

## Serum Alkalen Fosfataz ve Asit Fosfataz Enzimlerinin Aktivileri Üzerine Lizinoprilin In-Vitro Etkisi

Safinur Yıldırım Çelik<sup>1\*</sup>, Nazan Demir<sup>2</sup>, Yaşar Demir<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bayburt Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, İlköğretim Bölümü, Bayburt, tel: 0 458 211 2028, fax: +90 (458) 211 11 72, scelik@bayburt.edu.tr

<sup>2</sup>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Muğla, tel: 0 252 211 3178, Fax: + 90 (252) 223-9280, nazdemir@mu.edu.tr

<sup>3</sup>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Muğla, tel: 0 252 211 3177, fax: + 90 (252) 223-9280, yasdemi@mu.edu.tr

\*İletişimden sorumlu yazar / Corresponding author

Geliş / Received: 18 Kasım (November) 2016

Kabul / Accepted: 27 Şubat (February) 2017

DOI: 10.18466/cbayarfb.302653

### Özet

Hipertansiyon, çoğu yaşlı insanın mustarip olduğu bir hastalıktır. Yüksek tansiyonu olan insanlar genellikle hayatları boyunca sağlıklı bir yaşam sürdürebilmek için kan basıncını düşüren ilaçları kullanmak zorundadırlar. Bu çalışmada, lisinopril adlı hipertansiyon ilacının kemik yapım ve yıkımının bir göstergesi olan alkalen fosfataz (ALP) ve tartarata dayanıklı asit fosfataz (TrACP) enzimlerinin aktiviteleri üzerine olan etkilerini in vitro olarak incelenmiştir. İnsan serumundan alkalen fosfataz enzimi DEAE-selüloz, asit fosfataz enzimi ise CM-selüloz iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Alkalen ve asit fosfataz enzimlerinin aktiviteleri substrat olarak p-nitrofenilfosfat kullanılarak belirlenmiştir. TrACP enzim aktivitesi bulunurken ortama tartarat ilave edilerek TrACP dışındaki diğer asit fosfataz enzimlerinin inhibe olması sağlanmıştır. Alkalen fosfataz ve tartarata dayanıklı asit fosfataz enzimlerinin aktiviteleri substratın (0,033, 0,1, 0,16, 0,23 ve 0,3 mM) beş farklı konsantrasyonunda inhibitörlü ve inhibitörsüz ortamlarda bulunmuştur. İnhibitörün ise her bir substrat konsantrasyonu için  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  ve  $10^{-4}$  M olmak üzere üç farklı derişimi kullanılmıştır. İlacın her iki enzimi de inhibe ettiği tespit edilip,  $I_{50}$  değerleri 0,17 mM ve 0,79 mM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca  $K_i$  değerleri Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak ALP ve TrACP için sırasıyla  $6,98 \times 10^{-4}$ ,  $7,06 \times 10^{-4}$  olarak hesaplanmıştır.

**Anahtar kelimeler** — Alkalen fosfataz, Asit fosfataz, Lizinopril.

## The In-vitro Effect of Lisonopril on Serum Alkaline Phosphatase and Acid Phosphatase Enzymes Activity

### Abstract

Hypertension is a disease that most elderly people suffer. People with high blood pressure often obliged to use the drug that lowers blood pressure in order to maintain a healthy lifestyle throughout their lives. In this study, the in vitro effect of lisonopril on serum alkaline phosphatase and acid phosphatase enzymes which are essential for normal bone formation and mineralization activities was investigated. Alkaline phosphatase enzyme was purified using DEAE-cellulose, acid phosphatase enzyme was purified using CM-cellulose ion exchange chromatography from human serum. The activities of alkaline and acid phosphatase were determined using p-nitrophenylphosphate as the substrate. When finding out the activity of TrACP enzyme, adding tartrate to the environment provided inhibition of other acid phosphatase enzymes than TrACP. The activities of alkaline phosphatase and acid phosphatase, which is resistant to tartrate, have been found at five different concentrations of substrates (0.033, 0.1, 0.16, 0.23 and 0.3 mm) in environment with inhibitor and without inhibitor. While three different concentrations of the inhibitor, including  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-4}$ , was used for each substrate concentration. It was found that the drug inhibit both enzymes, and  $I_{50}$  value was calculated as 0.17 mm and 0.79 mm.

Furthermore, Ki values were calculated as  $6.98 \times 10^{-4}$ ,  $7.06 \times 10^{-4}$  for ALP and TrACP respectively by utilizing the Lineweaver-Burk plot.

**Key word** – Alkaline phosphatase, acid phosphatase, lisonopril.

## 1 Giriş

Asit ve alkalin fosfatazın da içinde bulunduğu fosfo monoesterazlar, alkalin fosfatazlar, mor renkli asit fosfatazlar, düşük molekül ağırlıklı asit fosfatazlar, yüksek molekül ağırlıklı asit fosfatazlar ve protein fosfatazlar olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır [1].

Alkalin fosfataz enzimi (ortofosforik monoester fosfohidrolaz (bazik optimum), EC:3.1.3.1) bazik ortamda fosfat monoesterlerinin hidrolizini katalizler. Bu enzim bir glikoproteindir ve hidrofobik glikozilfosfatidil inositol ile hücre membranına bağlı olarak görev yapmaktadır [2]. İnsanda bulunan alkalin fosfataz dört izoenzime sahiptir. Bunlardan üçü dokuya spesifiklik gösterirken (plasentada bulunan PLAP, bağırsakta bulunan IAP ve germ hücrelerinde bulunan GCAP) biri dokuya nonspesifik alkalin fosfatazdır [3]. Skeletal ALP'nin biyokimyasal fonksiyonu henüz netlik kazanamamasına rağmen, önceden yapılan çalışmalarda kemiğin normal yapımı ve mineralizasyonu için esas teşkil ettiği bulunmuştur. Skeletal ALP kemik yapımının bir göstergesi olarak osteoklastlardan kan dolaşımına bırakılmaktadır [4]. Metabolik kemik hastalıklarının teşhisinde serum kalsiyum, fosfat ve alkalin fosfataz enzimi en sık kullanılan biyokimyasal parametrelerdendir [5]. Ayrıca, enzimin göç eden hücreleri yönlendirdiği ve membrandan lipid ve immunoglobulinler gibi spesifik molekülleri taşıdığı da ifade edilmektedir [3].

Asit fosfatazlar (ortofosforik monoester fosfohidrolaz (asit optimum), EC: 3.1.3.2), asidik ortamda sudan inorganik fosfata oksijen aktaran ve fosfat monoesterlerinin nonspesifik hidrolizini katalizleyen enzimlerdir [6]. Genetik olarak, lizozomal, prostatik, makrofajik ve eritrositik olarak isimlendirilen asit fosfataz enziminin dört izoenzimi tanımlanmıştır. Lizozomal ve prostatik asit fosfatazlar büyük molekül ağırlığına (100 kDa) sahip olup, tartarat ve florit tarafından inhibe edilirler. Buna karşın macrofaj (37 kDa), eritrositlerden (17 kDa) ve osteoklastlardan (30-37 kDa) elde edilen ACP isoenzimleri tartarata

dayanıklıdır. Daha sonra yapılan çalışmalarda, eritrositlerdeki ACP'nin hem tartarata hem de floride karşı dayanıklı olduğu bulunmuştur [7]. Serum TrACP osteoklastlarda en bol bulunan enzimlerden biridir. Kemik yıkımı esnasında osteoklastlardan salgılanmaktadır. Serum TrACP'nin aktivitesi kemik yıkımının bir göstergesi olduğu düşünülmektedir [8].

Lisinopril angiotensin converting enzim (ACE) inhibitörüdür. ACE enzimi bir dipeptidil karboksipeptidazdır ve esas rolü angiotensin I'i angiotensin II'ye dönüştürmektir. Angiotensin II'nin en önemli görevi ise arterial kan basıncının düzenlenmesidir. Lisinopril ise angiotensin II oluşumunu önleyerek kan basıncında düşmeye neden olur [9,10].

Hipertansiyon, çoğu yaşlı insanın mustarip olduğu bir hastalıktır. Yüksek tansiyonu olan insanlar genellikle hayatları boyunca sağlıklı bir yaşam sürdürebilmek için kan basıncını düşüren ilaçları kullanmak zorundadırlar. Aynı zamanda yaşı ilerleyen insanlarda kemik kaybı oranı artmakta, özellikle de bayanların menapoz dönemi sonrası osteoporoz hastalığı yaygın olarak görülmektedir. Bu çalışmada, in vitro olarak, lisinopril'in etken maddesi olarak bulunduğu hipertansiyon ilacının kemik yapım ve yıkımının bir göstergesi olan asit ve alkalin fosfataz enzimlerinin aktiviteleri üzerine olan etkilerini incelenmiştir.

## 2 Materyal ve Metot

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 İnsan Serumunun Elde Edilmesi

Sağlıklı insanlardan alınan kan örnekleri oda sıcaklığında bekletilerek (2-4 saat) çöktürülmüştür. Daha sonra oda sıcaklığında 1000 xg'de santrifüj edilerek serum elde edilmiştir.

### 2.2 Metot

#### 2.2.1 İnsan Serumundan Alkalin Fosfataz Enziminin Saflaştırılması

Toplanan serumlar pH:8, 0,02 % azid içeren 0,05 M Tris-HCl tampon çözeltisine karşı diyaliz edilmiş ve önceden dengelenmiş olan DEAE-sepharose (2x20 cm) kolonuna yüklenmiştir. Kolon aynı tampon çözelti (pH:8, 0,02 % azid içeren 0,05 M Tris-HCl) ile yıkanmış ve ALP aktivitesi 0,05 M Tris-HCl (pH:8) tampon çözeltisi içerisinde 0'dan 1 M'a NaCl ile bir konsantrasyon gradienti oluşturularak elüe edilmiştir. Kolondan elüsyonlar 0,5 mL/dak. hızla toplanmıştır. Aktivite gösteren elüsyonlar toplanarak 0,05 M Tris-HCl (pH:8) tampon çözeltisine karşı diyaliz edilerek enzim havuzu oluşturulmuştur [4].

### 2.2.2 İnsan Serumundan Asit Fosfataz Enziminin Saflaştırılması

Serumun pH'sı glacial asetik asitle 4.8'e getirilmiş ve çöken proteinler 15.000 xg'de santrifüjlenerek atılmıştır. Süpernatant, pH:4,8'lik 10 mM sodyum asetatla dengelenmiş CM-Sepharose kolonuna (20x2 cm) yüklenmiştir. Daha sonra kolon 100 mL aynı tampon çözelti ile (pH:4,8 10 mM sodyum asetat) yıkanmıştır. ACP 10 mM (pH:4,8) sodyum asetat tampon çözeltisi içerisinde 0'dan 1 M'a NaCl ile bir konsantrasyon gradienti oluşturularak elüe edilmiştir. Kolondan elüsyonlar 0,5 mL/dak. hızla toplanmıştır. Aktivite gösteren elüsyonlar toplanarak 0,1 M asetat (pH:6,5) tampon çözeltisine karşı diyaliz edilerek enzim havuzu oluşturulmuştur [11].

### 2.2.3 Alkalen Fosfataz Aktivitesi Tayini

ALP aktivitesi enzimin substratı olan p-nitrofenilfosfat kullanılarak tayin edilmiştir. Aktivite tayinlerinde p-nitrofenilfosfat'ın (1 mg/mL) ve Tris'in (0,2 M) tablet şeklindeki kitleri kullanılmıştır. Oda sıcaklığında pH:9,0, 0,2 M Tris tamponu içinde 4,6 mm p-NPP bulunduran reaksiyon karışımına (0,5 mL) enzim ilavesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Enzim ilave edilir edilmez 410 nm' de absorbanı okunmuştur (A<sub>1</sub>). 30 dk sonra 410 nm'de absorban ölçümleri tekrar yapılmıştır (A<sub>2</sub>). Kör deneme, substrat çözeltisine tampon çözelti ilavesiyle oluşturulmuştur. EU hesaplanmasında A<sub>2</sub>'den A<sub>1</sub> çıkartılarak elde edilen değer kullanılmıştır. Enzim aktivitesi sonucu oluşan ürün olan p-nitrofenolün molar ekstinksiyon

katsayısı olarak 18,400 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> kullanılarak aktivite hesabı yapılmıştır [12].

### 2.2.4 Tartarat Resistant Asit Fosfataz Aktivitesi Tayini

TrACP aktivitesi enzimin substratı olan p-nitrofenilfosfat kullanılarak tayin edilmiştir. Aktivite tayinlerin de p-nitrofenilfosfatın 1 mg/mL derişime sahip tablet şeklindeki kitleri kullanılmıştır. Oda sıcaklığında pH:5,5, 100 mM sodyum asetat tamponu içinde 50 mM tartarat ve 4,6 mM p-NPP bulunduran reaksiyon karışımına (0,5 mL) enzim ilavesiyle reaksiyon başlatılmıştır. 20 dk sonra 1 mL 0,2 M NaOH ilavesiyle reaksiyon sonlandırılarak 410 nm'de absorban ölçümleri yapılmıştır. Kör deneme, substrat çözeltisine tampon çözelti ve 1 mL 0,2 M NaOH ilavesiyle oluşturulmuştur. Molar ekstinksiyon katsayısı olarak 17,800 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> kullanılmıştır [13].

### 2.2.5 Protein Tayini

Kolondan eşit hacimde alınan elüsyonların 280 nm'de absorbanı okunarak proteinlerin nisbi tayini yapılmıştır. Homojenatlarda ve enzim havuzlarında Coomassie Brilliant Blue G-250 metodu kullanılarak protein tayini yapılmıştır [14].

### 2.2.6 İlacın İn Vitro Olarak Enzimler Üzerindeki Etkisi

Lisinopril etken maddelerini içeren bir hipertansiyon ilacının ALP ve TrACP enzimlerinin aktiviteleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Substratın (0,033, 0,1, 0,16, 0,23 ve 0,3 mM) beş farklı konsantrasyonuyla inhibitörlü ve inhibitörsüz ortamlarda aktiviteleri bulunmuştur. Bu amaçla inhibitörün 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> ve 10<sup>-4</sup> M olmak üzere üç farklı derişimi kullanılmıştır. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek kontrol için K<sub>m</sub>, her bir inhibitör derişimi K<sub>mi</sub> değerleri hesaplanmıştır. Bulunan bu değerlerden yararlanarak inhibitörün 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> ve 10<sup>-4</sup> M derişimi için K<sub>i</sub> değerleri hesaplanmış ve ortalamaları alınarak çizelge 1'de verilmiştir.

## 3 Bulgular ve Tartışma

Hipertansiyon, çoğu yaşlı insanın muzdarip olduğu bir hastalıktır. Yüksek tansiyonu olan insanlar genellikle hayatları boyunca sağlıklı bir

yaşam sürdürebilmek için kan basıncını düşüren ilaçları kullanmak zorundadırlar. Aynı zamanda yaşı ilerleyen insanlarda kemik kaybı oranı artmakta, özellikle bayanların menapoz dönemi sonrasında osteoporoz hastalığı yaygın olarak görülmektedir.

Skeletal ALP'nin kemiğin normal yapımı ve mineralizasyonu için gerekli olduğu bilinmektedir. Skeletal ALP kemik yapımının bir göstergesi olarak osteoklastlardan kan dolaşımına bırakılmaktadır [4]. Serum TrACP osteoklastlarda en bol bulunan enzimlerden biridir ve kemik yıkımı esnasında osteoklastlardan salgılanmaktadır. Serum TrACP'nin aktivitesi kemik yıkımının bir göstergesi olduğu düşünülmektedir [13].

Biz de bu çalışmada sürekli olarak kullanılan hipertansiyon ilaçlarının kemik yapım ve yıkım göstergesi olan alkalen ve asit fosfataz enzimlerinin in vitro aktiviteleri üzerine olan etkisini araştırmayı hedefledik. Bu amaçla da lizinopril (angiotensin converting enzim (ACE) inhibitörüdür) etken maddesi olan bir ilacı kullandık.

Lizinopril angiotensin converting enzim (ACE) inhibitörüdür. ACE enzimi bir dipeptidil karboksipeptidazdır ve esas rolü angiotensin I'i angiotensin II'ye dönüştürmektir. Angiotensin II'nin en önemli görevi ise arterial kan basıncının düzenlenmesidir. Lizinopril ise angiotensin II oluşumunun önleyerek kan basıncında düşmeye neden olmaktadır [11, 12].

Lizinopril etken maddesi olan hipertansiyon ilacının kemik yapım ve yıkımının bir göstergesi olan asit ve alkalen fosfataz enzimlerinin aktiviteleri üzerine in vitro etkileri incelenip inhibisyon tipi belirlenmiş ve I<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri hesaplanmıştır.

Alkalen ve asit fosfataz enzimleri için K<sub>i</sub> değerleri p-nitrofenilfosfat substratı kullanılarak belirlenmiştir. Çizelge 1'de de verildiği gibi, ALP ve TrACP için K<sub>i</sub> değerleri sırasıyla 6,98x10<sup>-4</sup>, 7,06x10<sup>-4</sup> olarak hesaplanmıştır.

Alkalen fosfataz enzimini 50% inhibe eden inhibitör konsantrasyonunu (I<sub>50</sub>) bulabilmek için,

lizinopril'in 0,033, 0,1, 0,16, 0,23 ve 0,3 mM konsantrasyonlarına karşı enzim aktivitesi belirlenerek I<sub>50</sub> değeri 0,17 mM olarak grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

Asit fosfataz enzimini % 50 inhibe eden inhibitör konsantrasyonunu (I<sub>50</sub>) bulabilmek için, lizinopril'in 0,33, 1, 1,6, 2,3 ve 3,0 mM konsantrasyonlarına karşı enzim aktivitesi belirlenerek I<sub>50</sub> değeri 0,79 mM olarak grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

Tablo 1. Üç inhibitör ve altı substrat konsantrasyonu ile Lineweaver-burk grafiğini kullanarak Alkalen ve asit fosfataz enzimi için hesaplanan K<sub>i</sub> değerleri hesaplandı. 1,7 mM substrat varlığında 5 farklı inhibitör konsantrasyonu için alkalen ve asit fosfataz enzimleri için regresyon analiz grafiğinden I<sub>50</sub> değerleri elde edildi.

**Tablo 1.** Alkalen ve asit fosfataz enzimi için hesaplanan K<sub>i</sub> değerleri

	Inhibitör (M)	K <sub>i</sub> (mM)	Ortalama K <sub>i</sub> (mM)	Inhibition	I <sub>50</sub> , mM
Alkalen fosfataz	1x10 <sup>-2</sup>	7,86x10 <sup>-4</sup>	6,98x10 <sup>-4</sup>	Yarışmalı	0,17
	1x10 <sup>-3</sup>	9,21x10 <sup>-4</sup>			
	1x10 <sup>-4</sup>	3,89x10 <sup>-4</sup>			
Asit fosfataz	1x10 <sup>-2</sup>	15,1x10 <sup>-4</sup>	7,06x10 <sup>-4</sup>	Yarışmalı	0,79
	1x10 <sup>-3</sup>	5,38x10 <sup>-4</sup>			
	1x10 <sup>-4</sup>	0,66x10 <sup>-4</sup>			

#### 4 Referanslar

- [1] Ostanin, K.; Saeed, A.; Van Etten R.L. Heterologous expression of Human prostatik asit fosfataz ve site-directed mutagenesis of the enzyme active site. J. Biol. Chem. 1994; 269, 8971-8978.
- [2] Magnusson, P.; Larson, L.; Magnusson, M.; Davie, M.W.J.; Sharp, A.S.J. Isoforms of bone alkaline fosfataz: Characterization and origin in human trabecular and cortical bone. Bone Miner. Res. 1999, 14, 1926-1933.
- [3] Millan, J.L.; Fishman, W.H. Biology of human alkaline fosfataz with special reference to cancer; Cri. Rev. Clin. Lab. Sci. 1995, 32, 1-39.
- [4] Anh, D.J.; Eden, A.; Farley, J.R. Quantitasyon of soluble and skeletal alkaline fosfataz, and insoluble alkaline fosfataz anchor-hydrolase activities in human serum. Clin. Chim. Acta. 2001; 311, 137-148.
- [5] Malcolm, A.J. Metabolic bone disease. Curr. Diagn. Pathol.. 2002; 8, 19-25.
- [6] Buchawald, S.L.; Saini, M.S.; Knowles, J.R.; Van Etten, R.L. Stereochemical course of phospho

- group transfer by human prostatic asit phosphatase. *J. Biol Chem.* 1984; 259, 2208-2213.
- [7] Nakanishi, M.; Kousei, Y.; Uchida, K.; Maruo, S., Matsuoka, A. Improved method for measuring tartarate-resistant acid phophtase activity in serum. *Clin. Chim.* 1998; 44, 221-225.
- [8] Lau, K.H.V.; Onishi, T.; Wergedal, J.E.; Singer, F.R.; Baylink, D.J. Characterization and assay or tartarate-resistant acid phosphatase activity in serum: potential use to assess bone resorption. *Clin. Chem.* 1987; 33, 458-462.
- [9] Tian, X-L.; Paul, M. Species-specific spicing and expression of angiotensin converting enzyme. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 66, 1037-1044.
- [10] Daiana Weiss, M.D.; Dan Sorescu, M.D.; Robert, W.; Tylor, M.D. Angiotensin II and Atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 200; 87,25-32.
- [11] Nakanishi, M.; Yoh, K.; Miura T.; Ohasi, T.; Rai, S.K.; Uchida, K. Development of a kinetic assay for band 5b tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum. *Clin. Chim.* 2000; 46, 469-473.
- [12] Glew, R.N.; Heath, E.C.; Studies on the extracellular alkaline phosphatase of *Micrococcus Sodonensis*; *J. Biol, Chem.* 1971; 246, 1556-65.
- [13] Lau, K.H.W.; Farley, J.R.; Baylink, D.J. Phosphotyroyl-specific protein phosphatase activity of a bovine skeletal acid phosphatase isoenzyme. *J. Biol. Chem,* 1995; 260, 4653-4660.
- [14] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Annal. Biochem.* 1976; 72, 248-254.