

## Gebelik Süresince Çinko Verilen Tuj Irkı Koyunlarda Serum Lösin Aminopeptidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Onur ATAKIŞI\* Ayla ÖZCAN\* Emine ATAKIŞI\* Metin ÖĞÜN\* Necati KAYA\*

\* Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kars - TÜRKİYE

Yayın Kodu: 2006/37-A

### Özet

Lösin aminopeptidaz (LAP) aktif bölgesinde çinko atomuna sahiptir ve gebelikte önemli rolleri bulunmaktadır. Bu çalışmada Tuj ırkı koyunlara gebelikleri süresince dışardan ilave olarak verilen çinkonun, gebeliğin serum LAP aktivitesindeki değişimlere etkisi araştırmak amaçlanmıştır. Çalışmada materyal olarak 3 yaşlı 20 adet Tuj ırkı koyun kullanıldı. Hayvanlar kontrol (n=10) ve deneme (n=10) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Deneme grubundaki hayvanlara kontrol grubuna ek olarak 30 mg/kg çinko verildi. Gebelik boyunca ve gebelikten sonra hayvanlardan kan numuneleri alınarak, 15 dakika 3000 rpm' de santrifügasyona tabii tutuldu. Gebelik (5 ay süresince) ve doğumdan sonra alınan serum numunelerinde LAP aktivitesi ölçüldü. Çalışmada deneme grubundan elde edilen LAP değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark bulunamadı. Aylara göre LAP aktivitesinde ise en yüksek değerler gebeliğin son üç ayında tespit edildi.

Her iki grupta da gebeliğin üçüncü ayından doğuma kadar istatistiksel olarak  $p < 0.001$  düzeyinde artışların olduğu, ayrıca gebelik süresince artan LAP aktivitesinin doğumdan sonra tekrar azalmaya başladığı gözlemlendi. Sonuç olarak gebelik süresince ilave olarak verilen çinkonun LAP aktivitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görüldü.

**Anahtar sözcükler:** Koyun, Gebelik, Çinko, Lösin Aminopeptidaz.

### Determination of Serum Leucine Aminopeptidase Activity in Zinc Given Tuj Sheep During Pregnancy

#### Summary

Leucine aminopeptidase (LAP) has a zinc atom in its active site and this enzyme has important roles in the pregnancy. This study was aimed to investigate alterations on the activity of serum leucine aminopeptidase and the effect of zinc supplementation on the activity of leucine aminopeptidase in Tuj breed ewes during pregnancy. Twenty Tuj breed ewes at 3 years of age were used as animal material. The animals were divided into 2 equal groups including control (n=10) and the group receiving 30 mg/kg of zinc daily for average of 150 days (n=10). The blood samples from the groups were monthly collected and were centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. The activity of LAP in the serum samples were measured during the pregnancy (for five months) and after lambing. In this study, LAP activity between control and zinc-received groups was not significant. The LAP activity of both groups were found to be increased in the last third month of pregnancy.

The activity of LAP increased during the last third month of pregnancy in both groups. In addition, the observed increase in LAP activity during the last 3 months of pregnancy declined again following the lambing. The results of this study showed that oral administration of zinc did not change the activity leucine aminopeptidase during the pregnancy compared to control.

**Keywords:** Sheep, Pregnancy, Zinc, Leucine Aminopeptidase.

---

#### İletişim (Correspondence)

Phone: +90 474 2426800/1160

e-mail: onuratakisi@hotmail.com

## GİRİŞ

Amino peptidazlar, proteinlerin amino terminalinden amino asitlerin ayrılmasını katalize eden enzim sınıfı olup, hayvan ve bitkilerde birçok amino peptidaz varlığı belirlenmiştir. Bu tür amino peptidazlar protein matürasyonu, hormon olmayan proteinlerin ve hormonal peptidlerin yıkımı için önem taşımaktadır <sup>1</sup>. Bir ektopeptidaz olan lösin amino peptidaz (LAP; E.C. 3.4.11.1); yapısında lösin, izolösin, valin ve ayrıca düşük miktarda aromatik aminoasit bulunduran proteolitik özelliğe sahip bir enzimdir <sup>2</sup>. LAP aktivitesinin hücre siklusunun kontrolü ile ilişkili olduğu ayrıca birçok patolojik durumda önemli rol oynadığı kaydedilmiştir <sup>1,3,4</sup>.

Lösin amino peptidaz'ın yapısında çinko bulunduran bir metalloenzim olduğu bilinmektedir <sup>5</sup>. Çinko birçok proteinin yapısında yer aldığı gibi 300'den fazla enzimin aktivitesi için de gerekli bir elementtir <sup>6</sup>. Birçok canlıda, üreme fonksiyonunda çok özel bir yere sahip olan çinkonun yetersizliğinde cinsel gelişim bozukluklarının ortaya çıktığı, özellikle gebelikteki eksikliğin normal embriyonal gelişimi, fetal büyümeyi ve gebelik süresini etkilediği bildirilmektedir <sup>7,8</sup>. Koyunlarda sınırlı sayıda çalışma bulunmakla birlikte gebelikte serum LAP aktivitesinde artışların olduğu, ayrıca çinko ile bu enzimin aktivitesi arasında ilişki olduğu kaydedilmektedir <sup>9-11</sup>.

Bu nedenle yapılan bu çalışmada gebelik süresince LAP aktivitesindeki değişimleri ölçmek ve dışardan ilave olarak verilen çinkonun LAP aktivitesi üzerine etkisinin olup olmadığını belirlemek amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Araştırmada materyal olarak canlı ağırlık ortalaması  $47.87 \pm 2.83$  kg, yaklaşık 3 yaşlı 20 adet Tuj ırkı koyun kullanıldı. Deneme boyunca tüm hayvanlar ad libitum olarak kuru ot ve konsantre yemle beslendi. Doğum zamanları arasında herhangi bir fark olmasını ortadan kaldırmak için koyunlar senkronize edildi. Bu amaçla hayvanların östrüs göstermelerini sağlamak için 40 mg flogeston asetat (FGA) içeren vajinal sünger kullanıldı. Süngerler 14. günde çıkartılarak her koyuna 400 IU gonadotropin (PMSG) kas içi enjekte edildi. Enjeksiyondan sonra östrüs gösteren koyunları saptamak amacıyla arama koçu kullanıldı.

Östrüs gösteren koyunlar deneme ve kontrol olmak üzere 10'arlı iki gruba ayrıldı. Daha sonra östrüs

gösteren koyunlara koç katımı yapıldı. Deneme grubundaki hayvanlara ilave olarak günlük 30 mg elementel çinko gelecek şekilde  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  oral yolla verildi. Koç katımından sonra 1 defa, gebelik süresince her ay ve gebelikten 1 ay sonra hayvanların V. jugularislerinden kan numuneleri alındı. Numuneler 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı.

Serum LAP aktivitesi Goldbarg-Rutenburg (G-R) tarafından bildirilen kimyasal metot kullanılarak, UV spektrofotometre ile kolorimetrik olarak belirlendi <sup>12</sup>. Metot, L-Lösin- $\beta$ -Naftilaminin sulu ortamda LAP yardımıyla Lösin ve  $\beta$ -Naftilamin'e parçalanması esasına dayanmaktadır. Kullanılan çözeltiler; L-lösil-beta-naftilamin hidroklorid ( $6.85 \times 10^{-4}$  M, pH 7.1), triklorasetik asit (%40), sodyum nitrit (%0.1), amonyum sulfomat (%0.5) n-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorid (%0.05) ve beta-naftilamin (%3.6) standard çözeltisi hazırlanarak metotta belirtildiği şekilde prosedür uygulanarak 560 nm'de optik dansiteleri su körüne karşı okundu ve standart eğriden değerler hesaplandı.

Elde edilen verilerin istatistiksel analizlerinin hesaplanmasında SPSS 10.0 windows paket programından yararlanıldı. Gruplarda ortalama değerler arasındaki farklılıklar varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi. Sonuçlar; ortalama  $\pm$  standart hata ( $\bar{x} \pm Sx$ ) olarak verildi.

## BULGULAR

Kontrol ve deneme grubunda saptanan LAP aktivitesinin ortalama değerleri ile standart sapmaları Tablo-1'de verilmiştir. Kontrol grubunda koç katımından sonra, gebeliğin 1. ile 5. ayları ile gebelikten 1 ay sonra saptanan LAP değerleri sırasıyla;  $12.58 \pm 0.65$ ;  $12.81 \pm 0.55$ ;  $12.20 \pm 0.61$ ;  $16.82 \pm 0.94$ ;  $18.86 \pm 0.88$ ;  $24.9 \pm 1.82$ ;  $9.45 \pm 0.77$  ile deneme grubunda ise sırasıyla;  $12.48 \pm 0.74$ ;  $12.88 \pm 0.80$ ;  $11.01 \pm 0.58$ ;  $18.62 \pm 1.07$ ;  $18.04 \pm 1.22$ ;  $18.83 \pm 1.30$ ;  $7.90 \pm 0.75 \mu g/dl$  olarak bulunmuştur. Çalışmada kontrol ve deneme gruplarında en yüksek LAP aktivitesi gebeliğin 3, 4 ve 5. aylarında saptandı. Bu aylarda izlenen LAP değerleri gebeliğin ilk iki ayı ve doğum sonrasına göre istatistiksel olarak yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ). Yine her iki grupta da gebeliğin ilk aylarında saptanan LAP aktivitesinin doğumdan 1 ay sonra saptanan değerlere oranla yüksek ( $p < 0.001$ ) olduğu görüldü.

**Tablo 1.** Tuj ırkı koyunlarda gebelikte ve sonrasında lösin aminopeptidaz aktivitesi ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )**Table 1.** The activity of leucine aminopeptidase during pregnancy and after pregnancy in Tuj sheep ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )

DÖNEMLER	KONTROL (n: 10) LAP ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	DENEME (n:10) LAP ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )
Koç katımından sonra	12.58 $\pm$ 0.65 <sup>c</sup>	12.48 $\pm$ 0.74 <sup>b</sup>
Gebeliğin 1. ayı	12.81 $\pm$ 0.55 <sup>c</sup>	12.88 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup>
Gebeliğin 2. ayı	12.20 $\pm$ 0.61 <sup>c,d</sup>	11.01 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>
Gebeliğin 3. ayı	16.82 $\pm$ 0.94 <sup>b</sup>	18.62 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>
Gebeliğin 4. ayı	18.86 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>	18.04 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>
Gebeliğin 5. ayı	24.90 $\pm$ 1.82 <sup>a</sup>	18.83 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>
Doğumdan 1. ay sonra	9.45 $\pm$ 0.77 <sup>d</sup>	7.90 $\pm$ 0.75 <sup>c</sup>

a, b, c, d: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.001$ )

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Proteinlerin N-terminal amino grubunu uzaklaştıran aminopeptidazların aktif bölgelerinde çift metal merkezleri bulunmaktadır<sup>13</sup>. Bunlar biyolojik olarak aktif rolü olan peptidleri hidroliz ederek hücre büyümesi ve farklılaşmasının kontrolünde etkili olurlar. Plasental LAP, uterus kasılmasında rol alan oksitosin molekülünün N-terminal zincirinin ayrılmasından sorumlu bir enzim olduğu için oksitokinaz adı da verilmektedir<sup>14,15</sup>. Yapılan bir çalışmada maternal serum plasental LAP aktivitesinin spontan erken doğum vakalarında azaldığı bildirilmiş, bu enzimin kimi erken doğum vakalarının teşhisi için klinik olarak bir belirteç olabileceği ileri sürülmüştür<sup>16</sup>. Yamahara ve ark.<sup>17</sup> tarafından yapılan bir çalışmada, gebelik süresince plasental dokusunda ve serumda LAP aktivitesi ölçülmüş ve gebelikte birlikte bir LAP aktivitesi artışı olduğu kaydedilmiştir. Yapılan çalışmada gebelik süresince elde edilen serum LAP değerlerinin gebeliğin 3. ayından itibaren artmaya başladığı ve bu artışın doğuma kadar devam ettiği gözlemlendi. Koyunlarda yapılan bir çalışmada serum LAP aktivitesinde gebeliğin 50. gününden itibaren artışların olduğu ve bu artışın doğuma kadar artarak devam ettiği ayrıca LAP ölçümünde kullanılan reaktiflerin ucuz olmasından dolayı gebelik tanısında ekonomik ve güvenilir bir yöntem olabileceği belirtilmiştir<sup>9</sup>. Koyunlarda yapılan başka bir çalışmada gebeliğin idrar LAP aktivitesinin 50. 100 ve

145. gününde arttığı ve doğumdan sonra bu düzeyin tekrar azaldığı kaydedilmiştir<sup>10</sup>.

Yapılan bu çalışmada gebelik süresince artmış olan LAP aktivitesinin doğumdan sonra azalma eğilimi gösterdiği; doğum sonrası değerlerin gebelikte saptanan değerlerden daha düşük olduğu saptandı. Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda gebelikte artmış olan LAP aktivitesinin gebelikten sonra normal düzeylere indiği gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada da doğumdan sonra gebelik dönemine göre düşük düzeylerde saptanan LAP aktivitesi yapılan diğer çalışma verileriyle<sup>9,10</sup> uyum göstermektedir.

Normal gebelikte ilgili LAP aktivitesindeki değişimlerin birçok çalışmada bildirilmesine<sup>9,10,17</sup> rağmen, gebelik süresince ilave olarak yeme katılan çinkonun enzim üzerine etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çinkonun, gerek enzimin yapısında yer alması<sup>11,13</sup> gerekse de gebelik üzerine olan etkileri<sup>7,8</sup> dolayısı ile yapılan çalışmada bu enzimin aktivitesinde bir değişime yol açması beklenmekteydi. Ancak, çinko verilen deneme grubundan elde edilen değerler, kontrol grubuna göre yüksek gibi görünse de istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Elde edilen bu bulgular, besin desteği olarak verilen çinkonun gebelik dönemindeki LAP aktivitesine herhangi bir etkisinin olmadığını açıkça göstermektedir.

Sonuç olarak, gebelik süresince yeme katılan 30 mg çinkonun serum LAP aktivitesinde istatistiksel olarak değişime neden olmadığı; her iki grupta da gebeliğin üçüncü ayından doğuma kadar istatistiksel olarak  $p < 0.001$  düzeyinde artışların görüldüğü ve gebelik süresince artan LAP aktivitesinin doğumdan sonra tekrar azalmaya başladığı gözlemlendi.

## KAYNAKLAR

1. Taylor A: Amino peptidases: Structure and function. *FASEB J*, 7, 290-298, 1993.
2. Kaplan A, Ruark SR: Serum leucine amino peptidase activity normal newborns and infants. *Am J Dis Child*, 106-161, 1963.
3. Arima J, Uesugi Y, Uraji M, Yatsushiro S, Tsuboi S, Iwabuchi M, Hatanaka T: Modulation of streptomyces leucine amino peptidase by calcium: Identification and functional analysis of key residues in activation and stabilization by calcium. *J Biol Chem*, 4, 1-25, 2006.
4. Guth PH: Serum leucine amino peptidase: Source and diagnostic value. *Am J Gastroenterol*, 40:620-627, 1963.
5. Ralph Himmelhoch S: Leucine amino peptidase: A zinc metalloenzyme, *Arch Biochem Biophys*, 134 (2): 597-602, 1969.
6. Yousef MI, El Hendy HA, El-Demerdash FM, Elagamy EI: Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein

- electrophoretic behavior in growing rats. *Toxicol*, 175, 223-234, 2002.
7. **Stallard L, Reeves PG:** Zinc deficiency in adult rats reduces the relative abundance of testis- specific angiotensin-converting enzyme mRNA. *J Nutr*, 127, 25-29,1997.
  8. **Castillo-Durán C, Marín VB, Alcazar LS, Iturralde H, Ruz MO:** Controlled trial of zinc supplementation in Chilean pregnant adolescents. *Nutr Res*, 21, 715-724, 2001.
  9. **Kaya N, Bekyürek T, Utlü N, Çolak A:** Gebe koyunlarda lösin aminopeptidaz aktivitesinin tayini. *Tr J Vet Anim Sci*, 18:265-268, 1994.
  10. **Özcan A, Kaya N, Karapehlivan M:** Determination of urine leucine aminopeptidase activity in pregnant sheep. *Israel J Vet Med*, 54 (2): 36-38,1999.
  11. **Himmelhoch S:** Leucine aminopeptidase: A zinc metallo-enzyme. *Arch Biochem Biophys*, 134, 597-602,1969.
  12. **Goldbarg JA, Pineda EP, Rutenburg AM:** The measurement of activity leucine aminopeptidase in serum, urine, bile, and tissues. *Am J Clin Pathol*, 32, 571-575, 1959.
  13. **Sakiyama H, Ono K, Suzuki T, Tone K, Uneo T, Nishida Y:** Aminopeptidase function of dinuclear zinc (II) complexes with chiral dinucleating ligands: Stereoselectivity by chiral substrate recognition. *Inorganic Chem Communications*, 8, 372-374, 2005.
  14. **Kobayashi H, Nomura S, Mitsui T, Ito T, Kuno N, Ohno N, Kadomatsu K, Muramatsu T, Nagasaka T, Mizutani S:** Tissue distribution of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during mouse pregnancy. *Histochem Cytochem*, 52 (1): 113-122, 2004.
  15. **Nomura S, Ito T, Yamamoto E, Sumigama S, Iwase A, Okada M, Shibata K, Ando H, Ino K, Kikkawa F, Mizutani S:** Gene regulation and physiological function of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during pregnancy. *Biochim Biophys Acta*, 1751 (1):19-25. 2005.
  16. **Kozaki H, Itakura A, Okamura M, Ohno M, Wakai K, Mizutani S:** Maternal serum placental leucine aminopeptidase (P-LAP)/oxytocinase and preterm delivery. *Int J Gynaecol Obstet*, 73, 207-213, 2001.
  17. **Yamahara, N, Nomura S, Suzuki T, Itakura A, Ito M, Okamoto T, Tsujimoto M, Makazato H, Mizutani S:** Placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in maternal serum and placenta during normal pregnancy. *Life Sci*, 66, 1401-1410, 2000.