

AF (ALKALEN FOSFATAZ) ENZİMİNİN ATP HİDROLİZ EDİCİ ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Uzm. Dr. Belkıs GÖZEN*
Dr. Güneş YÜREGİR**

Ö Z E T :

Normalde AF lar fosfomonoesterleri hidroliz eden bir izoenzimler topluluğudur. AF da ATP az gibi hücre membranında yer almıştır. AF zın ATP hidroliz edici özelliklerinin araştırıldığı bu çalışmada civciv ve tavuk KC (karaciğer) AF mın ATP üzerine olan etkileri incelenmiş, civciv AF mın ATP yi parçalayamadığı, tavuk AF mın ise parçalayabildiği gözlenmiştir. Yaşla beraber oluşan bu farklılığın muhtemel sebepleri tartışılmıştır.

S U M M A R Y :

EXAMINING OF ATP HYDROLIZING PROPERTIES OF ALKALINE PHOSPHATASE ENZYME :

Alkaline phosphatases have been shown to be distributed throughout the body in various tissues of living organisms. They catalyze the hydrolysis of almost any phosphomonoester to give Pi and corresponding alcohol, phenol or sugar.

ATP ases as a rule membran bound enzymes involved in energy transforming processes and acting in complex physicochemical reactions.

We reported here the isolation of alkaline phosphatase from livers of chicks and chicken, and examined its ATP hydrolizing properties. The variation of enzyme activity development was discussed.

AF lar yapılarında sialik asit bulunduran ve membranda yer alan bir grup enzimlerdir. Sialik asitten dolayı negatif yük taşı-

(*) Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Asistanı.

(**) Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Profesörü

lar ve bu özellikleri sayesinde iyon değiştirme kromatografisi ile ayrıştırılabilirler (5, 6). AF enziminin içinde yer aldığı hücre membranının yapısı incelendiğinde son yılların çok taraftar toplayan Singer ve Nicholson tarafından öngörülen sıvı - mozaik yapısı gözden geçirilmelidir (17).

AF, P - O bağlarının yanısıra P - F (Fluoro fosfat), P - OP (İnorganik fosfat), P - S (Sisteamin S - fosfat), P - N (Kreatin N - fosfat) bağlarını da parçalayabilmektedir. Bazı araştırmacılar değişik kaynaklı AF ların ATP yi hidroliz edici özelliklerini araştırmışlardır. Debruyne yumurta sarısından (4), Vaanen, tavuk kartilajından (20) elde edilen AF ların ATP yi yüksek oranda hidroliz ettiğini göstermişlerdir. Kobori deniz bakterilerinden (10) elde edilen AF zın, Yunis sıçan kloromadan elde ettiği (22) AF in ATP yi çok az hidroliz ettiğini göstermişlerdir. Haussler ve arkadaşları civciv barsağını, Russel ve arkadaşları sıçan barsağı için Ca - ATP az ve AF in aynı enzimler olduklarını ileri sürmüşlerdir (19). Majeska tavuk epifizyel kartilaj mantriks veziküllerinde yaptığı çalışma ile ATP az, pirofosfataz ve AF in Levamisole karşı eşit hassasiyet gösterdiklerini izlemiştir (13). Fakat Borgers ve arkadaşları bir levamisol analogu olan (Levamisol : L - Tetramisol) L - p - bromo tetramisolün sıçanın değişik doku AF ları için potent bir inhibitör olduğunu fakat ATP azı inhibe etmediğini göstermişlerdir (2).

Matsuzawa ve Andersen yaptıkları bir araştırmada farelerde epifizyel kartilajda hem ATP nin hem de AF in matriks vezikülün dış membran yüzeyinde yerleştiklerini göstermişlerdir (14).

AF ve ATP azın hücrede lokalizasyonunu ve farklı enzimler olup olmadığını incelemek için ise Saito ve Ide farelerin ayak tabanlarında dijital duyu cisimciklerinin hücrelerinde elektron mikroskobik histokimyasal bir çalışma yapmışlardır. Sonuçlara göre ATP az enzimi bu cisimciklerde yer alan lameller hücrelerin plazma membranındaki (Caveolae) de yani kıvrımlarda yerleşmiştir. (Lameller hücreler plazma membranlarında çok fazla sayıda caveolae ihtiva ederler). Plazma membranının diğer taraflarında ise çok az bir aktivite alınmıştır. AF enzimi yalnız caveolaede yerleş-

miş olup plazma membranının diğer kısımlarında bir aktivite alınmamıştır. Yine aynı hücrelerin sinir uçlarının plazma membranında AF ve ATP az enzimine tesadüf edilmiştir (9).

Bu bilgiler ışığında bizim de amacımız civciv AF' inin ATP yi hidroliz hızına yaşın etkisini araştırmak olmuştur.

MATERYAL ve METOD :

Deneyler için Y₂ hattı civciv ve tavuk kullanıldı. Deneyler için kullanılan civcivler kuluçka makinesinden henüz çıkmış civcivlerdi. Bu civcivlerin bir kısmı 16 haftalığa kadar büyütülerek yetişkin tavuk olarak incelendi.

İzolasyon ve Estraksiyon : Yumurtadan çıkan civcivler eterle bayıltılıp seri halde karaciğerleri çıkartıldı. Doku birkaç kere soğuk suyla yıkandıktan sonra parçalanarak, teflon homojenizatörde doku ağırlığının 10 katı 10mM Tris - CH₁ pH : 7.4 tamponu içinde, oda ısısında homojenize edildi. Daha sonra homojenatlara doku ağırlığının 10 katı soğuk n - bütanol ilave edilip 10 dakika sonra sıcak su banyosuna kondu ve 37°C de 10 dakika bekletildi. Bu karışım 1500 rpm de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda gevşek protein kısmı aspirasyonla alındı. Çökeleğin altındaki berrak bütanol fazı toplanarak ayrıldı. Bu faz hemen kullanılmadığı hallerde -20°C de derin dondurucuda saklandı. Büyütülmek üzere alıkonan civcivler tavuk yemi ile büyütüldüler. 16 haftalık iken yukardaki işlemlere aynen tabi tutuldular. Elde edilen bütanol ekstreleri ya hemen kullanıldılar veya hemen kullanılmadığı hallerde derin dondurucuda saklandılar. Sonra liyofilize edildiler.

Örneklerin AF aktivitesi tayini : Sigma metoduna göre yapıldı. 1 Sigma ünitesi belirli deney şartlarında 1 saatlik sürede 1 µM para nitro fenol açığa çıkartan enzim aktivitesi olarak verildi. Reaksiyon sonunda enzim aktivitesine orantılı olarak meydana gelen ürünün (p - nitro fenol) alkali ortamda sarı renk vermesi esasına dayanılarak ölçümler yapıldı. Sonuçlar standartlara göre değerlendirilerek Sigma ünitesi olarak verildi (20).

Ayıraçlar : Tampon olarak pH 10.5 0.1 M glisin, 0,001 M mgCl₂ tamponu kullanıldı. Tampona 85 ml 1 N NaOH eklendikten sonra arık suyla litreye tamamlandı.

Stok substrat solusyonunu % 0.4 PNPP (paranitro - fenil fosfat) : 0.001 M HCl içinde günlük hazırlandı.

Günlük standart : Tampon ve substrat eşit olarak karıştırılıp alkali tamponlu substrat solusyonu elde edildi. Her seferinde taze hazırlandı.

0.02 N NaOH
Konsantre HCl

Deneyin yapılışı : 0.5 er ml tamponlu substrat pipetlenen kör ve numune tüpleri 37°C de 5 dakika bekletildikten sonra kör tüpüne 0.05 ml arık su, numune tüpüne 0.05 ml analiz edilecek numune ilave edildi. 37°C de 30 dakika enkube edildiler. Süre sonunda 0.02 N NaOH ilavesiyle oluşan renk 415 nm de spektronik 20 de okundu. Daha sonra kör ve deney tüplerine 2 damla (0.1 ml) konsantre HCl eklendi. Tekrar absorbanlar okunarak daha önceki absorbanstan çıkarıldı. Kalan absorban değeri standart eğriden değerlendirildi.

AF enziminin ATP az aktivitesi tayini : Örneklerin ATP hidrolizi sonunda açığa çıkarttıkları fosfatın tayini Atkinson yöntemi-ne (1) göre yapıldı. Yöntem ATP den enzim aracılığı ile ayrılan fosfatın cirasol ALN - WX (Lubrol) ve Molibdik asit ile sarı renkli kompleks oluşturma ilkesine dayanmaktadır. Enzimin ATP yi hidroliz edebilme kapasitesi Mg, (Ca ve Mg), (Na, K, Mg) varlığında araştırıldı. Deney ATP az enziminin ATP yi parçaladığı inkubasyon ortamında yapıldı. Enkubasyon ortamı tablo 1 de belirtilmiştir.

TABLO 1 : ATP AZ AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜLDÜĞÜ ENKUBASYON ORTAMI.

AF	Tüplerdeki E11 Son Konsantrasyon (mM)							
	470*	25*	30*	0.75*	125**	211**	306**	75*
	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	Tris-HCl	Tris HCl	Tris HCl	ATP
Na, K, Mg	100	5	6	—	30	—	—	3
Mg	—	—	6	—	—	135	—	5
Ca, Mg	—	—	6	0.15	—	—	134.85	3

(*) Stok Reaktifler

(**) Stok Tris - HCl

Her deney için bir ATP körü ve ayıraç körü hazırlandı. ATP körü enzim solüsyonu hariç bütün ayıraçları, ayıraç körü ise ATP ve TRİS tamponu hariç diğer ayıraçları ihtiva etmekte idi. Böylece tablo 1 de belirtilen miktarlarda iyon ve tampon içeren tüplerin son hacmi arık su ile 2.5 ml ye tamamlandı. Tüpler ATP ilave etmeden önce 5 dakika 37°C de preenkubasyona tabi tutuldular. ATP ilavesinden sonra ise 30 dakika 37°C de enkube edildi. (Enzim solüsyonu preenkubasyondan önce 0.2 ml miktarda ilave edildi). Enkubasyon sonunda tüpler buz banyosuna konularak reaksiyon durduruldu. 10 dakika sonra oda ısısında 5 er ml cirrasol asit molibdat çözeltisi eklendi. 10 dakika sonra Beckman DU - 2 de su körüne karşı 390 nm de okundu. Ayıraç körü ve ATP körü değerleri örnek değerinden çıkartılarak standart eğri yardımıyla enzim aktivitesi saptandı.

B U L G U L A R :

Gerek civciv ve gerekse tavuk bütanol ekstresi ve liyofilizat- lar da elde edilen sonuçlar aşağıda gösterilmiştir.

TABLO 2 : CİVCİV VE TAVUK BÜTANOL EKSTRESİ VE LİYOFİLİZE PREPARATLARINDA ELDE EDİLEN AKTİVİTE VE PROTEİN DEĞERLERİ.

	Akt* (Ü/ml)	Prot.** (mg/ml)	Sps. Akt. (Ü/mgP)	Akt*** (Ü/ml)	Prot. (mg/ml)	Sps. Akt. (Ü/mgP)
Civciv 45 ml bütanol ekstresi	23	1.03	22.3	168	4.46	37.6
Tavuk 100 ml bütanol ekstresi	33	1.4	23.5	500	10.5	47.6

(*) Bütanol ekstresi

(**) Protein değerleri Lowry metoduna göre ölçüldü (12).

(***) Liyofilize preparat

AF (ALKALEN FOSFATAZ) ENZİMİNİN ATP HİDROLİZ EDİCİ ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Uzm. Dr. Belkıs GÖZEN*
Dr. Güneş YÜREGİR**

Ö Z E T :

Normalde AF lar fosfomonoesterleri hidroliz eden bir izoenzimler topluluğudur. AF da ATP az gibi hücre membranında yer almıştır. AF zın ATP hidroliz edici özelliklerinin araştırıldığı bu çalışmada civciv ve tavuk KC (karaciğer) AF mın ATP üzerine olan etkileri incelenmiş, civciv AF mın ATP yi parçalayamadığı, tavuk AF mın ise parçalayabildiği gözlenmiştir. Yaşla beraber oluşan bu farklılığın muhtemel sebepleri tartışılmıştır.

S U M M A R Y :

EXAMINING OF ATP HYDROLIZING PROPERTIES OF ALKALINE PHOSPHATASE ENZYME :

Alkaline phosphatases have been shown to be distributed throughout the body in various tissues of living organisms. They catalyze the hydrolysis of almost any phosphomonoester to give Pi and corresponding alcohol, phenol or sugar.

ATP ases as a rule membran bound enzymes involved in energy transforming processes and acting in complex physicochemical reactions.

We reported here the isolation of alkaline phosphatase from livers of chicks and chicken, and examined its ATP hydrolizing properties. The variation of enzyme activity development was discussed.

AF lar yapılarında sialik asit bulunduran ve membranda yer alan bir grup enzimlerdir. Sialik asitten dolayı negatif yük taşı-

(*) Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Asistanı.

(**) Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Profesörü

lar ve bu özellikleri sayesinde iyon değiştirme kromatografisi ile ayrıştırılabilirler (5, 6). AF enziminin içinde yer aldığı hücre membranının yapısı incelendiğinde son yılların çok taraftar toplayan Singer ve Nicholson tarafından öngörülen sıvı - mozaik yapısı gözden geçirilmelidir (17).

AF, P - O bağlarının yanısıra P - F (Fluoro fosfat), P - OP (İnorganik fosfat), P - S (Sisteamin S - fosfat), P - N (Kreatin N - fosfat) bağlarını da parçalayabilmektedir. Bazı araştırmacılar değişik kaynaklı AF ların ATP yi hidroliz edici özelliklerini araştırmışlardır. Debruyne yumurta sarısından (4), Vaanen, tavuk kartilajından (20) elde edilen AF ların ATP yi yüksek oranda hidroliz ettiğini göstermişlerdir. Kobori deniz bakterilerinden (10) elde edilen AF zın, Yunis sıçan kloromadan elde ettiği (22) AF in ATP yi çok az hidroliz ettiğini göstermişlerdir. Haussler ve arkadaşları civciv barsağını, Russel ve arkadaşları sıçan barsağı için Ca - ATP az ve AF in aynı enzimler olduklarını ileri sürmüşlerdir (19). Majeska tavuk epifizyel kartilaj matriks veziküllerinde yaptığı çalışma ile ATP az, pirofosfataz ve AF in Levamisole karşı eşit hassasiyet gösterdiklerini izlemiştir (13). Fakat Borgers ve arkadaşları bir levamisol analogu olan (Levamisol : L - Tetramisol) L - p - bromo tetramisolün sıçanın değişik doku AF ları için potent bir inhibitör olduğunu fakat ATP azı inhibe etmediğini göstermişlerdir (2).

Matsuzawa ve Andersen yaptıkları bir araştırmada farelerde epifizyel kartilajda hem ATP nin hem de AF in matriks vezikülün dış membran yüzeyinde yerleştiklerini göstermişlerdir (14).

AF ve ATP azın hücrede lokalizasyonunu ve farklı enzimler olup olmadığını incelemek için ise Saito ve Ide farelerin ayak tabanlarında dijital duyu cisimciklerinin hücrelerinde elektron mikroskobik histokimyasal bir çalışma yapmışlardır. Sonuçlara göre ATP az enzimi bu cisimciklerde yer alan lameller hücrelerin plazma membranındaki (Caveolae) de yani kıvrımlarda yerleşmiştir. (Lameller hücreler plazma membranlarında çok fazla sayıda caveolae ihtiva ederler). Plazma membranının diğer taraflarında ise çok az bir aktivite alınmıştır. AF enzimi yalnız caveolaede yerleş-

miş olup plazma membranının diğer kısımlarında bir aktivite alınmamıştır. Yine aynı hücrelerin sinir uçlarının plazma membranında AF ve ATP az enzimine tesadüf edilmiştir (9).

Bu bilgiler ışığında bizim de amacımız civciv AF' inin ATP yi hidroliz hızına yaşın etkisini araştırmak olmuştur.

MATERYAL ve METOD :

Deneyler için Y₂ hattı civciv ve tavuk kullanıldı. Deneyler için kullanılan civcivler kuluçka makinesinden henüz çıkmış civcivlerdi. Bu civcivlerin bir kısmı 16 haftalığa kadar büyütülerek yetişkin tavuk olarak incelendi.

İzolasyon ve Estraksiyon : Yumurtadan çıkan civcivler eterle bayıltılıp seri halde karaciğerleri çıkartıldı. Doku birkaç kere soğuk suyla yıkandıktan sonra parçalanarak, teflon homojenizatörde doku ağırlığının 10 katı 10mM Tris - CH1 pH : 7.4 tamponu içinde, oda ısısında homojenize edildi. Daha sonra homojenatlara doku ağırlığının 10 katı soğuk n - bütanol ilave edilip 10 dakika sonra sıcak su banyosuna kondu ve 37°C de 10 dakika bekletildi. Bu karışım 1500 rpm de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda gevşek protein kısmı aspirasyonla alındı. Çökeleğin altındaki berrak bütanol fazı toplanarak ayrıldı. Bu faz hemen kullanılmadığı hallerde -20°C de derin dondurucuda saklandı. Büyütülmek üzere alıkonan civcivler tavuk yemi ile büyütüldüler. 16 haftalık iken yukardaki işlemlere aynen tabi tutuldular. Elde edilen bütanol ekstreleri ya hemen kullanıldılar veya hemen kullanılmadığı hallerde derin dondurucuda saklandılar. Sonra liyofilize edildiler.

Örneklerin AF aktivitesi tayini : Sigma metoduna göre yapıldı. 1 Sigma ünitesi belirli deney şartlarında 1 saatlik sürede 1 µM para nitro fenol açığa çıkartan enzim aktivitesi olarak verildi. Reaksiyon sonunda enzim aktivitesine orantılı olarak meydana gelen ürünün (p - nitro fenol) alkali ortamda sarı renk vermesi esasına dayanılarak ölçümler yapıldı. Sonuçlar standartlara göre değerlendirilerek Sigma ünitesi olarak verildi (20).

Ayıraçlar : Tampon olarak pH 10.5 0.1 M glisin, 0,001 M mgCl₂ tamponu kullanıldı. Tampona 85 ml 1 N NaOH eklendikten sonra arık suyla litreye tamamlandı.

Stok substrat solusyonunu % 0.4 PNPP (paranitro - fenil fosfat) : 0.001 M HCl içinde günlük hazırlandı.

Günlük standart : Tampon ve substrat eşit olarak karıştırılıp alkali tamponlu substrat solusyonu elde edildi. Her seferinde taze hazırlandı.

0.02 N NaOH
Konsantre HCl

Deneyin yapılışı : 0.5 er ml tamponlu substrat pipetlenen kör ve numune tüpleri 37°C de 5 dakika bekletildikten sonra kör tüpüne 0.05 ml arık su, numune tüpüne 0.05 ml analiz edilecek numune ilave edildi. 37°C de 30 dakika enkube edildiler. Süre sonunda 0.02 N NaOH ilavesiyle oluşan renk 415 nm de spektronik 20 de okundu. Daha sonra kör ve deney tüplerine 2 damla (0.1 ml) konsantre HCl eklendi. Tekrar absorbanlar okunarak daha önceki absorbanstan çıkarıldı. Kalan absorban değeri standart eğriden değerlendirildi.

AF enziminin ATP az aktivitesi tayini : Örneklerin ATP hidrolizi sonunda açığa çıkarttıkları fosfatın tayini Atkinson yöntemi-ne (1) göre yapıldı. Yöntem ATP den enzim aracılığı ile ayrılan fosfatın cirasol ALN - WX (Lubrol) ve Molibdik asit ile sarı renkli kompleks oluşturma ilkesine dayanmaktadır. Enzimin ATP yi hidroliz edebilme kapasitesi Mg, (Ca ve Mg), (Na, K, Mg) varlığında araştırıldı. Deney ATP az enziminin ATP yi parçaladığı inkubasyon ortamında yapıldı. Enkubasyon ortamı tablo 1 de belirtilmiştir.

TABLO 1 : ATP AZ AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜLDÜĞÜ ENKUBASYON ORTAMI.

AF	Tüplerdeki E11 Son Konsantrasyon (mM)							
	470*	25*	30*	0.75*	125**	211**	306**	75*
	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	Tris-HCl	Tris HCl	Tris HCl	ATP
Na, K, Mg	100	5	6	—	30	—	—	3
Mg	—	—	6	—	—	135	—	5
Ca, Mg	—	—	6	0.15	—	—	134.85	3

(*) Stok Reaktifler

(**) Stok Tris - HCl

Her deney için bir ATP körü ve ayıraç körü hazırlandı. ATP körü enzim solüsyonu hariç bütün ayıraçları, ayıraç körü ise ATP ve TRİS tamponu hariç diğer ayıraçları ihtiva etmekte idi. Böylece tablo 1 de belirtilen miktarlarda iyon ve tampon içeren tüplerin son hacmi arık su ile 2.5 ml ye tamamlandı. Tüpler ATP ilave etmeden önce 5 dakika 37°C de preenkubasyona tabi tutuldular. ATP ilavesinden sonra ise 30 dakika 37°C de enkube edildi. (Enzim solüsyonu preenkubasyondan önce 0.2 ml miktarda ilave edildi). Enkubasyon sonunda tüpler buz banyosuna konularak reaksiyon durduruldu. 10 dakika sonra oda ısısında 5 er ml cirrasol asit molibdat çözeltisi eklendi. 10 dakika sonra Beckman DU - 2 de su körüne karşı 390 nm de okundu. Ayıraç körü ve ATP körü değerleri örnek değerinden çıkartılarak standart eğri yardımıyla enzim aktivitesi saptandı.

B U L G U L A R :

Gerek civciv ve gerekse tavuk bütanol ekstresi ve liyofilizat- lar da elde edilen sonuçlar aşağıda gösterilmiştir.

TABLO 2 : CİVCİV VE TAVUK BÜTANOL EKSTRESİ VE LİYOFİLİZE PREPARATLARINDA ELDE EDİLEN AKTİVİTE VE PROTEİN DEĞERLERİ.

	Akt*	Prot.**	Sps. Akt.	Akt***	Prot.	Sps. Akt.
	(Ü/ml)	(mg/ml)	(Ü/mgP)	(Ü/ml)	(mg/ml)	(Ü/mgP)
Civciv 45 ml bütanol ekstresi	23	1.03	22.3	168	4.46	37.6
Tavuk 100 ml bütanol ekstresi	33	1.4	23.5	500	10.5	47.6

(*) Bütanol ekstresi

(**) Protein değerleri Lowry metoduna göre ölçüldü (12).

(***) Liyofilize preparat

TABLO 3 : AF IN ATP Yİ HİDROLİZ HIZI

	Na, K, Mg	Ca	Mg
Cıvıv Liyofilizati	—	—	—
Tavuk Liyofilizati	—	572 nm Pi	—

Tablo 3 te de görüldüğü gibi civciv preparatlarının ATP yi hidroliz edemediği, tavuklardan elde edilen liyofilizatın ise ATP yi hidroliz ettiği göze çarpmıştır. Tavuk AF' larının da ancak Ca iyonları varlığında ATP yi hidroliz ettiği yani bir Ca - ATP az aktivitesine sahip olaabileceği gözlenmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ :

AF ların vücutta pek çok fizyolojik olayı kataliz ettiği ileri sürülmüştür. Aktif transport yapan hücrelerde bulunması bazı maddelerin transportuna yardımcı olduğunu göstermektedir. Kemikte kalsifikasyonda rol oynamaktadır. Barsak izoenziminin ise yağ absorpsiyonunda rolü olduğuna dair deliller boldur (8).

Adenosin trifosfataz ise bir membran enzimi olup bilinen 3 katalitik aktivitesi vardır. Ca/Mg ATP az kalsiyumun aktif taşınımından sorumludur. Na,K/Mg ATP az ise sodyumun ve potasyumun insan eritrositi içerisine transportundan sorumludur (18). Mg/ATP azın fizyolojik fonksiyonu ise pek kesin değildir. AF enziminin ATP hidroliz edici özellikleri çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiş ve AF in ATP yi hidroliz edebildiği birçok yayınlarda belirtilmiştir. Çalışmamızda civciv AF' ının ATP yi hidroliz edememesine karşın, yetişkin AF' zı ATP yi rahatlıkla parçalayabilmiştir.

AF ların gelişme esnasında strüktürel olarak farklılaşma içinde oldukları ve gelişimin çeşitli basamaklarında değişik biçimlerde ortaya çıktıkları bilinmektedir. Bu durum göz önüne alınınca civciv A F'ının ATP yi hidroliz edemeyişini şöyle açıklayabiliriz. Enzim civcivde henüz ATP yi hidroliz edecek kapasitede değildir veya

TABLO 3 : AF IN ATP Yİ HİDROLİZ HIZI

	Na, K, Mg	Ca	Mg
Cıvıv Liyofilizati	—	—	—
Tavuk Liyofilizati	—	572 nm Pi	—

Tablo 3 te de görüldüğü gibi civciv preparatlarının ATP yi hidroliz edemediği, tavuklardan elde edilen liyofilizatın ise ATP yi hidroliz ettiği göze çarpmıştır. Tavuk AF' larının da ancak Ca iyonları varlığında ATP yi hidroliz ettiği yani bir Ca - ATP az aktivitesine sahip olabileceği gözlenmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ :

AF ların vücutta pek çok fizyolojik olayı kataliz ettiği ileri sürülmüştür. Aktif transport yapan hücrelerde bulunması bazı maddelerin transportuna yardımcı olduğunu göstermektedir. Kemikte kalsifikasyonda rol oynamaktadır. Barsak izoenziminin ise yağ absorpsiyonunda rolü olduğuna dair deliller boldur (8).

Adenosin trifosfataz ise bir membran enzimi olup bilinen 3 katalitik aktivitesi vardır. Ca/Mg ATP az kalsiyumun aktif taşınımından sorumludur. Na,K/Mg ATP az ise sodyumun ve potasyumun insan eritrositi içerisine transportundan sorumludur (18). Mg/ATP azın fizyolojik fonksiyonu ise pek kesin değildir. AF enziminin ATP hidroliz edici özellikleri çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiş ve AF in ATP yi hidroliz edebildiği birçok yayınlarda belirtilmiştir. Çalışmamızda civciv AF' ının ATP yi hidroliz edememesine karşın, yetişkin AF' zı ATP yi rahatlıkla parçalayabilmiştir.

AF ların gelişme esnasında strüktürel olarak farklılaşma içinde oldukları ve gelişimin çeşitli basamaklarında değişik biçimlerde ortaya çıktıkları bilinmektedir. Bu durum göz önüne alınınca civciv A F'ının ATP yi hidroliz edemeyişini şöyle açıklayabiliriz. Enzim civcivde henüz ATP yi hidroliz edecek kapasitede değildir veya

ATP yi hidroliz edecek yapıya kavuşmamıştır. Cıvciv büyüdükçe AF enziminin ATP hidroliz edici özelliği de gelişmektedir. Bu gözlemler sonucu AF enziminin cıvciv ve tavukta farklı olduğu anlaşılmaktadır.

Vaanan tavuk kartilajından elde edilen AF in ATP yi yüksek oranda (21) hidroliz ettiğini göstermiş, AF in Ca iyonları varlığında ATP yi parçalayabildiğini yani bir Ca ATP az aktivitesine sahip olduğunu belirtmiştir. Biz de çalışmamızda tavuk AF inin ancak Ca iyonları varlığında ATP yi hidroliz ettiği ve bir Ca ATP az aktivitesine sahip olduğu sonucuna ulaşmış bulunmaktayız.

Bilindiği gibi AF lar bir izoenzimler topluluğudur. Ayrıca AF ların bir tür içinde de değişiklikler arzettiği bilinmektedir. Her izoenziminde değişik substrat affiniteleri bulunmaktadır. Bu gün genellikle izoenzimlerin aktif merkezlerinin aynı veya en azından benzer olduğu, aktif merkez dışındaki polipeptid zincirlerindeki amino asit sıralarının değişiklik gösterdiği kabul edilmektedir (8).

Yapılan elektroforetik çalışmalar sonucu AF enziminin bir tek doku içerisinde bile değişiklikler arzettiği ortaya çıkarılmıştır (3, 7, 77). Bu bilgilerin ışığında sonuç olarak tavuk ve cıvciv AF larının farklı izoenzimik yapılarda oldukları ve ortama konan ATP substratını farklı hızlarda kullandıkları göze çarpmaktadır. Bu gözlem memeli AF larının memelilerde gelişme süreci içerisinde giderek değiştiğini ileri süren araştırmacıların sonuçlarıyla (15, 16) uyum göstermiş ve cıvciv AF inin da ilerleyen yaşla değişimi kanıtlanmıştır.

KAYNAKLAR

- (1) Atkinson A, Gatenby AD, Lowe AG, The Determination of inorganic orthophosphate in biological systems, *Biochim. Biophys. Acta.* 320 : 195. 1973.
- (2) Borgers M, et al, The inhibition of alkaline phosphatase by L - p - bromo tetramisole, *Histochemistry* 44 : 227. 1975.
- (3) Shiandussi L, Greene SF, Sherlock S, Serum alkaline phosphatase fractions in hepato - biliary and bone diseases, *Clin. Sci. Sci.* 22 : 425. 1962.
- (4) Debroyne I, Stockx J : Further evidence for the aspecificity of the alkaline phosphohydrolase from hen's egg yolk, *Biochim. Soc. Trans.* 5 : 1109. 1977.

- (5) Fernley, H : Mammalian Alkalian Alkaline Phosphatases. in Boyer P.D. (edt) : The Enzymes, New York, Academic Press, 1971 p 417.
- (6) Fishman WH, Ghosh NK, Isoenzymes of human alkaline phosphatase, Adv Clin Chem. 10 : 255. 1967.
- (7) Gordon S : Alkaline phosphatase isoenzymes in serum and tissue, South African Med. J. 39 : 49. 1965.
- (8) Gözen, B : Aktinomisin D'nin Civciv Embriyosu Üzerine olan Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, 1982 Adana.
- (9) İde C, Saito T, Electron mikroskopik histochemistry of ATP ase and alkaline phosphatase activities in Mouse digital corpuscles, J. Neurocytol. 9 : 207.... 1980.
- (10) Kobori H, Taga N, Ekstracellular alkaline phosphatase from marine bacteria : purification and properties of ekstracellular phosphatase from a marine Pseudomonas sp, Can. J. Microbiol. 26 : 833. 1980.
- (11) Lee LMY, Kenny MA : Electrophoretic method for assessing the normal and pathological distribution of alkaline phosphatase isoenzymes in serum, Clin. Chem. 21 : 1128. 1075.
- (12) Lowry OH, Rosebrough, NC, Farr LA, Protein measurement with the phenol reagent, J. Biol. Chem. 193 : 265. 1951.
- (13) Majeska RJ, Wuthier RE, Studies on matriks vesicles isolated from chick epiphyseal cartilage. Association of pyrophosphatase and ATP - ase activities with Alkaline Phosphatase, Biochim. Biophys. Acta. 3 391 : 51. 1975.
- (14) Matsuzawva T, Andersen HC, Phosphatases of Epiphyseal Cartilage studied by electron mikroskopik cytochemical method, J. Histochem Cytocem. 19 : 801. 1971.
- (15) Moog F, The functional differentiation of the small intestine. I. The accumulation of alkaline phosphatase in the duedonum of the chick, J. Exptl. Zool. 115 : 109. 1950 .
- (16) Moog, F, The functional differentiation of the small intestine II. The differentiation of alkaline phosphomonoesterase in the duedonum of the mouse, J, Exptl. Zool. 118 : 187. 1951.
- (17) Noyan, A : Fiziyooloji. Ankara Meteksan Ltd. Şirketi., 1980, p 3.
- (18) Özdemir, Y : İnsan eritrosit membran Na, K/Mg ATP az enziminin kısmi saflaştırılması ve özelliklerinin saptanması, Doktora Tezi, 1981 Adana.
- (19) Özgünen, T : Alkalen Fosfataz izoenzimlerinin tanı yöntemleri, İhtisas Tezi, 1975 Ankara.
- (20) Sigma Technical Bulletin, No : 104, Sigma Chemical Comp. St. Louis, Missouri, U.S.A. 1980.
- (21) Vaanen HK, Korhonen LK, Purification of matriks - Vesicle alkaline phosphatase from chicken epiphyseal cartilage and experiments on its ATP hydrolyzing properties, Clin. Orthop. 148 : 291. 1980.
- (22) Yunis AA, Gentry MA, Purification and properties of alkaline phosphatase from rat chloroma, Cancer Res. 31 : 39. 1971.