

**ALKALEN FOSFATAZ: V. ALP Enziminin Reaksiyon Hızına Elektrolitlerin, Amino Asitlerin, Antikoagülan EDTA'nın Tesirleri**

Dr. Hüseyin T. SESSİZ (x)

**ÖZET**

*i- ALP izoenzimine, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> iyonları ile muhtelif amino asitlerin ve EDTA'nın etkileri muhtelif konsantrasyonlarda değişik tarzda olmuştur. 5 mM Mg<sup>++</sup> iyonları konsantrasyonu, enzim aktivitesi için optimal bir konsantrasyondur; 50 mM'den fazlası inhibitör etki göstermiştir. -0 Fosfat iyonları 50 mikro M'da % 11,5 ve 50 mM'da % 95'e varan bir inhibisyon göstermektedir.*

*L-Fenil alanin enzimatik hızı 5 mM konsantrasyonda % 56,8 azalmıştır; argininde ise bu azalma % 41,8'dir, Glisin 50 mM. konsantrasyonda % 40 inhibisyon oluşturmuştur. Diğer amino asitler çok düşük konsantrasyonda bile inhibitör etkiye sahiptirler. Sadece alanin hafif bir aktivasyona sebep olmuştur.*

*Antikoagülan olarak kullanılan EDTA 0,5 mM'lık konsantrasyonda enzim aktivitesini yarı yarıya azaltmıştır.*

**GİRİŞ VE AMAÇ**

Alkaleen fosfataz enzimlerinin kan elektrolitlerinin ve antikoagülan maddelerin eşliğinde ne derece enzim aktivitesinde değişikliklerine neden olabileceği ve özellikle Mg<sup>++</sup> iyonlarının enzim aktivitesindeki değişik görüşlere açıklık getirmesi gibi hususlar amaç edinilmiştir. Oldukça saflaştırılmış ALP enzimi bu gayelere hizmet yönüyle kinetik çalışmalara tabi tutulmuştur. Kinetik ALP tayin yöntemlerinde kullanılan reaktiflerdeki ve kan kimyasındaki bazı mevcut faktörlerin gerçek aktiviteyi tesbit etmekteki etkinliklerini öğrenmek esas gayelerdendir. Özellikle Na-B-Gliserofosfat gibi kullanılan bazı substratların neticenin eldesindeki etkinliği veya riski olup olmadığı yönünden araştırmaya gerek duyulmuştur.

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

## YÖNTEMLER

K. 3- Sodyum, Potasyum iyonlarının fizyolojik ve yüksek konsanrasyonlar do-  
laylarında i-ALP inzoenziminin reaksiyon hızına etkileri.

**Kullanılan Yöntem : Morton**

**Sübrat tamponlu : 8 mM, pH 9,5 Na-B-Gliserofosfat.**

**Deney Şeması I- Sodyum İyonu Konsantrasyonunun Arttırılarak Raksiyon Hı-  
zının İncelenmesi.**

### Deney Tüpleri

#### Ayrıçalar

	1							
	K	Kont.	2	3	4	5	6	7
Sübrat, tampon (5 ml)	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 1 M ( ml)	—	—	—	—	—	—	2,5	5
NaCl 0,140 M ( ml)	—	—	—	—	—	—	5	—
NaCl 0,1 M ( ml)	—	—	0,5	2,5	—	5	—	—
Su " " ( ml)	10	5	4,5	2,5	0	0	2,5	0
<b>5°/37°C Preinkübasyon</b>								
ENZİM (0,1 ml)	—	+	+	+	+	+	+	+
<b>10°/37°C İnkübasyon</b>								
TCA (2,5 ml)	+	+	+	+	+	+	+	+
Amonyum Molib (1 ml)	+	+	+	+	+	+	+	+
ANSA	+	+	+	+	+	+	+	+

10' sonra / 660 nm'de okunur.

Bu deney şeması, bundan sonraki şemalara benzer bir örnek teşkil etmektedir.

**Kullanılan Yöntem : Morton**

**Sübrat Tamponlu : 8 mM, pH 9,5 Na-B-Gliserofosfat**

**Deney Şeması II- Potasyum İyonu Konsantrasyonu Attırılarak Reaksiyon Hızının  
İncelenmesi.**

**Deney Şeması I'de olduğu gibi.**

Sübrat 5 ml alınarak, KCl 0,1 M ve KCl 0,005 M dan uygun hacimlerde  
(0,5-5 ml arası) tüplere sırasıyla ilâve edildi. Distile su ile hacimler 10 ml'ye ta-  
mamlandı. Enzimimizden 0.1 ml. önceden olduğu gibi ilâve edildi. Diğer inküba-  
yon ve renklendirme safhaları aynen metoda bağlı olarak tatbik edildi.

K.4- Mağnezyum iyonlarının i-ALP izoenziminin Reaksiyon Hızına Etkisi:

Kullanılan Yöntem : Morton

Sübatrat, tamponlu : 8 mM pH 9,5 Na-B-Gliserofosfat (Mg<sup>++</sup> yok)

Mg<sup>++</sup> çözeltisi : 1 mM-10mM-100mM500 mM-2000 mM (Mg Cl<sub>2</sub>)

Deney Şeması III- Mg<sup>++</sup> İyonu Konsantrasyonunun Artışı ile Reaksiyon Hızının İncelenmesi.

Deney Düzeni:

Herbir Mg<sup>++</sup> çözeltisi için, yedişer tüplük ayrı seriler halinde çalışıldı. Aynı deney şeması kullanıldı.

K.5- Fosfat İyonların i-ALP İzoenziminin Reaksiyon Hızına Etkileri:

Fosfat iyonları, çok düşük konsantrasyonlarda mikro M ve düşük (mM) konsantrasyonlarda çalışıldı.

K.5-a- Çok düşük (mikroM) Fosfat Konsantrasyonlarında Reaksiyon Hızının İncelenmesi:

Kullanılan Yöntem : Morton

Sübatrat, tamponlu : 8 mM, pH Na-B-Gliserofosfat

Fosfat Çözeltileri : A) 10 Mikrom B) 100 Mikrom

Deney Şeması IV-a- Reaksiyon Hızına Mikromolar Konsantrasyonlarda Fosfat İyonlarının Etkilerinin İncelenmesi

Deney Düzeni: Deneyler yedişer tüplük ayrı serilerde her bir fosfat çözeltisi ayrı -ayrı tatbik edilerek, uygun şemaya göre yürütüldü.

K.5-b- Düşük (mikroM) Konsantrasyonlarda Fosfat İyonlarının Reaksiyon Hızına Tesirleri:

Kullanılan Yöntem : Modifiye Romel

Sübatrat, tamponlu : 5 mM, pH 10,15 FFMP

Fosfat Çözeltileri : A) 10 mM, B) 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Deney Şeması V-b- Reaksiyon Hızına Milimolar Fosfat Konsantrasyonlarının Etkilerinin İncelenmesi.

İlgili metoda göre yürütüldü.

K.6. Bazı Amino Asitlerin, i-ALP İzoenziminin Reaksiyon Hızına Etkileri:

Kullanılan Yöntem : Morton

Sübatrat, tamponlu : 8 mM, pH 9,5 Na-B-Gliserofosfat

Amino asit çözeltileri: 10 mM, A) Sistin B) Alanin, C) Arginin, D) L-Fenilalanin, E) Aspartik Asit, F) Glutamik asit, G) Glisin (100 mM).

**Deney Düzeni:** Şemada gösterildiği gibi yedişer tüplük deneylere amino asit çözeltilerinin ayrı serilerde yapıldı.

### Deney Şeması V- Reaksiyon Hızı - Amino Asit İlişkilerinin İncelenmesi

		Deney Tüpleri						
Ayrıraçlar		K	0	1	2	3	4	5
ENZİM	(0,1 ml)	—	+	+	+	+	+	+
Amino asit çöz.	( ml)	—	0	0,5	1	1,5	2	2,5
Su	( ml)	5	2,5	2	1,5	1	0,5	0
5/37°C Preinkübasyon								
Sübrat. temp.	(2,4 ml)	—	+	+	+	+	+	+
10'/37°C İnkübasyon								

Renklendirmeye Morton yönteminde olduğu gibi devam edildi.

**K 7- Etilen Diamin Tetra Asetik Asidin (EDTA) i-ALP İzoenziminin Reaksiyon Hızına Etkisi:**

**Kullanılan Yöntem** : Morton

**Sübrat, tamponlu** : 8 mM, pH 9,5 Na-B-Gliserofosfat

### Deney Şeması VI- EDTA İnhibisyonunun İncelenmesi

		Deney Tüpleri						
Ayrıraçlar		K	0	1	2	3	4	5
Sübrat, temp	(2,4 ml)	—	+	+	+	+	+	+
EDTA 1 mM	( ml)	—	0	0,5	1	1,5	2	2,5
Su	( ml)	5	2,5	2	1,5	1	0,5	0

Diğer Safhalar Morton Yöntemindeki gibidir.

## BULGULAR

**B.3- i-ALP İzoenzimi ile Sodyum ve Potasyum İyonlarına İlişkin Bulgular:**

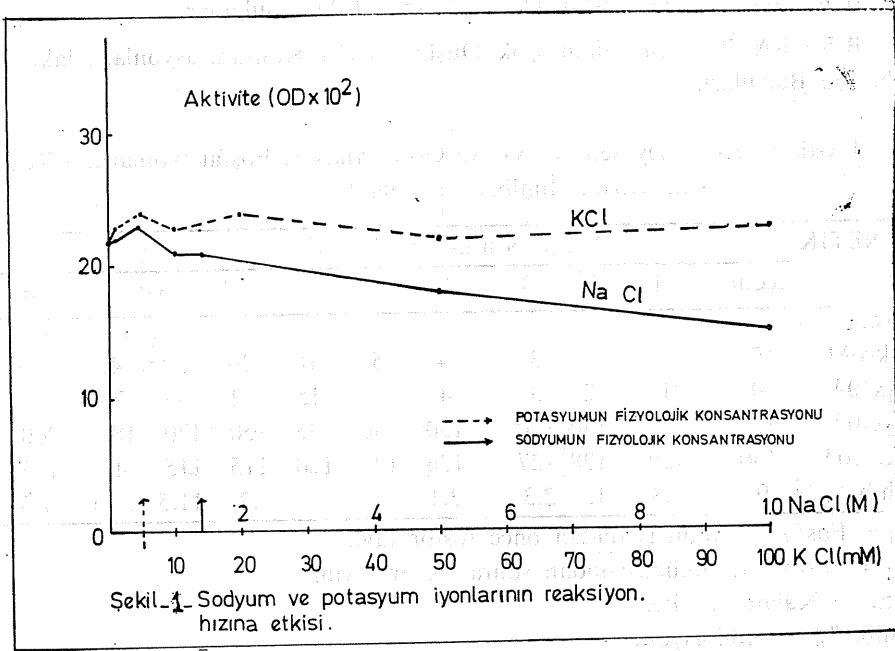
TABLO: 1- Deney Şeması I ve II'ye Göre 10-100 mM NaCl Çözeltileri ile 0,1-100 mM KCl Çözeltilerinin Reaksiyon Hızına Etkileri

K İ N E T İ K	T ü p N u m a r a l a r ı						
	1 Kont.	2	3	4	5	6	7
NaCl Molariteleri (mM)	0	10	50	100	140	500	1000
Aktivite ODx10 <sup>2</sup>	22	23,5	23	21	21	18	15
KCl Molariteleri (mM)	0	1	5	10	20	50	100
Aktivite Ox10 <sup>2</sup>	22	23	24	23	24	22	23

Açıklama: (140): mM Sodyumun Normal Serum Konsantrasyonu

(5): mM Potasyumun Normal Serum Konantrasyonu

Sodyum ve Potasyum iyonlarının kandaki konsantrasyonların çokaltında ve üstündeki değerlerde bu iyonların reaksiyon hızına etkisi şekil 1'de grafiklerle gösterilmiştir.



Şekil 1- Sodyum ve potasyum iyonlarının reaksiyon hızına etkisi.

B.4- i-ALP İzoenzimi-Mağnezyum İyonlarına İlişkin Bulgular:

5 mM'a kadar mağnezyum iyonlarının varlığında reaksiyon hızı şekil 2'de görüldüğü gibi artmıştır. Mağnezyum iyonlarının 50 mM'a kadar artışı reaksiyon hızında bir artış sağlamayıp aynı aktivitenin elde edilmesine yaramıştır. Daha yüksek konsantrasyonlarda, mağnezyumun etkisi reaksiyonu inhibe edici tarzda olmuştur. Bulgular Tablo II'de topluca yazılmıştır.

TABLO II- Deneş Şeması III'e Göre Muhtelif Konsantrasyonlarda Mg<sup>++</sup> İyonunun Enzim Aktivasyonuna Etkisi.

Tüp No.	Mg <sup>++</sup> (mM)	OD.x10 <sup>3</sup>	Aktivasyon %
0 (Kontrol)	0	(100)	—
1	0,1	115	15
2	0,5	120	20
3	1	130	30
4	5	145	45
5	10	145	45
6	50	150	50
7	100	140	40
8	250	100	10
9	800	50	—50

B.5- i-ALP İzoenzimi-Fosfat iyonlarına İlişkin Bulgular

B.5-a i-ALP İzoenziminin Çok Düşük Fosfat Konsantrasyonlarındaki İnhibisyon Bulguları:

TABLO: III- Deneş Şeması IV-a'ya Göre MikroM Fosfat İyonlarının Reaksiyon Hızına İnhibisyon Bulguları

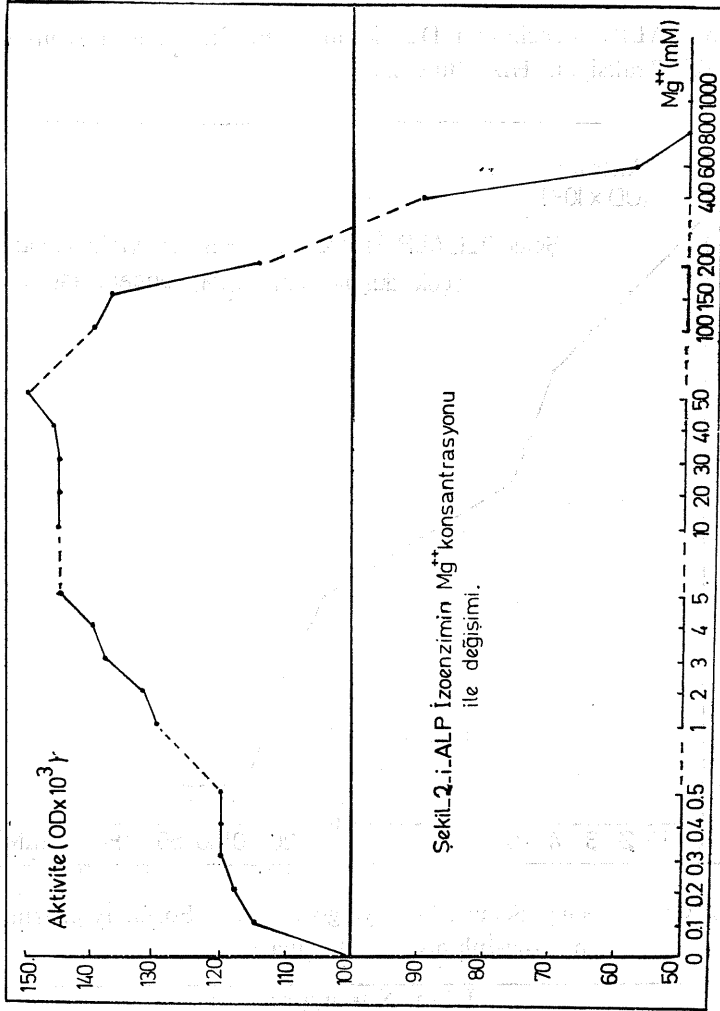
KİNETİK	T ü p N u m a r a l a r ı										
	Kont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fosfat											
mikroM	0	1	2	3	4	5	10	20	30	40	50
A <sub>1</sub> x10 <sup>3</sup>	0	1	2	3	4	7	15	32	55	70	85
A <sub>2</sub> x10 <sup>3</sup>	130	130	130	130	130	130	135	150	170	185	200
Aktx10 <sup>3</sup>	130	129	128	127	126	123	120	115	115	115	115
İnhib.%	0	0,8	1,5	2,3	3,1	5,4	7,7	9,2	11,5	11,5	11,5

A<sub>1</sub>= Fosfor I. İnkübasyondan önce fosfor tayini

A<sub>2</sub>= Fosfor II. İnkübasyondan sonra fosfor tayini

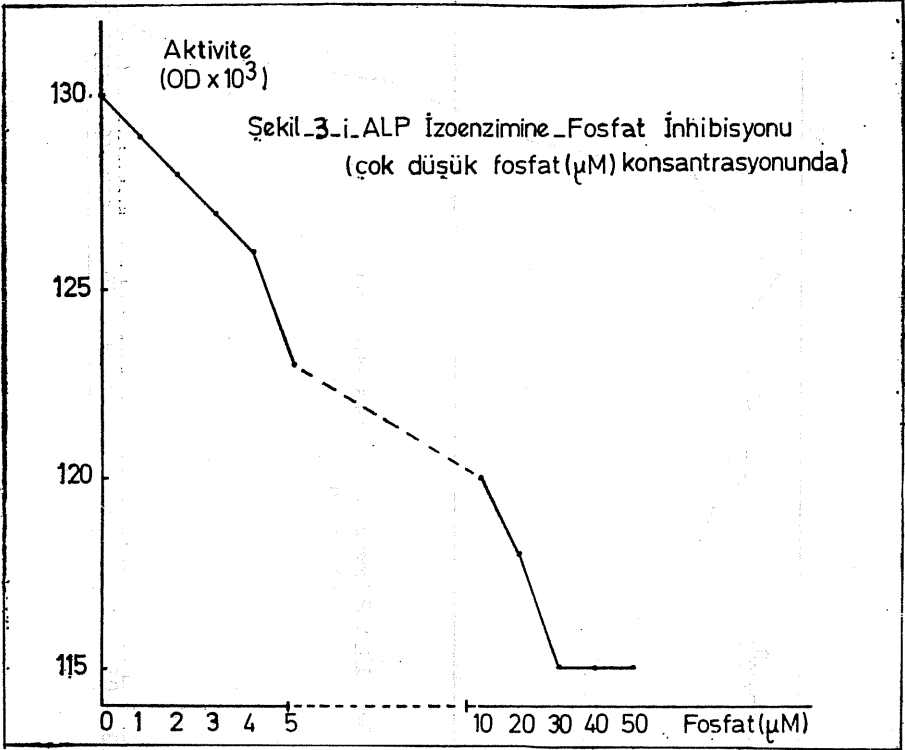
Akt. = Kalan aktivite.

İnhib. % = İnhibisyon.



Orto-Fosfat iyonları mikromolar konsantrasyonlarda (50 mikroM a kadar) reaksiyon hızını düşürdü. Sodyum-B-Glisero Fosfat substratın hidrolizinde % 11.5 a varan bir inhibisyon görüldü. Orto-fosfat iyonlarının FFMP substratının hidrolizinde inhibisyon etkileri daha yüksek konsantrasyonlarda incelenebildi. Bu inhibisyonun 50 mM fosfat konsantrasyonunda % 95' çıktığı görüldü. Bu yöntemde 1 mM fosfat ile % 2 inhibisyon meydana gelmiştir. Ara konsantrasyonların değerleri Tablo III, IV de gösterilmiştir ve ilişkin grafikler şekil 3-4 de çizilmiştir.

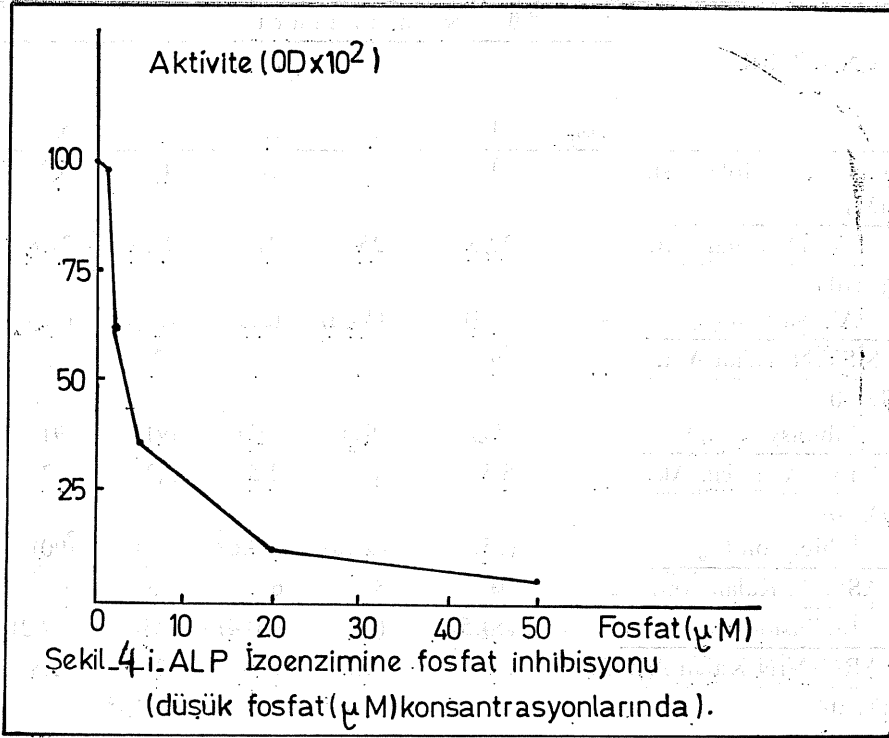
B.5.b- i-ALP İzoenziminin Düşük (mM) Fosfat İyonları Konsantrasyonlarındaki Reaksiyon Hızı Bulguları.



TABLO: IV- Deney Şeması IV.b-ye göre mM o-Fosfat İyonlarının Reaksiyon Hızı-İnhibisyon Bulguları

K İ N E T İ K	T ü p N u m a r a l a r ı					
	0 Kont.	1	2	3	4	5
Karışımda Fosfat (mM)	0	1	2	5	20	50
Kalan Aktivite ODx10 <sup>2</sup>	100	90	62	36	12	5
İnhibisyon (%)	0	10	38	64	88	95





Amino asitlerden alanin, arginin, L-Fenilalanin, aspartik asit, glutamik asit, sistin 10 mM çözelti halinde reaksiyon karışımına dilüe edilerek katıldı. 1-5 mM konsantrasyonlarında amino asitlerin reaksiyon hızına olan etkileri Tablo V'de topluca gösterilmiştir. Bunlardan alaninin artan konsantrasyonlarda aktiviteyi arttırdığı diğerlerinin ise aktiviteyi azalttığı gözlemlendi.

L- Fenilalanin inhibisyonununun 5 mM konsantrasyonda % 56,8 değeri ile yaklaşık aktiviteyi yarı yarıya azalttığı görüldü.

Arginin ise 5 mM konsantrasyonda 41,8 inhibisyon yapmıştır. Diğer amino asitler çok düşük konsantrasyonlarda bile şiddetli inhibitörlerdir. Glisin inhibisyonu 50 mM konsantrasyonda % 40'ı bulmaktadır. Tablo IV'de gösterilmiş olan amino asitlerle i-ALP izoenziminin inhibisyon bulguları şekil 5'de grafiklenmiştir.

#### B.6- i-ALP İzoenzim - Amino Asit Bulguları.

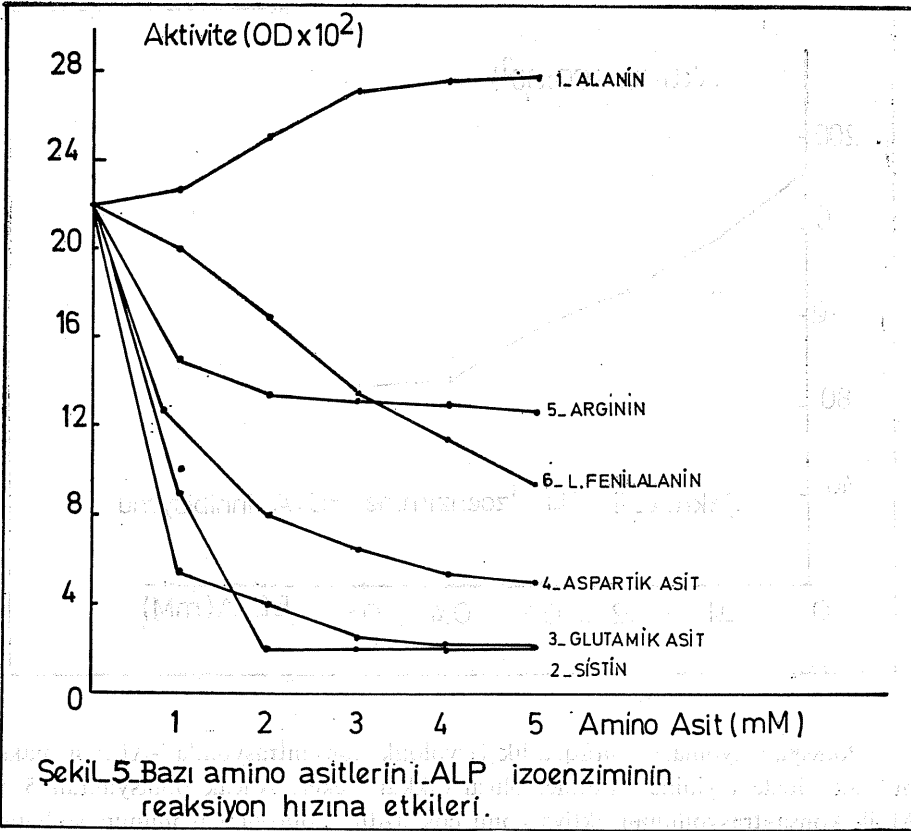
TABLE: V- Deneye Şeması VI'ya göre Bazı Amino asitlerin i-ALP İzoenziminin Reaksiyon Hızına Etkileri

K İ N E T İ K	T ü p N u m a r a l a r ı					
	0 Kont.	1	2	3	4	5
Amino Asit Molaritesi. (mM)	0	1	2	3	4	5
1-ALANİN Kalan akt. ODx10 <sup>2</sup>	22	22,5	25	27	27,5	27,8
Aktivasyon (%)	—	(2,3)	(13,6)	(22,7)	(25)	(26,4)
2- SİSTİN Kalan Akt. ODx10 <sup>2</sup>	22	9	2	2	2	2
İnhibisyon (%)	—	(59)	(91)	(91)	(91)	(91)
3- GLU. A. Kalan Akt. ODx10 <sup>2</sup>	22	5,5	4	2,5	2,2	2,2
İnhibisyon (%)	—	(75)	(81,8)	(88,6)	(90)	(90)
4- ASP. A. Kalan Akt. ODx10 <sup>2</sup>	22	10	8	6,5	5,5	5
İnhibisyon (%)	—	(54,5)	(64)	(70,4)	(75)	(77,2)
5- ARGİNİN Kalan Akt. ODx10 <sup>2</sup>	22	15	13,5	13,2	13	12,8
İnhibisyon (%)	—	(31,8)	(38,6)	(40)	(40,9)	(41,8)
6- L-FENİLLALANİN ODx10 <sup>2</sup>	22	20	15	13,5	11,5	9,5
İnhibisyon (%)	—	(9,1)	(31,8)	(38,6)	(47,7)	(56,8)
GLİSİN (Molarite) (mM)	0	10	20	30	40	50
Kalan Akt.ODx10 <sup>3</sup>	100	78	72	68	64	60
İnhibisyon (%)	—	22	28	32	36	40

B.7- i-ALP İzoenzimi-EDTA Bulgular :

TABLE: VI- Deney Şeması VI'ye göre, İzoenzime EDTA İnhibisyonu Bulguları.

K İ N E T İ K	T ü p N u m a r a l a r ı					
	0 Kont.	1	2 2	4 3	45	5
EDDA Molarite (mM)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Kalan Aktivite ODx10 <sup>3</sup>	185	156	132	117	92	90
İnhibisyon (%)	—	15,7	28,7	37,1	50,3	51,4



EDTA, reaksiyon hızını 0,4 mM konsantrasyonda yarı yarıya azaltmaktadır.

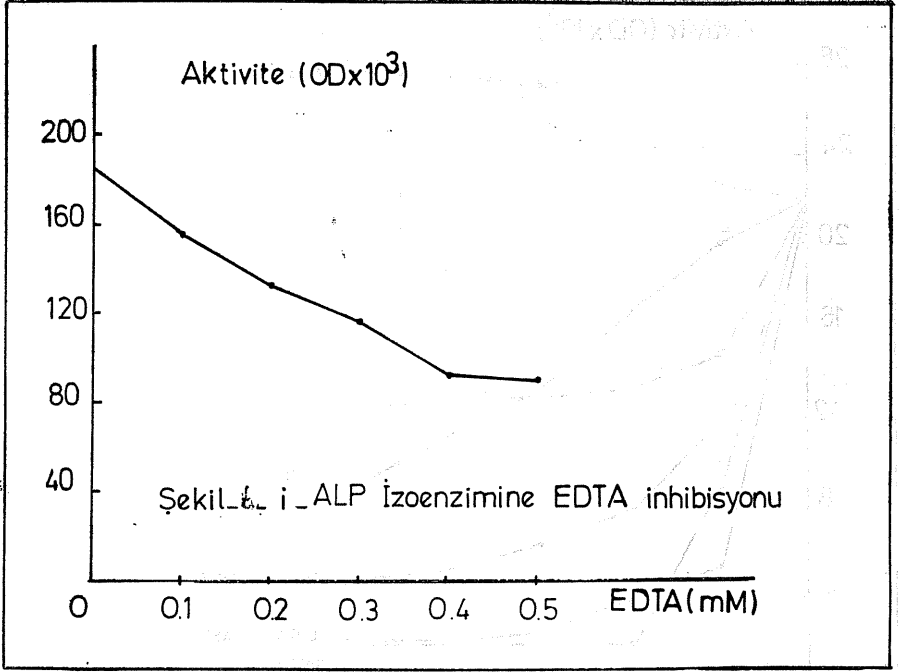
Tablo VI'da EDTA inhibisyonunun % 50,3 olduğu şekil 6 dan da EDTA konsantrasyonunun artışıyla aktivitenin hemen hemen doğrusal bir şekilde azaldığı görülmektedir.

### TARTIŞMA ve SONUÇ

0,60 O.D. üzerinden spektrofotometrik okuma verene enzim numunelerinin reaksiyon hızında, doğrusal bir artış gösteremeyeceği kanısına vardık (1,2,3).

#### Sodyum ve Potasyum İyonları:

Sodyum iyonları 140 mEq/lit konsantrasyonda i-ALP aktivitesin çok az (% 4) azaltmıştır. IM gibi büyük konsantrasyonda sodyum klorürün enzime olan inhibisyonu artar. Bu inhibisyon kinetik incelememizde % 25'e varan değerlere ulaşmaktadır.



Potasyum iyonları 5 mEq/L'lik fizyolojik konsantrasyonda i-ALP'in maksimal aktivitede tayinine yardımcı oluşu dikkati çeker. Ancak potasyumun 5 m M'lik konsantrasyonunun aktivasyonu çok azdır. Potasyum iyonunun sodyuma göre inhibitör etkisi olmaması, birçok ayıraçlarda sodyum tuzu yerine potasyum tuzunun kullanılmasının daha uygun olabileceği düşüncesini destekler. Zira potasyum iyonunun IM gibi yüksek konsantrasyonlarda da reaksiyon hızına etkisi hemen hemen yoktur.

#### Mağnezyum İyonları:

Mağnezyum iyonlarının i-ALP izoenziminin reaksiyon hızına çok değişik etkiler olur. Mg<sup>++</sup> iyonları düşük konsantrasyonlarda aktivatör gibi davranırken yüksek konsantrasyonuna göre aktivite % 50 azalmaktadır. Schales domuz böbreğinde ALP elde edilmişinde, ortama Mg<sup>+</sup> ilâve edilmemesi haline aktivitenin % 50 kadar düştüğünü görmüştür (4).

Mg<sup>++</sup> iyonları 1 mM kadar artarken reaksiyon hızındaki artış da tıpkı bir sübstratın artışı ile reaksiyon hızının Michaelis-Menten'e göre artışı gibi olur. Bu halde Mg<sup>++</sup> sanki i-ALP izoenziminin bir kofaktörü veya kosübstratı hissini verir.

Johnson, Mg<sup>++</sup> iyonuna kofaktör gözüyle bakmaktadır (2). Bizde, Mg<sup>++</sup> iyonu konsantrasyonu 0.5x10<sup>-3</sup> M'a kadar artıkça reaksiyonun gittikçe hızlandığı.

$5 \times 10^{-2}$  M'a kadar da daha şiddetle artan bir aktivasyon olduğu gözlemlendi. Bowers  $2 \times 10^{-4}$  M'dan fazla  $Mg^{++}$  iyonlarının biraz inhibitör tesiri olduğundan bahsetmektedir (5). Ancak biz bu düşük inhibisyonu  $5 \times 10^{-2}$  M'dan sonra tesbit ettik. Berghmeyer'de ise  $10^{-3}$  -  $10^{-2}$  M arasında aktivatör etkiden  $10^{-2}$  M'dan fazla  $Mg^{++}$  iyonu konsantrasyonunda ise inhibisyonun başladığı belirtilerek bizim bulgularımız desteklenmektedir. Bulgularımızda  $10^{-1}$  M dan fazla  $Mg^{++}$  iyonu artışları ile reaksiyon hızında çok şiddetli bir magnezyum inhibisyonu olduğu görülmektedir.

Biz ALP aktivitesi tayininde,  $Mg^{++}$  iyonu konsantrasyonunun  $5 \times 10^{-3}$  M ile  $10 \times 10^{-3}$  M (5-10 mM) arası bulunmasının gereğini Şekil 2'den açığa çıkartmış oluyoruz. Bu bulgular Berghmeyer ile tam bir uyum içerisinde.

#### Orta Fosfat İyonları:

Biz o-fosfat iyonlarının reaksiyon hızına etkilerini iki ayrı yöntemde inceledik.

Na-B- Gliserofosfat substratının hidrolizinde. inkübasyon karışımında  $1 \times 10^{-6}$  M o-fosfat varlığında bu inhibisyon % 0,8 iken  $5 \times 10^{-5}$  M o-fosfat konsantrasyonunda, inhibisyon bu substratı ile % 11,5'a varmaktadır (16).

p-Nitrofenil fosfat hidrolizi ile ALP aktivitesi tayininde  $2 \times 10^{-5}$  o-fosfat konsantrasyonunun % 1'den az inhibisyon yapmıştır Bowers'de  $10^{-3}$  M fosfat iyonları inhibisyonunun % 25 oranında olmasına karşın (5) bizde FFMP substratı hidrolizi için bu inhibisyon  $1 \times 10^{-3}$  M o-fosfat konsantrasyonunda % 10'dur.

Ancak fenil fosfat substratının ALP ile hidroliz hızı  $2 \times 10^{-3}$  M fosfat konsantrasyonunda % 50 inhibisyona neden olduğu rapor edilmiştir (7). Moss'un kullandığı bu fenil fosfat yönteminde  $Mg^{++}$  iyonu, reaksiyon ortamında 5 mM olarak bulunmaktadır. Bizim FFMP tayin yöntemimizde de 5 mM  $Mg^{++}$  iyonu bulunmaktadır ve bizde  $2,5 \times 10^{-3}$  M fosfat konsantrasyonundaki inhibisyonumuz % 38-64 arasındadır. Gayet iyi bir uyum vardır.

Orta-fosfat iyonlarının Na-B-Gliserofosfat substratı hidrolizinde, fenolik hidroliz ürünleri elde edilen yöntemlere göre inhibisyon yüzdesi daha çok artmaktadır (6);  $1 \times 10^{-3}$  M'dan fazla o-fosfat iyonu bulunur reaksiyon hızını şiddetle azaltır.

#### Amino Asitler

i-ALP izoenziminin L-fenilalanin ile inhibisyonu karakteristik bir şekilde azaldı. Diğer amino asitlerde rastlanmayan bu inhibisyon L-fenilalanin, ile gerçekleşir, konsantrasyonunun artması ile inhibisyon hemen hemen doğrusal bir şekilde oluşarak reaksiyon hızı azalır ve aktivite düşer.

Watanabe ve Fishman (8) L-fenilalanin ile insan ince barsak ALP'ını % 50-60 kadar inhibe ettiğini gösterdi ki bizim ince barsak inhibisyonumuz da aynı de-

ğeri vermektedir (% 56,8). Danimarkalı Gerhardt ise serumda rutin ALP aktivitesi tayininde 10 mM L-fenil alanin ile i-ALP'ı %50 oranında inhibe etmiştir (9). L-fenil alanin, koyun serumundaki ince barsak ALP'ını inhibe etmek için de kullanılmıştır (10). Saflaştırılmış i-ALP izoenziminde L-fenilalanin inhibisyonunun doğrusal bir şekilde oluşu, çalışmamızda ilginç olarak ortaya çıkmıştır. Kaynaklar da bu tür bir denemeye rastlamadık.

Sistin, glutamik asit, aspartik asit ve arginin amino asitlerinin i-ALP izoenziminin reaksiyon hızına olan etkileri ilk olarak tarafımızdan incelendi. Sistin, glutamik asit  $2 \times 10^{-3}$  konsantrasyonda dahi % 90 dolaylarında i-ALP izoenzimine şiddetli inhibitör etki yapmaktadır. Aspartik asit  $1 \times 10^{-3}$  M'da % 54,5  $5 \times 10^{-3}$  M'da ise % 77,2 inhibisyon yapmakta olup diğerlerine oranla orta şiddette bir inhibitördür.

i-ALP izoenziminin reaksiyon hızı alanin amino asidi ile artmakta olup bu durumun kinetik olguları da ilk olarak daha ince barsak-ALP denemelerimizde oluşmuştur. Alaninle aktivasyon  $1 \times 10^{-3}$  ile  $3 \times 10^{-3}$  M arasında doğrusal olarak artmaktadır. Bu aktivasyon alanin konsantrasyonu ile % 25 dolaylarında artırılabilir. Daha yüksek konsantrasyonlarda önemli aktivasyon artışları görülmez.

Etilen diamin tetra asetik asit-(EDTA)

Denemelerimizde, sıfır konsantrasyondaki deney kontrolüne göre  $4 \times 10^{-4}$  M EDTA, i-ALP izoenzimine karşı % 51,4 oranında inhibitör yapmaktadır. Bu inhibisyon Berghmeyer'de EDTA, ALP'a şiddetli bir inhibisyon yapar şekliyle ifade edilmiş olup özel değerler verilmemiştir. EDTA inhibisyonunun  $2,7 \times 10^{-5}$  M konsantrasyonlarda karaciğer ve kemik ALP'ını tamamen inhibe ettiği (2) serumda ise  $5 \times 10^{-2}$  ve  $5 \times 10^{-1}$  M konsantrasyonlarda inhibitör olduğu (6) kaynaklarda bulunmasına rağmen EDTA'nın ince barsak alkalen fosfatazına ait inhibisyon denemelerine rastlanmamıştır.

## S U M M A R Y

ALKALINE PHOSPHATASE: V. The Effects of Electrolytes, Amino Acids, Anticoagulant EDTA on the Reaction Rate for the i-ALP Enzyme.

In several concentrations of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4$  and various amino acids and EDTA, have different effects on the i-ALP isozyme. The concentration of 5 mM  $\text{Mg}^{++}$  ions is optimum for enzyme activity; however it has an inhibitory effect more than 50 microM. 0-phosphate has shown an inhibition of 11,5 % at 50 microM even reached to 95 % 50 mM.

The enzymatic rate was decreased 56,8 % at the concentration of 5 mM phenylalanine, where arginine has 41,8 %. Nearly the same inhibition 40 % has been occurred with 50 mM glycine whereas the other amino acids have the inhi-

bitory effect even in very low concentrations, Only alanine has caused a slight activation.

EDTA, as an anticoagulant has reduced the enzyme activities taking equal shares with 0,5 mM concentration.

### KAYNAKLAR

1. KOMODA, T., Sakagishi, -.: Partial purification and some properties of human liver alkaline phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 438: 138-152, 1976.
2. JOHNSON, R.B.: A New fluorometric method for the estimation or detection of total and fractionated alkaline phosphates. *Clin. Chim.* 15: 108-123, 1969.
3. AMINOFF, D., Ajstrins, M. and Zolfaghari, S.P.: Plasma alkaline phosphatase isoenzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 242: 108-122, 1971.
4. SCHALES, O., Arai, K.: Preparation and Properties of Highly Purified Alkaline Kidney Phosphatase., *Archives of Biochem. and Biophysics.* 83: 152-160, 1959.
5. BOWERS, G. N., McComb, R.: A continuous Spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase., *Clin. Chem.* 12: 70-78, 1966.
6. 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.
7. MOSS, D.W.: Properties of Alkaline-Phosphatase Fractions in Extracts of Human Small Intestine. *Biochemical J.* 94: 458-462, 1965.
8. WATANABE, K. and Fishmann, W. H.: *J. Histochem. Cytochem.* 12: 252, 1964.
9. GEABARDT, W., Nielson, 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.
10. AALUND, O., Rendel, J.: Freerland, R.A. Isolation and characterization of bovine serum alkaline phosphatases, *Biochim. Biophys. Acta,* 110: 113-123, 1965.