

T. C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı

*KOYUN KARACİĞER ALKALİ FOSFATAZININ KISMEN
SAFLAŞTIRILMASI, FİZİKOKİMYASAL VE KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI*

(DOKTORA TEZİ)

Arş. Gör. Beran YOKUŞ

Tez Yöneticisi

Prof. Dr. Nuriye METE

DİYARBAKIR – 1999

1. GİRİŞ ve AMAÇ

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Alkali fosfataz (ALP) Üzerindeki Çalışmaların Tarihsel Gelişimi
2. 2. ALP' ın Bulunduğu Yerler
2. 3. ALP' ın Doku ve Hücre İçi Lokalizasyonu
2. 4. ALP' ın Yapısı ve Moleküler Özellikleri
2. 5. ALP' ın Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları
2. 6. ALP' ın Etki Mekanizması
2. 7. ALP' ın Optimum pH' ısı ve Optimum pH' ıyı Belirleyen Etmenler
2. 8. ALP Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi ve Enzimin Stabilitesi
2. 9. ALP' ın Aktivatör ve İnhibitörleri
2. 10. ALP' ın Fizyolojik Önemi
2. 11. ALP' ın İzoenzimleri ve Klinik Önemi

3. MATERYAL ve METOD

3. 1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler
3. 2. Kullanılan Metodlar
 3. 2. 1. Koyun Karaciğerinden ALP' ın Saflaştırılması
 3. 2. 1. 1. Saflaştırma
 3. 2. 1. 2. ALP' ın aktivitesinin Ölçülmesi
 3. 2. 1. 3. Total Protein Tayini
3. 3. Saflaştırılan Enzimin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi
 3. 3. 1. Artan p-NPP konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi
 3. 3. 2. Artan Enzim Miktarının ALP aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi
 3. 3. 3. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi
 3. 3. 4. pH' ın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi
 3. 3. 5. Artan Fosfat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi
 3. 3. 6. Artan Tiyoüre Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi
 3. 3. 7. Artan L-Histidin Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi
 3. 3. 8. L-Histidin' in Artan p-NPP konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesi üzerine Etkisi

4. DENEY SONUÇLARI

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

6. ÖZET

7. SUMMARY

KAYNAKLAR

1.GİRİŞ ve AMAÇ:

Alkali fosfataz, hakkında en çok bilgi verilen enzimlerden biridir. Bunun nedeni, başta karaciğer ve kemik hastalıkları olmak üzere bir çok hastalığın belirlenmesinde, önemli bir indikatör olarak kullanılmasıdır. Bu nedenle bir çok araştırmacı enzimin özellikleriyle ilgilenmiştir (9, 19, 31, 49, 61, 72, 85).

Fosfatazlar, fosforik asit esterlerinin hidrolitik parçalanmasını katalizleyerek bunları kendilerine tekabül eden alkol, fenol veya şekerlere çeviren enzimlerdir. Bunlar maksimum aktivite gösterdikleri pH'ya göre asit ve alkali fosfatazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (7, 9, 47, 74). Uluslararası Biyokimya Birliğinin (IUB) adlandırma sistemine göre alkali fosfataz (ALP) enziminin sistematik adı Orthophosphoric monoester phosphohidrolase (E.C.3.1.3.1.), alkali ortamda birbirinden farklı türlerdeki fosfat esterleri üzerine hidrolaz ve transferaz etkisi gösteren enzimlerdir (7, 16, 25, 59, 74).

Alkali fosfataz enzimi doğada yaygın olarak bulunur. İnsan ve hayvan dokularının hemen hepsinden, bazı bitkilerden, balıklardan, bakteri ve mantarlardan izole edilmiştir (9. 72). Bu yüzden yaşam için bir anahtar enzim görevi gördüğünü söyleyebiliriz. Bulundukları doku ve organeller; karaciğer, ince barsak, pankreas, kemik osteoblastları, plasenta, meme glandı, troid glandı, diş minesi, seminifer tubuller, lökosit hücre membranı, endoplazmik retikulum, mitokondri, nükleus zarı ve hücre membranıdır (42, 45, 67). Özellikle karaciğer'de, safra'da, kemik, böbrek ve plasentada ALP aktivitesi çok yüksektir (25, 28, 41, 52). Hücrelerde özellikle membana bağlı olarak bulunur ve hücre membranında aktif transportu düzenleyen bir enzim olduğu düşünülmektedir.

ALP'nin serumdaki aktivitesinin yükselmesi genellikle patolojik durumlarda ortaya çıkmaktadır. Büyümede ve gebelikte yükselmesi ise fizyolojiktir. Büyümede hızlı bir biçimde kemik gelişimi olduğu için, osteoblastik aktivitedeki artışa bağlı olarak özellikle kemik ALP'ı çok yükselmektedir (84). Kolanjit, tıkanma sarılığı, hepatit gibi karaciğer ve safra

kanallarının akut hastalıklarında, osteoblastik aktivitenin artmasında, enzim aktivitesi artışı gözlenir. Özellikle karaciğer hastalıklarında ALP aktivitesindeki artış, karaciğer ALP'ı üzerindeki araştırmaların önemini artırmıştır (19)

Bu güne kadar, organ eksraklarından ve serumdan ALP'ın birçok izoenzimi belirlenmiştir. Serumda ALP'ın büyük bir kısmı serbest daha az bir kısmı özellikle de kolestazis'de lipoproteinler veya nadir olarak immunoglobulinlere bağlı olarak bulunur (9). ALP' ın izoformlarının hepsinin kinetik özelliklerinin bilinmesine ve enzimin izoenzimlerinin bütün genlerinin kolonlanıp, nükleotid dizilimleri ve genomik yapılarının açıklanmasına rağmen moleküler özellikleri ve fizyolojik fonksiyonları hakkındaki bilgiler yeterli değildir (35, 59). Bunun en büyük nedeni farklı dokulardan farklı izoenzimlerin saflaştırılmasındaki güçlük ve çok az miktarlarda enzim elde edilmesidir.

ALP'ın farklı izoenzimleri belirli efektörlere değişik yönde ve oranda cevaplar verebilmektedir. Bu çalışmada ALP'ın koyun karaciğerinden kısmen izole edilip saflaştırılarak, fizikokimyasal ve kinetik özelliklerinin incelenmesi ve muhtemel bazı inhibitörlerin karaciğer ALP aktivitesindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı. Elde ettiğimiz sonuçları literatürdeki bilgilerle karşılaştırdık.

2. GENEL BİLGİLER:

2. 1. ALP Üzerindeki Çalışmaların Tarihsel Gelişimi ve Sistematik Adlandırılması:

Bir çok araştırmada ALP hakkındaki ilk araştırmaların 1907 yılında Suziki ve arkadaşları tarafından yapıldığı bildirilmiştir. Buna göre Suziki, fosfataz aktivitesini ilk kez pirinçte ölçmüş ve fosfatazların ökaryotik enzimlerin ayrı bir sınıfını oluşturduğunu belirtmiştir (20, 36, 75, 85).

Grosser & Husler ve Von Euler, 1912 yılında bizim ALP olarak bildiğimiz enzimi tanımlayarak enzimin değişik dokularda var olduğunu gliserofosfat ve fruktoz 1-6 difosfatı hidrolize edebildiğini, ve intestinal mukozada yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunu göstermişlerdir. Bu yıllarda, intestinal mukozada özellikle de buzağı barsağı enzimin özelliklerini keşfetmek için araştırmacılar tarafından bir prototip olarak kullanılmıştır. Fosfataz kelimesinin ilk defa 1912 yılında Euler & Funke tarafından kullanıldığı bildirilmiştir (20).

Robison'un 1923 yılında ALP'nin kemik gelişiminde, kemiğin mineralizasyonunda rol aldığını bildirmesinden sonra fosfatazlarla ilgili araştırmalar yoğunlaşmıştır (65). Fernley yayınında ALP' ın farklı pH' larda aktivite gösteren şekillerinin varlığının ilk defa Davies tarafından bulunduğunu ve bu araştırmadan sonra fosfatazların alkali ve asidik olarak ikiye ayrıldığını söylemiştir (25).

Serumda alkali fosfatazın varlığı ilk kez 1924 yılında gözlenmiştir. 1954 yılında ise ilk kez serum ALP' ının birden çok değişik formda olabileceği kağıt elektroforezinde iki bantın görülmesiyle ortaya çıkmıştır (23).

Beertsen ve Van den Bos, ALP'nin lokal olarak fosfat konsantrasyonunu artırarak, kemik kalsifikasyonunu sağladığını göstermişlerdir. Bu özelliklerinden dolayı ALP'nin kemik izoenzimi, kemik hastalıklarının teşhisinde en yaygın olarak kullanılan laboratuvar testlerinden biri haline gelmiştir (5, 6).

Tıkanma sarılığında görülen serum ALP aktivitesindeki artış ilk defa 1930 yılında Roberts ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur (64). Sıçanlarda safra yolları ligatüre edilerek yapılan çalışmalarda, karaciğerde alkali fosfataz sentezinin artmasına bağlı olarak serum ALP aktivitesinde bir artış meydana geldiği tespit edilmiştir (11, 46). Daha sonradan yapılan araştırmalarda, karaciğerin bir çok malign ve bening hastalığında, ALP aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir. Karaciğer ve kemik hastalıklarında enzimin serum aktivitesinde büyük artışların tespit edilmesiyle ALP'nin klinik önemi artmıştır. Bu da enzim aktivitesinin tayini için hassas metodların gelişmesine yol açmıştır.

Memeli hayvanların lökositlerinde bulunan ALP enziminin varlığı ilk defa Roche tarafından ortaya çıkartılmış ve lökosit ALP düzeyinin %85' inin sitoplazmik granüllerde yer aldığı gözlemlenmiştir (66).

1950-1960'lı yıllar arasında araştırmacılar E.Coli'de ALP'nin bulunduğunu keşfettiler (30). İnsan dokularından moleküler çalışmalarda kullanılabilecek uygun kristalize formlar elde edilemediğinden E.Coli ALP'ı kullanılmaya başlandı. Coleman ve Murphy barsak izoenzimin, fosfat esterleriyle reaksiyonu neticesi, enzim katalitik yolunun önemli bir ara ürünü olan “fosfoseril bakiyesi” oluşumunun ilk defa 1961 yılında Engstrom tarafından bulunduğunu bildirmişlerdir (20, 60). Plocke tarafından 1962 yılında Zn^{+2} nun aktivite için gerekli olduğunu göstermesiyle ALP çinko grubu metalloenzim sınıfına dahil edildi (62).

1968' de Fishman ve arkadaşları Regan isimli akciğer kanserli bir hastanın serumunda ALP seviyesinin çok yüksek olduğunu ve bu artışın tümoral dokudan kaynaklandığını keşfetmişlerdir. Sıcaklığa dayanıklı bu enzime Regan izoenzimi adını vermişlerdir (26). Aynı yıllarda Timperley serum ALP' ı yüksek olan bir hastanın tümoral dokusunun ALP ihtiva ettiğini fakat bu izoenzimin Regan izoenziminin aksine sıcaklığa hassas ve fenil alanine hassas olmayan bir izoenzim olduğunu tespit etmiştir. Barsak ALP' ına benzeyen bu izoenzime Kasahara izoenzimi denmiştir (81). Daha sonraki yıllarda araştırmacılar başka kanserlerde de plasental-ALP' a benzeyen bir başka izoenzim, Nagao izoenziminin varlığını tespit etmişlerdir. Benzer özellikleri sebebiyle günümüzde bu izoenzime “Plasental benzeri ALP” adı verilmiştir (38).

Fernley bir makalesinde Kay' ın, süttten elde ettiği ALP'ın Michealis-Menten kinetiğine uymuş olduğunu bulduğunu, ayrıca son ürün olan fosfatın enzim aktivitesini inhibe ettiğini gösterdiğini bildirmiştir (25). Moss, King ve arkadaşları insan doku ALP'larının değişik substratlara karşı farklı ilgi gösterdiklerini bulmuşlardır. Fishman tarafından sıçanın farklı dokularından elde edilen ALP'ların, değişik bileşiklere karşı organospesifik davranışları tespit edilmiştir (28). İmmünokimyasal ve elektroforetik teknikler, doku ALP'ları arasında fizikokimyasal farklılıklar olduğunu göstermiştir. Böylece; ALP ile yapılan fizikokimyasal ve kinetik çalışmalardan elde edilen sonuçlar farklı izoenzimlerin varlığını ortaya koymuştur. Farklı hastalıklarda farklı izoenzimlerin elde edilmesi teşhis ve hastalığın seyrinde klinisyenlere önemli bilgiler sağlaması nedeniyle, bu enzimin fizikokimyasal özelliklerine olan ilgiyi artırmıştır (85).

Son yıllarda ise ALP enziminin genetik yapısını belirlemeye yönelik çalışmalara yönelinmiş, enzimin nukleotid dizilimleri ve polipeptid yapıları açıklanmıştır.

2. 2. Bulunduğu Yerler :

ALP birçok araştırmacı tarafından farklı canlı türlerinin, değişik organ ve dokularından saflaştırılmış, doğada oldukça yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiştir. ALP'ın hayvan ve insan dokularının hemen hepsinde, bazı bitki türlerinde, balıklarda, bakteri ve mantarlarda bulunduğu bilinmektedir.

İncelenen dokuların hemen hepsinde, örneğin;karaciğer, ince barsak epiteli, renal tubuli hücreleri, kemik osteoblast hücreleri, pankreas, lökositler, laktasyondaki meme glandı, troid glandı, diş minesi ve plasentada bol miktarda bulunurken, eritrositlerde, kaslarda olgunlaşmamış bağ dokusunda ve kemikleşmemiş kıkırdakta yok denecek kadar azdır (9, 15, 25, 28, 32, 41, 52, 72, 75). Kemikleşmiş kıkırdak ise zengin bir fosfataz kaynağı olarak tespit edilmiştir (73, 76). İdrarda da ALP bulunduğu, ayrıca semen'de de prostat ve ve testis tarafından salgılandığı kanıtlanmış az miktarda enzim aktivitesi tespit edilmiştir (16, 41, 85).

2. 3. ALP'ın Doku ve Hücre İçi Lokalizasyonu :

Farklı dokulardan elde edilmiş ALP aktivite değerlerinin dağılımı sırasıyla, en çok ince barsak mukozası sonra sırasıyla plasenta, böbrekler, kemik, karaciğer, dalak ve akciğerler olarak belirlenmiştir (25).

Enzimin organ içerisindeki dağılımı da homojen değildir. Böbrekte, karaciğerde ve intestinal mukozada yapılmış çalışmalar bunu doğrulamıştır. Böbrekte yapılan çalışmalar, korteksin medulladan daha fazla enzim içerdiğini ve intestinal kanal boyunca enzim aktivitesinin değişebileceğini göstermiştir. Karaciğerde ise enzim aktivitesi biliyer kanalların etrafındaki hücrelere yoğunlaşmıştır (22, 23, 27, 28).

Ultrasantrifüjle subsellüler fraksiyonların incelenmesi, elektron mikroskopisi ve histokimyasal teknikler kullanılarak, ALP'ın intrasellüler lokalizasyonu belirlenmeye çalışılmış ve enzimin en çok hücre membranında, çok az miktarda ise nükleus zarı, golgi cihazı, mitokondri ve endoplazmik retikulum'da bulunduğu tespit edilmiştir (23, 25, 28, 41, 42, 45, 67).

ALP karaciğerde hepatositlerin sinüzoidal yüzeylerinde sentezlenir (22, 23). Sıçan karaciğerinde yapılan histokimyasal çalışmalarda, ALP'ın reaksiyon ürünü, safra kanaliküllerinin mikrovillileri üzerinde tespit edilmiş ve enzimin bu bölgede lokalize olduğu gösterilmiştir (28). Fakat intrasellüler bölgede enzim aktivitesinin bulunmadığı görülmüştür (27).

Sandborn ve arkadaşları, ALP aktivitesinin ince barsak epitelinde mikrovillusların plazma zarında ve lateral hücre zarında yüksek olduğunu, ayrıca golgi cihazında, endoplazmik retikulumda, lizozomlarda ve nükleus membranında az da olsa ALP aktivitesinin olduğunu göstermişlerdir (68).

Enzim barsaktaki gibi, böbreklerde de proksimal tubulus hücrelerin mikrovillilerinde lokalize olmaktadır. Ayrıca bazal tabakalar dahil olmak üzere bütün hücrelerin yüzey zarlarında yer aldığı tespit edilmiştir (25, 28, 85, 87).

İnsan plasentasında ALP aktivitesine sadece mikrovillilerdeki plazma zarında ve sinsitiotrofoblastlarda rastlanır. Sinsitiotrofoblastlar ise sadece veziküller’de değil aynı zamanda bazal yüzeyler boyunca bulunmaktadır (25, 28, 35).

Eozinofil lökositlerde ALP reaksiyon ürünü, plazma zarında çok az miktarda bulunmaktayken, mitokondri dış zarında, nükleus membranında, endoplazmik retikulumda ve golgi membranında daha yüksek miktarlarda bulunmaktadır (25, 28, 51).

Kemikte kalsifikasyonun başladığı hipertrofik kıkırdakta, osteoblastlarda ve osteositlerde ALP aktivitesi oldukça yüksek bulunmuştur (19, 25, 28, 85).

ALP bu dokuların hemen hepsinde daha çok hücre membranına bağlı olarak bulunmaktadır. Maling tümör hücrelerinin de ektopik olarak ALP salgıladıkları tespit edilmiştir. Bunlardan Regan izoenziminin mitokondri iç membranında lokalize olduğu, daha az olarak da endoplazmik retikulumda, golgi aparatı ve nükleer membranda bulunduğu belirlenmiştir. Nagao ve Kasahara izoenzimlerinin ise plazma zarında lokalize olduğu tespit edilmiştir (28).

2. 4. Alkali Fosfatazın Yapısı ve Moleküler Özellikleri :

ALP enziminin yapısının hem canlının türüne göre değişmesi, hem de aynı tür içinde birbirinden farklı yapıdaki izoenzimlerin bulunması nedeniyle, enzim yapısının belirlenmesine yönelik çalışmalar ağırlık kazanmıştır. Enzimin moleküler yapısındaki bu farklılıklar kısmen genetik faktörlere, kısmen de posttranslasyonel modifikasyonlara bağlıdır (57).

Gen düzeyinde yapılan araştırmaların ilerlemesiyle ALP izoenzimlerinin yapısındaki farklılıkların nedenleri de ortaya çıkmaya başlamıştır. İnsan ALP enziminin, gen düzeyindeki araştırmalarda kullanılabilecek uygun kristal formu elde edilemediğinden, bu araştırmalarda E.Coli ALP enzimi kullanılmıştır. ALP enziminin yapısı ve fonksiyonları hakkındaki bir çok bilgi E.Coli enziminden yararlanılarak elde edilmiştir (20, 30, 60, 62).

ALP'ın bütün izoenzimleri, dimerik yapıda, her monomerin aktif bölgesinde iki Zn^{++} ve bir Mg^{++} iyonu bulunan, membrana bağlı bir metalloenzimdir. Bütün izoenzimleri glikoprotein yapısındadır (3, 16, 20, 72, 85).

İlk olarak 1962 yılında E.Coli ALP'ı çinko içeren metalloenzim grubuna dahil edildi (62). Bu ilk çalışmalar Zn^{++} nun aktivite için gerekli olduğunu, metalin aktivitedeki görevinin fosfatı bağlamak, böylece enzimin katalitik yolunun önemli bir ara ürünü olan fosfoseril formasyonunda ve hidrolizinde görev aldığını gösterdi (48, 85). E.Coli ile yapılan çalışmalar enzimin her monomerinde iki adet olmak üzere, toplam dört adet Zn^{++} atomu içerdiğini göstermiştir. Fakat enzim aktivitesi için iki çinko atomu yeterli olmaktadır. Enzimin içerdiği dört çinko atomundan ikisinin gevşek bağlı ve katalitik aktiviteden sorumlu olduğunu, diğer ikisinin ise daha sıkı bağlı olup enzimin yapısının stabiliteyondan yani enzimin konformasyonunun korunmasından sorumlu olduğu belirlenmiştir(25, 28, 43, 71, 75). Yüksek ve sabit tutulan pH değerlerinde metal içermeyen, apofosforil enzim (metal içermeyen fosforilize olan enzim) şunu göstermiştir ki metal iyonları fosfoseril araürünü için olduğu kadar defosforilasyon için de gereklidir (85). Enzimin aktif bölgesinde metal iyonlarının bağlanması için uygun bölgeler bulunmaktadır, çinko her dimerde dört bölgeye bağlanırken, magnezyum sadece iki bölgeye bağlanabilmektedir (43, 44, 85). Mg^{++} un tam olarak katalizdeki rolü bilinmesede, enzimin aktif bölgesindeki yapısı kuvvetli bir şekilde

korunmaktadır. Bu da bölgenin önemini ortaya koyar. ALP saflaştırma basamaklarında spesifik aktivite arttıkça çinko konsantrasyonunun da arttığı belirlenmiştir. Saflaştırma işleminde uygulanan diyalizin ise çinko konsantrasyonu azalmasına dolayısıyla enzim aktivitesinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (34).

E.Coli ALP'nın genel yapısının incelenmesi neticesinde, dimerik yapıda olduğu, her bir subünitenin 40.000 dalton olduğu, 429 aminoasit içerdiği, dört tane sistein bakiyesine sahip olduğu, iki disülfür köprüsü içerdiği ve aminoasit zincirinin memeli ALP'ı ile % 25-30 oranında homoloji gösterdiği bulunmuştur (20, 30, 60). Memeli ALP' ı E.Coli ALP' ına göre 10-20 kez daha aktiftir. E.Coli ALP' ının aktif bölgesi incelendiğinde Serin' in 102. sırada bulunduğu ve bunun etrafında bulunan aminoasitlerden Asparagin 101, Alanin 103 ve iki Zn, bir Mg'un varlığı tespit edilmiştir (24, 25, 48, 60, 62). E.Coli enzimi, intestinal ALP ile aynı katalitik özelliklere, benzer pH aktivitesine ve arada bulunan aynı fosfoserile sahiptirler (20). E.Coli ALP'nın sentezlenmesi sırasıyla şöyledir. Proenzim olarak düz bir zincir halinde sentezlenen enzim Lösin' den zengin bir sinyal peptit içermektedir. Sitoplazmaya salgılanmasından sonra sinyal peptit uzaklaştırılır. Önce düz zincir halindeki protein, kendi içinde kıvrılıp katlanarak monomerleri meydana getirir. Bu monomerler buradan hücre membranı ile hücre duvarı arasındaki periplazmik alana yerleşir, burada non-kovalent bağla birbirlerine bağlanarak dimerik yapıda enzim moleküllerini meydana getirirler. Daha sonra dimer başına dört atom çinko enzim molekülüne katılır (85).

İnsan ALP'ı izoenzimlerinin polipeptit zinciri incelendiğinde 507 ile 513 arası aminoasit içerdiği bulunmuş, insan plasental-ALP' ının %50 oranında non-polar aminoasit içermesiyle diğer izoenzimlerden farklı olduğu gözlenmiş ve aktif merkezin etrafında 36 aminoasitin dizildiği görülmüştür (25, 28, 31, 35). Bu yapı E.Coli ALP'ında bulunmamaktadır (60). Sıçan barsak-ALP' ının aktif merkezinde bulunan Lizin 'in görevi NH₂ grubu ve fosfatı bağlamak olduğu, Sistein' in ise SH grubu bağlamak ve metal grubu ile birlikte katalitik aktivitede görev aldığı bildirilmiştir (85).

İnsan serumundan elde edilen karaciğer-ALP' ı her bir subünitesi 80.000 dalton ağırlığında olan soluble homodimer şeklinde bulunur. Enzimin elektron mikroskopuyla yapılan fiziksel karakterleriyle ilgili çalışmalarda Plasental ALP'ın boyutlarının 7,5 nm x 5.5 nm olduğu gösterilmiştir (29, 79).

Son yıllarda ALP enziminin genomik yapısı üzerinde çalışmalar ağırlık kazanmış , bunların ilgili genleri ve nükleotid dizilimlerinin hepsi açıklanmıştır. ALP' ın protein kısmı, en az dört ayrı gen bölgesi tarafından kodlanır (16, 19, 20, 35). Bunlar TN-ALP (doku-nonspesifik ALP), barsak (İntestinal), plasental ve germ-cell ALP'larını kodlayan gen bölgeleridir (8, 35, 55, 78, 85, 89). Barsak, plasental ve TN-ALP'ları tam anlamıyla gerçek izoenzimlerdir, çünkü bunlar aynı reaksiyonu katalizledikleri halde genetik farklılıktan ötürü aminoasit dizilimleri farklı dolayısıyla, fiziksel özellikleri farklı olan enzimlerdir.

Doku-nonspesifik ALP gen ürünü (izoenzimini) posttranslasyonel modifikasyona uğratarak karbonhidrat kompozisyonunda farklılıklar oluşmuş ve dokuya spesifik karaciğer, kemik ve böbrek ALP'ları şekillenmiştir. Her ne kadar basitçe karaciğer, kemik ve böbrek ALP'ları için izoenzim terimini kullansak da, gerçekte bunlar aynı reaksiyonu katalizledikleri halde aynı aminoasit dizilimlerine sahip olduğundan izoform yapısındadır. TN-ALP birinci kromozomun kısa kolunda p36.1-p34 bandlarına lokalize olmuş bir genetik yerle kodlanır (16, 19, 20, 29, 35, 73, 85). İkinci kromozomun uzun kolunun sonuna yakın bir yer üzerinde p34-p37 bandlarına lokalize olmuş bir genetik yerle de intestinal ALP, yine yakın bir yerle de plasental ve plasental benzeri (germ cell) ALP'lar kodlanmaktadır (29,35,55,62,73,78,85,89).

Barsak ALP'ı haricindeki diğer bütün ALP'lar terminal sialik asit içeren bir glikoproteindir. Bunların karbonhidrat içeriği hakkında çok az bilgi vardır. Karaciğer-ALP'ında bulunan terminal sialik asit, enzimin aktivitesini regüle etmektedir. Enzime negatif yük kazandıran sialik asit aynı zamanda hücre yüzeyinin yapısında bulunan glikoprotein ve glikolipidlerin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır.

Son yıllarda ortaya çıkan yeni bir gelişme, ikinci kromozom da bulunan ALP genlerinin C-terminalleri üzerinde “fosfatidil inositol glikan” (PI-G) kuyruğunun gösterilmesidir. Bu bileşiğin ALP, enzimin posttranslasyonel modifikasyona uğraması sonucu, COOH ucundaki 29. aminoasit ile yer değiştirmesi sonucunda eklendiği düşünülmektedir. Bundan ötürü ALP, membran proteinlerinin farklı bir grubu olarak görülmektedir. ALP'ın peptid zincirinin karboksil ucu, kovalent bir bağ ile “fosfatidil inositol glikan” kuyruğuna bağlanmaktadır (35, 73, 85). Enzimin plazma membranına bağlanma olayında görev alan ve bir fosfatidik asit türevi olan “PI-G”ın, yapısında bulunan fosfat bir alkolün hidroksil grubuyla birleşmiştir (73). Bu olay bir membran enzimi olan ALP' ın memrana yerleşme mekanizmasını, aynı zamanda besinlerle alınan lipidlerin absorpsiyonu

sırasında intestinal mukozal ALP' ın azalması olayını da açıklamaktadır. Lipit absorpsiyonu sırasında barsak-ALP' ının dolaşımdaki düzeyinin artması tespit edilmiştir. Lipit tanecikleri, barsakta, barsak-ALP' ı ile birlikte lamina propria'nın hücreleri arasında mucoza boyunca hareket ederek lenf kanallarına geçer. Buradan Ductus Thorasicus' a geçip V.Porta'ya dökülen lipit tanecikleri ve barsak-ALP' ı dolaşıma katılmış olur. Lenf dolaşımı ile karaciğere gelmiş olan intestinal-ALP' ın sialik asit bakiyesi, hepatositlerde kopartılır. Intestinal-ALP' ın diğer izoenzimlerden farkı, protein kısmındaki farklılık yanında, karbonhidrat zincirinin sialik asit tarafından sonlandırılmamış olduğu, bunun yerine karbonhidrat eki olarak heksozamin bulundurmasıdır (25, 28, 41, 57, 75, 85).

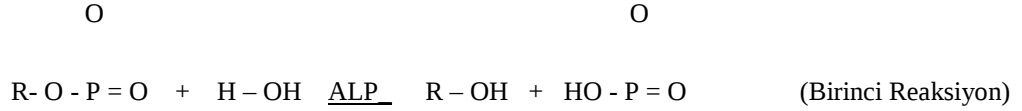
Komado ve Sakagishi insan karaciğer ve barsak ALP' ının karbonhidrat kompozisyonlarını ve ALP' ların karbonhidrat kısımlarının fizyolojik rolü hususunu açıklamışlardır. Buradaki karbonhidratlar karaciğerin asialoglycoprotein reseptörleri tarafından bağlanarak, enzimi dolaşımdaki hızlı yer değiştirmelerden korur (47). Enzimin karbonhidrat içeriğini aydınlatmaya yönelik araştırmaların sonuçları birbirleriyle çelişmektedir (28). İnsan ve sıçan' dan elde edilen farklı izoenzimlerin karbonhidrat yapıları, lektin affinite kromatografisi kullanılarak incelenmiş ve aralarında çok büyük farklar olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni ise kullanılan saflaştırma metodlarının birbirinden farklı olmasına bağlı olarak, enzimin içerdiği karbonhidratların değişik şekilde ayrıştığının düşünülmesidir (35).

Kanserli dokulardan kaynaklanan Regan ve Nagao izoenzimlerinin polipeptid yapılarının %98' inin homoloji gösterdiği, 12 aminoasitlik kısmının ise değiştiğini bulmuşlardır.

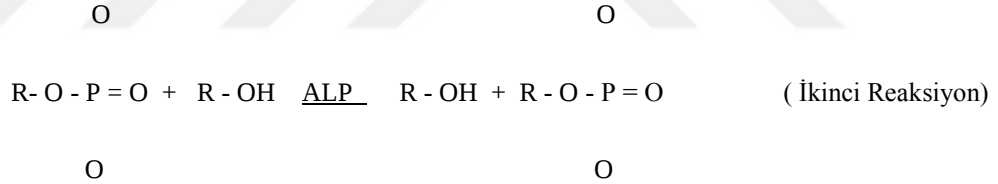
2. 5. ALP'ın Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları

Farklı kaynaklardan elde edilen ALP enziminin üç tip reaksiyonu katalizlediği gösterilmiştir (25, 28, 85, 86).

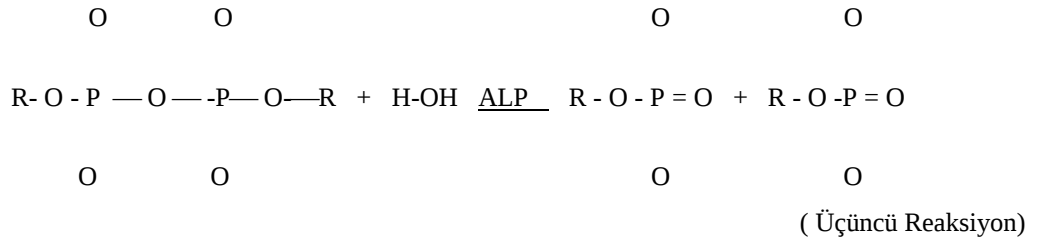
Birinci reaksiyonda enzim fosfohidrolaz olarak görev yapar ve P-O bağlarını hidroliz ederek inorganik fosfatı açığa çıkarır (25, 28, 85, 86).



İkinci reaksiyon ise transfosforilasyon olayıdır. Enzim bir fosfotransferaz olarak görev alıp, fosforil gruplarının başka bir moloküle aktarılmasını sağlar (25, 28, 75, 85, 86). Reaksiyonun meydana gelebilmesi için ATP ve yüksek enerjili fosfat bileşiklerine gerek yoktur. Bu reaksiyonda inorganik fosfat oluşmaz. Reaksiyon neticesinde fosforik asit esterleri oluşur.



Üçüncü reaksiyonda ise enzim pirofosfataz aktivitesi göstererek P-O-P (Pirofosfat) bağlarını hidrolize eder (25, 28, 56, 75, 85).



Ayrıca enzimin P-O-C bağlarına ilave olarak; P-F (flourofosfat) , P-S (sisteamin-S-fosfat) ve P-N (kreatinin- N- fosfat) bağlarının da hidrolizini katalizlediği gösterilmiştir (28, 85).

J.F.Chelebowski enzimin düşük de olsa bir fosfodiesteraz aktivitesinin bulunduğunu bildirmesine rağmen bir çok araştırmacı ALP'ın yalnız fosfomonoester' lere etkili olduğunu tespit etmiştir (85). Enzim birçok primer fosfat esterinin hidrolizini katalizlemesi nedeniyle non-spesifiktir (16, 20, 25, 85).

ALP'ların birçok doğal ve sentetik substratının bilinmesine rağmen, fizyolojik substratının ne veya neler olduğu kesin olarak belli değildir. Bununla birlikte doğuştan TN-ALP enzim eksikliği olan hypophosphatasia'lı çocukların serum ve idrarlarında normal miktarın üzerinde fosfoetanolamin, inorganik fosfat ve pridoksal 5'-fosfat bulunması, enzimin fizyolojik substratının fosfoetanolamin olabileceğini düşündürmektedir (16, 74, 85).

ALP'ın tipik substratlarını primer ve sekonder alifatik alkollerin fosfat esterleri ve bazı nükleotidler oluşturmaktadır (25, 28, 39, 41, 75).

Bazı araştırmacılar, Morton' un kreatin fosfatın da ALP tarafından hidroliz edilebileceğini gösterdiğini belirtmişlerdir (25, 28). Coleman, ALP' ın fosfoproteinler ve fosfolipidler gibi yüksek molekül ağırlıklı fosfomonoesterleri hidroliz edebildiğini göstermiştir (85). Bazı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar insan ALP'ının 5' AMP, ADP, ATP, UMP, UTP, PPi, glikoz-1-P, α -gliserofosfat'ı hidrolize ettiğini göstermiştir (25, 28, 34, 48). Ayrıca ALP hem RNA'yı hemde DNA'yı hidroliz edebilmektedir (25, 28, 41).

İnsan KC, kemik, incebarsak ve plesantasından saflaştırılan ALP'ın pirofosfatları hidroliz ettiği kanıtlanmıştır (20, 25, 41, 56, 75, 85).

ALP'ın heksozfosfat, β -gliserofosfat, etilfosfat, adenilat fosfat ve fenil fosfatı hidroliz edebildiği gösterilmiş ve β -gliserofosfatın ALP tayini için substrat olarak kullanılabileceğini bildirmiştir (3, 10, 20, 25, 42, 85). 1934 yılında King ve Armstrong, fenil fosfatı subtrat olarak kullandılar (44). Bessey-Lowry ve Brock 1946 yılında 4-NPP'ı (para-nitrofenilfosfat) ALP tayininde substrat olarak kullanmaya başladılar (11).

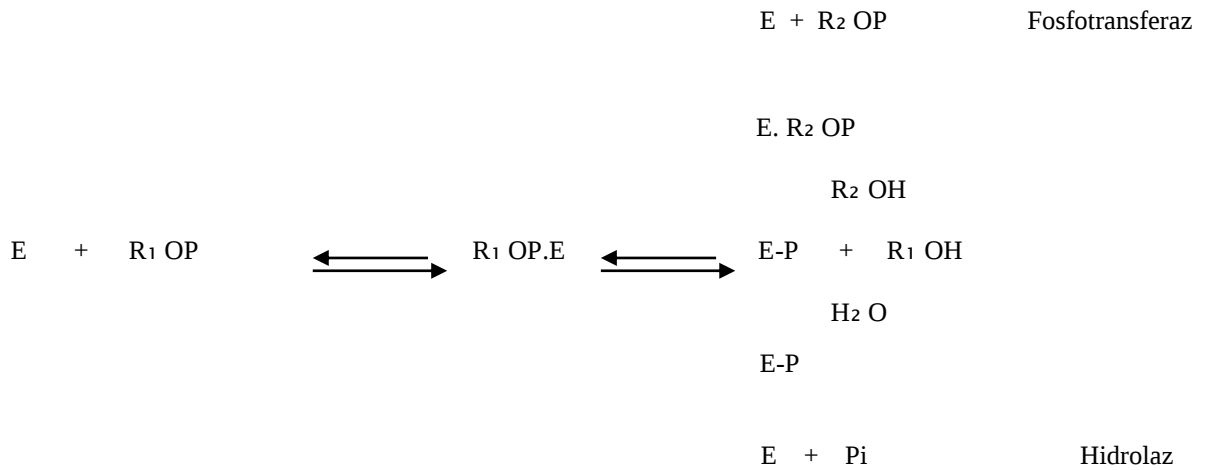
Enzim tayininde azda olsa kullanılan diğer kromojenik substratlar, fenolftalein mono ve di fosfat, timolftalein fosfat, α ve β -Nattyl fosfat ve indoksilfosfattır (16, 74).

Flourometric aktivite tayininde 4-Metilumbelliferil'in fosfat türevleri ALP'ın substratı olarak kullanılmaktadır (16, 74, 85).

2. 6. ALP'ın Etki Mekanizması :

Enzimin etki mekanizması, Fishman ve Ghosh tarafından incelenmiş olup reaksiyonun iki kademede oluştuğunu göstermişlerdir. İlk basamak Enzim-Substrat kompleksinin oluşmasından sonra substratın hidroliz olmasıyla açığa çıkan fosfatın, enzime non-kovalent şekilde bağlanmasıyla, fosforile olmuş enzim-ürün kompleksi oluşturmaktadır. Bu olay enzimin 102. sırasında bulunan serin aminoasitinin fosforilasyonu yoluyla şekillenir. Oluşan fosfoseril bakiyesi enzimin reverzibl fosforilasyonunu sağlamaktadır. İkinci basamakta ise fosforil grubu ya suya (fosfotransferaz reaksiyonu) taşınarak de-fosforile olmuş enzim ve inorganik fosfat'a dönüşür, veya bir organik alkol akseptörüne (fosfotransferaz reaksiyonu) taşınır (27, 31). Araştırmacılar insan ALP' ının üzerinde, fosfat alıcılarının bağlanması için özel bağlanma bölgelerinin bulunduğu dair kuvvetli kanıtlarının olduğunu bildirmişlerdir (20, 60, 85).

Fernley, fosforile olmuş enzim ara ürünü oluşmadan önce fosfat esterinin organik kısmının yani fosfatını kaybetmiş substratın ortaya çıktığını söylemişlerdir (25). Coleman ALP' ın etki mekanizmasını aşağıdaki şekilde özetlemiştir (20).



Burada E ; ALP'1, R₁ OP ; fosfat monoesteri olan substratı, R₁ OP. E ; Enzim-Substrat kompleksini, E-P ; fosforillenmiş enzim kompleksini, R₁ OH ; alkol ürününü, R₂ OH; fosfat akseptörünü , R₂ OP ; fosforile olmuş akseptörü , Pi ; inorganik fosfatı göstermektedir. Fosfatla enzim arasında non-kovalent bir bağ şekillenmiştir (20).

2. 7. ALP'in Optimum pH'sı ve Enzimin Optimum pH'sını Belirleyen Etmenler :

ALP' ın optimum pH'ı kullanılan substratın cinsinden ve konsantrasyonundan tamponun veya fosfat alıcısının cinsinden ve konsantrasyonundan, ortamdaki aktivatör veya inhibitörlerden etkilenir. Bir çok çalışmada substrat konsantrasyonu azaldıkça, ALP' ın optimum pH' sının düştüğü tespit edilmiştir (85). Düşük konsantrasyonlardaki tamponlar ALP'ın optimum pH'sını değiştirmezler. Mg konsantrasyonu optimum pH'yı değiştirir. Optimum pH, ALP'nın saflaştırıldığı dokuya göre de değişir. Farklı izoenzimlerin optimum pH' ları da farklıdır (16, 25, 28, 75, 76).

İnvitro yapılan çalışmalarda enzimin optimum pH'sının 8,2-10,7 arasında olduğu belirlenmiştir. İnvivo yapılan çalışmalarda ise enzimin fizyolojik pH'da optimum aktivite gösterdiği ortaya çıkmıştır. Karaciğer-ALP'ıyla yapılan histokimyasal çalışmalar bunu doğrulamıştır. β -Gliserofosfatın substrat olarak kullanıldığı, invivo çalışmalarda barsak ALP'ının optimum pH'sının 7,35 olduğu tespit edilmiştir. ALP nötral ve alkali ortamda genellikle dayanıklıdır asidik ortamda ise inaktivasyona hassastır. Farklı dokulardan elde edilen enzimlerin asidik ortamdaki denatürasyonları da farklı şiddette olmaktadır. Moss yaptığı araştırmada, karaciğer ve barsak ALP'ının asitle denatürasyonunu incelemiş, Karaciğer enziminin daha dayanıksız olduğunu ve ortamın tekrar notral pH'ya getirilmesiyle her iki enzimin de kısmen tekrar aktivite kazanabileceğini göstermiştir (58).

Serum numunelerinin bekletilmesiyle CO₂ kaybedilmekte NH₂ artışı meydana gelmektedir. Dolayısıyla pH artışı meydana gelmekte bu da serumdaki ALP aktivitesinde % 30' lara varan artışa neden olmaktadır (15).

2. 8. Alkali Fosfataz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi ve Enzimin Stabilitesi :

Farklı organlardan elde edilmiş ALP' ların, sıcaklığa duyarlılıklarının da farklı olduğu tespit edilmiştir. ALP izoenzimlerinin belirli sıcaklıklarda farklı oranlarda stabil kalma özelliklerinden faydalanılarak bu izoenzimleri birbirinden ayırma yoluna gidilmiştir. Bu metod klinik enzimolojide karaciğer ve kemik izoenzimlerinin ayırt edilmesinde kullanılmıştır (16, 25, 28, 50, 63, 85).

Karaciğer izoenzimi 56 °C de sıcaklığa kemik izoenziminden daha dayanıklıdır. Sıcaklığa en dayanıklı ALP izoenzimi ise plasental ALP'dır. 65 °C'de 30 dakika süreyle aktivitesini kaybetmemektedir. Plasental izoenzime benzeyen Regan ve Nagao izoenzimleride sıcaklığa plasental ALP kadar dayanıklıdır (21, 25, 28, 35, 41, 63, 68,75,87).

Karaciğer'den elde edilen ALP'ın terminal sialik asit bakiyeleri, Nöraminidaz ile muamele sonucu uzaklaştırılmış ve enzimin sıcaklığa direncinin azaldığı tesbit edilmiştir. Böylece sıcaklık direncinin terminal sialik asit bakiyeleri tarafından sağlandığı tespit edilmiştir (57, 85).

Aktivite ölçümünde uygulanan inkübasyon sıcaklığı da önemlidir, insan serumundan saflaştırılan farklı izoenzimlerin farklı inkübasyon sıcaklıklarındaki aktiviteleri ölçülmüş ve 37 °C 'deki ölçümde aktivitenin 25 °C 'ye göre yarıya düştüğü gözlemlenmiştir (21).

Serum saklama koşulları da ALP aktivitesinin korunması bakımından önemlidir. Serum ALP'ı 56 °C'de aktivitesini kaybeder. Düşük sıcaklıklarda ise nispeten daha stabildir. Serum oda sıcaklığında tutulursa yavaş ama gerçek bir aktivite artışı görülür. Oda sıcaklığında altı saatte % 1'in üzerinde, dört günlük bir zamanda %3 ile 6 arasında bir aktivite artışı gözlenir. Buzdolabında ALP aktivitesi, günde % 2 civarında artar. Dondurucu da aktivite düşer fakat sıcaklık oda ısısına geldikçe yavaş yavaş aktivite eski düzeyine döner. -20 °C'de dondurulan serumda ALP, bir kaç ay dayanır (16, 32, 85).

2. 9. Alkali Fosfataz'ın Aktivatör ve İnhibitörleri :

ALP'nin inhibitörleri dört temel grupta incelenmektedir. Bunlar metallerle şelat oluşturan ajanlar, amino asitler, inorganik fosfatlar ve iki değerlikli katyonlardır (74, 75).

Metallerle şelat oluşturan ajanlar şunlardır. etilendiamin tetraasetikasit (EDTA), sitrat, siyanür, sistein, α -dipiridil ve α -fenantrolin' dir. Bu maddelerin enzimin yapısındaki Zn^{++} ile şelat yaparak alkali fosfatazı inhibe ettiği bir çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (1, 28, 53, 70, 85). Ayrıca iodobenzoat ve iodoasetamid'inde enzimin yapısında bulunan çinko ile şelat yaparak enzimi inhibe ettiği gösterilmiştir (25, 28, 32). Plasental ALP diğer izoenzimlere nazaran EDTA ile inhibisyona daha dayanıklıdır. Domuz böbrek ALP'ı 10 mM KCN'e karşı dializ edilmiş ve enzim aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Ortama Mg^{++} ve Zn^{++} ilavesiyle, enzimin tekrar aktivite kazandığı bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise EDTA'ya karşı dializ yapılmış, inhibisyon oluşturulmuş fakat ortama Mg^{++} ilavesinin aktivite artışını sağlamadığı görülmüştür (25).

Heparin haricinde diğer bütün antikoagulanlar enzimin kofaktörü olan Mg ile girişimde bulunarak ALP aktivitesini inhibe ederler. Bu nedenle ALP tayinide hafif derecede hemoliz kabul edilebilir (3).

İki değerlikli katyonlardan Zn^{++} , Mn^{++} , Co^{++} , Ni^{++} ve Sn^{++} ın yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon yaptığı gösterilmiştir. Düşük konsantrasyonlardaki Zn^{++} , Mn^{++} ın ise aktivatör etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (16, 17, 25, 28, 41, 75).

Bazı aminoasitlerin, belirli ALP izoenzimlerini zayıf bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu özellikten yararlanarak izoenzimlerin birbirinden ayrılmasını sağlamıştır. Aminoasitlerin L-formlarının ALP'ı inhibe ettiği, D-formlarının ise etki etmediği gösterilmiştir (25, 85).

L-fenilalanin intestinal ve plasental ALP'ları unkompetatif olarak inhibe eder. Ayrıca Serin ve Histidin ise Zn^{++} ile şelat oluşturarak inhibisyon yapmaktadır (17, 25, 28, 52, 75).

Fosfat, borat, oksalat ve siyanür iyonları enzimin bütün formları için inhibitör etkisi göstermektedir. Fosfatın yaptığı inhibisyon tipinin kompetitif olduğu bildirilmiştir (16, 25, 28, 41, 75).

Üre, nonkompetitif reverzibl olarak ALP'ı inhibe eder (16, 25, 28, 85). Düşük konsantrasyonda üre, substrat olarak fenilfosfat kullanılması halinde karaciğer izoenzimini aktive eder. İyot, enzimin yapısında bulunan fenol-hidroksil gruplarıyla birleşerek enzimi inhibe etmektedir. Enzimin bir çok formu farklı oranlarda AsO_4^{3-} tarafından inhibe edilmektedir. Ayrıca levamizol ve imidazol Karaciğer ALP'larını inhibe ederler (84).

Enzimin aktivite değerini, düşük konsantrasyondakiler hariç, kullanılan tamponlar da değiştirir. Tamponlar şu şekilde sınıflandırılabilir. İnert (aktif olmayan) olanlar; karbonat ve barbital, inhibe edenler; glisin, propilamin; aktive edenler ise ; 2-amino-2-methyl-l-propanol (2A2IMP), Tris (hidroksimetil aminomethane), aminopropanol, dietanolamin (DEA) etilaminoetanol (EAE) ve N-Metil-D-glukamin gibi belirli amino alkoller ortamdaki fosfatları bağlayarak uzaklaştıran, aktive edici tamponlardır. Alman kimyacılar birliği ile İskandinav meslektaşları, manuel ve otomatik olarak ALP tayininde optimum koşulları pH 9,8'de 1 mol/L DEA tamponu ve substrat olarak da 10 mmol/L p-NPP diye tanımlamışlardır (16, 40, 76).

2. 10. Fizyolojik Önemi :

Şimdiye kadar ALP'ın fizyolojik fonksiyonları tam olarak belirlenememiştir. Fakat bulunduğu yerlerin tespit edilmesiyle, fizyolojik görevlerinin kesin olmamakla birlikte aydınlatılması kolaylaşmıştır. Enzimin karaciğer, safra kanalları, ince barsak epiteli, böbrek tubuluslarında absorptif hücrelerin membranında bulunması, aktif transportu regule eden bir enzim olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca ALP, fosfat esterlerini hidrolize ederek fizyolojik bir rol de üstlenmektedir (11, 16, 35, 41, 52).

ALP'ın en iyi açıklanan görevi kemik gelişiminde üstlendiği roldür. Kemikte enzim aktivitesinin en yoğun bulunduğu yer osteoblastların hücre membranıdır (16, 20, 85). ALP, fosforik asit monoesterlerinin hidrolizini sağlayarak, inorganik fosfat konsantrasyonunu artırır. İnorganik fosfat ise Ca ile birleşip, kalsiyum-fosfat şeklinde çökerek kemikleşmeye yardımcı olur (7, 16, 25, 28, 32, 41, 85). ALP, ayrıca inorganik fosfat ve ATP gibi büyüme

inhibitörlerini yıkarak ve ATP az rolü üstlenip Ca^{++} ile Pi nin aktif transportunu sağlayarak da kemikleşmeye yardımcı olur (10, 20, 41, 85). Raşitizm, osteomalizi, akromegali, kemik kırıkları, paget hastalığı gibi kemik yıkımının ve yapımının arttığı durumlarda ALP aktivitesinin yükselmesi enzimin kemikleşmede rol oynadığını kanıtlar (3, 16, 41).

Lipit emilimi sırasında dolaşımda bulunan I-ALP'ın artması enzimin barsaklarda lipid transportuyla ilgili bir görevinin olduğunu ortaya koymuştur. Yağlı bir diyetle beslenmeden sonra serum I-ALP'ının yükselmesinin yanısıra, barsak mukozasında ve ductus torasikusta da ALP aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Yağ tanecikleri ALP ile beraber Lamina proprianın hücreleri arasında mukoza boyunca seyahat eder ve sonrada lenf kanallarına geçer (16, 25, 28, 29, 85).

ALP' ın inorganik fosfat gibi bazı metabolitlerinin ince barsaktan aktif transportunda görev aldığı düşünülmektedir. Barsaklarda kalsiyum emilimi ile ALP artışı paralel gitmektedir. D vitamini alınmasıyla barsak-ALP enzimi iki üç kat bir artma göstermektedir (35).

ALP' ın insan organizmasında kanıtlanmış bir başka görevinin de, pankreatik kanalların hücrelerinde bulunan, düşük iletkenlikli klor iyonları kanallarının fosforilasyonunu sağlamak olduğu gösterilmiştir. Bu kanal iletim sisteminin bozukluğu sonucu kistik fibrozis oluşur. Kistik fibrozis de tedavi amaçlı kullanılan, bir TN-ALP inhibitörü olan levamizol, ALP aktivitesini azaltarak bu iletim kanallarının açılmasında kullanılır (85).

Gebelikte plasental ALP'ın antikorları ve IgG'leri anneden yavruya geçirme işini sağlayarak pasif immunizasyonda görev aldığı gösterilmiştir (54, 85). ALP'ın protein sentezi ve nükleotid metabolizmasıyla ilişkili olabileceği de tahmin edilmektedir. Çünkü ALP; DNA ve RNA' nın 5' uçlarını hidroliz edebilmektedir. Purin nükleotidleri (Adenozin, İnozin, Guanozin monofosfat) üzerine ALP'ın etkisi incelenmiş ve enzimin bu substratların intra sellüler düzenlenmelerinde rol oynayabileceği belirtilmiştir. Bu özelliği nedeniyle ALP, rekombinant DNA çalışmalarında kullanılan DNA manipulasyon enzimlerinden (DNA ligaz, DNA polimeraz gibi) biri olarak kullanılmaktadır. DNA ve RNA'nın kendi kendine bağlanmasını engellemek için kinaz işaretlemesinde önce 5'-PO gruplarının uzaklaştırılmasını sağlar (39, 48).

Lökositlerde düşük düzeylerde bulunan ALP enziminin glikojen sentezi ve yıkımına katıldığı ileri sürülmüştür. Enzimin eritrosit membranında bulunduğu ve eritrositlerde yapısal bütünlüğün korunmasında görev alarak membran proteinlerinden özellikle spektrin-aktin kompleksinin fosforilasyonunu sağladığı düşünülmektedir. Ayrıca eritrositlerde glikoliz için gerekli inorganik fosfat ile kalsyum iyonlarının transportunda da görev aldığı ileri sürülmüştür (51, 85).

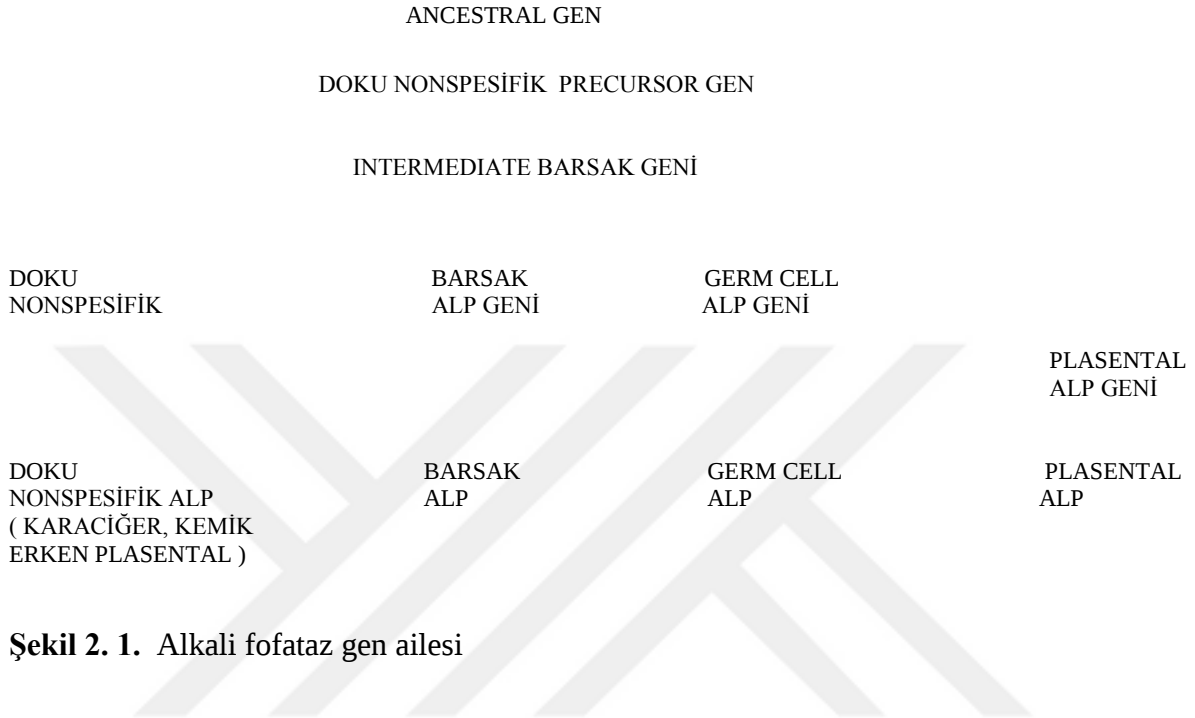
İdrarda da ALP bulunmuştur. Bunun kaynağı böbrekler tarafından serumdan atılan enzim değil, büyük ihtimalle ALP içeriği bakımından zengin renal dokulardır. Bunun herhangi bir fizyolojik rolünün olmadığı düşünülmektedir (16, 41, 85).

2. 11. Alkali Foasfatazin İzoenzimleri ve Klinik Önemi :

Değişik dokulardan elde edilmiş ALP'ların, farklı substratlara karşı farklı oranlarda affinitelerinin bulunduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir. Enzimin organospesifik davranışını kanıtlayan bu araştırmalar farklı izoenzimlerin de varlığını ortaya koymuştur (25, 28, 77). İzoenzimler farklı gen bölgesi tarafından kodlandığından polipepetid yapıları farklı olan, dolayısıyla farklı kimyasal, fizyolojik veya immünolojik özellikleri olan enzimlerdir. Bunlar aynı substrata etki eden, aynı reaksiyonu katalizleyen, farklı substrat spesifitelerine sahip enzimlerdir.

Son yıllarda ALP enziminin genomik yapısı üzerinde çalışmalar ağırlık kazanmış , ALP izoenzimlerinin bütün genleri genleri kolonlanıp, nükleotid dizilimlerinin hepsi açıklanmıştır (78, 85). Buna göre ALP izoenzimleri en az dört ayrı gen yeri tarafından kodlanmaktadır (16, 19, 20, 35, 73, 78). Bunlar TN-ALP (doku-nonspesifik ALP), I-ALP (intestinal ALP), (P-ALP) plasental ve germ-cell ALP'larını (GC-ALP) kodlayan gen bölgeleridir (8, 36, 38, 73, 78, 89). İntestinal, plasental ve TN-ALP'ları tam anlamıyla gerçek izoenzimlerdir. Çünkü bunlar aynı reaksiyonu katalizledikleri halde genetik farklılıktan ötürü aminoasit dizilimleri farklı dolayısıyla da, fiziksel özellikleri farklı olan enzimlerdir. TN-ALP birinci kromozomun kısa kolunda p 36.1-p 34 bandlarına lokalize olmuş bir gen yeri tarafından kodlanır. İntestinal-ALP ikinci kromozomun uzun kolu üzerin p 34-p 37 bandlarına

lokalize olmuş bir gen yeri tarafından, buna yakın bir bölgede ise plasental ve plasental benzeri (germ cell) ALP kodlanmaktadır (20, 29, 35, 55, 73, 78, 85).



Şekil 2. 1. Alkali fofataz gen ailesi

Bu izoenzimlerin genomik yapıları incelendiğinde P-ALP, GC-ALP ve I-ALP'ın birbirine daha çok benzediği bulunmuştur. Bunlar aynı intron ve eksonları kapsar. Bunların arasındaki ana fark, P-ALP'ın 20 nin üzerinde allellik varyans, GC-ALP'ın altı, I-ALP'ın hiç allellik varyans göstermemesidir. TN-ALP ise bir ekstra intron ve ekson'a sahip olması, beş glikalizasyon bölgesi ve sıfır allellik varyansla diğerlerinden ayrılır. Sıçan TN-ALP geninin izolasyonu ve karakterizasyonu için yapılan bir araştırmada, 12 eksondan oluştuğu ve en az 49 kb uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir. İlk iki eksonun 32 kb uzunluğunda bir intronla birbirinden ayrıldığı, geriye kalan diğer eksonların ise 17 kb' lık bir alanda bulunduğu belirtilmiştir. Dokulardan elde edilen ALP, bu özellikleriyle birbirinden ayrılrsa da, diğer bir fark da bunların karbonhidrat zincirleri arasındaki farkdır (16, 35, 80, 85).

Buraya kadar adı geçen ALP türlerinin hepsi gerçek izoenzimlerdir. TN-ALP gen ürünü ise (izoenzimi) posttranslasyonel modifikasyona uğrayarak karbonhidrat kompozisyonunda farklılıklar oluşmuş ve dokuya spesifik Karaciğer-ALP'ı, Kemik-ALP'ı ve Böbrek-ALP'ı olarak bildiğimiz ALP enzim türlerine dönüşmüştür. Her ne kadar kullanım

kolaylığı sebebiyle bunlara da ALP izoenzimleri denilse de, gerçekte bunlar aynı reaksiyonu katalizledikleri halde aynı aminoasit dizilimlerine sahip olduğundan izoform yapısındadır. Fenotipleri farklı olmalarına rağmen aynı gen ile kodlanmaktadır (29, 35, 85). Bu sınıflandırmaya göre ALP'lar Doku Nonspesifik ALP (Karaciğer, kemik,böbrek), intestinal, plental ve plental benzeri (germ cell) ALP olmak üzere dört ana grupta incelenir.

ALP izoenzimlerinin laboratuvar koşullarında birbirlerinden ayırımı, farklı izoenzimlerin kimyasal özelliklerinin de farklı olması temeline dayanır. ALP izoenzimleri ve diğer multiple formları değişik metodlar kullanılarak birbirinden ayrılabilirler. Bunlar; farklı elektroforetik göç etme özellikleri, kromatografi, üre ve sıcaklıkla denatürasyonda izoenzimin stabilizasyonundaki farklılık, değişik substratlarla reaksiyona sokularak farklı aktivite değerlerinin elde edilmesi, seçilen inhibitöre ve aktivatöre farklı cevaplar verilmesi ve immünokimyasal metodlardır (16, 29, 77, 85).

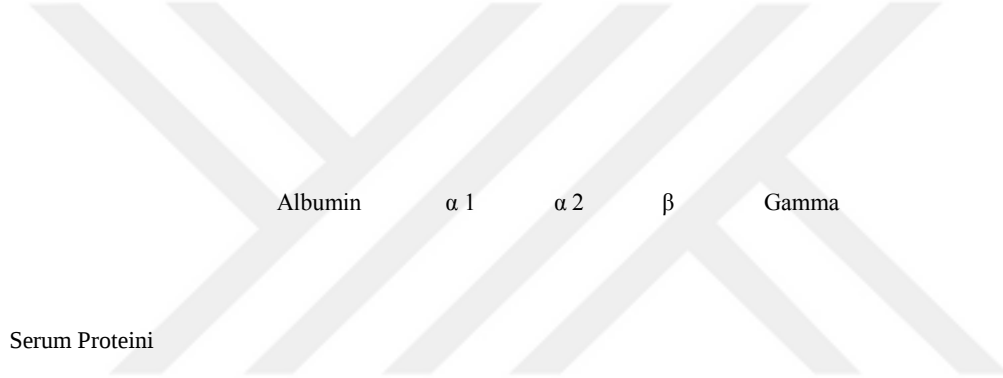
Rutinde en çok kullanılan metod elektroforezdir. ALP izoenzimlerini ayırmak için farklı elektroforez teknikleri kullanılmaktadır. Bunlar agar, agaroz, nişasta, poliakrilamid Jel ve seluloz asetat elektroforezleridir. Bunların arasında en iyi ve güvenilir sonuç veren ve ticari olarak kullanılan agaroz elektroforezidir. Elektroforetik seperasyonda seçilen jel, numunelerin göç yerlerinin farklı olmasına neden olabildiği gibi, bir yöntemde görülebilen bantlar başka bir tür elektroforetik yöntemde görülemeyebilir (10, 85).

ALP'nin dokular arasında ve dokular içerisinde heterojenite göstermesine rağmen normal bir kişinin serumunda üç ya da dört'den fazla formunun görülmesi nadirdir.(19) Serumda çeşitli hastalıklarda artan ve görülebilen spesifik ALP formları karaciğer, kemik, intestinal, plasental ve nadir olarak renal dokulardan kaynaklanmakla birlikte normal yetişkin serumunda, karaciğer ve kemik kaynaklı ALP'lar baskındır (9, 16, 28, 29, 41, 49, 57, 74, 87). Serumda bulunan ALP formlarının oranlarının yaşa, cinsiyete, gebelik durumuna, kan grubuna ve patolojiye göre değiştiği bildirilmiştir (42, 74).

Normal serumda bulunan major tipin, çocuklarda kemik büyümesi sırasındaki kemik-ALP'dan ibaret olduğu kabul edilmektedir (16, 41, 57). Yetişkin serumunda ise karaciğer-ALP' ı total aktivitenin yarısı veya daha fazlasından sorumludur. Yaşlandıkça karaciğer-ALP'ı göreceli olarak artar (3, 42).

Gebeliğin bir ve ikinci üç ayında P-ALP'ın serum düzeyi yükselmeye başlar. Üçüncü üç ayında ise pik yapar ve bu dönemde total ALP aktivitesinin % 40 ile %65'ini oluşturur. Doğumdan bir ay sonra da normale döner (10, 54). Ayrıca normal kişilerin % 20'sinde özellikle kan grupları B veya 0 olanların serumlarında daha sık olarak barsak-ALP'ı bulunmaktadır (4, 16, 28, 41, 87).

Farklı ALP izoenzimleri içeren serum örneği alkali pH'da selüloz asetat elektroforezine tabi tutulduğunda, Karaciğer-ALP'ı anoda doğru en hızlı göç eder. Kemik-ALP'ı bundan daha az anodal mobiliteye sahiptir. Fakat daha geniş bir bant oluşturur. Barsak-ALP'ı ise bu iki izoformdan daha az göç eder. Çok nadir de olsa görülebilen böbrek-ALP'ı en yavaş göç eden izoformdur (3)



Alkali fofataz
İzoenzimleri

Ultra Fast Bandı	Fast Liver	Liver (Karaciğer)	Kemik	Barsak Plasental Regan Nagao Böbrek	PA	Uygulama Noktası
---------------------	------------	----------------------	-------	---	----	---------------------

Şekil 2. 2. Selüloz Asetat Elektroforezinde Görülebilen ALP İzoenzim Tipleri

Normalde selüloz asetat elektroforezinde az görülebilen veya hiç görülmeyen ALP izoenzimlerin bazıları şunlardır.

Ultra Fast bandına % 2 sıklıkla rastlanır. Bu bant albümin pozisyonunda, albüminle bilirubin meydana getirdiği bir kompleksdir. Bu bantın görüldüğü olguların % 26' sında bilirubin 10 mg/dl' nin üzerindedir. 55 ve 65 C°'lerde kaybolmaz (85).

Fast Liver (Hızlı Karaciğer) bandı, karaciğer hastalıklarında görülür. Yüksek molekül ağırlıklı ALP, membrana bağlı ALP, bile ALP olarak da bilinir. Bu ALP karaciğer plazma membranından kaynaklanan izoenzimlerden farklıdır. Kolestazis' de görülür. Kuvvetli negatif yüklüdür. Bu yüzden nişasta jelde yavaş hareket eder. Poliakrilamid jelde görülmeyebilir. Selüloz asetatı ise en çok anodal göç eden fazdır. Serumda lipoproteinlere ve immünoglobulinlere bağlı olarak taşınır (85).

Böbrek bantı, nadir olarak plasental pozisyonunda, böbrek hastalıklarında ve böbrek transplantasyonunda görülmektedir.

Böbrek bantı, B ve 0 kan grubu taşıyan kişilerde yağlı diyetle beslenmeden sonra görülür. Serumdaki konsantrasyonu sirozda ve barsak ülserlerinde yükselir (4, 29).

Regan, Nagao bantları, kanser vakalarında artar. Teşhis ve tedavinin göstergesi olarak kullanılabilir (51).

PA bandı, pankreas kanseri olan vakalarda uygulama noktası ile barsak bantı arasında görülmektedir.

Selüloz asetat elektroforezi yalnızca izoenzimlerin elektrik yüklerinin farklı olması prensibine dayandığından izoenzim formlarının, özellikle de karaciğer ve kemik-ALP bantlarının üst üste binmesi dezavantajına sahiptir. Bunu engellemek için jele nöraminidaz ilave edip kemik-ALP'nin elektroforetik hareketliliğini azaltmak dolayısıyla da daha iyi bir ayırma yapmak mümkündür. Buradaki prensip bir ekzoglikozidaz olan nöraminidaz ile kısa süreli bir muamele sonucu kemik-ALP'nin terminal sialik asit kısmının, karaciğer izoformunkinden daha fazla harap olması ve anodal göç hızının karaciğer izoformunkinden daha fazla yavaşlamasıdır (3, 16, 57, 58).

Bütün ALP izoenzimlerinin elektroforetik hareketliliği nöraminidaz tarafından farklı oranda etkilenirken, Barsak-ALP'ı hiç etkilenmez. Bunun nedeni Barsak-ALP'ının hepatositlerde de-sialele olmasıdır. Bu özellikten serumdaki major formun, Barsak-ALP'ı olduğundan şüphelenilen serum örneklerini ayırmak için faydalanılır (17, 57, 68, 86).

Poliakrilamid jel elektroforezi, selüloz asetat elektroforezinden daha iyi bir ayırıştırma sağlamasına rağmen kantitatif sonuçların elde edilememesi dezavantajına sahiptir. Bu yöntemin temeli, ALP izoenzimlerinin hem elektirik yüklerinin hem de molekül ağırlıklarının farklı olması prensibine dayanır (3). Çift yönlü elektroforez de izoenzim çalışmalarında kullanılmaktadır. Fakat rutin kullanıma uygun değildir (85).

Kemik-ALP'ının tayini için geliştirilen son yıllardaki çalışmaların odaklandığı metod wheat germ lektin (WGL) ile kemik izoenziminin presipitasyonudur. Bu tekniğin dezavantajı ise yalnız kemik izoenzimini ölçmesi, diğer izoenzimler hakkında ise bilgi vermemesidir (33, 85).

İzoelektrik fokusing tekniği (IEF) ile ALP'ı enz az 10 ile 20 arası banda ayırmak mümkündür. Bunlar sırasıyla bilier ürün, hepatosit, hepatik retikuloendotelyal hücre, vasculer, kemik, akciğer alveoler, polimorf nötrofil, fetal barsak, germ hücre, plasental, lenfosit, böbrek ve barsak bantlarıdır (10, 33, 35, 55, 85).

Klasik jel kromatografisi, ALP izoenzimlerinin rutin labaratuvarlarda ayrılmasında kullanılabilir. Fakat kemik ve karaciğer ALP'ının ayrılmasına olanak sağlamaz. Bir çok araştırmacı tarafından ALP izoenzimlerinin ayırımında yüksek-performanslı sıvı kromatografisinin (HPLC) rutin olarak kullanılmasının yararlı bulunduğu belirtilmiştir. Bu yöntemle altı tane ana pik belirlenmiştir. Bunlardan iki veya üç tanesi kemik-ALP'ına, iki veya üç tanesi karaciğer ALP'ına, (Bu bantlarından bir tanesi membrana bağlı (diğer isimleri yüksek molekül ağırlıklı ALP, fast liver ALP, bile ALP olarak bilinir) karaciğer ALP'ıdır.) bir tanesi de barsak -ALP'ına ait bant'dır (85).

Serum ALP'ı artışında, bunun karaciğerden mi yoksa kemikten mi kaynaklandığını anlamak için, sıcaklıkla denatürasyon ve izoenzime özel aminoasitlerle inhibisyon, en eski ve yaygın metod olarak hala kullanılmaktadır. ALP izoenzimleri sıcaklıkla inaktivasyona farklı oranlarda duyarlıdır. Karaciğer ve barsak kaynaklı ALP orta derecede duyarlıdır. Sıcaklıkla

inaktivasyonda en az stabil olan kemik izoenzimi' dir. ALP düzeyi belirlendikten sonra, örnek 56⁰ C'de 10 dakika sıcaklığa maruz bırakılıp aktivite tekrar ölçülür. Başlangıçta ölçülen aktivite düzeyinin % 50'sinden daha fazlası korunuyorsa, artış karaciğer kaynaklıdır. % 20'sinden daha azı korunuyorsa kemik kaynaklıdır (3, 16, 57, 85, 86). P-ALP ve Regan izoenzimi ise ısıya en dayanıklı olanıdır. Bunlar 65⁰ C'de 30 dakika inkube edildikten sonra bile aktivitesini korumaktadır (3, 16, 21). Diğer izoenzimler ise bu şartlarda tamamen inaktivite olmaktadır (3, 10, 16, 21, 28, 41).

ALP fraksiyonları, farklı aminoasitlerle farklı oranlarda aktivitelerini kaybederler. L-Fenilalanin ve L-Triptofan plasental, barsak ve Regan ALP'larını inhibe ederler (3, 26, 29). L-Losin' in Germ-cell ALP'ı, L-Homoargininin ve Levamizol' un, karaciğer ve kemik ALP'larını inhibe ettiği gösterilmiştir (16, 25, 26, 28, 52, 75, 87).

ALP izoenzimlerini birbirinden ayırmak için kullanılan diğer bir yöntem üre ile inhibisyonudur. İnhibisyon oranı izoenzim türüne göre değişir. Üre ile inaktivasyonda en fazla kemik ALP'ı etkilenir. Daha sonra karaciğer ve barsak ALP'ları etkilenir. Plasental ve Regan ALP'ları ise üre ile inhibe olmamaktadır (3, 16, 25, 27, 28, 41).

Serumda ALP aktivitesinin yüksek bulunması nonspesifik olduğu için, artışın karaciğerden mi yoksa kemikten mi kaynaklandığını anlamının bir yolu da, ALP gibi membranda yer alan "5'-Nükleotidaz", "Gama glutamil transferaz" ve "Lösin aminopeptidaz"(LAP) enzimlerinin aktivite tayinlerinin yapılmasıdır. Karaciğer harabiyetinde ALP ile birlikte bu enzimlerin de "lipoprotein-x" fraksiyonuna bağlanarak kan dolaşımına verildikleri tespit edilmiştir. ALP düzeyindeki artışın kemikten kaynaklandığı durumlarda ise bu enzimlerin serum aktivite düzeylerinde artış görülmez. (3, 50).

Üre'nin düşük konsantrasyonlarının (0,5 M) ise karaciğer ALP'ının aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir (16, 25, 85).

Son zamanlarda ALP izoenzimlerinin tayininde elektroferezden daha duyarlı olan immünokimyasal metodlar kullanılmaya başlanmıştır. Karaciğer, barsak ve plasental-ALP ların antikorları, serumun içerdiği ALP izoenzimleriyle beraber reaksiyona girerler (3, 85).

Serumda normal koşullarda görülmeyen diğer ALP'lar belirli kanser türlerinde görülebilir. Bu izoenzimler Regan, Nagao ve Kasahara izoenzimleridir. Akciğer, göğüs,

ovaryum ve gastrointestinal sistem kanserlerinde ektopik olarak salgılandığı bildirilen, Regan ve Nagao adı verilen izoenzimlerin varlığı serumda tesbit edilmiştir. Bu ikisinden farklı olarak Nagao izoenzimi, testisin germ-hücre kanserlerinde özellikle seminome de görülmektedir. İntestinal izoenzime benzeyen Kasahara izoenzimi ise ara sıra diğer doku kanserlerinde görülebilse de başlıca hepatoma'lar da görülmektedir. Bu izoenzimlerin serum düzeylerinden, kanser vakalarında teşhis ve tedavi göstergesi olarak yararlanılmaktadır (2, 3, 15, 16, 18, 35, 37, 38, 40, 50, 85).

Regan izoenziminin özellikleri, plasental ALP'a çok benzediğinden, "Carsino plasental izoenzim" de denilir. Sıcaklığa en dayanıklı izoenzimlerdendirler. 65⁰ C'de 30 dakika inaktivasyona karşı dirençlidir. Bazı araştırmacılar enzimin proteini kodlayan genin depresyonu sonucu oluştuğunu bildirmelerine rağmen (3) tümoral hücrelerin, embriyonik ve fetal genlerinin aktivasyonu sonucunda yalnız fetal dokularda sentez edilebilen proteinleri oluşturduğu öteden beri bilinen bir olaydır. Enzim olarak da ALP bu tip fetal bileşikler arasında gösterilmektedir. Ektopik olarak salgılanan bu izoenzim kanserli vakaların yaklaşık % 5'inde görülür (3, 10, 38, 40).

Bir çok durumda serum ALP seviyesi yükselebilir. Ama patolojik olarak karaciğer ve kemik hastalıklarında artması çok önemlidir. Serum ALP artışı genellikle karaciğer ve kemik izoformlarının artmasından kaynaklanmaktadır.

ALP karaciğerde hepatositlerin membranında, Vena porta ile Vena sentralisin endotelinde ve safra kanallarında bulunmaktadır. Doğal olarak biliyer fonksiyon bozukluklarında ve karaciğer hücrelerinin harabiyetinde ALP aktivitesinde aşırı derecede artış görülmektedir (3, 10, 41, 87). Kolestatik karaciğer hastalıklarında veya hepatobiliyer tıkanmalarda ALP aktivitesi normalden 10-15 kat fazla yükselebilir (3, 16, 22, 32, 41, 59). Sıçanlarda safra akıtıcı kanalı bağlanarak yapılan araştırmalarda ALP aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (11). İnsanlarda bu şekilde ekstrahepatik tıkanma yapan pankreas başı kanseri ve safra yolları taşı gibi hastalıklarda ALP aktivitesi üç kat artmaktadır. Cerrahi müdahale sonucunda tıkanmaya neden olan etken ortadan kaldırıldıktan sonra ALP düzeyi normal seviyelerine inmektedir. İntrahepatik tıkanmalarda ALP artış düzeyi 10-15 kat artabilir (3, 16, 32, 36, 37, 41, 50, 86). ALP'ların ayrılmasında kullanılan kriterler ve enzim fonksiyonlarının duyarlılığı tablo 2. 1' de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Alkali Fosfataz Enziminin Karekterleri

	Doku Nonspesifik				
	Karaciğer	Kemik	Barsak	Plasental	Germ-cell
10 dakika 56°C	++	+	+	-	-
10 dakika 65°C	++	++	+	-	-
Üre	++	+	+/-	-	-
L-fenilalanin	-	-	+	+	+
L-p-bromotetramizol		++	-	-	-
L-triptofan	-	-	+	+	
L-homoarginin	++	++	-	-	-
L-lösin	-	-	-	-	++
Levamizol	++	++	-	-	
Neuraminidaz'la					
muamelede anodal göç	++	+	etkilenmez	-	+
Poliakrilamid jel	1	2	4	kemik ve KC	
elektroforezi göç sırası				bantlarını üstüne düşer	

ALP'nin serum aktivitesinin arttığı diğer karaciğer hastalıkları infeksiyöz mononükleozis, kolonjilitis, portal siroz, primer hepatosellüler kanser ve sekonder metastatik kanserlerdir (3, 16, 32, 41, 50, 86).

ALP artışı nonhepatik hastalıklarda da görülebilir. Bunlar, akut ve kronik pankreatit, kronik böbrek yetmezliği, ekstrahepatik sepsis, intraabdominal bakteriyel infeksiyonlar ve tireotoksikoz'dur.

ALP kemik yapımının olduğu osteoblastik hücrelerde de sentezlenebilir. Bu yüzden osteoblastik aktivitenin arttığı kemik hastalıklarında aktivitesi artar (3, 10, 15).

Kemik yıkımının ve yapımının söz konusu olduğu Paget hastalığında (Osteitis deformans) ALP aktivitesi normalin 10-25 kat üzerine çıkar. Burada artmış olan osteoklastik aktivite neticesi rezorbe olan kemiğin, yeniden oluşturulabilmesi için osteoblastik aktivite artar. Bu olay ise artmış ALP düzeyine neden olur (3, 16, 90).

Vitamin D eksikliğinde ve renal tübüler disfonksiyonda görülen raşitizm (rickets)'de artmış osteoblastik aktiviteye bağlı bariz bir ALP artışı görülmektedir. Osteomalazi'de de ALP aktivitesi artar. D vitamini verildiğinde normale döner. Osteoporoz'da ALP düzeyi normal sınırlar içerisinde (3, 16, 85).

Ayrıca primer ve sekonder kemik kanserlerinde, kemik kırıklarında, akromegali'de ALP aktivitesi artar. Hiper paratroidizmde ise hafif bir ALP artışı gözlenir (16, 85, 86).

Yapılan araştırmalarda eklampsi, preeklampsi gibi komplikasyonlu gebeliklerde serum ALP aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Bu araştırmalar neticesinde ALP'nin plasenta ve fetus'un durumun değerlendirilmesinde bir marker olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (13).

Bunlara ek olarak birçok ilaçta ALP aktivitesini yükseltebilir. Örneğin: Östrojenler, progesteron ve klorpromazine gibi (3).

Azalmış ALP aktivitesi ise; Hipotroidizm, skorbüt, kongenital hipofosfatemi, kwashiorkor, kretinizm, multiple myelemada ve bazı anemilerde görülür (3, 7, 10, 35, 82, 85).

3. MATERYAL ve METOD :

3. 1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

3. 1. 1. Kullanılan Cihazlar

- Sorvall superspeed S₁ santrifüj
- Sanyo model Harrier 18/80 soğutuculu santrifüj
- Unicam UV-Visible spektrofotometre
- Warring Blendor
- Heldolph manyetik karıştırıcı
- Grant CB2 50Z su banyosu
- Beckman pH metre
- Sartorius basic model dijital terazi
- Derin dondurucu
- Brand Transferpette, 100,100-1000'lik otomatik pipetler.

3. 1. 2. Kimyasal maddeler

Tiyoüre “Carlo Erba” firmasından, L-Histidin, “Eastman” firmasından, p-Nitrofenilfosfat (p-NPP), geriye kalan diğer kimyasal maddeler “Sigma” firmasından temin edilmiş olup hepsi analitik saflıktadır.

3. 2. Metodlar

Çalışmalar iki basamakta yapıldı. İlk basamakta alkali fosfataz enzimi koyun karaciğerinden izole edilerek kısmen saflaştırıldı. İkinci basamakta ise saflaştırılan enzimin p- NPP substratına karşı Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek Km değeri hesaplandı. Kısmen saflaştırılan koyun karaciğer alkali fosfatazı üzerine sıcaklık, pH, enzim konsantrasyonu, L-Histidin ve tiyürenin etkileri kinetik olarak araştırıldı.

3. 2. 1. Koyun Karaciğerinden Alkali Fosfatazın Saflaştırılması

3.2.1.1. Saflaştırma

Enzim saflaştırılmasında Latner ve Hudson'un insan karaciğerinden alkali fosfataz saflaştırmasındaki metodu, genel kurallara uyularak kısmen modifiye edilip uygulanmıştır (49). Enzim kinetği bir çalışmada yeterli sayılabilecek bir saflık düzeyine ulaşılmıştır. Saflaştırma işleminin her aşamasında, hem enzim aktivitesi tayini hem de protein tayini yapılmıştır. Elde edilen bu bilgiler yardımıyla, her aşama için spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları hesaplanmış ve bir sonraki saflaştırma aşamasında kullanılacak olan fraksiyon belirlenmiştir.

1. Basamak: Mezbahada yeni kesilmiş bir yaşında sağlıklı koyundan alınan karaciğer, tuz ve buz karışımında korunarak laboratuvara getirildi. Karaciğer'in yapılan makroskopik muayenesinde Fasciola, Dicrocoelim gibi paraziteler invazyonlara ve herhangi bir patolojiye rastlanmadı. Daha sonra karaciğer; zar ile bağ dokusundan temizlendi.. Küçük parçalara ayrılıp + 4°C'de 0,15 M.NaCl ile yıkanıp kandan temizlendi ve -20 °C'de saklandı. ALP'ın ekstraksiyonu için bir gece +4°C'de çözünmeleri için bekletildi. Küçük parçalara ayrılan karaciğerden 250 g. alınıp, ağırlığının iki katı hacminde olacak şekilde +4°C'deki 500 ml. 0,15 M NaCl ile Waring Blendorda iki dakika düşük, üç dakika yüksek hızda homojenize edildi. Elde edilen homojenat 2000g'de 45 dakika santrifuj edildi. Sediment atılıp, süpernatant alındı. Süpernatanın hacmi 550 ml. idi.

2. Basamak. n-Butanol ile Çöktürme: Önceden -20°C 'ye soğutulmuş 550 ml n-butanol, süpernatantın üzerine manyetik karıştırıcıda yavaş yavaş ilave edildi. Karışım waring blendorda yüksek hızla homojenize edildi. Homojenat 8000 rpm'de 20 dakika santrifuj edildi. Üç fazlı bir karışım elde edildi. Üstteki açık sarı renkli sıvı n-Butanol fazı ve ortadaki katı çamurumsu kısım uzaklaştırılıp, alttaki koyu kahve renkli sulu faz toplandı. Bu faz iki kez 1 nolu whatman kağıdında süzildükten sonra pH'sı 0,1 N NaOH ile 7,6'ya ayarlandı. Hacim 330 ml. idi. Elde edilen n-Butanol fazı 0°C 'ye soğutuldu.

3. Basamak. Asetonla Çöktürme: Soğutulmuş n-butanol fazı üzerine daha önceden -20°C 'ye soğutulmuş asetondan, son konsantrasyonu % 33 (V/V) olacak şekilde manyetik karıştırıcı ile yavaş yavaş karıştırılarak ilave edildi. Karışım 2000 g.'de 15 dakika santrifuj edilerek çöken protein uzaklaştırıldı. Süpernatana son konsantrasyonu % 40 (V/V) olacak şekilde tekrar -20°C 'deki asetondan ilave edildi. Karışım tekrar 2000 g'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Sedimentin hacmi 9 ml. idi.

4. Basamak. Etanol-Kloroform'la Çöktürme: Elde edilen sediment üzerine 3/1 (V/V) oranında -20°C 'deki etanol-kloroform karışımından, son hacmi % 44 olacak şekilde yavaş yavaş karıştırarak ilave edildi. Elde edilen enzim çözeltisi homojenizatörde süspansiyon haline getirildi. Bütün bu işlemler enzim aktivitesi kaybını önlemek için buz banyosu içerisinde yapıldı. Enzim çözeltisi 30 dakika süreyle 9000 g'de santrifuj edildikten sonra süpernatant alındı. Hacmi 8 ml. idi. Böylece ALP enzimi koyun karaciğerinden kısmen saflaştırılmış oldu.

Bu şekilde elde edilen konsantre enzim çözeltisi, daha sonra kullanılmak üzere bir kaç parçaya bölünerek derin dondurucuda saklandı.

3. 2. 1. 2. : Alkali Fosfotaz Aktivitesinin Ölçülmesi :

-Kullanılan Reaktifler :

1-) Glisin (0.1 M) – Magnezyum (1 mM) Tamponu pH 10.5 :

Glisin'den (M.A 75.07) 75.07 g. alınarak yaklaşık 800 ml. distile suda çözülür. Magnezyum klorür 6H₂O (M.A. 203,3) bir miktar distile suda çözülür ve glisin çözeltisine ilave edilir. 1 N NaOH ile pH'sı 10.5'e ayarlanır . Distile suyla hacim 1000 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti +4 °C'de aylarca dayanır.

2-) p-Nitrofenilfosfat (p-NPP) Çözeltisi (11mM) :

p-Nitrofenilfosfat-Na₂'dan (M.A.263.06) 1.447 g. alınır bir miktar distile suda çözülür. Hacmi 500 ml'ye distile suyla tamamlanır. Günlük kullanılacak miktarlar kadar küçük şişelere konulur ve dondurularak saklanır. Dondurulmuş reaktif aylarca dayanır.

3-) Alkali Fosfataz Çalışma Çözeltisi :

Bir hacim Glisin–Magnezyum çözeltisi, bir hacim p-Nitrofenilfosfat çözeltisi karışımından oluşur. Günlük olarak taze hazırlanır.

-ALP Aktivitesinin Ölçülmesi :

ALP aktivitesi tayininin duyarlılık ve hızını, kullanılan substratın hidrolize olma yeteneği ile kullanılan tamponun fosfat bağlama kapasitesi belirler. Farklı ALP izoenzimleri kullanılan substrata farklı oranlarda affinite gösterebilirler, örneğin barsak-ALP, p-NPP substratına karşı diğer izoenzimlerden daha az ilgi gösterir. Aktivite tayininde seçilen tampon da önemlidir. Kullanılan tampon farklı izoenzimleri farklı oranlarda aktive edebilir. Barsak-ALP' ı dietanolamin (DEA) tamponunda kemik ve karaciğer izoformlarından daha az aktive olur (40, 76, 85).

ALP aktivitesini belirlemeye yönelik çalışmaların geçmişi oldukça eskidir. β -gliserofosfat'ın substrat olarak kullanılabileceğini ve açığa çıkan inorganik fosfatın ölçülmesi ile ALP tayini yapılabileceğini söylenmiştir. Bu bilgi 1932 yılında Bodansky tarafından kullanılmıştır. King ve Armstrong 1934'de fenilfosfatı substrat olarak kullanıp belirli bir zamanda açığa çıkan fenol'u ölçerek reaksiyonun hızını belirlediler. Fenilfosfat her ne kadar bir çok bileşiğin fotometrik olarak belirlenmesinde kullanılan bir reaktif olsa da, β -gliserofosfat'dan daha hızlı hidrolize olması nedeniyle daha hızlı sonuçlanması avantajına sahiptir. 1946 yılında Bessey, Lowry ve Brock tarafından p-Nitrofenilfosfat'ın (p-NPP veya 4-NPP olarak bilinir) substrat olarak kullandığı metodu tarif etmişlerdir. Bu metod reaksiyon şartlarında geliştirmeler yapılarak şu anda ALP tayininde en çok tavsiye edilen yöntemin temelini teşkil etmiştir (12, 44). Enzim tayininde az da olsa kullanılan diğer substratlar fenolftalein monofosfat, timol ftalein fosfat ve α -naftilfosfat'tır. Şimdiye kadar bahsi geçen bütün yöntemlerde, fosfat hidrolitik olarak substrattan ayrılarak serbest bırakılır. Bir diğer yöntem de Cornish ve arkadaşları tarafından uygulanan çok duyarlı bir floresans metodudur. 4-Metilumbelliferil substratı, 4-metilumbelliferon'a hidrolize olup 360 nm'de floresans göstermesi prensibine dayanır (3, 10, 16, 20, 25, 42).

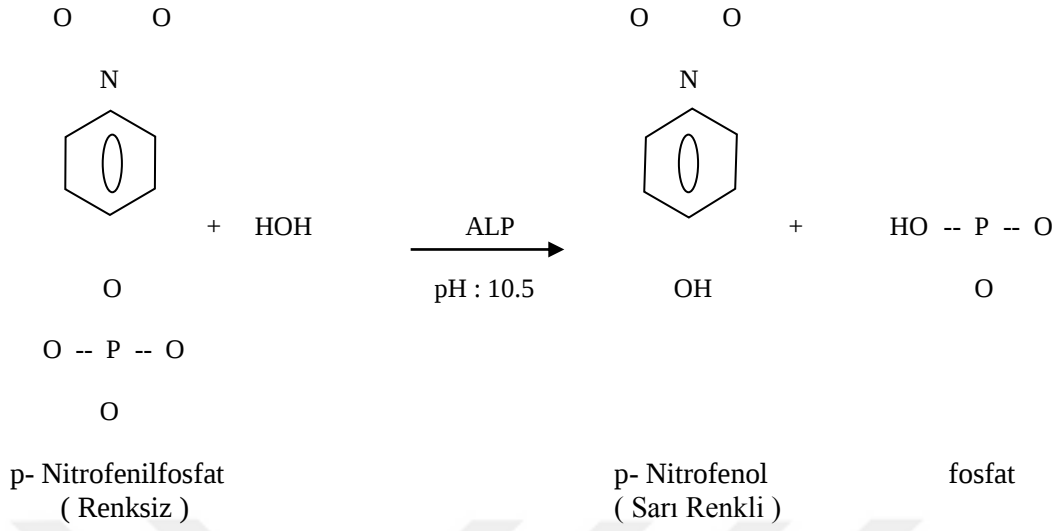
Bowers ve McComb, p-NPP'ı substrat olarak kullanarak ALP tayininde duyarlılığın ve ölçüm süresinin hızının kullanılan tamponun fosfat bağlama kapasitesi ile ilgili olduğunu göstermişlerdir (13).

Bu tezde yapılan saflaştırma işleminin her basamağında ve daha sonraki yapılan deneylerde ALP aktivitesi Bessey, Lowry, Brock metodu ile ölçüldü (88).

- Deneyin Prensibi :

ALP enzimi renksiz olan p-Nitrofenilfosfat substratının alkali ortamda p-nitrofenol ve fosfata hidrolizini katalize eder. Asit ortamda renksiz olan p-nitrofenol anyonu, alkali ortamda koyu sarı bir renk verir ve 405 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir.

ALP aktivitesi, birim zamanda açığa çıkan p-nitrofenol ile doğru orantılıdır. Bu prensipten hareket edilerek p-nitrofenol ile orantılı olan optik dansite değişimi ölçülerek ALP aktivitesi tayin edilir. Bu şekilde ALP enzim aktivitesi kinetik metodla tayin edilmiş olur.



- Deneyin Yapılışı :

Her çalışmada kör kullanılmaktadır. Kör, içinde reaktiflerin bulunduğu enzim ekstraktı içermeyen çalışma çözeltisidir. Çalışma çözeltisinin sıcaklığı su banyosunda 25 °C'ye getirilir. Spektrofotometre 405 nm'ye ayarlanır ve köre karşı sıfırlanır. Enzim aktivitesinin ölçüleceği kuvvet içerisine, 2 ml çalışma çözeltisi ve 0.1 ml enzim ekstraktı konulur 25 °C'lik su banyosunda beş dakika bekletilir. Daha sonra Spektrofotometrede birer dakikalık aralarla beş dakika süre ile optik dansite (O.D.) değerleri okunur. Okunan O.D. değerleri arasındaki farkların aritmetik ortalaması alınarak optik dansite değişimi ($\Delta E / t$) bulunur.

Enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\begin{aligned}
 \text{ALP aktivitesi (IU / L)} &= \frac{\Delta E}{t} \times \frac{1000 \times V}{\epsilon \times v} \times \text{seyreltme oranı} \\
 &= \frac{\Delta E}{t} \times \frac{1000 \times 2.1}{16.8 \times 0.1} \times \text{seyreltme oranı} \\
 &= \frac{\Delta E}{t} \times 1250 \times \text{seyreltme oranı}
 \end{aligned}$$

ΔE = Birim zamanda ölçülen O.D.' lerin aritmetik ortalaması.

ϵ = Molar absorpsiyon katsayısı.

V = Total hacim

v = Enzim ekstraktının hacmi.

1000 = milimol' ü mikromol' e çevirmek için gerekli katsayı.

$$\text{Total Aktivite (IU)} = \frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{Aktivite (IU / L)}}{1000}$$

$$\text{Total Protein (mg)} = \text{Hacim (ml)} \times \text{Protein (mg / ml)}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (IÜ / mg protein)} = \frac{\text{Total enzim aktivitesi}}{\text{Total protein aktivitesi}}$$

$$\text{Saflaştırma Oranı} = \frac{\text{n . basamağın spesifik aktivitesi}}{\text{Birinci basamağın spesifik aktivitesi}}$$

$$\text{Verim (\%)} = \frac{\text{n.basamağın total aktivitesi}}{\text{Birinci basamağın spesifik aktivitesi}} \times 100$$

3.2.1.3. : Total Protein Tayini :

Saflaştırmanın her basamağında alınan numunelerdeki protein tayini Lowry metodu kullanılarak yapıldı (9, 87).

Lowry metodunun prensibi : Proteinler ilk önce alkali ortamda bakırla reaksiyona girerler ve kompleks oluştururlar. Folin-Ciocateu (fosfotungustic-fosfomolibdik asit) reaktifi, bakır-protein kompleksine eklendiğinde, triptofan ve tirozin amino asitleri redüksiyon işlemine katılır. Daha az olarak da histidin ve sistein amino asitleri redüksiyon işlemine

yardımcı olur. İndirgenme sonucu oluşan rengin absorbansı 650-750 nm’de köre karşı okunur. Okunan optik dansiteye karşılık gelen “mg protein /ml“ değeri standart eğriden bulunduktan sonra aşağıdaki formülde yerine konularak “mg /ml” cinsinden protein miktarı belirlenir.

$$\text{Protein (mg/ml)} = \text{Standart eğriden okunan değer} \times \frac{\text{Standart hacmi}}{\text{Numune hacmi}} \times \text{Seyretme oranı}$$

3. 3. Saflaştırılan Enzimin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi :

3. 3. 1. Artan p-Nitrofenilfosfat Konsantrasyonu’ nun Enzim Aktivitesine Etkisi :

Deneydeki bütün faktörler sabit tutularak yalnızca p-NPP konsantrasyonu değiştirilmek suretiyle enzim aktivitesi ölçülmüştür. p-NPP’ın farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerini hazırlamak için önce 21 mM’lık p-NPP çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak 10,5 ve 4,2mM konsantrasyonlarında p-NPP çözeltileri elde edildi. Hazırlanan bu stok çözeltilerden Tablo 3.1 gösterildiği şekilde son konsantrasyonları 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0 ve 10.0 mM olan çözeltiler elde edildi. Daha sonra aynı tablodaki deney şemasına göre enzim aktivitesi ölçüldü. Elde edilen aktivite değerlerine göre Michaelis-Menten ve Lineweaver Burk grafikleri çizildi. Enzimin 25°C’de Glisin-Mg ⁺² tamponunda (pH 10.5) p-NPP için Km değeri hesaplandı.

3. 3. 2. Artan Enzim Miktarının Enzim Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi:

Deneydeki bütün faktörler sabit tutularak sadece ilave edilen enzim miktarını artırmak suretiyle, artan enzim miktarının enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Bunun için Tablo 3.2’de gösterilen deney şemasına göre çalışılmıştır.



3. 3. 3. Sıcaklığın Enzim Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi:

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi iki sıcaklık derecesinde incelendi. Tablo 3. 3 de gösterilen deney şemasına göre enzim aktivitesi ölçülmüştür. İlk olarak tüplere 0.1 ml. enzim çözeltisi konduktan sonra tüpler 56 °C’deki su banyosunda 5–10–15 –20–25–30 dakika bekletildi. Sürelerin sonunda tüpler su banyosundan çıkartılarak buz banyosuna kondu. Böylece sıcaklığın enzim üzerindeki etkisi durduruldu. Tüplerdeki enzim çözeltileri üzerine ikişer ml. çalışma çözeltisi ilave edilerek enzim aktivitesi ölçüldü.

İkinci sıcaklık uygulaması Tablo 3. 4’ de gösterilen deney şemasına göre 65 °C’de yapıldı. Tüpler aynı şekilde hazırlanarak 65 °C’deki su banyosunda bekletildi. Beşer dakikalık aralıklarla su banyosundan çıkartıldı ve buz banyosunda reaksiyon durduruldu. Üzerine ikişer ml. çalışma çözeltisi ilave edilip enzim aktivitesi ölçüldü.

3. 3. 4. PH’nın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi:

PH’nın enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için pH’ ları 8.4 ile 12.8 arasında değişen 0.1 M Glisin-Mg ⁺² tamponu hazırlanmıştır. Bu tamponlardan hazırlanan çalışma çözeltileri ile enzim aktivitesi ölçülmüştür.

3. 3. 5. Artan Fosfat Konsantrasyonun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi :

Enzim aktivitesi üzerine son ürün olan fosfatın etkisini incelemek için önce 1.31 g. “Sodyum dihidrojen fosfat” (NaH₂PO₄) tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 100 ml’ ye tamamlandı. Böylece 84 mM’ lık sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden bir hacim alınıp, üzerine üç hacim distile su ilave edilerek 21 mM konsantrasyonunda stok çözeltisi elde edildi. Hazırlanan bu stok çözeltileri uygun oranlarda seyreltilerek, son konsantrasyonları 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ve 20 mM olan çözeltiler elde edilmiştir. Substrat konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde sabit tutulmuştur. Daha sonra Tablo 3.5.’de gösterilen deney şemasına göre enzim aktivitesi ölçülmüştür.







3. 3. 6. Artan Tiyoüre Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi:

Artan tiyoüre konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek için önce 0.160 g. Tiyoüre (M.A. 76.12) alınıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 100 ml.'ye tamamlanarak 21mM konsantrasyonunda tiyoüre çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden iki hacim alınıp üzerine üç hacim distile sudan ilave edilerek 8,4 mM tiyoüre çözeltisi elde edildi. 21 mM 'lık çözeltiden bir hacim alınıp üzerine dört hacim distile su ekleyerek 4.2 mM'lık tiyoüre çözeltisi elde edildi. Konsantrasyonları 21, 8.4, 4.2 mM olan bu stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak, son konsantrasyonları 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.40, 1.80, 2.00, 3.00, 4.00 ve 5.00 mM olan çözeltiler elde edilmiştir. Substrat konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde sabit tutularak Tablo 3.6'da gösterilen deney şemasına göre enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

3. 3. 7. Artan L-Histidin Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi:

Artan L-histidin konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek için, 1.56 g. L-histidin (M.A.209.64) alınıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile suyla 50 ml'ye tamamlanarak 84 mM konsantrasyonunda L-Histidin çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiden bir hacim alınıp üzerine üç hacim distile su ilave edilerek 21 mM'lık L-histidin çözeltisi elde edildi. Hazırlanan 84 ve 21 mM'lık stok L-histidin çözeltilerinden uygun seyreltmeler yapılarak son konsantrasyonları 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ve 18 mM olan çözeltiler elde edilmiştir. Substrat konsantrasyonları 5 mM olacak şekilde sabit tutularak Tablo 3.7'de gösterilen deney şemasına göre artan L-Histidin konsantrasyonunun ALP aktivitesine etkisi incelenmiştir.



3. 3. 8. L-Histidin'in Artan p-NPP Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi:

Bir önceki deney sonucunda ALP inhibisyonu için en uygun L-Histidin konsantrasyonunun 5 mM olduğu bulunmuştur. Buna göre tüplerdeki L-Histidin konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde sabit tutularak Tablo 3.8'de gösterilen deney şeması hazırlanmış ve artan substrat konsantrasyonlarında sabit tutulan L-Histidin'in enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir.





4. DENEY SONUÇLARI :

4. 1. Koyun Karaciğerinden ALP'ın Saflaştırılması İle İlgili Deney Sonuçları :

ALP enziminin koyun karaciğerinden saflaştırılması işleminin her basamağında elde edilen total aktivite, total protein, spesifik aktivite, verim ve saflaştırma oranları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Saflaştırma işleminin son basamağı olan etanol-kloroform çöktürmesinden sonra elde edilen enzim ekstraktının total aktivitesi 216 IU, spesifik aktivitesi 0.843 IU/mg protein, verim % 10.33, saflaştırma oranı ise 18.326 olarak bulunmuştur.

4. 2. Saflaştırılan Enzimin Kinetik Özelliklerine Ait Deney Sonuçları :

4. 2. 1. Artan p-Nitrofenilfosfat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisi :

Artan p-NPP konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için, Tablo 3.1. deki deney şemasına göre 15 ayrı p-NPP konsantrasyonunda çalışılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Tablo 4. 2'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre çizilen Michaelis-Menten grafiği Şekil 4. 1'de görülmektedir. Lineweaver-Burk grafiğini çizmek için bu sonuçlar istatistiki olarak değerlendirildi. Bu değerlere göre elde edilen doğru denklemi $y = 35.16 + 11.07 x$, $r = 0.96$ olup buna ait grafik, şekil 4. 2' de verilmiştir.

p-Nitrofenilfosfat substratı için, enzimin 25 C°' de, pH 10.5' de, 0.1 M Glisin-Magnezyum tamponunda Km' si 0.31 olarak bulunmuştur.







4. 2. 2. Artan Enzim Miktarının Enzim Aktivitesine Etkisi :

Bölüm 3. 3. 2. ve Tablo 3. 2.'de anlatılan şekilde çalışıldı. İlave edilen enzim miktarı ve elde edilen enzimatik aktivite Tablo 4. 3 ve şekil 4. 3.'de görülmektedir. Enzim aktivitesi artan enzim miktarıyla doğru orantılı olarak artmıştır.

Tablo 4. 3. Artan Enzim Miktarının Enzim Aktivitesine Ait Sonuçlar.

İlave edilen enzim (ml)	$\Delta E / t$
0.000	0.000
0.025	0.007
0.050	0.014
0.075	0.021
0.100	0.027
0.120	0.033
0.150	0.041
0.200	0.054



4. 2.. 3. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi :

Bölüm 3.3.3.'de anlatılan şekilde enzim 56 °C ve 65 °C' lerde inkube edilerek aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.4 ve Şekil 4.4' de gösterilmiştir. 56 °C' de enzim aktivitesinin % 48.7' sini ilk 10 dakikada kaybettiği belirlendi.

Tablo 4. 4. Sıcaklığın (56 °C) Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Deney Sonuçları.

Süre (Dakika)	$\Delta E / t$	İnhibisyon (%)	Kalan Aktivite (%)
0	0.027	0.00	100
5	0.019	26.5	73.5
10	0.014	48.7	51.3
15	0.009	67.2	32.8
20	0.006	78.2	21.8
25	0.002	92.6	7.4
30	0.001	96.3	3.7

65 °C' de ise enzim beşinci dakikada aktivitesinin % 98' ini kaybetmiştir. Buna ait deney sonuçları tablo 4.5' de gösterilmiştir.

Tablo 4. 5. Sıcaklığın (65 °C) Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Deney Sonuçları.

Süre	$\Delta E / t$	Kalan Aktivite
(Dakika)		(%)
0	0.0280	100
5	0.0004	2
10	0.0002	1
15	0.0002	1
20	0.0002	1
25	0.0002	1
30	0.0002	1

4. 2. 4. pH' nın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi :

Bölüm 3.3.4.' de anlatıldığı gibi çalışılarak, farklı pH'lardaki 0.1 M Glisin-1mM Mg^{+2} tamponlarından hazırlanan çalışma çözeltileri kullanılarak enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. Deneylere ait sonuçlar Tablo 4. 6. ve Şekil 4. 5.' de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre enzimin optimal aktivite gösterdiği pH aralığı 10.0 – 11.0 arasında bulunmuştur.

Tablo 4. 6. pH' nın enzim aktivitesine etkisine ait deney sonuçları.

pH	$\Delta E / t$
8.4	0.0045
9.0	0.0120
9.4	0.0175
10.0	0.0220
10.4	0.0283
11.0	0.0245
11.4	0.0115
12.0	0.0065
12.8	0.0048



4. 2. 5. Artan Fosfat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisi :

Enzim aktivitesi üzerine son ürün olan fosfat'ın etkisini incelemek için Bölüm 3.3. 5.'de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Deney sonuçları Tablo 4.7. ve Şekil 4.6.'da gösterilmiştir. Fosfat konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesi azalmıştır. 18 mM' da enzim aktivitesinin % 85.7' sini kaybetmiştir.

Tablo 4. 7. Artan Fosfat Konsantrasyonun Enzim Aktivitesine Etkisi.

Tüp No	NaH ₂ PO ₄ (mM)	$\Delta E / t$	İnhibisyon (%)	Kalan Aktivite (%)
1	0.0	0.0280	0.0	100
2	1.0	0.0270	3.6	96.4
3	2.0	0.0245	12.5	87.5
4	3.0	0.0227	19.0	81.0
5	4.0	0.0215	20.7	76,7
6	5.0	0.0203	27,5	72,5
7	6.0	0.0182	35.0	65.0
8	8.0	0.0145	48.2	51.8
9	10.0	0.0117	58.2	41.8
10	12.0	0.0100	64.3	35.7
11	14.0	0.0082	70.7	29.3
12	16.0	0.0070	75.0	25.0
13	18.0	0.0040	85.7	14.3
14	20.0	0.0040	85.7	14.3

4. 2. 6. Artan tiyoüre Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi :

Tiyoüre' nin artan konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisini incelemek için Bölüm 3. 3. 6. ve Tablo 3. 4.' de anlatıldığı gibi farklı konsantrasyonlarda tiyoüre çözeltileri hazırlayarak enzim aktiviteleri ölçüldü. Bu deneye ait sonuçlar Tablo 4.8. ve Şekil 4.7.de verilmiştir. Tiyoüre' nin enzim aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 4. 8. Artan Tiyoüre Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisi.

Tiyoüre (mM)	$\Delta E / t$
0.0	0.0290
0.2	0.0285
0.4	0.0290
0.6	0.0290
1.0	0.0295
1.4	0.0285
1.8	0.0290
2.0	0.0285
3.0	0.0285
4.0	0.0290
5.0	0.0285

4. 2. 7. Artan L-Histidin Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisi :

L- Histidinin artan konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için Bölüm 3.3.8. ve Tablo 3. 6.' de gösterildiği şekilde farklı konsantrasyonlarda L-Histidin çözeltileri hazırlanarak ALP aktivitesi ölçüldü. Artan L-Histidin konsantrasyonunun enzim aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur. Bu deneye ait yüzde inhibisyon sonuçları Tablo 4. 9' da gösterilmiştir. Bu sonuçlara ait grafikler Şekil 4. 8. ile Şekil 4. 9' da gösterilmiştir.

Tablo 4. 9. Artan L- Histidin konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi.

L-Histidinin Konsantrasyonu (mM)	E / t	Kalan Aktivite	% İnhibisyon
0,0	0,0277	100	0,0
0,5	0,0257	92,8	7,2
1	0,0255	92,0	8,0
2	0,0225	81,2	8,8
3	0,0212	76,5	23,5
4	0,0150	54,1	45,9
6	0,0100	36,1	63,9
8	0,0080	28,9	71,1
10	0,0060	21,7	78,3
12	0,0050	18,0	82,0
14	0,0047	17,0	83,0
18	0,0030	10,1	89,9



4. 2. 8. L-Histidinin, Artan p-NPP konsantrasyonunda enzim aktivitesi üzerine etkisi:

Sabit tutulan L-Histidin (5 mM) konsantrasyonunun, artan substrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesine etkisini incelemek için, Bölüm 3. 3. 8. ve Tablo 3. 6.'de gösterildiği şekilde çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4. 10.' de görülmektedir. Bu sonuçlara göre çizilen Michealis-Menten grafiği Şekil 4. 10.' de görülmektedir. Lineweaver-Burk grafiğini çizmek için, sonuçlar bilgisayarda SPSS programındaki regresyon analizi ile, istatistiki olarak değerlendirildi. Bu değerlere göre elde edilen inhibitörlü doğru denklemi $y = 41.81 + 11.56 x$ ve $r = 0.99$ olarak bulunmuştur. Elde edilen doğru denklemine göre çizilen Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4. 11.' de görülmektedir.

	Doğru Denklemi	Km
Effektörsüz	$y = 35.16 + 11.07 x$	0.31
L-Histidinli	$y = 41.81 + 11.56 x$	0.27





5. TARTIŞMA .

Alkali fosfataz, bir çok hastalığın belirlenmesinde önemli bir indikatör enzim olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle serum ALP aktivitesi artışının hangi dokudan kaynaklandığını belirlemek için enzim, bugüne kadar bir çok araştırmacı tarafından farklı canlı türlerinin organ ve dokularından saflaştırılarak, fizikokimyasal ve kinetik özellikleri incelenmiştir (9, 19, 24, 31, 49, 72, 85).

Bu çalışmada, alkali fosfataz enzimi koyun karaciğerinden kısmen saflaştırılarak bazı fizikokimyasal ve kinetik özellikleri araştırılmıştır. Alkali fosfatazı saflaştırmak için Latner ve Hudson' un, insan karaciğerinden ALP enzimini saflaştırmak için uyguladıkları metodu kısmen modifiye ederek kullandık (49). Saflaştırma işleminin her aşamasında ve daha sonraki kinetik deneylerde enzim aktivitesi, Bessey-Lowry-Brock' un alkali fosfataz tayin metoduna göre ölçülmüştür (11, 88). Bu metotta enzim substratı olarak p-Nitrofenilfosfat kullanılmaktadır. P-NPP, ALP' a çok yüksek affinite göstermektedir. Bu nedenle ALP tayini için en sık kullanılan substrattır (16, 85). Protein tayini Lowry metodu kullanılarak yapılmıştır (9, 88).

Karaciğer ALP' ının fizikokimyasal ve kinetik özelliklerine ait bilgilere literatürde çok az rastladık. Bunlardan, Ohkubo ve arkadaşları (61) sıçan karaciğerinden alkali fosfatazın saflaştırılmasında homojenat süzütüsünde spesifik aktiviteyi 0,03 ünite / mg protein, butanol ekstraktında ise 0,1 ünite / mg protein olarak bulmuşlardır. Latner ve Hudson (49), insan karaciğerinden alkali fosfataz saflaştırılmasında butanol ekstraktında spesifik aktiviteyi 0,12 ünite / mg protein, asetonla çöktürmeden sonra 0,8 ünite / mg protein, son kademedede ise 2,9 ünite / mg protein olarak bulmuşlardır. Türköz ve Üstdal, sığır karaciğerinden alkali fosfataz saflaştırmasında spesifik aktiviteyi, homojenatta 0,025 ünite / mg protein, butanol ekstraktında 0,089 ünite / mg protein, asetonla çöktürmeden sonra 0,161 ünite / mg protein ve son basamak da ise 0,356 ünite / mg protein olarak bulmuşlardır (83). Biz yaptığımız enzim saflaştırma işlemi basamaklarında spesifik aktiviteyi, homojenatta 0,046 ünite / mg protein, butanol ekstraktında 0,225 ünite / mg protein, asetonla çöktürmeden sonra 0,607 ünite / mg protein, son kademe olan etanol-kloroform çöktürmesinden sonra ise 0,843 ünite / mg protein olarak bulduk. (Tablo 4. 1.)

Kimyasal efektörlerin enzimler üzerine etkisinin net olarak belirlenmesi için, saflaştırma sonucu elde edilen numunedeki aktivite düzeyinin, enzimin serum aktivite düzeyinden en az on kat fazla olması gereklidir (10). Biz de çalışmamızda enzimin fizikokimyasal özelliklerini incelerken oldukça yeterli olan bir aktivite düzeyine ve saflaştırma oranına ulaştık.

Saflaştırılan enzimin kinetik özelliklerinin araştırılmasında önce değişik substrat konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Enzimin 10 mM p-NPP konsantrasyonuna kadar Michaelis-Menten kinetiğine uygun davrandığı saptandı. Elde ettiğimiz sonuçları istatistiki olarak değerlendirdik. Buna göre 25 °C’ de, pH 10.5’ de, 0.1 M Glisin- Magnezyum tamponunda, p-Nitrofenilfosfat substratına karşı Km değerini 0.31 mM olarak hesapladık. Ohkubo ve arkadaşları sıçan karaciğerinden saflaştırdıkları ALP için Km değerini 0.5 mM olarak tespit etmişlerdir (61). Latner ve Hudson insan karaciğerinden saflaştırdıkları enzimin 25 °C’ de, pH 10.5’ de, 2 Amino- Methyl Propan-1-ol-HCl tamponunda, p-NPP substratı için Km değerini 0,5 mM olarak tespit etmişlerdir (49). Sarconi ve arkadaşları merinos koyununun karaciğerinden saflaştırdıkları alkali fosfatazın p-NPP substratı için Km değerini 0.5 ± 0.2 mM olarak tespit etmişlerdir (69). Türköz ise sığır karaciğerinden saflaştırdığı alkali fosfatazın, 25 °C’ de, , 0.1 M Glisin- Magnezyum tamponunda (pH 10.5) p-NPP substratına karşı Km değerini 1.1 mM olarak tespit etmiştir (83). V_{max} ve Km değerleri, enzim ekstraktının saflık derecesinden, aktivite tayininde kullanılan enzimin konsantrasyonundan, tamponun cinsi ile pH’ sından, metal aktivatörün cinsi ile konsantrasyonundan ve çalışma şartlarından etkilenmektedir. Bu nedenle ALP için literatürdeki kinetik çalışmaların sonuçlarını birbirleri ile kıyaslamak çok zordur. Biz yaptığımız çalışmada bulduğumuz Km değerinin, diğer araştırmacıların değerlerine yakınlık gösterdiğini tespit ettik. Aradaki fark yukarıda anlatılan sebeplerden kaynaklanabilir.

Yaptığımız çalışmada, koyun karaciğer alkali fosfatazının maksimum aktivite gösterdiği substrat konsantrasyonunun, alt sınırını 2 mM olarak bulduk. Biz de çalışmamızda enzim, fosfat, tiyoüre, L-histidinin artan miktarlarının, enzim aktivitesi üzerine etkilerini incelerken, tüplerdeki p-NPP’ ın son konsantrasyonunu oldukça yeterli olan 5 mM olacak şekilde ayarladık.

Enzim konsantrasyonunu artırıp, diğer bütün faktörleri sabit tuttuğumuz zaman enzim aktivitesinin, enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığını tespit ettik .(Şekil 4. 3.) Bu bulgumuz diğer araştırmacıların bulgularına uymaktadır (32, 83, 85).

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek için, 56 °C ve 65 °C’ lerde enzim inkübe edilerek aktivite ölçümleri yapılmıştır. Koyun karaciğerinden elde ettiğimiz alkali fosfatazın 56 °C’ de zamanla aktivitesinin azaldığını, bu aktivite kaybının 5. dakikada % 26.5, 10. dakikada % 48.7 olduğunu ve 30. dakikada aktivitesinin % 96.5 ini kaybettiğini tespit ettik (Şekil 4. 4.). 65 °C’ de yaptığımız çalışmada ise enzimin ilk beş dakikada aktivitesinin % 98’ ini kaybettiğini tespit ettik (Tablo 4. 5.). Elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki bilgilerle uyumludur (3, 16, 32, 49, 57, 63, 85).

Karaciğerden kısmen saflaştırdığımız ALP’ ın optimum pH’ sını bulmak için değişik pH’ larda 0.1 M Glisin-Magnezyum tamponları hazırlayarak enzimin aktivite tayini yapıldı. Enzimin pH 10 – 11 arasında, özellikle de pH 10.4’ de maksimum aktivite gösterdiği tespit edildi. (Tablo 4. 6. ve Şekil 4. 5.) Bulduğumuz sonuçların literatürdeki bilgilerle uyum sağladığı tespit edildi. Komada ve arkadaşları insan karaciğerinden saflaştırdıkları enzim için maksimum aktiviteyi pH 10.2’ de (47), Türköz, sığır karaciğerinden elde ettiği enzimin maksimum aktivitesini pH 10.4’ de tespit etmişlerdir (83). Ohkubo ve arkadaşları sıçan karaciğerinden saflaştırdıkları enzim için maksimum aktiviteyi pH 10.2 olarak tespit etmişlerdir (61).

Artan fosfat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi neticesinde, fosfat konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. 18 M fosfat konsantrasyonunda, enzim aktivitesinin % 85.7’ sini kaybetmiştir (Tablo 4.7. ve Şekil 4.6.). Bulduğumuz sonuç literatürle uyum içerisindedir. Kay, son ürün olan fosfatın enzim aktivitesini inhibe ettiğini ilk olarak belirlemiştir. Daha sonra bir çok araştırmacı, fosfatın enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. p-NPP’ ın alkali fosfataz tarafından hidrolitik olarak parçalanması neticesinde açığa çıkan son ürün olan fosfatın, kompetitif inhibitör olduğu bildirilmiştir (16, 20, 25, 28, 49, 57, 63, 85).

Tiroid bezinden tiroid hormonlarının salgılanmasının kontrol dışı ve fazla miktarlarda olmasıyla karakterize bir hastalık olan Hipertroidi’ de serum alkali fosfatazının, özellikle de kemik ve karaciğer izoformlarının aktivite artışı öteden beri bilinmektedir (85).

Tibi tarafından yapılan bir araştırmada; hipertroidili hasta grubunda bulunan kişilerin, total, karaciğer ve kemik ALP' ları, tedavi görmüş hipertroidliler ve sağlıklı kontrol grubundaki kişilere göre oldukça yüksek bulunmuştur (82). Hipertroidizmde fazlalığı görülen iyot, ALP' ın yapısında bulunan fenol-hidroksil gruplarını iyotlayarak, enzimi inhibe etmektedir. Hipertroidli hastalarda tedavi amaçlı olarak Tiyoüre (Tiyokarbamid olarak da bilinir) ve bunun türevleri olan Tiyoürasil, Propil Tiyoürasil (PTU), Karbimazol ve Metimazol verilmektedir. Antihipertroid olarak kullanılan tiyoüre türevi bu ilaçların etki mekanizması, tiroid hücresine giren iyodürün iyoda oksidasyonunu katalizleyen peroksidazları inhibe etmek, böylece tirozine bağlanmasını engellemek şeklindedir. Dolayısıyla iyodun tiroid bezi içerisinde tiroglobulin haline dönüşümünü baskılayarak organın fazla hormon salgılamasını (T_3 , T_4) engellemektedir (14). Tiyoüre, bir diğer etkisini de plazmada T_4 ' ün T_3 ' e dönüşümünü engelleyerek gösterir. Tiyoüre türevi ilaçlar hipertroidide antitroid ajan olarak kullanılmasının yanı sıra, anjina pectoris ve kalp yetmezliklerinde' de kullanılmaktadır. Son yıllarda bir tiyoüre türevi olan metamizol' ün Graves hastalığında ve deneysel hipertroidi de immunsupresif etkisi gösterilmiştir.

Yukarıda da anlatıldığı gibi tiyoüre ile ALP aktivitesi arasında dolaylı bir ilişki vardır. Bu nedenle biz çalışmamızda ALP aktivitesi üzerine, tiyoüre' nin etkisinin olup olmadığını araştırdık. Tiyoüre' nin artan konsantrasyonlarının alkali fosfataz aktivitesine etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3. 3. 6 ve Tablo 3. 6' da gösterildiği şekilde, 0.2 ile 5 mM konsantrasyonları arasında tiyoüre çözeltileri hazırlandı. Tiyoüre' nin 5 mM konsantrasyona kadar olan derişiminin, enzim aktivitesi üzerine etki etmediğini tespit ettik. Tiyoüre ile alkali fosfataz arasında direkt bir ilişki olmadığı sonucuna vardık. Literatürde tiyoüre' nin alkali fosfataz aktivitesine olan etkileri ile ilgili bir araştırmaya rastlayamadığımız için, sonuçlarımızı bizimkilerle karşılaştıramadık. Elde ettiğimiz sonuçlar Tablo 4. 8 ve Şekil 4. 7.' de verilmiştir.

Albumin içerdiği L-Histidin amino asitlerinin yapısında bulunan imidazol grupları yardımıyla, plazmanın non-bikarbonat tampon sisteminde önemli bir görev almaktadır. Histidinemi, histidaz enzim eksikliği sonucu serumda histidin birikimi ve idrarda da imidazol, pirüvik asit ile diğer histidin metabolitleri görülmesiyle karakterize bir hastalıktır. Biz de bu öneminden ötürü, L-Histidin' in artan konsantrasyonlarının alkali fosfataz aktivitesi üzerine etkisini, Bölüm 3. 3. 7. ve tablo 3. 7.' de anlatıldığı şekilde inceledik. L-histidin' in artan

konsantrasyonları ile alkali fosfataz aktivitesi arasında, ters orantılı bir ilişki bulunduğunu belirledik. Elde ettiğimiz sonuçlar Şekil 4. 8. ve Tablo 4. 9.' da gösterilmiştir. Deney sonuçlarına göre L-Histidinin, 3 mM konsantrasyonda enzimi % 23.5, 6 mM konsantrasyonda % 63.9, 18 mM konsantrasyonda ise enzimi % 89.9 oranında inhibe ettiği görülmektedir. Litaratürde amino asitlerin L formlarının, ALP aktivitesini inhibe ettiğine dair bir çok bilgi mevcuttur (3, 15, 19, 27, 52, 58, 73, 83, 84). Bu bakımdan elde ettiğimiz aktivite değerleri literatürle uyum içindedir. Fakat L-Histidin ile yapılmış bir çalışmaya rastlayamadığımız için yüzde inhibisyon ve kalan aktivite cinsinden sonuçlarımızı karşılaştıramadık.

Artan p-NPP konsantrasyonlarında, sabit konsantrasyonda tutulan (5 mM) L-Histidin'in enzim aktivitesine etkisi incelendi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre çizilen Michaelis-Menten grafiğinden, inhibitörsüz grafiğe göre, enzim aktivitesinde azalma meydana geldiği tespit edildi (Şekil. 4. 10). Lineweaver-Burk grafiğini çizmek ve İnhibisyon tipini belirlemek için elde ettiğimiz değerleri regresyon analizi uygulayarak istatistiki olarak değerlendirdik. Km değerlerini hesapladık. Sonuçta elde ettiğimiz doğru denklemlerine göre çizilen Lineweaver-Burk grafiği, inhibisyon tipinin unkompetitif olduğunu göstermektedir. (Şekil 4. 11)

Alkali fosfataz koyun karaciğerinden izole edilip kısmen saflaştırılarak bazı fizikokimyasal ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Enzimin yukarıda incelenen özellikleri bakımından, bilinen karaciğer izoenzimi karakterinde olduğu görülmüştür.

6. ÖZET .

Bu çalışmada alkali fosfataz enzimi koyun karaciğerinden kısmen saflaştırılarak kinetik ve fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Koyun karaciğerinden 18.32 kat saflaştırılmış enzimin spesifik aktivitesi 0.843 İU/mg protein olarak bulundu. Saflaştırma işlemleri, homojenizasyon, N-Butanol ekstraksiyonu, aseton ve etanol-kloroformla çöktürme basamaklarını içermektedir.

Kısmen saflaştırılan enzimin 25° C’ de, 0.1 mM Glisin-Magnezyum tamponunda (pH 10.5), p-Nitrofenilfosfat substratına karşı Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek Km değeri 0,31 olarak hesaplandı. Daha sonra sıcaklık, pH, L-Histidin, Tiyoüre ve Fosfat’ ın enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı.

Enzimin 56 °C de zamanla aktivitesinin azaldığı ve 30 dakika sonunda aktivitesinin % 96.5’ ini kaybettiği gözlemlendi. 65 °C sıcaklıkta ise ilk 5 dakikada aktivitenin hemen hemen tamamının kaybedildiği gözlenmiştir. Enzimin p-NPP için optimum pH’ sı 10.4 olarak bulunmuştur.

Son ürün olan fosfatın enzimi inhibe ettiği, L-Histidin’in unkompetitif inhibisyona yol açtığı gözlenmiştir. Tiyoüre nin ise enzim aktivitesi üzerine hiçbir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

7. SUMMARY.

In this study, alkaline phosphatase enzyme was partially purified from sheep liver and its physicochemical and kinetic properties were investigated.

The specific activity of enzyme purified 18.32 fold as much as that of sheep liver was found to be 0.843 IU / mg protein. Purification procedures include homogenization, N-Butanol extraction, acetone and precipitation stages with ethanol-chloroform.

In a medium of 25 °C and pH 10.5, Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk graphics of the partially purified enzyme placed in 0.1 mM Glycine-Magnesium buffer against p-Nitrophenylphosphate substrate were drawn up, and K_m value was calculated as 0.31. Later, the effect of temperature, pH, L-Histidine, Thiourea and phosphate on enzyme activity was investigated.

It was observed that the activity of enzyme decreased with time at 56 °C, and that 96.5 % of this activity disappeared at the end of 30 minutes. At 65 °C, however, almost all of the activity was noticed to disappear in the first 5 minutes. The optimum pH of enzyme was determined to be 10.4 for p-NPP.

The last product phosphate was observed to inhibit enzyme, and L-Histidine was determined to lead to un-competitive inhibition. It was identified that thiourea had no effect on enzyme activity.

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim ve tez çalışmalarım esnasında yakın ilgi ve desteklerini esirgemeyen tez danışmanım ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nuriye METE' ye, Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın. Prof.Dr. Belkıs AYDINOL' a, Sayın Doç. Dr. Abdurrahman KAPLAN' a, Anabilim Dalının tüm öğretim üyesi sayın hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma, tezimin hazırlanmasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm A. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı GÖKHUN' a ve bana her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan ailem teşekkürü borç bilirim.

Saygılarımla

Beran YOKUŞ

Diyarbakır 1999

7. KAYNAKLAR

- 1- ACKERMAN B.P.: Kinetics of alkaline phosphatase from pig kidney. *Biochem. J.* 153: 151. 1976.
- 2- ALPERS D.H., ELIAKIM R., DESCHRYVER K.: Secretion of hepatic and intestinal alkaline phosphatases: similarities and differences. *Clin. Chim. Acta*, 186: 211-224, 1989.
- 3- ANDERSON C.A., COCKAYNE S.: *Clinical chemistry/ Concepts and applications*. W.B. Saunders Co. 260-5. 1993.
- 4- BAMFORD K.F. et al.: Serum alkaline phosphatase and the ABO blood groups. *Lancet*. 1: 530, 1967.
- 5- BEERTSEN W., Van den BOS, T.: Calcification of dental collagen by cultured rabbit periosteum: the role of Alkaline phosphatase. *Matrix*, 8: 159-71, 1989.
- 6- BEERTSEN W., Van den BOS T.: Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat. *J. Clin. Invest*, 89: 1974-1990, 1992.
- 7- BENTOUATI L., SAMADI M.B., HACHEM H., et al.: Hyperphosphatasemia related to three intestinal alkaline phosphatase isoforms: Biochemical study. *Clin. Chem. Acta*, 189:145-152, 1990.
- 8- BERGER J., GARRATINI E., HUA J.C., et al.: Cloning and sequencing of human intestinal alkaline phosphatase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 695-8. 1987.
- 9- BERGMAYER H.U.: *Methoden Der Enzymatischen Analyse*. Band 1. Verlag Chemie. Weinheim. 1974.
- 10- BERNARD J.H.: *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 19. th ed. W.B. Saunders Co. Pp.277-281. 1996.
- 11- BIRNS M., MASEK B., AUERBACH O.: The effects of experimental acute biliary obstruction and release on the rat liver. *Am. J. Pathol.*, 40: 95-11. 1962.
- 12- BODANSKY A.: Phosphatase studies VI non osseous origin of serum phosphatase. Its increase after ingestion of carbohydrates. *J. Biol. Chemistry*. 104, 473. 1934.

- 13- BOWERS G.N., Jr., McCOMB R.: A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. Clin. Chem., 12: 70-89, 1966.
- 14- BUDDECKE E.: Grundriss Der Biochemie, Walter de Gruyter. Berlin. Newyork. 9. ed. pp 322, 1994.
- 15- CALBREATH F.D.: Clinical chemistry a fundamentel texbook. W:B. Saunders Co. 186-90. 1992.
- 16- CARL A.B., EDWARD R.A. :Tietz textbook of clinical chemistry. 2 th ed., W.B. Saunders Co.,pp.830-844, 1994.
- 17- CIANCAGLANI P., PIZAVRO J.M., LEONE F.A.: Polyoxyethylene 9- lauryl ether – solubilized alkaline phosphatase: Synergistic stimulation by zinc and magnesium ions. Int. J. Biochem. 24 (4): 611-5. 1992.
- 18- CLEEVE H.J.W., TUA D.C.: Studies of the regan alkaline phosphatase isoenzyme in plasma from a lung carsinoma patients. Clin. Chem. 29/4: 715-17, 1983.
- 19- COLEMAN J.E.,In phosphate metabobolism and cellular regulation in microorganisms, Am.Soc.Microbiol. Washington D.C. pp. 127-38, 1987.
- 20- COLEMAN J.E.,. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. Annu. Rev.Biophys. Biomol. Struct ; 21: 441-83, 1992.
- 21-COPELAND W.H., NEALON D.A., REJ A.: Effects of temparature on measurement of alkaline phosphatase activity. Clin. Chem. Feb; 31 (2): 185-90, 1985.
- 22- DAWN B.M.,ALLAN D.M, COLLEEN M.S.: Basic medical biochemistry a clinical aproach, Williams&Wilkins Campany, 584-85, 1996.
- 23- EMERY A.J., DOUNCE A.L.:Intracellular distribution of alkaline phosphatase in rat lever cell. J. Biophys. Biochem. Cytol, 1:315, 1955.
- 24- ENGSTROM L.: The aminoacid sequence around the reactivexerin in calf intestinal alkaline phosphatase. Biochim. Biophy. Acta. 92: 78, 1964.
- 25- FERNLEY H.N.,Mammalian alkaline phosphatase. In: Boyer D, ed. The Enzyme. Vol IV. New York: Acedemic Press, 417-447. 1971.

- 26- FISHMAN W.H., INGILS N.R., GREEN S., et.al.: Immunology and biochemistry of Regan izoenzyme of alkaline phosphatase in human cancer. *Nature*, 219: 697-699, 1968.
- 27- FISHMAN W.H., LIN C.W.: Membrane phosphohydrolases, metabolic conjugation and metabolic hydrolysis. New York Academic Press, p 397-98, 1973.
- 28- FISHMAN W.H., Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *Am. J. Med.*, 56:617-50, 1974.
- 29- FISHMAN W.H.: Alkaline phosphatase isoenzymes: recent progress, *Clin. Biochim*, Vol.23. pp. 99-104, 1990.
- 30- GAREN A., LEVINTHAL C. A fine structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of E.Coli I. Purification and characterization of alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 38: 470-483, 1960.
- 31- GHOSH N.K., et al.: Purification and properties of molecular weight variants of human placental alkaline phosphatase. *Biochem. J.* 108: 779-83, 1968.
- 32- GÖKHUN İ.H.: Sıçan karaciğer ve böbrek alkali fosfatazları üzerine metil ve etil parathionun tesirleri. Doktora Tezi. Ankara . 1975.
- 33- GÜLTEPE M., BÜLBÜL M.: Quantitative determinations of alkaline phosphatase isoenzymes by chemical inactivation and it's application to automation. *Tr. J. of Medical Sciences*, 18(1): 23-9, 1993.
- 34- HARKNESS D.R.: Studies on human placental alkaline phosphatase purification and crystallization. *Arch Biochim. Biophys*, 126:503-12. 1968.
- 35- HARRIS H.: The human alkaline phosphatase: What we know and what we don't know. *Clin.Chim. Acta*. 186: 133-150, 1989.
- 36- HIGASHINI K., KUDI S., YAMAMURA Y.: Further investigation of a variant of the placental alkaline phosphatase in human hepatic carcinoma. *Cancer Res*, 34: 3347-3351, 1974.
- 37- HIGASHINI K., OHTANI R., KUDO S. Et.al.: Hepatocellular carcinoma and a variant alkaline phosphatase. *Ann Intern Med*, 83: 74-78, 1975.
- 38- HIRANO K., KOYAMA I., STIGBRAND T.: Purification and partial characterization of the placental-like alkaline phosphatase in human lung tissue. *Clin. Chim. Acta*, 186: 265-276, 1989.

- 39- JENSEN MH.: Dephosphorylation of purine mononucleotides by alkaline phosphatases substrat specifity and inhibition patterns, *Biochim. Biophys Acta*, 9; 571 (1): 55-62, 1979.
- 40- JUNG K., PERGANDE M., EGGER E.: Stability of isoenzymes of alkaline phosphatase in various buffer systems, *Enzyme* ; 24 (1) : 18-22, 1979.
- 41- KAPLAN M.M. : Alkaline phosphatase: Progress in hepatology. *Gastroenterology*, 62: 452-468, 1972.
- 42- KAPLAN L.A., PESCE A. J., *Clinical chemistry theory, analysis and correlation*. Third edition. Baltimore, Boston, Chicago, New York, London, Madrid, Singapure, Tokyo, Toronto, Mosby. 514-5. 1996.
- 43- KIM E.E., WYCKOFF H.W.: Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. *J. Mol. Biol*, 218, 449-464. 1991.
- 44- KING J.: *Pratical Clinical Enzymology*. D. Van Nostrand Company. 191, 1965.
- 45- KLUMP S., SCHULTZ J.E.: Alkaline phosphatase from pramercium cilia and cell bodies. Purification and characterization. *Biochem. Biophys. Acta*, 1037 (2): 233-9. 1990.
- 46- KOMADO T., KUEGAWA M., YAJIMA T.: Induction of rat hepatic and intestinal Alkaline phosphatase activity by biliary from bile duct-ligated animals. *Am. J. Physiol.*, 246: G394-400, 1984.
- 47- KOMADO T. : Pratical purification and some properties of human liver alkaline phosphatase. *Biochim. Bioph. Acta*. 438:138, 1976.
- 48- LABOW B.I., HERSCHLAG D., JENCKS W.P.: Catalysis of the hydrolysis of the phosphorylated pyridines by alkaline phosphatase has little or no dependence on the pKa of leaving group, *Biochemistry*, 32, 8737-8741, 1993.
- 49- LATNER A.L., HUDSON A.W.: Human liver Alkaline phosphatase purified by affinity chromatography, ultracentrifügation. *Biochem. J*. 159: 697-99, 1976.
- 50- LU Y, et al,: Diagnosis of primary liver cancer using lectin affinity chromatography of serum alkaline phosphatase, *J.Exp. Clin. Cancer Res*, Mar; 16 (1): 75-80, 1997.
- 51- MAKITA T., SANDBORN E.: The ultrastructural localization of adenosinetriphosphate and alkaline phosphatase activity in eosinofil leukocytes. *Histochemie*, 24: 99, 1970.
- 52- McCOMB R.B., BOWERS G.N., POSEN J.: *Alkaline phosphatase*. New York.Plenum Press, 1979.

- 53- MERSOL J.V., STEEL D.G., GAFHÍ A.: Detection of intermediate protein conformation by room temperature tryptophan phosphorescence spectroscopy during denaturation of E.Coli alkaline phosphatase. *Biophys. Chem.* 48 (2): 281- 91. 1993.
- 54- MEYER R.E., THOMPSON S.J., et al.: Maternal serum placental alkaline phosphatase level and risk for preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*, 173, 181-186, 1995.
- 55- MILLAN J.L.: Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* 261: 3112-5. 1986.
- 56- MOSS D. W., et al.: Association of inorganic pyrophosphatase preparations. *Biochem. J.* 102: 53, 1967.
- 57- MOSS D. W. : Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin.Chem.* 28/10, 2007. 1982.
- 58- MOSS D.W., EDWARDS R.K.: Improved electrophoretic resolution of bone and liver ALP resulting from partial digestion with neuroaminidase. *Clin. Chem. Acta.*, 143:177, 1984.
- 59- MOSS D.W.: Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin. Chem*, 38: 2486-2492, 1992.
- 60- MURPHY J. E., XU XU, KANTROWITZ E.R.: Conversion of a magnesium binding site into a zinc binding site by a single amino acid substitution in E. Coli alkaline phosphatase. *The J. of Biological Chemistry*, 268, 29 :21497-21500, 1993.
- 61- OHKUBO A., LANGERMAN N., KAPLAN M.M.: Rat alkaline phosphatase purification and properties. *J. Biol. Chem.* 249 (22): 7174-80, 1974.
- 62- PLOCKE D.J., LEVINTHAL C., VALEE B.L.: Interaction of alkaline phosphatase of E.Coli with metal ions and chelating agents. *Biochemistry* 1:373-78. 1962.
- 63- POSEN S., et al.: Inactivation in the study of human alkaline phosphatase. *Ann. Int. Med.* 62: 1233, 1965.
- 64- ROBERTS W. M.: Variations in the phosphatase activity of blood in disease. *Br. J. Exp.Pathol.*, 11, 90-95, 1930.
- 65- ROBISON R.: The possible significance of hexozophosphoric esters in ossification in vitro. *Biochem J.*, 17:286-93. 1923.
- 66- ROCHE J.: Blood phosphatasases. *Biochem J.* 25: 1724. 1931.

- 67- SAKHAROW I., MAKASOVA I., ERMOLIN G. A., Purification and characterization of intestinal alkaline phosphatase from harp seal. *Comp. Biochem Physiol.*; 90 (4) : 709-14. 1988.
- 68- SANDBORN E.B., MAKITA T.: The effect of dimethyl sulfoxide on aldehyde fixation and localization of alkaline phosphatase activity in tissues. *J. Cell Biol*; 43:121. 1969.
- 69- SARCONI M.E., HAMAOU W., AZIAR G., et al.: Alkaline phosphatase from *Echinococcus multilocularis*: purification and characterization, *Comp. Biochem.* 100: 2; 253-258, 1991.
- 70- SHAN Y., McKELVIE I.D., HEART B.T., Characterization of immobilised *E.Coli* alkaline phosphatase reactors in flow injection analysis. *Anal. Chem.* 65 (21): 3053-60. 1993.
- 71- SIMPSON R.T., VALEE B.L., et al.: Alkaline phosphatase of *E.Coli* composition. *Biochem*, 7: 4336, 1968.
- 72- SIMONOPOULOS T., JENCKS W.: Alkaline phosphatase is an almost perfect enzyme. *Biochemistry*, 33: 10375-80. 1994.
- 73- SMITH M., WEISS W. J., GRIFFIN C.A. et al.: Regional assignment of the gene for liver/bone/kidney alkaline phosphatase to chromosome 1p36.1- p34. *Genomics*, 2: 139-43, 1988.
- 74- SOLOMON P.: Alkaline phosphatase. *Ann Int Med*, 67: 183-203, 1967.
- 75- STADMAN T.C.: The enzymes. Ed. P. Boyer, V, 55-71, 1961.
- 76- STINSON R.A.: Kinetic parameters for the cleaved substrate and enzyme and substrate stability, vary with the phosphoacceptor in alkaline phosphatase catalyses, *Clin. Chem.* ; 39 : 2293-7, 1993.
- 77- SUSMANN H.H., ET AL.: Human alkaline phosphatase immunochemical identification of organ-specific isoenzymes. *J. Biol. Chem.* 243:160, 1968.
- 78- SWALLOW D.M., POVEY S., et al.: Mapping of the gene coding for the human liver/bone/kidney isoenzyme of alkaline phosphatase to chromosome 1., *Ann.Hum. Genetic*, 50:229-35. 1986.
- 79- TAKEYA M., KLIER F.G., FISHMAN WH.: Molecular dimensions of the SS and FF phenotypes of human placental alkaline phosphatase: rotary shadowing and negative staining electron microscope measurement *J. Mol.Biol.* 173: 253-64, 1984.

- 80- TERAÖ M., STUDER M., GIANNI M.: Isolation and characterization of the mouse liver/bone/kidney- type alkaline phosphatase. *Biochem. J. London*, 268: 3, 641-648, 1991.
- 81- TIMPERLEY, W.R.: Alkaline phosphatase secreting tumour of lung. *The Lancet* 10:356, 1968.
- 82- TIBI L., PATRICK A.W., LESLIE P., et al.: Alkaline phosphatase isoenzymes in plasma in hyperthyroidism., *Clin. Chem.* ; 35 (7): 1427-30, 1989.
- 83- TURKOZ, Y., USTDAL, M. : Sığır karaciğer alkali fosfatazının saflaştırılması, fizikokimyasal ve kinetik özelliklerinin araştırılması, *Optimal Tıp Dergisi*, 7 (1): 31- 7, 1994.
- 84- Van BELLE H.: Alkaline phosphatase I. Kinetics and inhibitions by levamisole of purified isoenzyme from humans. *Clin. Chem.*, :22: 972-976, 1976.
- 85- Van HOOFF V. O., De BROE, M. E.: Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Critical Reviews in Clinical Lab. Sciences*. 31 (3): 197-293. 1994.
- 86- VARLEY H.: *Practical Clinical Biochemistry*, Vol.I W. Heinemann Books Lim. 1980
- 87- WARNES T.W.: Progress report in alkaline phosphatase . *Gut*, 13: 926, 1972.
- 88- WEBER H, WEGMANN T.: *Atlas der klinischen enzymologie methoden und arbeitsvorschriften* georg thieme, Verlag Stuttgart, 13-14, 1968.
- 89- WEISS M.J., HENTHORN P.S., LAFFERTY M.A., et al.: Isolation and characterization of cDNA encoding a human liver/bone/kidney type alkaline phosphatase. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* ,83:7182-6, 1986.
- 90- ZILVA J.F., PANNALL P.R., MAYNE P.D.: *Clinical chemistry in diagnosis and treatment.*, 5 th ed.Clays Ltd. England, 315-316, 1992.