

İNSAN PLASENTASI VE GEBE SERUMLARINDAN SAFLAŞTIRILMIŞ LÖSİN AMİNOPEPTİDAZIN MAKSİMUM AKTİVİTESİ İÇİN EN UYGUN ŞARTLARIN ARIŞTIRILMASI

Dr. Necati KAYA (x)

Dr. Vedat AKIN (xx)

ÖZET

Bu çalışmada, önceden insan plasentasından ve gebe serumlarından saflaştırılmış lösün aminopeptidazın aktivitesi için en uygun şartlar araştırıldı. Sonuçta, hem plasental lösün aminopeptidazın hem de serum lösün aminopeptidazın aynı şartlarda maksimum aktivite gösterdikleri gözlemlendi.

GİRİŞ VE AMAÇ

Lösün aminopeptidaz (LAP: EC 3.4.11.1) karaciğer, pankreas, böbrek ve ince bağırsakta yüksek aktiviteli olmak üzere genellikle insan dokularının hepsinde bulunur (1,2,3,4,5). Daha önce yapılan araştırmalarda bu enzimin birçok hastalıkta, serumda yükselmiş değerleri gözlenmiştir (6,7). Artışlar özellikle hepatobiliyer hastalıklarda daha fazladır (6,7). Gebeliğin son üç ayı boyunca serum LAP (sLAP) aktivitesi önemli derecede artar; ancak bu ilginç durumun fizyolojik sebebi açıklanamamıştır. (6,7,8). Gebelikteki bu istisnai durum hakkında çelişen görüşler vardır. Plasental kaynaklı olamayacağı görüşünü savunanların yanı sıra (9), tamamen plasentaldan kaynaklandığı görüşün olan araştırmacılar da vardı (10,11).

Bu çalışmada, plasental LAP (pLAP) ve sLAP'ların maksimum aktiviteleri için en uygun şartlar (pH, substrat konsantrasyonu, sıcaklık) araştırılmıştır. Böylece gebelik süresince yükselen LAP'ın kaynağına yaklaşılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Enzim aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisini bulmak için, 0.05-2 mM arasında değişen konsantrasyonlarda substrat (L-lösil-naftilamin) çözelti-

(x) Yrd. Doç. Dr. A.Ü. Kars Vet. Fak. Dekan Yardımcısı

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

leri kullanılarak ve diğer deney şartarı aynı bırakılarak aktivite tayinleri yapıldı. Michealis-Mentan ile Lineweaver Burk grafikleri çizilerek Km değerleri bulundu.

Enzim aktivitesine pH'ın etkisini tesbit etmek için bir seri glisin, fosfat, sitrat ve tris-HCl tamponları değişik pH lara (pH 3,5,5, 7, 7.4, 8,9, 10, 11, 12) ayarlandı. B tamponlar kullanılarak aktivite tayin edildi. Bunlara ilaveten enzim aktiviteleri 25,30,37,50,55,58,60 ve 70°C sıcaklıkları seçilerek tayin edildi. Aktivite tayinleri, Goldbarg-Rutenburg metoduna göre yapıldı (12).

BULGULAR

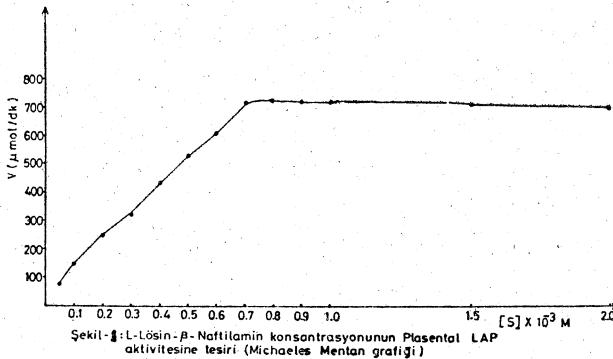
Öndört farklı substrat konsantrasyonu ile enzimatik aktivite tayin edildi. Sonuçlara göre çizilen Michealis-Mentan ve Lineweaver Burk grafik leri Şekil-1,2,3, 4'de verilmiştir. Şekil-2'de görüldüğü gibi pLAP için Km: 1.25×10^{-3} M olarak hesaplandı. Şekil-4'de görüldüğü üzere, sLAP için Km: 1×10^{-3} M olarak hesaplandı.

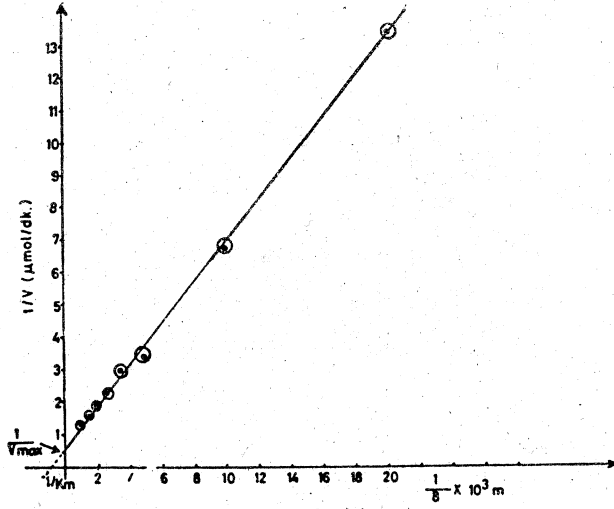
Farklı pH larda tampon çözeltiler kullanılarak enzim aktivitesi tayin edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil-5'de gösterilmiştir. Şekilden de görülebileceği gibi, hem pLAP hem de sLAP, optimum pH sı 8.0 dır.

Çeşitli sıcaklıklar seçilerek enzim aktivitesi tayin edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil-6'da verilmiştir. PLAP'ın 50°C de, sLAP ın ise 37°C de optimum aktivite gösterdikleri gözlemlendi. 60°C de ise heriki enzim içinde aktivite kaydedilmedi.

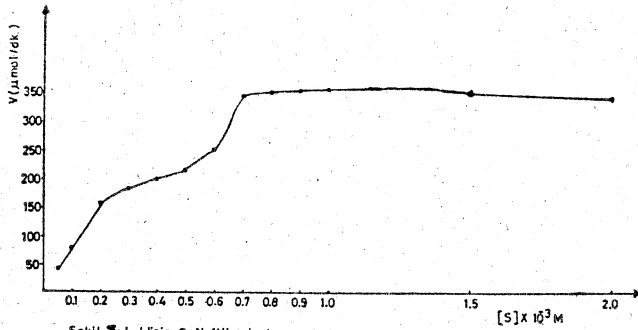
TARTIŞMA

Enzimin optimum pH sı tesbit etmek amacıyla yaptığımız deneylere ait eğriler incelendiği zaman görüleceği gibi, hem pLAP hem de sLAP inoptimum pH sı 8.0 dır. Bu değer, daha önce yapılmış olanbenzeri deneylerde elde edilen değerlere uyum göstermektedir. Söz konusu çalışarlarda enzimin optimum pH sı 7-9 arasında bulundu ğu bildirilmektedir (13).

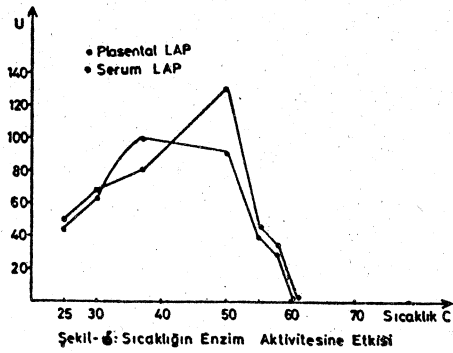
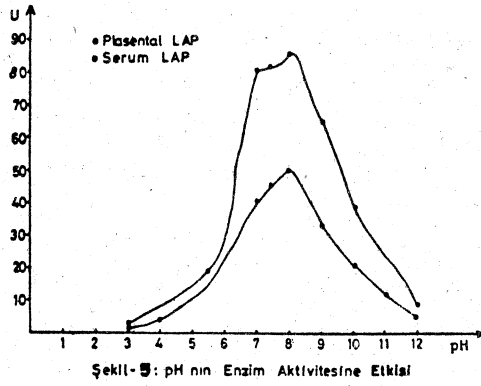
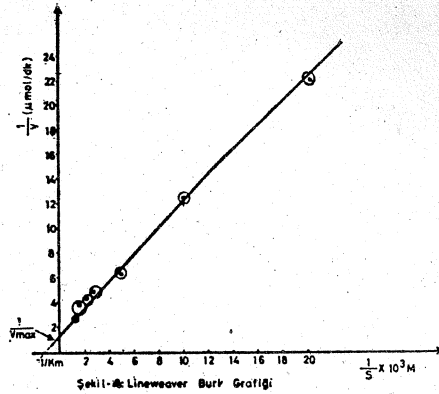




Şekil-2: Lineweaver-Burk Grafiği



Şekil-3: L-Lösin- β -Naftilamin konsantrasyonunun SLAP aktivitesine tesiri (Michaelis-Menten grafiği)



Değişen sıcaklıklarda enzim aktivitesi incelendi. PLAP'ın 50°C de, sLAP'ının da 37°C de optimum aktivite gösterdiği gözlemlendi. 60°C de ise heriki enzim için de aktivite kaydedilmedi (Şekil-6). Bu değerler literatürle uygunluk göstermektedir (14).

Enzimin L-lösil-β-naftilamin hidroklorid substratı için Km değeri, pLAP ile sLAP için ayrı ayrı hesaplandı. PLAP için Km değeri 1.25×10^{-3} M ve sLAP için de 1×10^{-3} M olarak bulundu. Nelly ve arkadaşları LAP'ın Km değerlerini, insan ve domuz karaciğerinden saflaştırdıkları enzim için ayrı ayrı hesaplamışlar ve insan enzimi için 1.97×10^{-2} M, domuz enzimi için de 2.85×10^{-2} M bulmuşlardır. Ancak bu Km değerlerini L-lösinamid substratı için hesaplamışlardır (14,15). Buradan da görüldüğü gibi, enzimin Km derecesi substrata ve doku kaynağına göre değişmektedir.

Bulgularımızdan da görüleceği üzere, pLAP ile sLAP'ın maksimum aktivite'leri aynı şartlarda sağlanmıştır. Bu durum, gebelik boyunca plasental gelişmeye paralel olarak çok yüksek seviyelere ulaşan sLAP'ın esas kaynağının placentada olabileceği görüşünü desteklemektedir.

SUMMARY :

THE STUDY ON THE APPROPRIATE CONDITIONS FOR MAXIMUM ACTIVITY OF LEUCINE AMINOPEPTIDASE PURIFIED FROM HUMAN PLACENTA AND PREGNANCY SERA

In this study, the appropriate conditions for maximum activity of leucine aminopeptidase purified from human placenta and pregnancy sera have been investigated. As a result, both placental leucine aminopeptidase and serum leucine aminopeptidase showed maximum activity in the same conditions.

KAYNAKLAR

1. 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.
2. Kohno, H., Kanda, S., Kanno, T.: Immunoaffinity purification and characterization of leucine aminopeptidase from human liver J. Biol. Chem. 261 (23): 10744-10748, 1968.
3. Hafkenschied, J.C., Kohler, B.B.: A continuous method for the determination of leucine aminopeptidase in human serum with L-leucineamid as substrate. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23: 393-398, 1985.
4. Fischbach, F. A Manual of Laboratory Diagnostic Tests, 2th ed. Lippincott Co., Philadelphia, 1984, p. 180-182.

5. Pineda, E.P., Goldbarg, J.A., Rutenburg, A.B.: Serum leucine aminopeptidase in pancreatic and hepatobiliary diseases. *Gastroenterology*, 38: 698-712, 1960.
6. Zimmerman, H.J., West M.: Serum enzymes in gastrointestinal diseases. *Med. Clin. North. Amer.* 48:189, 1969.
7. Eastman, R.D., *Biochemical Values in Clinical Medicine*, 5 th ed., John Wright and Sons LTD., 1975, p. 116-117.
8. Beckman, L., Grivea, M.: Variations in serum leucine aminopeptidase in pregnant women and in newborn children, *Acta Paediat Scand* 54: 578, 1965.
9. 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.
10. 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.* 86 (3): 310-316, 1985.
11. Fein, A.: Proteolytic activity in the placenta, decidua and postimplantation embryos of the rat. *Isr. J. Med. Sci.* 21: 394-396, 1985.
12. Frankel, S., Reitman, S., Sonnen Wirth, A.C. *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*, 7 th ed. Saint Louis, V.C. Mosby Co. Vol. I, 1970, p. 136-138.
13. 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,
14. Ledeme, N., Fiquet, O.V., Hennon, G., et al.: Human liver L-leucine aminopeptidase: Evidence for two forms compared to pig liver enzyme, *Biochim.* 65: 397-404, 1983.
15. Ledeme, N., Hennon, G., Fiquet, O., et al.: Purification and enzymatic properties of an L-leucine aminopeptidase from swine liver. *Biochem. Biophys. Acta.* 13: 660 (2): 262-270, 1981.