

PREİNKÜBASYON İSİSİNİN VE BAZI METAL İYONLARININ İNSAN HUMOR VİTREUS ARGİNAZI ÜZERİNE ETKİLERİ*
The effects of preincubation temperature and some metal ions on human vitreous arginase

M Ferit GÜRSU¹, H Ergin DÜLGER², Sema OZAN³, Şendoğan GÜLEN⁴

Özet

Amaç : Üre döngüsünün en son basamağını katalize eden arginaz, Mn iyonlarına kofaktör olarak gereksinim duyan bir enzimdir. İnsan eritrosit ve karaciğerinde arginazın +2 değerlikli Mn iyonlarıyla 50-55°C preinkübasyonu sonucu maksimum aktivite elde edilmiştir. İnsan humor vitreus arginazi üzerine preinkübasyon ısısı ve metal iyonlarının etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Arginaz aktivitesi ölçümünün esası, L-argininin arginazla hidrolizi tarafından oluşan ürenin spektrofotometrik TDMU yöntemiyle ölçümüne dayanır.

Bulgular: İnsan humor vitreus arginazi için preinkübasyon ısısı 40°C olarak bulunmuştur. Preinkübasyonun 50 - 55°C de yapılması % 5 - 7 dolaylarında aktivite kaybına neden olmuştur. Enzimin 40°C de Pb, Hg, Ag, Cu ve Sn gibi metallerle preinkübasyonu % 80 - 85, Ba, Fe, Cr ve Ca ile % 60 - 70 ve Mg ve Co ile % 30 - 40 dolaylarında inhibisyona neden olmuştur. Mn iyonları enzimin aktivitesini % 36 oranında arttırmıştır. Ni enzim aktivitesini değiştirmemiştir. Mn inkübasyon ortamına ilave edildiğinde aktivasyon % 12 dolaylarına düşmüştür.

Sonuç: Sonuç olarak, diğer doku arginazları Mn iyonları yokluğunda hemen hemen inaktif durumda iken vitreus arginazi Mn iyonları yokluğunda da belirgin olarak aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Arginaz, İyonlar, Metaller, Vitreus

Summary

Purpose : Arginase is an enzyme which catalyses the last step of urea cycle and needs Mn ions as a cofactor during this procedure. It has been reported that the maximum activity of arginase in human erythrocytes and liver was obtained in the presence of Mn ions at 50-55°C preincubation temperature. The aim of this study was to investigate effects of preincubation temperature and some metal ions on human vitreous arginase.

Material and methods: The principle that determines the arginase activity is spectrophotometric measurement of urea produced by the hydrolysis of L-arginine by arginase. The spectrophotometric determination is made according to TDMU method.

Results: Preincubation temperature for human vitreous humor arginase was found to be 40 °C. The arginase activity decreased around 5-7 % when the preincubation temperature was increased to 50 - 55°C. The preincubation of the enzyme at 40 °C with some metal ions caused a decrease in its activity. The inhibition of the enzyme was around 80 - 85 % with Pb, Hg, Ag, Cu and Sn, 60 - 70 % with Ba, Fe, Cr, Co and 30 - 40 % with Mg and Co. In contrast, Mn ions increased the enzyme activity by 36 %. Ni ions had no effect on the enzyme activity. When Mn ions were added to the incubation medium, the arginase activity was decreased by 12 %.

Conclusion: It was determined that vitreous arginase was active even in the absence of Mn ions, whereas under these circumstances other tissue arginases were almost inactive.

Key Words: Arginase, Metals, Ions, Vitreous body

* XV. Gevher Nesibe Tıp Günleri, 27-30 Mayıs 1997
 Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi ELAZIĞ
 Biyokimya. Doç.Dr.¹, Adli Tıp. Doç.Dr.²,
 Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya.Prof.Dr.³,
 Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi EDİRNE
 Biyokimya.Prof.Dr.⁴

Geliş tarihi: 28 Mayıs 1997

Göz küresi dıştan içe, herbiri çeşitli katlardan oluşan üç tabakadan yapılmıştır. En dıştaki tabaka kornea ve sklera, ortadaki damardan zengin tabaka ise uveadır. En içteki tabaka retinadır(1). Göz küresi içerisinde ön kamara, arka kamara ve vitreus olmak üzere üç bölüm ve lens bulunur.

Vitreusun yapısı, su, protein ve hyalüronik asit

olarak bilinen üç temel maddeden oluşmaktadır(2). Bunların yanında vitreusda glisin, hidroksiprolin, prolin ve sistin'in varlığı da gösterilmiştir(3). Postmortem vitreusda Na, K ve üre azotu ölçümleri yapılmış, ölüm zamanının tespitinde doğru sonuçlar elde edilmiştir(4). Bir başka çalışmada bazı vitreus hastalıklarında serum ornitin düzeylerinin arttığı ve bunun hiperornitinemia ile ilgili olabileceği açıklanmıştır(5). Humor vitreusda üre, ornitin ve sitrülün'in düzeyleri ile üre döngüsünün en son basamağında L-arginini üre ve ornitine hidrolize eden arginaz (L-arginin amidinohidrolaz, E.C.3.5.3.1) enziminin varlığı ilk kez Gürsu(6) tarafından gösterilmiştir. Arginaz enziminin bu tür non hepatik doku ve organlarda bulunması evrim ile açıklanmaya çalışılmıştır. Campbell' e (7) göre evrimin ilk dönemlerinde bütün canlılarda üre döngüsü bulunmakta idi. Fakat bazı canlılar çevre koşulları ile uyum sağlamak için bazı biyokimyasal değişimlere uğradılar. Bu biyokimyasal değişimler sonucu üre döngüsünün bazı enzimleri kaybolduğu halde arginazın varlığını koruduğu ileri sürülmüştür(7).

Non hepatik dokularda arginazın fonksiyonu bilinmemekle beraber poliamin sentezi için gerekli ornitin kaynağı sağladığı bildirilmektedir(8). Bu sentez yolunda da arginaz başlangıç enzimi olup oluşan ornitin daha sonra ornitin dekarboksilaz enzimi vasıtasıyla hücrelerin büyüme ve çoğalmasında sağlayan putresin, spermin, spermidin gibi poliaminlere dönüşmektedir.

Arginaz enzimi Mn iyonlarına kofaktör olarak gereksinim duyan bir enzimdir. Enzimin Mn iyonlarıyla 55 °C de preinkübasyonu sonucu maksimum aktivite elde edilebilmiştir(9). Mn iyonları enzimin dayanıklılığını arttırmakta ve inaktivasyonlara karşı korumaktadır. Enzimin Mn iyonları dışında Hg⁺, Zn gibi metal iyonlarıyla inhibisyona uğradığı tespit edilmiştir(10).

Bu çalışmada, insan humor vitreus arginaz enzimi üzerine preinkübasyon ısısının ve bazı metal iyonlarının etkileri araştırılmak istenmiştir.

MATERYAL VE METOD

Çalışma; yaşları 7 ile 52 arasında değişen (yaş ortalaması 27+5) 3 kadın , 6 erkek toplam 9 kişinin vitreuslarının , ölü muayenesi veya otopsi sırasında adli tıp uzmanı tarafından alınıp , laboratuvarında incelenmesiyle yapılmıştır. Ölüm öncesinde hiçbir göz veya metabolik hastalığı bulunmayan olguların ölüm sebepleri trafik kazası, asılma, ateşli silah ve yüksekten düşme olarak tespit edilmiştir. Örnekler ölümden 2-4 saat içinde, her iki iç kantustan girilerek alınmış ya hemen veya derin dondurucuda 1-2 saat bekletilerek laboratuvara ulaştırılmıştır. Bu işlem gerek olgu yakınlarından gerekse Cumhuriyet Savcısından sözlü onay alınarak gerçekleştirilmiştir.

Örneklerdeki arginaz aktivite miktarları L-argininden arginaz enzimi ile oluşan ürenin spektrofotometrik ölçümü esasına dayanır(11). Bu yöntem T.D.M.U. (tiyosemikarbazid diasetilmonoksim üre) dir. Protein ölçümleri ise Biüret yöntemine göre yapılmıştır(12). Ünite tanımlaması , örneklerdeki her 1 mg protein başına L-argininden 1 saatte oluşan ürenin miktarı olarak yapılmıştır. ÜNİTE = m mol üre / mg. Protein x saat .

BULGULAR

Şekil 1' de vitreus arginaz. aktivitesinin Mn iyonlarının varlığında ve yokluğunda belirli preinkübasyon ısılarındaki değişimini göstermektedir. 30 - 50 °C lik preinkübasyon ısılarında enzim aktivitesi çok fazla değişime uğramamakta ancak , 55 °C den sonra aktivitede % 10 dolaylarında düşme görülmektedir. Preinkübasyon ısısı 40 °C olarak alınmış ve enzim aktivitesi bu ısıda % 40 dolaylarında artmıştır. 55 °C den sonra enzimin aktivitesinde belirgin olarak düşme görülmektedir.

Bütün metal iyonlarının konsantrasyonu 5 mM olarak alınmıştır. Mn iyonları preinkübasyon basamağına ilave edildiğinde % 40, inkübasyon basamağına ilave edildiğinde ise % 12 aktivasyon

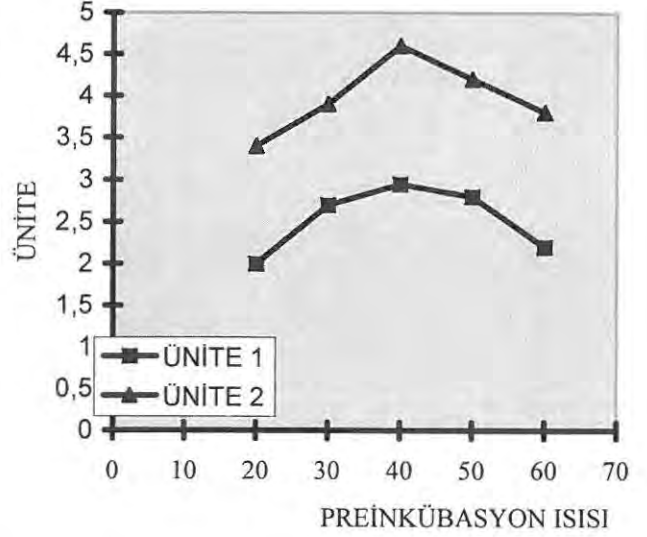
sağlanmıştır. Enzimin 40 °C preinkübasyonu sonucu Pb, Hg, Ag, Cu ve Sn önemli oranda inhibisyona neden olmaktadır. Ba, Fe, Cr ve Ca iyonlarıyla inhibisyon oranı % 70 dolaylarındadır. Mg ve Co ile inhibisyon azalmakta Ni iyonları ise aktiviteyi çok önemli oranda değiştirmemektedir (Tablo I).

Tablo I. Bazı metal iyonlarının vitreus arginaz aktivitesi üzerine etkileri

METAL İYONLARI	% AKTİVİTE
Kontrol (-Mn)	100
Mn *	140
Mn**	112
Ni	97
Co	61
Mg	47
Cd	43
Ca	27
Cr	23
Fe	23
Ba	21
Sn	14
Cu	11
Ag	6
Hg	3
Pb	-

*preinkübasyon ortamına ilave edilmiştir

** İnkübasyon ortamına ilave edilmiştir



Şekil 1. Mn iyonlarının varlığında ve yokluğunda vitreus arginaz aktivitesinin preinkübasyon ısısına bağlı değişimi

TARTIŞMA

Vitreus arginazının preinkübasyon ısısı 40 °C olarak bulunmuştur. Bir çok doku arginazının optimal preinkübasyon ısıları 50-55 °C dolaylarında bulunmasına rağmen vitreus arginaz aktivitesi bu ıslarda aktivite kaybetmektedir (şekil 1). Mn iyonlarının preinkübasyon sırasında ilavesi enzime % 40 daha yüksek aktivite kazandırmıştır. Mn iyonlarının enzim -substrat arasında bir köprü kurduğu ve enzim-Mn-L-arginin kompleksinin oluşmasının enzimi aktive ettiği bildirilmektedir(9). Vitreus arginazı için elde edilen bu sonuçlar enzimin Mn iyonlarına kofaktör olarak ihtiyaç göstermesine rağmen Mn iyonlarının yokluğunda da belirgin olarak aktivite gösterdiği şeklindedir. Diğer doku arginazları Mn iyonları yokluğunda hemen hemen inaktif durumda iken vitreus arginazı için bu durum tersine gelişmiştir. Preinkübasyon ısısının 40 °C

olarak bulunması ve enzimin 55 °C den sonra belirgin olarak aktivite kaybetmesi vitreus arginazının bir izoenzim olabileceğini düşündürmektedir. Bilindiği üzere izoenzimler aynı kimyasal reaksiyonu katalize etmelerine rağmen bazı fiziksel özellikleri ve dokularda dağılımları değişmektedir. Bugüne kadar arginazın 3 izoenziminin varlığı tespit edilmiştir (10). Bu izoenzimler böbrek, karaciğer ve tükürükte bulunmaktadır (6,10).

Vitreus arginazının diğer metal iyonları ile ilgisi araştırıldığı zaman Pb , Hg , Ag , Cu ve Sn iyonları ile önemli oranda aktivite kaybettiği, bu metal iyonlarının arginaz aktivitesinin neredeyse tamamını inhibisyona(% 80-95) uğrattığı görülmektedir. Ba , Fe, Cr ve Ca iyonları ise enzimi %60-70 dolaylarında inhibe etmektedir. Enzimin Hg, Zn gibi gibi metallerle inhibe edildiği bildirilmiş (10) vitreus arginazı için bu sonuç doğrulanmış görülmektedir. Cd , Mg , Co iyonlarının inhibisyon oranı diğer metallerle nazaran daha düşük bulunmuştur(%40-50). Ni iyonları ise enzimin aktivitesini değiştirmemiştir. Mn iyonlarının inkübasyon ortamına ilave edilmesi enzimin ancak %12 oranında aktive olmasına neden olmuştur. İnkübasyon ortamına ilave edilen Mn iyonlarının vitreus arginaz aktivitesini % 40 oranında arttırdığı tespit edilmiştir. Diğer doku arginazlarının Mn iyonlarına olan ilgileri araştırıldığında dokulara göre arginaz aktivitesini preinkübasyon basamağında 3-5 kat yükselttiği gösterilmiştir(9). Metal iyonlarının vitreus arginaz aktivitesi üzerine etkileri ilk kez tarafımızdan gösterilmiştir. Vitreus arginazının bu dokudaki fonksiyonu ve önemi tam olarak bilinmemekle beraber, poliamin sentezi için gereken ornitini sağlamada bir rolü olabileceği kanısına varılmıştır. Ayrıca olguların yaş ortalamasının 27 gibi genç bir yaş olması , yaş ile arginaz aktivitesi arasında bağlantı olup olmadığını araştıran çok olgulu çalışmaları gerektirmiş ve bu başlangıç çalışmamız devamında Mn başta olmak üzere diğer metal iyon buzukluklarında vitreus arginazının nasıl etkilendiğini gösteren ve poliaminlerin hücrelerin rejenerasyonu yönünden vitreus patolojilerinin incelendiği kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulduğu ortaya konulmuştur. Konu bu yönlerden ele alınarak çalışmalarımız devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Fırat T. Göz ve Hastalıkları. Saypa Ofset (1.cilt), Ankara 1990, ss 63-98.
2. Brewton RG, Mayne R. Mammalian vitreous humour contains networks of hyaluronan molecules. *Exp Cell Res* 1992; 198: 237-249.
3. Gloor BP. The Vitreous. In: Moses, RA, Hart WM (eds) *Adler's Physiology of the Eye, Clinical Application. The C.V. Mosby, St.Louis. 1987, pp 246-265.*
4. Balasooriya BAW, Hin CA, Williams AR. The biochemistry of vitreous humour . A comparative study of the K , Na and Urate concentrations in the eyes at identical time intervals after death . *Forensic Sci Int* 1984; 26 :85-91.
5. Wen YY. Serum ornithine levels in some ocular disorders. *Biochem Med and Met Biol* 1986; 35: 83 - 87.
6. Gürsu MF. Çeşitli Türlerin Humor Vitreuslarında Üre ve Kaynaklarının Araştırılması. F.Ü. Sağlık Bilimleri (Doktora Tezi). Elazığ 1993; ss 5-32.
7. Campbell JW. Arginine and urea biosynthesis in the land planarian : its significance in biochemical evolution . *Nature* 1965; 208 : 1299-1301.
8. Pegg AE, Mccann P. Polyamine metabolism and function in mammalian cells and protozoans. *ISI Atlas of Sci. Biochem. 1988; 11-18.*
9. Colombo JP, Konarska L. Arginase. Bergmayer HU. (eds) *Methods of Enzymatic Analysis. (3rd ed) Verlag Chemie, Weinheim, 1984; 285-294.*
10. Ikemoto M, Tabata M, Murachi T, et al. Purification and properties of human erythrocyte arginase. *Ann Clin Biochem* 1989; 26 : 547-553.
11. Özdemir Y, Ozan S, Özdemir N, et al. The evaluation of the methods used for the measurement of arginase activity . *Acta Medica Mediterranea* 1994 ;10: 171-174.
12. Bauer MD. *Clinical laboratory methods . The C.V. Mosby, St.Louis .1974; 472-487.*