

T.C
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

KARS YÖRESİNDEKİ KOYUNLARDA SERUM VE SÜT LÖSİN
AMİNOPEPTİDAZ AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Arş. Gör. Metin ÖĞÜN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Necati KAYA

2003-KARS

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Araştırma Görevlisi Metin Öğün'ün Yüksek Lisans TEZİ olarak hazırladığı 'Kars Yöresindeki Koyunlarda Serum ve Süt LAP aktivitesinin Araştırılması' adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ile kabul/red edilmiştir.

...../...../ 2003

Adı Soyadı

İmza

Başkan :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Bu tezin kabulü, Fen bilimleri Enstitüsü yönetmeliği Kurulu'nun/...../..... gün ve/...../..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Haydar YÜKSEK

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

| | |
|--------------------------------------|----|
| 1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER | 1 |
| 1.1. Koyun Irkları | 2 |
| 1.2. Enzimler | 3 |
| 1.2.1. Aminopeptidazlar | 5 |
| 1.2.1.1. Lössin Aminopeptidaz | 5 |
| 1.2.1.2. LAP'ın Moleküler Yapısı | 7 |
| 1.2.1.3. LAP'ın Monomer Yapısı | 8 |
| 1.2.1.4. LAP'ın Hekzamer Yapısı | 9 |
| 1.2.1.5. LAP'ın Aktif Bölgesi | 10 |
| 1.2.1.6. LAP'ın Etki Mekanizması | 11 |
| 1.2.1.7. LAP'ın İnhibitörleri | 13 |
| 1.2.1.8. LAP'ın Klinik Önemi | 13 |
| 2. MATERYAL VE METOT | 17 |
| 2.1. Materyal | 17 |
| 2.2. Metot | 18 |
| 2.2.1. Serumda LAP Aktivitesi Tayini | 18 |
| 2.2.1.1. Kullanılan Çözeltiler | 18 |
| 2.2.1.2. Deneyin Yapılışı | 19 |
| 2.2.2. Sütte LAP Aktivitesi Tayini | 21 |
| 2.2.3. Sonuçların Hesaplanması | 21 |
| 2.2.4. Standart Eğrinin Hazırlanması | 22 |
| 2.2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi | 23 |
| 3. BULGULAR | 24 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ | 25 |
| 5. KAYNAKLAR | 29 |

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Kars'ta doğdu. İlk ,orta ve lise öğrenimini burada tamamladı. 1993 yılında girdiği Hacettepe Üniversitesi Kimya öğretmenliği (Almanca) bölümünü 1998 yılında tamamladı. 1999 yılında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Araştırma görevlisi olarak göreve başladı. 2000 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Halen aynı Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

ÖZET

Bu çalışmada, Kars yöresinde bulunan Tuj ve Morkaraman ırkı koyunlarda serum ve süt Lösin Aminopeptidaz (LAP) aktivitesinin araştırılması amaçlandı.

Materyal olarak 87 adet 3-6 yaşında, Tuj ve Morkaraman ırkı koyun kullanıldı. Koyunlardan uygun alınan kanlardan elde edilen serum ve süt örneklerinde spektrofotometre ile LAP aktiviteleri tayin edildi.

Serum LAP aktivitesi Morkaraman ırkı koyunlarda $8,93 \pm 3,50$ $\mu\text{g/ml}$, süt LAP aktivitesi de $16,84 \pm 6,35$ $\mu\text{g/ml}$ olarak, Tuj ırkı koyunlarda serum LAP aktivitesi $8,36 \pm 1,82$ $\mu\text{g/ml}$, süt LAP aktivitesi de $17,00 \pm 9,17$ $\mu\text{g/ml}$ bulundu. Değişik ırk ve yaştaki koyunlarda yapılan bu çalışmada yaş ve ırka göre istatistiki olarak önemli bir fark bulunmadı.

Sonuç olarak sağlıklı koyunlarda serum ve süt LAP aktivitelerinin saptanmasıyla ileride koyunlar üzerinde yapılacak diğer araştırmalara kaynak oluşturabileceği kanaatine varıldı.

SUMMARY

This study was aimed to determine LAP activity which were grown up in and around the Kars.

For this study, 87 Morkaraman and Tuj sheep were used as material. The Blood serum and milk LAP activities was determined by spectrofotometer.

As a result, for Morkaraman sheep the serum LAP activity $8,93 \pm 3,50$ $\mu\text{g/ml}$ and the milk LAP activity $16,84 \pm 6,35$ $\mu\text{g/ml}$ for Tuj sheep serum LAP activity $8,36 \pm 1,82$ $\mu\text{g/ml}$ and the milk LAP activity $17,00 \pm 9,17$ $\mu\text{g/ml}$ was found.

TEŞEKKÜR

Bu tezin belirlenmesi ve hazırlanmasında desteklerini esirgemeyen Tez Danıőmanın Sayın Prof. Dr. Necati KAYA' ya, çalışma esnasında yardımını çok gördüğüm sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Ayla ÖZCAN'a, tüm kürsü arkadaşlarıma ve her zaman yanımda olan aileme içtenlikle teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

1.GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

Dünyada hayvansal üretim faaliyetleri arasında koyun yetiştiriciliği önemli bir yer tutar. Çeşitli ülkelerde, başka amaçlar için kullanılmayan mera ve otlaklar koyun yetiştiriciliği yolu ile uygun bir şekilde değerlendirilebilmektedir. Koyunlar, böyle alanlardaki doğal vejetasyonu, insanların beslenmesi için gerekli et ve süt gibi besin ürünlerine dönüştürür, yapağı ve deri gibi ürünleri de üretir. Dünyada 1,2 milyar adet koyun bulunmaktadır. Mevcut koyunlardan yılda 6,1 milyon ton et, 8,6 milyon ton süt üretilmektedir. Bu üretim miktarı dünya toplam et ve süt üretiminin sırasıyla %4 ve % 2' sine denk gelir(1).

Türkiye'nin büyük bir bölümünde yazların kurak ve kışların sert olması nedeniyle mera ve otlaklar genellikle fakirdir. Ülke yüzölçümünün %23 kadarını bu tip mera ve otlaklar oluşturur. Türkiye'de ortalama et üretiminin %32'si ve süt üretiminin %22'si bu yetiştirme kolundan sağlanmaktadır. Öte yandan koyunculuk kesiminden yılda 62.000 ton yapağı ve 67.000 ton taze deri elde edilmektedir. Bu ürünler halı, yünlü dokuma ve deri sanayilerinin ham maddelerini oluşturmaktadır(1).

Tüm dünyada hayvansal ürünler açısından önemli yeri olan koyunlardan ve diğer evcil hayvanlardan daha fazla verim alınmasının yanısıra hastalıklardan da korunma, teşhis ve tedavide önemli yer tutan biyokimyasal parametrelerin tesbiti ve özellikle enzim testleri önemlidir. Enzimler genellikle tıpta bazı hastalıkların teşhisinde ve bir dereceye kadar da tedavide kullanılmaktadır(2,3).

Günümüzde veteriner hekimlik alanında enzim testlerinden yeterince yararlanıldığını söylemek olanaksız bulunmakla birlikte, önümüzdeki yıllarda, özellikle çabuk sonuç veren, duyarlı ve yeterince ucuz tekniklerin geliştirilmesine bağlı olarak uygulamaların yaygınlık kazanabileceği anlaşılmaktadır. Öncelikle kan serumunda, daha az da beyin- omurilik sıvısı, sinovya gibi organizma sıvıları ile süt, idrar ve dışkı örneklerinde enzim aktivitelerinin ölçülmesi klinik biyokimya alanında giderek artan bir değer

kazanmış ve özellikle karaciğer, miyokardium ve kan hastalıklarının tanınması ve izlenmesi amacı ile kullanılması yaygınlaşmıştır(2,4).

Bu çalışma ile Kars yöresindeki Tuj ve Morkaraman ırkı koyunlarda serum ve süt LAP aktivitelerinin tesbiti ile ileride yapılacak çalışmalarda da bir kriter olarak kullanılabilmesi amaçlanmıştır.

1.1. Koyun Irkları

Türkiye, değişik coğrafi yapıda ve farklı iklim şartlarına sahip çeşitli bölgelerden meydana geldiğinden her bölgede o bölgenin şartlarına uyum sağlamış koyun ırkları yetiştirilmektedir. Türkiye'de yetiştirilen koyun ırkları kuyruk yapısına göre dört grupta incelenir(1).

a) Yağlı kuyruklu ırklar:

Akkaraman, Morkaraman, Dağlıç, İvesi, Karagül

b) Yağsız uzun kuyruklu ırklar:

Kıvırcık, Karakaya, İmroz, Sakız, Türk Merinosu

c) Uyluğu yağlı ırk

Tuj

d) Diğer Koyunlar

Kamakuyruk, Herik, Çandır, Kesber vb.

Kars ve yöresinde ise genellikle Tuj ve Morkaraman ırkı koyun yetiştirilmektedir.

a) Tuj : Türkiye'nin Rusya sınırına yakın kuzeydoğu bölgesinde, özellikle Kars, Ardahan ve Iğdır çevresinde yetiştirilen bu ırk Kars koyunu, Çıldır koyunu ve kesik olarak da bilinir. Vücut beyaz renkli kaba-karışık yapağı ile örtülüdür. Göz etrafında ve ayaklarda siyahlıklar bulunur. Erkekler boynuzlu dişiler boynuzsuzdur. Uyluğu yağlı bir ırktır. Kuyruk kısa ve yağlı olup dip kısmında ve butların iç yüzünde yağ kütlesi bulunur. Vücut orta iriliktir. Yapağısı Akkaraman ve Morkaraman yapağısından iyidir.

Anaç koyunlarda; canlı ağırlık 445 kg., kirli yapağı verimi 2 kg., lüle uzunluğu 115 cm., yapağı kalitesi 40-50 S (C-D), süt verimi 560 kg.,

laktasyon süresi 140-150 gün, ikiz doğum oranı %5-10, yapağı randımanı %60-65 dir(1).

b) Morkaraman: Yerli bir ırktır ve Doğu Anadolu'da yetiştirilir. Bu ırk sayı olarak Türkiye'de ikinci sırada (%23,2) yer alır. Vücut kahverengi veya kızıl kahverengi kaba-karışık yapağı ile örtülüdür. Erkekler ve dişilerde boynuzlu ve boynuzsuz olanına rastlanır. Baş, boyun, karınaltı, bacaklar çıplaktır. Baş uzun ve dar, boyun uzun, vücut dar ve kısa, bacaklar uzundur. Kuyruk yağlı ve S kıvrımlıdır.

Anaç koyunlarda; canlı ağırlık 50-60 kg., kirli yapağı verimi 2-2,5 kg., lüle uzunluğu 10-12 cm., yapağı kalitesi 36-42 S, süt verimi 80-90 kg., laktasyon süresi 150-160 gün, ikiz doğum oranı %20-30, yapağı randımanı %65-72 dir (1).

1.2. Enzimler

Enzimler çok az miktarları ve üstün katalitik güçleri biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapılı moleküllerdir. Öyle ki enzimle katalizlenen bir kimyasal reaksiyonun hızı enzimsiz bir reaksiyona göre 10^6 - 10^{12} kat daha fazladır. Biyolojik aktif proteinler olan enzimler reaksiyon sırasında bazı fiziksel değişimlere uğrasalar da reaksiyon sonunda tekrar başlangıçtaki durumlarına dönüşürler, harcanarak ortadan kaybolmazlar (2).

Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonununun 1964 yılında enzimleri sistematik bir isimlendirme ve sınıflandırmaya tabi tutmuştur. Bu sistem üzerinde 1972 ve 1978 yıllarında yapılan düzenlemelerle enzimler 6 ana sınıfa ayrılmıştır. Enzim kod numaraları noktalarla ayrılmış 4 rakamdan ibaret olup ilk rakamı enzimin 6 ana sınıftan hangisine girdiğini, ikinci rakam etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu, üçüncü rakam akseptörü, dördüncü rakam ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasını gösterir (2).

1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler bu sınıfta toplanmıştır. Bu sınıf enzimlerin substratları

genellikle elektron ve hidrojen donörleridir. NADH, NADPH, FADH₂, FMNH₂ gibi koenzimleri bulundurlar. Laktat dehidrogenaz (LDH), ve katalaz bu grup enzimlere örnektir.

2. Transferazlar: Fonksiyonel bir grubu, bir donörden bir akseptöre taşıyan enzimlerdir. Sistematik isim donör, akseptör grup transferaz şeklindedir. Transaminazlar bu gruba en iyi örnektir. Bu grubun en iyi bilinen enzimleri glutamat-okzalasetat transaminaz (GOT) ve glutamat-privat transaminazdır (GPT).

3. Hidrolazlar: Çeşitli bağların hidrolizini katalize eden enzimlerdir. Substratın çeşidine göre ester, eter, peptid v.s. bağları hidrolize eder. Fosfataz, sülfatazlar, pepsin, tripsin bu gruba örnek verilebilir.

4. Liyazlar: Bu grup enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki bağları hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla kırarlar veya bu atomlar arasına bir çok çift bağ ilave ederler. Karboksiliyazlardan dekarboksilazlar, privat dekarboksilaz, dehidratazlardan fumaraz bu gruba örnektir.

5. İzomerazlar: Bir grup içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri katalize eden enzimler olup yaptıkları izomerizme göre rasemazlar, epimerazlar, cis-trans izomerazlar, izomerazlar, tautomerazlar, mutazlar, ve siklo-izomerazlar adını almaktadırlar.

6. Ligazlar: Ligazlar C-O, C-S, C-N, C-C arasındaki bir bağın oluşmasını sağlayan enzimlerdir. Bu enzimler genellikle ATP deki veya diğer trifosfatlardaki pirofosfatı hidrolize ederek iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize eder. Asetatı CoA ile birleştirerek As-CoA'yı meydana getiren asetil CoA sentetaz bu gruba örnektir(2,3).

Enzim kod numaraları noktalarla ayrılmış 4 rakamdan ibaret olup ilk rakamı enzimin 6 ana sınıftan hangisine girdiğini, ikinci rakam etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu, üçüncü rakam ise akseptörü, dördüncü rakam ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasını gösterir(2).

Lösin Aminopeptidaz LAP (3.4.11.1) örneğinde olduğu gibi ilk rakam olan enzimin bir hidrolaz olduğunu, ikinci rakam peptidleri hidrolize eden peptidaz olduğunu, üçüncü rakam peptidleri amino grubundan parçaladığını,

dördüncü rakam ise onun spesifitesini gösteren lösün içeren bileşikleri hidrolize ettiğini göstermektedir(7).

1.2.1. Aminopeptidazlar

Aminopeptidazlar, barsak kanalında proteinlerin sindiriminde önemli rolü olan enzimlerdir. Polipeptidlerin sindirimi, pankreastan salınan çinko içeren bir enzim olan karboksipeptidaz ve duodenumun Brunner's bezleri ve Lieberkühn bezlerinden salgılanan aminopeptidaz ve dipeptidazların bir karışımıyla gerçekleşir (4).

Aminopeptidazlar çok geniş bir sınıfa sahip proteinazların bir üyesi olup, protein oluşumu, hormon üretimi ve peptidlerin sindiriminde görev alırlar. Ayrıca bu enzimlerin, proteinlerin parçalanmasında ve biyolojik aktif peptidlerin metabolizmasında büyük önemleri vardır. Aminoasitleri protein molekülünün N-terminalinden parçalayan ekzopeptidazları içerirler(4,5).

1.2.1.1. Lösün Aminopeptidaz (LAP EC 3.4.11.1)

1929 yılında Lindertrom-Lang, domuzların intestinal mukozasından ekstrakte edilen erepsinin lösildiglisini hızla hidrolize eden bir enzim içerdiğini gösterdi. Bu enzimin erepsinin diğer peptidazlarından farklı olduğu önceleri Euler ve ark. tarafından gösterilmişti. Daha sonraları, Johnson ve ark. tarafından kısmen saflaştırılmış ve ilk olarak lösilpeptidaz olarak isimlendirilen bu enzimin Mg^{+2} ile aktive edildiği gösterilmiştir. Johnson ve Berger daha sonra bu enzimin Mn^{+2} ile daha iyi aktive olabileceğini gösterdi (5).

Daha sonraları yapılan çalışmalarda L-lösilamid bileşiklerini hidrolize ettiği fakat N-asetil bileşiklerinin dayanıklı olduğunun bulunmasından sonra bu enzime Lösün Aminopeptidaz (LAP) adı verildi (5,6,8).

Günümüzde sadece lösün içeren bileşikleri hidrolize etmediği bilinmektedir (5-8).

Smith 1940 ve 1950'li yıllar arasında yaptığı bir çok çalışmada bu enzimin büyük çoğunlukta peptid ve amidleri hidrolize ettiğini gösterdi, metal iyonunu aktivasyonunu da açıkladı (10,11).

Bir ekzopeptidaz olan LAP; polipeptid ve peptid zincirindeki N-terminal amino asitleri hidrolize eder. Her ne kadar LAP adı enzimin spesifitesini belirtse de, hidrofobik bir çok amino asidi kolaylıkla hidrolize edebilir. Arginin, lizin, prolin gibi bazı amino asitler zayıf substrat özelliği gösterirler. Bununla beraber enzimin parçaladığı tüm amino asitler L-konfigurasyonunda olmalıdır (5,7,9,12,13).

LAP sitozolik bir aminopeptidaz olup, özellikle ince barsak mukozası, pankreas, böbrek, uterusun stroma hücreleri ve karaciğer hücrelerinde yüksek aktivitede olmak üzere insan ve hayvan dokularında(5,44), bitkilerde ve bakterilerde bulunur (44). Enzim hücrenin sitoplazmasına lokalize olmuş durumdadır (6,7).

Süt(19), serum, idrar gaita, safra ve mide sıvısında önemli aktivitede bulunan enzimin fizyolojik fonksiyonu ve sitoplazmadan vücut sıvılarına nasıl geçtiği henüz aydınlatılamamıştır (7,19,20).

LAP metallopeptidazlar grubundan olup tripeptidleri, tetrapeptidleri, pentapeptidleri hidrolize etmesine rağmen dipeptidler üzerinde bir aktivite göstermez(9). Serbest $-NH_2$ grubuna sahip peptid bağlarının yıkımında spesifik bir enzim olan LAP'ın aktivite gösterebilmesi için serbest karbonil grubu gereklidir (12,14).

LAP'ın hayvansal organlardaki dağılımı ile ilgili geniş çalışmalar yapılmasına rağmen meme dokusu ve süt LAP aktivitesi hakkında literatürlere rastlanmamıştır.

Enzimin aktivitesini etkileyen önemli faktörler inek sütü LAP aktivitesi tayini içinde yapılmıştır(19). Optimal ölçüm şartlarını sağlamak ancak farklı araştırma gruplarının farklı zamanlarda elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması ile mümkündür. Farklı faktörlerin enzim aktivitesine etkisiyle ilgili koşulların optimize edilmesi ile sonuçlarda güvenilirliğe gidilebilir. Ölçümün optimize edilmesi saklama koşulları, inkübasyon süresi, inkübasyon

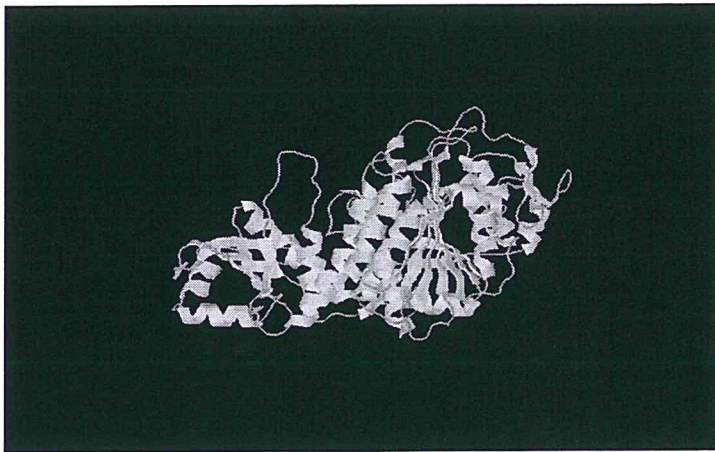
ısı, substrat konsantrasyonu, sütteki pH değeri, saklama derecesi ve aktivatörlere bağlıdır. Yapılan çalışmalar süt LAP aktivitesi için en uygun inkübasyon süresinin 37° C'de 30 dk. olduğunu göstermektedir. Bu sürede enzim substratı ile doyurulmaktadır. Bundan daha düşük ve yüksek inkübasyon süreleri de bulmak mümkündür. 60°C' deki ısıda enzim aktivitesinin %80'ini kaybettiği, 75° C' de ise hiçbir aktivite göstermediği kaydedilmiştir (19).

Süt örnekleri ile yapılan çalışmalarda pH değerinin 6,6-7,5 arasında değiştiği bildirilmiştir (19).

Süt LAP aktivitesinde sulandırma işlemi için hiçbir literatür bilgisi bulunamamıştır.

1.2.1.2. Moleküler Yapısı

Amino peptidazlar hakkında çok az bilgi olmasına rağmen özellikle sığır lens LAP'ı iyi bilinmektedir. Molekül ağırlığı 324 000 Da. olup, 15 α -heliks ve 11 β -katlanmış yaprak yapısı hakimdir. Her birinin molekül ağırlığı 54,000 olan 6 tane alt birimden ve 12 tane çinko iyonundan oluşan hegzamerik bir yapıya sahiptir. Bu enzimin amino asit zinciri hem DNA hem de protein kısmı için aydınlatılmıştır (9,12,13).



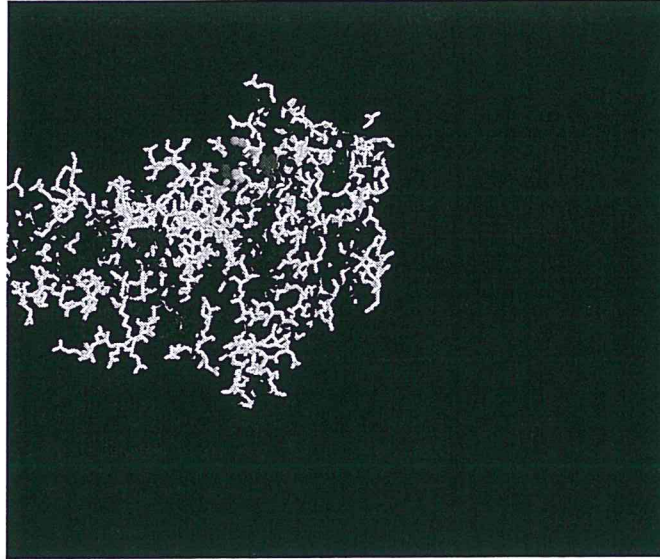
Şekil I. Sığır lens lösin amino peptidazı (51)

1.2.1.3. Monomer Yapısı

LAP 487 tane amino asit ve iki tane de çinko iyonu içeren bir çinko-peptidazdır. Yapıda buluna amino asitler α - ve β - gibi iki katlı bir molekül oluştururlar. Bu molekülün yarıçapı yaklaşık $90 \times 55 \times 55 \text{ \AA}$ kadardır. Sekonder yapının ise %40'ı α -heliks, %19 da β -katlanmış yaprak şeklindedir (9,12).

N-terminaldeki 150 amino asit katlanarak dört tane α -heliks arasına girer ve beş kenarlı bir β -katlanmış yaprak tabakası oluşturur. Oluşan bu tabakanın dört tanesi paralel kenar bir tanesi de antiparalel kenardır. Bir α -heliks ve beşinci β -katlanmış yaprak tabaka birleşerek uzun bir spiral oluşturur ki bu spiral yapı Arg-137 ile Lys-138 amino asitleri arasındadır (12,13).

α -heliks yapılarından bir tanesi 151. ve 170. amino asitleri arasında oluşur ve N-terminal ile C-terminal bölgeyi birbirine bağlayan merkezde sekiz üyeli sandalye şeklindeki β -katlanmış yaprak yapısı hakimdir. Buna ilaveten monomer yüzeye lokalize olmuş ve enzimin diğer hegzamer üyelerine etki edebilen üç kenarlı küçük bir β -katlanmış yaprak tabakası daha vardır. Aktif bölge ve iki tane çinko iyonu ise tamamen katalitik bölgeye lokalize olmuş durumdadır (11,12,14,15).

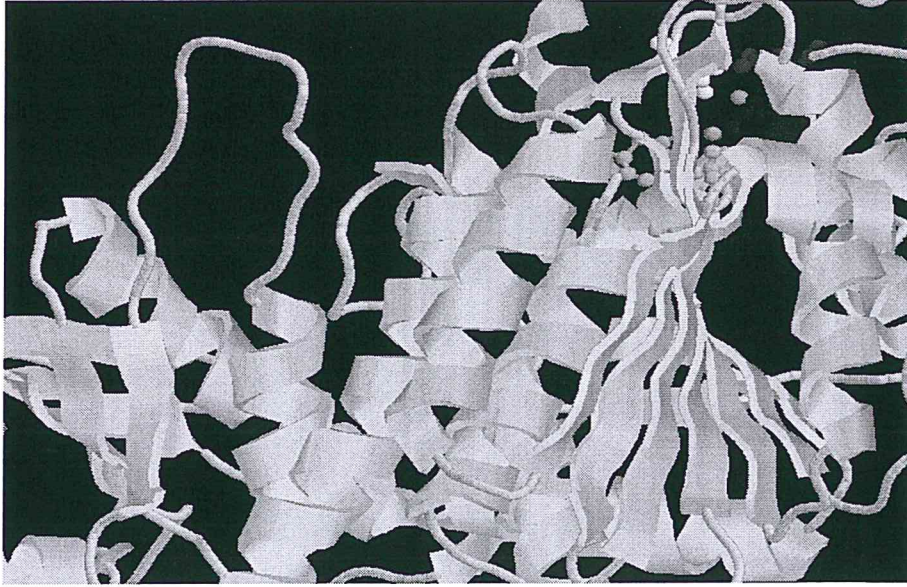


Şekil II . LAP'ın monomer yapısı (51)

Norbert ve ark.'nın X-ışınları ile yaptıkları bir çalışmada, *Escherichia coli*'den elde edilen aminopeptidaz A (PepA) ve sığır lensinden elde edilen LAP'ın yapılarının çok benzer olduğu, her iki yapıda da katalitik etki gösteren çinko iyonu yakınında arjinine bağlı bir bikarbonat iyonunun (HCO_3^-) bağlı olduğu gösterildi. Bikarbonat iyonlarının, çinko iyonu ile bağlı su moleküllerinden, ayrılan peptid grubuna proton transferini kolaylaştırdığı, Arg-356 ya bir bikarbonat iyonunun bağlanması enzimin aktivitesini artırdığı fakat enzimin aktivitesi için çok gerekli olmadığı kaydedilmiştir (17).

1.2.1.4. Hekzamer Yapısı

LAP'ın üç boyutlu yapısı simetrik bir düzlem üzerinde düşünülürse hekzamer yapının üçgen bir şekil aldığı ve kenar uzunluklarının 115 \AA olduğu görülür. Üç katlı eksen boyunca hekzamer yapının mesafesinin en fazla 90 \AA olduğu elektron mikroskobu ile gösterilmiştir (12,13,15,18).

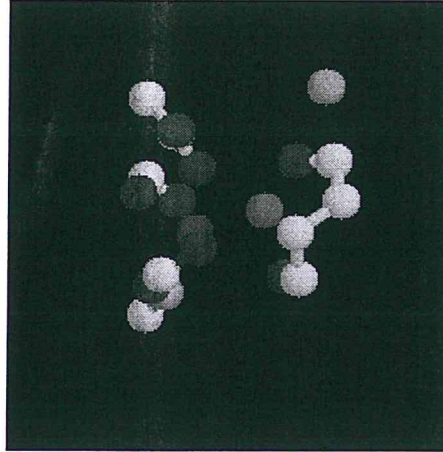


Şekil III . LAP'ın hekzamer yapısı (51)

1.2.1.5. Aktif Bölgesi

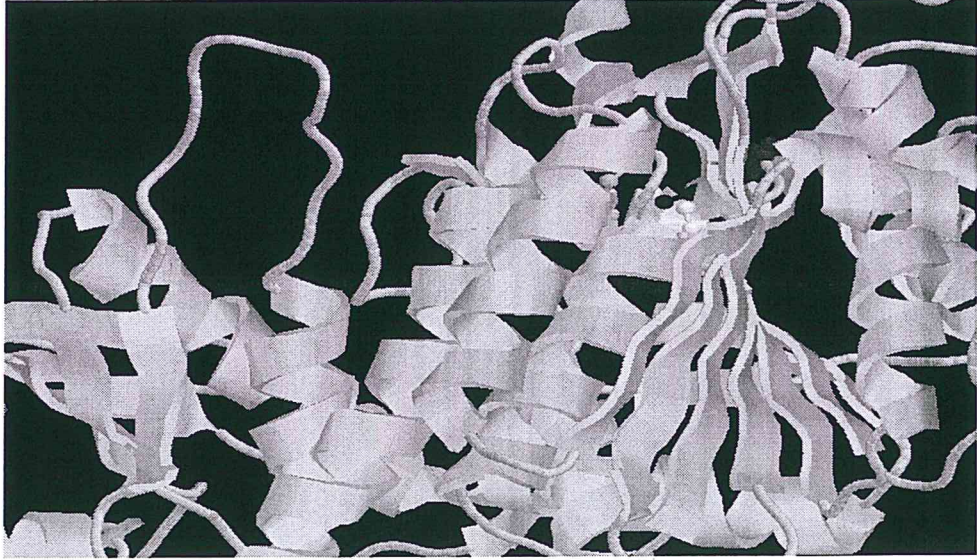
LAP'ın aktif bölgesi sekiz kenarlı β -katlanmış yaprak bölgesinin hemen yanına lokalize olmuş durumdadır. Altı tane aktif bölge,hekzamer yapının içine lokalize olmuştur ve bunlar yarıçapı 150 Å°, yüksekliği 10 Å° olan disk şeklinde bir boşluktan ibarettir (14,16).

İki çinko iyonu arasındaki uzaklık yaklaşık 2,88 Å° kadardır. Daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi bu iki çinko iyonu aynı değildir. Çinko iyonlarından bir tanesinin diğerine göre daha sıkı bir şekilde bağlandığı görülür. İkinci pozisyondaki çinko iyonu, Asp-225 nin bir O⁸ atomu, Asp-332 nin bir O⁸, bir karbonil oksijeni ile Glu-334'nin bir O⁸ atomu ile koordine olarak tetrahedral bir yapı oluşturur. Diğer çinko atomu ise protein molekülüne daha gevşek bağlanmış durumdadır ve bir Asp-273 O⁸ atomu, bir Asp-225 O⁸ atomu ve bir tane de Glu-334 O⁸ atomu ile koordine haldedir. Bu alanda dörtlü bir liganda rastlanmamıştır. Daha önceleri sığır lens LAP'ının metal-substrat çalışmaları her iki pozisyondaki çinko iyonunun Mg⁺², Mn⁺², ve Co⁺² gibi iyonlarla birlikte bulunduğunu kanıtlamıştır (11,1213,16).



Şekil IV. LAP'ın Aktif bölgesi (53).

Ayrıca aktif bölge iki tane asidik amino asit artığı da ihtiva eder. Bunlar Lys-250 ve Arg-336'dır. Lys-250 birinci pozisyondaki çinko iyonu ile lokalize olmuş durumdadır. Arg-336 ise iki çinko iyonuna da aynı uzaklıkta lokalize olmuştur. Bu amino asitlerin enzimin katalitik gücünü etkileyip etkilemediği henüz bilinmemektedir (9).

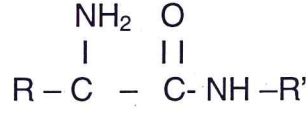


Şekil V . LAP'ın Hekzamer Yapısı ve Aktif Bölgesi

LAP'ın aktif bölgesindeki C-terminali 173 ile 487. amino asitleri kapsar. Bu alan yaklaşık 7Å büyüklüğündedir. Hidrofobik bölge olan bu alanda Thr 359, Gly 362, Ala 451, Met 454 mevcuttur (9).

1.2.1.6. Etki Mekanizması

LAP serbest amino grubu bulunan birçok amid ve peptidi hidrolize eder. Hidroliz kapasitesi substratın büyüklüğüne ve R gruplarının polaritesine bağlıdır (lösin > izolosin > valin > alanin > glisin). Şayet substratta herhangi bir fonksiyonel grup veya polar grup içeren amino asit varsa enzimin hidroliz derecesi düşer (4,6).



Ayrıca R' de enzimin hidrolizi üzerinde etkilidir. Eğer R' polar bir grup ihtiva ederse, hidroliz biraz yavaşlar (4).

Diğer deneysel bir çalışmada metal iyonunun aminopeptidazlarda bir köprü görevi üstlendiği, enzim ve substrat ile koordine bir kompleks oluşturduğu belirtilmiştir (4,5,7).

Mn⁺² kadar iyi bir aktivatör olmayan Mg⁺² iyonu enzimin stabil hale geçmesi için gereklidir. Bu, Mn⁺²'nin alkali pH'da optimal aktivitenin olduğu anda oluşan oksidasyon ürünlerinin enzime zararsız etkisinden kaynaklanmaktadır. Optimal pH'da iyon enzime imidazol veya amin grubundan bağlanır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki metal iyonlarından yalnız bir tanesi enzimin aktif yüzeyine bağlanır. Katalizleme sırasında metal-enzim kompleksi substrata geçici olarak bağlanır. Bu bağlanma yeri serbest uçtaki amino grubudur. N-açil ve N-aril gruplarının bu kompleks için substrat olmadığı bildirilmiştir. Bağlanma yeri amino grubunun azot atomudur (11,13).

Yukarıda sunulan deliller; metal iyonunun, substratın enzime bağlanmasında aracılık ettiğini göstermekte ve substrat ile protein molekülü arasında oluşan mekanizmayı açıklamaktadır. Metal iyon-peptid kompleksleri üzerinde yapılan çalışmalar, etkiyen kısmı yüksüz amino grupları ve peptid amidleri veya esterin oksijen atomu olduğunu göstermiştir. Substrat-metal iyonu-enzim kompleksi oluşumunda reaksiyon hızı her ne kadar çok artsa da bu anda katalitik bir etki beklenmez. Ribonükleaz ve kimotripsin için suyun bağlı olduğu bir bölgenin var olduğu bilinmektedir. Böyle bir yapının LAP için de olabileceği düşünülmüş, ve alkol ile yapılan inhibisyon çalışmalarında bunun uygun olabileceği gösterilmiştir. pH aktivite eğrileri, katalizleme için substratın amino grubu ve su bağlı bölge olan imidazol grubuna varlığına ihtiyaç olduğunu göstermiştir (22).

Norbert ve ark. yaptıkları çalışmalarda LAP için bir etki mekanizması öne sürmüşlerdir. Buna göre Arg-356'nın yakınında bulunan bikarbonat iyonu metal köprüsü ile kurulu olan su molekülünden bir proton kabul eder. Alınan

bu proton tetrahedral yapıdan amino grubunun koparılmasını kolaylaştırır (17).

1.2.1.7. İnhibitörleri

Enzim EDTA ve sitrat ile kuvvetli bir şekilde inhibe olur. Hem EDTA hem de sitrat, Mg^{+2} ve Mn^{+2} için kuvvetli kelat yapıcı maddelerdir. En yüksek inhibisyon düzeyi pH 8-8,5 arasında bulunmuştur. Ayrıca Cd^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} ve Pb^{+2} iyonları da enzim için inhibitör maddeler olarak kabul edilmektedir. Enzim bestatin, alkol p- klorcivabenzoat ve α -aminoboronik asit ile de inhibe olur (7,15,18,21,24).

1.2.1.8. Klinik Önemi

Herhangi bir enzimin, bol bulunduğu organ ya da dokunun genellikle hücrel harabiyetinin bir göstergesi olarak plazmadaki aktivitesi yükselir. LAP aktivitesinin de arttığı başlıca hastalıklar hepatit, siroz, tıkanma sarılığı ve karaciğer kanseridir (25,26,29,30).

Roswell ve ark. insan dokularının çoğunda mevcut olan proteolitik bir enzim olan LAP aktivitesini çeşitli malign hastalıklı doksan hastada ve 25 normal kontrol grubu ile çeşitli malign hastalığı olmayan 38 hasta ile karşılaştırdılar. (29). Baş ve boyun kanseri olan 6 hastanın ikisinde LAP seviyelerinin arttığı görülmüş, tümörün lokalize edildiği dört hastada LAP değerleri normal olarak bulunmuştur (40).

Gastro intestinal sistem (GİS) kanseri 18 hastanın 16'sında hastalık iyice yayılmış, 2'sinde ise tümörler önceden çıkarılmıştır. Hastalığın yayılmış olduğu hastalarda idrar LAP seviyelerinin artışı hepsinde hemen hemen aynı bulunmuştur Bronş kanseri olan 20 hastadan biri hariç hepsinde LAP seviyesinin normali aştığı gözlenmiştir. Metastazlı 20 hastadan 7'sinde serum

LAP seviyesi yüksek bulunmuştur. Bronşit tedavisi yapılan 2 hastada ise serum LAP aktivitesi normal olarak bulunmuştur (39,40).

Prostat kanser olan 18 hastadan kemiğe metastaz yapmış 6 hastanın hepsinde yükselmiş alkalen fosfataz ve LAP artışı bulunmuştur. Buna ilaveten beş hastada idrar LAP aktivitesinin arttığı ileri sürülmüştür (39,47).

Böbrek ya da idrar kesesinden ileri gelen GİS kanserli 18 hastada LAP idrar aktivitelerinin, metastaslı hastaların hepsinde yükseldiği, fakat mesane kanseri yayılmış olan 3 hastada LAP'ın serum aktiviteleri anormal olarak yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Mesane tümörü önceden çıkarılmış ve tekrar oluşmamış 2 hastada idrar ve serum LAP aktivitelerinin normal olarak bulunduğu, hipernefromalı 3 hastanın idrarlarında ve bir vakanında serumunda LAP aktivitesinin yüksek seviyede bulunduğu kaydedilmiştir (31,39,40,47).

Bedir ve ark'nın yaptığı bir çalışmada insüline bağlı olmayan diabetik hastaların idrar LAP aktiviteleri ölçülmüş, LAP aktivitesi ile kreatinin konsantrasyonu arasındaki oranın insüline bağlı olmayan diabetik hastalara göre anormal bir değer aldığı ve LAP'ın diabetik nefropatik hastalarda hastalığın teşhisi için erken bir gösterge olarak kullanılabileceği kaydedilmiştir. Tubular hücrelerin fırça kenar membranından salınan LAP'nın idrar aktivitesinin böbrek hastalıklarında teşhis amaçlı kullanılabileceği bildirilmiştir (42).

Helmintler tarafından üretilen proteinazlar parazit ve konakçı arasındaki dengenin sağlanmasında kritik bir rol üstlenirler. Örneğin, proteinazlar, direkt parazit dokularına karşı immun savunma mekanizmasına, parazitlerin konakçıdan besin temin edilmesine direk olarak katılırlar (13). Lucia ve ark.'nın Fasciolalı koyunlarda yaptıkları çalışmada LAP'ın bu parazitler için iyi bir koruyucu madde olduğu Trematodolardan ekstrakte

edilen LAP'ın fasciolalı koyunlara aşılama yolu ile verildiğinde hastalığı azaldığı ileri sürülmüştür (41).

Kronik seyirli sistemik hastalıklar şiddetlenme ve azalma gibi çok değişik boyutlar gösterir. Hastalığın aktif ya da stabil olduğuna karar vermek oldukça güçtür (39,42). Normal bireylerin serumunda arilamidaz aktivitesi yüksek fakat LAP seviyesi düşüktür. Serum LAP seviyesinin yükselişi hücrelerin harabiyetini gösterir. Kronik seyirli sistemik hastalıkta serum LAP seviyesi oldukça artar (39).

İnsan serumunun birçok aminopeptidaz içerdiği ve bu aminopeptidaz aktivitelerinin gebelik süresince arttığı bilinmektedir. Plesantal aminopeptidazların (P-LAP), kinin, anjiotensin, oksitosin ve vazopresin gibi aktif peptid hormonların seviyelerinin düzenlenmesinde ve normal gebelik süresince fizyolojik aktivitelerini sürdürmelerinde rolü oldukları bilinmektedir (34,35,49).

P-LAP sistein aminopeptidaz ile eş bir aktiviteye sahiptir ve oksitosinaz (EC 3.4.11.3) gibi kabul edilir. Sistein aminopeptidaz (CAP) aktivitesinin de gebelik süresince arttığı gözlenmiştir. Fakat bu enzimlerin biyokimyasal özellikler hakkında çok az şey bilindiğinden aktiviteleri kesin olarak aydınlatılamamıştır(23,28).

Daha önceki çalışmalar gebe serumunun en az iki tip LAP içerdiğini ispat etmiştir. Bunlardan biri, tüm insan, hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda bulunan normal serum LAP'ı, diğeri ise yalnız gebelik sırasında görülen gebelik serum LAP'ıdır. Her ne kadar normal serum LAP'ı ısıya ve L-metiyonine duyarlı ise de, gebelik serum LAP'ı ısıya ve bu amino aside karşı dayanıksızdır. Bu iki LAP aktiviteleri birbirinden ayırt edilebilir (45,46).

Klinik açıdan bakıldığında gebelik sırasında , kan basıncının ayarlanmasında ve uterus kanalının regule edilmesinde bu enzim önemlidir. Hem vazopresin hem de anjiotensin III vazokontraktif bir aktiviteye sahiptir (32,33).

P-LAP/oksitazinaz insülini regüle eden bir aminopeptidazdır ve gebelik süresince artar. Gebeliğin ilk üç ayında P-LAP aktivitesi düşük, ikinci ve üçüncü üç aylık periyotta ise oldukça yüksektir. Doğumdan hemen sonra hızla düşer. Bu yüzden, P-LAP normal gebelikte uterusda önemli etkisi olan peptid hormonların azalmasıyla önemli bir rol üstlenir (43).

Yapılan bir çalışmada, gebeliğin ilerlemesine paralel olarak anjiotensinaz ve LAP aktivitesinin arttığını ve gebeliğin sonunda serum LAP seviyesinin maksimuma ulaştığı gösterilmiştir (25).

Kaya'nın (21) yaptığı bir çalışmada insan plasentasından saflaştırılan LAP ile serumlardan kısmen saflaştırılan LAP'ın özelliklerinin çok küçük istisnalarla birlikte aynı doğrultuda olduğunu bulmuştur. Yine Kaya ve ark.'nın (53) Morkaraman ırkı koyunların serumunda yaptığı bir araştırmada gebelik boyunca serum LAP aktiviteleri normal değer üzerinde bulunmuş, gebelik süresince plasental gelişmeye paralel olarak artan serum LAP'ın esas kaynağının plasenta olacağı kanısına varılmıştır.

Özcan ve ark.'nın Morkaraman ırkı koyunlarda yaptıkları bir çalışmada idrar LAP aktivitesine bakılmış ve gebelik boyunca arttığı gözlenmiştir. En yüksek artışın gebeliğin 50. gününde olduğu ve koyunlarda gebelik teşhisi için kullanılabileceği kanaatine varılmıştır (50).

Kozaki ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada erken doğum yapmış kadınlarda P-LAP aktivitesinin ölçülmesi ile, erken doğumun olup olmayacağı hakkında bir bilgi edinilebileceğini ileri sürmüştür. Fakat P-LAP aktivitesine bakılmasının yalnız başına yetersiz kalacağını savunmuşlardır (43).

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

Çalışmada materyal olarak Kars yöresinden değişik yerlerden rasgele seçilen 3-6 yaşında 87 adet Tuj ve Morkaraman ırkı koyun kullanıldı. Koyunlardan bir enjektör yardımı ile 10 ml. kadar vena kanı alındı. Oda sıcaklığında 25-30 dakika bekletildikten sonra pıhtılaşan kan santrifüje edilerek serum ayrıldı ve analizlerde bu serumlar kullanıldı.

Aynı koyunlardan 10'ar ml süt usulüne uygun olarak kapaklı tüplere alındı. Alınan numuneler süt yağının üstte toplanması nedeni ile santrifüje ters bir şekilde yerleştirilerek, derhal 20 dakika 3000 devirde santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra ters çevrilen tüplerde yağ tabakası alta geçtiğinden üstte kalan yağsız süttten örnekler alınarak analize kadar -25 °C de saklandı (53).

Çalışmada kullanılan kan ve süt örneklerinin alındığı bölgeler, koyunların yaşı ve türü Ek-1 de gösterilmektedir.

Analizde Kullanılan Cihazlar

- Spektrofotometre (UV-1201, Shimadzu)
- Santrifüj
- Su Banyosu (SB100, Nüve)
- Otomatik pipet (Eppendorf)
- Terazı (Sartorius)
- Vorteks (Labinco)

2.2. Metot

2.2.1. Serumda LAP Aktivitesi Tayini

Serumda LAP aktivitesi, Goldbarg-Rutenburg (G-R) metodu ile tayin edildi. Enzim aşağıdaki reaksiyonu katalize eder (36-38).



2.2.1.1. Kullanılan Çözeltiler

1. Fosfat Tamponu (0,2 M, pH 7.0):

a) 28,4 g. disodyum fosfat bir miktar distile suda çözüldü ve 1 litreye su ile dilüe edildi.

b) 27,2 g. potasyum dihidrojen fosfat distile suda çözüldü ve hacmi su ile 1 litreye tamamlandı.

c) 7 kısım (a) çözeltisi 3 kısımda (b) çözeltisi alınarak karıştırıldı. Sonra pH 7,0'ye ayarlandı ve +4°C'da plastik bir şişede saklandı.

2. L-Lösil-Beta-Naftilamin Hidroklorid Çözeltisi ($6,85 \times 10^{-4}$ M, pH 7,1): 20 mg. substrat 50 ml. distile suda çözüldü ve 50 ml. tampon çözelti katılarak karıştırıldı. Bu çözelti oda sıcaklığında 30 gün dayanıklıdır.

3. Triklorasetik Asit (%40) : 40 g. TCA bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi 100 ml. ye tamamlandı.

4. Sodyum Nitrit Çözeltisi (%0,1) : 01, g. sodyum nitrit bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi 100 ml. ye tamamlandı.

5. Amonyum Sulfomat Çözeltisi (%0,5) : 0,5 g. amonyum sulfomat bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi 100 ml. ye tamamlandı.

6. N-(1-Naftil)-Etilendiamin Dihidroklorid Çözeltisi (%0,05) : 50 mg. N-(1-Naftil)-Etilendiamin dihidroklorid %95'lik etil alkolde çözüldü, 100 ml. ye tamamlandı.

7. Beta- Naftilamin : 18 mg β -naftilamin 500 ml. distile suda çözüldü. Bu stok çözeltiden çeşitli dilüsyonlar yapılarak standard çözeltiler hazırlandı.

2.2.1.2. Deneyin Yapılışı

Bir deney tüpünde 0,1 ml. serum 4,9 ml. distile su ile seyreltildi. Daha sonra, 3 adet deney tüpü alınıp üzerlerine kör, numune ve numune körü tüplerini belirlemek için, sırasıyla A, B, C harfleri yazıldı. İşlem aşağıda gösterildiği şekilde gerçekleştirildi.

| | Tüp-A | Tüp-B | Tüp-C |
|--|-------|-------|-------|
| Distile su | 1 ml. | - | - |
| Dilüe Serum (%2'lik) | - | 1 ml. | 1 ml. |
| L-Lösil-Beta-Naftilamin Dihidroklorid çözeltisi | 1 ml. | 1 ml. | - |
| Fosfat Tamponu | - | - | 1 ml. |

Bütün tüpler karıştırıldı ve 37° C'de 2 saat inkübe edildi.

| | | | |
|---------------|-------|-------|-------|
| TCA çözeltisi | 1 ml. | 1 ml. | 1 ml. |
|---------------|-------|-------|-------|

Tüpler iyice karıştırılıp 5 dk. bekletildi ve 3000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi.

| | | | |
|-------------|-------|------|------|
| Süpernatant | 1 ml. | 1ml. | 1ml. |
|-------------|-------|------|------|

| | | | |
|-------------------------|-------|-------|-------|
| Sodyum Nitrit çözeltisi | 1 ml. | 1 ml. | 1 ml. |
|-------------------------|-------|-------|-------|

İyice karıştırılıp 3 dk. bekletildi.

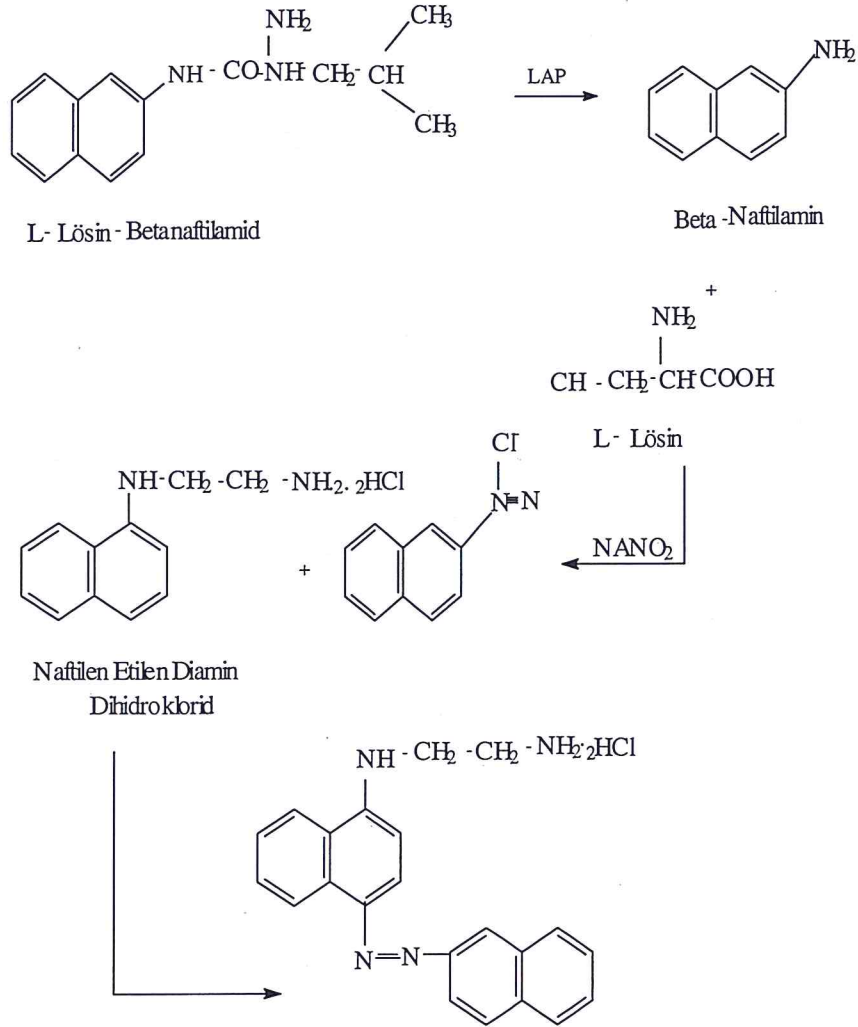
| | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|
| Amonyum Sülfomat çöz. | 1 ml. | 1 ml. | 1 ml. |
|-----------------------|-------|-------|-------|

Karıştırıldı ve 2 dk. beklendi.

| | | | |
|---|-------|-------|-------|
| N-(1-Naftil)-Etilendiamin Dihidroklorid çöz. | 2 ml. | 2 ml. | 2 ml. |
|---|-------|-------|-------|

Karıştırılıp 10 dk. bekletilerek bütün tüplerin su körüne karşı 560 nm. de optik dansiteleri okundu.

Bütün bu işlemler sonucunda meydana gelen reaksiyonlar aşağıdaki gibidir.



Şekil. VI. LAP Aktivitesinin Reaksiyon Mekanizması

2.2.2. Sütte LAP Aktivitesi Tayini

Süt örnekleri önce kapaklı tüplerde ters çevrilerek 3000 rpm de 15 dakika santrifüj edildi ve süt kaymağı ayrıldı. Kaymağı alınmış süt örneklerinden 1'er ml. alınarak başka bir tüpe aktarıldı. Bunların üzerine 1'er ml. % 15'lik TCA çözeltisi ilave edildi. Karıştırıldı ve 3000 rpm de 15 dakika tekrar santrifüj edilerek süt serumuna ayrıldı (53).

Süt serumu tıpkı serumda olduğu gibi %2 oranında seyreltildi. Süt örneklerinin analizinde süt serumu çıkarılırken daha önce %15'lik TCA kullanılarak proteinlerin çöktürülmesi sağlandığı için %40'lık TCA tekrar kullanılmadı. Fosfat tamponu katıldıktan sonra 2 saat değil 30 dk. beklendi (19). Diğer bütün işlemler serumda olduğu gibi aynen takip edildi.

2.2.3. Sonuçların Hesaplanması

A ve C tüplerinin optik dansiteleri toplamı B tüpünün optik dansitesinden çıkarılarak oluşan beta-naftilaminin optik dansitesi bulundu.

LAP ünitesi, % 2'lik kan ve süt serumun 1 ml.'si tarafından serbest bırakılan beta-naftilaminin mikrogram cinsinden miktarıdır. Bundan dolayı tayin edilen LAP'ın aktivitesi ünite cinsinden şöyle olur (50,51).

$$U = \text{Mikrogram beta-naftilamin} \times 3$$

Formüldeki 3 düzeltme faktörüdür. Çünkü total 3 ml. 'lik hacimden 1 ml. alınmıştır.

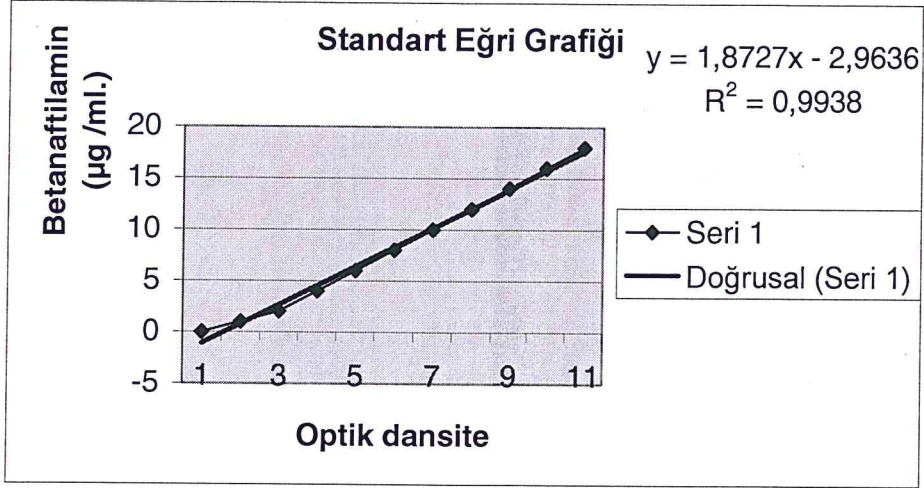
Elde edilen optik dansitelerin standart eğriden μg . beta-naftilamin değerleri elde edildi.

2.2.4. Standart Eğrinin Hazırlanması

Bunun için daha önce hazırlanan beta-naftilamin stok solüsyonundan çeşitli dilüsyonlar yapıldı. Bu dilüsyonların hazırlanışı ve mikrogram olarak tekabül ettikleri beta-naftilaminin miktarı aşağıdaki gibidir.

| <u>Tüp No</u> | <u>Stok Stand. Sol.</u> | <u>Dis. Su (ml.)</u> | <u>Çalışma Standardı (µg/ml.)</u> | <u>β-Naftilamin (µg/ml)</u> |
|---------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 9,0 | 0,0 | 54 | 18 |
| 2 | 8,0 | 1,0 | 48 | 16 |
| 3 | 7,0 | 2,0 | 42 | 14 |
| 4 | 6,0 | 3,0 | 36 | 12 |
| 5 | 5,0 | 4,0 | 30 | 10 |
| 6 | 4,0 | 5,0 | 24 | 8,0 |
| 7 | 3,0 | 6,0 | 18 | 6,0 |
| 8 | 2,0 | 7,0 | 12 | 4,0 |
| 9 | 1,0 | 8,0 | 6,0 | 2,0 |
| 10 | 0,5 | 8,5 | 3,0 | 1,0 |
| 11 | 0 | 9,0 | 0,0 | 0,0 |

Hazırlanan standart solüsyonlardan 1'er ml. tüplere aktarıldı ve 1'er ml. fosfat tamponu ile TCA katıldı. Bunlardan da 1 ml. başka tüplere aktarıldı. Sonra sodyum nitrit çözeltilisinden başlamak üzere serumdaki işlemler aynen takip edildi. Renklendirme işleminden sonra da bütün tüplerin reaktif körüne karşı (Tüp-11) 560 nm de optik dansiteleri okundu, ve bir standart eğri grafiği elde edildi (36,37).



2.2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi hazır paket program kullanılarak bilgisayarda yapıldı (54).

3. BULGULAR

Sağlıklı Tuj ve Morkaraman ırkı koyunlarda yapılan bu çalışma sonucu elde edilen serum ve süt LAP aktiviteleri Ek-2 de verilmiştir.

Değişik yaş ve ırktaki koyunların kullanıldığı bu araştırmada yaş ve ırka göre istatistiki olarak önemli bir fark görülmemiştir.

Koyunlarda serum ve Süt LAP aktiviteleri Ek-2 de verilmiştir.

Tablo-1. Morkaraman Irkı Koyunlarda Serum LAP Aktivitesinin İstatistiksel Değerlendirilmesi ($X \pm SD$)

| Yaş | 3 (N=14) | 4(N=13) | 5(N=11) | 6(N=4) |
|------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Morkaraman | 8,76 \pm 2,46 | 9,67 \pm 5,07 | 9,075 \pm 3,14 | 6,81 \pm 1,21 |

Tablo-2. Morkaraman Irkı Koyunlarda Süt LAP Aktivitesinin İstatistiksel Değerlendirilmesi ($X \pm SD$)

| Yaş | 3 (N=14) | 4(N=13) | 5(N=11) | 6(N=4) |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Morkaraman | 18,39 \pm 9,51 | 15,91 \pm 6,43 | 16,28 \pm 7,35 | 16,00 \pm 4,65 |

Tablo-3. Tuj Irkı Koyunlarda Serum LAP Aktivitesinin İstatistiksel Değerlendirilmesi ($X \pm SD$)

| Yaş | 3 (N=18) | 4(N=19) | 5(N=8) |
|-----|-----------------|-----------------|------------------|
| Tuj | 8,17 \pm 1,73 | 8,66 \pm 1,71 | 8,066 \pm 2,35 |

Tablo-4. Tuj Irkı Koyunlarda Süt LAP Aktivitesinin İstatistiksel Değerlendirilmesi ($X \pm SD$)

| Yaş | 3 (N=18) | 4(N=19) | 5(N=8) |
|-----|------------------|-------------------|------------------|
| Tuj | 15,52 \pm 9,51 | 21,70 \pm 11,00 | 17,00 \pm 9,17 |

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karaciğer ve pankreas hücrelerinde bol bulunan LAP aktivitesi serum, süt, idrar, safra ve dokularda incelenmiştir. (14,19,22,25). Araştırmada gerek numunelerin toplanması kolaylığı gerekse anlamlı sonuçlar elde edilebileceği düşüncesiyle LAP aktivitesi serum ve sütte incelendi.

Araştırmada biyolojik materyal olarak kullanılan süt, kan örneklerine göre bazı avantajlar içermektedir. Öncelikle süt LAP aktivitesi tayini serum LAP aktivitesi tayininden daha kısa sürede gerçekleşmektedir. Serum LAP aktivitesi için en uygun inkübasyon süresi 2 saat iken süt LAP aktivitesi için bu süre 30 dk. dır. Ayrıca süt örneklerini toplanması esnasında hayvan sahiplerinin olaya karşı çıkmadığı, ancak kan örneklerinde hayvana zarar gelebileceği korkusu içinde oldukları gözlemlendi.

Süt örneklerinin toplanmasında yetişmiş bir elamana ihtiyaç duyulmamakta, hayvan sahiplerinin kendileri bile rahatlıkla süt örnekleri toplayabilmektedir. Oysa kan örneklerinin toplanması ancak uzman bir kişinin varlığında mümkün olabilmekte ve enjektör, tüp gibi daha pahalı malzemelere ihtiyaç göstermektedir. Öte yandan örnek toplama aralığının sık olması hayvanlardan sık sık kan alımı gerektirmekte, bu da hayvanlarda stres oluşmasına veya yanlış bir uygulamanın hayvanda olumsuz bir durumun ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Bundan dolayı kan örneklerinin toplanmasının hayvan sahiplerine benimsetilmesi oldukça güçtür.

Serum LAP aktivitesi tayini için yaygın olarak kullanılan kolorimetrik metotlarda substrat olarak L-lösil-beta-naftilamin dihidroklorid kullanılır. Söz konusu metotda, enzim ve substratın 37°C'de inkübasyonundan sonra %2'lik serumun 1 ml.'si tarafından substratdan oluşturulan beta-naftilaminin mikrogramının LAP aktivitesine tekabül etmesi esasına dayanmaktadır (38). Bazı araştırmacılar, G-R metodunda çeşitli değişiklikler yapmışlar ve özellikle inkübasyon süresini 30 dk. (47) ve 1 saat (55) tutarak zamanı kısaltmışlardır. Ancak bu çalışmada Kaya'nın (56) daha önce yapmış olduğu ön çalışmalara dayanarak kısaltılmış sürelerden daha farklı sonuçlar alındığı bildirildiği için

daha iyi sonuçlar veren 2 saatlik inkübasyon süresini tercih edildi. Esasında enzimatik reaksiyonlarda en güvenilir metot reaksiyonun tam başlangıç hızının tespitidir. Ancak reaksiyonun tabiatı böyle bir ölçüme fırsat vermemektedir.

Bazı araştırmacılar, LAP aktivitesini L-lösilamidin hidrolizi sonucu açığa çıkan karboksil gruplarını ölçmek suretiyle incelemişlerdir. Ancak bu metot daha zor ve beta-naftilaminin kolorimetrik ölçümünden daha az güvenilirdir (57).

Fleisher ve ark. (55) substrat olarak L-lösilglisin kullanarak peptidaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Ancak substrat olarak L-lösil beta-naftilaminin kullanılmasının bazı üstünlükleri vardır. Bu üstünlükler şunlardır:

1. Az reaktif kullanılır ve işlemler kolaydır.
2. Oluşan azo boyası çözülebilir olup, 4°C'de 7 gün dayanıklıdır.
3. Bu metodun duyarlılığı fazladır, öyleki substratın 5 mikrogramının hidrolizi doğru olarak ölçülebilir.
4. Arzu edilirse inkübasyon süresi kısaltılabilir. Çünkü reaksiyonun hızı 15 dk. dan 4 saate kadar lineardır..

Az hemoliz olmuş kanın sonuçları önemli derecede etkilemeyeceği görüşüne (58) rağmen, biz hemolizsiz kan kullanmaya özen gösterdik. Ayrıca serumları ya hemen yada buz dolabında birkaç gün bekleterek çalıştık.

Yine süt LAP aktivitesi içinde kolorimetrik yöntem kullanıldı. Yalnız daha önceki çalışmalarda süt için en iyi inkübasyon süresinin 30 dk. (19) olduğu bildirildiği için inkübasyon süresi kısaltıldı. Metot uygulama esnasında süt örnekleri daha önceden %15'lik TCA çözeltisi kullanılarak süt serumuna ayrıldığı için tekrar %40'lık TCA çözeltisi kullanılmadı. Hatta yapılan ön çalışmalarda %40'lık TCA'nın kullanılması ile aynı sonuçlar elde edildi.

Hücrenin sitoplazmasına lokalize olan LAP aktivitesinin özellikle hepatobiliyer hastalıklarda arttığı (23) bunun yanı sıra pankreas kanseri, akut

pankreatit, siroz, safra yolu taşı, metastatik karaciğer kanseri, tıkanma sarılığı ve özel bir durum olarak gebelikte yükseldiği bildirilmiştir (27,49).

LAP'ın gebelik süresince değişebilen enzimlerden biri olduğu ve bu değişimlerin anormal gebelikte plasental fonksiyonunun teşhisinde yararlı olabileceği kaydedilmiştir (23).

Araştırmamızda, Morkaraman ırkı koyunlarda serum LAP aktivitesi $8,93 \pm 3,55 \mu\text{g/ml}$, süt LAP aktivitesi de $16,84 \pm 6,35 \mu\text{g/ml}$ olarak, Tuj ırkı koyunlarda ise serum LAP aktivitesi $8,36 \pm 1,82 \mu\text{g/ml}$, süt LAP aktivitesi de $18,39 \pm 10,31 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada, gebeliğin ilerlemesine paralel olarak angiotensinaz ve LAP aktivitesinin arttığı ve gebeliğin sonunda sLAP'ın maksimum aktiviteye ulaştığı kaydedilmiştir (26).

sLAP aktivitesinin gebeliğin özellikle son 3 ayı boyunca arttığı (34) ve doğumdan 6-8 hafta sonra normale döndüğü, gebelikte artışın ise aydınlatılmadığı kaydedilmiştir (32,33).

Eichel'in yapmış olduğu bir çalışmada serum ve süt LAP aktiviteleri arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmış ve sonuç olarak sütteki enzim aktivitelerinin kan serumundan bağımsız olabileceğine karar verilmiştir. 280 adet inek sütünde LAP aktivitesinin 4-150 U/L arasında değiştiği kaydedilmiştir. Aynı çalışmada inek serum LAP aktivitesi de 5-37 U/L olarak kaydedilmiştir (19).

Kaya ve ark.'nın Morkaraman ırkı koyunlarda yaptığı bir çalışmada gebelik boyunca sLAP aktivitesinin arttığını ve bu artışın doğum anında maksimuma ulaştığı, doğumdan 5 hafta sonrada normale döndüğü kaydedilmiş, ve doğumdan 5. hafta sonra serum LAP aktivitesi $8,04 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ (U) değerinde bulunmuştur (49).

Yapılan literatür taramalarında koyunlarda serum ve süt LAP aktiviteleri hakkında daha fazla bilgiye rastlanmamıştır.

Elde edilen serum LAP aktivite sonuçları Kaya ve ark.'nın (49) daha önce yapmış olduğu çalışmadaki sonuçlarla uygunluk içindedir. Ayrıca süt LAP aktiviteleri de Eichel'in inek sütünde yapmış olduğu çalışmada elde ettiği sınırlar içerisindedir.

Değişik ırk ve yaştaki koyunlarda yapılan bu çalışmada yaş ve ırka göre istatistiki olarak önemli bir fark bulunmadı .

Serum ve süt LAP aktivitelerine bakıldığında süt LAP aktivitesinin seruma göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Eichel (19) serum ve süt LAP'ının tamamen birbirinden bağımsız olduğunu kaydetmiştir. Süt LAP aktivitesinin daha yüksek oluşu, süttaki protein miktarının seruma göre daha fazla olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak;

Kars ve çevresindeki sağlıklı koyunlardan toplanan süt ve kan örneklerinde LAP aktivitelerinin referans değerleri elde edildi. Elde edilen serum LAP referans değerlerinin; serum LAP aktivitesinin daha önceki çalışmalarda artış gösterdiği kaydedilen, hepatobiliyer hastalıklar, pankreas kanseri, sarılık, siroz ve özel bir durum olan gebelik için ayırıcı bir tanı olarak kullanılabileceği, süt LAP referans değerlerinin ise tüm gebelik süresince koyunlardan numune elde edilemediği için gebelik tanısında kullanılamayacağı, fakat mastitis gibi meme ve meme başı hastalıkları ve meme kanseri için ayırıcı bir tanı olarak kullanılabileceği kanısına varıldı.

5. KAYNAKLAR

1. Akçapınar H. (2000). Koyun Yetiştiriciliği, Ankara, İsmat Mat. Ltd. Şti.
2. Kaya N. (1993). Atatürk Üniv. Yayınları, Erzurum.
3. Aras K. (1988). Klinik Enzimoloji, Ankara Üniv. Basımevi.
4. Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K. (1960). The Enzyme, Academic Pres. New York and London, Sec. Edition.
5. Kaplan, A., Sylvan R. (1963). Serum lösin aminopeptidase. Amer. J. Dis. Child., 106:161.
6. Henry, B.H. (1984). Clinical Diagnostic and Management by Laboratory Methods. W.B. Saunders Company 262.
7. Himmelhoch, S.R. (1989). Leucine aminopeptidase: A zinc metalloenzyme. Arc. Biochem. Biophysics, 134: 597-602.
8. Taylor, A., Tisdell, F.E., Carpenter, F.H. (1981). Leucine aminopeptidase (Bovine lens) : Synthesis and kinetic properties of ortho-, meta-, para-substituted leucyl-anilids, Arch. Biochem. Biophysics, 210 (1), 90-97.
9. Burley, B.K., David, P.R., Talor, A., Lipscomb, W.N. (1990). Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2,7 Å resolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 6878-6882.
10. Harold, E., Wart, V., Lin, S.H. (1981). Metal binding stoichiometry and mechanism of metal ion modulation of the activity of porcine kidney leucine aminopeptidase. Biochemistry, 20,
11. Lin, L.Y., Park, H.I., Ming, L.J. (1997). Metal binding and active site structure of di-zinc Streptomyces griseus aminopetidase, J. Biol. Inorg. Chem., 2:744-749
12. Holz, R.C., Bennett, B., Chen, G., Ming, L.J. (1998). Proton NMR spectroscopy as a probe of dinuclear copper (II) active side in metalloproteins. Characterisation of the hyperactive copper(II)-substituted aminopeptidase from Aeromonas proteolytica, J. Am. Chem. Soc., 120: 6329-6335.
13. Singer, R.M., White, L.J., Perry, J.E., Doellgast, G.J. (1975). The release of high-molecular weight alkaline phosphatase and leucine aminopeptidase into the media of cultured human cells, Cancer Res., 11 (1): 3048-50.

14. Ruthenburg, A.M., Goldberg, J.A., Pineda, E.P. (1958). Leucine aminopeptidase activity, *New. Eng. J. Med.*, 259(10):469-773.
15. Taylor, A., Sawan, S., James, T.S. (1982). Structural aspects of inhibitor complex formed by N-(leucyl)-o-aminobenzenesulfonate and manganese with Zn^{+2} , Mn^{+2} leucine aminopeptidase (EC 3.4.11.1), *J. Bio. Chem.*, 257(19):11571-11576.
16. Bryce, G.F., Rabin, B.R. (1964). The function of the metal ion in leucine aminopeptidase and the mechanism of action of the enzyme. *Biochem.*, 90:513.
17. Strater, N., Sun, L., Kantrowitz, E.R., Lipscomb, W.N. (1996). A bicarbonate ion as a general base in the mechanism of peptide hydrolysis by dizinc leucine aminopeptidase, *Biocem.*, 96(20): 11151-11155.
18. Phillpotts C.J., Tyldesley, W.F.(1986). Inhibition of leucine aminopeptidase (LAP) activity in the small intestines of rats exposed to dietary cadmium, *Toxicology Letters*, 34:271-275.
19. Eichel V. (1981). Determination of leucine aminopeptidase in cow's milk, *Arch. Exp. Vet. Med.*, 35(2):235-244.
20. Grün, E., Früll, B., Eichel V. (1992). Vergleichende untersuchungen diagnostisch bedeutsamer enzyme in blutplasma, euterlymphe und milch von gesunden und euterkrankte kühen, *J. Vet. Med.*, 39:669-686.
21. Kaya, N., Akin, V. (1990). İnsan plasentası ve gebe serumlarından saflaştırılan lösin aminopeptidazın maksimum aktivitesi için en uygun şartların araştırılması. *Atatürk Üniv. Tıp Bült.*, 22(1):227-232.
22. Kawai, M., Hara, Y., Kubota, T., Shilba, K., Hosaki, S. (2001). A family with high serum leucine aminopeptidase activity derived from a novel variant CD13, *Clin. Chem.*, 44(2):215-224.
23. Blum, M., Sirota, P. (1977). Serum cysteine aminopeptidase and leucine aminopetidase activity in women with bening and malignant uterine and ovarian tumors, *Isr. J. Med.*, 13(9):875-880.
24. Kraus, J.L. (1984). Beta-phenyl cysteine: a leucine aminopeptidase inhibitor, *Phar. Res. Com.*, 16(6):533-539.

25. Beckman, L., Grivea, M. (1965). Variations in serum leucine aminopeptidase in pregnant women and newborn children. *Act. Paediatrica*, 54:578-580.
26. Mizutani, S., Noto, H., Inamoto, Y. (1979). Estimation of placental leucine aminopeptidase in abnormal pregnancy sera, 31(4):493-498.
27. Phillips, W.R., Manildi, E.R. (1970). Elevation of leucine aminopeptidase in disseminated malignant disease, *Cancer*, 26(5):1006-1012.
28. Mizutani, S., Akiyama, H., Kurauchi, O., Taira, H., Narika, O., Tomoda, Y. In vitro degradation of angiotensin II(A-II) by human placental subcellular fraction, pregnancy sera and placental aminopeptidase, *Acta Endocrin.*, 110:135-139.
29. Everett, R., Duncan, J.R., Prasse, K.W. (1977). Alkaline phosphatase, leucine aminopeptidase, and alanine aminotransferase activities with obstructive and toxic hepatic disease in cats, *Am. J. Vet. Res.*, 38(7):963-966.
30. Pineda, P.E., Goldbarg, J.A., Bnaks, B.M., Rutenburg, A.R. (1960). Serum leucine aminopeptidase in pancreatic and hepatobiliary diseases, *Gastroenterology*, 38:698-712.
31. Kowlessar, D.O., Haeffer, L.J., Riley, E.M., Sleisenger, M.H. Comparative study of serum leucine aminopeptidase and non-specific alkaline phosphatase in diseases affecting the pancreas, hepatobiliary tree and bone, *Am. J. Med.*, 31:231-237.
32. Mizutani, S., Yoshino, M., Oya, M. (1976). Placental and non-placental leucine aminopeptidase during normal pregnancy, *Clin. Biochem.*, 9(1):16-18.
33. Mizutani, S., Akiyama, H., Kurauchi, O., Taira, H. (1985). Plasma angiotensin I and serum placental leucine aminopeptidase in pre-eclampsia., *Arch Gynecol.*, 236:165-172.
34. Ibrahim, F.K., Fattah, M.A., Ramandan, F.M., Sasmour, M.B. (1976). Leucine aminopeptidase activity in maternal, cord blood and placenta of normal pregnancy and in pre-eclampsia, *Acta Obstet. Gynecol.*, 55(1):45-47.

- 35.** Kurauchi, O., Mizutani, S., Nomura, S., Hotta, R., Ito, Y., Asada, Y., Furuhashi, M., Kasugai, M., Tomoda, Y. (1989). Effects of progesterone and estradiol on aminopeptidase and leucine aminopeptidase activities in the pregnancy serum and placental of the rat, *Exp. Clin. Endocrinol.*, 93(1):90-94
- 36.** Colowick S.P., Kaplan N.O. (1955). *Methods in Enzymology*, Vol II, New York.
- 37.** Donough O'brien, M.D., Ibbatt, F.A., Robgerson, D.O. (1968). *Laboratory Manual of Pediatric Micro-Biochemical Techniques*, London, Fourth Edition,
- 38.** Bauer, J.D., Ackermann, P.G., Toro, G. (1968). *Bray's Clinical Laboratory Methods*, Saint Louis, 7. Edition.
- 39.** Julius, A., Goldbarg, M.D., Alexander, M., Rutenburg, M.D. (1958). The colorimetric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other diseases, *Cancer*, 11:283-291.
- 40.** Julius, R.A., Goldbarg, M.D., Esteban, P., Pineda, M.D., Rutenburg, A.M. (1959). The measurement of activity of leucine aminopeptidase in serum, urine, bile and tissues, *Am. J. Clin. Pat.*, 32(6):571-575.
- 41.** Piacenza, L., Acosta, D., Basmadjian, I., Dalton, J.P., Carmona, C. (1999). Vaccination with cathepsin L proteinases with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against Fascioliasis in sheep. *Piacenza* 67(4):1954.
- 42.** Bedir, A., Özener, Ç.İ., Emerk, K. (1996). Urinary leucine aminopeptidase is a more sensitive indicator of early renal damage in non-insulin-dependent diabetics than microalbuminuria, *Nephron*, 74:110-113
- 43.** Kozaki, H., Itakura, M., Okamura, M., Ohno, Y., Wakai, K., Mizutani, S. (2001). Maternal serum placental leucine aminopeptidase P-LAP/oxytocinase and preterm delivery, *Int. J. Gynecol. Obstetrics*, 73:207-213.
- 44.** Guth, P.H. (1963). Serum leucine aminopeptidase source and diagnostic value, *Am. J. Gastroenter.*, 40:620-627.
- 45.** Andersson, L., MacNeela, J., Wolfenden, R. (1984). Use of secondary isotope effects and varying pH to investigation the mode of binding inhibitory amino aldehydes by leucine aminopeptidase, *Biochem.*, 24(2):330-333.

46. Mituzani, S., Sakura, H., Akiyama, H., Kobayashi, H. (1983). Changes in plasma renin activity, angiotensin I and placental leucine aminopeptidase during normal pregnancy, *Acta. Obst. Gynecol.*, 35849:545-549.
47. Arst, H.E., Manning, R.T., Delp, M. (1959). Serum leucine aminopetidase activity: finding in carcinoma of the pancreas, pregnancy and other disorders, *Am. J. Med. Sci.*, 238:598-609.
48. Manwell, C., Baker, C.M. (1986). Leucine aminopeptidase (neutral arylamidase) in sheep sera: Improved resolution with jel electrophoresis, *Biochem. Physiol.*, 84B(4): 601-605.
49. Kaya, N., Bekyürek, T., Utlü, N., Çolak, A. (1994). Gebe koyunlarda lösin aminopeptidaz aktivitesininini tayini, *Tr. J. Vet. Anim. Sci*, 18:265-268.
50. Özcan, A., Kaya, N., Karapehlivan, M. (1997). Determination of LAP in sheep urine. *Isr. J. Vet. Med.*, 54(2):36-38.
51. www.calzyme.com/catalog/leucamin.html
52. bssv01.lancs.ac.uk/StuWork/BIOS316/
53. Kiermer, F., Freisfeld, I. (1966). Zur kenntnis des neuraminsaüregelhaltes in kuhmich.Veränderungen des neuramin saure-gehaltes der milch durch biologische einflüsse. *Org. Ges. Leb. Wis.*, 128:267-277.
54. Minitab Inc, (1998). Minitb, Release 11-2 State College, Pennsylvania.
55. Phillips, R.W., Manildi, E.R. (1970). Elevation of leucine aminopeptidase in disseminated malignant disease. *Cancer* 11:283.
56. Kaya, N. (1986). Karaciğer ve pankreas hastalıklarında lösin aminopeptidaz ile diğer bazı enzimlerin serumdaki aktivite seviyelerininini tayini. Atatürk Üniv. S.B:E., Yüksek lisans tezi.
57. Goldberg, J.A., Rutenburg, M. (1958). The colorimetric determination of leucine aminopetidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other diseases, *Cancer*, 11:283.
58. Goldberg, J.A., Pineda E.P., Ruthenburg, A.M. (1959). The measurement of activity leucine aminopeptidase in serum, urine, bile, and tissues. *Amer. J. clin. Pathol*, 32:571-575.

6. EKLER

Ek-1. Materyalin toplandığı bölgeler

1. Bülbül Mahallesi

| No | Tür | Yaş |
|----|------------|-----|
| 1 | Morkaraman | 4 |
| 2 | Morkaraman | 6 |
| 3 | Morkaraman | 5 |
| 4 | Tuj | 3 |
| 5 | Tuj | 3 |
| 6 | Tuj | 3 |
| 7 | Morkaraman | 6 |
| 8 | Morkaraman | 4 |
| 9 | Morkaraman | 3 |
| 10 | Tuj | 5 |
| 11 | Morkaraman | 6 |

2. Atatürk Mahallesi

| | | |
|----|-----|---|
| 12 | Tuj | 4 |
| 13 | Tuj | 3 |
| 14 | Tuj | 3 |
| 15 | Tuj | 4 |
| 16 | Tuj | 4 |
| 17 | Tuj | 5 |
| 18 | Tuj | 3 |
| 19 | Tuj | 4 |
| 20 | Tuj | 4 |

3. Subatan Yolu

| | | |
|----|------------|---|
| 21 | Morkaraman | 3 |
| 22 | Morkaraman | 4 |
| 23 | Morkaraman | 5 |
| 24 | Morkaraman | 3 |
| 25 | Morkaraman | 3 |
| 26 | Morkaraman | 5 |
| 27 | Morkaraman | 3 |
| 28 | Morkaraman | 4 |
| 29 | Morkaraman | 5 |
| 30 | Morkaraman | 5 |
| 31 | Morkaraman | 4 |

4. Sorgukavak Köyü (Digor)

| | | |
|----|-----|---|
| 32 | Tuj | 3 |
| 33 | Tuj | 4 |
| 34 | Tuj | 3 |
| 35 | Tuj | 5 |
| 36 | Tuj | 4 |
| 37 | Tuj | 3 |
| 38 | Tuj | 4 |
| 39 | Tuj | 5 |
| 40 | Tuj | 4 |

5. Kmbetli Köyü:

| | | |
|----|------------|---|
| 41 | Morkaraman | 5 |
| 42 | Morkaraman | 4 |
| 43 | Morkaraman | 5 |
| 44 | Morkaraman | 6 |

| | | |
|----|------------|---|
| 45 | Morkaraman | 3 |
| 46 | Morkaraman | 4 |
| 47 | Morkaraman | 4 |
| 48 | Morkaraman | 3 |

6. Mezra Köyü:

| | | |
|----|-----|---|
| 49 | Tuj | 3 |
| 50 | Tuj | 4 |
| 51 | Tuj | 4 |
| 52 | Tuj | 5 |
| 53 | Tuj | 4 |
| 54 | Tuj | 3 |
| 55 | Tuj | 3 |
| 56 | Tuj | 3 |
| 57 | Tuj | 4 |
| 58 | Tuj | 3 |
| 59 | Tuj | 4 |

7. Benliahmet Köyü:

| | | |
|----|------------|---|
| 60 | Morkaraman | 3 |
| 61 | Morkaraman | 4 |
| 62 | Morkaraman | 3 |
| 63 | Morkaraman | 5 |
| 64 | Morkaraman | 3 |
| 65 | Morkaraman | 4 |
| 66 | Morkaraman | 3 |
| 67 | Morkaraman | 4 |

8. Azad köyü:

| | | |
|----|------------|---|
| 68 | Morkaraman | 5 |
| 69 | Morkaraman | 4 |
| 70 | Morkaraman | 3 |
| 71 | Morkaraman | 5 |
| 72 | Morkaraman | 4 |
| 73 | Morkaraman | 3 |
| 74 | Morkaraman | 5 |
| 75 | Morkaraman | 3 |

9. Karacaören Köyü:

| | | |
|----|-----|---|
| 76 | Tuj | 4 |
| 77 | Tuj | 5 |
| 78 | Tuj | 3 |
| 79 | Tuj | 4 |
| 80 | Tuj | 5 |
| 81 | Tuj | 4 |

10. Gelirli Köyü:

| | | |
|----|-----|---|
| 82 | Tuj | 3 |
| 83 | Tuj | 5 |
| 84 | Tuj | 4 |
| 85 | Tuj | 3 |
| 86 | Tuj | 4 |
| 87 | Tuj | 3 |

Ek-2. Koyunlarda serum ve Süt LAP Aktiviteleri (U)

| Koyun No | Serum LAP ($\mu\text{g/ml}$) | Süt LAP($\mu\text{g/ml}$) |
|-----------------|--|---|
| 1. | 6,03 | 18,60 |
| 2. | 6,76 | 14,80 |
| 3. | 8,41 | 8,59 |
| 4. | 10,79 | 16,28 |
| 5. | 7,86 | 22,31 |
| 6 | 6,41 | 6,40 |
| 7. | 7,86 | 22,31 |
| 8 | 9,87 | 14,08 |
| 9. | 8,04 | 19,50 |
| 10. | 5,12 | 5,12 |
| 11. | 5,12 | 15,73 |
| 12. | 9,32 | 11,89 |
| 13. | 10,06 | 23,04 |
| 14. | 6,95 | 28,10 |
| 15. | 9,69 | 19,20 |
| 16. | 4,75 | 18,09 |
| 17. | 9,69 | 19,20 |
| 18. | 6,41 | 3,84 |
| 19. | 6,40 | 4,57 |
| 20. | 12,07 | 19,02 |
| 21. | 10,06 | 20,48 |
| 22. | 6,40 | 16,64 |
| 23. | 8,96 | 8,04 |
| 24. | 9,50 | 25,60 |
| 25. | 7,62 | 19,57 |
| 26. | 15,54 | 11,89 |
| 27. | 9,39 | 19,39 |
| 28. | 13,59 | 20,46 |

| | | |
|-----|-------|-------|
| 29. | 9,87 | 24,69 |
| 30. | 11,52 | 23,47 |
| 31. | 12,37 | 8,41 |
| 32. | 8,23 | 6,58 |
| 33. | 9,32 | 21,03 |
| 34. | 7,50 | 4,75 |
| 35. | 7,31 | 22,86 |
| 36. | 9,32 | 35,85 |
| 37. | 10,79 | 28,12 |
| 38. | 7,50 | 4,75 |
| 39. | 12,43 | 27,40 |
| 40. | 9,32 | 32,56 |
| 41. | 7,31 | 13,90 |
| 42. | 8,04 | 4,57 |
| 43. | 10,06 | 19,20 |
| 44. | 7,50 | 11,15 |
| 45. | 5,12 | 17,19 |
| 46. | 8,78 | 24,87 |
| 47. | 5,30 | 12,98 |
| 48. | 7,82 | 10,24 |
| 49. | 9,87 | 28,17 |
| 50. | 6,30 | 34,93 |
| 51. | 7,68 | 42,80 |
| 52. | 9,69 | 19,75 |
| 53. | 10,24 | 20,85 |
| 54. | 10,79 | 13,90 |
| 55. | 8,41 | 13,17 |
| 56. | 6,58 | 8,78 |
| 57. | 10,42 | 4,39 |
| 58. | 5,48 | 7,64 |
| 59. | 9,69 | 17,56 |

| | | |
|------|-------|-------|
| 60. | 10,42 | 19,20 |
| 61 | 5,85 | 21,76 |
| 62.. | 7,50 | 9,51 |
| 63. | 3,29 | 12,98 |
| 64. | 6,76 | 13,35 |
| 65. | 11,52 | 20,12 |
| 66. | 15,73 | 32,01 |
| 67. | 14,63 | 23,96 |
| 68. | 5,85 | 10,79 |
| 69. | 6,21 | 8,04 |
| 70. | 7,31 | 10,06 |
| 71. | 8,59 | 14,63 |
| 72. | 7,13 | 12,39 |
| 73. | 7,86 | 19,39 |
| 74. | 10,42 | 30,91 |
| 75. | 9,51 | 21,95 |
| 76. | 8,23 | 19,20 |
| 77. | 6,58 | 6,03 |
| 78. | 6,95 | 8,78 |
| 79. | 8,29 | 33,10 |
| 80. | 6,76 | 27,07 |
| 81. | 9,69 | 27,98 |
| 82. | 6,58 | 5,30 |
| 83. | 6,95 | 8,59 |
| 84. | 9,32 | 17,74 |
| 85. | 9,87 | 29,08 |
| 86. | 7,31 | 26,70 |
| 87. | 7,68 | 25,06 |



