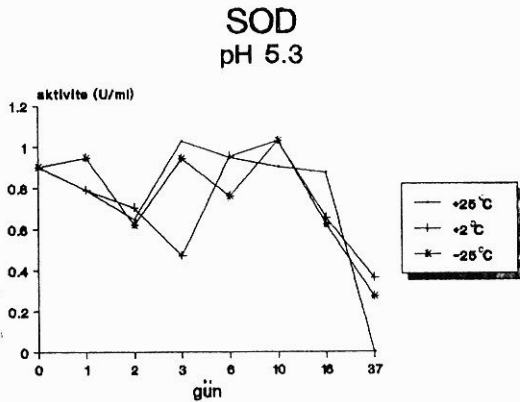
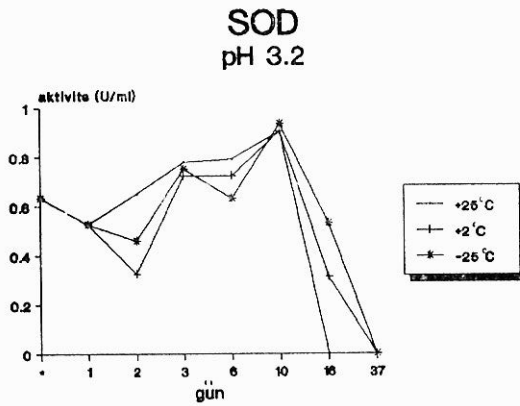
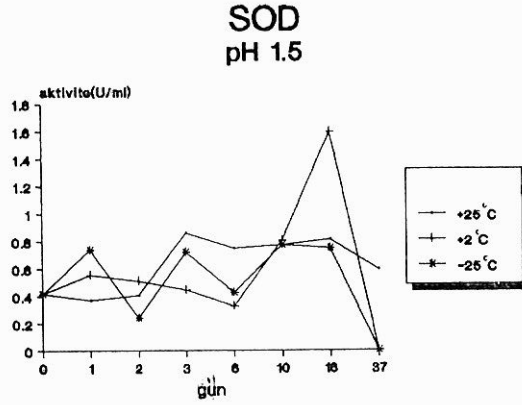
Tablo IV : -25°C 'de bekletilen mide suyunda enzim aktivitelerinin zamana göre değişmesi. A.Y. = aktivite yok

Gün	-25°C					
	pH 1.5		pH 3.2		pH 5.3	
	5NT (U/L)	SOD (U/ml)	5NT (U/L)	SOD (U/ml)	5NT (U/L)	SOD (U/ml)
1	0.0214	0.737	0.0214	0.526	0.0054	0.947
2	0.0342	0.243	0.0091	0.460	A.Y.	0.622
3	0.0263	0.722	0.0050	0.750	A.Y.	0.944
6	0.0460	0.426	0.0075	0.630	A.Y.	0.760
10	0.0320	0.774	0.0106	0.935	A.Y.	1.032
16	0.0040	0.750	0.0210	0.531	A.Y.	0.625
37	0.0050	A.Y.	0.0150	A.Y.	A.Y.	0.273

Şekil 1 ve 2 zamana bağlı olarak meydana gelen enzim aktivite değişikliklerini göstermektedir.



Şekil 1 : 5NT enziminde zamana bağlı olarak gözlenen aktivite değişiklikleri.



Şekil 2 : SOD enziminde zamana bağlı olarak gözlenen aktivite değişiklikleri.

TARTIŞMA

Öncelikle şunu belirtmek gerekir ki, mide suyunun toplanması, saklanması, enzim aktivitesi tayini ve bilgilerin ifade tarzındaki farklılık ve bu konudaki çalışmaların azlığı nedeniyle, sonuçlarımızın literatür ile karşılaştırılması mümkün olmamıştır. Pereslegine'in yaptığı bir araştırmada (1) mide suyunda SOD enzim aktivitesi üzerine çeşitli maddelerin etkisi incelenmiştir. Fakat bu araştırma bizim çalışmamızdan farklı olup sadece mide suyunda SOD enzimi aktivitesinin bulunduğu ve birçok endojen ve eksojen faktörlerden etkilenebileceği yönünde fikir vermektedir. Bu yüzden sonuçlarımız bu çalışmanın sonuçları ile mukayese edilememektedir. Ayrıca herhangi bir vücut sıvısında SOD ve 5NT enzimleri ile ilgili sıcaklık ve saklama zamanının enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırıldığı metodolojik bir çalışmaya da rastlanılamamıştır.

Her iki enzim için de farklı ortamlarda bekletmenin numunenin pH'sına göre avantajlı ve dezavantajlı yönleri vardır. Sonuçlarımıza göre, SOD için pH 1.5'ta en iyi bekletme ortamı +25°C oda sıcaklığıdır. +2 ve -25°C ortamları ise 16. güne kadar beklemek için elverişlidir. Daha sonra aktivite kaybolmaktadır. pH 3.2'de en iyi bekleme ortamı -25°C'dir. Zira bu sıcaklıkta önemli bir aktivite kaybı olmaksızın 16. güne kadar enzim stabil kalmıştır. +2°C'de ise 16. güne kadar % 50'lik bir aktivite kaybı olmuştur. pH 5.3'te en iyi saklama ortamı +2°C'dir. Bu sıcaklıkta 16. güne kadar % 15'lik, 37. güne kadar % 60'lık bir aktivite kaybı gözlenmiştir. +25°C'de 16. güne kadar önemli aktivite kaybı olmazken daha sonra aktivite tamamen kaybolmuş, -25°C'de ise 37. güne kadar önemli bir azalma gözlenmiştir. Kanaatimizce SOD enzimi yapısı itibariyle süre sınırlı tutulmak şartıyla düşük pH ortamlarında nisbeten dayanıklı bir enzimdir.

5'nükleotidaz için pH 1.5'da en iyi saklama ortamı +25°C'dir. +2°C'de hiç aktivite bulunamamış olması bu ortamın 5NT enzimi için çok elverişsiz olduğunu göstermektedir. -25°C'de dondurarak saklama ise 10. güne kadar elverişli olmakla birlikte daha sonrası için elverişsizdir. pH 3.2'de en iyi saklama ortamı -25°C'dir. Bu sıcaklıkta hiçbir aktivite kaybı olmaksızın 37. güne kadar enzim stabilitesini de-

vam ettirmiştir. Bu pH grubunda en elverişsiz ortam ise +2°C'dir. pH 5.3'de 16. güne kadar saklamak üzere en elverişli ortam +25°C'dir. —25°C'de saklamak ise ilk günden enzimde hemen hemen tama yakın aktivite kaybına neden olmaktadır.

Sonuç olarak, fizikokimyasal içeriği çok değişken olan mide suyunda enzimatik analiz yapılırken değişik sıcaklıklarda saklama işlemlerinin, mide suyunun pH değerine göre ayarlanması daha uygundur. Yukarıdaki bilgilerin ışığında bu iki enzim için standart bir ortam önermek mümkün görülmemektedir. Bu tür enzimatik analizlerde takip edilecek yol, numunenin fazla bekletilmeden işleme konulmasıdır. Konunun daha iyi aydınlatılması için bu sahada daha farklı pH değerine sahip mide suyu gruplarında çalışmalar yapılmalıdır. Hatta bu çalışmaların sınırı geniş tutulup mide suyunda mevcudiyeti tesbit edilmiş ve değişik diagnostik yaklaşımlara yardımcı olabilecek tüm enzim gruplarını içermelidir.

ÖZET

Bu çalışmada, sağlıklı ve hasta şahıslardan elde edilen mide suyunu, pH değerlerine göre sınıflandırarak 5NT ve SOD enzim aktivitelerini araştırdık. Saklama ortamı ve zamanın mide suyundaki enzim aktivitelerini çok değişik seviyede etkilediğini bulduk.

Anahtar Kelimeler : Gastrik sıvı, 5'NT, Cu,Zn SOD.

SUMMARY

The Effects Of Temperature And Time Course On The Activities Of 5' Nucleotidase (5NT) And Superoxide Dismutase (SOD) Enzymes In Gastric Juice : An Experimental Study.

In this study, we classified gastric juices from healthy and diseased-patients according to the pH values and estimated 5NT and SOD activities in the groups : We found that environment and duration affect enzyme activities in various degree.

Key words : Gastric juice, 5'nucleotidase, Superoxide dismutase.

KAYNAKLAR

1. Pereslegine IA : Superoxide dismutase activity of digestive secretions. Ukr. Biokhim Zh. 62 (2) : 53-58, 1990.
2. Rogers K Roberts GM Williams GT : Gastric juice enzymes - an aid in the diagnosis of gastric cancer? The Lancet, May 23, 1124-1125, 1981.
3. Sun Y LW Oberley and Y Li : A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin. Chem. 34 (3) : 497-500, 1988.
4. Tietz NW : Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company, Canada. 705-720, 1986.