

**DİABET OLUŞTURULAN KÖPEKLERDE LÖSİN AMİNOPEPTİDAZ(LAP)
AKTİVİTESİNİN TAYİNİ VE TANIDAKİ ÖNEMİ**

Seçkin Gündüz¹
Necati Utlu,³

Necati Kaya²
İsa Özaydın⁴

**Determination of Leucine Aminopeptidase(LAP) in the Dogs Made Diabetic
Experimentally and Its Importance in Diagnosis**

Summary: Fifty-six healthy dogs of both sexes, weighing 15-25 kg, were used in our study. The dogs were fed with two-week standard diet before the experiment. Pankreatectomy was carried out in 36 dogs of this group ($n=36$), as for the 20 dogs ($n=20$), they were left as being control group. sLAP activity levels were determined in the samples collected from all the animals. The sLAP activity in the pankreatectomy dogs were observed to be higher ($26.27 + 2.48$) than those of the normal ones ($16.55 + 5.34$).

The LAP levels measured in the groups were analysed between each other in importance and the difference between them was found to be very important ($p < 0.001$). This situation may be very important in the diagnosis of the disorders occur in pancreas.

Key Words: LAP, pankreatectomy, dog

Özet: Çalışmamızda her iki cinsten sağlıklı ve ağırlıkları 15-25 kg olan 56 adet köpek kullanıldı. Köpekler deneyden önce iki haftalık standart diyetle beslendi. Bunlardan 36 köpekte pankreatektomi ($n = 36$) gerçekleştirildi, 20 köpekte ($n=20$) kontrol grubu olmak üzere ayrıldı. Tüm hayvanlardan alınan kan numunelerinde sLAP aktivite seviyeleri tespit edildi.

Parsiyel pankreatektomili köpeklerde sLAP aktivitesi ($26.27 + 2.48$), normal köpeklerden ($16.4 + 5.34$) daha yüksek bulundu.

Gruplarda ölçülen sLAP seviyeleri kendi aralarında önemlilik yönünden analiz edildi ve aralarındaki fark istatistiki olarak çok önemli ($P < 0.001$)

1. Doç.Dr. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Cerrahi Anabilim Dalı, KARS

2 Doç. Dr. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Biyokimya Bilim Dalı, KARS

3 Araş.Gör. Bilim Uz. Kafkas Üniv. Biyokimya Bilim Dalı, KARS

4 Yrd. Doç. Dr. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Cerrahi Anabilim Dalı, KARS

bulundu. Bu durum pankreasta oluşan bozuklukların tanısında önemli olabilir.

Anahtar Kelimeler : LAP, Pankreatektomi, Köpek

Giriş

Pankreas; endokrin salgısıyla karbonhidrat metabolizmasında; ekzokrin salgısıyla da sindirimde görev alan exo-endokrin bir bezdir. Diğer bir deyişle pankreas; exocrine ve endokrine dokulardan yapılmış bir organdır ve bu organın endokrin sekresyonu metabolizma ile direkt ilgilidir. Pankreasın exocrin salgısı, yaşamın devamı için her zaman gerekli değildir. Bu ödevi tükrük bezleri ve ince bağırsaklar üstlenerek kompanse edebilirler (35).

Pankreas apoplexie'si, acute pankreas necros'u pankreatitis chronica serosa, pankreatitis apestematosa, langerhans adacıklarının hydropik degenaration'u atrophie'si ve sclerosis ve yine langerhans adacıkları hücrelerinin azalması ile karakterize lymphocyter infiltration'u gibi patolojik değişimler çoğunlukla yaşlılarda olmak üzere köpeklerde diabetes mellitus gibi metabolik bir sendroma neden olabilirler(35).

Köpeklerde diabetes mellitus ta genel olarak kaşeksi ve dehydratation, ileri olgularda polyurie, polydipsie ve hızla gelişen katarakt gözlenebilir. Diabetes mellitus, daha çok dişi ve özellikle 8-9 yaşlarında ve evlerde beslenen köpeklerde görülür. Dişilerde görülme oranı erkeklere oranla 2.5: 1'dir. Langerhans adacıklarının metastaz yapma özelliğindeki tümörlerinde hyper insulinism ile seyreden diabet olguları çoğunlukla çeşitli ırktan yaşlı köpeklerde saptanmıştır (13).

Diabetin tanısında çeşitli yöntemler denenmiştir. Son yıllarda gelişen analiz metodları içerisinde enzimlerin aktivitesinin saptanması önemli bir yer tutmaktadır; bunlardan biride LAP aktivitesinin tanıyındır.

LAP, "hidrolazlar" sınıfına giren, serum, idrar ve safrada bulunan proteolitik bir enzimdir (16, 20); karaciğer, pankreas, böbrek ve ince bağırsakta yüksek aktiviteli olmak üzere genellikle insan ve hayvanların dokularının hepsinde bulunur (32, 36, 39). LAP Aktivitesi bir çok iç salgı bezinde görülmüştür. Bir iç salgı bezine omurgalıların testisleri de dahildir. Leyding hücrelerinin hiperaktivitesi so-

nucu LAP aktivitesi de artar(10). Bu enzim hücrenin özellikle stoplazmasına lokalize olmuştur (142). LAP, göz lensinde plasentada ve seminal plazmada da bol miktarda vardır (18,37). Hidrolitik enzimler, peptit, amid ve hemiasetal gibi bağları içeren bileşiklerden başka, açıl veya fosforilester gruplarını taşıyan bileşiklerin parçalanma reaksiyonlarını katalize ederler (6, 25) LAP'ın yapısında lösün, izo-lösün ve valin gibi amino asitler bol bulunmakla beraber düşük miktarda da olsa aromatik amino asitlerde mevcuttur (40). LAP lösina-mid ve belli peptitlerle reaksiyona girer, ancak peptidin serbest amino grubunu taşıyan amino asit lösün olduğu takdirde reaksiyon gerçekleşir. (2, 8, 11 32, 37). LAP'ın vücutta tam fonksiyonu bilinmemekle beraber (7, 39) in vitro olarak aşağıdaki reaksiyonu katalize ettiği bilinmektedir(7).

LAP

L-Lösil-Beta-Naftilamid + H₂O → Lösün + Beta-Naftilamin

Elde edilen beta-naftilamin miktarı, LAP aktivitesinin miktarı ile doğru orantılıdır(7).

Materyal ve Metot

Çalışmada her iki cinsten sağlıklı ve ağırlıkları 15-25 kg olan 56 adet köpek kullanıldı. Köpekler deneyden önce iki haftalık standart diyetle beslendi ve iki gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu (n = 20), diğeri ise parsiyel pankreatektomi ile diabetes oluşturulan deneysel gruptur (n = 36).

Kan numunelerinin toplanması: Normal ve postoperatif dönemlerde kan numunelerinin alınması için köpeklere V. Cephalica antebrahium'dan fleksible intraket (branül) uygulandı. Kan alınacağı zaman intraketin kapağı açılarak kan alındı sonra kapaklar tekrar yerine yerleştirildi. Alınan kan numunelerinin serumlarında Goldbarg Rutenburg (G-R) (18) metodu ile serumda LAP aktivitesi tayin edildi.

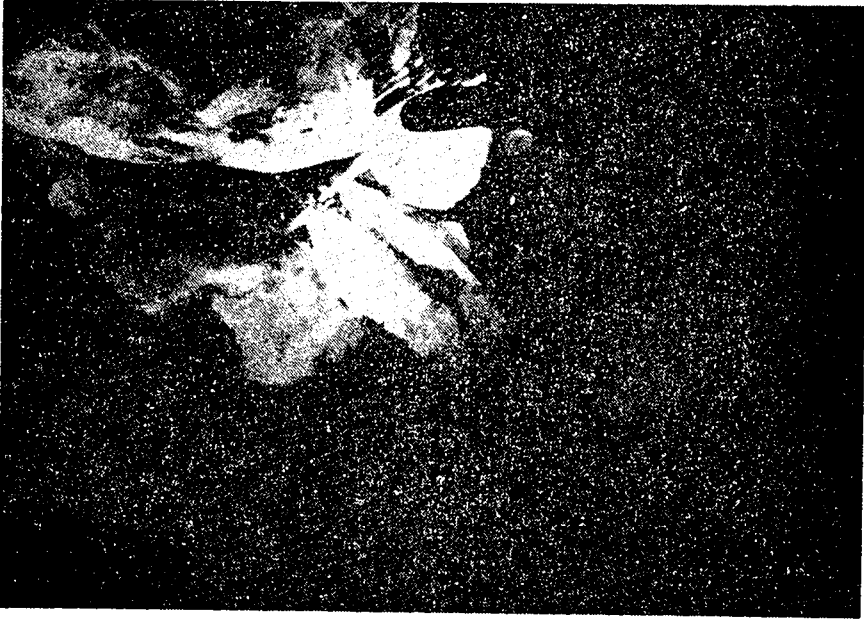
Anestezi: Deneye tabi tutulan köpeklerin anesteziinde xylazine (% 2 Rompun-Bayer) ve Ketamin HCl (50 mg/ml Ketalar) kombinasyonu (dissosiyatif anestezi) kullanıldı. Bunun için 2 mg/kg dozda xylazine'in kas içi enjeksiyonundan 5 dakika sonra 20 mg/kg dozda ketamin yine kas içi enjekte edilerek operasyon için uygun anestezi oluşturuldu.

Operasyon Tekniği: Köpeklerde operasyon median hatta gerçekleştirildi. Operasyon sahası tıraş ve dezenfekte edildikten sonra operasyon sahası steril serviyetlerle sınırlandırıldı; median hatta deri ensize edildi. Deri altı bağdoku ve linea alba küt diseksiyonla açılarak periton bir makasla kesildi. Pankreas duodenumla birlikte ensizyon bölgesinden karın boşluğu dışına çıkarıldı. Organ, kaudal uçtan başlayarak corpus pankreatis'in cranialindeki ductus pankreaticus majora kadar tüm eklentilerinden ve mezarterial damarlardan (damarlar ligatüre edilerek) ayırıldı (Resim 1). Bezin orta kısmına ipek iplikten bir ligatür konarak 1/2 kadarı ductus pankreaticus accessorius'la birlikte kesilerek uzaklaştırıldı (Resim 2). Kanamalar kontrol edildikten sonra periton ve kaslar katkütle, deri ipek iplikle dikilerek operasyon tamamlandı. Karın boşluğu kapatıldıktan sonra, karın boşluğuna 1.000.000. İU. kristal penisilin enjekte edilerek operasyon yarası koruyucu bir pansuman altına alındı.

Hayvanlara 4-5 gün süre ile 800.000 İÜ. prokain penisilin enjeksiyonu kas içi yolla yapıldı. Operasyon sonrası günlerde hayvanlar normal gıda ile beslendi.



Şekil 1. Eklentilerinden ayırt edilmiş pankreasın görünümü.
Fig. 1. A view of the pancreas isolated from the joints.



Şekil 2. Ductus Pancreaticus Major düzeyinde bezin 1/2 kısmının ekstirpasyonu.
Fig. 2. Extirpation of 1/2 part of the gland at ductus pancreaticus major level.

Bulgular

Kontrol ve parsiyel pankreatektomili köpek gruplarında bulunduğumuz sLAP aktivite değerleri tablo 1. de, ortalama değerleri (X) ve standart sapma değerleri (SD) ise tablo. 2 de verilmiştir.

Kontrol ve parsiyel pankreatektomili köpek gruplarında yapılan analiz sonuçlarının kendi aralarında önemli olup olmadığını tesbit etmek için "t" testi yapıldı ve gruplar arasındaki fark ($p < 0.001$) önemli bulundu.

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada LAP aktivitesini serumda incelemek suretiyle köpekler için normal sLAP değerini tesbit etmeyi hem de genel olarak pankreas- ta oluşan dejeneratif, metabolik, malign ve travmatik kökenli bozuklukların tanısında diğer enzim tayinleri ile birlikte bir analiz yöntemi olup olmadığı amaçlandı. Herhangi bir enzimin bol bulunduğu organ ya da dokunun genellikle hücrel harabiyetinin bir göstergesi

Tablo 1. Çalışmada kullanılan hayvanlara ait LAP aktivite değerleri (ug/dl).

Table 1. LAP values (ug/dfl) of the animals in the experiment

Sıra No	Kontrol Grubu	Deneyisel Grup
1	13.5	25.8
2	14.0	24.3
3	13.8	28.5
4	16.2	25.8
5	18.7	32.4
6	14.0	22.5
7	16.2	28.2
8	15.9	23.4
9	17.7	19.5
10	13.7	44.1
11	15.9	34.5
12	16.5	29.1
13	20.3	25.8
14	20.9	28.5
15	19.0	24.3
16	19.3	31.8
17	20.1	36.9
18	15.0	29.1
19	19.1	26.7
20	21.3	25.8
21	-	29.4
22	-	22.5
23	-	24.3
24	-	22.0
25	-	24.0
26	-	21.6
27	-	23.4
28	-	21.8
29	-	26.7
30	-	22.5
31	-	21.6
32	-	19.5
33	-	19.5
34	-	21.6
35	-	34.5
36	-	23.4

Tablo 2. Kontrol grubu ve parsiyel pankreatektomili köpeklerde LAP aktivitesinin ortalama değerleri.

Table 2. LAP mean values values of control group and the animals with partial pancreatectomy

Grup	n	LAP(ug/dl)	
		X	Sİ
Kontrol	20	16.40	5.34
Parsiyel Pankre- atektomi yapılmış Köpekler	36	26.27	2.48

olarak, plazmadaki aktivitesi yükselir. LAP aktivitesinin arttığı bir çok hastalık belirlenmiştir. Artışlar özellikle hepatobiliyer hastalıklar ile pankreas kanseri ve pankreatit gibi hastalıklarında daha fazladır (17-21). L-lösil peptidlerin sindirilmesinde ihtiyaç duyulan bu enzim özellikle ince bağırsak mukozasında ve pankreas salgısında mevcuttur (4, 26).

Pankreas, endokrin salgısıyla karbonhidrat metabolizmasında, ekzokrin salgısıyla sindirimde görev alan exo-endokrin bir bezdir. Glukozun intrasellüler olarak fazla bulunması halinde kullanılması ile ilgili enzimlerin hepsi aktive olur. Buna karşılık glukoneogenezisten sorumlu enzimlerin aktivitesi azalır. Genel olarak metabolitlerin kandaki miktarlarının artması hormonların salgılanma hızını etkilediği gibi, hormonların sekresyon hızının değişmeside metabolik yolların işleyişini etkiler (24, 38). İnsülinin yetersiz salgılanması veya insülin antagonistlerinin aktivitesinin artması halinde, ağır metabolizma bezuklukları şeklinde kendini gösteren Diabetes Mellitus meydana gelir. Ancak pankreatogen diabetten başka hipofizer (glukoz merkezinin uyarılmasına sebep olan kısımda iltihap, kanama, kuduz, sinirsel gerginlik hastalığı v.s.) ve hepatogen (karaciğer harabiyeti sonucu) diabet vardır. Her iki durumda da ketosis meydana gelir ve diabet koması görülür (3-43).

Aynı köpekler üzerinde yapılan başka bir çalışmada glukoz değerleri kontrol grubunda 106 ± 18 ve deneysel grupta ise 155 ± 27 mg/dl bulunmuş ve öldürücü diabetin oluşmadığı saptanmıştır(27).

Tablo 1'de görüldüğü gibi parsiyel pankreatektomili köpeklerde sLAP aktivitesi normal değerlerin çok üzerinde saptandı. Yapılan istatistik değerlendirmede sonucu normal ve parsiyel pankreatektomili köpekler arasında sLAP aktivitesi bakımından farklı ($P < 0.001$) önemli bulunmuştur.

Bunlardan da anlaşılacağı üzere parsiyel pankreatektomi sonucu köpeklerde kan şekeri artışına paralel olarak serum LAP aktiviteside artmaktadır.

Serum ve idrarda LAP aktivitesinin incelenmesi, pankreas kanserinin tanısında, sarılığın ayırıcı tanısında ve karaciğer hastalıklarının ortaya çıkarılması ile değerlendirilmesinde oldukça önemlidir (18). Rutenburg, Goldberg ve Pineda (18), yaptıkları bir çalışmada, pankreas tümörlerinde LAP'ın hem serumda hem de idrardaki sevi-

yelerini araştırmışlar ve dikkati çekecek kadar yüksek seviyeler belirlemişlerdir (26, 37).

Bir enzimin dokudan dokuya aktivitesi değişir, başka bir deyişle her doku ve organın kendine özgü enzim tablosu vardır (9,12). Böylece serum ve diğer vücut sıvılarında enzim tayinleri yapılarak ilgili hastalığın teşhisine yardımcı olunmaktadır (9, 23, 40). LAP'ın esas kaynağı pankreas hücreleridir ve proteolitik enzimler vasıtasıyla, sindirim süresince serbest kalan peptitlerin tam yıkımı için üretilir (29, 37).

Bu çalışmamızda hem köpekler için normal sLAP değerleri tespit edildi hem de genel olarak pankreasta oluşan bozuklukların tanısında diğer enzimlerle birlikte sLAP tespitinin de önemli olabileceği kanısına varıldı. Bu çalışmanın bu konuda yapılabilecek diğer araştırmalara ışık tutabileceğini ummaktayız.

Kaynaklar

1. **Albert, L.L.** (1975). *Biochemistry*. second edition, New York, 829-852.
2. **Allen, M.P., Yamada, A.H., Carpenter, F.H.** (1983). *Kinetisc parameters Metal substituted leucine aminopeptidase from bovine lens*. *Biochemistry* 22 (16): 3778-3783.
3. **Altan, M.Y.** (1969). *Evcil hayvanların iç ve deri hastalıkları*. Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Yayınları.
4. **Arsat, H.E., Manning, R.T., Delp, M.** (1959). *Serum Leucine Aminopeptidase Activity: Finding in Carcinoma of the Pancreas, Pregnancy and Other Disorders*. *Amer. J. Med. Sci.*, 238, 598.
5. **Austin, T., Geraci, J.R.** (1981). *Tissue sources and clinical application of four enzyme in phocid seals*. *Am. J. Vet. Res.*, 42(5): 834-837.
6. **Bakan, E.**, (1983). *Erzurum ve çevresindeki sağlam şahıslardan nötrofil alkalen fosfataz enzim seviyelerinin tesbiti, serum alkalen fosfataz ile ilgisinin araştırılması ve lökositlerin glikoz tüketiminin tayin edilmesi*. Erzurum Atatürk Üniv. Tıp Fak. İhtisas Tezi.
7. **Bauer, J.D., Ackermann, P.G., Toro, G.** (1968). *Bray's Clinical Laboratory Methods*. 7th ed. Saind Louis., C.V. Mosby Co, 399-401.
8. **Buitrago, G., Nava jo, J. A., Diez, G., et al.** (1985). *Seminal plasma leucine aminopeptidase in male fertility*. *Andrologia*, 17 (2): 139-142.
9. **Casey, A.E., Downey, E.L.** (1969). *Leucine Aminopeptidase in 1000 Liver pancreas profiles*. *South Med. J.*, 59: 221-226.
10. **Chanda, S.E., Patra, P.B., Chanda, R., et al.** (1980). *A Histochemical Study of Leucine Aminopeptidase Activity in the Testes of Immature and Mature Quinapigs*. *Expriencia*. 15: 36 (10): 1232-3.

11. **Colowick, S.P., Kaplan, N.O.** (1963). *Methods in enzymology*. vol. VI, 840-842.
12. **Danışefsky, I.** ((1980). *Biochemistry for Medical Sciences*. 1 nd ed., Boston, Brown Co., 490-492.
13. **Dixon, J.B., Sanford, J.** (1962). *Pathological Featur of Spontaneous Canine Diabetes Mellitus*. J. Comp. Path., 72: 153-164.
14. **Eastman, R.D.** (1975). *Biochemical values in clinical medicine*. Biristol 5 th ed. John Wright and Sans LTD., p. 116-117.
15. **Ersoy, E., Bayşu, N., Ertürk, K., ve Üstdal, M.** (1986). *Biyokimya*. A. Üniv. Vet. Fak. Yayınları, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara. 357-410.
16. **Fischback, F.A.** (1984). *Manuel of Laboratory Diagnostic Tests*. 2 th. ed., Lippincott Co, Philadelphia, 180-182.
17. **Frankel, S., Reitman, S., Sonnenwirth, A.C.** (1970). *Gradwohls' Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*. 7 th ed., Sqint Louis C.V. Mosby Co., Vol. I, 136-138.
18. **Goldberg, J.A., Pineda, E.P., Rutenburg, A.M.** (1959). *The measurement of activity leucine aminopeptidase in serum, urine, bile and tissues*. Amer. J. Clin. Pathol., 32:571-575.
19. **Hafkenscheld, J.C., Kohler, B.B.** (1985). *A Continuous Method for the Determination of Leucine Aminopeptidase in Human Serum with Leucineamid as Substrat*. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 23: 393-398.
20. **Henry, J.B.** (1984). *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. W.B. Savn ders Co., 262.
21. **Himmelhoch, S.R.** (1969). *Leucine aminopeptidase: A zinc metaloenzyme*. Archives of Biochemistry and Biophys., 13 (4): 597-602.
22. **İbrahim, F.K., Fattah, M.M., Ramadan, M.A., et al.** (1976). *Leucine amino peptidase octivity in maternal cord blood and in placenta of normal pregnancy and in preeclampsia*. Acta Obstet. Gynecol. Scand, 65 (1): 45-47.
23. **Imren, A.H., Turan, O.,** (1985). *Tanıta Laboratuvar*. 3. Bas. Kırklareli, Serment Matbaası. 216-250.
24. **Jiro, J.K.** (1980). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 4 the. ed. New York 2-48.
25. **Kachemar, J.F., Moss, D.W.** (1976). "*Enzymes*" Tietz N. (Derleme) Fundamentals of clinical chemistry. London, W.B. Saunders Co., 601-610, 657.
26. **Kaplan, A., Ruark, S.R.** (1963). *Serum leucine aminopeptidase. Activity in normal newborns and infants*, Amer. J. Dis. Child., 106, 161.
27. **Kaya, N., Gündüz, S., Utlu, N., Özaydın, İ.** (1992). *Deneyisel olarak diabet meydana getirilmiş köpeklerde kan şekeri tayini*. Atatürk Üniv. Tıp Bülteni Cilt: 24 Sayı: 4, 827-838.
28. **Kohno, H., Kanda, S., Kanno, T.** (1986). *Immunoaffinity Prufication and Charaterization of Leucine Aminopeptidase From Human Liver*. J. Biol. Chern. 261(23): 10744-10748.

29. **Lynch, M.J., Raphael, S.S., Mellor, L.D.** (1957). *Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology*. 2nd ed. London, 214, 395.
30. **Martin, D.W., Mayes, P.A., Rodwell, V.W.** (1971). *Harper's Review of Biochemistry*. 18th ed. California, Lan. Med. Publ., 61-62.
31. **Norbert, W.T.** (1985). *Textbook of clinical chemistry*. West Washington Square, Philadelphia. 775-823.
32. **O'Brien, D., Ibbot, F. A., Redgreen, D.O.** (1970). *Laboratory manual of pediatric micro-biochemical technology*. 4th ed. London, 203-211.
33. **Oran, M.** (1957). *Sarılık kusulu geyirleri furkleri serum enzimleri*. Türk Tıp Cemiyeti Mecm., 9 (33): 406-418.
34. **Öktem, B.** (1971). *Evcil hayvanların göz hastalıkları*. A.Ü. Vet. Fak. Yay., A.Ü. Basımevi. Ankara.
35. **Pamukçu, M.** (1966). *Veteriner Patoloji*. I. cilt. A.Ü. Basımevi. Ankara s. 404-457.
36. **Pineda, E.P., Goldberg, J.A., Rutenburg, A.R.** (1957). *Serum Leucine Aminopeptidase in Pancreatic and Hepatobiliary Diseases*. *Gastroenterology* 33: 533-712.
37. **Raphael, S.F.** (1983). *Lynch's medical laboratory techniques*. 4th ed. London W.B. Saunders Co., 168-171.
38. **Robert, K.M., Darby, K.G., Peter, A.M., and Weiss, W.R.** (1931). *Harper's Biochemistry*, 22nd. ed. California. 179-189.
39. **Rutenburg, A.M., Goldberg, J.A., Pineda, E.P.** (1958). *Leucine Aminodase Activity*. *New Engl. J. Med.* 259 (10): 469.
40. **Smith, E.L., Hill, R.L.** (1966). *Leucine aminopeptidase*. *The enzyme*, vol. 4.37-61.
41. **Smith, E.E., Kaufman, J.T., Rutenburg, A.M.** (1965). *The partial purification of an amino acidnaphthylamidase from human liver*. *J. Biol. Chem.* 240 (4): 1718-1721.
42. **Taylor, A., Tisdell, F.E., Carpenter, F.H.** (1981). *Leucine aminopeptidase (Bovine Lens) : Synthesis and kinetic properties of ortho-meta and para substituted leucyl - amidase*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 210 (1): 90-97.
43. **Urman, H.K.** (1977). *Sinir Sistemi Patolojisi*. A.Ü. Vet. Fak. Yay. A.Ü. Basımevi. Ankara.
44. **Üstüdal, K.M.** (1983). *Biyo kimya: Vitaminler-Enzimler-Hormonlar*. I. Bas. Anadolu Univ. Basımevi, 183-218, Eskişehir.
45. **Zimmermann, H.J., West, M.** (1969). *Serum enzyme in gastrointestinal diseases*. *Med. Clin. North. Amer.*, 48, 189.