

İNSAN PLASENTASINDAN VE GEBE SERUMLARINDAN SAFLAŞTIRILMIŞ LÖSİN AMİNOPEPTİDAZ ÜZERİNE METAL+2 İYONLARININ ETKİSİ

Dr. Necati KAYA (x)
Dr. Vedat AKIN (xx)
Dr. Ebubekir BAKAN (xxx)

ÖZET :

Lösın aminopeptidaz, hamilelik boyunca kan serumunda normalin çok üstünde aktivite göstermektedir. çeşitli dokulardan saflaştırılan lösın aminopeptidazın özelliklerinin araştırılması ile enzimin kaynağına inilebilir. Bu amaçla önceden insan plasentasından modifiye bir metodla lösın minopeptidazı saflaştırdık. Ayrıca hamile kadın serumlarından da lösın aminopeptidazı kısmen saflaştırdık.

Bu çalışmada, insan plasentası ve gebe serumlarından saflaştırılmış lösın aminopeptidaz üzerine metal+2 iyonları ile etilendiamintetraasetik asid (EDTA) ve p-kloromerkürbenzoat (PCMB'nin etkileri araştırılmıştır. Sonuçta, bu maddelerin etkilerinin aynı doğrultuda olduğu gözlemlendi.

GİRİŞ VE AMAÇ :

Lösın aminopeptidaz (LAP: aminoasıl peptid hidrolaz EC 3.4.11.1), normal olarak serum, idrar ve safrada bulunan proteolitik bir enzimdir (1,2). Daha önce yapılan araştırmalarda bu enzimin birçok hastalıkta, serumda yükselmiş değerleri gözlemlenmiştir(3,4). Artışlar özellikle hepatobiliyer hastalıklarda daha fazladır(3,4). Gebeliğin son üç ayı boyunca serum LAP aktivitesi önemli derecede artar; ancak bu ilginç durumun fizyolojik sebebi açıklanamamıştır (3,4,5). Gebelik süresince artmış olan serum LAP aktivitesi, doğumdan 6-8 hafta sora normale döner (6). Gebelikteki bu istisnai durum hakkında çelişen görüşler vardır. Enzimin kord kanında bulunmaması nedeniyle plasental barriyeri aşmadığı ve dolayısıyla plasental kaynaklı olamayacağı görüşünü savunanların yanı sıra (7), tamamen plasentalan kaynaklandığı görüşünde olan araştırmacılar da vardır (8,9).

(x) Yrd. Doç. Dr. A.Ü. Kars Veteriner Fakültesi Dekan Yrd.

(xx) Uz. Dr. Numune Hastanesi Biyokimya Lab. Sorumlusu ERZURUM

(xxx) Doç. Dr. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı.

LAP, maksimum olarak 0.001-0.002 M Mn^{+2} veya Mg^{+2} aktive edilir. Ancak Mg^{+2} ile aktivasyon daha kısa sürede gerçekleşir (10-13), Zn^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , EDTA ve PCMB LAP'ın inhibitörleridir(10,13).

Bu inhibitörlerden Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Ca^{+2} inhibisyonları zayıftır. Cd^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} , EDTA ve PCMB'in inhibisyonları ise kuvvetlidir(12). Bu inhibitörler aktif bölgedeki Zn^{+2} iyonlarını bağlayarak inhibisyonu gerçekleştirirler(14).

Bu çalışmada, plasental ve serum LAP'ları üzerine aktivatör ve inhibitörlerin etkisi incelenmiş olup, gebelik süresince yükselen serum LAP'ın kaynağına yaklaşılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Mn^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Pb^{+2} , Ni^{+2} ve Cd^{+2} iyonlarının değişik konsantrasyonlarda (1,1.5,2,5 mM) çözeltileri tamponlanmış substrat çözeltisi içinde hazırlandı. Ayrıca aynı şekilde hazırlanan EDTA ve PCMB çözeltileri kullanılarak da aktivite ölçüldü. Aktivite, Goldbarg Rutenburg metodu ile tayin edildi (15).

BULGULAR

Plasental LAP (pLAP) v3serum LAP (sLAP) aktivitesine Mg^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının etkisi Şekil-1-2'de gösterilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi 2 mM Mg^{+2} konsantrasyonunda hem pLAP hem de sLAP maksimum aktivite göstermişlerdir. Mn^{+2} iyonları ile deaktivite artışı gözlemlendi. Ancak pLAP 1,5 mM Mn^{+2} konsantrasyonunda, sLAP ise 2 mM Mn^{+2} konsantrasyonunda maksimum aktivite verdiler.

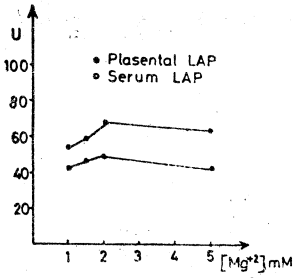
Fe^{+2} ve Co^{+2} iyonlarının aktivite üzerine olan etkisini araştırmak amacıyla yapılan deneylerden elde edilen eğriler (Şekil-3-4) incelendiğinde görüleceği gibi hem pLAP hem de sLAP aktivitesi Fe^{+2} iyonları ile önemli derecede inhibe edilmiştir. Co^{+2} iyonlarıyla ise, özellikle 1-1.5 mM'lık konsantrasyonlarda aktivite de artış gözlenmiştir. Ancak pLAP aktivitesindeki artış daha yüksektir.

Pb^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarına ait aktivite grafikleri (Şekil -5-6) incelendiği zaman görüleceği üzere, Pb^{+2} iyonları ile LAP aktivitesi inhibe edilmiştir (özellikle 5 mM Pb^{+2} konsantrasyonlarında). Zn^{+2} iyonlarının da enzim aktivitesini önemli derecede inhibe ettiği gözlemlendi.

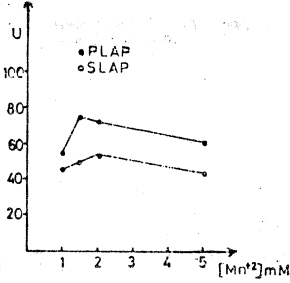
pLAP ve sLAP aktivitesine Cu^{+2} ile Ca^{+2} iyonlarının etkisi Şekil-7-8' de verilmiştir. Şekilden de anlaşılabacağı gibi Cu^{+2} iyonları enzim aktivitesini önemli derecede inhibe etmiştir. Ca^{+2} iyonlarıyla gözlenen inhibisyon da kaydedilmiştir.

Ni+2 ve Cd+2 iyonlarına ait aktivite grafikleri (Şekil-9-10) incelendiği zaman görüleceği üzere, her iki iyonla da önemli inhibisyonlar tesbit edilmiştir.

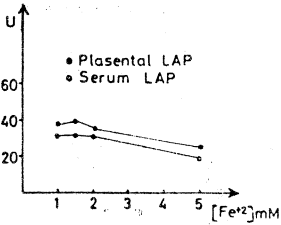
EDTA ve PCMB nin aktivite üzerine olan etkisini incelemek amacıyla yapılan deneylerden elde edilen eğriler (Şekil-11-12) incelendiğinde görüleceği gibi, her iki maddenin de enzim aktivitesi üzerinde önemli inhibisyonları vardır.



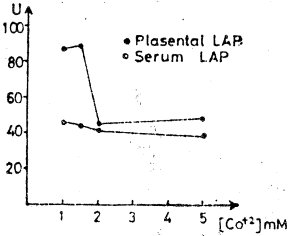
Şekil-1: LAP Aktivitesine Mg^{+2} iyonunun Etkisi



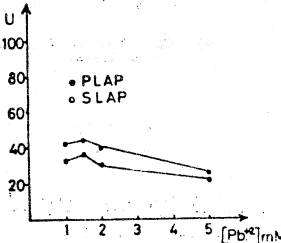
Şekil-2: LAP Aktivitesine Mn^{+2} iyonunun Etkisi



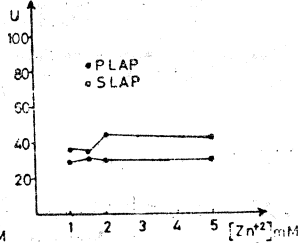
Şekil-3: LAP Aktivitesine Fe^{+2} iyonunun Etkisi



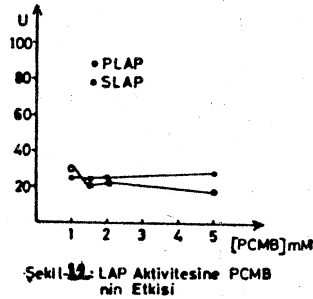
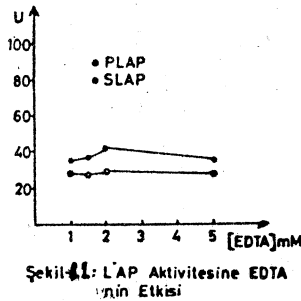
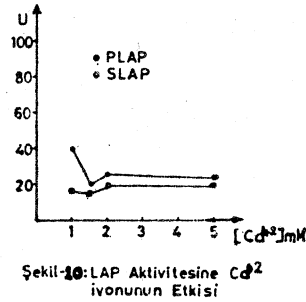
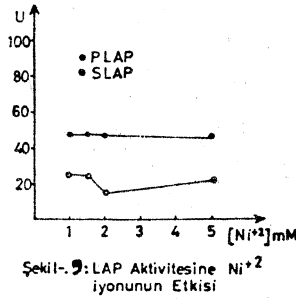
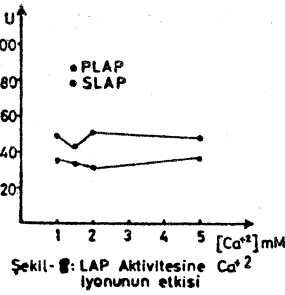
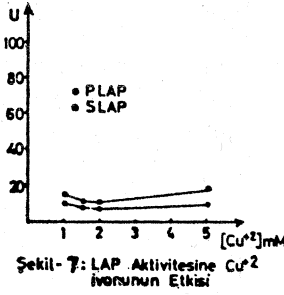
Şekil-4: LAP Aktivitesine Co^{+2} iyonunun Etkisi



Şekil-5: LAP Aktivitesine Pb^{+2} iyonunun Etkisi



Şekil-6: LAP Aktivitesine Zn^{+2} iyonunun Etkisi



TARTIŞMA :

Mg+2 ve Mn+2 iyonlarının 1,5-2 mM'lık konsantrasyonlarında maksimum aktivite gözlenmiştir. Bu iyonların diğer konsantrasyonlarında ise, ya aktivitede az bir artış ya da hiçbir değişiklik bulunamamıştır. Bu konuda çalışan diğer araştırmacılar da benzer sonuçları elde etmişlerdir (10,12,16).

Fe+2 iyonlarının önemli derecede inhibisyona neden olduğu görüldü. Bu etki özellikle 5 mM lık konsantrasyonlarında daha fazlaydı. Bunlar beklenen sonuçlardı. Fakat inhibisyon etkisi beklediğimiz Co+2 iyonlarıyla ise, özellikle 1-1.5 mM lık konsantrasyonlarda aktivite artışı bulduk. Bu durum önce bizi şaşırttı. Ancak derinlemesine bir literatür araştırması yaptığımızda gördük ki Co+2 iyonlarının aktivite üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını gözlemlendiği çalışmaların (17) yanı sıra Co+2 iyonlarıyla aktivite artışının bulunduğu çalışmalar da vardır(11).

Kasyonlardan Pb+2, Zn+2, Cu+2, Ca+2 Ni+2 ve Cd+2 un enzim aktivitesi üzerinde önemli inhibisyonlarını tesbit ettik. Ayrıca, EDTA ve PCMB çözeltilerinin de önemli derecede inhibisyona sebep oldukları gözlemlendi. Enzim inhibisyonu üzerinde tesbit ettiğimiz bu sonuçlar literatürde uygunluk içindedir (10-13, 17-20).

Bulgularımızdan da anlaşılacağı üzere, insan plasentasından safaştırdığımız LAP ile hamile kadınların serumlarından kısmen saflaştırdığımız LAP'ın aktivatör ve inhibitörlere karşı cevabı, çok küçük istisnalarla beraber aynı doğrultudadır. Bu da bizi, gebelik boyunca plasental gelişmeye paralel olarak çok yüksek seviyelere ulaşan sLAP'ının esas kaynağının plasenta olabileceği sonucuna götürmektedir.

SUMMARY :

THE EFFECTS OF METAL+2 IONS ON LEUCINE AMINOPEPTIDASE PURIFIED FROM HUMAN PLACENTA AND PREGNANCY SERA

The activity of leucine aminopeptidase is very high in serum during the pregnancy. Investigation on the properties of leucine aminopeptidase purified from other tissues assists to find their source. Thus, we purified leucine aminopeptidase from human placenta by a modified method. In addition, we purified leucine aminopeptidase from pregnancy sera.

The effects of metal+2 ions on leucine aminopeptidase purified from human placenta and pregnancy sera have been investigated in this study. In addition, the effects of p-chloromercuribenzoate (PCMB) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) have been investigated. As a result, the effects of metal+2 ions and other substances on leucine aminopeptidase purified from human placenta and pregnancy sera were identically.

KAYNAKLAR

1. Hafkenschied, J.C., Kohler, B.E.: A continuous method for the determination of leucine aminopeptidase in human serum with L-leucineamid as substrat. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23: 393-398, 1985.

2. Rutenburg, A.M., Goldbarg, J.A., Pineda, E.P.: Leucine aminopeptidase activity. *New Engl. J. Med.* 259 (10): 469, 1958.
3. Zimmerman, H.J., West, M.: Serum enzymes in gastrointestinal diseases *Med. Clin. North Amer.* 48: 189, 1969.
4. Eastman, R.D. *Biochemica Values in Clinical Medicine*, 5 the ed., John Wright and Sons LTD., 1975, P. 116-117.
5. Beckman, L., Grivea, M.: Variations in serum leucine aminopeptidase in pregnant women and in newborn children. *Acta Paediat Scand.* 54: 578, 1965.
6. Ibrahim, F.K., Fattah, M.M., Ramadan, M.A., et al.: Leucine aminopeptidase activity in maternal, cord blood and in placenta of normal pregnancy and in pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol-Scand.*, 65(1): 45-47, 1976.
7. Blum, M., Sirota, P.: Serum cystine aminopeptidase and leucine aminopeptidase activity in women with benign and malignant uterine and ovarian tumors. *Isr. J. Med. Sci.* 13 (9): 875-880, 1977.
8. Mizutani, S., Sumi, S., Oka, K., et al.: In vitro degradation of oxytocin by pregnancy serum, placental subcellular fractions and purified placental aminopeptidases. *Exp. Clin. Endocrinol.* Vol. 86, No. 3, 310-316, 1985.
9. Fein, A.: Proteolytic activity in the placenta, decidua and postimplantation embryos of the rat. *Isr. J. Med. Sci.* 21: 394-396, 1985.
10. Wart, H.E., Lin, S.H.: Metal binding stoichiometry and mechanism of metal ion modulation of the activity of porcine kidney leucine aminopeptidase, *Biochemistry* 20: 3682-3689, 1981.
11. Ledeme, N., Fiquet, O.V., Hennen, G., et al.: Human liver L-leucine aminopeptidase: Evidence for two forms compared to pig liver enzyme. *Biochim.* 65: 397-404, 1983.
12. Ledeme, N., Hennen, G., Fiquet, O., et al.: Purification and enzymatic properties of L-leucine aminopeptidase from swine liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 13: 660 (2) 262-70, 1981.
13. Bryce, G.F., Rabin, B.R. The function of the metal ion in leucine aminopeptidase and the mechanism of action of the enzyme. *Biochim. j.* 90: 513, 1964.
14. O'Brien, D., Ibbott, F.A., Roberson, D.O. *Laboratory Manual of Pediatric Micro-Biochemical Techniques*, 4 th ed. London, 1968, p. 208-210.
15. Frankel, S., Reitman, S., Sonnenwirth, A.C. *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*, 7 th ed. Saint Louis, C.V. Mosby Co. Vol. I, 1970, 136-138.

16. Allen, M.P., Yamada, A.H., Carpenter, F.H.: Kinetic parameters metal-substituted leucine aminopeptidase from bovine lens. *Biochemistry* 22 (16): 3778-3783, 1983.
17. Smith, E.L., Hill, R.L.: Leucine aminopeptidase, Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K. (ed) , *The Enzyme*, Vol. 4, Academic Press, New York, 1960, p. 37-61.
18. Kohno, H., Kanda, S., Kanno, T.: Immunoaffinity purification and characterization of leucine aminopeptidase from human liver. *J. Biol. Chem.* 261 (23): 10744-10748, 1986.
19. Burch, R.E., Williams, R.V., Henry, K.J., et al.: Serum and tissue enzyme activity and trace-element content in response to zinc deficiency in the pig. *Clin. Chem.* 21 (4): 568-577, 1975.
20. Phillpotts, C.J., Tyldesley, W.F.: Inhibition of leucine aminopeptidase (LAP) activity in the small intestines of rats exposed to dietary cadmium. *Toxicology Lett.* 34 (2): 271-275, 1986.