

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

İmza: 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 sütsubstratları için optimal bir aktivite tayinine olanak sağlar, *p*-nitrofenil fosfat ve Na-B-gliserofosfat sütsubstratlarıyla doku ekstraktelerinde *i*-ALP enzim tayin yöntemlerini araştırmalarımızla geliştirdik.

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

2) GİRİŞ VE AMAC

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

85. 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) YÖNTEM

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

siyon karışımındaki esas ayıraçlar, 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:

Sübstrat konsantrasyonları orijinal çalışmaya konsantrasyonuna getirilmiştir.

Bu standardize şartlar diğer denemelerde de hesaplanarak sağlanmıştır.

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

Kullanılan yöntem: Modifiye Bessey-Lorwy-Brock

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

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

B) Tris, C) 2A2MIP'de nötr radyasyondur PNPP ar 94774 Avrupa N 226,0

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

Bütün tüplerde sübstrat 1 ml. alınmış, dist ile su ile hacimler 3 ml'ye tamamlanmışlardır. 37°C'ta 5 dakikalık preinkübasyondan sonra, 0,1 ml. enzim ilave edilip 37°C'ta 10 dakika atfik edilerek ve 10 ml. 0,02N NaOH ile renkendirme yapılarak 10' sonra 415 nm'de absorbanslar 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

Sübstrat, (tamponsuz): 8 mM, Na-B-Gliseroftosfat

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 ilave edildikten sonra diğer uygulamalar aynen yürütülmüştür.

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

Kullanılan Yöntem: Modifiye Romel -ye Röntgen -yazılım teknolojisi ile. Sıvı substrat: 2,5 mM, pH 10,15 FFMP.

Sıvı substrat: 2,5 mM, pH 10,15 FFMP.

Tampon: 0,625 mM, pH 10,15 2A2MP.

Deney Şeması II- Enzim Konsantrasyonunun Arttırılması.

Deney tüplerine 1 ml. sıvı substrat, 2,5-0,5 ml arasında tamponla hacimler tamamlandıktan sonra enzim 0,1-1,0 ml. arasında artan konsantrasyolarda ilave edildi.

Diger işlemler Modifiye Romel metodundaki gibi yürütüldü.

4) BULGULAR

B- Enzim Kinetiği ile İlgili Bulgular:

B.1- Yöntemlerle Tampon Tipine ve Molaritesine Ait Bulgular: Reaksiyon ortaminin pH'sı fenolik hidroliz ürünleri mevcudiyetinde büyük önem arz eder. Orijinal yöntemde 0,04 ml konsantre FFMP sıvı substratının hacmi 26 defa sulandırılmaktadır. Bu sulandırma pH'yu 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 sıvı substrat (2,5 mM) kullanılarak yapılmıştır. Farklı i-ALP aktivitesindeki enzimlerin FFMP sıvı substratını hidrolizi sonucu, pH ve sıcaklık kriterleri ile birlikte aşağıdaki bulguları vermiştir.

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

Deney Sistemi: **Tüp Numaraları:** 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 597, 598, 599, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 697, 698, 699, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 797, 798, 799, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 897, 898, 899, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 997, 998, 999, 999, 1000, 1001, 1002, 1003, 1004, 1005, 1006, 1007, 1008, 1009, 1009, 1010, 1011, 1012, 1013, 1014, 1015, 1016, 1017, 1018, 1019, 1019, 1020, 1021, 1022, 1023, 1024, 1025, 1026, 1027, 1028, 1029, 1029, 1030, 1031, 1032, 1033, 1034, 1035, 1036, 1037, 1038, 1039, 1039, 1040, 1041, 1042, 1043, 1044, 1045, 1046, 1047, 1048, 1049, 1049, 1050, 1051, 1052, 1053, 1054, 1055, 1056, 1057, 1058, 1059, 1059, 1060, 1061, 1062, 1063, 1064, 1065, 1066, 1067, 1068, 1069, 1069, 1070, 1071, 1072, 1073, 1074, 1075, 1076, 1077, 1078, 1079, 1079, 1080, 1081, 1082, 1083, 1084, 1085, 1086, 1087, 1088, 1089, 1089, 1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096, 1097, 1097, 1098, 1099, 1099, 1100, 1101, 1102, 1103, 1104, 1105, 1106, 1107, 1108, 1109, 1109, 1110, 1111, 1112, 1113, 1114, 1115, 1116, 1117, 1118, 1119, 1119, 1120, 1121, 1122, 1123, 1124, 1125, 1126, 1127, 1128, 1129, 1129, 1130, 1131, 1132, 1133, 1134, 1135, 1136, 1137, 1138, 1139, 1139, 1140, 1141, 1142, 1143, 1144, 1145, 1146, 1147, 1148, 1149, 1149, 1150, 1151, 1152, 1153, 1154, 1155, 1156, 1157, 1158, 1159, 1159, 1160, 1161, 1162, 1163, 1164, 1165, 1166, 1167, 1168, 1169, 1169, 1170, 1171, 1172, 1173, 1174, 1175, 1176, 1177, 1178, 1178, 1179, 1180, 1181, 1182, 1183, 1184, 1185, 1186, 1187, 1188, 1189, 1189, 1190, 1191, 1192, 1193, 1194, 1195, 1195, 1196, 1197, 1198, 1198, 1199, 1199, 1200, 1201, 1202, 1203, 1204, 1205, 1206, 1207, 1208, 1209, 1209, 1210, 1211, 1212, 1213, 1214, 1215, 1216, 1217, 1218, 1219, 1219, 1220, 1221, 1222, 1223, 1224, 1225, 1226, 1227, 1228, 1229, 1229, 1230, 1231, 1232, 1233, 1234, 1235, 1236, 1237, 1238, 1239, 1239, 1240, 1241, 1242, 1243, 1244, 1245, 1246, 1247, 1248, 1249, 1249, 1250, 1251, 1252, 1253, 1254, 1255, 1256, 1257, 1258, 1259, 1259, 1260, 1261, 1262, 1263, 1264, 1265, 1266, 1267, 1268, 1269, 1269, 1270, 1271, 1272, 1273, 1274, 1275, 1276, 1277, 1278, 1278, 1279, 1280, 1281, 1282, 1283, 1284, 1285, 1286, 1287, 1288, 1289, 1289, 1290, 1291, 1292, 1293, 1294, 1295, 1295, 1296, 1297, 1298, 1298, 1299, 1299, 1300, 1301, 1302, 1303, 1304, 1305, 1306, 1307, 1308, 1309, 1309, 1310, 1311, 1312, 1313, 1314, 1315, 1316, 1317, 1318, 1319, 1319, 1320, 1321, 1322, 1323, 1324, 1325, 1326, 1327, 1328, 1329, 1329, 1330, 1331, 1332, 1333, 1334, 1335, 1336, 1337, 1338, 1339, 1339, 1340, 1341, 1342, 1343, 1344, 1345, 1346, 1347, 1348, 1349, 1349, 1350, 1351, 1352, 1353, 1354, 1355, 1356, 1357, 1358, 1359, 1359, 1360, 1361, 1362, 1363, 1364, 1365, 1366, 1367, 1368, 1369, 1369, 1370, 1371, 1372, 1373, 1374, 1375, 1376, 1377, 1378, 1378, 1379, 1380, 1381, 1382, 1383, 1384, 1385, 1386, 1387, 1388, 1389, 1389, 1390, 1391, 1392, 1393, 1394, 1395, 1395, 1396, 1397, 1398, 1398, 1399, 1399, 1400, 1401, 1402, 1403, 1404, 1405, 1406, 1407, 1408, 1409, 1409, 1410, 1411, 1412, 1413, 1414, 1415, 1416, 1417, 1418, 1419, 1419, 1420, 1421, 1422, 1423, 1424, 1425, 1426, 1427, 1428, 1429, 1429, 1430, 1431, 1432, 1433, 1434, 1435, 1436, 1437, 1438, 1439, 1439, 1440, 1441, 1442, 1443, 1444, 1445, 1446, 1447, 1448, 1449, 1449, 1450, 1451, 1452, 1453, 1454, 1455, 1456, 1457, 1458, 1459, 1459, 1460, 1461, 1462, 1463, 1464, 1465, 1466, 1467, 1468, 1469, 1469, 1470, 1471, 1472, 1473, 1474, 1475, 1476, 1477, 1478, 1478, 1479, 1480, 1481, 1482, 1483, 1484, 1485, 1486, 1487, 1488, 1489, 1489, 1490, 1491, 1492, 1493, 1494, 1495, 1495, 1496, 1497, 1498, 1498, 1499, 1499, 1500, 1501, 1502, 1503, 1504, 1505, 1506, 1507, 1508, 1508, 1509, 1510, 1511, 1512, 1513, 1514, 1515, 1516, 1517, 1518, 1519, 1519, 1520, 1521, 1522, 1523, 1524, 1525, 1526, 1527, 1528, 1529, 1529, 1530, 1531, 1532, 1533, 1534, 1535, 1536, 1537, 1538, 1539, 1539, 1540, 1541, 1542, 1543, 1544, 1545, 1546, 1547, 1548, 1549, 1549, 1550, 1551, 1552, 1553, 1554, 1555, 1556, 1557, 1558, 1559, 1559, 1560, 1561, 1562, 1563, 1564, 1565, 1566, 1567, 1568, 1569, 1569, 1570, 1571, 1572, 1573, 1574, 1575, 1576, 1577, 1578, 1578, 1579, 1580, 1581, 1582, 1583, 1584, 1585, 1586, 1587, 1588, 1589, 1589, 1590, 1591, 1592, 1593, 1594, 1595, 1595, 1596, 1597, 1598, 1598, 1599, 1599, 1600, 1601, 1602, 1603, 1604, 1605, 1606, 1607, 1608, 1608, 1609, 1610, 1611, 1612, 1613, 1614, 1615, 1616, 1617, 1618, 1619, 1619, 1620, 1621, 1622, 1623, 1624, 1625, 1626, 1627, 1628, 1629, 1629, 1630, 1631, 1632, 1633, 1634, 1635, 1636, 1637, 1638, 1639, 1639, 1640, 1641, 1642, 1643, 1644, 1645, 1646, 1647, 1648, 1649, 1649, 1650, 1651, 1652, 1653, 1654, 1655, 1656, 1657, 1658, 1659, 1659, 1660, 1661, 1662, 1663, 1664, 1665, 1666, 1667, 1668, 1669, 1669, 1670, 1671, 1672, 1673, 1674, 1675, 1676, 1677, 1678, 1678, 1679, 1680, 1681, 1682, 1683, 1684, 1685, 1686, 1687, 1688, 1689, 1689, 1690, 1691, 1692, 1693, 1694, 1695, 1695, 1696, 1697, 1698, 1698, 1699, 1699, 1700, 1701, 1702, 1703, 1704, 1705, 1706, 1707, 1708, 1708, 1709, 1710, 1711, 1712, 1713, 1714, 1715, 1716, 1717, 1718, 1719, 1719, 1720, 1721, 1722, 1723, 1724, 1725, 1726, 1727, 1728, 1729, 1729, 1730, 1731, 1732, 1733, 1734, 1735, 1736, 1737, 1738, 1739, 1739, 1740, 1741, 1742, 1743, 1744, 1745, 1746, 1747, 1748, 1749, 1749, 1750, 1751, 1752, 1753, 1754, 1755, 1756, 1757, 1758, 1759, 1759, 1760, 1761, 1762, 1763, 1764, 1765, 1766, 1767, 1768, 1769, 1769, 1770, 1771, 1772, 1773, 1774, 1775, 1776, 1777, 1778, 1778, 1779, 1780, 1781, 1782, 1783, 1784, 1785, 1786, 1787, 1788, 1789, 1789, 1790, 1791, 1792, 1793, 1794, 1795, 1795, 1796, 1797, 1798, 1798, 1799, 1799, 1800, 1801, 1802, 1803, 1804, 1805, 1806, 1807, 1808, 1808, 1809, 1810, 1811, 1812, 1813, 1814, 1815, 1816, 1817, 1818, 1819, 1819, 1820, 1821, 1822, 1823, 1824, 1825, 1826, 1827, 1828, 1829, 1829, 1830, 1831, 1832, 1833, 1834, 1835, 1836, 1837, 1838, 1839, 1839, 1840, 1841, 1842, 1843, 1844, 1845, 1846, 1847, 1848, 1849, 1849, 1850, 1851, 1852, 1853, 1854, 1855, 1856, 1857, 1858, 1859, 1859, 1860, 1861, 1862, 1863, 1864, 1865, 1866, 1867, 1868, 1869, 1869, 1870, 1871, 1872, 1873, 1874, 1875, 1876, 1877, 1878, 1878, 1879, 1880, 1881, 1882, 1883, 1884, 1885, 1886, 1887, 1888, 1889, 1889, 1890, 1891, 1892, 1893, 1894, 1895, 1895, 1896, 1897, 1898, 1898, 1899, 1899, 1900, 1901, 1902, 1903, 1904, 1905, 1906, 1907, 1908, 1908, 1909, 1910, 1911, 1912, 1913, 1914, 1915, 191

İyonye Konsantrasyonu ile etkili, ayırmalı ve enzimlerin etkileşimi olmamıştır.
Açıklama : St = Modifiye Romelyönteminde kullanılan standartların değerlendirilmesi.

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

FFMP sübstrati, pH 10,15 te, $t=37^{\circ}\text{C}$ ta hidroliz edildiği zaman, pH 10,3 ve $t=25^{\circ}\text{C}$ 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 iki ayrı Yöntemle 2A2MIP Tamponu ile Glisin Tamponlarına ait Aktivite Bulguları

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

(x) = Yönteme, 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. Gisin 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. I-a-PNPP Sübstrat yönteminde Tamponlar:

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

K İ N E T İ K	Tüp	N u m a r a l a r	Aktivite (U)
	1	2	3
Tampon Molariteleri(M)	0,1	0,1	0,3
Glisinde aktivite (OD)	0,130	1,120	0,095
Trisde Aktivite (OD)	0,421	0,462	0,500
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 absorbansları 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 artışı gözlandı.

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

TABLO: IV- Morton Yönteminde, Deney 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 i														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Tampon	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
Moroliteleri ^(M)															
Glisinde															
Aktivite ODx10 ²	12	11	8	7	6,5	6	7	5,8	5,8	5,6	5	5	5	5	5
Triste															
Aktivite ODx10 ²	43	45,5	51	52,5	54	60	61	62	62	62	61,5	62	61,5	59	58
2A2MIP'de															
Aktivite ODx10 ²	45	46,5	54,5	57	59	60	61	62	62	62	61,5	62	61,8	60	59

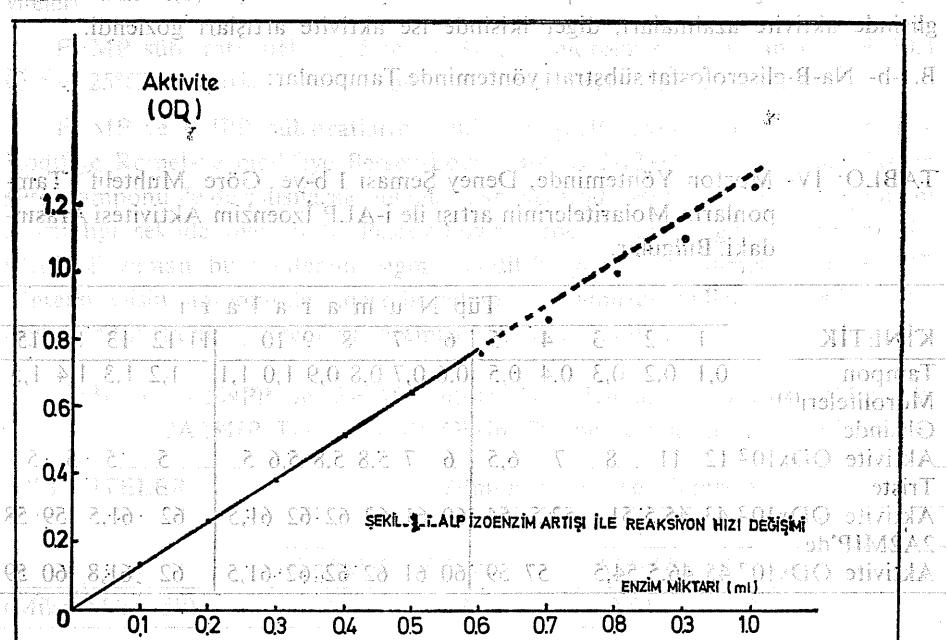
Tamponların molariteleri her tüpte 0,1 M artırılarak 0,1-1,5 M arası denenmiştir. Bu üç tampon ALP tayin yöntemlerinde genellikle kullanılmaktadır. i-ALP izoenzimi aktivitesi tayininde glisin tamponun molaritesinin artması nisbetinde aktivite (OD) düşmektedir ve de diğer iki tampona kıyasla aktivitesi 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 derege ulaşmıştır. Konsantrasyon 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- Deney Şeması II'ye göre Enzim Miktarlarının Artırılması ile Reaksiyon hızının Artışı.

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

-in 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. 1,0 ebeveynlik seviyesindeki enzim miktari 0,6 ml'dir.



-in 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. 1,0 ebeveynlik seviyesindeki enzim miktari 0,6 ml'dir.

5) TARTIŞMA ve SONUÇ

Total alkanen fosfataz aktivitesi ölçümü her bir yöntemde sübstrat ve reaksiyon ortamı pH'sına, siddetle 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 akıcı olan bu sıvı madde 30°C'de sivilastırılarak kullanılmakta olup 0,1M çözeltisinin tabii pH'sı 11,4'tür. ALP aktivite tayin yöntemlerinden bu tamponu kullanılanlarda 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 tespit edilmiştir. Tris tamponu, ayınen 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 aktiviteler çok düşük tespit edilir. Glisinin suda 0,2 M çözeltisinin pH'sı 4'tür (6). PNPP sübstratinin 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 sübsrat 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 indikör olup, ortamın pH'sından şiddetle etkilenirler. Bu yönyle, 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 indikör olan hidroliz ürünlerinin renginde aktiviteye bağlı olmayan artışlara veya azalışlara neden olabilir.

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

Samuel yönteminde (4) 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'da 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 yönteme 5 mM'lik PNPP sübstratından 2,9 ml. kullanılmıştır. Bizim sübstratımızın konsantrasyonu daha düşük olarak tutulmuştur ki PNPP sübstrati 10 mM'dan sonra inhibisyon yapmaktadır (2). Orijinal Bessey-Lowry-Brock yönteminde, % 400 mg PNPP stok sübstrat çözeltisi tamponla yarı yarıya seyrettilerek hazırlanırken 1 M MgCl₂'den 0,1 ml. ilâve edilerek 1 mM'lik Mg iyonu konsantrasyonu içeren sübstrat elde edilir. Biz PNPP sübstratımızı direkt çalışan 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 bayatıldığı zaman 415 nm. dalga boyunda alkali ortamda absorbans veren p-nitro fenol oluşturmaktadır (11). Halbuki deneylerimizde tamponun 0,4-0,7 M konsantrasyonları dışında bile pH 11,20 değeri asılmaktadır.

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

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

İzozimlerin optimale etki için 2A2MIP, Tris ve glycine bufferlerinin pH 10,15'te 10,8 kat artışı elde edilmiştir. 2A2MIP buffer, PNPP substratının en iyi etkili formudur. İtalyan ve İngiliz tarama metodlarında ise 2A2MIP bufferin PNPP substratla birlikte kullanıldığı görülmektedir.

S U M M A R Y

ALKALINE PHOSPHATASE: IV. The Kinetical 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 deceasing values of ALP activitees 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 iso-
enzymes. Pure Appl. Chem., 3: 397-402. 1961.

4) CHU, S.Y., Turkington, V.E., Vea C., Cheung, P.: An improved electrop-
horetic 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.

- 10) WOLF, M., Dinwoodie, A., Morgan, H.G.: Comparison of alkaline phosphatase isoenzymes activity using five standard methods. Clin. Chim. Acta, 24: 131-134, 1969.
- 11) BESSEY, A.O., Lowry, O.H., Brock, M.J.: A Method For the Rapid Determination of Alkaline Phosphatase With Five Cubic Millimetres of Serum, 164: 321, 1940.

Fazla fazla Etki (PGF₂) ve Farmakolojik etkiler

M. M. Nefis GACAR (x)

M. Hasan GACAR (xx)

Etki 2

Üç ümumi prostaglandin P_g (PGF₂)nin çeşitli organlardaki etkilerini inceledi.isteren ilerici, gevşetici, sıkıştırıcı, gevşemelidirlerden bazıları, deprime eder. Üç ümumi prostaglandin çeşitli dene, hafifarkus ve ontürüm hizini artıran organları ile üremeyi artırdılar. Karbassan, solunum, peristaltizm gibi çeşitli sistemlere prostaglandin P_g (PGF₂)nin en fazla etkisi gösterdi. Etkisini il. elektrot bulguları, kargolagınlardır ve prostaglandin Pg (PGF₂)nın farmakolojik etkileri hakkında genel bilgi derlendi.

Özet

Prostaglandinler organizmaın her çok fizyolojik ve patolojik olaylarında ve ilaçlarda etkili olan çokgen etkili maddelardır.

1933 yılında Goldblatt, 1934 yılında da Von Euler'in insan serviksini parmaklarını ekstetelerini kan basıncındaki depresör etkisini ve bu maddelemin kanda organizma dansite hizmetlemeyle tarafladığı, çeşitli yayıklarla ilişkilidir. 1935 ve 1960 yıllarıda da Bergström ve Björsell prostaglandin E₁ ve P₁ adını vermiştir. 1958 ve 1960 yıllarıda da Bergström ve Björsell prostaglandin E₁ ve P₁ adını akıllı, ömrü uzun böcekler haliinde ikinci erimeyi besarmışlardır. Bu izolasyonu kılavuzluğunda dört, 60-65 kılıç eimiş ve 10'dan fazla böceklik izzoji eimiş kareküpleri tıbbi uygulamaya Niha, e. Bergström ve Von Döp 1964 yılında PGF₂'yı sentetik olarak yapmış, başarılmıştır. Kliniksel yapisı bakırından 20 karten oluşan yapıya bir dodeponentin halkası ve cu bağı İE alfaik zincirlerin meydana gelmesidir. Sekiz protonun halkasında bir hidroksi birde keto grubu olmaya sunmaktadır. Halka içinde ise bir 5 ile 6 er karbon atomları, diğer 13 ve 14 olsun karbon atomları halkada olmasa ikinci çift bağ tasar. Sentezindeki pratikte erkenin yapıldıktan sonra dır.

(x) Ataşehir Üz. İpp. Farmakoloji bölüm. dan

(xx) Ataşehir Üz. İpp. Farmakoloji bölüm. dan