

FOSFATAZ ENZİMLERİ

Alkalen fosfataz enzim çalışmalarına başlangıç.

Dr. Hüseyin T. SESSİZ (x)

ÖZET

Fosfataz enzimleri yirminci yüzyıl başlarından itibaren incelenmeğe başlanmışlardır. Asit ve alkalen pH'da aktif olarak fosfat esterlerini hidroliz ederler. Bunlardan alkalen fosfatazlar klinisyene daha fazla sahada yardımcıdırlar. Çalışmamızda bu konuda kliniğe yardımcı olabilecek bazı kinetik araştırmalar hedef alınmıştır.

Enzim çalışmalarında en az 100 İ.Ü./mg saflık derecesindeki enzimlerle çalışmak sonuçlara güven getirir (1,2). Bu yönüyle yazımızda önce toplu bakış açısından bu hususları ele alarak incelemeyi ve sonra her teknik kısmı ayrıntılarıyla bir seri makalelerde anlatmayı yeğledik.

Bu enzimlerin ayrılması, saflaştırılması ve kinetiklerinin incelenmesi Doğu Anadolu'da başlanan ilk çalışmadır ve sonuçlarının dünya literatürüne de bazı yenilikler eklendiğini ümit ederiz.

GİRİŞ VE AMAÇ

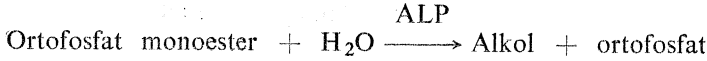
Alkalen fosfataz (ALP) enzimleri, bugün için birçok yönüyle bilinen, fakat henüz araştırılmaya muhtaç taraflar da bulunan bir grup enzimlerdir. Sırası geldikçe değinilecek konular kısmen araştırılmış olmakla beraber, günümüzde henüz ilginçliğini yitirmemiş bir bütünlüğe sahiptir. (3).

İlk çalışmalar 1907 yılında Japon araştırmacı Suzuki ile pirinç kepeğinde başlamıştır. (4). 1939'da King ve Delory ALP'nin optimum pH'sının süstrata bağımlı olduğunu, 1962'de Moss King ve arkadaşları doku orijinleri farklı ALP enzimlerinin çeşitli süstratlara karşı farklı affiniteler gösterdiklerini ortaya koydular. (5).

(x) Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biokimya Kürsüsü Öğretim Üyesi, Doçent.

Falley ve Kay, Ross ve arkadaşları Sodyum- B gliserofosfat ile maksimum ALP aktivitesini pH: 9,1 de elde ettiler. Ciddi elektroforetik ve kromatografik ALP enzim çalışmaları 1960 ve hatta 1970 yıllarından itibaren başlamıştır. Bu bakımdan ALP enzimleri hakkında esaslı değerlendirmeler, son çeyrek asrın ürünleridir.

ALP hidrolazlar grubuna girer, I.U.B.'ye göre kod no'su E.C. 3.1.3.1'dir. Sistematik adı ortofosfat mono ester fosfohidrolazdır. Genel olarak katalize ettiği reaksiyon şöyle gösterilir.



Bu enzim birçok fosfo-monoesterleri hidroliz eder, ancak diesterlere tesiri yoktur. (1,2,6). Fosfomononükleotidler hidroliz ederse de o zaman -pirofosfataz- adını alır.

Esas hidroliz yaptığı kemikaller: primer ve sekonder alkollerin, siklik alkollerin, fenol ve aminlerin fosfat esterleridir. (2). Nükleik asitler, fosfatidler gibi fosforik asit esterleri ara metabolizmada fosfatazlara önemli rol yüklerler. Bu haliyle ALP bir metabolizma enzimi olarak görev yapar.

ALP esasen bir membran enzimi olup insan ve hayvanın bütün dokularında vardır. Bitki, bakteri süt ve mayada da bulunur. (1,4). Granülositlerde ALP'nin varlığı bu hücrelerin matürasyonu ile beraber gider. Laktasyon sırasında meme bezinde, gebelikte plasentada, normalde beyinde, lenf dokusunda, lökosit, eritrosit ve spermada ALP vardır (2,4). Sıçanların bazı organ ve dokularında ALP dağılımı şöyledir. (7).

<u>İnce barsak</u>	<u>Kemik</u>	<u>Karaciğer</u>	<u>Böbrek</u>	<u>Prostat</u>	<u>Serum</u>
51,1	42,5	33,1	28,8	7,3	0,029

Organdaki aktivite Internasyonel ünite (İ.Ü)/gr. yaş doku olarak belirlenmektedir.

İnce barsak ve böbrek ALP enzimleri daha ziyade membran enzimi sayılır. Kemik alkalin fosfatazı ise hemen tamamen bir metabolizma enzimidir. Fosfatazlar % 70 oranında lizozimlerde lokalize olmuştur. Karaciğer ve safra kanallarından elde edilen ALP çoklukla mikrozomal fraksiyonlardadır. (8).

Molekül Yapı ve Safılık Kriterleri:

Bilinen kadarıyla dana ince barsağından elde edilmiş ALP (i-ALP), pH: 8,7'de 100.000 molekül ağırlığına sahiptir; sığır sütünde ve karaciğerinde 190.000 e ulaşır. E. Coli'de 40.000 molekül ağırlıklı iki izoenzimden oluşur (9).

ALP, molekül başına bir mol fosfat ve % 0,2 Zn içeren bir metallo enzimdir. i-ALP enzimi kristal bir şekilde elde edilmemiştir. N-Asetil nöraminik asit enzim yapısına girer, sialik asit girmez. Karaciğer ALP'sinde ise sialik asit bulunur ve bu enzim için negatif bir kooperasyon faktörüdür, ve aktivitesini regüle eder (10).

ALP enzimleri değişik miktar ve çeşitte sakkaroid maddeler içeren glikoprotein yapısını gösterir. Bu sakkaroidler glukozamin, galaktozamin, galaktoz, fukoz, mannoz ve ribozdur (11,12,13) Membrana bağlı enzim, otolizle veya n-butanol gibi organik solventlerle separe edilebilir. Bu usul enzim eldesinin başlangıcıdır (14, 15,16,17), Spesifik aktivitesi mg. proteini başına 100 İ.Ü.'lik preparasyonlar enzim çalışmalarında askarî kriterdir (1,2)

ALP ENZİMİ TAYİN YÖNTEMLERİ KRİTERLERİ

Enzimler oldukça özgül katalizörlerdir. Aktivite tayin yöntemlerinde özel sübstratlar kullanılır ve bu sübstrat organizma genelinde bir tanedir. Fakat alkalen fosfatazin fizyolojik sübstratı tam belirlenmediği gibi sayısı da çoktur. Fosforil kolinin fizyolojik sübstratı olabileceği tahmin edilmektedir (18).

A- Sübstrat Özgüllüğü

Aktivite tayinlerinde en çok kullanılan sübstratları; Na-B-Gliserofosfat, fenil fosfat, p-nitrofenil fosfat, α ve β naftil fosfatlar, fenolfitalein mono ve difosfatlar, Naftil AS-MX fosfatlar (2-OH, 3- Amido-N- (2',4' Dimetil fenil) naftalen fosfat'dır. Hidroliz sonucu ortaya çıkan fosfat veya fosfat ayrıldıktan sonra kalan fenol veya fosfat ayrıldıktan sonra kalan fenol veya nitrofenol gibi alkolik maddeler üzerinden ölçüm yapılarak enzim aktivitesi tayin edilir.

Tayin edilen enzim aktiviteleri her yönetime göre ayrı bir birimle gösterilebilmektedir.

1959 yılında IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry) komiteleri tarafından enzim ünitesi için internasyonal bir tarif yapılmıştır.

Bu tarife göre; dakikada 1 mikro M sübstrat değiştiren (hidroliz eden) enzim miktarı 1 İ. Ü. kabul edilmiştir. Diğer şartlar ise, optimal sıcaklık (25° veya 37°), optimal sübstrat konsantrasyonu, optimal tampon iyonik gücü (veya molaritesi) ve optimum pH'dır. Biyolojik materyelde 1 ml veya 1000 ml. ile gösterilebilir (19).

B- Aktivatörleri:

ALP'm en önemli aktivatörü magnezyum iyonudur. Magnezyum iyonunun reaksiyon ortamına ilâve edilmemesi aktiviteleri % 50 kadar düşürür.

Mg⁺⁺ iyonunun 10⁻² M konsantrasyonlarında (7) ve 10⁻⁴M konsantrasyonda (20) aktivatör role sahip olduğu, 10⁻²M dan fazlasının inhibisyon yaptığı ve 10⁻⁴M dan fazlasının ise biraz inhibitör olduğu rapor edilmiştir. Komada (1976) ise elüentlerine 20-40 mM Mg⁺⁺ ilâvesiyle hepatik ALP'ını daha aktif halde elde edebilmiştir (21).

Serumda total ALP tayinlerinde 0,1 ml. serum ile reaksiyon ortamındaki Mg⁺⁺ 2x10⁻⁵M'a gelir. Bu ise arzu edilenin 1/5'i kadardır. Sübstrat için gerekli miktar buradan hesaplanabilir (20).

İnce barsak ALP'ı için spesifik bir aktivatör 5 mM sodyum deoksikolatıdır. İnce barsak ALP izoenzimini % 120 kadar aktive eder. Diğer ALP izoenzimlerine ise inhibisyon etkisi gösterir (9,18).

İki değerlikli metal iyonlarından Zn⁺⁺, Mn⁺⁺, Co⁺⁺ iyonları da aktivatör role sahiptirler. Alaninin, Cu⁺⁺ gibi inhibe edici metal iyonlarını bağlayarak aktivasyon etkisi görülür. Saflaştırma işlemleri esnasında elektroforez-konveksiyon denemelerinde 0,01 M alanin ile kaybolan aktivitenin yerine getirilebildiği, reaksiyon karışımında ise aynı konsantrasyonda % 5-10 kadar aktivite artışı sağhyabildiği rapor edilmiştir (13).

Aktinomisin-D ve puromisin'in aktivatör etkileri ince barsak ALP elde edilmesinde görülmüştür (22,23).

Karaciğer ALP enzimi saflaştırmalarında ise sialidaz, Ca⁺⁺ ile birlikte enzimdeki sialik asidi uzaklaştırmak suretiyle ALP aktivitesini 1,3 - 1,5 defa arttırabilmektedir (21).

Üre, karaciğer, ALP'ı aktive eder..

C- İnhibitörleri:

ALP inhibitörleri, metal kelatları teşkil eden ajanlar, bazı iki değerli katyonlar ile orto fosfat ve benzeri polivan anyonlardır. Civa ve sülfid inhibitördürler. Cu⁺⁺ ve Be⁺⁺ 10⁻⁵M konsantrasyonlarda şiddetle inhibitör etkisine sahiptir. Burada magnezyuma karşı bir antagonizma söz konusudur (4).

EDTA, magnezyumu bağlayıcı bir inhibitördür. 2,5 x 10⁻²M konsantrasyonda tüm ALP aktivitesini durdurur. Sistein, iyot, siyanür, H₂S, fenantrolin 10⁻³M konsantrasyonlarda ALP'yi tamamen inhibe ederler. Zn⁺⁺ düşük konsantrasyonlarda (10⁻⁶M) aktivatör olarak tesir etmesine karşın 10⁻⁴M'da inhibitör olarak etki eder (1).

Askorbik asit, glisin, histidin, dietil ditiokarbonat inhibitör etki gösterir. 0,025 M glisin serum ALP'ını % 20 inhibe eder; 0,1 M'da inhibisyon % 60'ı bulur. 0,025 M sitrat da % 50 inhibitördür. EDTA ve sitrat haricinde diğer anti-

koagulanların etkisi (serumda) 4 saate kadar çok az veya hiç yoktur. Oda sıcaklığında bekliyen serum ALP'ı 7 güne kadar % 10 aktivite kaybeder (20).

Watanabe-Fishman (1966) L-fenil alanin ile insan ince barsak ALP'ının stereospesifik olarak inhibe edildiğini göstermiştir (24). 5 mM DL-fenil alanin intestinal ALP izoenzimini % 50-60 inhibe eder (9,25,26).

Ortofosfatlar, ALP enziminin aktif merkezini bağlayıcı olarak inhibitör etki gösterirler. 10^{-2} M Na_2HPO_4 ve sodyum arsenat % 50 inhibisyon yaparlar.]

2×10^{-5} M fosfat konsantrasyonu ALP'ı % 1'den az inhibe eder. Bu konsantrasyon 0,1 ml. serum ile oluşur. Ancak daha fazlasından kaçınılmalıdır. 0.,001-0,01-0,1 M fosfat konsantrasyonlarında sırasıyle % 25-50-90 inhibisyon görülür (2). Borat ve pirofosfat da ALP için birer inhibitördürler. Üre, kemik, böbrek, ince barsak, plesanta ALP'ını inhibe eder (1). Fenil fosfata karşı K_m 'i 0,2 mM olan ince barsakALP'ı inorganik fosfat ile inhibe edildiğinde $K_i=0,6$ mM'a yükselmektedir (9).

Karaciğer ALP'ı için bazı amino asitler ve diğer inhibitörlerin inhibisyon tipi ve K_i 'leri aşağıda topluca gösterilmiştir (21)

KAYNAK TABLO: 1- Muhtelif İnhibitörlerin Karaciğer ALP'sine olan İnhibisyonları

İnhibitör	K miktarı	İnhibisyon Tipi
L-Homoarginin	1220	non-kompetitif
L-fenil alanin	7200	non-kompetitif
L-Lösin	3900	non-kompetitif
L-Sistein	550	non-kompetitif
Zn^{++}	350	Karışık tip
Bi^{++}	92	kompetitif
PO_4^{---} 4	470	kompetitif
Tetranitrometan	6860	non-kompetitif

D-pH Optimumu ve Tamponlar:

Fosfatazlar asit ve alkali olmak üzere iki ayrı pH sahasında etkilidirler. Asit fosfatazlar pH 4-5 civarında reaksiyonu yürütürler. Alkalen fosfatazlar pH 8,5 -10 arasında ve asit fosfatazlara oranla daha yaygındırlar. Sübstratın cinsi ve konsantrasyonu ve tampon sistemi, optimum pH'yı etkiler. pH önemli miktarda sübstrata bağımlıdır. 3 mM PNPP konsantrasyonunda maksimum aktivite sırasıyle; $t= 37^\circ, 30^\circ, 25^\circ$ llerde pH= 9,9-10,1 ve 10,3 te elde edilmiştir. Her derece başına pH değişikliği $\mp 0,03$ kadardır (1,4,20).

Tampon sistemleri muhtelif olabilmekle beraber, etkinlikleri birbirinden farklıdır. Bu tampon sistemlerinden, glisin, bikarbonat ve amino metil propanol ile Tris tamponlarının ALP tayinlerinde kullanıldığı dikkati çeker.

E- Isıya Dayanıklılığı:

ALP enzimlerinin en çok derinlemesine incelenen bir kinetik özelliği, ısıya karşı davranışdır. ALP genel olarak ısıya dayanıklı bir enzimdir. Serum ALP'ı 4° ile 25° arasında 7 gün, serum-8° ile -20° arasında dondurularak saklanırsa 20 dakika dayanır. İnkübasyon sıcaklığının 25° den 35°'ye artması aktiviteyi 1,5 defa artırır (20). Dialize edilmiş idrarda oda sıcaklığında 1 gün dayanırken dialize edilmemiş idrarda en çok 6 saat bozulmadan kalabilir. Isıya en fazla dayanıklı ALP enzimi plesenta (27) orijinli olanı, en az dayanıklı olanı ise kemik (28) orijinlisidir.

Plesental ALP 56° de 30 dakika kadar stabildir (29). Isıya dayanıklılık çeşitli sübstratlarla paralel sonuçlar vermektedir. Isı inaktivasyonları genellikle 56°C ta yapılmaktadır. Fenilfosfat ve sodyum B-Gliserofosfatla 55° deki ısı ile inaktivasyon denemelerinde ilk aktivitenin % 40-60'ı kalmaktadır; 4°-25°'de 48 saat gibi uzun bir süre bekletilmekle de aktivite geriye kazanılmaz (10). 56°C'ta 5 dakika içerisinde kemik ALP'ı bandı tamamen, karaciğer ALP'ı 10 dakikada hafifçe (30), ince barsak ALP ise pek az inaktif olmaktadır (31,32,33). Böbrek ALP'ı 60°C'ta 1/2 dakikada tamamen inaktif olmaktadır. Isı ile inaktivasyon 5mM Mg⁺⁺ iyonunun olup olmaması, inaktivasyon sonucunu değiştirmemektedir (9).

TARTIŞMA ve SONUÇ

ALP tayin yöntemlerini etkileyen önemli iki faktör vardır. Biri serumdaki ALP aktivitesinin takriben 10⁻⁴mg/ml gibi düşük bir konsantrasyonda bulunuşu, diğeri ise serumdaki fosfat ve de reaksiyon sonucu artan fosfat konsantrasyonlarıdır. Bu bakımdan hidroliz sonucu açığa çıkacak ürün, reaksiyona inhibe edici etki yapmamalı hidrolize giren ise hidroliz olanla aynı dalga boyunda maksimum bir pik vermemelidir.

ALP enziminin fazlaca sübstrat özgüllüğü göstermemesi ve aktivitenin daha sonra izah edilecek diğer faktörlere çokca bağlı olması, sübstratın seçiminde bir önceki paragraftaki hidrolizin sonucunda karşılıklı önleyici koşulların yerine getirilmesine önem kazandırır. p-Nitro fenil fosfat (PNPP) bu şartları yerine getiren oldukça iyi bir sübstrattır. Reaksiyona sokulan PNPP renksiz bir madde olup hidrolizde teşekkül eden p-nitrofenil (PNP) ise koyu sarı bir bileşiktir ve kanda bulunmaz. Reaksiyonun hızı, veya aktivite PNP üzerinden gidilerek hesaplanır. Bu sübstratla 10 mM'a kadar sübstrat inhibisyonu görülmez. Serumda hidroliz,

3 mM sübstratla 30 dakikada sona ermektedir (20). PNPP sübstrat için K_m pH 8,5 da 2 mM'dır. Fenil fosfat Na-B-Gliserofofat için K_m 6,6 mM olarak bulunmuştur.

Fenil fosfat sübstratı, Na-B-Gliserofosfat eşliğinde hidroliz edilirse fenil fosfat, Na-B-Gliserofosfat tarafından kompetitif olarak inhibe edilmektedir (14,31).

İnce barsak ALP fenil fosfatı, Na-B-Gliserofosfata tercih etmektedir. Sadece fenil fosfata karşı K_m 0,2 mM'dır (9).

ALP'ın birçok fosfat bileşiklerini sübstrat olarak kabul etmesi değişik K_m değerlerini ortaya çıkarır. Bu nedenle herbir sübstrata ait bir K_m değeri vardır. Ayrıca herbir sübstratın düşük ve yüksek konsantrasyonlarında da bu K_m değerlerinin değiştiğinden bahsedilir. Dolayısıyla ALP Michaelis-Menten klâsik teorisine kısmen uyan kinetik davranışlar gösterir. Kinetiği etkileyici birçok faktörlerin K_m 'in değişimine mutlak tesirleri vardır (1,4). Bu bakımdan K_m değerlerinin, optimum şartları belirlenmiş reaksiyon kinetikleri için önemi söz konusudur.

K_m , enzimi identifie etmek için en uygun bir parametredir. En zim sübstratla reaksiyona girdiği zaman diğer denge reaksiyonlarındaki gibi reaksiyon hızını belirleyen enzimin sübstrata karşı ilgisini gösteren bir denge sabiti olarak K_m 'e mutlak ihtiyaç vardır (1,34).

Böbrek ALP'ının fenil fosfata karşı affinitesi biraz fazladır. Bununla birlikte 3-Fosfo gliserik asit gibi daha başka sübstratları da kullanabilmektedir. Sübstrat özgülüğü yönünden dikkate alındığında böbrek ALP'ının K_m 'i Naftil fosfat için $3,8 \times 10^{-3}M$ değerini vermektedir (13). Fluoresan hidroliz ürünü veren sübstratlardan Naftil AS-MX fosfat ile K_m , serum için $1,38 \times 10^{-4}M$ bulunmuştur. ALP enzimlerinin daha aktif olarak bağlanabildikleri bir sübstrat gibi görünmektedir (35).

Mg^{++} iyonlarına aktivite tayinlerinde mutlak ihtiyaç vardır. Ancak düşük Mg^{++} konsantrasyonlarında aktivatör etkisine rağmen, yüksek Mg^{++} konsantrasyonlarından da sakınılmalıdır. Schales domuz böbreğinden elde ettiği ALP'ın aktivitesini ortama Mg^{++} ilâve etmeden yaptığı ölçmelerde aktiviteyi % 50 kadar düşük bulmuştur (13). Johnson ise Mg^{++} iyonlarına bu nedenle Kofaktör gözüyle bakmaktadır (35). Mg^{++} iyonunun/aktivatör etkisinin $2 \times 10^{-4}M$ 'dan fazlasında kalmadığını ve aksine inhibitör etkisi gösterdiğini söylemektedir (20). Berghmeyer ise bu aktivasyonun oldukça yüksek konsantrasyonlarda devam ettiğini klasik bir bilgi olarak kitabında vermektedir (1).

Başlangıçta özetle bildirecek olursak amacımıza yönelik tayin yöntemlerini geniş bir tarama ile tesbit ettik. Bunlar ileri işlemlerle de birlikte incelemeğe olanak sağlayacak nitelikte olmalıydı.

SUMMARY

PHOSPHATASE ENZYMES

The phosphatase enzymes which are actively hydrolysed to phosphate esters at the both acidic and basic pH have been investigating since the early of 20 th century. In more cases, the alkaline phosphatase enzymes are helpfull for clinician.

In our research paper, some works on kinetics have been regarded at the same individuals.

It gives safety to the results to study with enzymes that are pure at a degree 100 I.U. per mg. of enzyme protein, at least (1,2). For this reason, first of all, we have decided to speak about these articles.

These series will be the first-articles that reveal the enzyme seperations, purification and investigation of kinetics in East Anatolia; and we hope that the research will bring a new supplementary findings to literature.

KAYNAKLAR

1. BERGHMEYER, H.U.: Methods of Enzimatic Analysis, 2nd Ed., Verlag Chemie, 1965.
2. BOYER, P.D.: The Enzymes, Vol I-II, Academic Press, Newyork, 1970.
3. MOSS, D.W.: Multiple forms of alkaline phosphatase: Some topics of current interest., Histochemical Journal. 6: 343-360, 1974.
4. GÖKHUN, İ.H.: Sıçan Karaciğer ve böbrek alkali fosfatazları üzerine methyl ve ethyl parathionun tesirleri., A.Ü. Tıp Fak. Biyokimya Kürsüsü, Ankara, 1975.
5. MOSS, D.W., KING, E.J.: Properties of alkaline phosphatases fractions seperated by starch gel electrophoresis. Biochem. J., 84 192-95, 1962.
6. COLOWICK, S.P., KAPLAN, N.O.: Metods in Enzymology, Vol: 1, Acaademic Press, Newyork, 1962.
7. HASCHEN, R.J.: Enzymdiagnostis, Gustave Fischer Verlog Stuttgart, 1970.
8. HAROLD, A. HARPER: Çeviri; Mentş N.K., Mentş, G.: Fizyolojik Kimyaya ya Bakış, 14. Baskı, Ege Üni. Matbaası, İzmir, 1976.
9. MOSS, D.W.: Properties of Alkaline- phosphatase Fractions in Extracts of Human Small Intestine. Biochemical J. 94: 485-462, 1965.
10. MOOG, F. , VIRE, H.H., GERY, R.D.: The Multiple Forms of Alkaline Phosphatase in The Small Intestine of the Young Mouse. Biochim. Biophys. Acta. 113: 336-349: 336-349, 1966.

11. KOMADA, T., HOKARI, S. and SAKAGISHI, Y.: *Journal of Analytical Chem, Japan*, 24: 209-212, 1975.
12. ANDREWS, P.: Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel-filtration. , *Biochem. J.* 91: 222-233, 1964.
13. SCHALES, O. ARAI, K.: Preparation and Properties of Highly Purified Alkaline Kidney Phosphatase., *Achives of Biochem. and Biophysics.* 83: 152-160, 194.
14. MOSS, D.W. : *Nature*, 200: 1206, 1963.
15. MORTON, R.K.: The purification of Alkaline Phosphatases of Animal Tissues.: *Excerpta Med. Biochem.*, 57: 595, 1954.
16. MOSS, D.W.: Separation and characterization of alkaline phosphatase isoenzymes. *Pure Apply Chem.*, 3: 397-402, 1961.
17. AHMED, Z., KING, E.J.: Pufication of Placental Alkaline Phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* 40: 320, 1960.
18. OKUBO, A. LANGERMAN, KAPLAN, M.M.: Rat Liver Alkaline Phosphatase. *J. Biol. Chem.* 249 (22): 7174-7180, 1974.
19. GRADWOHL'S Clinical Laboratory Methods and Diagnosis; Vol 1 7 th Ed., Mosby St. Louis, Mo., 1970.
20. BOWERS- G.N., McComb, R.: A continuous Spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase., *Clin. Chem.* 12: 70-78, 1966.
21. KOMODA, T. , Sakagishi, Y: Partial purification and some properties of human liver alkaline phosphatase., *Biochimica et Biophysica Acta.* 438: 138-152, 1976.
22. MOOG, F.: *Science*, 144: 414, 1964.
23. MOOG, F. : *Advenced Enzyme Regulation*, 3: 221, 1964.
24. WATANABE, K. and FISHMANN- W.H.: *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 252, 1964.
25. GREEN- S., CANTOR, F., INGLISH, N.R.: Normal Serum Alkaline Phosphatase Isoenzymes Examined by Acrylamide and Starch Gel Electrophoresis and by Isoenzyme Analysis Using Organ-Specific Inhibitors. *Normal serum Alkaline Phosphatase isoenzymes Exa.* 57: 52-64, 1972.
26. GERHARDT, W., NELSON, L., NIELSON, V., STATLAND, B.E.: Routine Measurements of Liver and Bone Alkaline Phosphatase in

Human serum: Differential Inhibition by L-Phenylalanine and Carbamide (Urea) on The LKB 8600 Reaction Rate Analyzer. *Clinica Chimica Acta*. 53: 281-290, 1974.

27. RHONE, D.P., MIZUNO, F.M., GIDASPOW, H.: Profiles of serum isoenzymes of alkaline phosphatase in hepatobiliary disorders using cellulose acetate electrophoresis and organ-specific inhibitors. *Ann. Clin. Laboratory Science*. 3: 353-361, 1973.
28. HEALY, P.J.: Serum alkaline phosphatase activity in sheep. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 52: 375-385, 1974.
29. YOUNG, J.M.: Origins of serum alkaline phosphatase. *J. Clin. Path.* 20: 647-653 1967.
30. FRITSCH, H.A., ADAMS, P.H.R.: Cellulose Acetate Electrophoresis of Alkaline Phosphatase Isoenzymes in Human Serum and Tissue. *Clinical Chemistry*. 18: 417, 1972.
31. MOSS, D.W. and KING, E.J.: *Biochem. J.* 84: 192, 1962.
32. WARNOCK, M.L.: Characterization of tissue and serum alkaline phosphatases. *Clin. Chim. Acta*, 14: 156-165, 1966.
33. POSEN, S., NEALE, F.C. and CLUB, J.S.: *Ann. Internal Med.*, 62: 1234, 1965.
34. CANTAROW, A., SCHEPARTZ, B.: *Biochemistry*, 4 th Ed., W.B. Saunders Co., Phila. 1967.
35. JOHNSON, R.B.: A New fluorometric method for the estimation or detection of total fractionated alkaline phosphatase. *Clin. Chim.* 15: 108- 123, 1969.