

PLASENTAL ALKALİ FOSFATAZIN SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Aytaç Keskiner* • Kadirhan Sunguroğlu*

ÖZET

Alkali fosfataz insan plasentasından 29.1 kat saflaştırılarak spesifik aktivitesi 6.40 IU/mg olarak bulunmuştur. Saflaştırma işlemleri, pH 8.6 tris tamponu kullanılarak homojenizasyon, butanol ekstarksiyonu, amonyum sülfatla çöktürme, isi muamelesi ve Sephadex G-200 jel filtrasyonu basamaklarını içermektedir.

Kısmen saflaştırılmış enzimin Lineweaver-Burk grafiği çizilerek 37°C'de 0.1M Glisin-1mM Mg⁺⁺ tamponunda (pH 10.5) p-NPP substratı için K_m değeri 0.5 mM olarak saptandı. Enzimin p-NPP substratı için optimum pH'sı 10.6 olarak bulundu. Yapılan isi inaktivasyon çalışmaları sonucunda, enzimin 65°C'de aktivitesinin hemen hemen %100'ünü koruduğu, 78°C'de ise aktivitesinin tamamını kaybettiği gözlemlenmiştir.

Daha sonra enzim üzerine ferröz sülfatın etkileri denenmiş ve ferröz sülfatın enzimi inhibe ettiği ve inhibisyon tipinin un-kompetitif olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Alkali fosfataz, plaseenta, saflaştırma, ferröz sülfat

SUMMARY

Purification of Placental Alkaline Phosphatase and Investigation of Its Kinetic Properties

Alkaline phosphatase of human placenta was purified 29.1 fold to a final specific activity of 6.40 U/mg by a procedure involving homogenization with tris buffer pH 8.6, extraction with butanol, ammonium sulphate precipitation, exposure to heat and Sephadex G-200 gel filtration.

The apparent K_m value of the purified enzyme for p-NPP in 0.1M glycine-1mM magnesium buffer, pH 10.5 at 37°C was calculated (estimated) to be 0.50 mM from Lineweaver-Burk plot. The enzyme had a pH optimum 10.6 for p-NPP. Heat inactivation studies showed that the enzyme remained almost 100% stable at 65°C but it was completely inactivated at 78°C.

Subsequently, the effects of ferrous sulphate were investigated. The inhibition type for ferrous sulphate was uncompetitive.

Key Words: Alkaline phosphatase, placenta, purification, ferrous sulphate

Fosfatazlar fosforik asit esterlerinin hidrolitik parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir. Bunlar maksimum aktivite gösterdikleri pH'ya göre asit ve alkali fosfatazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (1,2).

Alkali Fosfatazlar [Orthophosphate monoester phosphohydrolase, alkali optimum, (EC 3.1.3.1)] alkali ortamda birçok fosfat esteri üzerine hidrolaz ve transferaz etkisi gösteren enzimlerdir (1, 3, 4).

Alkali fosfataz (ALP) insanda ve hayvanda hemen hemen tüm dokulardan izole edilmiş ve enzimin özellikle hücre membranında lokalize olduğu saptanmıştır. Bilhassa karaciğer, kemik, barsak, böbrek ve plasentada ALP aktivitesi çok yüksektir (5-9). ALP yapısında önemli miktarda bulunan sialik asit çeşitli enzim formlarının oluşmasına sebep olmaktadır (4, 10). Gü-

nümüzde serumda ALP'nin 11 ayrı izoformunun olduğu tesbit edilmiştir. Bu izoformların hepsinin kinetik özelliklerinin bilinmesine rağmen moleküler özellikleri ve fizyolojik fonksiyonları hakkındaki bilgiler yeterli değildir (4).

Serumda ALP artışı genellikle patolojik durumlarda meydana gelmektedir. Robinson'un kemik ALP'ını ve bu enzimin kemik formasyonundaki rolünü keşfetmesiyle birlikte birçok araştırmacı ALP'nin klinik önemini aydınlatmak için çeşitli araştırmalar yapmışlardır (4, 11-15). Özellikle osteoblastik aktivitenin arttığı kemik hastalıklarında ve hepatobilyer sistemde obstrüksiyona neden olan patolojilerde serumda ALP aktivitesinin çok yükseldiği bilinmektedir (15).

* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Bu patolojik durumlar dışında puberte ve gebelik gibi fizyolojik durumlarda da serum ALP aktiviteleri yükselmektedir. Pubertede kemik gelişimi çok hızlı olduğu için artmış osteoblastik aktiviteye bağlı olarak özellikle kemik ALP çok yükselmektedir (16). Gebelikte ise onikinci haftadan sonra plasenta tarafından sentez edilen ALP miktarında önemli bir artış meydana gelmektedir. Plasentadan salgılanan ALP'ın plasental transport ve metabolizmada rol oynadığı düşünülmektedir (17, 18). 1960'lardan sonra araştırmacılar serum ALP'ının plasenta fonksiyonunun ve fetüs durumunun değerlendirilmesinde bir marker olabileceğini düşünmüşler ve bu konuyu aydınlatmak için çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Bu araştırmalar sonunda, artmış serum plasental ALP'ı ile preeklampsi, düşük doğum ağırlıklı bebek ve plasental yetmezlik gibi patolojiler arasında muhtemel bir ilişki olduğunu saptamışlardır (19).

Biz de bu çalışmada ALP'ı insan plasentasından saflaştırıp, fizikokimyasal ve kinetik özelliklerini ve bazı muhtemel inhibitörlerin alkali fosfataz aktivitesine etkilerini incelemeyi planladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmalar iki kademede yapılmıştır. Öncelikle alkali fosfataz enzimi insan plasentasından izole edilerek kısmen saflaştırılmıştır. İkinci kademede ise saflaştırılan enzimin p-NPP substratına karşı Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_m değeri hesaplandı. Ayrıca kısmen saflaştırılan insan plasental ALP'ı üzerine sıcaklık, pH, enzim konsantrasyonu ve Ferröz sülfat'ın etkileri kinetik olarak araştırılmıştır.

Saflaştırma:

Enzimin saflaştırılmasında Ghosh ve Fishman'ın insan plasental alkali fosfatazi saflaştırmak için kullandıkları metod kısmen modifiye edilerek uygulanmıştır (10). Saflaştırma işlemleri +4°C'de soğuk odada yapılmıştır. Saflaştırma işlemlerinin her basamağında hem aktivite hem de protein tayini yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında, saflaştırma işlemi sırasındaki her basamakta ve daha sonraki kinetik deneylerde protein tayini için Lowry metodu (20), ALP aktivite tayini için ise Bessey-Lowry-Brock'un tarif ettiği spektrofotometrik metod kullanılmıştır (21).

Saflaştırma işlemleri, pH 8.6 tris tamponuyla homojenizasyon, butanol ekstraksiyonu, amonyum sülfatla çöktürme, ısı muamelesi ve Sephadex G-200 jel filtrasyonu basamaklarını içermektedir.

1. Basamak: *Ham Homojenatin Hazırlanışı*. İnsan Plasentaları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde, normal doğum yapmış genç gebelerden toplanmış ve hemen tuz-buz karışımında korunarak, laboratuvara getirilmiştir. Plasentalar +4°C'ye soğutulmuş serum fizyolojik kullanılarak kandan temizlenmiş ardından fetal yüzde bulunan vasküler mezoderm ve göbek kordunu kesilerek atılmıştır. Plasentalar ağırlığının 3 katı olacak şekilde Tris tamponu (0.08 M pH 8.6) ile *Waring Blendord*da 4 dakika yüksek devirde homojenize edilmiştir.

2. Basamak: *Butanol İle Çöktürme*. 800 mL homejenat manyetik karıştırıcı ile karıştırılırken, üzerine n-Butanol ilave edilmiş ve sonra *Sorvall* marka santrifujda yaklaşık 1000 devirde +4°C'de 30 dakika santrifuj edilmiştir. Üstteki n-butanol fazı dikkatle uzaklaştırıldıktan sonra sarı renkli sıvı kısım toplanmıştır ve diyaliz membranı içine konularak 20 saat boyunca +4°C'de, 0.08 M Tris tamponuna karşı diyaliz edilmiştir.

3. Basamak: *Amonyum Sülfatla Çöktürme*. Diyaliz edilen süpernatant (260mL), manyetik karıştırıcı ile karıştırılırken, üzerine %95 doygunluğa ulaşacak şekilde amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edilmiş, ve ardından *Sorvall* marka santrifujde 30 dakika süreyle santrifuj edilmiştir. Supernatant atıldıktan sonra sediment 30 mL pH 8.6 olan 0.08 M Tris tamponunda çözülmüştür. Bir gece boyunca +4°C'de, aynı Tris tamponuna karşı diyaliz edilmiştir.

4. Basamak: *Isı Muamelesi*. 35 mL numunenin 25 mL'si alınarak 55°C'lik su banyosunda 60 dakika bekletilmiş, bu süre sonunda numune derhal buz banyosuna konmuş ve 30 dakika buz banyosunda bekledikten sonra 20 dakika yaklaşık 1000 devirde santrifuj edilmiştir. Sediment atılıp supernatant (toplam hacim 23.5 mL) toplanmıştır.

5. Basamak: *Jel Filtrasyon*. 6 g. kuru Sephadex G-200 tartılmış ve 300 mL tamponun üst yüzeyinde ince bir tabaka halinde dağılacak şekilde yavaş yavaş ilave edilip karıştırılmıştır. Bu işlemlerden sonra 3x60 cm. boyutlarındaki kolon, hava kabarcığı olmayacak şekilde ıslatılan jel ile yavaş yavaş doldurulmuştur. Jel kolona oturana kadar yine birkaç kez tamponla yıkanmıştır. Daha sonra kolon akış hızı 20 mL/saat olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu işlemde sonra 4. basamak sonucunda elde edilen numuneden 4 mL. ince bir pipetle kolonun iç çeperinden tampon-jel ara fazına, homojen bir tabaka oluşturacak şekilde dikkatlice uygulanmıştır. Kolonun üst ucundan pH 8.6 olan Tris tamponu verilmiştir.

Safılaştırılan Enzimin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

Değişen substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla, bütün faktörler sabit tutularak yalnız p-NPP konsantrasyonu değiştirilerek enzim aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen değerlere göre Michaelis-Menten ve Lineweaver Burk grafikleri çizildikten sonra enzimin 37°C'de Glisin-Mg⁺⁺ tamponunda (pH 10.5) p-NPP için K_m değeri hesaplanmıştır.

Artan enzim miktarının enzim aktivitesine etkisinin incelemek amacıyla, diğer faktörler sabit tutularak sadece ilave edilen enzim miktarını arttırmak suretiyle artan enzim miktarının enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir.

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi iki bölümde incelenmiştir. İlk önce 25, 37, 45, 55, 60, 65, 70 ve 78 °C'lik subanyoları hazırlanmış ve 1/8 oranında distile su ile seyreltilmiş enzim çözeltileri 15 dakika çeşitli sıcaklıklarda inkübe edilerek ALP aktiviteleri tayin edilmiştir.

Daha sonraki çalışmada ise, artan substrat konsantrasyonunda sıcaklığın enzim aktivitesine etkisini görmek için, bir önceki deney sonucunda ALP inhibisyonu için en uygun sıcaklık olarak 65 ve 78 °C seçilerek artan substrat konsantrasyonlarında enzim aktiviteleri ölçülmüştür. 1/6 oranında seyreltilmiş enzim çözeltisi kullanılmıştır.

pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek için pH: 6.70, 8.50, 8.75, 9.00, 9.30, 9.50, 9.80, 10.20, 10.60, 11.10, 11.40, 11.70 ve 12.00 olacak şekilde 0.1M Glisin - 1mM Mg⁺⁺ tamponu hazırlanmıştır. 1 mL tampon, 0.6 mL distile su, 0.4 mL 40.5 mM p-NPP çözeltisi ve 0.1 mL 1/8 oranında distile su ile seyreltilmiş enzim çözeltisi karıştırılarak 37°C'lik su

banyosunda 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak için 0.6 mL 0.2 N NaOH reaksiyon karışımına ilave edilmiş ve 405 nm'de absorbans okunarak ve formüle göre aktivite hesabı yapılmıştır.

Değişen ferröz sülfat (FeSO₄) konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için, 0.0563g FeSO₄+6H₂O (MW 278.028) tartılıp 50 mL disitle suda çözülerek 4.05 mM lık ve gerekli seyreltme yapılarak 0.81 mM'lık stok ferröz sülfat çözeltileri hazırlanmış ve Tablo 3.12. deki deney şeması hazırlanmıştır. En uygun son konsantrasyonlar 0.00, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.10, 0.20 ve 0.40 mM olarak tesbit edilmiştir. Substrat konsantrasyonu 2.00 mM olarak sabit tutulmuş, enzim ekstraktı ise 1/8 oranında distile su ile seyreltilmiştir.

Bir önceki deney sonunda ALP inhibisyonu için en uygun ferröz sülfat konsantrasyonu 0.02 ve 0.03 mM olarak tesbit edilmiş ve artan substrat konsantrasyonlarında enzim aktiviteleri tayin edilmiştir.

BULGULAR

İnsan Plasentasından ALP'in Safılaştırılmasına Ait Sonuçlar:

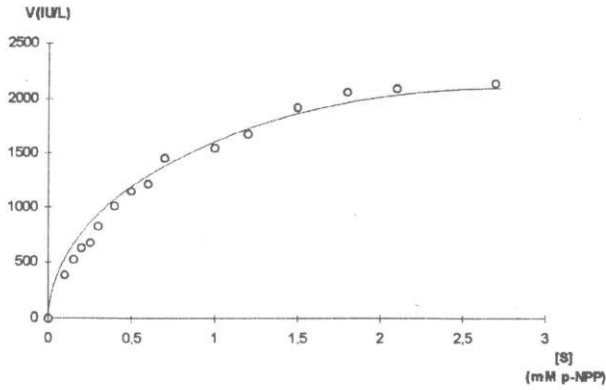
Safılaştırma kademeleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Safılaştırmanın son kademesi olan Sephadex G-200 jel kromatografisi sonucunda elde edilen enzim ekstraktının total aktivitesi 13.0 IU, spesifik aktivitesi 6.40 IU/mg protein, safılaştırma oranı 29.1 verim ise %5.75 olarak bulunmuştur.

Safılaştırılan Enzimin Kinetik Özelliklerine Ait Sonuçlar:

15 farklı p-NPP konsantrasyonu ile çalışılmış ve ALP aktiviteleri tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çizilen Michealis-Menten Eğrisi Şekil 1'de, Lineweaver-Burk Grafiği ise Şekil 2'de verilmiştir.

Tablo 1. İnsan plasental ALP'nin safılaştırma basamaklarına ait sonuçlar

Safhalar	Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Total Protein (mg)	Enzim Aktivitesi (IU/L)	Total Aktivite (IU)	Spesifik Aktivite (IU/mg protein)	Verim (%)	Safılaştırma Oranı
Ham Ekstrakt	800	10,67	8533	2343	1874	0,22	100,0	1,0
n-Butanol Ekstraktı	260	1,12	291	2851	741	2,55	39,5	11,6
Amonyum Sülfatla Çöktürme	35	3,59	126	10284	360	2,87	19,2	13,1
Isı ile Muamele	23,5	2,99	70	9828	231	3,29	17,2	15,0
Gel Filtrasyon	7,5	0,28	2	1791	13	6,40	5,75	29,1

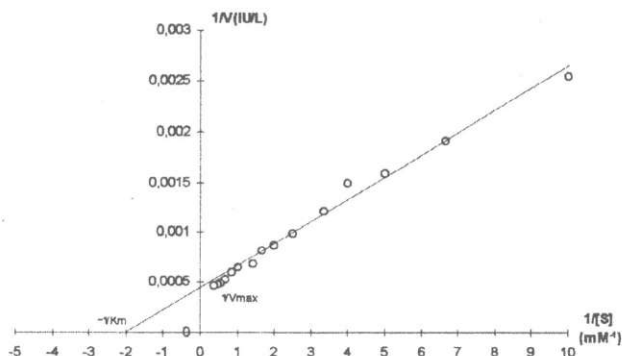


Şekil 1. Artan p-NPP konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi (Michaelis-Menten Grafiği)

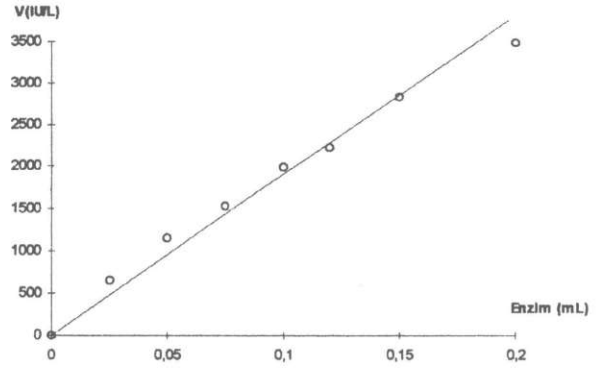
Biz yaptığımız çalışmada 37°C'de 0.1M Glisin-1mM Mg⁺⁺ tamponunda (pH 10.5) p-NPP substratı için K_m değerini 0.5 mM olarak saptadık

Artan enzim miktarının aktiviteye etkisi incelendiğinde, elde edilen enzimatif aktiviteler Şekil 3'de görülmektedir. Bu sonuçlara göre artan enzim miktarının enzim aktivitesini arttırdığı görülmektedir.

Sıcaklığın enzim Aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla Gereç ve Yöntemde anlatıldığı gibi 2 ayrı çalışma yapılmıştır. Birinci çalışmada, sıcaklık artışının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş, ikinci çalışmada ise sıcaklıklar sabit tutulmuş değişen p-NPP konsantrasyonlarında enzim aktivitesi incelenmiştir. Birinci çalışmada enzimin 55°C'de aktivitesini yitirmediği 65°C'de ise aktivitesinin çok az düştüğü görülmüştür. Bu deneye ait sonuçlar Şekil 4'de veril-



Şekil 2. Artan p-NPP konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği)

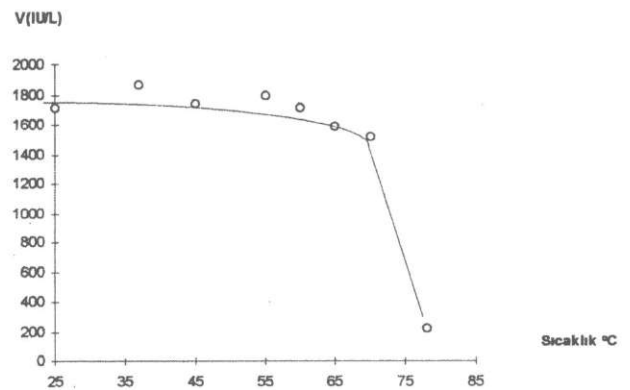


Şekil 3. Artan Enzim miktarının aktiviteye etkisi

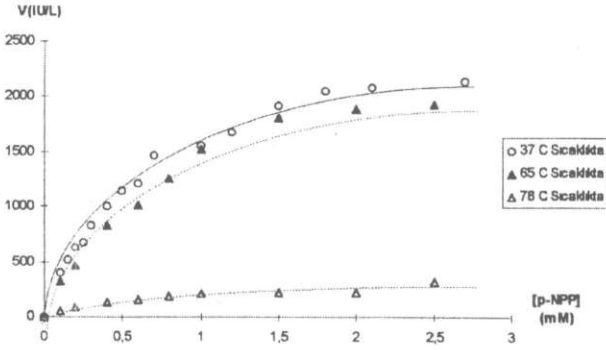
miştir. İkinci çalışmaya ait sonuçlar ise Şekil 5'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre enzimin farklı sıcaklıklarda kinetik özelliklerinin farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir.

Farklı pH'larda 0.1 M Glisin - 1mM Mg⁺⁺ tamponları hazırlanmış ve deneyler yapılmıştır. Deneylere ait sonuçlar Şekil 6'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH 10.6 olarak bulunmuştur.

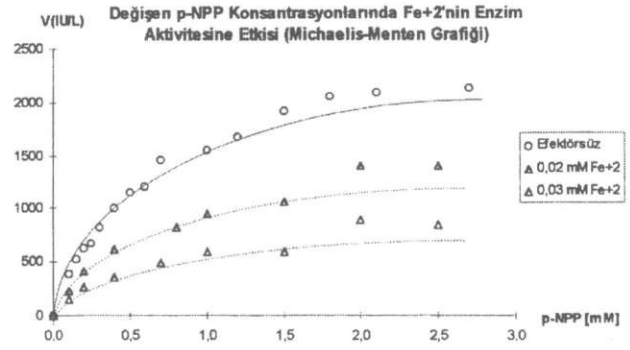
8 ayrı ferröz sülfat konsantrasyonunda, ferröz sülfat'ın enzim aktivitesi üzerine olan etkisi incelenmiş ve bu deneye ait sonuçlar Şekil 7'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi 0.02 mM'lık Ferröz sülfat çözeltisi enzim aktivitesinin yaklaşık % 50 sini inhibe etmektedir. 0.1 mM'lık Ferröz sülfat çözeltisi ise enzim aktivitesinin % 84'ünü inhibe etmektedir.



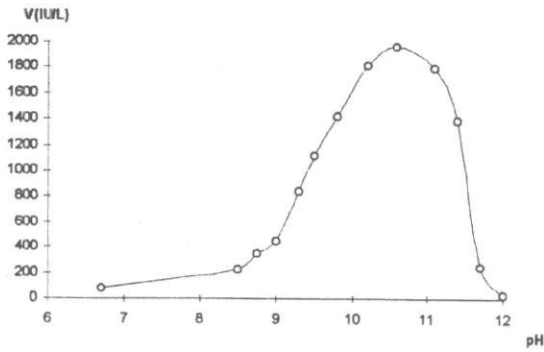
Şekil 4. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi



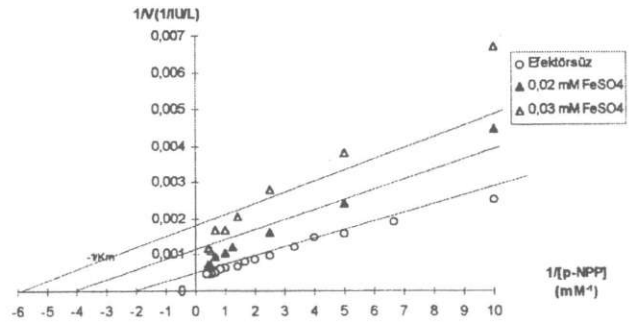
Şekil 5. Değişen p-NPP konsantrasyonunda sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 8. Değişen p-NPP konsantrasyonunda ferröz sülfat'ın (FeSO4) enzim aktivitesi üzerine etkisi

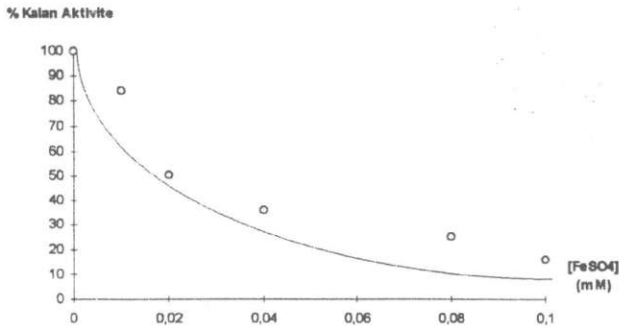


Şekil 6. pH'nin enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 9. Değişen p-NPP konsantrasyonunda ferröz sülfat'ın (FeSO4) enzim aktivitesi üzerine etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği)

Değişen p-NPP konsantrasyonlarında, 0.02 ve 0.03 mM'lık ferröz sülfat çözeltilerinin ALP üzerindeki etkileri incelenmiş ve bu sonuçlara göre çizilen Michaelis-Menten grafiği Şekil 8'de, Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 7. Artan ferröz sülfat (FeSO4) konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

TARTIŞMA

Alkali fosfatazlar insan ve hayvan dokularında yaygın olarak bulunmaktadır. ALP bugüne kadar çeşitli araştırmacılar tarafından farklı dokulardan saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir (22-25). Ghosh, Fishman, Doellgast ve Harkness çalışmalarını özellikle plasental alkali fosfataz üzerine yoğunlaştırmışlardır (26-28).

Ghosh ve Fishman hem büyük miktarlardaki plasentadan hem de daha az miktarlardaki plasentadan alkali fosfatazı saflaştırmak için iki ayrı yöntem geliştirmişlerdir. Birinci metotta yaklaşık 18 kg insan plasentasını %0.02 verimle 785 kat saflaştırmışlar ve spesifik aktiviteyi 220 U/mg olarak bulmuşlardır. İkinci metotta ise yaklaşık 500 g. insan plasentasını %0.08 verimle 1020 kat saflaştırmışlar ve spesifik aktiviteyi 254.5 U/mg olarak bulmuşlardır (27). Birkaç yıl sonra Doellgast ve Fishman 842 kat saflaştırdıkları enzim ekstraktının spesifik aktivitesini 155 U/mg olarak bulmuşlardır (26). Harkness ise ticari olarak kristalize halde bulunan E.Coli'den plasental ALP'ı %12 verimle

35.6 kat saflaştırmış ve spesifik aktiviteyi 4200 U/mg olarak bulmuştur (28).

Enzimin kinetik özelliklerinin incelenmesinde ilk olarak değişen substrat konsantrasyonlarının etkisi araştırıldı. Enzimin 2.7 mM p-NPP konsantrasyonuna kadar Michaelis-Menten kinetiğine uygun davrandığı saptandı. Biz yaptığımız çalışmada 37°C'de 0.1M Glisin-1mM Mg⁺⁺ tamponunda (pH 10.5) p-NPP substratı için K_m değerini 0.5 mM olarak saptadık. V_{max} ve K_m değerleri, enzimin ekstraktının saflığının derecesinden, aktivite tayin metodunda kullanılan enzimin konsantrasyonundan, kullanılan tamponun cinsi ve pH'sından ve kullanılan metal aktivatörün cinsinden etkilenmektedir. Bu yüzden ALP için literatürdeki kinetik çalışmaların sonuçlarını birbirleriyle kıyaslamak çok zordur. Ayrıca plasental ALP kinetiği ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıda olduğundan sonuçlarımızı hem plasentadan hem de diğer dokulardan saflaştırılan ALP'lara ait bilgilerle kıyaslamayı uygun bulduk. Ghosh insan plasentasından saflaştırdığı ALP için K_m değerini, pH 10.7 sodyum bikarbonat tamponunda disodyum fenilfosfat substratı için 0.51 mM olarak bulmuştur (29). Shameem ve arkadaşları seminomali testis dokusundan saflaştırdıkları plasental ALP için pH 10.5 p-NPP substratı için 37°C'de K_m değerini 2.5 mM olarak bulmuşlardır (30). Latner ve Hodson insan karaciğerinden saflaştırdıkları enzimin K_m değerini, 25°C'de 0.1M 2Amino-2Metil Propan-1-ol -HCl tamponunda (pH 10.5) p-NPP substratı için 0.5 mM olarak saptamışlardır (25). Araştırmacıların elde ettikleri Km değerleri bizim sonucumuza yakındır. Özellikle Latner ve Hodson ile Ghosh'un sonuçları bizim sonucumuzla aynıdır. Diğer çalışmadaki K_m değerinin farklı olması ise, kullanılan dokunun kaynağının, ve çalışma şartlarının farklı olmasından kaynaklanabilir.

Enzim konsantrasyonunu arttırıp diğer faktörleri sabit tuttuğumuz zaman, enzim aktivitesinin enzim miktarı ile doğru orantılı olarak arttığını saptadık.

Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisini gözlemek için iki ayrı deney yapılmıştır. Birinci deneyde 25, 37, 45, 55, 60, 65, 70, 78°C'lik sıcaklıklarda enzim inkübe

edilmiş ve aktivitesi saptanmıştır. Bu deneyde 25-55°C arasındaki sıcaklıklarda enzimin aktivitesini kaybetmediği, 65°C'de aktivitede çok az bir kayıp olduğu 78°C ve üzerinde ise aktivitenin kaybolduğu gözlenmiştir. Bilindiği gibi plasental ALP'in en önemli özelliği ısıya dayanıklı olmasıdır. Bu özelliği sayesinde diğer tüm ALP izoenzimlerinden ayrılabilir. Plasental ALP 65°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra bile aktivitesini korumaktadır. Diğer izoenzimler aktivitelerini tamamen yitirmektedir. Bizim sonuçlarımızda bu bilgiyi desteklemektedir. İkinci deneyde ise 65 ve 78°C'de inkübe edilmiş enzim çözeltisinde, değişen p-NPP konsantrasyonlarının aktivite üzerine etkisi incelenmiş ve 65 ve 78 °C'lerde enzimin kinetik özelliklerinin değiştiği saptanmıştır.

Plasentadan kısmen saflaştırdığımız ALP'in optimum pH'sını bulmak için farklı pH'larda tamponlar hazırlanmıştır. Bu amaçla 6.70, 8.50, 8.75, 9.00, 9.30, 9.50, 9.80, 10.20, 10.60, 11.10, 11.40 ve 11.70 pH'larda 0.1 M Glisin-1mM Mg⁺⁺ tamponları hazırlanmış ve deneyler yapılmıştır. Enzim Maksimum aktiviteyi pH 10.60 da göstermiştir. Yapılan invitro çalışmalarda enzimin optimum pH aralığının 8.2 - 10.7 olduğu saptanmıştır (5, 29, 32). Bizim bulgumuz da literatürle uygunluk göstermektedir.

Bilindiği gibi ALP yapısında bulunan çinko, enzimin hem konformasyonu hem de katalitik aktivitesi için gereklidir (6). Bugüne kadar birçok metal iyonunun enzim aktivitesi üzerine etkileri denenmiş ve bunlar arasından +2 değerlikli Ca⁺⁺, Ni⁺⁺, Cd⁺⁺ ve Sn⁺⁺ iyonlarının ALP aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (3, 6). Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ ve Co⁺⁺ ise enzimi aktive etmektedirler (3, 5, 6). Literatürde Fe⁺⁺ ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim ferröz sülfat ile yaptığımız çalışmanın sonucunda ferröz sülfat'ın inhibisyon yaptığını ve bu inhibisyonun unkompetitif olduğu saptanmıştır. 37°C'de 0.1M Glisin-1mM Mg⁺⁺ tamponunda (pH 10.5) p-NPP substratı kullanılarak 0.02 mM ferrözsülfat için K_i 0.25, 0.03 mM ferrözsülfat için K_i 0.16 olarak saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Solomon, P.: Alkaline phosphatase. *Ann Int Med*, 67: 183-203, 1967.
2. Sunguroğlu, K., Gökhan, İ.H.: Koyun böbrek alkali ve asit fosfatazlarının kısmen saflaştırılması ve bazı katyonların bu enzimler üzerindeki etkilerinin araştırılması. *Optimal Tıp Dergisi*, 4: 224-228, 1991.
3. Carl, A.B., Edward, R.A.: *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2 th ed., W.B. Saunders Co., pp. 830-844, 1994.
4. Moss, D.W.: Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin Chem*, 38: 2486-2492, 1992.
5. Fernley, H.N.: Mammalian alkaline phosphatases. *The Enzyme Vol IV*. Boyer, D .Ed. Academic Press New York, 3.Ed. 417-447, 1971.
6. Fishman, W.H.: Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *Am J Med*, 56: 617-50, 1974.
7. Kaplan, M.M.: Alkaline phosphatase: Progress in hepatology. *Gastroenterology*, 62: 452-468, 1972.
8. McComb, R.B., Bowers, G.N., et al.: *Alkaline phosphatase*. New york Plenum Press, 1979.
9. Warnes, T.W.: Progress report in alkaline phosphatase. *Gut*, 13: 926, 1972.
10. Ghosh, N.K., Fishman, W.H.: Purification and properties of molecular-weight variants of human placental alkaline phosphatase. *Biochem J*, 108: 779-792, 1968.
11. Mabry, C.C., Bautista, A.: Familial hyperphosphatasia with mental retardation, seizures, and neurologic deficits. *J Pediatr*, 74: 74-85, 1970.
12. Roberts, W.M.: Variations in the phosphatase activity of blood in disease. *Br J Exp Pathol*, 11, 90-95, 1930.
13. Robinson, R.: The possible significance of hexosophosphoric esters in ossification in vitro. *Biochem J*, 17: 286-93, 1923.
14. Seetharam, S., Sussman, N.L., et al.: The mechanism of elevated alkaline phosphatase activity after bile duct ligation in the rat. *Hepatology*, 6: 374-80, 1986.
15. Van Hoof, V.O., De Broe, M.E.: Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit, Rev, Clin Lab Sci*, 31: 197-293, 1994.
16. Van Belle, H.: Alkaline phosphatase I. Kinetics and inhibitions by levamisole of purified isoenzyme from humans. *Clin Chem*, 22: 972-976, 1976.
17. Fishman, W.H., Ghosh, N.K.: Isoenzymes of human alkaline phosphatase. *Adv Clin Chem*, 10: 255-370, 1967.
18. Hulstaert, C.E., Torringa, J.L., et al.: The characteristic distribution of alkaline phosphatase in the full-term placenta. *Gynecol Invest*, 4: 24, 1973.
19. 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.
20. Lowry, O.H., Rosebrough, J., et al.: Protein measurement with the folinphenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275, 1951.
21. Bessey, O.A., Lowry, O.H., et al.: *J Biol Chem*, 164: 321, 1946.
22. Barman, T.E., Gutfreund, H.: The catalytic activity and kinetic properties of bovine milk alkaline phosphatase
23. Harada, M., Hiroaka, K., et al.: Purification and properties of bovine dental-pulp alkaline phosphatase. *Arch Oral Biol*, 27: 69-74, 1982.
24. Kilpatrick, D.C., Crofton, P.M.: Alkaline phosphatase from human thyroid. *Clin Chim Acta*, 117: 307-315, 1981.
25. Latner, A.L., Hodson, A.W.: Human liver alkaline phosphatase purified by affinity chromatography, ultracentrifugation and polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem J*, 159: 697-705, 1976.
26. Doellgast, G., Fishman, W.H.: Purification of human placental alkaline phosphatase: salt effects in affinity chromatography. *Biochem J*, 141: 103-112, 1974.
27. Ghosh, N.K., Fishman, W.H.: Purification and properties of molecular-weight variants of human placental alkaline phosphatase. *Biochem J*, 108: 779-792, 1968.
28. Harkness, D.R.: Studies on human placental alkaline phosphatase I. Purification and crystallization. *Arch Biochim Biophys*, 126: 503-512, 1968.
29. Ghosh, N.K.: Purification and molecular properties of placental and intestinal alkaline phosphatase. *Ann NY Acad Sci*, 166: 604-640, 1969.
30. Shameem, G.M.M., Quadri, F.: Isolation and purification of placental type alkaline phosphatase from seminoma. *Clin Chem*, 33: 248-52, 1987.
31. Fernley, H.N.: Mammalian alkaline phosphatases. *The Enzyme Vol IV*. Boyer, D .Ed. Academic Press New York, 3.Ed. 417-447, 1971.
32. Fleisch, H., Bisaz, S.: Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Amer J Physiol*, 203: 671, 1962.