

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

Beran YOKUŞ¹, Nuriye METE², Yıldız ATAMER²

PARTIAL PURIFICATION OF SHEEP LIVER ALKALINE PHOSPHATASE, INVESTIGATION OF PHYSICOCHEMICAL AND KINETIC PROPERTIES

Summary: In this study, alkaline phosphatase (ALP) enzyme was partially purified from sheep liver and its physicochemical and kinetic properties were investigated. Specific activity of enzyme was found 0.843 IU/mg protein which had been purified 18,32 fold from sheep liver. 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 in 0.1 mM Glycine-Magnesium buffer against p-Nitrophenylphosphate (p-NPP) substrate were drawn up, and Km value was calculated as 0.31mM. The effect of temperature, pH, L-Histidine, Thiourea and phosphate on enzyme activity was investigated. It was observed that activity of the enzyme decreased with time at 56 °C, and 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.

Key Words: Alkaline phosphatase, purification, kinetics of enzyme, thiourea, phosphate, L-Histidine

Özet: Bu çalışmada alkali fosfataz (ALP) 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 (p-NPP) substratına karşı Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek Km değeri 0,31 mM 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 gözlemlenmiştir. Enzimin p-NPP için optimum pH' ı 10.4 olarak bulunmuştur. Son ürün olan fosfatın enzimi inhibe ettiği, L-Histidin'in unkompetitif inhibisyona yol açtığı gözlemlenmiştir. Tiyoüre'nin ise enzim aktivitesi üzerine hiçbir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Alkali fosfataz, saflaştırma, enzim kinetiği, tiyoüre, fosfat, L-histidin

GİRİŞ VE AMAÇ

Alkali fosfataz (ALP) alkali ortamda birbirinden farklı türlerdeki fosfat esterleri üzerine hidrolaz ve transferaz etkisi gösteren bir enzimdir (E.C.3.1.3.1),

doğada yaygın olarak bulunur. İnsan ve hayvan dokularının hemen hepsinden, bazı bitkilerden, balıklardan, bakteri ve mantarlardan izole edilmiştir (1, 2). Özellikle karaciğer, safra, kemik, böbrek ve plasentada ALP aktivitesi çok yüksektir (3, 4, 5, 6).

Başta karaciğer ve kemik hastalıkları olmak üzere bir çok hastalığın belirlenmesinde önemli bir indikatör olarak kullanılmaktadır. ALP'nin izoformlarının hepsinin bilinmesine ve enzimin izoenzimlerinin bütün genlerinin kolonlanıp, nükleotid dizilimleri ve genomik yapılarının açıklanmasına rağmen moleküler özellikleri ve fizyolojik fonksiyonları hakkındaki bilgiler yeterli değildir. Bunun en büyük nedeni farklı dokulardan farklı izoenzimlerin saflaştırılmasındaki güçlük ve çok az miktarda enzim elde edilmesidir.

Bu çalışmada, ALP'nin koyun karaciğerinden kısmen izole edilip saflaştırılarak fizikokimyasal ve kinetik özelliklerinin incelenmesi ve muhtemel bazı inhibitörlerin karaciğer ALP aktivitesindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

MATERYAL VE METOD

Çalışmalar iki basamakta yapıldı. İlk basamakta ALP enzimi koyun Karaciğerinden izole edilerek kısmen saflaştırıldı. İkinci basamakta ise enzimin p-NPP substratına karşı Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek Km değeri hesaplandı. Kısmen saflaştırılan koyun karaciğer ALP'ı üzerine sıcaklık, pH, enzim konsantrasyonu, L-Histidin ve Tiyoürenin etkileri kinetik olarak araştırıldı. Tiyoüre "Carlo Erba" firmasından, L-Histidin "Eastman" firmasından, p-NPP ve geriye kalan diğer kimyasal maddeler "Sigma" firmasından temin edilmiş olup hepsi analitik saflıktadır. Deneylerde Unicam UV-Visible spektrofotometre, Sorvall S1 ve Sanyo harrier 18/80 soğutmalı santrifujler, Waring blender, Grant CB2 50Z su banyosu kullanıldı.

1. Koyun Karaciğerinden Alkali Fosfatazın Saflaştırılması

Latner ve Hudson'un kısmen modifiye edilip uygulanmıştır (7). Mezbehada yeni kesilmiş bir yaşındaki sağlıklı koyundan alınan karaciğer, tuz ve buz karışımında korunarak laboratuara getirildi. Zar ve bağ dokudan ayrılan ve küçük parçalara getirilen

karaciğer, +40C'de 0,15 M NaCl ile yıkayıp kandan temizlendi. Bundan 250 g. Alınıp 500 ml. +40C'deki 0,15 M NaCl ile 3 dakika yüksek hızda homojenize edildi. Alttaki sulu faz toplandı. Bu faz 1 nolu whatman kağıdından süzöldükten sonra pH'sı 0,1 N NaOH ile 7,6 ya ayarlandı ve 00C'ye soğutuldu. Bunun üzerine -200C'ye soğutulmuş asetonan, son konsantrasyon %33 (v/v) olacak şekilde ilave edildi. Karışım 2000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek çöken protein uzaklaştırıldı. Supernatant'a son konsantrasyon %40 (v/v) olacak şekilde soğutulmuş asetonan ilave edilerek tekrar 2000 g'de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen sedimentin (hacmi 9 ml idi) üzerine 3/1 (v/v) oranında -200C'deki etanol-kloroform karışımından, son hacim %44 olacak şekilde karıştırılarak ilave edildi. Elde edilen enzim çözeltisi homojenizatörde süspansiyon haline getirildi. Enzim çözeltisi 30 dakika süreyle 9000 g'de santrifüj edildi ve süpernatant alındı. Böylece alkalen fosfataz koyun karaciğerinden kısmen saflaştırılmış oldu. Kinetik 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.

2. Alkali Fosfataz Aktivitesinin Ölçülmesi

Deneyin Prensipleri: Bu çalışmada yapılan saflaştırma işleminin her basamağında ve sonraki yapılan deneylerde ALP aktivitesi; Bessey, Lowry, Brock metodu ile ölçüldü (8). ALP enzimi renksiz olan p-NPP substratını alkali ortamda p-nitrofenol ve fosfata hidrolizini katalize eder. Asit ortamda renksiz olan p-nitrofenol anyonu, alkali ortamda koyu sarı renk verir ve 405 nm de maksimum absorpsiyon gösterir. Bu prensipten hareket edilerek p-nitrofenol (p-NPP) ile orantılı olan optik dansite değişimi ölçülerek ALP aktivitesi tayin edilir. Kullanılan Reaktifler; 1-) Glisin(0,1M)-Magnezyum (1 mM) Tamponu pH 10,5 2-) p-

Nitrofenol çözeltisi (11mM) 3-) ALP çalışma çözeltisi: 1 hacim Glisin-Magnezyum çözeltisi ve 1 hacim p-NPP karışımından oluşur. Deneyin Yapılışı; Enzim aktivitesinin ölçüleceği küvet içerisine 2 ml çalışma çözeltisi ve 0,1 ml enzim ekstraktı konulur. 25 Co de 5 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede 405 nm'de birer dakikalık aralarla optik dansite okunur. Okunan O.D. değerleri arasındaki farkların aritmetik ortalaması alınarak optik dansite değişimi (?E/t) bulunur. ALP aktivitesi şu formüle göre hesaplanır.

ALP aktivitesi (IU/L) = (?E / t) x (1000 x 2,1 / ? x 0,1) x Seyreltme oranı

? : Molar absorpsiyon katsayısı : 16,8

Saflaştırmanın her basamağında alınan numunelerdeki protein tayini Lowry metodu ile yapıldı (1,9).

3. Saflaştırılan Enzimin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

a-) Deneydeki bütün faktörler sabit tutularak yalnızca p-NPP konsantrasyonu değiştirilerek enzim aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen değerlere göre Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi.Km değeri hesaplandı.

b-) Deneydeki bütün faktörler sabit tutularak sadece ilave edilen enzim miktarını artırarak, artan enzim miktarının enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir.

c-) Sıcaklığın ALP Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi: Enzim, 56°C ve 65°C'de inkube edilerek aktivite ölçüldü.

d-) 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

e-) Artan Fosfat Konsant-

rasyonun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi: Artan konsantrasyonlarda "Sodyum dihidrojen fosfat" (NaH₂PO₄) çözeltileri hazırlanarak, fosfatın enzim aktivitesi üzerine etkisi ölçülmüştür.

f-) Artan Tiyoüre Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi için, tiyoüre stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak çeşitli konsantrasyonlarda çözeltiler elde edilmiştir.

g-) Stok L-histidin çözeltilerinden uygun seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanıp, diğer bütün faktörler sabit tutularak L-histidin'in enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

h-) Bir önceki deney sonucunda ALP inhibisyonu için en uygun L-Histidin konsantrasyonunun 5 mM olduğu bulunmuştur. Tüplerdeki L-Histidin konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde sabit tutulurken substrat konsantrasyonları artırılarak, L-Histidin'in enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. e, f, g, h şıklarında yapılan deneylerde substrat konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde sabit tutulmuştur.

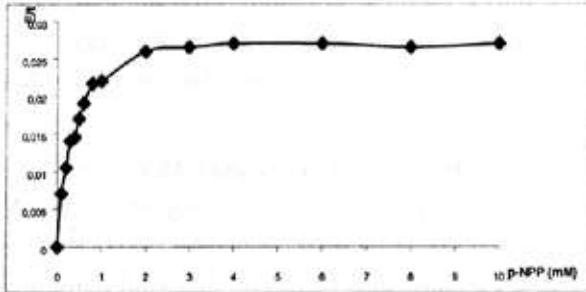
SONUÇLAR

ALP enziminin koyun karaciğerinden saflaştırılması işleminin her basamağında elde edilen total aktivite, total protein, spesifik aktivite, verim ve saflaştırma oranları Tablo-1 de gösterilmiştir.

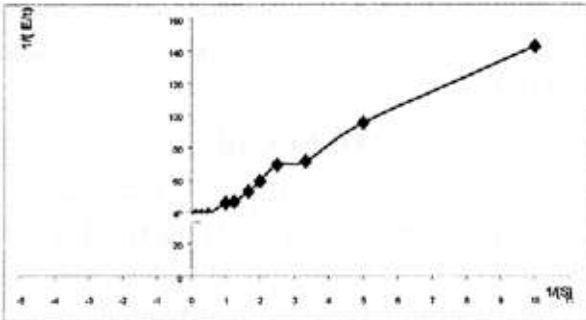
Tablo 1: Koyun karaciğer alkali fosfatının saflaştırılmasına ait sonuçlar

Saflaştırma Basamakları	Total Aktivite (IU)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (IU/mg protein)	Saflaştırma Oranı
Homojenat	2090	44814	0,046	1,00
n-Butanol Ekstraktı	1947	8633,3	0,225	4,891
Asetonla Çöktürme	229,5	378	0,607	13,195
Etanol-Kloroformla Çöktürme	216	256	0,843	18,326

a-) Artan p-NPP Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisi: Elde edilen sonuçlara göre çizilen Michaelis-Menten grafiği Şekil-1'de gösterilmiştir. 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 -2' de gösterilmiştir. p-NPP substratı için, enzimin 25 C°' de, pH 10.5' de, 0.1 M Glisin-Magnezyum tamponunda Km' si 0.31 mM olarak bulunmuştur.



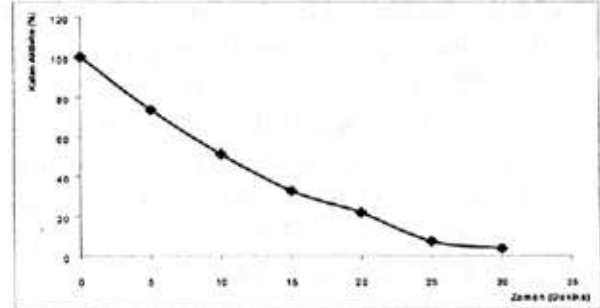
Şekil 1. p-Nitrofenilfosfat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi (Michaelis-Menten eğrisi)



Şekil 2. p-Nitrofenilfosfat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

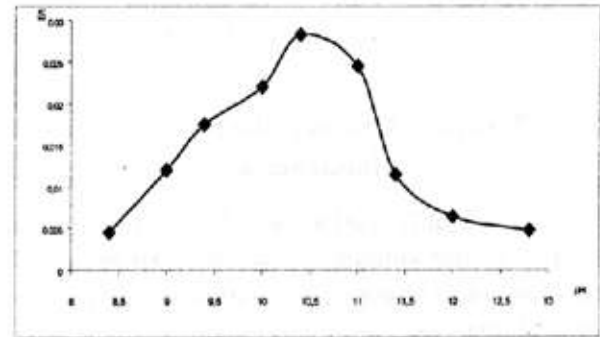
b-) Artan Enzim Miktarının Enzim Aktivitesine Etkisi: Enzim aktivitesi, artan enzim miktarıyla doğru orantılı olarak artmıştır.

c-) Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi: 56 °C' de enzim aktivitesinin % 48.7' sini ilk 10 dakikada kaybettiği gözlemlendi. (Şekil-3) 65 °C' de ise enzim 5.dakikada aktivitesinin % 98' ini kaybetmiştir.



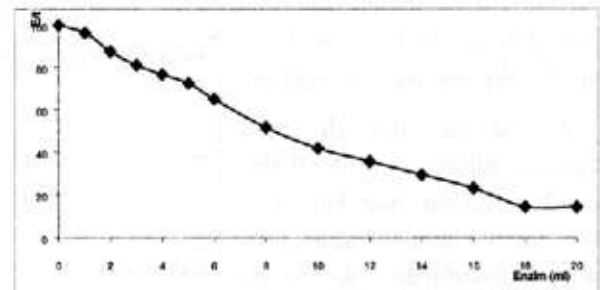
Şekil 3. 56° sıcaklıktaki enzim aktivitesini zamana bağlı değişimi

d-) pH' nın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi: Bu sonuçlara göre enzimin optimal aktivite gösterdiği pH aralığı 10.0–11.0 arasında bulunmuştur. (Şekil-4)



Şekil 4. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi

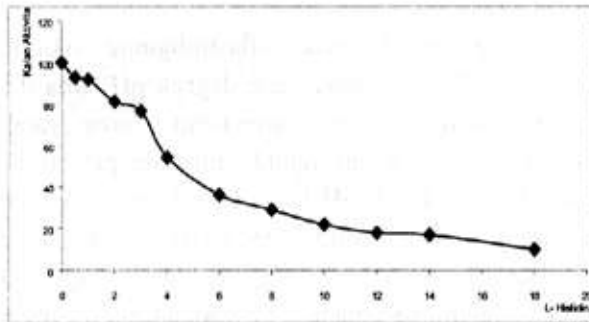
e-) Artan Fosfat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisi: Fosfat konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesi azalmıştır. 18 mM' da enzim aktivitesinin % 85.7' sini kaybetmiştir. (Şekil-5)



Şekil 5. Fosfat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

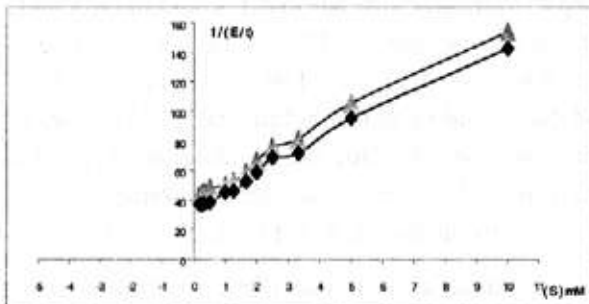
f-) Artan Tiyoüre Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi: Tiyoüre'nin enzim aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

g-) Artan L-Histidin Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisi: Artan L-Histidin konsantrasyonunun enzim aktivitesini inhibe ettiği gözlemlendi. (Şekil-6)



Şekil 6. Histidin enzim aktivitesine etkisi

h-) L-Histidin, Artan p-NPP Konsantrasyonunda Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi: Sabit tutulan L-Histidin konsantrasyonunun (5 mM), artan substrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesine etkisi incelendi. Lineweaver-Burk grafiğini çizmek için, sonuçlar bilgisayarda SPSS programı ile, istatistik olarak değerlendirildi. Bu değerlere göre elde edilen inhibitörlü doğru denklemi $y = 41.81 + 11.56 x$ ve $r = 0.99$ olarak bulunmuştur (Şekil-7).



Şekil 7. L-Histidin enzim aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

TARTIŞMA

ALP, 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 (1, 2, 7, 10, 11, 12, 14).

Ohkubo ve arkadaşları (15) sıçan karaciğerinden ALP saflaştırılmasında homojenat süzütüsünde spesifik aktiviteyi 0,03 U/ mg protein, butanol ekstraktında ise 0,1 U/ mg protein olarak bulmuşlardır. Latner ve Hudson (7), insan karaciğerinden ALP saflaştırılmasında butanol ekstraktında spesifik aktiviteyi 0,12 U/ mg protein, asetonla çöktürmeden sonra 0,8 U/ mg protein, son kademede ise 2,9 U/ mg protein olarak bulmuşlardır. Türköz ve Üstdal, sığır karaciğerinden ALP saflaştırılmasında spesifik aktiviteyi, homojenatta 0,025 U/ mg protein, butanol ekstraktında 0,089 U/ mg protein, asetonla çöktürmeden sonra 0,161 U/ mg protein ve son basamak da ise 0,356 U/ mg protein olarak bulmuşlardır (16). Biz yaptığımız enzim saflaştırma işlemi basamaklarında spesifik aktiviteyi, homojenatta 0,046 U/ mg protein, butanol ekstraktında 0,225 U/ mg protein, asetonla çöktürmeden sonra 0,607 U/ mg protein, son kademe olan etanol-kloroform çöktürmesinden sonra ise 0,843 U/ mg protein olarak bulduk (Tablo-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 (17, 19). 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 istatistik 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 (15). 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 (7). Sarconi ve arkadaşları merinos koyununun karaciğerinden saflaştırdıkları ALP' ın p-NPP substratı için Km değerini 0.5± 0.2 mM olarak tespit etmişlerdir (18). Türköz sığır karaciğerinden saflaştırdığı ALP' ın, 25°C' de, 0.1 M Glisin- Magnezyum tamponunda (pH 10.5) p-NPP substratına karşı Km değerini 1.1 mM olarak tespit etmiştir (16). V max ve Km değerleri, enzim ekstraktının saflık derecesinden, aktivite tayininde kullanılan enzimin konsantrasyonundan, tamponun cinsi ile pH'ından, 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 yakın olduğunu tespit ettik. Aradaki fark yukarıda anlatılan sebeplerden kaynaklanabilir. Yaptığımız çalışmada, koyun karaciğer ALP'ının maksimum aktivite gösterdiği substrat konsantrasyonunun, alt sınırını 2 mM olarak bulduk. Biz de çalışmamızda enzim, fosfat, tiyöüre, 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. Bu bulgumuz diğer araştırmacıların bulguları ile uyumludur (14, 16, 19).

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisini incelediğimizde ALP'ın 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-3). 65°C'de yaptığımız çalışmada ise enzimin ilk beş dakikada aktivitesinin % 98' ini kaybettiğini tespit ettik. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki bilgilerle uyumludur (7, 14, 19, 20, 21, 22, 23).

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. (Şekil-4) Bulduğumuz sonuçların literatürdeki bilgilerle uyum sağladığı tespit edildi. Komada ve arkadaşları insan karaciğerinden saflaştırdıkları enzim için maksimum aktiviteyi pH 10.2'de (24), Türköz, sığır karaciğerinden elde ettiği enzimin maksimum aktivitesini pH 10.4'de tespit etmişlerdir (16). Ohkubo ve arkadaşları sıçan karaciğerinden saflaştırdıkları enzim için maksimum aktiviteyi pH 10.2 olarak tespit etmişlerdir (15).

Artan fosfat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi sonucunda, fosfat konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. 18 M fosfat konsantrasyonunda, enzim aktivitesinin % 85.7' sini kaybetmiştir (Şekil-5). Kay, son ürün olan fosfatın enzim aktivitesini inhibe ettiğini ilk olarak belirlemiştir. Daha sonra bir çok araştırmacı, fosfatın enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bulduğumuz sonuç literatürle uyum içerisindedir. (3, 4, 7, 14, 21, 23, 25, 31).

Hipertroidi'de serum ALP'ının özellikle kemik ve karaciğer izoenzimlerinin artışı öteden beri bilinmektedir.(13-14) Hipertroidizmde tedavi amaçlı tiyöüre ve türevleri, tiyöürasil, propil tiyöürasil, karbimazol ve metimazol verilmektedir. Antihipertroid olarak kullanılan tiyöüre türevi bu ilaçların etki mekanizması, troid 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 (T3,T4) engellemektedir. (28) 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 ALP aktivitesine etkisini incelemek amacıyla 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 ALP arasında direkt bir ilişki olmadığı sonucuna vardık. Literatürde tiyoüre' nin ALP aktivitesine olan etkileri ile ilgili bir araştırmaya rastlayamadığımız için, sonuçlarımızı karşılaştıramadık.

L-Histidin' in artan konsantrasyonları ile ALP aktivitesi arasında, ters orantılı bir ilişki bulunduğunu belirledik (Şekil-6). Deney sonuçlarına göre L-Histidin'in, 3 mM konsantrasyonda enzimi % 23.5, 6 mM konsantrasyonda % 63.9, 18 mM konsantrasyonda ise enzimi % 89.9 oranında inhibe ettiği görülmektedir. Literatürde amino asitlerin L-formlarının, ALP aktivitesini inhibe ettiğine dair bir çok bilgi mevcuttur (10, 16, 20, 28, 29, 30, 31, 32, 33). 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. Lineweaver-Burk grafiğini çizmek ve İnhibisyon tipini belirlemek için elde ettiğimiz değerleri istatistiki olarak değerlendirdik. Km değerlerini hesapladık. Sonuçta

elde ettiğimiz doğru denklemlerine göre çizilen Lineweaver-Burk grafiği, inhibisyon tipinin unkompetitif olduğunu göstermektedir. (Şekil-7)

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

KAYNAKLAR

1. BERGMAYER, H.U. (1974) Methoden Der Enzymatischen Analyse. Band 1. Verlag Chemie, Weinheim.
2. SİMONOPOULOS, T., JENCKS, W. (1994) Alkaline phosphatase is an almost perfect enzyme. *Biochemistry*, 33: 10375-80.
3. FERNLEY, H.N. (1971) Mammalian alkaline phosphatase. In: Boyer D, ed. The Enzyme. Vol IV. 417-447. Academic Press. New York.
4. FISHMAN, W.H. (1990) Alkaline phosphatase isoenzymes: recent progress, *Clin. Biochim*, Vol.23. pp. 99-104.
5. KAPLAN, M.M. (1972) Alkaline phosphatase: Progress in hepatology. *Gastroenterology*, 62:452-468.
6. McCOMB, R.B., BOWERS, G.N., POSEN J. (1979) Alkaline phosphatase..Plenum Press. New York.
7. LATNER, A.L., HUDSON, A.W. (1976) Human liver Alkaline phosphatase purified by affinity chromatography, ultracentrifugation. *Biochem. J.* 159: 697-99.
8. WEBER, H., WEGMANN, T. (1968) Atlas der klinischen enzymologie methoden und arbeitsvorschriften georg thiem, 13-14. Verlag Stuttgart.
9. WARNES, T.W. (1972) Progress report in alkaline phosphatase. *Gut*, 13: 926.
10. COLEMAN, J.E. (1987) In phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms, *Am.Soc.Microbiol.* Washington D.C. pp. 127-38.
11. ENGSTROM, L. (1964) The amino acid sequence around the reactivator in calf intestinal alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* 92: 78.
12. GHOSH, N.K., et al. (1968) Purification and properties of molecular weight variants of human placental alkaline phosphatase. *Biochem. J.* 108: 779-83.
13. TIBI, L., PATRICK A.W., LESLIE, P. et al. (1989) Alkaline phosphatase in plasma in hyperthyroidism., *Clin.Chem.*:35(7):1427-30.
14. Van HOOFF, V.O., De BROE, M. E. (1994) Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Critical Reviews in Clinical Lab. Sciences.* 31 (3): 197-293.



15. OHKUBO, A, LANGERMAN, N, KAPLAN, M. M. (1974) Rat alkaline phosphatase purification and properties. *J. Biol. Chem.* 249 (22): 7174-80.
16. TURKOZ, Y, USTDAL, M. (1994) Sığır karaciğer alkali fosfatazının saflaştırılması, fizikokimyasal ve kinetik özelliklerinin araştırılması, *Optimal Tıp Dergisi*, 7 (1): 31- 7.
17. BERNARD, J. H. (1996) Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 19. th ed. Pp.277-281. W.B.Saunders Co.Philedelphia.
18. SARCONI, M. E, HAMAOU, W, AZIAR, G, et al. (1991) Alkaline phosphatase from *Echinococcus multilocularis*: purification and characterization, *Comp. Biochem.* 100: 2; 253-258.
19. GÖKHUN, İ. H. (1975) Sığır karaciğer ve böbrek alkali fosfatazları üzerine metil ve etil parathionun tesirleri. Doktora Tezi. Ankara.
20. ANDERSON, C. A, COCKAYNE, S. (1993) Clinical chemistry/ Concepts and applications. 260-5. W.B.Saunders Co.Philedelphia.
21. CARL, A. B, EDWARD, R. A. (1999) Tietz textbook of clinical chemistry. 3 th ed., pp.676-684, 1429,1431. W.B. Saunders Co.Philadelphia.
22. MOSS, D. W. (1992) Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin.Chem.*,38:2486-2492.
23. POSEN, S. (1965) Inactivation in the study of human alkaline phosphatase. *Ann. Int. Med.* 62: 1233.
24. KOMADO, T. (1976) Pratical purification and some properties of human liver alkaline phosphatase. *Biochim. Bioph. Acta.* 438:138.
25. COLEMAN, J. E. (1992) Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. ev.Biophys. Biomol. Struct* : 21: 441-83.
26. FISHMAN, W. H. (1974) Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *Am. J. Med.*, 56:617-50.
27. BUDDECKE, E. (1994) *Grundriss Der Biochemie*, Walter de Gruyter., 9.ed. Pp322. Berlin. Newyork
28. CALBREATH, F. D. (1992.) *Clinical chemistry a fundametal texbook.* 186-90. W:B. Saunders Co.Philedelphia.
29. FISHMAN, W. H, LIN, C. W. (1973) *Membrane phosphohydrolases, metabolic conjugation and metabolic hydrolysis.* New York Acedemic Press, p 397-98.
30. McCOMB, R.B, BOWERS, G. N, POSEN, J. (1979) *Alkaline phosphatase.* Plenum Press. New York.
31. MOSS, D.W, EDWARDS, R. K. (1984) Improved electrophoretic resolution of bone and liver ALP resulting from partial digestion with neuroaminidase. *Clin. Chem. Acta.*, 143:177.
32. SMITH, M, WEISS, W. J, GRIFFIN, C.A. et al. (1988) Regional assignment of the gene for liver/bone/kidney alkaline phosphatase to chromosome1p36.1- p34. *Genomics*, 2: 139-43.
33. Van BELLE, H. (1976) Alkaline phosphatase I. Kinetics and inhibitions by levamisole of purified isoenzyme from humans. *Clin. Chem.*, :22: 972-976.