

A. Ü. Tıp Fakültesi Biokimya ve Kimya Kürsüsü

SIÇAN BÖBREK VE KARACİĞER ALKALİ FOSFATAZLARI ÜZERİNE METİL VE ETİL PARATIONUN TESİRLERİ

Dr. İ. H. GÖKHUN (*)

GİRİŞ :

İnsektisitlerin enzimler üzerindeki tesirleri hayvan türlerine göre, değiştiği gibi enzimlerin bulunduğu organ ve dokulara göre de farklılıklar gösterir (1, 3). Bu çalışmada metil ve etil parationun sıçan böbrek ve karaciğer homogenatlarındaki alkali fosfataz üzerine tesirleri araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Enzim aktivitesi tayini : Disodyum fenil fosfat substratının alkali ortamda (pH=10) alkali fosfataz tarafından hidrolizi esasına dayanan kolorimetrik metot vasıtasıyla tayin edilmiştir (8).

İnsektisit çözeltilerinin hazırlanması : Etanol alkali fosfatazı % 29 oranında aktive eder. Metanol ise ancak % 2 kadar bir inhibisyona sebep olur (6). Bunun için çözücü olarak metanolü kullandık.

Metil paration çözeltisi : % 99 saflıktaki metil paration preparatından metanolde metil parationun 10^{-2} M lık çözeltisini hazırladık. (pH = 2.35).

(*) A. Ü. Tıp Fakültesi Biokimya ve Kimya Kürsüsü Uzman Asistanı
Bu çalışma aynı konudaki doktora tezinden kısaltılarak alınmıştır.

Etil paration çözeltisi : % 98.8 saflıktaki etil parationun metanoldeki 10^{-2} M lık çözeltisini hazırladık. (pH = 2.20).

Organ homogenatlarının hazırlanması : Deney hayvanı olarak ağırlıkları 140 - 170 gr olan beyaz erkek sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar dekapite edildikten sonra karaciğer ve böbrekleri çıkarıldı. Soğukta ($+4^{\circ}$ C de) organların zar, yağ gibi yabancı doku kısımları ayıklandı. Küçük parçalar haline getirildi. 0.15 M NaCl çözeltisi ile bir kaç defa yıkandı. Doku ağırlığının iki katı hacimde 0.15 M NaCl çözeltisi ilâve edildi. Potter - Elvehjem tipi cam-cam homogenizatör ile homogenize edildi. Homogenat 0.15 M NaCl çözeltisiyle 100 ml. ye tamamlandı. Soğukta 8500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Sedimentler atıldı. Süpernatantlar alınarak pH ları ölçüldü. Karaciğer homogenatı pH=6.67 ve böbrek homogenatı pH=6.82 olarak tesbit edildi.

İnsektisitlerin tesiriyle ilgili deneyler : Metil ve etil paration alkali ortamda hızla hidrolize uğrarlar. Bu bakımdan alkali fosfatazın tayin edildiği pH=10.0 da da parçalanırlar. Ayrıca organik fosforlu insektisitler kimyasal yapı bakımından disodyum fenil fosfat substratının analogu olduğundan pH=10.0 da alkali fosfataz tarafından spontan olarak hidroliz edilirler. Parçalanma ürünü olarak burada da gene fenol teşekkül eder ve yanlış sonuçlar elde edilmesine sebep olur (7). Bu sebeplerden dolayı alkali fosfataz aktivitesini tayin etmeden önce homogenatları insektisitlerle inkübasyona tâbi tuttuk. Homogenat-insektisit karışımı (pH=6.35 $\pm$ 0.25) hem insektisitlerin oldukça dayanıklı olduğu hem de alkali fosfatazın optimum pH sınıfı altında bulunduğu bir ortam teşkil etmektedir. (1. Tablo). Bundan sonra homogenat - insektisit karışımından alınan numunede kalan alkali fosfataz aktivitesini tayin ettik (5).

1. Tablo : İnkübasyon safhası

	Kontrol	Nümune
Homogenat	0.5 ml	0.5 ml
Distile su	0.1 ml	—
İnsektisit	—	0.1 ml
37° C de 20 dakika bekletilir		

2. Tablo : Sıçan böbrek homogenatı alkali fosfataz aktivitesi

	n	$\bar{x}$ (Optik dansite)	SD	P	% i
Kontrol	14	0.1772 ± 0.0006	0.0021	P < 0.001	9.71
Etil parationla	14	0.1600 ± 0.0006	0.0024		
Kontrol	12	0.2215 ± 0.0003	0.0008	P < 0.001	
Metil parationla	12	0.2327 ± 0.0003	0.0008		

3. Tablo: Sıçan karaciğer homoge natı alkali fosfataz aktivitesi

n	$\bar{x}$ (Optik dansite,	SD	P	% i
Kontrol	17	0.1696 ± 0.0009	P < 0.001	17.22
Etil parationla	17	0.1404 ± 0.0006		
Kontrol	12	0.1855 ± 0.0003	P > 0.050	0.00
Metil parationla	12	0.1855 ± 0.0003		

4. Tablo : İnsektisitlerin AP a tesir tarzı

Effektör	Sıçan böbrek AP ı	Sıçan karaciğer AP ı
Etil paration	(—)	(—)
Metil paration	(0)	(+)

(0) = Tesirsiz

(—) = İnhibitör

(+) = Aktivatör

5. Tablo : Sıçan böbrek AP ı İ ve % i bağlantısı

İ = Etil paration konsantrasyonu (mM)

% i

1.25X10 ⁻²	0.55 ± 0.02
2.50X10 ⁻²	12.64 ± 0.05
3.75X10 ⁻²	50.05 ± 0.12
5.00X10 ⁻²	81.12 ± 1.41
6.52X10 ⁻²	91.00 ± 1.35
7.50X10 ⁻²	95.18 ± 1.13

6. Tablo: Sıçan böbrek AP ı t (Zaman) ve % i bağlantısı

t (Dakika)

% i

10	6.73 ± 0.42
20	17.49 ± 0.63
30	31.40 ± 0.21
40	33.64 ± 0.24
60	34.53 ± 0.18

AP = Alkali fosfataz

% i = 1-Vi/V

a) Etil parationsuz

V (Optik dansite)	S (mM)	1/V	1/S (mM ⁻¹)
0.094 ± 0.003	0.328	10.63	3.048
0.157 ± 0.006	0.656	6.36	1.524
0.248 ± 0.002	1.312	4.03	0.762
0.386 ± 0.011	2.624	2.59	0.381
800'0 ± 60E'0	3,280	3.23	0.304

b) Etil parationla

V (Optik dansite)	S (mM)	1/V	1/S (mM ⁻¹)
0.056 ± 0.002	0.328	17.80	3.048
0.100 ± 0.004	0.656	10.00	1.524
0.200 ± 0.002	1.312	5.00	0.762
0.313 ± 0.005	2.624	3.19	0.381
0.277 ± 0.009	3,280	3.61	0.304

a) Etil parationsuz Km = 1.74 mM

b) Etil parationla Km = 3.04 mM

İnhibisyon tipinin araştırılması: Siçan böbrek alkali fosfatazının artan substrat konsantrasyonunda etil parationsuz ve etil parationla Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk bağıntılarını inceledik. Enzimi karakterize eden Km sabitesini hesapla ve grafiklerle tayin ettik. Elde ettiğimiz eğrilerin şekli ve Km değerleri inhibisyonun kompetitiv olduğunu göstermektedir (2).

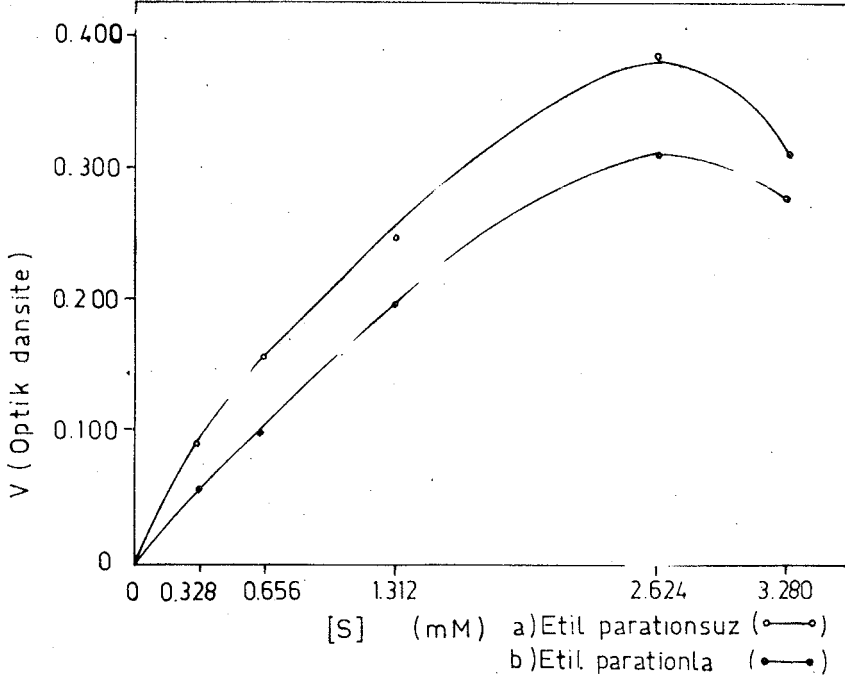
M Ü N A K A Ş A

Kimyasal efektörlerin enzimler üzerinde net bir tesirinin tesbiti için nümunedeki enzim aktivitesinin, serumdaki aktivitenin en az 10 katı olması gerekir (7). Karaciğer ve böbrek alkali fosfatazları üzerinde metil ve etil parationun in vitro tesirlerini incelemeyi önce homogenatlardaki enzimi kısmen saflaştırarak gerekli aktiviteyi sağladık.

Deneylerimiz sonunda böbrek ve karaciğer alkali fosfatazının metil ve etil paration karşısında farklı bir davranış gösterdiğini müşahade ettik. Metil paration böbrek alkali fosfatazını aktive etmekte, karaciğer alkali fosfatazı üzerinde ise aktivatör veya inhibitör olarak hiç bir tesir göstermemektedir. Etil paration karaciğer alkali fosfatazını böbrek alkali fosfatazından daha fazla inhibe etmektedir.

Genel olarak alkali fosfatazın Michaelis - Menten bağıntısına uygunluk göstermemesi deneylerde bazı güçlükler yaratmaktadır (10). Biz de deneylerimizde bilhassa siçan karaciğer alkali fosfatazının Michaelis - Menten eğrisinden önemli derecede sapmalar gösterdiğini tesbit ettik. Bu durum literatürün verdiği bilgileri doğrulamaktadır (10). Böbrek alkali fosfatazı ise, önemsiz bazı sapmalar dışında, Michaelis - Menten ve Lineweaver - Burk bağıntılarına uygun sonuçlar vermiştir (1. grafik).

İnhibitörlü ve inhibitörsüz her iki reaksiyonda da yükselen substrat konsantrasyonunda enzim aktivitesi artmaktadır. Ancak maksimum hıza ulaşıldıktan sonra tekrar bir düşüş gö-



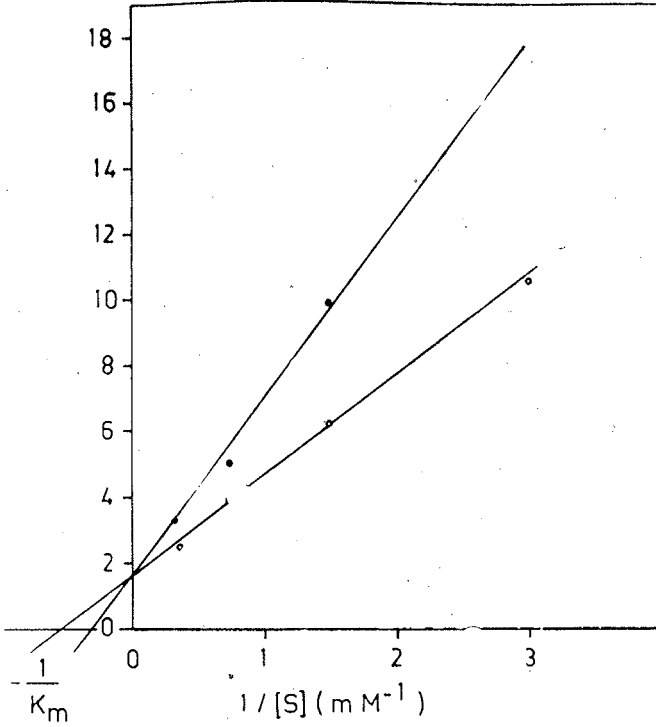
1 Michaelis - Menten grafiği

rılmaktadır. Bu durum aşırı substrat konsantrasyonunun sebep olduğu bir inhibisyonudur. Burada aktif ES kompleksi yanında inaktif veya çok az aktif ESS kompleksi teşekkül etmektedir (2, 4, 9).

İnkübasyon süresinin uzatılması halinde inhibisyonun belli bir değere kadar arttığı fakat meselâ 30. dakikadan sonra oldukça sâbit kaldığı müşahade edilmiştir. (4. grafik).

Yükselen inhibitör konsantrasyonunda inhibisyon tipik sigmoid bir eğri çizmektedir (3. grafik).

Inhibisyon tipinin araştırılmasında Lineweaver - Burk eğrileri ile inhibitörsüz ve inhibitörlü reaksiyonların Km değer-

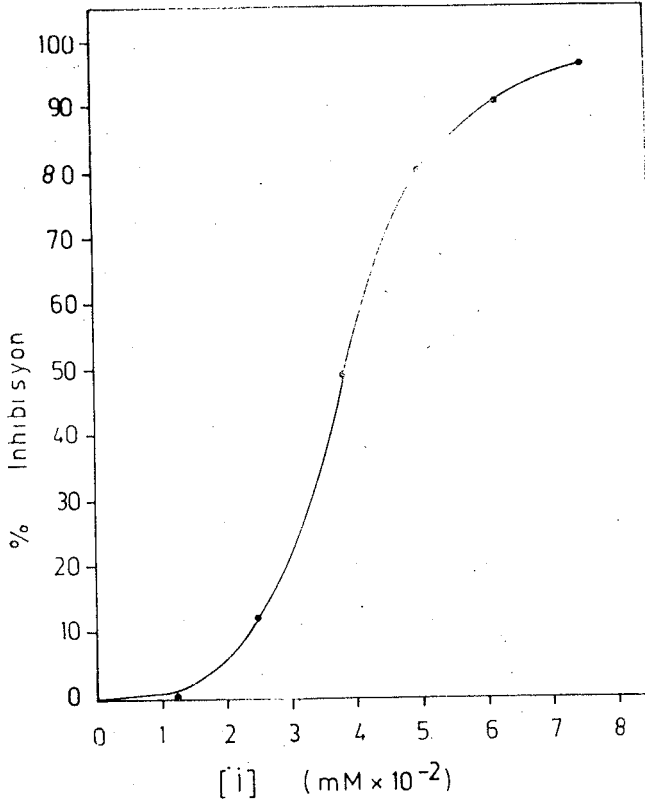


2. Lineweaver-Burk grafiği

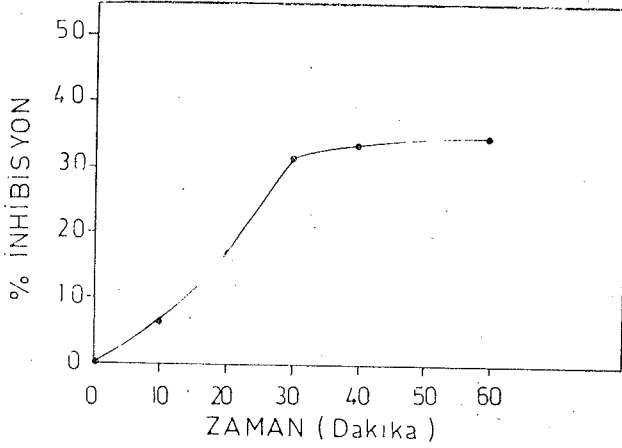
(a) Etil parationless (○—○)

(b) Etil parationla (●—●)

leri inhibisyonun kompetitiv olduğunu göstermektedir (2. grafik). Organik fosfat esterlerinin, fosfatazların substrat analogu olduğu dikkate alınırsa inhibisyonun kompetitiv olması beklenen bir neticedir (6).



3. İnhibitör konsantrasyonu - İnhibisyon grafiği



4 Inkubasyon süresi - % İnhibisyon
grafığı

Ö Z E T

Sıçan karaciğer ve böbrek alkali fosfatazları kısmen saf-
laştırıldı. Metil ve etil parationun alkali fosfatazın bu iki for-
mu üzerindeki tesirleri ve kinetiği ilk defa tarafımızdan araş-
tırıldı.

Metil paration böbrek alkali fosfatazını aktive etmekte, ka-
raciğer formu üzerine ise aktivatör ve inhibitör olarak hiç te-
sir etmemektedir.

Etil paration karaciğer ve böbrek alkali fosfatazının her
ikisini de inhibe etmektedir.

İnkübasyon süresinin uzatılması inhibisyonu belli bir değere kadar artırmakta daha sonra oldukça sabit bir değerde kalmaktadır.

Yükselen inhibitör konsantrasyonunda inhibisyon tipik sigmoid bir eğri çizmektedir.

ZUSAMMENFASSUNG

DIE WIRKUNG DER METHYL-UND ETHYL PARATHION ÜBER NIERE - UND LEBER-ALKALISCHE PHOSPHATASE VON RATTEN

Bei vorliegender Arbeit wurde Leber-und Niere-alkalische Phosphatase von Ratten teilweise gereinigt.

Die Wirkung und Kinetik von Methyl-und Ethyl Parathion über diese beide Formen der alkalischen Phosphatasen wurde erstmal von uns untersucht.

Methyl Parathion aktiviert Niere-alkalische Phosphatase. Aber bei Leberform wurde keine aktivatorische oder inhibitorische Wirkung festgestellt.

Ethyl Parathion hemmt Leber-und Niere-alkalische Phosphatase.

Die Verlaengerung der Inkubationszeit vermehrt die Hemmung bis zu einem bestimmten Wert. Dann bleibt die Hemmung ziemlich konstant.

Bei der ansteigenden Konzentration des Hemmstoffes zeigt die Hemmung eine typische Sigmoidkurve.

L I T E R A T Ü R

- 1 — BERSIN, T., Biokatalysatoren, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt a. Main, 1968.
- 2 — BUDDECKE, E., Grundriss der Biochemie, Walter de Gruyter, 1974.
- 3 — GERTIG, H., et al, The Effect of Aldrin, Dieldrin, Lindane, DDT, DDD, and DDE on The activity of alkaline and acid phosphatase, Dissert. Pharm. Pharmacol., XXIII, 5, 1971.
- 4 — HASCHEN, R. J., Enzymdiagnostik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1970.
- 5 — JAKL, A., J. TULACH, Therapeutische Wirksamkeit von Esterase-reaktivatoren bei der Vergiftung mit Organophosphonaten und ihre Grenzen., Hradci Králove, 14, 2, 1971.
- 6 — KERN, R., et al, Einfluss organischer Insecticide auf Enzyme, Biochemische Zeitschrift, 336, 1962.
- 7 — KIERMEIER, F., B. PICHA, Verhalten der alkalischen Phosphatase der Milch gegenüber organischen Phosphorsäureestern, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 142, 2, 1970.
- 8 — KING, J., Practical Clinical Enzymology, D. Van Nostrand Co. Ltd. London, 1965.
- 9 — REHFELD, N., REICHEL, D., Analytische und präparative Methoden der klinischen Biochemie, Verlag Chemie, 1973.
- 10 — SEYLER, H. / THIERFELDER, Handbuch der physiologisch - und pathologisch - chemischen Analyse 6. Band Enzyme Teil B. Springer Verlag, Berlin, 1964.

