

SERUM NADP SPESİFİK İZOSİTRAT DEHİDROJENAZ ENZİMİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİ

Orhan Tınaz*

Hayvan dokularında gıdaların oksidasyonu iki ana safhayı kapsar. 1. safhada çeşitli substratlar bir seri değişmeye uğrarlar ve sonuçta ya asetil gruplar veya trikarboksilik asit siklusunun bir ara maddesi teşekkül eder. Substrat moleküllerinin trikarboksilik asit siklusuna girebilmesi için değişikliğe uğratıldığı bu 1. safhanın reaksiyonları substrattan substrata değişir. 2. veya son hafta bütün gıda maddeleri için müşterek olup trikarboksilik asit siklusu tarafından temsil edilir.

Bu siklusun çeşitli reaksiyonlarını 8 enzim katalize eder. Bu çalışmaya konu teşkil eden izositrat dehidrojenaz (ICD) bu 8 enzimden biri olup izositratın alfa keto glutarat'a oksidatif dekarboksilasyonu kademesini katalize eder. Bu kademe genellikle siklusun hızını belirleyen kademe olarak bilinir. Bu yüzden ICD a enerji metabolizmasında özel bir önemi olan regülatör bir enzim gözü ile bakılmıştır (1).

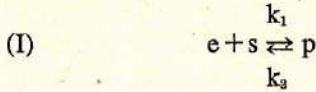
Bu önem dolayısı ile bu enzim pek çok araştırmacının ilgisini çekmiş, tek hücreli organizmalardan memelilere kadar çeşitli canlılardan ve bunların muhtelif dokularından saflaştırılarak elde edilmiştir. Yakın zamanlarda bir araştırmacı grubu bu enzimi kristalize halde elde etmeğe de muvaffak olmuştur. Literatür incelenecek olursa araştırmaların pek çoğunun çeşitli canlılardan saflaştırılmış ICD preparatlarının kinetik özellikleri üzerinde yoğunlaştığı görülür. Buna mukabil insan serum ICD'nin katalitik özelliklerini inceleyen araştırmalar, bilindiği kadarıyla, çok azdır. İşte bu çalışmanın amacı insan serumu kaynaklı ICD'nin katalitik özelliklerini, optimum reaksiyon şartlarını rutin hizmetle yüklü bir klinik biyokimya laboratuvarı ortamının elverdiği ölçüde, enzim kinetiği parametreleri ile inceleyebilmektir.

Enzim reaksiyon hızını (= aktiviteyi) etkileyen faktörler genel olarak substratların ve enzimin konsantrasyonları, tampon iyon kuvveti, ortamın ısı ve pH'sı, zaman, çeşitli aktivatör ve inhibitörlerin varlığı, x ve ultraviyole ışınları gibi fiziksel ajanlar v.s. dir. Kinetik özelliklerin araştırıldığı çalışmalarda bu faktörlerden biri değişken, diğerleri sabit tutularak değişken faktörün aktiviteyi ne yön-

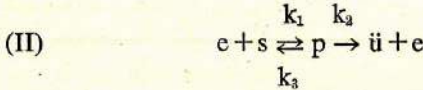
* Ankara Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı Başasistanı

de etkilediği araştırılır. Bu çalışmada da bu prensip uygulanmıştır. Konuya geçmeden önce Mikaeli-Menten teorisi ve Mikaeli sabitesine kısaca değinmek yararlı olacaktır (2).

Enzimatik reaksiyonların hızlarına substrat konsantrasyonlarının etkisi ilk defa 1913 yılında Michaelis ve Menten tarafından incelendi. Bu araştırmacıların buldukları Mikaeli sabitesi, K_m , bir enzim için en karakteristik özelliklerden biridir. Bu sabite, enzimatik reaksiyonun hızı maksimal hızın yarısına ulaştığı anda ortamdaki substrat konsantrasyonu olarak tarif edilir. Enzimatik reaksiyonun 1. basamağında enzim (e) ile substratın (s) bir kompleks (p) teşkil etmek üzere reversibl olarak birleştikleri farzedilir :



Bu reversibl reaksiyonda k_1 kompleksin teşekkülü yönüne doğru cereyan eden reaksiyonun hız sabitesi, k_2 kompleksin disosyasyon sabitesidir. Reaksiyonun 2. basamağı ürünü (ü) ile serbest enzimin yeniden teşekkülünü kapsar. Bu iki basamağı birlikte yazarsak :



denklemleri elde edilir. Bu reaksiyonda :

- e = serbest ve bağlı enzim konsantrasyonunun
- p = enzim-substrat kompleksinin konsantrasyonunu
- e - p = serbest enzimin konsantrasyonunu
- s = substrat konsantrasyonunu gösterebilir. (Substrat konsantrasyonunun enzim konsantrasyonuna göre çok büyük olması ve enzimi tam olarak satüre etmesi şarttır.)

$e + s \rightleftharpoons p$ reversibl reaksiyonunun equilibrium durumunda disosyasyon sabitesi olan K_m şu şekilde ifade edilebilir :

$$(III) \quad K_m = \frac{(e-p) \cdot s}{p} \quad \text{Bu eşitlik düzenlenirse :}$$

$$p \cdot K_m = (e-p) \cdot s$$

$$p \cdot K_m = es - ps$$

$$pK_m + ps = es$$

$$p(K_m + s) = es$$

$$p = \frac{es}{K_m + s}$$

$$(IV) \quad p = \frac{es}{K_m + s}$$

Enzim reaksiyon hızı kompleksin 2. basamaktaki yıkılışının hızı tarafından tayin edilir. Bu hız şu denklemle verilir :

(V) $v = k.p$ p'nin değerini burada yerine korsak :

(VI) $v = \frac{k.e.s}{K_m + s}$ eşitliğin sağ tarafındaki pay ve payda s'ye bölünürse :

(VII) $v = \frac{k.e.}{K_m + 1}$ denklemini elde edilir.

Yukarıdaki (VII) eşitliği :

Eğer s, K_m değerine göre çok büyük olursa $\frac{K_m}{s}$ sıfıra yaklaşır ve yukarı-

$v = \frac{k.e}{1} = k.e$ olur. Buna maksimum hız (V) diyebiliriz ki bu durum-

da enzim substrat ile satüre haldedir. Yani :

(VIII) $v = k.e$ olur. Bu durumda (VII) eşitliği :

(IX) $v = \frac{V}{K_m + 1}$ şekline girer. Bu eşitliğe Mikaeli-Menton denklemini de-

nişir. Bu denklem düzenlenecek olursa :

(X) $K_m = s \cdot \left(\frac{V}{v} - 1 \right)$ denklemini elde edilir. K_m ve V değerleri sabit oldu-

ğu için bu bir dikdörtgenli hiperbol denklemdir. Bu denklemin temsil ettiği eğri Mikaeli-Menten eğrisi adını alır. Deneysel bulgularla da gösterilmiştir ki enzim-

lerin büyük çoğunluğu için substrat konsantrasyonlarının reaksiyon hızına karşı

noktalanması bu tip bir eğri vermektedir. (IX) denkleminde (v) yerine $\left(\frac{V}{2} \right)$ de-

(IX) denkleminin tersi alınacak olursa :

(XI) $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{V}$

denklemini elde edilir. K_m ve V değerlerinin sabit olduğu hatırlanır, $\frac{K_m}{V} = a$,

$\frac{1}{V} = b$, $\frac{1}{v} = y$ ve $\frac{1}{s} = x$ denirse (XI) denklemi $y = ax + b$ for-

muna sokulmuş olur. Bilindiği üzere bu bir lineer doğru denklemdir. (XI) denkleminin temsil ettiği doğruya Linweaver-Burk doğrusu denir. Bu doğrunun apsis

eksenini kestiği $y = 0$ noktasında $x = -\frac{b}{a}$ değerine eşit olur. (b) ve (a)'nın

değerleri yerlerine konursa : $x = -\frac{1}{K_m} v$ bundan da $K_m = -\frac{1}{x}$ değeri bu-

lunur. $x = -\frac{a}{b}$ eşitliği burada yerine konursa $K_m = \frac{a}{b}$ bulunmuş olur.

Yani $y = ax + b$ denkleminin (a) ve (b) değerleri hesaplanarak K_m değeri tayin edilebilir. (2)

Çalışmamızda bu teorik bilgiler uygulanarak serum NADP spesifik ICD in substratları olan D-threo-izositrat, NADP ve mangan iyonu için K_m değerleri hesaplandı.

MATERYAL VE METOD

Bütün aktivite tayinleri Bausch-Lomb firmasının Spectronic-20 model spektrofotometresinde gerçekleştirildi.

Alfa keto glutarik asit (159 mg/L), DL-izositrik asidin trisodyum tuzu (2,7 mikro Mol/ml) (/zositrik asidin yalnız D formu substrat fonksiyonu gördüğü için hesaplamalarda çözeltinin konsantrasyonu 1,35 mikro Mol/ml alınmıştır.), Na. NADP. 2 H₂O (0,6 ve 30 mg.lık vialler), MnCl₂ (0,15 M NaCl de çözülmüş 0,01 M), EDTA (% W/V) Sigma firmasından, dinitro fenil hidrazin Haury Diagnostica firmasından temin edildi. 0,4 N NaOH (Proanalysi Merck), MgCl₂. 6H₂O (Chem. pure crys. Riedel), CoCl₂. 6H₂O (Proanalysi Merck), ZnCl₂ (Proanalysi Merck) ve CuSo₄. 5H₂O (Chem. pure crys. Riedel) in 0,15 M NaCl deki 0,01 M çözeltileri laboratuvarda hazırlandı. Çalışmada NADP spesifik ICD kaynağı olarak insan serumu kullanıldı. Bu amaçla laboratuvara rutin tahliller için gelen, laboratuvar bulguları normal olan taze kan numunelerinin hemolizsiz serumlarının arta kalanları depo serum şeklinde toplandı.

Reaksiyon hızı (= aktivite), enzimatik reaksiyon sonunda açığa çıkan alfa keto glutaratın mikro Mol cinsinden miktarı olarak tarif edildi. Açığa çıkan bu alfa keto glutarat Bell, Baron, Taylor ve Friedman'ın geliştirdikleri kolorimetrik metodun Sigma Firmasınca modifiye şekli uygulanarak tayin edildi. Ancak substrat ve

enzimin ortamdaki nispi konsantrasyonlarını istendiği ölçüde arttırabilmek için nihai hacim yeterli olmadığından kalibrasyon grafiği çiziminde ve aktivite tayinlerinde ortama 1 ml. distile su ilave edilerek çalışıldı. Bu hacim artışından optimumdan daha yüksek substrat ve enzim konsantrasyonlarını denemekte yararlanıldı.

1 — İZOSİTRAT İÇİN Km DEĞERİ :

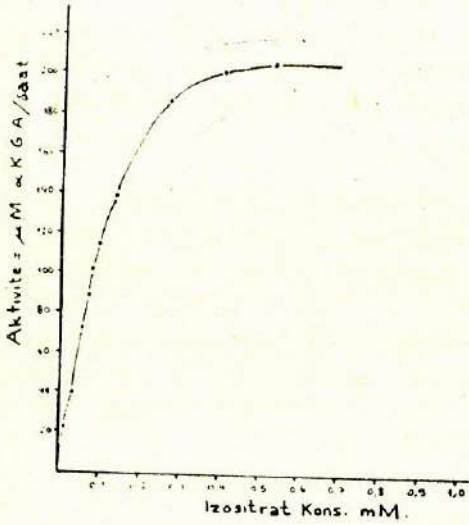
Reaksiyona tesir eden diğer faktörler sabit tutulup izositrat konsantrasyonu $13,5 \times 10^{-6}$ ila 540×10^{-6} M arasında değiştirilerek tayin edildi. Çeşitli izositrat konsantrasyonlarının karşılıkları olan reaksiyon hızları Tablo-1 de verilmektedir. İzositrat için Lineweaver-Burk doğru denklemi, en küçük kareler metoduyla, $y = 0,5517 x + 3,4705$ olarak hesaplandı. Bu denklemden izositrat için Km değeri 0,159 mMol bulundu. İzositrat için Mikaeli-Menten eğrisi Şekil-1 de, Lineweaver-Burk doğrusu Şekil-2 de görülmektedir.

Tablo - 1 : İzositratın artan konsantrasyonlarına karşılık olan reaksiyon hızları. (s) substrat, (v) reaksiyon hızı

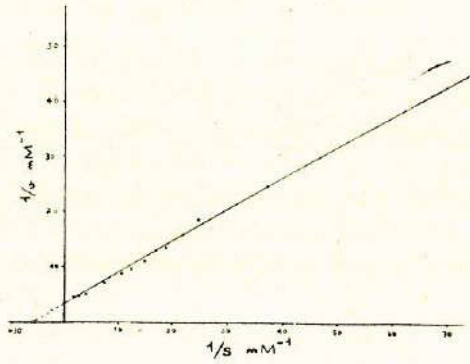
s mMol ⁻¹	1/s mMol	v mMol	1/v mMol
0,0135	74	0,023	43,5
0,0270	37	0,040	25,0
0,0405	24,7	0,053	18,8
0,0540	18,5	0,073	13,7
0,0675	14,8	0,090	11,1
0,0810	12,3	0,103	9,7
0,0945	10,6	0,115	8,7
0,1350	7,4	0,140	7,1
0,2700	3,7	0,190	5,3
0,4050	2,5	0,203	4,9
0,5400	1,9	0,206	4,8

2 — NADP⁺ İÇİN Km DEĞERİ :

Diğer faktörler sabit tutulurken NADP⁺ konsantrasyonları $9,4 \times 10^{-6}$ ila 375×10^{-6} m arasında değiştirilerek tayin edildi. Çeşitli NADP⁺ konsantrasyonlarının karşılıkları olan reaksiyon hızları Tablo-2 de verilmektedir. NADP⁺ için Lineweaver-Burk doğru denklemi, en küçük kareler metoduyla $y = 0,6944 x + 16,1524$ olarak hesaplandı. Bu denklemden NADP⁺ için Km değeri, 0,043 mMol bulundu. NADP⁺ için Mikaeli-Menten eğrisi Şekil-3 de, Lineweaver-Burk doğrusu Şekil-4 de görülmektedir.



Şekil - 1 : İzositrat için Mikaeli-Menten eğrisi



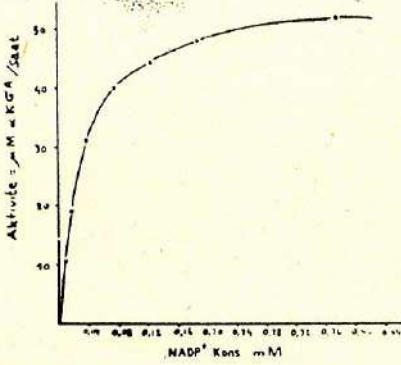
Şekil - 2 : İzositrat için Lineweaver-Burk doğrusu

Tablo - 2 : NADP⁺ in artan konsantrasyonlarına karşılık olan reaksiyon hızları. (s) substrat, (v) reaksiyon hızı.

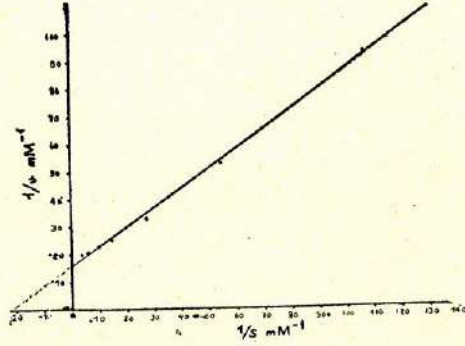
s mMol	1/s mMol ⁻¹	v mMol	1/v mMol ⁻¹
0,0094	106,4	0,011	90,9
0,0187	53,5	0,019	52,6
0,0375	26,7	0,031	32,3
0,0750	13,3	0,040	25,0
0,1125	8,9	0,044	22,7
0,1875	5,3	0,048	20,8
0,3750	2,7	0,052	19,2

3 - Mn²⁺ İÇİN Km DEĞERİ :

Diğer faktörler sabitken Mn²⁺ iyonu konsantrasyonları 0,5 ila 6,0 mMol arasında değiştirilerek tayin edildi. Çeşitli Mn²⁺ konsantrasyonlarının karşılıkları olan reaksiyon hızları Tablo - 3 de verilmektedir. Mn²⁺ için Lineweaver-Burk doğru denklemi $y = 3,7025x + 19,1041$ olarak hesaplandı. Bu denklemden Mn²⁺ için Km 0,194 mMol bulundu. Mn²⁺ için Mikseli-Menten eğrisi Şekil - 5 de Lineweaver-Burk doğrusu Şekil - 6 da görülmektedir.



Şekil - 3 : NADP+ için Mikaeli-Menten eğrisi



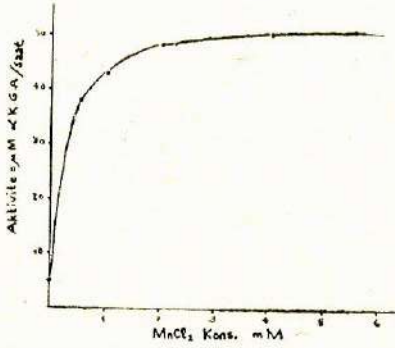
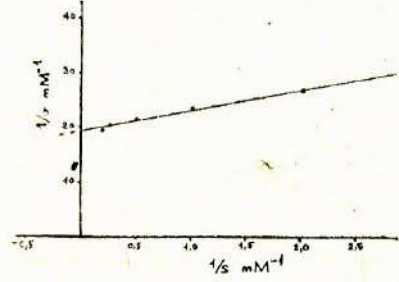
Şekil - 4 : NADP+ için Lineweaver-Burk doğrusu

Tablo - 3 : Mn_2+ in artan konsantrasyonlarına karşılık olan reaksiyon hızları. (s) substrat, (v) reaksiyon hızı.

s mMol	1/s mMol ⁻¹	v mMol	1/v mMol ⁻¹
0,5	2	0,038	26,3
1	1	0,043	23,3
2	0,5	0,048	20,8
4	0,25	0,050	20,0
6	0,17	0,051	19,6

4 — REAKSİYON HIZINA ENZİM KONSANTRASYONUNUN ETKİSİ :

Enzim kaynağı olarak depo serum kullanıldığından, serumun, reaksiyon ortamının nihai hacminin yüzdesi olarak ifade edilen konsantrasyonunu gittikçe arttırmak suretiyle ölçülen reaksiyon hızları ve karşılık oldukları enzim (serum) konsantrasyonları Tablo - 4 de, bu değerlere göre çizilen enzim konsantrasyonu-reaksiyon hızı grafiği Şekil-7 de görülmektedir.

Şekil - 5 : Mn_2+ için Mikaeli-Menten eğrisiŞekil - 6 : Mn_2+ için Lineweaver-Burk doğrusu

Tablo - 4 : Artan serum konsantrasyonlarında ölçülen reaksiyon hızları.

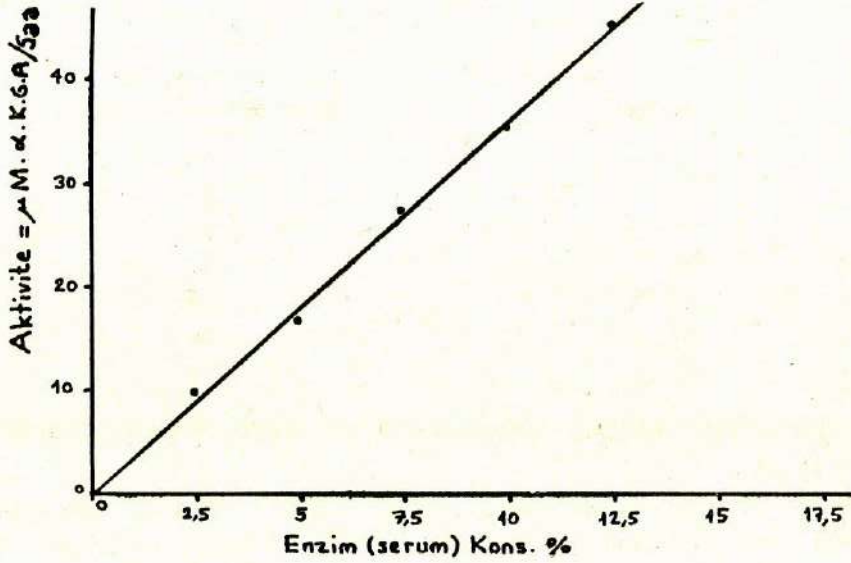
Serum konsantrasyonu (nihai hacmin % si)	Reaksiyon hızı (mikroMol alfa K.G.A.)
2,5	10
5,0	17
7,5	28
10,0	36
12,5	46

5 — REAKSİYON HIZINA ENKÜBASYON ZAMANININ ETKİSİ :

Çeşitli enkübasyon sürelerinde ölçülen reaksiyon hızları ve karşılık oldukları enkübasyon zamanları Tablo - 5 de, bu değerlere göre çizilen zaman-reaksiyon hızı grafiği Şekil - 8 de görülmektedir.

Tablo - 5 : Enkübasyon zamanı-reaksiyon hızı bulguları

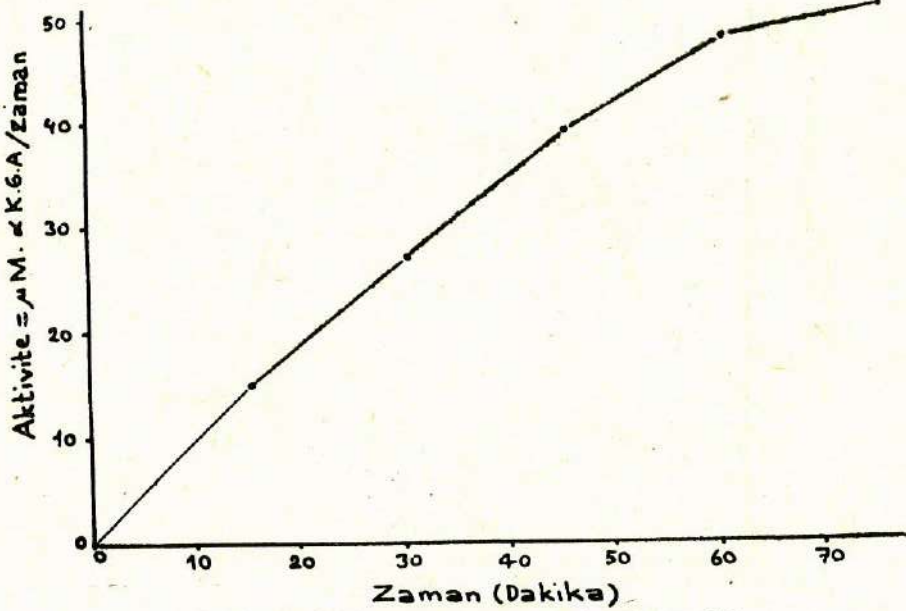
Enkübasyon zamanı (dakika)	Reaksiyon hızı (mikroMol alfa K.G.A.)
15	15
30	27
45	39
60	48
75	51



Şekil - 7 : Serum kon-u-reaksiyon hızı grafiği

6 — REAKSİYON HIZINA ORTAMIN ISISININ ETKİSİ :

Reaksiyon ortamının enkübasyon safhasında tâbi olduğu değişik ısıların reaksiyon hızını ne yönde etkilediklerine dair bulgular Tablo-6 da, bu bulgulara göre çizilen ısı-reaksiyon hızı grafiği Şekil-9 dadır.



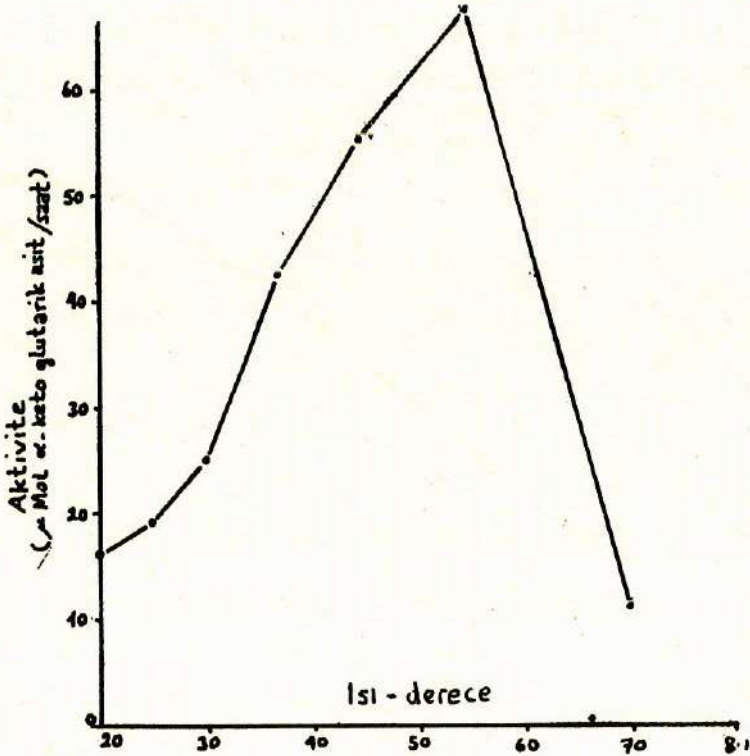
Şekil - 8 : Enkübasyon zamanı-reaksiyon hızı grafiği

Tablo - 6 : Reaksiyon hızına ortamın ısısının etkisi bulguları.

Isı (derece)	Reaksiyon hızı (mikroMol alfa K.G.A.)
20	16
25	19
30	25
37	43
45	56
55	68
70	11

7 — REAKSİYON HIZINA HİDROJEN İYON KONSANTRASYONUNUN ETKİSİ :

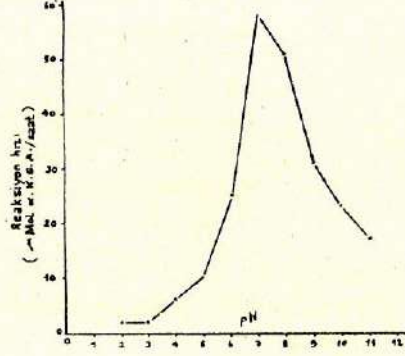
Reaksiyon ortamının pH sınıfı 2 den 11 e kadar değiştiği şartlarda ölçülen reaksiyon hızları ve karşılık oldukları pH lar Tablo - 7 de, bu değerlere göre çizilen ortam pH sı-reaksiyon hızı grafiği Şekil - 10 da görülmektedir.



Şekil - 9 : Isı-reaksiyon hızı grafiği

Tablo - 7 : pH - reaksiyon hızı bulguları.

pH	reaksiyon hızı (mikroMol alfa KGA)
2	2
3	2
4	6
5	10
6	25
7	58
8	51
9	31
10	23
11	17



Şekil - 10 : pH-reaksiyon hızı grafiği

8 — REAKSİYON HIZINA 2 DEĞERLİ METAL İYONLARININ ETKİLERİ

Çeşitli metal iyonlarının reaksiyon hızına etkileri Tablo-8 de görülmektedir.

Tablo - 8 : Çeşitli metal iyonlarının varlıklarında ölçülen reaksiyon hızları. Mangan iyonunun varlığındaki reaksiyon hızı 100 kabul edilerek diğerleri bunun % si olarak ifade edilmiştir.

Metal iyonu (0,01 M)	Rölatif reaksiyon hızı (%)
Manganez	100
Mağnezyum	27
Kobalt	33
Çinko	10
Bakır	8
Hiçbiri	10

Mangan iyonunun hasil ettiği aktivasyonu diğer iyonların ne yönde etkiledikleri, bu iyonları mangan iyonu ile beraber reaksiyon ortamına ilave etmek suretiyle araştırıldı. Bulgular Tablo-9 da görülmektedir.

Tablo - 9 : Mangan iyonunun hasıl ettiği aktivasyona diğer metal iyonlarının etkileri. Mangan iyonu varlığındaki reaksiyon hızı 100 kabul edilerek diğerleri bunun % si olarak ifade edilmiştir.

Metal iyonları (0,01 M)	Rölatif reaksiyon hızı (%)
Manganez	100
Manganez + Magnezyum	100
Manganez + Kobalt	96
Manganez + Çinko	17
Manganez + Bakır	15

9 — SERUMU BEKLETMENİN AKTİVİTEYE ETKİSİ :

Taze ve +4°C de bekletilmiş serumlarda tayin edilen aktiviteler Tablo - 10 da görülmektedir

Tablo - 10 : Serumu +4°C de bekletmenin aktiviteye etkisi. Taze hazırlanmış depo serumda 3 ayı aktivite tayini yapılmış, ortalama değer 100 kabul edilerek, bekleyen serumlardaki ortalama aktiviteler bunun % si olarak ifade edilmiştir.

Bekleme süresi	Rölatif aktivite %
Taze serum	100
24 saat	100
48 saat	96
72 saat	89
1 hafta	80

TARTIŞMA

Bu çalışmada insan serumu NADP spesifik ICD enziminin bazı kinetik özellikleri araştırılmaya çaba sarfedilmiştir.

Enzimatik reaksiyonun hızının maksimal hızın yarısına ulaştığı andaki substrat konsantrasyonunu veren Mikaeli sabitesi her bir enzim için karakteristik bir değerdir. Teorik olarak bir enzimin Mikael sabitesi ancak saf enzim ile çalışılarak tayin edilebilir (3). Çünkü enzim ne kadar saf olursa spesifik aktivitesi o nispette artar ve doğal olarak daha az miktarda substrat enzimi tam satüre ederek reaksiyonu maksimal hıza ulaştırır. Diğer enzimlerde olduğu gibi ICD'in Mikaeli sabitesini tayin etmek için yapılan çalışmalarda önce çeşitli hayvan dokularından veya bakteri kültürlerinden enzim saflaştırılarak elde edilmiş, daha sonra izositrat, NAD (P) ve mangan iyonu için Km değerleri bilinen metodlarla tayin edilmiştir. Tablo - 11 çeşitli hayvan dokularından ve bakteri kültürlerinden saflaştırılmış ICD'in substratları için hesaplanmış Km değerlerini göstermektedir.

Tablo - 11 : Çeşitli kaynaklardan izole edilmiş NADP spesifik ICD'ların izositrat, NADP ve mangan iyonu substratları için bulunmuş Km değerleri. (mikroMol olarak)

Enzim kaynağı	izositrat	NADP	Mn ²⁺	literatür
İnsan sitoplazmik izoenzim	7,0	5,6	—	4
İnsan mitokondrial izoenzim	8,1	3,7	—	4
Domuz kalbi	5,7	4,6	0,9	5
Sıçan kalbi	5,0	20,0	—	6
Sıçan karaciğeri	3,0	25,0	—	6
Rhesus maymunu gingival doku	62,5	33,0	—	7
E. coli	15,6	37,0	12,9	8
T. aquaticus	9,7 ± 1,4	16,5 ± 4,7	—	9
B. subtilis	9,1 ± 3,0	27,4 ± 5,7	—	9
C. reinharti	12,5 ± 4,0	10,0 ± 3,2	—	9

Çalışmamızda insan serumu enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Serumla elde edilen Km değerleri Tablo-12 de görülmektedir.

Tablo - 12 : İnsan serumu NADP spesifik ICD'in izositrat, NADP ve Mn₂⁺ için Km değerleri. (mikro Mol olarak)

	izositrat	NADP	Mn ²⁺
Km	159	43	194

Bu değerlerin Tablo - II deki insan sitoplazmik NADP spesifik ICD için verilen Km değerlerinden izositratla yaklaşık 22, NADP de yaklaşık 8 defa büyük olduğu görülmektedir. Bu husus serum yerine daha saf preparatlarla çalışıldığında daha küçük Km değerlerinin elde edileceğini doğrulamaktadır.

Substrat konsantrasyonlarının yeterli seviyede ve diğer faktörlerle birlikte sabit tutulduğu şartlarda, Tablo - 4 ve Şekil - 7 de de görüleceği üzere reaksiyon hızı enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. $k =$ hız katsayısı olmak üzere reaksiyon hızı ile enzim konsantrasyonu arasındaki bağıntıyı (yeterli ve sabit miktarda substrat konsantrasyonlarının ortamda var olması şartıyla)

$$v = k.e$$

şeklinde gösterebiliriz. Bu bağıntı bize ICD'nin katalize ettiği reaksiyonun O dereceden bir reaksiyon olduğunu, belli bir substrat konsantrasyonunun daha üzerindeki substrat miktarlarının hızı etkilemediğini, sadece enzim konsantrasyonunun hızı et-

kilediğini göstermektedir. Literatürde de bu bulguyu teyit eden yayınlar mevcuttur (10).

Enküasyon süresinin değişmesinin, diğer faktörlerin sabit kaldığı şartlarda reaksiyon hızını ne yönde etkilediğine ait bulgular (Tablo - 5, Şekil - 8) ilk 60 dakika için zaman faktörü ile reaksiyon hızı arasında lineer sayılabilecek bir bağıntının var olduğunu göstermektedir. Serum ICD aktivitesi ile zaman arasındaki ilişki bir araştırmada lineer olarak bulunmuştur (11).

Reaksiyon hızına ortamın ısısının etkisini gösteren bulgulara göre (Tablo - 6, Şekil - 9) reaksiyon hızı 55°C civarında maksimum olmakta, daha yüksek ısılarda ise hızla düşmektedir. Başka araştırmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır (11,12). Ancak bu araştırmalarda 37° ila 40°C ye kadar olan bulgular verildiği için 40°C nin üstündeki bulguları karşılaştırmak olanağı bulunamamıştır.

Aktiviteye pH'nın etkisini gösteren bulgular, yaklaşık değerler olarak verilmesine rağmen, literatürde bu konuda yayınlanan bulgularla uygunluk içindedir (12, 13). Bulunan değerlere göre insan serumu NADP spesifik ICD için optimum pH 7,5 ila 8,0 arasındadır. Asit ortamın ICD aktivitesini daha olumsuz olarak etkilediği görülmektedir.

Aktiviteye 2 değerli metal iyonlarının etkilerini gösteren Tablo -8 ve 9 daki bulgulara göre reaksiyon ortamına hiç bir metal iyonu ilave edilmediği zaman ICD aktivitesi ihmal edilebilecek kadar azdır. Enzimi mangan iyonu maksimal ölçüde aktive etmektedir. Kobalt ve magnezyumu aktive edici kudretleri manganın 1/3 i ve 1/4 i kadardır. Çinko ve bakırın hiç bir aktive edici kudretleri yoktur. Bu bulgular literatüre uygundur (6,11). Cohen ve Colman (14) domuz kalbi NADP spesifik ICD'ı çinkonun aktive ettiğini bildirmektedirler. Bu husus domuz kalbi kaynaklı enzim için geçerli olsa gerekir. Çünkü başka yayınlarda bu bulguyu teyit eden bir kayda rastlanmamıştır. Bowers (12) yeterli miktarda mangan iyonunun varlığında kalsiyum iyonları ilavesinin aktiviteyi yarı yarıya azalttığını bildirmektedir. Aynı yazara göre enzim kaynağı olarak serum kullanıldığında ortamda diğer metalik iyonlar gibi kalsiyum da mevcut bulunmaktadır. Kalsiyumun serumdaki miktarından daha fazla ilavesi aktiviteyi etkilememektedir. Yani 0,2 ml. serumda mevcut kalsiyum maksimal inhibitör etki göstermesi için yeterlidir. Enzim kaynağı olarak saflaştırılmış preparatlar kullanılarak yapılan araştırmalarda ortama hiç metal iyonu ilave edilmeyen şartlarda enzim aktivitesinin O olduğu belirtilmektedir. Enzim kaynağı olarak serumun kullanıldığı çalışmalarda ve bu çalışmada ortama hiç metal iyonunun ilave edilmediği şartlarda az da olsa bir aktivite gözlenmiştir. Ortama ilave edilen 0,2 ml. serumda mevcut 2 değerli metal iyonları bu düşük aktiviteden sorumludurlar (11). Bulgularımıza göre çinko iyonları mangan iyonlarının yaptığı aktivasyonu % 83 oranında inhibe etmektedirler. Bu bulgunun pratik bir yorumu olabilir. Şöyle ki : myokard enfarktüsü esnasında kanda çinko iyonu

konsantrasyonunun arttığı bildirilmektedir. Buna mukabil serum ICD seviyesinin yükselmesi beklenirken böyle olmamaktadır. Bu olay kalp dokusu kaynaklı ICD'ın, karaciğer kaynaklı ICD'dan daha dayanıksız olduğu ve sirkülasyona karışır karışmaz süratle inaktive olduğu şeklinde izah edilmektedir. (6,15). Myokard enfarktüsünü takiben kanda çinko konsantrasyonu artışının ICD aktivitesini inhibe ederek neticede serum ICD seviyesinde önemli bir artışın görülmemesine dolaylı olarak ve kısmen de olsa neden olduğu düşünülebilir. Ancak bu görüş bir spekülasyon olup deneysel verilerden yoksundur.

Serumun +4°C de bekletilmesi ICD seviyesinde zamanla oranlı bir azalmaya yol açmaktadır. (Tablo-10). Bu şekilde bir hafta bekletilen serumda aktivite bulgularımıza göre % 20 civarında azalmaktadır. Bu yüzden ICD aktivitesi tayini için taze veya +4°C de en fazla 24 saat beklemiş serumların kullanılması uygundur. Literatürde ise bu konuda bir fikir birliği yoktur. Mesela Bowers (12) +4°C de bekletilen serumda ICD aktivitesinin haftalarca stabl kalacağını ileri sürmektedir. Sigma teknik bültenin de ise 3 hafta bekletilebileceği bildirilmektedir. Yine Bowers tarafından ve ayrıca Sigma teknik bülteninde serumun dondurularak saklanması aktivite kaybına yol açacağı belirtilmektedir. (12,16). Taylor ve Friedman (10) ise kanın alındığı gün aktivite tayin edilmeyecekse serumun dondurularak saklanması gerektiğini ileri sürmektedirler. Bu konunun daha geniş ölçüde araştırılması yararlı olacaktır.

ÖZET

Bu çalışmada insan serumu kaynaklı NADP spesifik ICD enziminin katalitik özellikleri araştırıldı. Enzim kaynağı olarak insan serumu kullanıldı. Enzimin isositrat substratı için Km değeri 159 mikroMol, NADP⁺ için 43 ve Mn²⁺ için 194 mikroMol bulundu. Aktivite enzim konsantrasyonunun lineer bir fonksiyonudur. Zaman için de ilk 60 dakika için lineer bir bağıntı mevcuttur. Enzim 55°C civarında maksimal aktivite göstermektedir. Optimum pH 7,5 - 8 arasındadır. Mangan iyonu enzimi maksimum ölçüde aktive etmektedir. Kobalt iyonu manganın 1/3 i ve magnezyum 1/4 i kadar aktive edebilmektedir. Çinko, mangan iyonunun yaptığı aktivasyonu % 83 oranında inhibe etmektedir. Bakır enzime inhibitör etki göstermektedir. +4°C de 1 hafta bekletilen serumun orijinal ICD aktivitesi % 20 oranında azalmaktadır.

SUMMARY

Enzyme kinetics of human serum NADP isocitrate dehydrogenase

In this study, the catalytical activity properties of human serum NADP-linked isocitrate dehydrogenase were investigated according to the enzyme kinetics parameters. Km values of serum NADP linked ICD for isocitrate, NADP⁺ and manganese substrates were found as 159, 43 and 194 microMoles respectively.

The correlation between the enzyme activity and the enzyme concentration was found as linear. For the first 60 minutes of the reaction, the correlation between time and the enzyme activity can be considered as linear. The activity was greatest near 55°C. Above this temperature the activity fell down rapidly. Optimum pH was between 7,5 - 8,0.

The enzyme needed the presence of metal ions for its activity. Manganese activated the enzyme maximally. Cobalt and magnesium ions activated the enzyme only 1/3 and 1/4 of that of manganese activation. Zinc inhibited the manganese activation by 83 percent and copper by 87 percent. Activity was negligible when there was no metal ions in the medium.

Serum which was preserved at 4°C for one week lost 20 percent of its original activity.

LİTERATÜR

1. Lowenstein J.M.; *Metabolic Pathways*. Third edition. Ed. David M. Greenberg Vol. 1 Academic Press Newyork and London 1967 sayfa 147-171, 198-200
2. Dixon M., Webb E.C.; *Enzymes*. Second edition. Ed. Longmans Green and Co. Ltd (Great Britain 1964)
3. Özkañ K.; Serum beta glukuronidazı enzim kinetiği ve bu enzim aktivitesinin pratik önemi üzerine bir çalışma Doçentlik tezi 1970
4. Turner B.M., Fisher R.A., Harris H.; *Ann. Hum. Genet.* 37 : 455-467, 1974
5. Colman R.F.; *J. Biol. Chem.* 243 : (10) 2454-2464, 1968
6. Islam M., Bell J.L., Baron D.N.; *Biochem. J.* 129 : 1003-1011, 1972
7. Bergquist J.J., Organ R., Nuhi K.; *J. Periodont. Res.* 9 : 193-198, 1974
8. Reeves H.C., Danmy G.O., Lin C.C., Houston M.; *Biochim. Biophys. Acta* 258 : 27-39 1972
9. Ramaley R.F., Hudock M.O.; *Biochim. Biophys. Acta* 315 : 22-36, 1973
10. Taylor T.H., Friedman M.E.; *Clin. Chem.* 6 : 208-215, 1960
11. Bell J.L., Baron D.N.; *Clin. Chim. Acta* 5 : 740-747, 1960
12. Bowers G.N. Jr.; *Clin. Chem.* 5 : 509-518, 1959
13. Siebert G., Carsiotis M., Plaut G.W.E.; *J. Biol. Chem.* 266 : 977-990, 1957
- 14 - Cohen P.F., Colman R.F.; *Eur. J. Biochem.* 47 : 35-45, 1974
15. Rosalki S.B.; *Diagnostic Enzymology* Second edition Publication of DADE division. 1969, 24-25, 36-38
16. Sigma Technical Bulletin No. 150- - U.V., No. 175