

## ALKALEN FOSFATAZ

### III. Dokuda ALP Aktivitesi Tayinleri

Dr. Hüseyin T. SESSİZ (x)

#### Ö Z E T

*Çalışmaya başlamadan önce araştırma amacımıza yönelik tayin yöntemlerini geniş bir tarama ile tesbit etmeğe çalıştık. Bunlar, ileri işlemlerde birlikte incelenmeye olanak sağlayacak nitelikte olmalıydı. Bu nedenle alkalen fosfataz enziminin aktivitesinin tayini, kaynakların ön doğrultusunda tesbit edilmeğe çalışıldı. ALP aktivitesi tayini için üç ayrı yöntem incelendi. Protein tayinleri ise bilindiği üzere sıklıkla kullanılan yöntemler olup üzerinde herhangi bir değişiklik yapmağa gereksinme duyulmayacak duyarlıktadır.*

*Saflaştırma konusu özellikle protein biokimyasının çok özel bir dalı olması nedeniyle uygulanan birçok işlemlerde ayırma kademelerinin tesbitinde saflaştırma, yöntemlerinde belirtilen işlemlerin türü, sırası, süreleri ve ayıraç yüzdeleri bakımından öncelikle denendi. Alkalen fosfataz enziminin kinetik özelliklerinin incelenmesinde yöntemlerin çalışma koşullarının tüm içeriği ile belirlenmesi gereğine inanıyoruz. Çünkü kinetik olguların belli bir düzende incelenmesi ve tartışılması gerekir (1,2).*

#### Giriş

Doku homojenize edilmek suretiyle belirli bir örnekte yöntemler gereğince ALP aktivitesi aranır. Daha sonraki kinetik işlemlerde incelenecek faktörler, çeşitli konsantrasyonlarda toplam hacmi hesaba katarak dahil edilir. Bu bakımdan kinetik araştırmalara esas olan tayin yöntemlerini ayrıca vermeyi kısaltma yönünden uygun bulduk.

#### Yöntemler ve Eksperimental Bulgularla Değişiklikler

Dana ince barsak mukozası ayrıldıktan sonra hacminin üç katı kadar 0°C'ta distile suda homojenize edilip, pH'sı 7,5'a ayarlandı. Sıcaklığı sabit tutulmak üzere

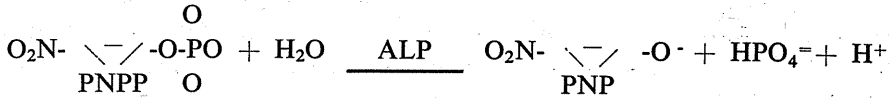
(x) Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Kürsüsü Doçenti.

buzla soğutulurak 45.000 devirde iki dakikada homojenize edildi. Buchner hunisindeki nötür hale getirilmiş tamponlu pamuk süzgeçten süzülerek yağları ve çözünmeyen agregatlar uzaklaştırıldı. Süzüntüler de 0°C'ta soğutma plağı üzerinde toplandı. Genellikle bu veya benzer şekilde elde edilen doku homojenizatlarında enzim aktiviteleri tayin edilebilir.

Kan v.b. sıvı materyellerdeki aktivite tayin yöntemleri doku homojenizatlarına uyarlanılarak, bunlarda ve daha saf örneklerde analiz yapıldı.

#### a- Değiştirilmiş Bessey-LoWry-Brock Yöntemi 3)

Prencip: p-nitro fenil fosfat substratı ALP ile hidrolize edildiğinde p-nitro fenol (PNP) ve inorganik fosfata parçalanır. Açığa çıkan PNP asit solüsyonlarda rensiz, alkali solüsyonda sarı renk veren indikatör bir maddedir. İndikatör olarak pH 5-7 sınırlarında renk değiştirir. Aktivite tayinine PNP miktarı ölçülerek gidilir. Reaksiyon şöyle yürür;



Ayıraçlar:

1. Alkalin tampon 2-Amino-2-Metil-1-Propanol (2A2MIP) 0,625 M pH 10,15
2. Sübstrat p-nitrofenil fosfat (PNPP) tamponlu 9,1 mM pH 10,15
3. NaOH 0,02 N ayarlı.
4. NaCl konsantre.

İşlem :

Ayıraçlar	Tüpler K (x) N	İşlemler (i)
Sübstrat, tamponlu (ml)	1 (v) 1	5'/37° preinkübasyon
Doku Ekstresi (ml)	— 0,1	
Su (s) (ml)	0,1 —	30'/37° İnkübasyon
0,02N NaOH (10 ml)	+ + (.)	OD1/415 nm(h), 10' sonra
HCl (ikişer damla)	+ +	OD2/415 nm

Hesap : OD ALP = OD1 — OD2 bulunur. Grafikten değerlendirilir.

Açıklama: Bütün denemeler, anlaşılma ve işlem (teknik) kolaylığı bakımından semalar halinde gösterilecektir. Şema içerisindeki kısaltmalar bundan sonra da aynen kullanılacaktır.

(x) : K = K r t b 

N = Nümune (deney) t b 

(v) : (ml) = Tüplere konan sının (ml.)'si

(i) : 5'/37°C = 37°C'ta c'ta 5 dakika su banyosunda tüplerin  n  n ıstılması. Preinkübasyon.

(s) : Su = Deneylerde ve ayıralarda taze cam distile su kullanıldı. Aksi yazılmadıkça "Su" kelimesi distile suyu ifade edecektir.

(.) : ++ = İlgili ayıratan parantezde yazıldığı miktarda konur.

(h) : 415 nm/10'sonra =spektrofotometrede belirtilen dalga boyunda okuma yapılır.

Standardizasyon :

1. Stok standart p-nitrofenol PNP 10 mM

0,1391 gr. PNP. gr. PNP 100 ml suya oz ld .

2. Çalışma satandardı 0,05 mM

3. Çalışma standardından (st) 11 t be sırasıyle;

st : 0-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 (ml) pipetlenir.

Su : 10-9-8-7-6-5-4-3-2-1-0 (ml) konur.

0,02 N NaOH : Herbir t be (1,1 ml.) ilâve edilir.

Saflaştırma çalışmalarında uluslararası ünite birimi ( $\mu$  M/ml/dk. hidroliz. hızına çevrilerek grafiklenmiş ve değerlendirmeler ona göre yapılmıştır.

Standart tüpler içerisindeki her ml. Çalışma standardı için 0,05 mikro M PNP vardır. Doku için bu standart değerler sırasıyle: 5-10-15-20-25-30-35-40-45-50 İ. . x 10<sup>2</sup>'ye tekabül ederler.

Doku ekstresinde ALP aktiviteleri tayinleri için standardizasyon işlemleri kaynaklarda verilmemektedir. Biz, bu yöntemde ve diğer ikisinde aktiviteyi İ /ml/dk. cinsinden uluslararası birimle ifade edebilecek şekilde hesaplarla tesbit ettik. Her birinde standarizasyon grafiği çizerek ünite hesaplamalarında faydalandık.

#### b- Morton Yöntemi (4)

Prensip : Bu yöntemde Na-B--Gliserofosfat sübstratının pH 9,5 da hidrolizi sonucu açığa çıkan inorganik fosfat tayin edilerek ALP aktivitesi ölçülür. Doku

çalışmalarında Morton tarafından kullanılan bu yöntemde  $Mg^{++}$  iyonunu 2 mM yerine 5 mM konsantrasyonda kullandık.

Ayırıcılar :

1. Tamponlu sübstrat Na-B-gliserofosfat pH 9,5, 4 mM;
2. Triklor asetik asit (TCA) % 20 (w/v);
3. Amonyum molibdat ayırıcı 0,02 M;
4. Amino naftol sülfonik asit (ANSA) renk ayırıcı 0,01M;
5. Stok fosfor standardı 3 mikro M/ml.

İşlem :

Ayırıcılar		Tüpler		İşlemler :
		K	N	
Sübstrat, tamponlu	(ml)	5	4,8	5'/37°C Preinkübasyon
Doku Ekstresi	(ml)	—	0,2	5'/37°C İnkübasyon
TCA % 20	(ml)	2,5	2,5	
Amonyum molibdat	(ml)	1	1	
ANSA	(ml)	0,4	0,4	Okuma : 10'/660 nm'de

Hesap :

$$1) \text{ Fosfor I} = \frac{\text{mikroM /fosfor (grafikten)}}{0,2} \times 5$$

Fosfor tayini için inkübasyon yapılmadan yukarıdaki işlemler aynen uygulanır, formülden fosfor miktarı hesaplanır.

$$2) \text{ Fosfor II} = \frac{\text{mikroM/ml fosfo (grafikten)}}{5 \text{ dakika} \times 0,2, \text{ ml serum}} \\ = \text{mikroM/ml fosfor (grafikten)}$$

$$\text{ALP (İÜ)} = (\text{mikroM/ml/dk}) = \text{Fosfor II} - \text{Fosfor I}$$

Fosfor I miktarı hemen hemen okunamayacak değerde ise, fosfor II miktarı direkt, grafikten okunarak (İÜ) ALP bulunur.

Standardizasyon :

Standart tüplerinin hazırlanışı :

Tüp No

	K	1	2	3	4	5
Çalışan St. (ml)	0	1	2	3	4	5
Su	5	4	3	2	1	0
Grafik değeri	0	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5 mikroM/ml fosfor

Olacak tarzda çalışılan standartlar elde edilir. Bu konsantrasyonlarda, yöntem göre spektrofotometrik okumalar normal sınırları aşmaz, Tüp 5'in okunması 0,60 OD. civarındadır.

**c- Değiştirilmiş Romel Yöntemi: (5)**

**Prinsip :** Fonolfitalein monofosfat (FFMP) alkalen ortamda hidroliz sonucu, fenolfitalein (F.F) ve inorganik fosfata (Pi) ayrılır. Aktivite tayinine kendisi alkalen vasatta pembe renge sahip olan F.F. üzerinden gidilir.

**Ayıracılar :**

1. Alkalen tampon 2A2MIP, 0,625 pH 10,15;
2. Sübstrat FFMP, tamponlu 2,5 mM pH 10,15;
3. Renk stabilizeri, 0,1M pH 11,2;
4. Stok F.F. standardı 2,5 mM

**İşlem :**

Ayıracılar	Tüpler		İşlemler
	K	N	
Sübstrat, tamponlu	(ml) —	1	5'/37°C Preinkübasyon
Su	(ml) 1	—	
Doku Ekstresi	(ml) —	0,1	20'/37°C İnkübasyon
Renk Stabilizeri	(ml) 5,1	5,0	20'sonra/550 nm.de okunur

**Hesap :** ALP aktivitesi standart grafiğinden bulunur.

**Standardizasyon :** Bir ml. stok F.F. standardı 50 ml.ye sulandırılır. Çalışılan standartta 0,05 mikroM/ml. F.F. bulunur. Bu standartın 1-2-3-4-ml. sine 5,1-4,1-3,1-2,1 ml renk stabilizleri sırasıyla konur. Hemen 550 nm de okunur. Okunan optik dansiteler sırasıyla, 0,025 0,050-0,075-0,100 İÜ/ml/dk'ya karşdır.

## TARTIŞMA

Total alkalen fosfataz aktivitesi ölçümü herbir yöntemde sübstrat ve reaksiyon ortamının pH'sına şiddetle bağlıdır. Aktivite tayinleri in vitro 8,5-10,5 gibi fizyolojik pH'dan oldukça sapan değerlerde yapılmaktadır (6,7). Aktivite tayin pH'sı bu derecede değişik olan yöntemlerde ilk aranacak husus pH'nın stabilize edilmesidir. Ölçülen aktivitenin de sıhhatı çoğunlukla buna bağlıdır. Son yıllarda pH'yı sabit bir değerde tutmak üzere sıklıkla 2A2MIP maddesine tamponluk görevinin verildiği görülmektedir. (6,7,8,1). Oda ısısında az acı olan bu sıvı madde 30° de sıvılaştırılarak kullanılmakta olup 0,1M çözeltisinin tabii pH'sı 11,4 tür.. ALP aktivite tayin yöntemlerinden bu tamponu kullananlarda pH 10,17 (6). 10,25 (8). 10,40 (9). gibi değerlere rastlanır. PNPP ve FFMP sübstrati ile ALP tayinlerinde pH 10,15'i benimsedik. 2A2MIP tamponunda pH 10,15'te 10,3'e göre aktivite iki kat fazla tesbit edilmiştir. İnkübasyon sıcaklığının 25° yerine 37° olarak alınması birim zamandaki aktiviteyi arttırdığından 37°C'ı kullandık. Bowers-McComb (6) ve diğerleri fizyolojik sıcaklığa uygun olan 37°C 'ta inkübasyonları yürütmüşlerdir.

Çok küçük aktivitelere enzim tayin edileceğinden aktiviteyi en iyi gösterebilecek yöntemi tesbit ve değişiklikleri yapma gereğini duyduk. Tris tamponu, aynen 2A2MIP gibi gayet iyi aktivite sonuçları alınmasına yardım eder. Tris'in sudaki 0,05 M çözeltisinin de pH'sı 10,3'tür. Glisinin tamponluğunu yaptığı yöntemde ise aktivite çok düşük tesbit edildi. Glisinin suda 0,2 M çözeltisinin pH'sı 4'tür. (9). PNPP sübstratının gereksinmesi olan hidroliz pH'sından çok düşük olması ve de glisinin ALP'a inhibitör gibi etki, etmesi bu tampon sisteminin ALP aktivite tayin yöntemlerinde kullanılmamasını gerektirir.

Tris ve 2A2MIP tamponları çoğunlukla fenolik hidroliz ürünleri veren sübstrat sistemlerinde yer alır (8,10,11,12). Bu sistemlerde ise aktivite tayini fenolik bileşikler üzerinden gidilerek yapılır. Fenolfitalein, p-nitro fenol v.b. maddeler birer indikatör olup ortamın pH'sından şiddetle etkilenirler. Bu yönüyle, alkalik pH'da renklendirilmelerinin yanlış sonucu götürmemesi bakımından kullanılan NaOH ve benzeri alkali renklendirici veya renk stabilizler, pH'yı ayarlanandan dışarı çıkarmamalıdır.

Tamponların molaritelerinin çok değişken bir şekilde kullanılması pH'yı etkileyen ikinci bir konudur. Tampon molaritesi 2A2MIP için 0,4-0,7 M konsantrasyonlar arasında ise pH'11,20 değerinde sabit kalabilmektedir. Bu molariteler dışında pH 11,30'dan 11,15'e kadar değişir. Haliyle pH'nın sabit kalmaması indikatör olan hidroliz ürünlerinin rengine aktiviteye bağlı olmayan artışlara veya azalışlara neden olabilir.

Tris ve 2A2MIP tamponları Na-B-gliserofosfat sübstratının hidrolizinde ürün, fosfat iyonudur. Bu yöntemde optimal tãmon konsantrasyonu 0,6-1,0 M arası-

dır. Her iki incelemede tampon konsantrasyonunun 0,6 ile 0,7 M arasında bir değerde kullanılması gereği çıkar.

Samuel yönteminde (8) 2A2MIP 0,625 M'dır. Romel ve Bessey-Lowry-Brock yöntemlerinde 0,5 M'dır. 2A2MIP tampon sisteminin pH 10,15 'de 0,625 M olarak kullanılması, Samuel yöntemiyle aynı olması yanında diğer yöntemlerdeki değerlerin biraz üzerindedir. Tamponun cinsi, molaritesi ve pH'sını iyice belirlemekten gayemiz en önemli etkenin, benimsenen ALP aktivitesi tayin yöntemleriyle sonraki sübstrat kinetiği çalışmalarında tampona bağlı ayrıcalıklar yaratmasıdır. Yöntemlerin en iyi çalışır duruma getirilmeleri için önce bazı değişkenler bu şekilde gözden geçirilerek en elverişli koşullar arandı.

PNPP sübstrat hidrolizinde biz pH'yi 10,15 de tutarken Balestrileri-1975-pH 10,2'yi ercih etmiş ve beyin dokusunda 37° de 5 dakikalık inkübasyonla aktiviteye geçmiştir. (13) Biz 9,1 mM PNPP sübstratından 1 ml.yı 0,1 ml. enzim ile hidroliz ederken, önceki yöntemde 5 mM'lik PNPP sübstratından 2,9 ml. kullanılmıştır. Bizim sübstratımızın konsantrasyonu daha düşük olarak bulunmuştur ki PNPP sübstratı 10 mM'dan sonra inhibisyon yapmaktadır (6).

Orijinal Bessey-Lowry-Brock yönteminde, % 400 mg PNPP stok sübstrat çözeltisi tamponla yarı yarıya seyreltilerek hazırlanırken 1 M MgCl<sub>2</sub>'den 0,1 ml. ilâve edilerek 1 mM'lik Mg iyonu konsantrasyonu içeren sübstrat elde edilir. Biz PNPP sübstratımızı direkt çalışılan konsantrasyonda % 200 mg. (9,1 mM) mağnezyum iyonu bulunan 0,625 M, pH 10,15 2A2MIP tamponunda hazırladık. p-Nitrofönil fosfat çözeltisinin ancak 3-5 gün gibi kısa sürelerde dayanıklı olduğu göz önüne alınırsa taze hazırlanması önem kazanmış olur. Zira PNPP çözeltisi eskidiği zaman 415 nm. dalga boyunda alkali ortamda absorbands veren p-nitrofenol oluşturmaktadır. (3).

Değişik Romel yöntemimizde FFMP sübstratını taze olarak ve içinde 5 mM mağnezyum iyonu bulunan 0,625 M pH 10,15 2A2MIP tamponda hazırladık. Orijinalde konsantre tamponlu sübstrat halinde hazırlanan reaksiyon karışımından bir damla konsantre bir ml. suya damlatılarak seyreltme yapılmaktadır. Bu durum pH'da protikte çok az da olsa 10,15 ile 10,30 uçlarına doğru sapmalara neden olmaktadır. Reaksiyonda pH 11,20 'lik renk stabilizeri kullanılarak hidroliz sonucu oluşan fenolfitaleinin standardizasyondaki gibi aynı pH'daki ortamda okunması gerekir. Halbuki deneylerimizde tamponun 0,4-0,7 M konsantrasyonları dışında pH 11,20 değeri aşılmaktadır. Diğer yöntemde i-ALP aktivitesinin bu tamponla kararlı sonuçlar verdiği konsantrasyon 0,6-1,0 M arasındır.

Bowvers-Mc Comb 2A2MIP tamponunun 0,75 M'da 30°C'ta aktiviteyi en çok pH 10,17 'de elde etti (6). İlâveten tamponun iyonik gücünü 0,1-,1,0 M arası NaCl ilâvesiyle arttırdığında aktivitenin azaldığını gözledi. Bu veriler eşliğinde, 2A2MIP tamponunun aktivite tayin yöntemlerimizdeki pH denemeleri ve konsantras-

yon artışlarındaki olgularımızdan 2A2MIP tamponunu 0,625 M ve pH 10,15 olarak belirledik.

Orijinal yöntemdeki standardizasyon işlemlerinde çalışılan F.F. standartlarına 5,14-4,14-3,14-2,14 ml. gibi küçük kesirli renk stabilizeri ilâve edilmektedir. Biz bunun yerine, 5,1-4,1-3,1-2,1 ml. gibi daha güvenilir pipetleme ler sağladık. Standardizasyon işlemleri, doku ALP aktivitesine uygun uluslararası ünite cinsinden hesaplanarak yöntemdeki standardizasyon işlemlerinde yerine kondu.

PNPP sübstratının hidrolizi ile aktivite tayini sonuçları FFMP sübstratına göre daha yüksek değerler vermektedir. Diğer bir çalışmada Bessey-Lowry-Brock yönteminde PNPP sübstratında FFMP sübstratına oranla bizimki gibi ince barsak ALP'ı için daha fazla hidroliz gözlenmiştir (12). Aynı kaynakta diğer doku ekstreleri için de benzer durum kaydedilmiştir.

ALP aktivitesinin tayini için Na-B-gliserofosfat sübstratının hidrolizi suretiyle kullanılan diğer bir yöntem klasik Bodansky yöntemidir. 1933 yıllarında orijinal Bodansky yöntemindeki Na-B-gliserofosfat sübstratının hidrolizi pH 8,6'da 2 mM sübstrat konsantrasyonunda yapılıyordu. 2 mM konsantrasyonda sodyum barbital tamponu eşliğinde hidroliz edilerek aktivite tayin edilmiştir. Roe-Whitmore 1938 yılında işlemlerde sadece renk ayırıcı olarak kalay-2-klorür yerine, daha hassas ANSA'yı koyarak Bodansky yöntemindeki gibi 700 nm.. dalga buyunda ki absorbans ile aktivite tayinine geçti (14). Morton dana ince barsağında ALP aktivitesi tayini için 5 ml. reaksiyon karışımında 20 mikromol Na-B-gliserofosfatı 40 mikromol sodyum barbital ve 10 mikromol magnezyum iyonları varlığında pH 9,5 da hidroliz yaptı.

Morton (1950) tarafından işletilen bu yöntem Behal (1965) tarafından aynen ince barsak doku ekstrelerine uygulandı. Shinowara-Jones-Reinhardt, total ALP aktivitesini aynı sübstratla pH 9,3 de tayin edilmiştir (14). Magnezyum iyonlarının aktivatörlüğü (6,7,10,15,6,17) önemsenmesi gereken bir konudur. Morton yöntemindeki reaksiyon karışımında bulunan 2mM magnezyum iyonu konsantrasyonu deneysel olgularımızla 5 mM olarak değiştirilmiştir. Birçok yöntemlerde bu özellik belirgindir (15,16,18,19). Sadece bir yöntemde 16 mM magnezyum iyonu kullanılmıştır (17). Az bir kısmında 2,5 mM magnezyum iyonuna rastlanır. Magnezyum, pirofosfataz aktivitesini saf dışı eder. ALP aktivitesinin ölçümünde ALP'a aktivatörlük yaparken aynı zamanda çok az da olsa ortamda bulunabilecek pirofosfataza inhibitör etki gösterir (20). Bu iki nedenle magnezyum varlığı ve konsantrasyonu ALP aktivitesi tayininde önemli rol oynar.

Sodyum B-gliserofosfat sübstratı, reaksiyon karışımında aynı molaritede kullanılmıştır. Sodyum barbital tamponu tabii pH'sının sodyum-B-gliserofosfatın maksimal hidroliz hızındaki pH ile aynı olması (9) yöntem için bir avantajdır.



## SUMMARY

### The Determinations of Tissue ALP Activities

An attempt was made to find out the most sensitive methods for determining the intestinal ALP enzyme activities in young calves. The Romel's, B.L. Brock's and Morton's methods were modified for kinetic experiments in our laboratory, and standardized according to international units. It was concluded that the B.L. Brock's method is the best one to study the enzyme kinetics which is also most suitable for the routine clinical usage.

## K A Y N A K L A R

1. MOSS, D.W.: Multiple forms of alkaline phosphatase: Some topics of current interest., *Histochemical Journal*. 6: 353-360, 1974.
2. MOSS, D.W.: Separation and characterization of alkaline phosphatase isoenzymes. *Pure Apply Chem.*, 3: 397-402, 1961
3. BESSEY, A., Lowry, O.H., Brock, M.J.: A Method For the Rapid Determination of Alkaline Phosphatase With Five Cubic Millimetres of Serum., 164: 321, 1940.
4. BEHAL, F.J., Center, M.: Heterogeneity of Calf Intestinal Alkaline Phosphatase. *Arch. Biochem.*, 110: 500-505, 1965.
5. ROMEL, W.C., La Mancusa, S.J. and DuFrene, J.K.: Detection of serum alkaline phosphatase isoenzymes with phenolphthalein monophosphate, following cellulose acetate electrophoresis., *Clin. Chem.* 14: 47-57, 1968.
6. BOWERS, G.N., McComb R.: A continuous Spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase., *Clin. Chem* 12: 70-78, 1966.
7. KOMODA, T., Sakagishi, Y.: Partial purification and some properties of human liver alkaline phosphatase., *Biochemica et Biophysica Acta*. 438: 138-152, 1976.
8. CHU, S.Y., Turkington, V.E., Vea, C., Cheung, P.: An improved electrophoretic method for alkaline phosphatase isoenzymes determination. *Clin. Biochem.* 8: 415-418, 1975.
9. MERCK Index: 8th. Ed., Merck and Co., Inc. Rahway, N.J., 1968.
10. JOHNSON, R.B.: A New fluorometric method for the estimation or detection of total and fractionated alkaline phosphatase. *Clin. Chim.* 15: 108-123, 1969.

11. HOAG, S. , Charm, S., Raam, S.: Optimal conditions for isolating human placental alkaline phosphatase by immunosorption. *Immunochemistry*. 12: 833-837, 1975,.
12. WOLF, M., Dinwoodie, A., Morgan, H.G.: Comparison of alkaline phosphatase isoenzymes activity using five standard methods. *Clin. Chim. Acta*, 24: 131-134, 1969.
13. BALESTRIERI, C., Colonna, G., Irace, G., Cedrangold, F.: Purification and some properties of an alkaline phosphatase from beef brain. *Comp. Biochem. Physiol.* 50 B: 203-207, 1975.
14. GRADWOHL'S *Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*; Vol 1 7 th Ed., Mosby St. Louis, Mo., 1970.
15. SCHALES, O., Arai, K.: Preparation and Properties of Highly Purified Alkaline Kiney Phosphatase., *Achives of Biochem. and Biophysics*. 83: 152-160, 1959.
- 16- MOSS, D.W.: Properties of Alkaline -Phosphatase Fractions in Extracts of Human Small Intestine. *Biochemical J.* 94: 458-462, 1965.
17. MOOG, F., Vire, H.H., Grey, R.D.: The Multiple Forms of Alkaline Phosphatase in the Small Intestine of the Young Mouse. *Biochim. Biophys. Acta*. 113: 336-349, 1966.
18. AALUND, O., Rendel, J.: Freedland, R.A. Isolation and characterization of bovine alkaline phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta*, 110: 113-123, 1965.
19. ATASAGUNGİL, M.: *Klinik Biokimya ve Araştırma Metodları*, Güzel İstanbul Matbaası, Ankara. 1962.
20. EATON, R.H. , Moss, D.W.: Kinetic Studies on the Orthophatase and Inorganic Pyrophoshatase Activities of Human Alkaline Phosphatases. *Alkaline Phosphatase Kinetics*. 35: 168-178, 1968.