

ALKALEN FOSFATAZ: IV. ALP Enziminin Kinetik Davranışları (İzoenzim konsantrasyonu ve -muhtelif sübstratlar ile pH ilişkileri)

Dr. Hüseyin T. SESSİZ (x)

Ö Z E T

1) *i-ALP enzimi için maksimal aktivite tamponun pH'sına olduğu kadar, konsantrasyonuna da fazlaca bağlıdır. 2A2MIP ve tris tamponları pH 10,15 ile 0,625 M olarak FFMP ve PNPP sübstratları için optimal bir aktivite tayinine olanak sağlar, p-nitrofenil fosfat ve Na-B-gliserofosfat sübstratlarıyla doku ekstratlarında i-ALP enzim tayin yöntemlerini araştırmalarımızla geliştirdik.*

Hidroliz hızı B sisteminde iki kat artmıştır. Bessy-lowry-Brock yönteminde ALP aktivitesini 10,8 kat arttırmak mümkündür. Glisin tamponları 0,5 M'a kadar aktivite azalmalarına sebep olur, tris ve ondan da iyisi 2A2MIP tampon sistemi aktivite tayinine en uygun olanıdır. Ölçülebilen sınırdaki enzim konsantrasyonu 0,60 0 D'ye eşlenik aktivitelerin üstünde gerçekten düşük değerler vermektedir.

2) GİRİŞ VE AMAC

Tamponun cinsi molarite ve pH'sını iyice belirlemekten gayemiz; en önemli 2 etkenin, benimsenen ALP tayin yöntemleriyle sonraki sübstrat kinetiği çalışmalarında tampona bağlı ayrıcalıklar yaratmamasıdır. Yöntemlerin en iyi hale getirebilmeleri için önce bazı değişiklikler bu şekilde gözden geçirilerek en elverişli koşullar arandı. Çok düşük aktivitelere enzim tayin edilebileceğinden aktiviteyi en iyi gösterebilecek değişiklikleri aradık.

Enzim miktarı arttığı zaman reaksiyon hızında bir artış görüldü. Çok klasik olan bu konudan girerek elde ettiğimiz i-ALP enziminin bu uyarılığından başlamak istedik.

3) Y Ö N T E M L E R

Kinetik yöntemlerde bu şekilde herbirinin işlemleri önceden anlatıldığı tarzda yürütüldü. Her bir incelemenin kendine özgü ilâve teknikleri belirtilerek reak-

x) Doç. Dr. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bilim Dalı Öğretim Üyesi, Erzurum.

siyon karışımındaki esas ayraçlar, yöntemlerinde belirlenen konsantrasyonlar değişmeyecek şekilde kullanıldı. Reaksiyon karışımındaki incelenen maddelerin konsantrasyonlarının değerleri bulgular kısmında takdim edildi. Reaksiyon deney şeması halinde incelendi.

K.1- Tampon Tipinin ve Molaritesinin Seçimi:

Sübatrat konsantrasyonları orijinal çalışma konsantrasyonuna getirilmiştir. Bu standardize şartlar diğer denemelerde de hesaplanarak sağlanmıştır.

K.1-a. PNPP sübatrat yöntemi ile inceleme:

Kullanılan yöntem: Modifiye Bessey-Lorwy-Brock

Sübatrat (tamponsuz) 27,3 mM, PNPP (% 600 mg)

Tamponlar : 3 M, pH 9,5 olan A) glisin

B) Tris, C) 2A2MIP

Deney Şeması Ia-Modifiye Bessey-Lowry-Brock Yönteminde Tamponların incelenmesi.

Bütün tüplerde sübatrat 1 ml. alınmış, distile su ile hacimler 3 ml'ye tamamlanmışlardır. 37°C'ta 5 dakikalık preinkübasyondan sonra 0,1 ml. enzim ilâve edilip 37°C'ta 10 dakika tatbik edilerek ve 10 ml. 0,02N NaOH ile renklendirme yapılarak 10' sonra 415 nm'de absorbanlar okunmuş ve değerlendirilmiştir.

K.1.b- Na-B-gliserofosfat Yönteminde Muhtelif tamponların İncelenmesi:

Tamponlar burada daha geniş konsantrasyon sınırları içerisinde deneye dahil edilmişlerdir. Deneyler aynı pH ve sıcaklıkta yapılmıştır. Aşağıdaki tek deney şeması halinde üç ayrı tampon sistemi 0-1,5 Molar arasında 0,1 Molar konsantrasyon artışlarında denenmişlerdir.

Kullanılan Yöntem: Morton

Sübatrat, (tamponsuz): 8 mM, Na-B-Gliserofosfat

Tamponlar : 2,5 M, pH 9,5 olan A) Glisin

B) Tris C) 2A2MIP

Deney Şeması I-b-Morton Yönteminde Muhtelif Tamponların İncelenmesi.

Önceki Deney şemasındaki gibi ilgili metoda ait deney şemasının 0,0-3,0 ml. arasında 15 tüpte tamponlar ilâve edildikten sonra diğer uygulamalar aynen yürütülmüştür.

K.2- i-ALP. İzoenzimin Artan Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi:

Kullanılan Yöntem: Modifiye Romel
Süstrat : 2,5 mM, pH 10,15 FFMP
Tampon : 0,625 M; pH 10,15 2A2MP

Deney Şeması II- Enzim Konsantrasyonunun Arttırılması.
 Deney tüplerine 1 ml. süstrat, 2,5-0,5 ml arasında tamponla hacimler tamamlandıktan sonra enzim 0,1-1,0 ml. arasında artan konsantrasyonlarda ilâve edildi. Diğer işlemler Modifiye Romel metodundaki gibi yürütüldü.

4) BULGULAR

B- Enzim Kinetiği İle İlgili Bulgular:

B.1- Yöntemlerle Tampon Tipine ve Molaritesine Ait Bulgular: Reaksiyon ortamının pH'sı fenolik hidroliz ürünleri mevcudiyetinde büyük önem arz eder. Orijinal yöntemde 0,04 ml konsantre FFMP süstratının hacmi 26 defa sulandırılmaktadır. Bu sulandırma pH'yı az da olsa etkileyebilir. Keza hidroliz ürününde pH 11,2'lik alandan kayabilir. Aşağıdaki deney sistemi ile pH = 11,2'yi sabit tutan tampon konsantrasyonu araştırılmıştır.

Tamponların denenmesinden önce bazı parametrelerin ön taraması yapılmıştır. İnkübasyon sıcaklığı 25° ve 37°C alınarak pH 10,3 ve pH 10,15 değerleri sınanmıştır. Böyle bir deneme modifiye Romel yöntemi ile FFMP süstrat (2,5 mM) kullanılarak yapılmıştır. Farklı i-ALP aktivitesinde ki enzimlerin FFMP süstratını hidrolizi sonucu, pH ve sıcaklık kriterleri ile birlikte aşağıdaki bulguları vermiştir.

TABLO: I- Çeşitli Sıcaklık ve pH Değerlerinde Hidroliz Hızı Bulguları

Deney Sistemi ve Aktiviteler	Tüp Numaraları							
	St ₁	St ₂	St ₃	St ₄	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄
Süstrat(A) için ODx10 ² (İnkübasyon 25°C, pH 10,3)	23	46	68	88	19	28	14	15
Aktivite (İ.Ü./litre)	25	50	57	100	(21)	(31)	(16)	(17)
Süstrat (B) için ODx10 ² (İnkübasyon 37° C, pH 10,15)	22	44	64	84	40	50	29	33
Aktivite (İ.Ü./litre)	25	50	75	100	(45)	(57)	(33)	(37)
(B) Sistemi için Hidroliz hızı artışı (%)	—	—	—	—	115	84	106	118

Açıklama: St = Modifiye Romel yönteminde kullanılan standartların değerlendirilmesi.
 N = Dört ayrı dilüe enzimin A ve B kritik pH ve sıcaklıklarındaki aktiviteleri.

Açıklama : St = Modifiye Romel-yönteminde kullanılan standartların değerlendirilmesi.

N = Dört ayrı dilüe enzimin A ve B kritik pH ve sıcaklıklarındaki aktiviteleri.

FFMP sübstratı, pH 10,15 te, t=37°C'ta hidroliz edildiği zaman, pH 10,3 ve t= 25°C'a kıyasla yaklaşık bir misli daha artmaktadır.

FFMP ve PNPP sübstratlarını kullanan ALP tayin yöntemleri (sırasıyla modifiye Romel-ve modifiye Bessey-Lowry-Brock) 2A2MIP tamponuna ilâveten glisin tamponu ile de çalışılarak bulgular karşılaştırıldı. Her bir ALP tayin yöntemi belirtildiği şekilde uygulandı. Bessey-Lowry-Brock yöntemi glisin tamponu ile işletildiği zaman bu yöntemin Sigma modifikasyonu kullanılmış olur. FFMP yöntemi, glisin tamponu ile sadece buradaki deneyimizde kullanılmaktadır. Deneyler ALP tayin yöntemleri işlemlerine göre yapıldı.

TABLO II- PNPP ve FFMP Sübstratları Kullanan İki Ayrı Yöntemle 2A2MIP Tamponu ile Glisin Tamponlarına ait Aktivite Bulguları

AKTİVİTELER	Yöntemler (x) ve Tamponlar			
	P N P P		F F M P	
	2A2MIP	Glisin	2A2MIP	Glisin
(MikroM/ml/dk)	2,7	0,8	0,64	0,25

(x) = Yöntemle, kullanılan sübstrata göre yazılmıştır.

Aynı aktivitenin dört ayrı çalışma yöntemleriyle en aktif olarak (en fazla ünite) tesbit edildiği yöntem PNPP yöntemidir. Ancak bu yöntemde dahi kullanılan tamponun cinsi aktiviteyi etkilemektedir. Glisin tampon kullanan yöntemlerde aktivite, genel olarak diğer tamponlara göre düşüktür. En aktif yöntemin modifiye Bessey-Lowry-Brock olduğu en az aktif olanına kıyasla mevcut aktivitenin 10,8 kat kadar tesbit edilebildiği görülmektedir.

B.1-a-PNPP Sübstrat yönteminde Tamponlar:

TABLO III:- Modifiye Bessey-Lowry-Brock Yönteminde Deney Şemasında 1.a-ya göre tamponların molaritelerinin artışı ile i-ALP izoenzim aktivitesi arasındaki bulgular:

K İ N E T İ K	T ü p N u m a r a l a r ı				
	1	2	3	4	8
Tampon Molariteleri(M)	0,1	0,1	0,3	0,4	0,5
Glisinde aktivite (OD)	0,130	1,120	0,095	0,080	0,060
Trisde Aktivite (OD)	0,421	0,462	0,500	0,530	0,540
2A2MIP'de Aktivite(OD)	0,445	0,470	0,550	0,580	0,595

Glisin-tris ve 2A2MIP tamponları 0,1-0,5 M arası yukarıdaki yöntemde kullanıldı. Aynı enzim konsantrasyonunda yapılan aktivite tayinlerinde absorbanslar glisinde 0,130, triste 0,421, 2A2MIP'de 0,445 okumalarını, 0,1 M tampon konsantrasyonlarında gösterirken tampon konsantrasyonu arttıkça (0,5 m'a kadar) glisinde aktivite azalmaları, diğer ikisinde ise aktivite artışları gözlemlendi.

B.1-b- Na-B-gliserofosfat süstratı yönteminde Tamponlar:

TABLO: IV- Morton Yönteminde, Deneş Şeması 1.b-ye Göre Muhtelif Tamponların Molaritelerinin artışı ile i-ALP İzoenzim Aktivitesi Arasındaki Bulgular.

KİNETİK	Tüp N u m a r a l a r ı														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Tampon Morolitelere(M) Glisinde	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
Aktivite ODx10 ² Triste	12	11	8	7	6,5	6	7	5,8	5,8	5,6	5	5	5	5	5
Aktivite ODx10 ² 2A2MIP'de	43	45,5	51	52,5	54	60	61	62	62	62	61,5	62	61,5	59	58
Aktivite ODx10 ²	45	46,5	54,5	57	59	60	61	62	62	62	61,5	62	61,8	60	59

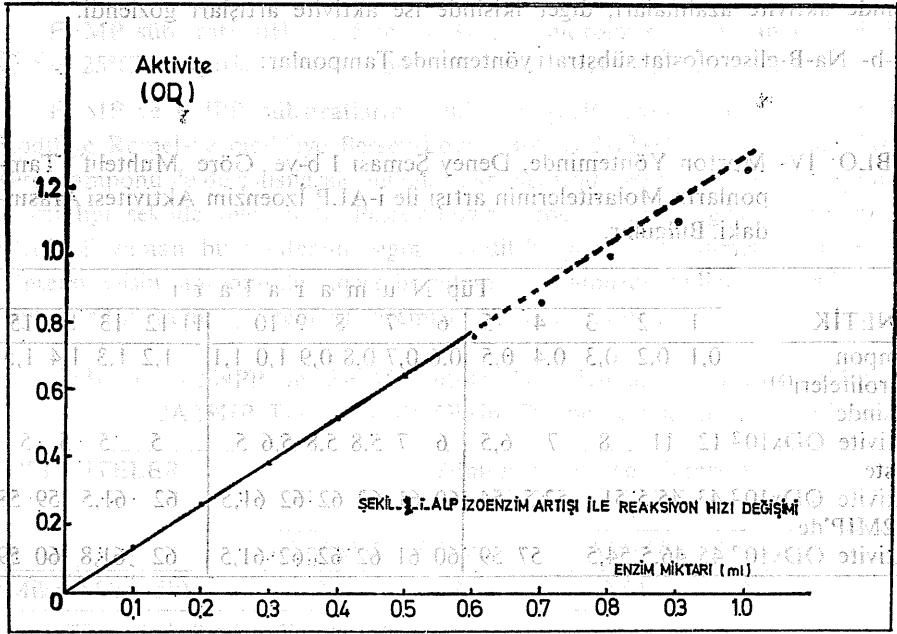
Tamponların molariteleri her tüpte 0.1 M artırılarak 0.1-1.5 M arası denenmişlerdir. Bu üç tampon ALP tayin yöntemlerinde genellikle kullanılmaktadırlar. i-ALP izoenzimi aktivitesi tayininde glisin tamponunun molaritesinin artması nisbetinde aktivite (OD) düşmektedir ve de diğer iki tampona kıyasla aktivitesi düşük bulunmuştur. Tris ve 2A2MIP tamponlarının konsantrasyonu arttıkça i-ALP aktivitesi de artmaktadır. 2A2MIP ve tris tamponlarının konsantrasyonları 0,6-1,0 M arasında iken edilen aktivite optimal bir değere ulaşmıştır. Konsantrasyonun 1,0 M dan daha fazla artması aktivitede önemli bir artış meydana getirmiştir.

B.2-i-ALP İzoenzim miktarı artışı ile reaksiyon hızındaki değişiklik bulguları:

TABLO: V- Deneş Şeması II'ye göre Enzim Miktarlarının Artırılması ile Reaksiyon hızının Artışı.

ENZİM (ml)	T ü p n u m a r a l a r ı									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aktivite (OD)	0,13	0,26	0,38	0,52	0,64	0,76	0,86	1,00	1,10	1,26

-Enzim konsantrasyonu hacimlerinin 0,1 den 1,0 M'a kadar artırılması sureti ile aktivite incelenerek aktivitenin de 0,13'den 1,26 OD'ye arttığı görüldü. Aktivite artışlarını enzim miktarı ile ilgili grafiği Şekil 1'de çizilmiştir.



ŞEKİL 1. ALP İZOENZİM ARTIŞI İLE REAKSYON HIZI DEĞİŞİMİ

5) TARTIŞMA ve SONUÇ

Total alkalen fosfataz aktivitesi ölçümü her bir yöntemde sübstrat ve reaksiyon ortamı pH'sına şiddetle bağlıdır. Aktivite tayinleri invitro 8,5-10,5 gibi fizyolojik pH'dan oldukça sapan değerlerde yapılmaktadır (2,3). Son yıllarda pH'yi sabit bir değerde tutmak üzere sıklıkla 2A2MIP maddesine tamponluk görevinin verildiği görülmektedir(2,3,4,5). Oda ısısında az acııcı olan bu sıvı madde 30°C'de sıvılaştırılarak kullanılmakta olup 0,1M çözeltisinin tabii pH'sı 11,4'tür ALP aktivite tayin yöntemlerinden bu tamponu kullananlarda pH 10,17 (2), 10,25 (4), 10,40(6), gibi değerlere rastlanır. PNPP ve FFMP sübstratı ile ALP tayinlerinde pH 10,15 'i benimsedik. 2A2MIP tamponundan pH 10,15'te 10,3'e göre aktivite iki kat fazla tesbit edilmiştir. Tris tamponu, aynen 2A2MIP gibi gayet iyi aktivite sonuçları alınmasına yardım eder. Tris'in sudaki 0,05M çözeltisinin de pH'sı 10,3 'tür (kendi şişesinde). Glisinin tamponluluğunu yaptığı yöntemde ise aktivite çok düşük tesbit edilir. Glisinin suda 0,2 M çözeltisinin pH'sı 4'tür (6). PNPP sübstratının gereksinmesi olan hidroliz pH'sında çok düşük olması ve de glisinin ALP'a inhibitör gibi etki etmesi bu tampon sisteminin ALP aktivite tayin yöntemlerinde kullanılmamasını gerektirir kanısındayız.

Tris ve 2A2MIP tamponları çoğunlukla fenolik hidroliz ürünleri veren sübstrat sistemlerinde yer alır (7,8,4,9). Bu sistemlerde ise aktivite tayini fenolik bileşikler üzerinden gidilerek yapılır. Fenol fitalein, p-nitro fenol v.b. maddeler birer indikatör olup, ortamın pH'sından şiddetle etkilenirler. Bu yönüyle, alkalik pH'da renklendirmelerinin yanlış sonuca götürmemesi bakımından kullanılan NaOH ve benzerli alkali renklendirici veya renk stabilizerleri, pH'yi ayarlanandan dışarı çıkarmamalıdır.

Tamponların molaritelerinin çok değişken bir şekilde kullanılması pH'yi 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 renginde aktiviteye bağlı olmayan artışlara veya azalışlara neden olabilir.

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

Samuel yönteminde (4) 2A2MIP 0,625 M'dir. Romel ve Bessey-Lowry-Brock yöntemlerinde 0,5 M dir. 2A2MIP tampon sisteminin pH 10,15'de 0,625 M olarak kullanılması, Samuel yöntemiyle aynı olması yanında diğer yöntemlerdeki değerlerin biraz üzerindedir.

PNPP sübstrat hidrolizinde biz pH'yi 10,15 de tutarken Balestrieri (1975) pH 10,2'yi tercih etmiştir (9).

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 tutulmuştur ki PNPP sübstratı 10 mM'dan sonra inhibisyon yapmaktadır (2). Orijinal Bessey-Lowry-Brock yönteminde, % 400 mg PNPP stok sübstrat çözeltisi tamponla yarı yarıya seyreltilerek hazırlanırken 1 M MgCl₂'den 0,1 ml. ilâve edilerek 1 mM'lik Mg iyonu konsantrasyonu içeren sübstrat elde edilir. Biz PNPP sübstratımızı direkt çalışılan konsantrasyonda % 200 mg. (9,1mM) magnezyum iyonu bulunan 0,625 M, pH 10,15 2A2MIP tamponunda hazırladık. p-Nitrofenil fosfat çözeltisinin ancak 3-5 gün gibi kısa sürelerde dayanıklı olduğu göz önüne alınırsa taze hazırlanması önem kazanmış olur. Zira PNPP çözeltisi bayatladığı zaman 415 nm. dalga boyunda alkali ortamda absorbanı veren p-nitro fenol oluşturmaktadır (11). Halbuki deneylerimizde tamponun 0,4-0,7 M konsantrasyonları dışında bile pH 11,20 değeri aşılmaktadır.

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

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

S U M M A R Y

ALKALINE PHOSPHATASE: IV. The Kinetic Behaviour of ALP Enzyme (The concentrations of Izoenzyme and various substrates and PH.

The i-ALP enzyme activity is mostly due to pH of the buffer as well as the concentration. It is valuable to use 2A2MIP and tris buffers in pH 10,15 and 0,625 M for the optimal ALP activity using PPMP and PNPP substrates.

In the system, the hydrolytic rate has increased two-fold. It is possible to elevate the ALP activity for 10,8 times with Bessey-Lowry-Brock methods. While glycine buffers cause to decrease of the i-ALP activities, in contrast tris buffers and especially 2A2MIP buffer systems are the most appropriate ones.

It would be found in the decreasing values of ALP activities regarding over 0,60 O.D. in the normal range of measureable enzyme concentrations.

1) GRADWOHL'S Clinical Laboratory Methods and Diagnosis: Vol 1,7-th Ed., Mosby St. Louis.

2) BOWERS, G.N., McComb, R.: A continuous Spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase., Clin. Chem. 12: 70-78, 1966.

3) KOMODA, T., Sakagishi, Y.: Partial purification and some properties of human liver alkaline phosphatase., Biochimica et Biophysica Acta. 438: 138-152, 1976.

5) MOSS, D.W.: Separation and characterization of alkaline phosphatase isoenzymes. Pure Apply Chem., 3: 397-402. 1961.

4) CHU, S.Y., Turkington, V.E., Veal C., Cheung, P.: An improved electrophoretic method for alkaline phosphatase isoenzymes determination. Clin. Biochem. 8: 415-418, 1975.

6) MERCK Index: 8th. Ed., Merck and Co., Inc. Rahway, N.J., 1968.

7) JOHNSON, R.B.: A New fluorometric method for the estimation of detection of total and fractionated alkaline phosphatase. Clin. Chim. 15: 108-123, 1969.

8) HOAG, S., Charm, S., Raam, S.: Optimal conditions for isolating human placental alkaline phosphatase by immunosorption. Immunochemistry. 12: 833-837, 1975.

9) BALESTRIERI, C., Colonna, G., Irace, G., Cedrangold, F.: Purification and some properties of an alkaline phosphatase from beef brain. Comp. Physiol., 50 B: 203-207, 1975.

