



Çinkonun Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisinin İncelenmesi

Sevtap BAKIR¹, Serkan KAPANCIK¹, Deniz BAKIR¹, Serpil ERŞAN², Mustafa Doğan BEDİR¹

¹Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas, TÜRKİYE

²Cumhuriyet Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Sivas, TÜRKİYE

Geliş Tarihi / Received

Kabul Tarihi / Accepted

Yayın Tarihi / Published

21.02.2017

28.05.2017

28.07.2017

Özet: Çinko, vücuda dışarıdan alınan inorganik bir maddedir ve enzimlerin aktivitelerini düzenlemesi, proteinlerin yapılarına katılıp stabilizasyonlarını sağlaması ve gen ifadesini kontrol etmesi nedeniyle organizmada önemli rollere sahiptir. Bu çalışmada çinko sülfatın, glikolizin son basamağında yer alan laktat dehidrogenaz enziminin aktivitesine in vitro etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çinko' nun laktat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla; 1mg/ml, 0.5mg/ml ve 0.25mg/ml derişimine sahip 3 farklı derişimdeki çinko sülfat varlığında laktat dehidrogenaz ortama ilave edilmiş ve 5 farklı substrat(piruvat) derişiminde aktivite değerleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Km ve Vmax değerleri saptanmıştır. Laktat dehidrogenazın Vmax değeri 1.43 µmol piruvat/mg protein/dakika, Km değeri 32.57 mM olarak hesaplanmıştır. Tepkime ortamına 1, 0.5 ve 0,25 mg/ml çinko sülfat eklendiğinde laktat dehidrogenaz enzimin sırasıyla %81.2, 77.7 ve 70.7 oranında inhibe olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, çinko sülfat derişimindeki artışın, enzimin hem Km hem de Vmax değerlerinde önemli bir azalmaya neden olduğu ve substrat derişiminin arttırılsa bile enzim inhibisyonunun devam ettiği tespit edilmiştir. Bu durum da inhibisyon tipinin unkompetetif inhibisyon olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Çinko, Laktat Dehidrogenaz, İnhibisyon

Investigation of the In Vitro Effect of Zinc on the Lactate Dehydrogenase Activity

Abstract: Zinc is a inorganic substance taken from outside of the body. It has important role in an organism, because it organizes activity of enzyme and controls gene expression, joins structure of proteins and makes their stabilization. In this study, examining the effect of zinc sulfate on the activity of the enzyme lactate dehydrogenase in the last step of glucose was aimed. Lactate dehydrogenase in 3 concentration have 1mg/ml,0.5 mg/ml, and 0.25 mg/ml density to enviroment in the presence of zinc sulphate was added and activity values were at 5 different substrate concentration were determined. Km and Vmax values were defined. Vmax value of lactate dehydrogenase was calculated as 1.43 mol pyruvate/mg protein/minute, and Km value was calculated as 32.57 mM. When 1, 0.5 and 0.25 mg/ml zinc sulfate were added, it was determine that lactate dehydrogenase enzyme were inhibited with respectively %81.2, 77.7 and 70.7 ratio. Consequently, it was defined that the increasing of zinc sulfat concentration, and enzyme caused decreasing of not only Km but also Vmax and even if

substrate concentration were increased, enzyme inhibition continued. This situation show that inhibition type is uncompetitive inhibition.

Keywords: Inhibition, Lactate Dehydrogenase, Zinc,

Sorumlu yazar: Sevtap BAKIR

Adres: Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas TÜRKİYE

e-mail: sbakir@cumhuriyet.edu.tr

1. GİRİŞ

Organizmayı meydana getiren hücrelerin hayati fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri, bölünmeleri ve farklılaşmaları için organik moleküllerin yanında inorganik maddelere de ihtiyaçları vardır. Bu inorganik maddelerin en önemlilerinden biri çinkodur. Esansiyel bir mineral olan çinko, organizma için büyük öneme sahiptir. Bu nedenle, canlılar biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmek için her gün belirli bir miktar çinko almak zorundadırlar (1). Çinko, metabolizmanın yapım ve yıkım tepkimelerinde rol alan birçok enzime bağlanarak bu enzimlerin aktivitelerini düzenler. Bununla birlikte, proteinlerin yapısına katılarak üç boyutlu yapının stabilitesine katkı sağlar. Ayrıca, nükleik asitlerin yapısını stabilize eder, hücre içi taşınımında ve genlerin ifade edilmesinin kontrolünde önemli rolleri vardır (1,23). Metabolizmadaki önemli rolleri nedeniyle eksikliğinde büyüme-gelişme geriliği görülür. Bununla birlikte, immun sistem olumsuz yönde etkilenir, tat ve koku duyusunda bozulmalar ve yara iyileşmesinde gecikmeler yaşanır (19). Çinkonun eksikliği gibi fazlalığı da organizma için istenilir bir durum değildir. Çinko düzeyindeki yükselmenin enzimlerin aktivitelerinde inhibisyonlara neden olarak toksik bir etkiye neden olabileceği gösterilmiştir (26). Bu toksik etkilerine rağmen, çinkonun enzimler üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar az sayıdadır.

Laktat dehidrogenaz enzimi, anaerobik glikolizin son basamağında yer alan bir enzimdir. Bu enzim, NADH varlığında pirüvatın laktata çevrildiği reaksiyonu katalizler. Organizmadaki dokularda

yaygın olarak bulunmaktadır. Fakat, diğer dokularla karşılaştırıldığında kalp kası, eritrositler ve iskelet kasındaki düzeyleri oldukça yüksektir (9). Laktat dehidrogenaz enziminin aktivitesinde meydana gelen değişimler birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Neoplastik hastalıklarda aktivitesinin arttığı bilinmektedir. Bunu yanında, neoplastik olmayan diabetik asidoz, kalp krizi ve hepatit de düzeyleri ve aktivitesinde artış olmaktadır (10). Bu enzimin aktivitesinde meydana gelen değişimler metabolizmayı olumsuz yönde etkileyeceğinden dolayı büyük öneme sahiptir.

Bu nedenle, bu çalışmamızda, glikolizin son basamağında yer alan ve canlılarda büyük öneme sahip olan laktat dehidrogenaz enziminin aktivitesine çinkonun in vitro etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2.MATERYAL VE METOT:

Bu çalışmada kullanılan tris Sigma Aldrich (Steinheim, Germany), NADH Sigma Aldrich (Steinheim, Germany), sodyum piruvat Merck (Darmstadt, Germany)' den temin edilmiştir. Bu çalışma için, laktat dehidrogenaz enzimi ise Sigma Aldrich (Steinheim, Germany)' den tedarik edilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler analitik olarak uygun saflıktadır.

Laktat Dehidrogenaz Aktivite Tayini

Laktat dehidrogenaz enzimine ait reaksiyon hızı, NADH 'ın oksidasyonu sonucu 340 nm dalga boyundaki absorbans azalması aracılığıyla saptandı. pH 7.3 ve 25°C' de dakikada 1 µmol

NADH 'ın oksidasyonu bir ünite aktivite olarak belirlendi. Laktat dehidrogenaz enziminin spesifik aktivite değerleri aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplandı (5).

$$\text{Units/mg} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{6,22 \times \text{mg enzim/ml reaksiyon karışımı}}$$

Çinko sülfatın laktat dehidrogenaz enziminin kinetik davranışına karşı etkisi incelemek üzere 5 farklı substrat deşişimine karşılık aktivite değerleri hesaplandı. Daha sonra 1/Aktivite 'ye karşı 1/deşişim grafiği olan Lineweaver-Burk grafiği çizildi. 1mg/ml, 0.5mg/ml ve 0.25mg/ml deşişimine sahip çinko sülfat varlığında laktat dehidrogenaz ortama ilave edilerek yine 5 farklı substrat deşişimine karşılık aktivite değerleri elde edildi. Aktivite deneyleri üçer kez tekrarlandı. Buradan elde edilen verilerin ortalaması alınarak Lineweaver Burk grafiğine eklendi.

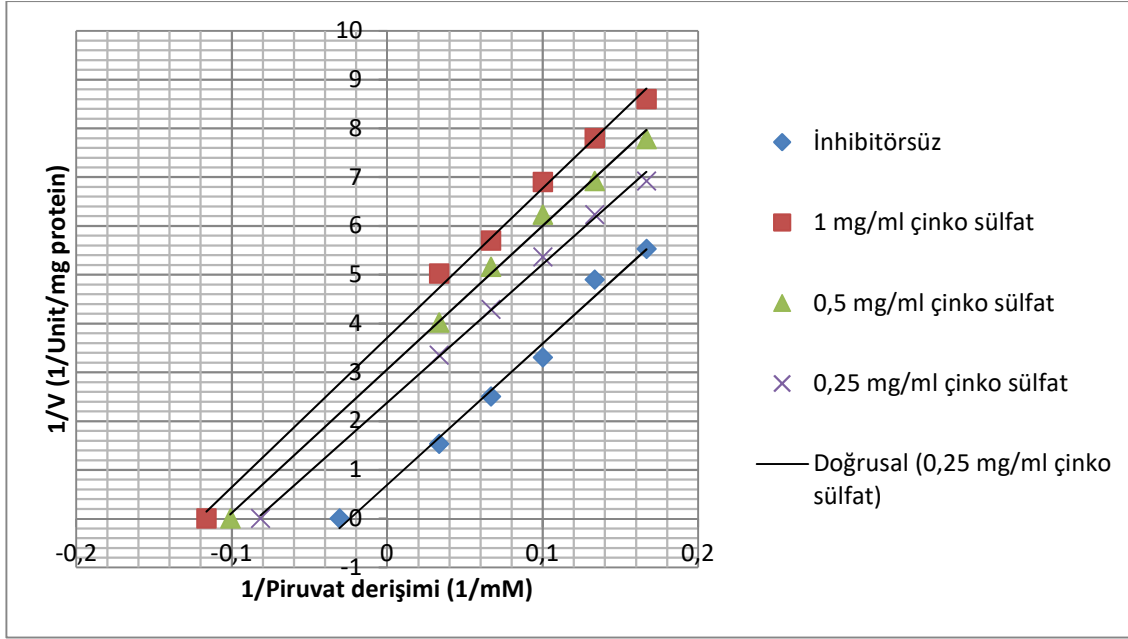
Enzimin maksimum hız (Vmax) ve Michaelis Menten sabit (Km) değerleri saptandı (Tablo 1). Bu bulgular yardımıyla çinko sülfatın laktat dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerine in vitro etkisi değerlendirildi.

3.BULGULAR

3.1. Çinko'nun Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi zerine İn Vitro Etkisi

Laktat dehidrogenaz enziminin Km ve Vmax değerlerini hesaplamak amacıyla 30, 15, 10, 7.5 ve

6 mM olmak üzere 5 farklı Na-piruvat deşişiminde, enzim aktivitesi ölçülerek Lineweaver Burk grafiği çizildi. Bu grafikten Laktat dehidrogenazın Vmax değeri 1.43 µmol piruvat/mg protein/dakika, Km değeri 32.57 mM olarak belirlendi. Çinko sülfatın laktat dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla beş substrat deşişiminde (30, 15, 10, 7.5, 6 mM) tepkime ortamına 1mg/ml, 0.5mg/ml ve 0.25mg/ml deşişimine sahip çinko sülfat eklenerek her bir çinko sülfat deşişimi için Laktat dehidrogenaz aktivitesi ölçülüp Lineweaver-Burk eğrileri elde edildi. Bu eğriler yardımı ile her bir çinko sülfat deşişimi için enzimin görünür Km değeri (inhibitör varlığındaki Km değeri) ve Vmax değerleri belirlendi Artan inko sülfat deşişiminde hem Km hem de Vmax değerlerinde dikkate değer bir azalma tespit edildiğinden çinko sülfatın enzimi unkompetetif olarak inhibe ettiği saptanmıştır(şekil 1).



Şekil 1. Laktat dehidrogenaz aktivitesinin 5 farklı substrat (piruvat) ve 3 farklı çinko sülfat derişimine bağlı olarak değişiminin Lineweaver- Burk grafiği ile incelenmesi

Figure 1. Investigation of the change of lactate dehydrogenase activity with 5 different substrate (pyruvate) and 3 different zinc sulfate concentrations by Lineweaver-Burk graph

Tablo 1. Laktat dehidrogenaz enziminin 3 farklı çinko sülfat derişiminde ve çinko sülfat içermeyen aktivite ortamındaki elde edilen Km, Vmax değerleri ve inhibisyon yüzdeleri

Table 1. Km, Vmax values and inhibition percentages of lactate dehydrogenase enzyme in three different zinc sulfate concentrations and in the absence of zinc sulphate

Çinko sülfat yokluğunda		Çinko sülfat varlığında			
Km (mM)	Vmax (µmol piruvat/mg protein) /dakika)	Çinko sülfat (mg/ml)	Km (mM)	Vmax (µmol piruvat/mg protein) /dakika)	% İnhibisyon
32,57	1,43	1	8,60	0,27	81,2
		0,5	9,90	0,32	77,7
		0,25	12,26	0,42	70,7

4. TARTIŞMA

Çinko tek oksidasyon durumunda divalent bir katyondur ve "d" kabuğu 10 d elektronları ile doludur. Divalent Zn redoks etkinlik göstermemekte, okside formu (Zn+3) ile redükte

formu (Zn+2) ise normal koşullarda oluşmamaktadır. Çinko hafif asidik olması nedeniyle sisteinin kükürdüne, histidinin imidazol azotuna, aspartat ve glutamatın karbonil oksijeni ile suya kuvvetle bağlanabilir. Ayrıca kükürt veya

azot atomları ile kararlı kompleksler oluşturarak proteinlerin yapılarını kuvvetlendirir (4).

Çinko nükleik asit, protein ve karbonhidrat metabolizmasını içeren enzim sistemlerinde görev almakta, iskelet ve üreme sistemini olumlu yönde geliştirmekte, yangı önleyici özelliği ile stres ve hastalıkların ortaya çıkmasını engellemektedir. Vücutta oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar gibi çok sayıda enzim yapısında görev almaktadır (24). Çinko özellikle bu enzimlerden karbonik anhidrazın yapısına katılmakta, solunum sisteminde karbondioksitin uzaklaştırılması, kalsifikasyon, keratinizasyon ve yaraların iyileşmesinde işlev görmektedir (11).

Çinko metali ve birçok bileşici diğer ağır metallerle karşılaştırıldığında düşük zehirlilik etkisi gösterir (8). Yaşamsal gerekli olan çinko, sindirim prosesinde, besin çinko halinde düzenlenir ve ince bağırsağın alt kısmında emilir ve büyük bir oranda proteinlere bağlanır. Boşaltım bağırsaklarda baskın olmakla birlikte bir kısmı da üre ve ter ile atılır (8,14,22).

Koroner arter hastalarının ve sağlıklı kişilerin serum Zn düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada koroner arter hastalarının serum Zn düzeyleri oldukça düşük bulunmuştur. Çinkonun aterosklerozla ilişkisi ile ilgili olarak, birkaç Sovyet araştırmacısı aterosklerotik hastaların aort duvarında bu elementin davranışını inceleyerek elde edilen verilerin çelişkili olduğunu bildirmiştir. Bazı araştırmalarda çinko aort duvarındaki konsantrasyon aterosklerozda artarken, bazılarında ise azalmakta olduğunu bulmuşlardır (3,17,21).

Çinko ile yapılan çalışmaların çoğunda, yetersizlikleri ile çakışan faydalar ve değişiklikler gösterir. Bazıları ise takviyeleri nedeniyle zararlar bildirir. Çinkonun, uyarıcı ve koruyucu gibi etkilerini vurgulayan raporlar bulunmaktadır

(7,15). Buna ek olarak, çinko eksikliğinde ortaya çıkan bazı zararlı etkilerin (6,13,27), yüksek metal dozlarında da ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (18). Sağlıklı insanlarda 8 günden fazla normalden 5 kat fazla çinko verildiğinde kemotaksis ve fagositozda bir azalma olduğu gösterilmiştir. Çinko uygulamasının 15 gün sürmesi halinde hücre çoğalmasının azaldığı ve çinkonun protein tersiyer yapılarını stabilize ederek işlevlerini değiştirdiği bildirilmiştir (16).

Farklı hücre hatlarında çinkonun etkisini analizleyen bir çalışmada farklı doz çinko uygulaması ile gözlemlenen etkilerin sadece türler arasında değil, aynı zamanda hücrelerin metale maruz kalma sürelerine göre de değişiklik gösterdiği vurgulanmıştır. Burada aynı dozda metalin, uyarıcı veya inhibe edici etkilere sahip olabileceği ileri sürülmüştür (25).

Literatürde Çinkonun LDH enzim aktivitesi üzerine etkisini inceleyen benzer bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte birçok enzim üzerine etkisi incelenmiş, farklı sonuçlar elde edilmiştir (2,12). Johnsen ve ark. Ları, insan spermi asit ekstraktlarında akrozinin esterolitik ve gelatinolitik aktivitesinin çinko tarafından inhibe edildiğini göstermişlerdir. İnsan akrozini üzerinde yapılan diğer bir çalışmada çinko iyonunun enzimi 0,25 mM konsantrasyonda %50, 10 nM konsantrasyonda ise, %64 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Burada çinkonun sistein artıklarına bağlandığını yani sülfhidril bağlayıcı ajan olduğunu ileri sürmüşlerdir (12).

Bizim çalışmamızda da çinko sülfatın Laktat Dehidrogenaz enzimini unkompetetif olarak inhibe ettiği belirlendi. LDH enzim aktivitesinin 0,25 mg/mL çinko sülfat varlığında bile oldukça yüksek oranda azaldığı görüldü. Burada çinko zamana ve derişime bağlı olarak LDH enziminde konformasyonel değişime neden olarak, işlevselliğini değiştirmiş olabilir.

Çinkonun faydalı etkisi çok iyi bilinmekle beraber zararlı etkileri ile ilgili bilgi oldukça azdır. Bu durum aşırı çinko kullanımına neden olmaktadır. Son yıllarda bebek ve çocuklar, çinko destekli gıdalar ile beslenmektedir (20). Bu nedenle ihtiyacı olmayan bireylerde çinkonun sürekli veya artmış dozunun potansiyel etkileri hakkında elde edilen bilgilerin daha doğru yorumlanması gerekir.

Yaptığımız çalışmanın sonucunda, çinko sülfatın laktat dehidrogenaz enzimini unkompatatif olarak inhibe ettiği belirlendi. Laktat dehidrogenaz enzim aktivitesinin 0.25 mg/mL çinko sülfat varlığında bile oldukça yüksek oranda azaldığı görüldü (Tablo1).

Bu nedenle aşırı çinko alımı ya da yapısında çinko bulunduran maddelere maruziyet enzimler üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir. Dolayısıyla esansiyel olarak aşırı çinko alımının veya günlük hayatta karşılaşılan çinko maruziyetinin olumsuz etkilerinin konu alındığı daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. **Arcasoy A. (2002):** Çinko ve çinko eksikliği. 2th ed.1-23, Ankara Talasemi Derneği Yayınları, Ankara.
2. **Akın V., Kaya N. (1991):** Saflaştırılmış insan akrozini üzerine Zn+2 ve Ca+2 iyonlarının etkisi. Atatürk Üniversitesi Tıp Bülteni; 23:439-444.
3. **Bala Ju M., Plotko S.A. (1965):** In: Trudy IV Vsesojuznogo S'ezda Patologoanatomov. Ki. İnev, Moscow, Medicina.
4. **Berg J.M., Shi Y. (1996):** The galvanization of biology: a grwing appreciation fort he roles of zinc. Science; 271:1081-1085.
5. **Boehringer and Mannheim (1973):** Biochemica information handbook, 1th ed.121-122,Boehringer Mannheim.
6. **Daniels W., Hendricks J., Salie R., Van Rensburg S.J. (2004):** A mechanism for zinc

toxicity in neuroblastoma cells. Metab Brain Dis; 19:79-88.

7. **Duncan E.J., Thompson M.P., Phua S.H. (2005):** Zinc Prtection of HepG2 cells from sporidesmin toxicity dos not require de novo gene transcription. Toxicol Lett; 159:164-172.
8. **Habashi F. (1997):** Handbook of Extractive Metallurgy. 2th ed. WILEY-VCH, Germany.
9. **Holbrook J.J., Liljas A., Steindel S.J., Rossmann M.G. (1975):** Lactate Dehydrogenase. The enzymes; 11:191-292.
10. **Hsieh K.M., Blumenthal H.T. (1956):** Serum Lactic Dehydrogenase Levels in Various Disease States. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine; 91:626-630.
11. **Jahson P.E. (1995):** Trace minerals and fertility in dairy cattle. (In) Biotechnology in the Feed Industry, Proceeding of Alltech's Annuel Symposium. 287-291, Nottingham Universty Press, England.
12. **Johnesen Q., Eliasson R., Lofman C.O. (1982):** Inhibition of the gelatinolytic and esterolytic activity of human sperm acrosin by zinc. Acta Physiol Scan; 114:457-476.
13. **Keller J., Owens C.T., Lai J.C., Devaud L.L. (2005):** The effects of 17β-estradiol and ethanol on zinc or manganese induced toxicity in SK-N-SH cells. Neurochemistry; 46:293-303.
14. **Küchler W., Verlag C.H. (1986):** Chemischen Technology. ISBN 3-446-13182-5, Wien.
15. **Prasad A., Bao B., Beck F.W., Kucuk O., Sarkar F.H. (2004):** Antioxidant effectmof zinc in humans. Free Radic Biol Med; 37:1182-1190.
16. **Prasad A.S., Meftah S., Abdallah J., Kaplan J., Brewer G.J., Bach J.F., Dardenne M. (1988):** Serum Thymulin in human zinc deficiency. J Clin Invest; 82:1202-1210.
17. **Racininskij I.D. (1967):** In: Trudy IV Vsesojuznogo S'ezda Patologoanatomov. 1th ed.71, Medicina, Moscow.

- 18. Reardon C.L., Lucas D.O. (1987):** Heavy mitogenesis: Zn⁺⁺ and Hg⁺⁺ induce cytotoxicity and interferon production in murine T lymphocytes. *Immünobiology*; 175:455-469.
- 19. Saner G. (2002):** Mikroelementler (Çinko). Neyzi O, Ertuğrul T (Ed), *Pediatri*. 3th ed.174-75, İstanbul.
- 20. Sherman A.R. (1992):** Zinc, copper and Iron nutriture and immunity. *J Nutr*; 122:604-609.
- 21. Sosunov A.V., Malik Ju S. (1967):** In: *Trudy IV Vsesojuznogo S'ezda Patologoanatomov*. 1th ed.102-103, Medicina, Moscow.
- 22. Trace Elements In Human Nutrition and Health. (1996):** World Health Organization, Geneva.
- 23. Vallee, B.L., Auld, D.S. (1990):** Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*; 29:5647-5659.
- 24. Vallee B.L., Faichuk K.H. (1993):** The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev*; 73:79-118.
- 25. Vega-Robledo G.B., Polo-Jimenez A., Morales-Martinez E., Rojas-Dotor S., Rico-Rosillo G. (2007):** Effect of zinc upon human and murine cell viability and differentiation. *Biol Trace Elem Res*; 120:133-140.
- 26. Wacker W.E.C., Ulmer D.D., Vallee B.L. (1956):** Metalloenzymes and myocardial infarction: Malic and lactic dehydrogenase activities and zinc concentrations in serum. *New England journal of medicine*; 255:449-456.
- 27. Wintergest E.S., Maggini S., Homig D.H. (2006):** Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Ann Nutr Metab*; 50:85-94.