

31380

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIĞIR DALAK ASİT FOSFATAZİNİN KISMEN SAFLAŞTIRILMASI,
FİZİKOKİMYASAL VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

31380

Dr. H. Serdar ÖZTÜRK

Danışman: Prof. Dr. İsmail Hakkı GÖKHUN

ANKARA - 1993

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
MATERYAL VE METOD	18
DENEY SONUÇLARI	30
TARTIŞMA	50
ÖZET	55
SUMMARY	56
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	68

GİRİŞ VE AMAÇ

Enzim katalizli reaksiyonların kinetiği üzerinde değişik faktörler, değişik etkiler ortaya çıkabilmektedirler. Ortaya çıkan bu etkiler ise, bazan pratik kullanım açısından veya bazı yeni araştırmalara yön vermek bakımından kullanışlı olabilmektedir. Böyle kullanışlı bilgilerin elde edilebilmesi için de enzimlerle ilgili kinetik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, değişik kaynaklardan izole edilen asit fosfataz enziminin, farklı özellikler gösterdiği, yani pek çok izoenziminin varolduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla değişik dokularda yapılacak yeni saflaştırma işlemleri, enzimin yapısı ve özelliklerinin araştırılması ile daha önceki çalışmalardan elde edilen verilerle karşılaştırılmasının uygun olacağını düşündük.

Asit fosfataz enzimi ile ilgili çalışmalar 1920'li yıllardan günümüze kadar yapılagelmiştir. Pek çok canlı türünün değişik organ ve dokularında enzimin değişik formları bulunmakta ve bu formlar farklı özellikler göstermektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarla bu formların farklı özellikleri ortaya konmaya çalışılmış ve bu çalışmalardan elde edilen bilgilerden de klinikte teşhis ve tedavi amacıyla ve laboratuvarlarda yeni araştırmalarda yararlanılmaktadır.

Ancak asit fosfataz ile ilgili olarak 70 yıldan beri yapılan bunca çalışmaya rağmen bugün hâlâ enzimlerin tabii substratı bilinmemektedir. Bu sebeple hakkında çok fazla çalışma yapılmış olmasına rağmen hâlâ bu enzimle ilgili yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Biz bu çalışmamızda asit fosfataz enzimini sığır dalağından kısmen saflaştırarak, fizikokimyasal ve kinetik özelliklerini incelemeyi amaçlıyoruz.

GENEL BİLGİLER

Fosfatazlar fosforik asit esterlerinin hidrolitik parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir. Optimal aktivite gösterdikleri pH bölgesine göre asit fosfatazlar ve alkali fosfatazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (10, 24).

Asit fosfataz ismi optimal aktiviteleri pH 7'nin altında olan bütün fosfatazları ihtiva eder. Dolayısıyla bu isim, belirli bir enzim çeşidinden ziyade birbirine benzer veya ilişkili enzimleri ihtiva eden bir gruba aittir (71).

SİSTEMATİK ADLANDIRILMASI VE KATALİZLEDİĞİ REAKSİYON

Asit fosfataz enziminin sistematik adı; ortofosforik monoester fosfohidrolaz, asit optimum, (EC 3.1.3.2)'dir. Genel reaksiyonu:



şeklinde yazılabilir (11). Buradaki R enzimin substratlarından herhangi biri olabilir. Bugüne kadar, enzimin açıkça ifade edilen spesifik fizyolojik bir substratı kesin olarak belirlenememiştir (11). Ölçüm için substrat olarak değişik bileşikler kullanılmıştır. Bu bileşiklerin seçiliş sebebi ise genellikle reaksiyon ürününün kolorimetrik ve florometrik tekniklerle kolayca tayin edilebilir (11).

Asit fosfataz, fosfomonoesterlerin büyük bir bölümünden ve fosfoproteinlerden inorganik fosfat'ı ayırır. Çeşitli kaynaklardan izole edilen Asit fosfataz enzimleri pirofosfat bağlarına da etki etmektedir. Mesela sığır dalağında izole edilen enzim PP_1 , ATP ve ADP'yi hidrolize edebilir (7).

ASİT FOSFATAZ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALARIN TARİHİ GELİŞİMİ VE ENZİMİN BULUNDUĞU YERLER

Martland ve arkadaşları 1924 yılında eritrositlerde bir fosfataz aktivitesi olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra Roche eritrositlerdeki fosfatazın optimum pH'larının 6,0-6,2 ve lökositlerdekinin 8,8-9,0 olduğunu tespit etmiştir. Roche ayrıca eritrosit ekstraktları tarafından α -gliserofosfatın β -gliserofosfattan daha hızlı parçalandığını buna karşılık plazmadaki asit fosfataz aktivitesi için bunun aksinin gerçekleştiğini gösterdi. Kutscher ve Wolberg erkek idrarındaki asit fosfataz aktivitesinin kaynağını araştırırken asit fosfataz aktivitesinin insan prostatında çok yüksek olduğunu buldular. 1942'de Woodard tarafından prostattaki asit fosfataz aktivitesinin kemik, karaciğer ve böbrek ekstraktlarından bin kat daha fazla olduğu gösterildi. 1968 yılında Igarashi ve Hollander sıçan karaciğerinden asit fosfatazı izole ederek belirli şartlarda aktivitenin allosterik kontrolünün mümkün olabileceğini gösterdiler (33).

Asit fosfataz, tabiattaki canlıların hemen hemen tamamında yaygın olarak bulunmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda araştırmacılar insan ve hayvan hücrelerinin büyük çoğunluğunda, arpa ve badem gibi bazı bitkilerin tohumlarında, turuncgillerde, mantarlarda ve bakterilerde bu enzimin bulunduğunu bildirmişlerdir (10, 33).

Tablo 2.1'de bazı asit fosfatazların ilk bulunduğu yerler gösterilmiştir (33).

Tablo 2.1. Bitki ve Hayvan Kaynaklı Bazı Asit Fosfatazların Bulunduğu Yerler

Nonspesifik Asid Fosfomonoesterazların Bulunduğu Yerler	
<u>İnsan ve Hayvanlardan</u>	
Prostat glandı (İnsan ve maymun)	Kutscher ve Wolberg (1935) Kutscher ve Pany (1938) Siebert ve arkadaşları (1955)
Böbrek	Perlmann ve Ferry (1942)
Karaciğer	Bamann ve Diederichs (1935)
Dalak	Bamann ve Diederichs (1935)
Eritrositler	Abul Fadl ve King (1949)
Kan Plazması	Fishman ve Davidson (1957)
<u>Diğer Kaynaklar</u>	
Küfler	Uzawa (1932) Bamann ve Meisenheimer (1936)
Mayalar	Albers ve Albers (1935) Lüvers ve Malseh (1929) Schaeffner ve Krumei (1938)
Tohumlar (Badem, arpa)	Waldschmidt-Leitz ve Mayer (1935) Joyce ve Grisolia (1960)
Turunçgiller	Axelrod (1947)
Bakteriler (Stafilokok, E. Coli)	Malveaux ve San Clememente (1969) Rothschild (1965, 1966, 1967)

Asit fosfataz eritrositler dışında bütün hücrelerde mevcut bir organel olan lizozomlarda bulunur (4, 10, 71). Elektron mikroskopik immünohistokimyasal çalışmalar sıçan karaciğerindeki asit fosfatazın lizozomal membranın iç yüzüne ve

lizozomal matriksteki materyal kümelerine asosiye olduğunu ortaya koymuştur (71). Enzim eritrositler ve trombositlerde de önemli miktarda bulunur (11, 71). En çok bulunduğu yer ise prostattır. Sağlıklı bir erkekte alınan kandan elde edilen serumdaki asit fosfataz enziminin 1/3 ilâ 1/2'si prostat kaynaklıdır. Sağlıklı erkeklerin serumundaki asit fosfataz'ın geri kalan kısmı ile sağlıklı kadınların serumundaki asit fosfatazın kaynağı bilinmemektedir. Fakat bunun kaynağının kemiğin osteoklastları olduğuna dair deliller vardır (73). Bir başka kaynakta ise sağlıklı bireylerin serum veya plazmasındaki mevcut enzimin çoğunluğunun trombosit turnover'inden geldiğinin düşünüldüğü bildirilmektedir (11).

Bunlardan başka enzimin çok bulunduğu yerler arasında karaciğer, dalak, süt, kemik (osteoklastlar), lökositler, seminal sıvı sayılabilir (10, 11, 60, 71). Ayrıca enzimin, pankreas, testisler, böbrekler, akciğerler, barsaklar, böbrek üstü bezleri, iskelet kası, overler, timus, kalp kası, paratiroidler, uterus, safra kesesi, deri gibi dokularda da bulunduğu bilinmektedir (10, 60, 71). İnsan prostatında diğer dokulardakinden birkaç yüz kat daha fazla asit fosfataz aktivitesi bulunmaktadır (13).

ASİT FOSFATAZ'IN İZOENZİMLERİ

Asit fosfataz'ın tabii formu, mol ağırlığı yaklaşık 100.000 - 125.000 olan bir dimerdir. Enzimi, yapı olarak birbirinin aynı 2 alt birimden meydana gelmiştir. Enzime kompleks bir karbonhidrat olan sialik asit moleküllerinden birkaç tanesi bağlanmıştır. Proteine bağlı olan sialik asit moleküllerinin sayısının izoenzim fraksiyonunun belirlenmesini sağladığı sanılmaktadır (11).

Halen tam olarak kaç asit fosfataz izoenziminin var olduğu konusunda kesin bir fikir birliği yoktur (11). Yapılan araştırmalarda elektroforez ile serumda 3, çeşitli organ ve dokularda 17 kadar asit fosfataz izoenzimi bulunmuştur (10). Poliakrilamid jel elektroforezi ile yapılan bir çalışmada plazmada 5 izoenzimi tes-

bit edilmiştir (60). Başka bir kaynağa göre ise nişasta jeli, poliakrilamid jel ve diğer ayırma ortamları kullanılarak yapılan elektroforez çalışmalarında maksimum 8 izoenzim formunun varlığı gösterilmiştir (11).

Bu izoenzimler arasındaki fark, izoenzimlerin bir kısmı için sahip oldukları farklı protein yapılarından kaynaklanır. Diğer kısmı için ise farklılık proteine bağlı olan sialik asit moleküllerinin sayısına bağlıdır. Bu ikinci durumda molekülün karbonhidrat kısmı ayrıldığında geriye kalan protein, bazı izoenzimlerde birbirinin aynıdır (11).

Değişik hastalıklarda serum asit fosfatazındaki artış değişik izoenzimlere bağlı olduğundan artışın hangi izoenzimden kaynaklandığını tesbit etmek teşhis bakımından önemlidir. Bu sebeple değişik izoenzimlerin serumdaki tayini için bazı teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikler kimyasal metodlar, elektroforez ve RIA (Radioimmunoassay) olarak sıralanabilir (11).

Prostat Asit Fosfatazi: Sağlıklı bir erkeğin serumunda bulunan asit fosfatazın 1/3 ilâ 1/2'si prostat kaynaklıdır (11, 71). Prostat asit fosfatazi tartarat tarafından kuvvetle inhibe edilir (11, 13, 60, 71). Bununla birlikte bu, ayırım için tam olarak güvenilir değildir. Çünkü trombositler ve lökositlerde bulunan izoenzim fraksiyonları da büyük oranda tartarat tarafından inhibe edilir (11). Bunlar elektroforezde orijinden büyük oranda uzaklaşanlardır. Elektroforez çalışmalarına göre en az iki prostat kaynaklı izoenzim formu vardır (11).

Ayrıca prostat kaynaklı asit fosfatazın ölçümünün RIA ile de yapılması mümkündür (11).

Eritrosit Asit Fosfatazi: Asit fosfatazın eritrositlerdeki aktivitesi relatif olarak, retikülositler ve eritroblastlardan daha azdır. Altı fenotipli bir genetik polimorfizm gösteren 3 izoenzimi bilinmektedir. Eritrosit enzimi, α -naftilfosfatın

parçalanmasında zayıf tesir gösterir. Formaldehit ve bakır iyonları tarafından inhibe edilir. L-tartarat tarafından ise inhibe edilmez (60, 71). Ayrıca elektroforez'de orijinden hareket etmez (11).

Trombosit Asit Fosfatazi: Kanının pıhtılaşması esnasında plazmaya verilir. Bu enzim öncelikle β -gliserofosfat substratını parçalar, p-nitrofenilfosfat ve α -naftil fosfat substratlarına da tesir eder. Formaldehit ile inhibe edilir (60). Ayrıca tartaratın da inhibitör etkisi vardır (11).

Kemik Asit Fosfatazi: Sadece kemik hastalıklarında değil, bilhassa meme karsinomlarının metastazında, paget hastalığında ve hiperparatiroidide bu asit fosfataz izoenziminin yükseldiği gözlenmiştir. Enzimin kaynağı daha ziyade osteoklastlardır. Kemik asit fosfatazi en çok fenilfosfat ve α -naftilfosfat substratlarına spesifiktir. L-tartarat tarafından inhibe edilmez (60). Elektroforezdeki mobilitesi fazladır.

Gaucher Asit Fosfatazi: Bu izoenzim Gaucher hücrelerinin lizozomlarında lokalize olmuştur. Retikülositlerde de bulunur. Bir lipidoz olan Gaucher hastalığında bulunan serum asit fosfatazının kaynağı izah edilememiştir. Bu izoenzimin dalaktan kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir. Bu izoenzim L-tartarat tarafından inhibe edilemez (33, 60).

Lökositlerde bulunan izoenzim fraksiyonu da tartarat tarafından büyük oranda inhibe edilir (11).

ASİT FOSFATAZ ÖLÇÜMÜNDE KULLANILAN SUBSTRATLAR

Asit fosfatazın fizyolojik rolü bilinmediğiden, enzimin plazma veya diğer materyallerdeki tayini güçleşmektedir. Bu sebeple de enzimin biyokimyasal fonksiyonlarını en iyi şekilde ortaya koyacak spesifik bir substrat bulunamamıştır. Es-

kiden beri kullanılan substratlar ölçüm kolaylığı gibi sebeplerden dolayı tercih edilmektedir (11).

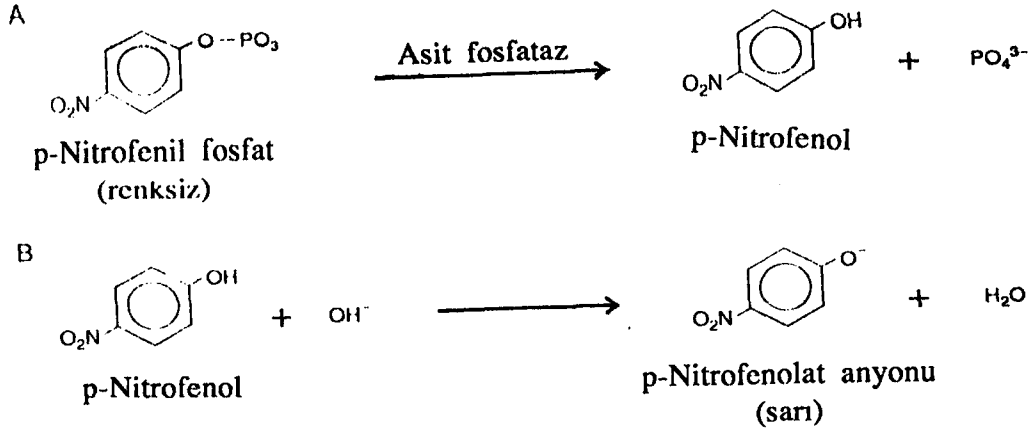
Kullanılan substratların bazıları Tablo 2.2'de gösterilmiştir (11).

Tablo 2.2. Asit Fosfatazın Substratları

ACP'nin Substratları		
Reaksiyon Adı	Kullanılan Substrat	Yorum
Bodansky	Beta-gliserofosfat	Uzun bir ölçüm, Nonspesifik
Gutman, King-Armstrong	Fenilfosfat	Nonspesifik
Hudson	p-nitrofenilfosfat	Hızlı, nonspesifik
Babson ve Reed	Alfa-naftil fosfat	Az duyarlı
Roy	Timolftalein mono fosfat	Prostatik form için daha spesifik
Rietz, Guilbault	4-metilumbeliferon fosfat	Floresan, kısmen duyarlı

Asit fosfataz için spesifik bir substratın bulunmayışı, literatürde farklı farklı ünite tariflerinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Ünite tarifleri uygulanan substrata, ölçülen ürüne, reaksiyon süresine, sıcaklığa, tampona ve reaksiyon sisteminin pH'ına göre değişir (11).

Asit fosfataz ölçümlerinde en çok kullanılan substrat p-nitrofenil fosfattır. Ürün (p-nitrofenol), alkali çözeltide, parlak sarı bir renk verdiği için hidroliz miktarının ölçümü oldukça doğrudur. İnkübasyon periyodunun sonunda baz ilâvesi reaksiyonu durdurur ve pH'yı alkali tarafa kaydırır. Oluşan p-nitrofenolat anyonu 410 nm'de kuvvetli bir absorpsiyon verir (11). Bu reaksiyon Şekil 2.1'de görülmektedir.



Şekil 2.1.

Asit fosfataz ölçümünün en önemli amacı prostat karsinomunu araştırmak olduğu için araştırmacılar, eskiden beri bu izoenzime duyarlı spesifik bir substrat bulmaya çalışmışlardır. Önceleri alkali fosfataz ölçümünde kullanılan timolftalein-monofosfat, daha sonra asit fosfataz ölçümünde de kullanılmaya başlanmıştır. Bu substrat, prostatik asit fosfataz için oldukça yüksek derecede bir spesifiklik gösterir. Diğer izoenzimlerle düşük oranda hidroliz görülür. Timolftalein monofosfatın yapısı p-nitrofenilfosfata göre çok daha komplike olmasına rağmen, ürünün rengi bazik çözeltideki aynı tip fenolat anyonu oluşumu neticesinde ortaya çıkar. Ürün (timolftalein) 590 nm'de kuvvetli bir absorpsiyon verir. Absorbansın 590 nm'de ölçülmesi hemoglobinin veya bilirubinin absorbansına bağlı interferans riskini de ortadan kaldırır. Çünkü hemoglobin ve bilirubin 410-450 nm aralığında kuvvetli absorpsiyon verirler (11).

ASİT FOSFATAZIN BAZI ÖZELLİKLERİ

Serum asit fosfataz değerleri yaşa göre değişir. Yenidoğanlardaki asit fosfataz değerleri erişkinlerdekine 2-3 katı kadardır. Çocukluk döneminde erişkinlerinkinden belirgin şekilde yüksek olarak devam eder. Erken adolesans döneminde seviye düşmeye başlar ve 20 yaşından önce erişkin seviyesine iner.

Bundan sonra asit fosfotaz aktiviteleri erişkinlik dönemi boyunca değişmeden kalır. Enzimin referans değerleri kullanılan metoda göre değişir. Eğer kullanılan substrat fenolftalein monofosfat ise erişkin referans değeri 0,5-1,9 U/L'dir. Substrat p-nitrofenilfosfat ise Bessey-Lowry-Brock metoduna göre referans değeri 1-12 U/L'dir (11).

Değişik asit fosfatazların optimum pH'ları kaynaklandıkları dokuya ve enzimin etkili olduğu substrata göre değişir (71).

Asit fosfotazlar özellikle 37°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ve 7,0'nin üzerindeki pH seviyelerinde stabil değildirler (71). Serumdaki bazı enzim formları, özellikle prostatik fosfataz labildir (25, 73). Enzim oda sıcaklığında, pıhtı ayrılmamışsa birkaç saat stabil kalabilir. Eğer pıhtı ayrılmışsa aktivitesini hemen kaybeder (11). Oda sıcaklığında bir saatte asit fosfataz aktivitesinin % 50'si kaybolur. Serum numunesinin sitratla pH 6,5'un altında saklanması enzimin stabil kalmasını sağlar (13, 25, 71).

Prostat kanserinin teşhisinde ve izlenmesinde yükselmiş serum asit fosfataz seviyesinin klinik önemi sebebiyle prostatik ve non-prostatik formlarının ayırt edilebilmesi arzu edilen bir durumdur (71). Prostatik asit fosfataz tartarat iyonları tarafından kuvvetle inhibe edilir. Eritrosit izoenzimi ise inhibe edilmez (10, 11, 13, 60, 71). Eritrosit asit fosfatazı formaldehit ve Cu^{++} iyonları tarafından inhibe edilir. Prostatik asit fosfataz ise bunlara karşı dirençlidir. Dolayısıyla bu inhibitörler prostat ve eritrosit kaynaklı asit fosfataz izoenzimlerinin ayrılmasını sağlarlar (10, 13, 71). Bununla birlikte özellikle tartaratla yapılan ayırma tam olarak güvenilir değildir. Çünkü trombositler ve lökositlerde bulunan izoenzim fraksiyonları da tartarat tarafından yüksek oranda inhibe edilirler (11). Prostat kaynaklı enzim ayrıca bazı 2-hidroksi karboksilik asitler tarafından da inhibe edilmektedir (7). Normal serumdaki asit fosfatazın florür iyonlarıyla inhibe edildiği

bildirilmektedir (10, 11). Kan numunesi alınırken uygun bir antikoagülanın seçimi önemlidir. Çünkü hem oksalat, hem de heparin enzim aktivitesinde düşüğe sebep olurlar (11). Sığır böbrek korteksinden saflaştırılan asit fosfataz enzimi cıva ve gümüş kanyonları tarafından inhibe edilmektedir (22). İnsan prostatından elde edilen Asit fosfataz'ın p-nitrofenilfosfat ve β -gliserofosfat substratları üzerindeki aktivitesi 10 mM malonat tarafından inhibe edilmektedir (77).

Bazı mantarlardan elde edilen asit fosfataz, Mg iyonlarına ihtiyaç duymakta ve Ca iyonları tarafından inhibe edilmektedir (77). Polifloretilfosfat prostatik asit fosfatazı inhibe etmektedir (77). Aynı enzim üzerinde poliestradiolfosfat daha fazla inhibitör etki göstermektedir (77). Bu enzimi arjinatda kuvvetle inhibe etmektedir (77). 1 mM o-iodosobenzoat insan eritrositlerindeki asit fosfatazı inhibe ettiği halde, 10 mM o-iodosobenzoat insan prostat asit fosfatazı üzerinde inhibitör etki göstermemektedir. Böbrek asit fosfatazı arsenikli bir organik bileşik olan Lewisite tarafından inhibe edilmektedir (78).

Kato ve arkadaşları sıçan kemiğinden elde ettikleri asit fosfatazın amonyum molibdat sodyum florür ve bakır sülfat tarafından inhibe edildiğini, buna karşılık Fe^{+2} iyonları, askorbik asit, sistein, ditiotretiol ve 2-merkaptotanol tarafından aktive edildiğini bildirmişlerdir (40). Hara ve arkadaşları sıçan dalağında elde edilen asit fosfataz enziminin Fe^{+2} iyonları ve askorbik asit tarafından aktive edildiğini göstermişlerdir (26, 27).

Vincent ve arkadaşları sığır dalağında saflaştırdıkları mor (purple) asit fosfatazla yaptıkları kinetik çalışmalarda değişik inhibitörlerle çeşitli inhibisyon tiplerinin varlığını göstermişlerdir (73).

Schindelmeiser ve arkadaşları Tip I Gaucher hastalığı olan 3 yaşındaki bir çocuğun dalağında elde ettikleri biyopsi materyalinden tartarata dirençli purple asit fosfatazı izole ederek immüno ve sitokimyasal analizini yapmışlardır (65).

Waymack ve Van Etten, buğday tohumu asit fosfatazının homojen izoenzimlerini saflaştırarak bazı özelliklerini araştırmışlardır (18).

Kubicz ve arkadaşları kurbağa karaciğerinden elde ettikleri düşük molekül ağırlıklı asit fosfataz izoenzimlerinin oligosakkaritlerin bağlı olduğu yan zincirlerinin birbirinden farklı olduklarını göstermişlerdir (42).

Schell ve arkadaşları Trypanosoma Bruceiden tartarata duyarlı bir asit fosfataz saflaştırarak özelliklerini araştırmışlardır (63).

Panara ve arkadaşları arpa kökünden asit fosfatazı saflaştırarak bazı kinetik özelliklerini incelemişlerdir (57).

Dissing ve Svensmark, insan eritrosit asit fosfatazını saflaştırarak A, B, C izoenzimlerinin özelliklerini araştırmışlardır (15).

Panara ve arkadaşları kurbağa (*Rana esculenta*) karaciğerinden asit fosfatazın değişik formlarını saflaştırarak hücre içi lokalizasyonlarını, molekül ağırlıklarını, optimum pH'larını, substrat ve inhibitörlerini incelemişlerdir (54).

Stepan ve arkadaşları hairy-cell lösemili bir hastanın dalağında asit fosfataz tip 5'in tartarada dirençli iki alt grubunu saflaştırarak N-terminal dizilişini göstermişlerdir (68).

Anderson ve Toverud sıçan karaciğerinden, Lau ve arkadaşları sığır karaciğerinden asit fosfatazı saflaştırarak iskelet asit fosfatazının çeşitli özelliklerini incelemişlerdir (1, 44).

Gieselmann, Ketcham, Waheed ve arkadaşları insan plasentasından asit fosfatazı saflaştırarak çeşitli fizikokimyasal özelliklerini incelemişlerdir (23, 41, 75).

Himeno ve arkadaşları sıçan karaciğeri lizozomlarındaki asit fosfatazı saflaştırarak lokalizasyonunu ve fizikokimyasal özelliklerini incelemişlerdir (30, 31, 32).

Janska, Kubicz ve arkadaşları, kurbağa, sazan ve yayın balığı karaciğerinden asit fosfataz enzimini saflaştırarak termostabilitesini, karbonhidrat kompozisyonunu, çeşitli inhibitör ve aktivatörlerin etkilerini incelemişlerdir (36, 37, 38, 39, 43).

Arnold ve arkadaşları *Spherothrix Schenckii*'den, Lopandic ve arkadaşları *Saccharomyces Cerevisiae*da, Moran ve arkadaşları *Yarrowia Lipolytic*adan, Schweingruber ve arkadaşları *Saccharomyces Pombe*'den asit fosfataz enzimini saflaştırarak çeşitli inhibitör ve aktivatörlerin etkilerini incelemişlerdir (3, 46, 52, 66).

Avila ve arkadaşları ile Lovelace ve arkadaşları Leishmanialardan, Barclay ve arkadaşları ise listerialardan asit fosfataz enzimini saflaştırarak çeşitli substratlarını ve inhibitörlerin etkilerini incelemişlerdir (4, 6, 47, 48).

Basboa ve arkadaşları yer fıstığı filizlerinden, Basha yer fıstığı tohumundan, Fujimoto ve arkadaşları tatlı patatesden asit fosfataz enzimini saflaştırarak çeşitli fizikokimyasal özelliklerini incelemişlerdir (8, 9, 21).

Terracio ve arkadaşları sıçan ventral prostatından, Chevalier ve arkadaşları, Van Etten ve Saini ise köpek ve insan prostatından asit fosfataz enzimini saflaştırarak çeşitli substratlar üzerindeki tesirlerini ve inhibitörlerin etkilerini incelemişlerdir (12, 69, 72).

Hibbard ve arkadaşları benign hipertrofik prostat dokusundan, Lin ve arkadaşları ile Rusciano ve arkadaşları ise insan semeninden asit fosfatazı elde ederek çeşitli özelliklerini incelemişlerdir (29, 45, 62).

Filmus, Podhajcer ve arkadaşları tarafından kanserli meme dokularından asit fosfataz enzimi saflaştırılarak çeşitli substratlar üzerindeki aktiviteleri ve diğer fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir (20, 58, 59).

Panara ve Mileti tavuk karaciğerinden asit fosfatazı saflaştırarak molekül ağırlığını, optimal pH'sını ve çeşitli inhibitörlerin etkilerini incelemişlerdir (55, 56).

Hara, Kato ve arkadaşları sıçan kemiği ve dalağından elde ettikleri asit fosfatazın substratlarını, aktivatörlerle inhibitörlerini incelemişlerdir (26, 27, 40).

Barboni ve arkadaşları bal arısı zehirinden asit fosfataz enzimini saflaştırarak optimal pH ve Michaelis-Menten kinetiklerini incelemişlerdir (5).

ASİT FOSFATAZIN KLİNİK ÖNEMİ

Asit fosfataz enziminin ölçümünün değer taşıdığı en önemli klinik durum prostat karsinomudur (2, 10, 11, 71). Bu hastalıkta serum asit fosfataz seviyesi yüksektir ve hastalık ilerledikçe artmaya devam eder. Meme kanserli kadınların büyük bölümünde, değişik tiplerde kansere yakalanmış pek çok hastada olduğu gibi serum asit fosfatazında bir artış vardır (11, 71).

Osteoporoz, multipl myelom, Paget hastalığı, iskelet tutulumu olan hiperparatiroidi gibi kemik hastalığı bulunanlarda ve diğer ilgili klinik durumlarda asit fosfataz enzimi seviyesinde artış olduğu bildirilmiştir (11, 71). Belli bazı sfingolipid bileşiklerinin birikmesi ile karakterize bir metabolik bozukluk olan Gaucher ve Nieman-Pick hastalıklarında asit fosfataz seviyesinde ekseriya artış gözlenir (11, 60, 71). Gaucher hastalığında spesifik izoenzim, elektroforez veya kolon kromatografisi ile ayrılabilir ve hastalığın daha iyi bir karakterizasyonu sağlanır (11). Bazı böbrek rahatsızlıklarında da serum asit fosfatazında bir artış görülür. Enzi-

min idrardaki artışı da sıklıkla görülür. Fakat bunun klinik önemi henüz bilinmemektedir (11).

Enzim aynı zamanda bazı karaciğer rahatsızlıkları ve safra yolları tıkanmalarında da artar (11).

Trombosit yıkılımının artmasıyla karakterize trombositopenilerde plazma asit fosfataz seviyesi önemli derecede yükselir. Trombositopeni trombosit oluşum bozukluğuna bağlıysa asit fosfataz seviyesi normal sınırları içerisindedir (60). Tromboz ve emboli gibi tromboembolik hastalıklarda da asit fosfataz seviyesi artabilir. Bilhassa akciğer embolisinde, myokard infarktüsünde, periferik venöz ve arteriel trombozlarda asit fosfatazlarda yükselme görülür. Bu olaylarda yükselen enzim aktivitesi kısmen eritrositlerden kaynaklanmaktadır (60).

Akut ve kronik myeloid lösemi, myeloid metaplazi, myeloma, kronik lenfositik lösemi, polisitemia vera, megaloblastik anemi gibi bazı kan hastalıklarında da enzim aktivitesinde hafif bir yükselme tespit edilmiştir (5).

Benign prostat hipertrofilisi hastalarda serum enzim seviyesi normal sınırlardadır. Fakat bu hastalardan prostatik manuplasyon yapılan hastalarda nadiren yükselme görülür (71).

Prostat Kanseri: Prostat karsinomu yaşlı erkeklerde gelişen kanser tiplerinin en çok görülenlerinden biridir (11). Prostat kanserlerinin teşhisinde ve tedavisinin takibinde serum asit fosfataz seviyesinin tayin edilmesi faydalı olmaktadır (10, 11, 71). Bu önemli hastalık Amerikalı erkeklerde görülen kanserden ölümlerin ikinci en sık sebebidir (Yılda 17.000) (71). Hastalık prostatta küçük kanser adacıkları şeklinde başlar (Stage I). Stage II'de prostatta kanser nodülleri oluşmaya başlar. Kanser çoğu vakada diğer dokulara hâlâ yayılmaya başlamamıştır. Stage III'de tümör pelvik bölgedeki komşu bölgelere yayılır. Stage IV'de

ise özellikle lenf nodülleri ve kemik gibi diğer dokularda metastaz vardır. Erken teşhis başarılı tedavi için gereklidir. Eğer hastalık Stage I'de teşhis edilmişse yaşma ihtimali normal popülasyondaki herhangi birine eşittir. Prostat karsinomunun II. evresinde bile 5 yıllık yaşama ihtimali % 70-90'dır. Survive (5 yıllık) Stage III'de (% 40-70) ve Stage IV'de (% 16-25) belirgin şekilde düşer. Açıkça görülmektedir ki kanser ne kadar erken teşhis edilirse, tedavi o kadar erken başlayabilmekte ve survivein uzun olma ihtimali artmaktadır. Prostat kanseri teşhisindeki ilk adım doktorun fizik muayene esnasında prostat palpasyonudur. Bu muayene ile prostat kanserinin Stage I ve Stage II evrelerinde teşhisi çok nadir olarak mümkündür. Prostat karsinomu vakalarında sadece Stage III ve Stage IV fizik muayene ile tespit edilebilir (11).

Stage I veya II'deki hastaların çok azının serum asit fosfatazında belirgin bir artış olur. Stage I'deki hastaların sadece % 12'si ve Stage II'dekilerin ise % 15'i serum enzim aktivitesinde dikkate değer artış gösterir. Stage III'te bile hastaların % 70'i enzim aktivitesi ölçümünde normal asit fosfataz seviyesi gösterir. Sadece Stage IV'deki hastaların anlamlı bir yüzdesi (yaklaşık % 60'ı) asit fosfataz seviyesinde önemli bir artış gösterir (11). Görüldüğü gibi serum asit fosfataz seviyeleri hastalığın ilk devrelerinde fazla yükselmemektedir. Buna karşılık iskelet dokusundaki metastazlardan sonra, muhtemelen prostat hücrelerinin sayısındaki bir artışa bağlı olarak, yüksek değerlere erişmektedir (33, 35, 53).

Benign prostat hipertrofili hastalarda serum enzim seviyesi normal sınırlardadır. Bu hastalardan prostatik maniplasyon yapılanlarda nadiren yükselme olur. Bugün bunun doğruluğu tartışılmaktadır (17, 18, 71, 74).

Son yıllarda prostatik asit fosfataza spesifik anti serumların kullanılması esasına dayanan çeşitli immunolojik metodlar geliştirilmiştir (14, 19, 64). Bu metodların özellikle RIA'nın ileri hassasiyeti ve spesifikliğı prostat kanserinin değişik evrelerinin teşhisinde asit fosfataz tayininin değerinin yeniden gözden

geçirilmesine sebep olmuştur (35, 67, 71). Monoklonal antikorlar kullanılarak prostatik asit fosfataz ölçülmesi 1980'den sonra klinik çalışmalara ışık tutmaya başlamıştır (17, 34, 50, 61).

Immunoassay tekniği, enzimin aktivitesinin değil, kütesinin ölçümünü sağlamaktadır (11).

Stage II ve Stage III'deki hastaların % 70-80'i immünoassay ile artmış asit fosfataz seviyesi gösterir. Stage IV'deki hastaların ise % 90'dan fazlasında asit fosfataz seviyesi artmıştır. Burada güçlük, Stage I karsinomlarının sonuçlarındadır. Çünkü bu hastaların sadece % 30-35'inde immunoassay teknikleri ile asit fosfataz seviyesi artmış bulunmaktadır (7, 11). Asit fosfataz ölçümünde karışıklık yaratan bir diğer durumda non-prostatik karsinomu olan kadın ve erkek hastaların % 5-10'unda immünokimyasal tekniklerle dolaşımdaki asit fosfataz miktarı artmış bulunur (11).

Serum veya plazmada asit fosfataz ölçümü yüksek oranda prostat karsinomunun teşhisini amaçlamakla birlikte bu, bu konudaki teşhisle ilgili problemin son cevabı değildir. Prostat karsinomunun erken ve tedavi edilebilir bir evrede teşhisini sağlayacak spesifik bir metodun geliştirilebilmesi için çalışmalar halen devam etmektedir.

Asit Fosfatazın Adli Tıptaki Yeri ve Önemi: Asit fosfatazın seminal sıvıda yüksek konsantrasyonda bulunması sebebiyle henüz yapılmış seksüel ilişkinin tespitinde fiziksel delilin bir parçası olarak vajende bu enzimin araştırılması yöntemi uzun süreden beri kullanılmaktadır (11, 71). Tecavüz iddialarında olaydan sonra mümkün oldukça çabuk olarak vajen sürüntüsü alınır. Ve hem sperm hücrelerinin varlığı, hem de asit fosfataz aktivitesi açısından incelenir. Henüz yapılmış bir ilişki yoksa asit fosfatazın vajinal seviyesi aranmayacak seviyededir. Ancak seminal sıvının varlığı ilişkiden birkaç saat sonraya kadar açık bir şekilde asit fosfataz aktivitesinde yükselmeye sebep olur (11).

MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Beckmann Model 25 Spektrofotometre, Waring blender, Sorwall superspeed SS 1 tip santrifüj cihazı, ISCO soğutmalı fraksiyon kollektörü, Pharmacia fine chemicals 1,5 x 90 cm kolon.

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Para-nitrofenilfosfat, amonyum sülfat, tris, amonyum molibdat, L-prolin, sitrik asit monohidrat, lityum sülfat Merck'den, sodyum pirofosfat ve arsenik asidi Fisher'den, Sephadex G100-120 Sigma'dan temin edildi.

3.2. Metodlar

Çalışmamızda önce asit fosfataz enzimi sığır dalağında kısmen saflaştırıldı. Saflaştırma işleminin her basamağında enzimin aktivitesi ve total protein miktarları ölçüldü. Kısmen saflaştırma işleminin sonunda ise enzimin p-nitrofenil fosfat substratına karşı Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_m değeri hesaplandı. Bundan sonra saflaştırılan sığır dalak asit fosfatazının kinetik özelliklerini tespit için deneyler yapıldı. Bu deneylerde, amonyum molibdat, Napirofosfat, prolin, lityum sülfat, arsenik asit gibi değişik efektörlerin pH'nın ve sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendi.

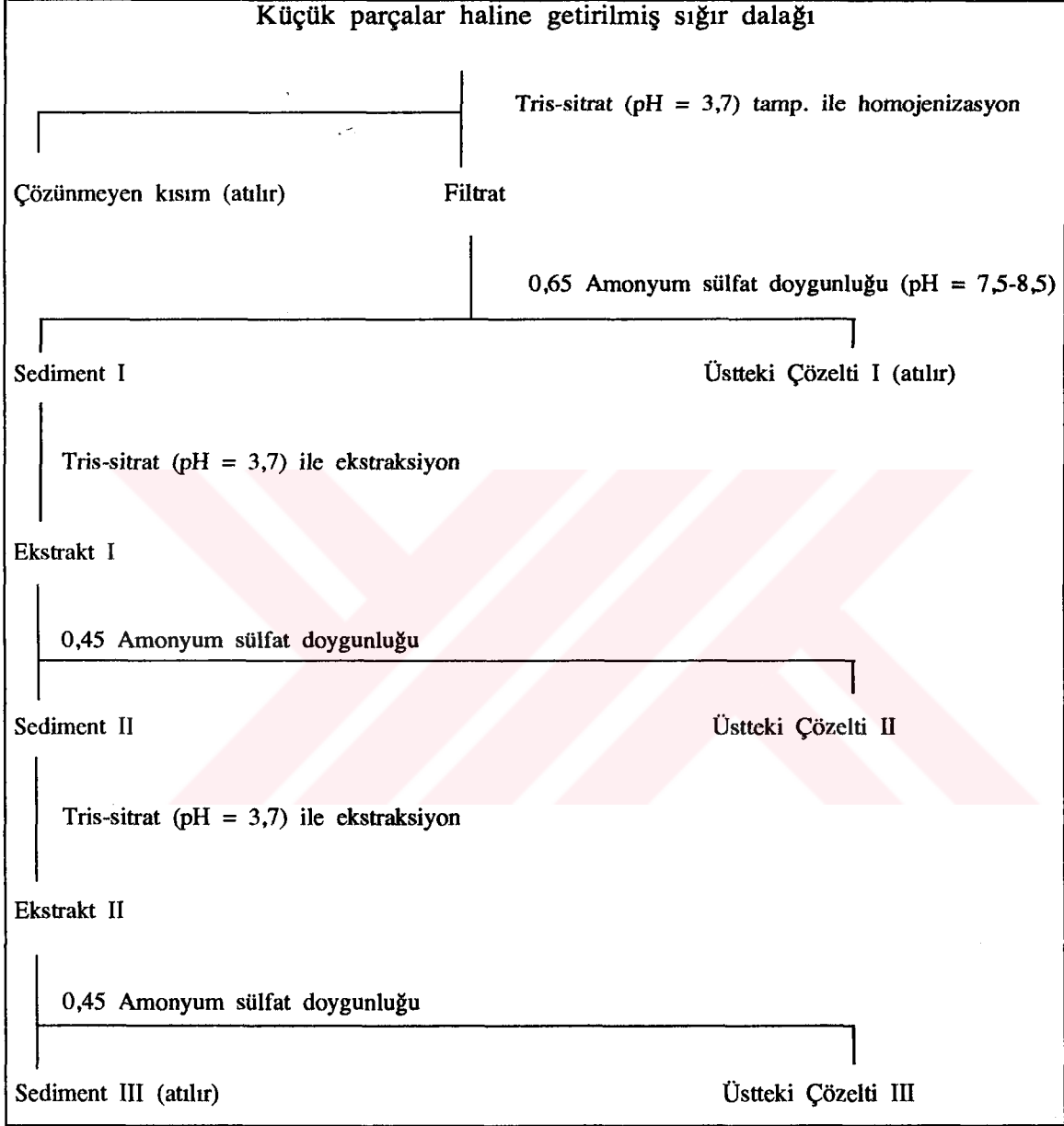
3.2.1. Sığır dalağında asit fosfatazın kısmen saflaştırılması

3.2.1.1. Saflaştırma işleminde Davidson ve Fishman tarafından insan prostatından asit fosfataz'ın saflaştırılması sırasında kullanılan metod uygulandı (70).

Safılaştırılmada kullanılan tampon çözeltili: Tris-sitrat tamponu (50 mM, pH = 3,7): 10 gr sitrik asit monohidrat ve 5 gr tris distile suda çözümlür ve 1 lt'ye tamamlanır.

Safılaştırma Metodu: Mezbahadan kesim esnasında 1 adet sığır dalağı alınarak buz içerisinde korunmak suretiyle laboratuvara getirildi. Mümkün olduğu kadar bağ dokusu ve diğer yabancı dokulardan temizlendi. Keskin bir makasla küçük parçalar haline getirilen doku tartıldı. Doku ağırlığının iki katı hacimdeki soğuk tris-sitrat tamponu ile karıştırılarak Waring blendorda 1 dakika süreyle homojenize edildi. Daha sonra homojenat gazlı bezden süzöldü. Düşük devirde 5 dakika santrifüj edildi ve dipteki çökelti atıldı. Süzöntünün pH'sı 8 e ayarlanarak buz içerisinde soğutulmak suretiyle manyetik karıştırıcıyla devamlı karıştırılarak % 65 doygunluğa ulaşılmıncaya kadar katı amonyum sülfat ilave edildi. Amonyum sülfat tamamen çözündükten sonra 10 dakika süreyle 15.000 r.p.m. de santrifüj edildi ve üstteki çözeltili atıldı (çözeltili I). Altta kalan yağ çökelti (Sediment I) tris-sitrat tamponu ile başlangıçtaki süzöntünün 1/10'unu geçmeyecek şekilde süspansiyon haline getirildi. Bu şekilde elde edilen Ekstrakt I deki amonyum sülfat konsantrasyonu 3.2.1.4'de bahsedilecek nesslerizasyon reaksiyonuyla tayin edilerek doygunluk % 20'yi geçmeyecek şekilde ekstrakt I seyreltildi. Bu şekilde elde edilen ekstrakt I e, evvelce bahsedildiği şekilde % 45 doygunluğa erişinceye kadar amonyum sülfat ilave edilerek tekrar santrifüj edildi. Buradan elde edilen çözeltili (üstteki çözeltili II) kısmen safılaştırılmığ enzim ihtiva etmektedir. Altta kalan sediment (sediment II) tris-sitrat tamponu ile yeniden ekstrakte edildi. Böylece elde edilen süspansiyona (ekstrakt II) evvelce bahsedildiği gibi doygunluk % 45 olacak şekilde amonyum sülfat ilave edildi. Bundan sonra yeniden santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstte kalan çözeltili III ün önemli miktarda saf enzim ihtiva ettiği göröldü (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Saflaştırma Şeması



1,5 x 90 cm boyutlarındaki kolona evvelce hazırlanmış, sephadex G100-120 süspansiyonu dolduruldu. Bu kolondan önce pH 4,8 sitrat tamponu geçirildi. Bundan sonra saflaştırma esnasında elde edilen Çözelti III bu kolona uygulandı.

Kolondan geçen çözelti III her tüpe 50 damla gelecek şekilde ayarlanarak fraksiyon kollektöründe tüplere toplandı. Tüplerin herbirinde spektrofotometre ile 250 nm'de protein miktarı ölçüldü. Proteinin pik yaptığı yerlerde aktivite tayin edildi.

3.2.1.2. Total asit fosfataz aktivitesi tayini

Saflaştırma işlemi esnasında her basamakta ve daha sonra yapılan kinetik deneylerde enzim aktivitesi Bessey-Lowry-Scott'un asit fosfataz tayin metodu kullanılarak ölçüldü (79).

Deneyin Prensi: Asit fosfataz asit ortamda p-nitrofenilfosfatın p-nitrofenol ve fosfata hidrolitik olarak parçalanmasını katalizler. Bu reaksiyon NaOH ilavesiyle durdurulur ve oluşan p-nitrofenolat anyonunun alkali ortamdaki sarı rengi 405 nm de ölçülür.

Reaktifler: Sitrata Tamponu (0,1 M, pH = 4,8): 5,1 gr sitrik asit 50 ml 1 N NaOH'da çözülür. Bunun üzerine 150 ml bidistile su ilave edilir. Çözeltiye birkaç damla 1 N NaOH veya 1 N HCl ilave etmek suretiyle pH 4,8'e ayarlanır. Bidistile su ile 250 ml'ye tamamlanır. Çözelti + 4°C'de aylarca dayanır.

p-nitrofenilfosfat çözeltisi (11 mM): 1, 445 gr p-nitrofenilfosfat-Na₂ 500 ml bidistile suda çözülür. Dondurularak muhafaza edilirse aylarca dayanır. Gereklikçe yeterli miktarda eritilerek kullanılır.

Çalışma Çözeltisi: Bir kısım sitrata tamponu, bir kısım p-nitrofenil fosfat çözeltisiyle karıştırılır. Bu karışım + 4°C'de 1 hafta dayanır.

NaOH çözeltisi: 0,02 N NaOH çözeltisi kullanılır.

Deneyin Yapılışı:

Tablo 3.2. Total Asit Fosfataz Aktivitesi Tayini

REAKTİF	Numune	Kör
Çalışma Çözeltisi	0,5 ml	0,5 ml
Enzim	0,1 ml	-
37°C'de 30 dakika inkübe edilir.		
NaOH	5,0 ml	5,0 ml
Enzim	-	0,1 ml

Oda sıcaklığına kadar soğutularak 30 dakika içinde 405 nm de distile suya karşı optik dansiteleri ölçülür. Enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

Aktivite (mU/ml) = (numunenin optik dansitesi-körün optik dansitesi) x 100

$$\text{Aktivite (mU/ml)} = \frac{[(\text{OD})_N - (\text{OD})_K] \cdot 1000 \cdot V_T}{\epsilon \cdot V_N \cdot t}$$

$(\text{OD})_N$: Numunenin OD si

$(\text{OD})_K$: Numunenin körünün OD si

1000 : Üniteyi, miliüniteye çevirme çarpanı

V_T : Toplam hacim ($V_{\text{numune}} + V_{\text{subs}} + V_{\text{NaOH}}$) (ml)

V_N : İlave edilen enzim hacmi (ml)

ϵ : Molar absorpsiyon katsayısı (PNPP için; 18,53 cm²/μ mol)

t : İnkübasyon süresi (dakika)

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{\text{mU/ml}}{(\text{mg/ml}) \text{ prot.}} = \frac{\text{mU}}{\text{mg. prot.}}$$

3.2.1.3. Total protein tayini

Saflaştırma işleminin her kademesinde protein miktarları Lowry Metoduna göre tayin edildi (49). Protein standardı olarak Moni-Trol kullanıldı.

3.2.1.4. Amonyum sülfat tayini

Saflaştırma esnasında gerekli yerlerde amonyum sülfatın miktar tayini, üre tayininde kullanılan nesslerizasyon metoduyla yapılmıştır (60).

3.2.2. Kısmen saflaştırılan asit fosfatın kinetik özelliklerinin incelenmesi

3.2.2.1. Artan substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

Bu deneyde Tablo 3.3'de gösterildiği şekilde substrat olarak kullanılan p-nitrofenilfosfatın konsantrasyonu, 0'dan başlamak üzere her tüpte bir miktar artırılarak 9 değişik substrat konsantrasyonu elde edilmiş, buna karşılık enzim konsantrasyonu sabit tutulmuştur. Substrat olarak p-nitrofenilfosfatın (pH = 4,8) sitrat tamponunda hazırlanan 11 mM'lık çözeltisi kullanılmıştır.

Tablo 3.3'de gösterilen deney şemasına göre enzim aktiviteleri ölçüldükten sonra, elde edilen değerlerle Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek, enzimin pH 4,8 ve 37°C'de p-nitrofenilfosfat substratı için K_m değeri bulunmuştur.

Tablo 3.3. Artan Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi İçin Deney Şeması.

Tüp No Reaktif	1		2		3		4		5		6		7		8		9	
	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K
Tampon (ml) (Sitat, pH: 4.8)	1.0		0.9		0.8		0.7		0.6		0.5		0.4		0.3		0.2	
Substrat (ml) (p-NPP) (mM)	-		0.1		0.2		0.3		0.4		0.5		0.6		0.7		0.8	
Enzim (ml)	0.1	-	0.1	-	0.1	-	0.1	-	0.1	-	0.1	-	0.1	-	0.1	-	0.1	-
37 C'da 30 dakika inkübasyon																		
NaOH (ml) (0.02 N)	5.0		5.0		5.0		5.0		5.0		5.0		5.0		5.0		5.0	
Enzim (ml)	-	0.1	-	0.1	-	0.1	-	0.1	-	0.1	-	0.1	-	0.1	-	0.1	-	0.1

3.2.2.2 Artan enzim miktarının aktiviteye etkisinin incelenmesi

Bu deneyde Tablo 3.4'de gösterildiği şekilde substrat konsantrasyonu sabit tutularak ilave edilen enzim miktarı artırılmak suretiyle artan enzim miktarının enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir.

Tablo 3.4. Artan Enzim Miktarının Asit Fosfataz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesine Ait Deney Şeması

Tüp No	Kör	1	2	3	4	5
Çalışma Çöz. (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tampon (ml)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	-
Enzim (ml)	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
37°C'de 30 dakika inkübasyon						
NaOH (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Enzim (ml)	0,1	-	-	-	-	-
405 nm de distile suya karşı okunur						

3.2.2.3. Sabit efektör konsantrasyonunun artan substrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi.

3.2.2.3.1. İki değişik konsantrasyonda amonyum molibdat'ın artan p-nitrofenilfosfat konsantrasyonlarında enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi

Bu deney için önce pH 4,8 sitrat tamponu ile 10 mM'lık ve 20 mM'lık amonyum molibdat çözeltileri hazırlanmış daha sonra Tablo 3.5'de gösterildiği şekilde amonyum molibdat ve 11 mM'lık p-nitrofenilfosfat çözeltisi ilave edilerek enzim aktiviteleri tayin edilmiştir.

Tablo 3.5. Sabit Efektör Konsantrasyonunun Artan Substrat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisinin İncelenmesine Ait Deney Şeması.

Tüp No	1		2		3		4		5		6		7	
	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K
Reaktif (ml)														
Efektör (ml)	0,1		0,1		0,1		0,1		0,1		0,1		0,1	
Tampon (ml)	0,9		0,8		0,7		0,6		0,5		0,4		0,3	
Enzim (ml)	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-
37°C'de 5 dakika ön inkübasyon														
Substrat (ml) (p-NPP)	0		0,1		0,2		0,3		0,4		0,5		0,6	
37°C'de 30 dakika inkübasyon														
NaOH (ml)	5,0		5,0		5,0		5,0		5,0		5,0		5,0	
Enzim (ml)	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1

3.2.2.2 Artan enzim miktarının aktiviteye etkisinin incelenmesi

Bu deneyde Tablo 3.4'de gösterildiği şekilde substrat konsantrasyonu sabit tutularak ilave edilen enzim miktarı artırılmak suretiyle artan enzim miktarının enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir.

Tablo 3.4. Artan Enzim Miktarının Asit Fosfataz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesine Ait Deney Şeması

Tüp No	Kör	1	2	3	4	5
Çalışma Çöz. (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tampon (ml)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	-
Enzim (ml)	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
37°C'de 30 dakika inkübasyon						
NaOH (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Enzim (ml)	0,1	-	-	-	-	-
405 nm de distile suya karşı okunur						

3.2.2.3. Sabit efektör konsantrasyonunun artan substrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi.

3.2.2.3.1. İki değişik konsantrasyonda amonyum molibdat'ın artan p-nitrofenilfosfat konsantrasyonlarında enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi

Bu deney için önce pH 4,8 sitrat tamponu ile 10 mM'lık ve 20 mM'lık amonyum molibdat çözeltileri hazırlanmış daha sonra Tablo 3.5'de gösterildiği şekilde amonyum molibdat ve 11 mM'lık p-nitrofenilfosfat çözeltisi ilave edilerek enzim aktiviteleri tayin edilmiştir.

Tablo 3.5. Sabit Efektör Konsantrasyonunun Artan Substrat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisinin İncelenmesine Ait Deney Şeması.

Tüp No	1		2		3		4		5		6		7	
	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K
Reaktif (ml)														
Efektör (ml)	0,1		0,1		0,1		0,1		0,1		0,1		0,1	
Tampon (ml)	0,9		0,8		0,7		0,6		0,5		0,4		0,3	
Enzim (ml)	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-
37°C'de 5 dakika ön inkübasyon														
Substrat (ml) (p-NPP)	0		0,1		0,2		0,3		0,4		0,5		0,6	
37°C'de 30 dakika inkübasyon														
NaOH (ml)	5,0		5,0		5,0		5,0		5,0		5,0		5,0	
Enzim (ml)	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1

3.2.2.3.2. 2 Değişik konsantrasyonda arsenik asidin artan p-nitrofenilfosfat konsantrasyonlarında enzim aktivitesine etkilerinin incelenmesi

Bu deney için önce, pH 4,8 sitrat tamponu ile 10 mM'lık ve 20 mM'lık arsenik asidi çözeltileri hazırlanmış, daha sonra Tablo 3.5 de gösterildiği şekilde, arsenik asidi ve 11 mM'lık p-nitrofenilfosfat çözeltisi ilave edilerek enzim aktiviteleri tayin edilmiştir.

3.2.2.3.3. Sodyum pirofosfatın artan p-nitrofenilfosfat konsantrasyonlarında enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi

Bu deney için önce, pH 4,8 sitrat tamponu ile 10 mM'lık sodyum pirofosfat çözeltisi hazırlanmış, daha sonra Tablo 3.5'de gösterildiği şekilde, sodyum pirofosfat ve 11 mM'lık p-nitrofenilfosfat çözeltisi ilave edilerek enzim aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.2.4. Sabit substrat konsantrasyonunda artan efektör konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi

3.2.2.4.1. Sabit substrat konsantrasyonunda, artan prolin konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi

Prolinin enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi için önce pH 4,8 sitrat tamponu ile % 10'luk prolin çözeltisi hazırlanmış, daha sonra Tablo 3.6'da gösterilen şekilde % 10'luk prolin ve 11 mM'lık p-nitrofenilfosfat çözeltisi ilave edilerek enzim aktivitesi tayin edilmiştir.

Tablo 3.6. Sabit substrat konsantrasyonunda değişen efektör konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisinin incelenmesine ait deney şeması.

Tüp No	1		2		3		4		5		6	
	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N	K
Efektör (ml)	0		0,1		0,2		0,3		0,4		0,5	
Tampon (ml)	0,6		0,5		0,4		0,3		0,2		0,1	
Enzim (ml)	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-
37°C'de 5 dakika ön inkubasyon												
Substrat (ml)	0,7		0,7		0,7		0,7		0,7		0,7	
37°C'de 30 dakika inkubasyon												
NaOH (ml)	5,0		5,0		5,0		5,0		5,0		5,0	
Enzim (ml)	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1

3.2.2.4.2. Sabit substrat konsantrasyonunda artan lityum sülfat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi

Lityum sülfatın enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi için önce, pH 4,8 sitrat tamponu ile 10 mM'lık lityum sülfat çözeltisi hazırlanmış daha sonra Tablo 3.6'da gösterilen miktarlarda 10 mM'lık lityum sülfat ve 11 mM'lık p-nitrofenilfosfat çözeltisi ilave edilerek enzim aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.2.4.3. Sabit substrat konsantrasyonunda artan amonyum molibdat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi

Amonyum molibdat'ın enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi için önce, pH 4,8 sitrat tamponu ile 10 mM'lık amonyum molibdat çözeltisi hazırlanmış, daha sonra Tablo 3.6'da gösterilen şekilde amonyum molibdat ve 11 mM'lık p-nitrofenilfosfat çözeltisi ilave edilerek enzim aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.2.4.4. Sabit substrat konsantrasyonunda artan arsenik asidi konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi

Arsenik asidinin enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi için önce pH 4,8 sitrat tamponu ile 10 mM'lık arsenik asidi çözeltisi hazırlanmış, daha sonra Tablo 3.6'da gösterilen miktarlarda arsenik asidi ve 11 mM'lık p-nitrofenilfosfat çözeltisi ilâve edilerek enzim aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.2.4.5. Sabit substrat konsantrasyonunda artan sodyumpirofosfat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi

Sodyumpirofosfatın enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi için önce pH 4,8 sitrat tamponu ile 10 mM'lık sodyum pirofosfat çözeltisi hazırlanmış, daha sonra Tablo 3.6'da gösterilen miktarlarda sodyumpirofosfat ve 11 mM'lık p-nitrofenilfosfat çözeltisi ilâve edilerek enzim aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.2.5. Deney sıcaklığının enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi

Bu deney Tablo 3.2'de gösterilen deney şemasına uygun olarak yapılmıştır. Ancak, 30 dakikalık inkubasyon bölümünde deney sıcaklığı her tüp için sırasıyla 0, 10, 20, 37, 40, 60°C olacak şekilde değiştirilmiştir.

3.2.2.6. pH'nın enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi

pH'nın enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi için değişik pH'larda sitrat tamponu hazırlanmış ve deney, bu değişik pH'lardaki tamponlarla hazırlanan çalışma çözeltileri ile Tablo 3.2'deki deney şemasına göre yapılmıştır.

DENEY SONUÇLARI

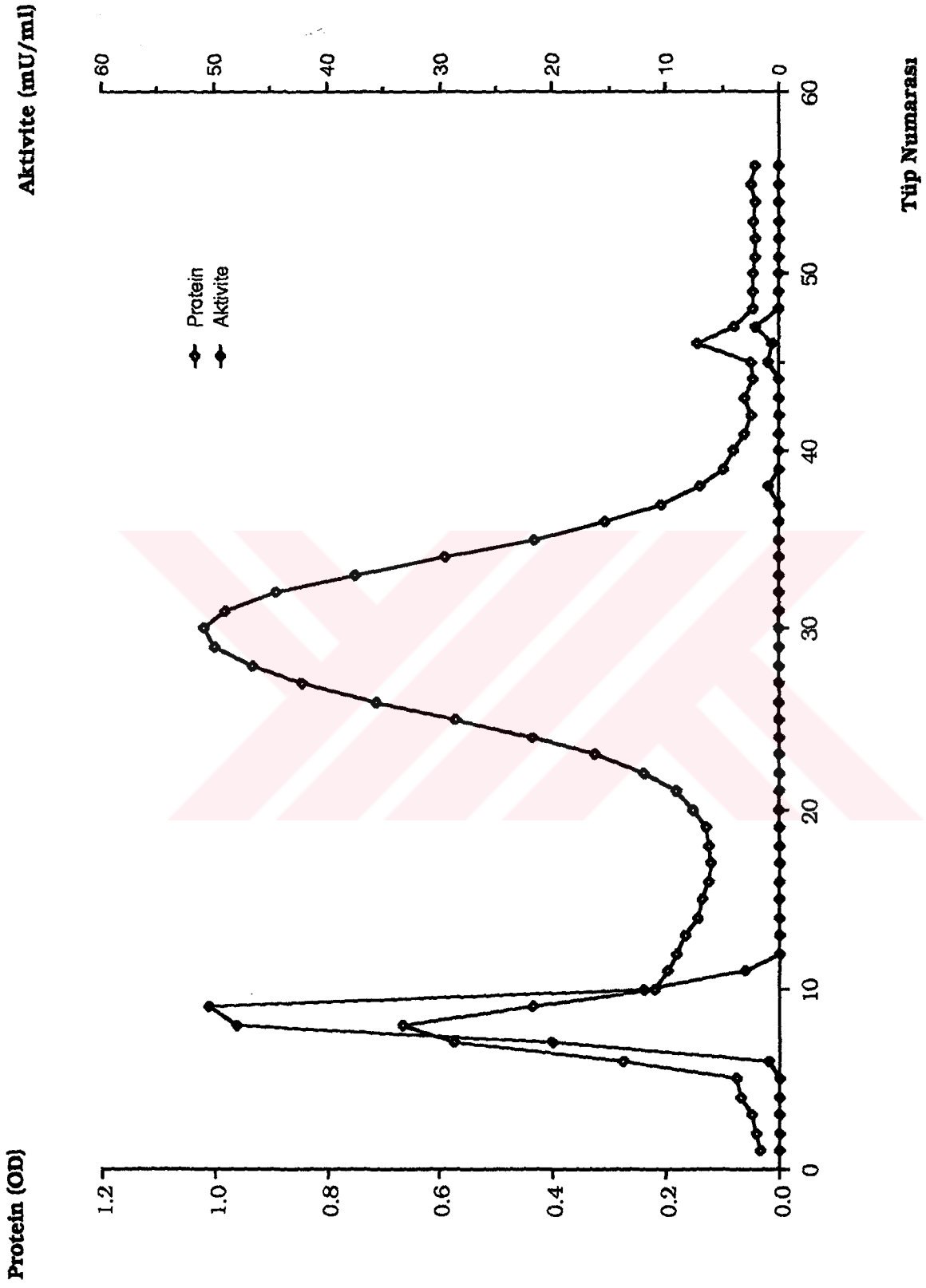
4.1. Sığır Dalağından Asit Fosfataz Enziminin Saflaştırılması

Şekil 4.1 de saflaştırmanın son kademesinde üstteki çözelti III ün Sephadex G-100 kolonuna uygulanmasından sonra, fraksiyon kollektöründeki tüplerde toplanan kolon filtratının 280 nm de okunan protein değerleri ile enzim aktivitesi ölçümü sonucunda bulunan asit fosfataz aktiviteleri görülmektedir.

Aşağıdaki Tablo 4.1 de saflaştırma işleminin kademeleri ve her kademedен sonra elde edilen değerler gösterilmiştir. Buna göre saflaştırma işleminin son basamağındaki Sephadex G-100 kolonundan sonra total aktivite 18 mU, spesifik aktivite 300 mU/mg protein, saflaştırma oranı 66,1 ve verim % 0,05 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.1. Sığır Dalağından Asit Fosfataz Enziminin Saflaştırma Basamaklarında Elde Edilen Sonuçlar.

Saflaştırma Basamakları	Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Aktivite (mU/ml)	T. Prot. (mg)	Total Akt. (mU)	Spesifik akt. mU/mg.pr.	Saflaştırma oranı	Verim (%)
Homojenat	380,0	21,6	98	8208,0	37240	4,54	1,0	100
Ekstrakt-I	85,0	9,6	90	816	7650	9,38	2,1	20,5
Ekstrakt-II	13,0	7,8	82	101,4	1066	10,5	2,3	2,86
Üst. Çöz. III	15,0	0,15	24	2,25	360	160	35,3	0,97
Sep.-G-100	10,0	0,006	1,8	0,06	18	300	66,1	0,05



Şekil 4.1. Kolon Filtratından Elde Edilen Enzim Aktivitesi ve Protein Değerleri.

4.2. Kısmen Safılaştırılan Asit Fosfataz Enziminin Kinetik Özelliklerine Ait Sonuçlar

4.2.1. Artan p-nitrofenilfosfat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

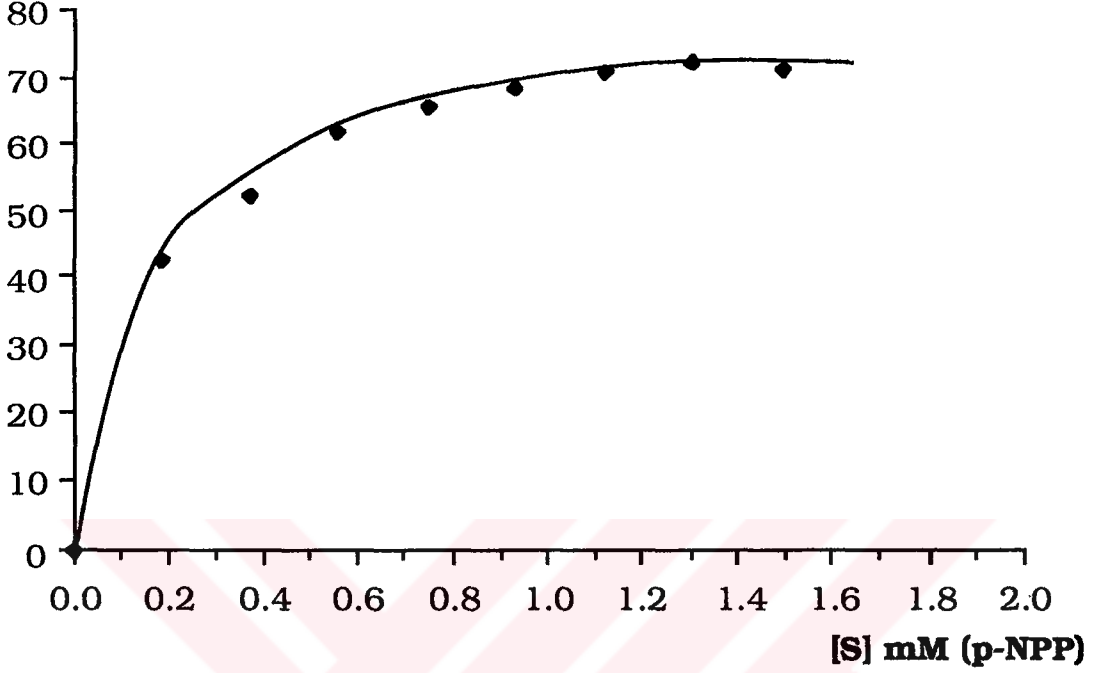
Bu çalışma 3.2.2.1 de anlatıldığı şekilde, Tablo 3.3'deki deney şemasına göre yapılarak, Tablo 4.2 deki sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre çizilen Michaelis-Menten grafiği Şekil 4.2 de görülmektedir. Bu değerlere göre elde edilen Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 4.3 dedir.

p-nitrofenilfosfat substratı için 37°C de pH, 4,8, 0,1 M sitrat tamponunda bulunan K_m değeri = 0,14 mM'dır.

Tablo 4.2. Artan p-nitrofenilfosfat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Deney Sonuçları.

Tüp No	[S] mM (p-NPP)	O.D.		ΔOD	Aktivite(mU/ml) ($\Delta OD \times 106,13$)	1/v (mU^{-1})	1/[S] (mM^{-1})
		N	K				
1	0,00	0,031	0,034	0,00	0,00	∞	∞
2	0,186	0,457	0,054	0,403	42,8	0,0234	5,56
3	0,373	0,558	0,066	0,492	52,2	0,0192	2,78
4	0,559	0,659	0,078	0,581	61,7	0,0162	1,85
5	0,746	0,705	0,088	0,617	65,5	0,0153	1,39
6	0,932	0,747	0,103	0,644	68,3	0,0146	1,11
7	1,119	0,785	0,116	0,669	71,0	0,0141	0,93
8	1,305	0,814	0,131	0,683	72,5	0,0138	0,79
9	1,492	0,807	0,133	0,674	71,5	0,0140	0,67

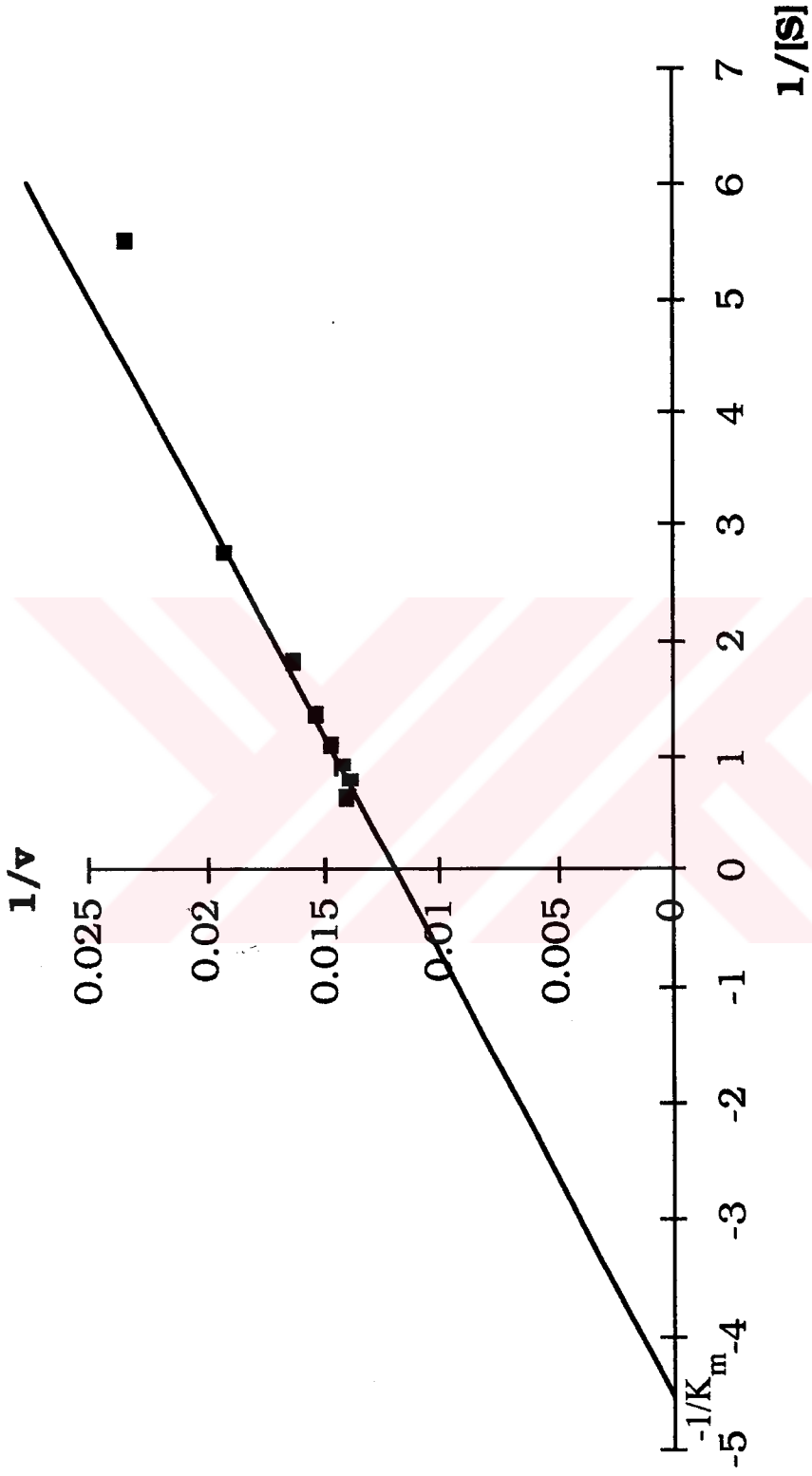
Aktivite (mU/ml)



Şekil 4.2. Artan p-nitrofenilfosfat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisi (Michaelis-Menten Grafiği).

4.2.2. Artan Enzim Miktarının Aktiviteye Etkisi

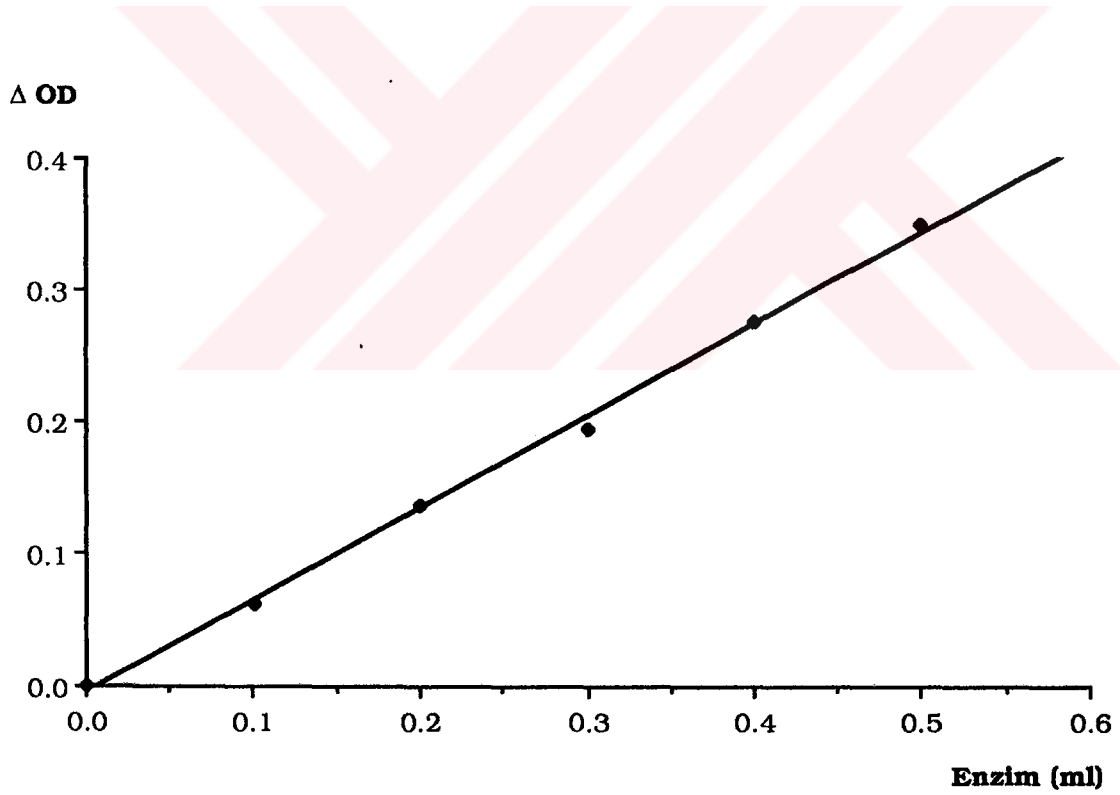
Bu deney 3.2.2.2 de anlatıldığı şekilde Tablo 3.4 deki deney şemasına uygun olarak yapılmış ve Tablo 4.3 deki sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.4 de ise bu tabloya göre çizilen grafik görülmektedir.



Şekil 4.3. Artan p-Nitrofenil Fosfat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği)

Tablo 4.3. Artan Enzim Miktarının Aktiviteye Etkisine Ait Sonuçlar.

Tüp No	İlave Edilen Enzim (ml)	ΔOD
1	0,1	0,062
2	0,2	0,137
3	0,3	0,195
4	0,4	0,275
5	0,5	0,350



Şekil 4.4. Artan Enzim Miktarının Enzim Aktivitesine Etkisi.

4.2.3.Sabit Etkör Konsantrasyonunun Artan Substrat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar

4.2.3.1. Amonyum Molibdatın Artan p-nitrofenilfosfat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar

Bu deney 3.2.2.3.1 de anlatıldığı Şekilde, Tablo 3.5 deki deney Şemasına uygun olarak yapılmış ve Tablo 4.4.a ve 4.4.b deki sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.5.a ve 4.5.b. de ise bu sonuçlara gÖre çizilen Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri gÖrÖlmektedir.

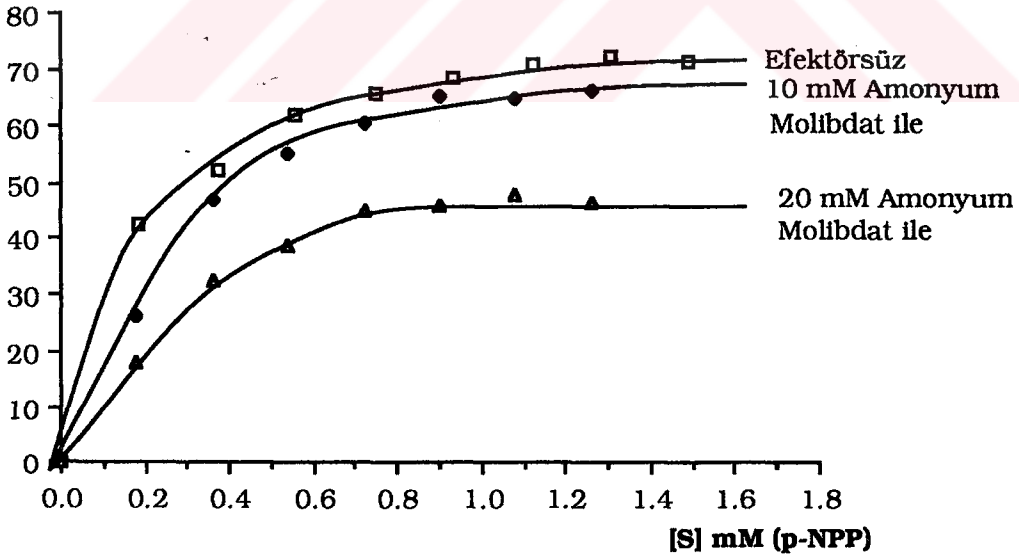
Tablo 4.4.a. 10 mM lık Amonyum Molibdatın Artan p-Nitrofenil Fosfat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar.

Tüp No	[S] mM (p-NPP)	O.D.		Δ OD	Aktivite (mU/ml) (Δ ODx109,73)	1/v (mU ⁻¹)	1/[S] (mM ⁻¹)
		N	K				
1	0	0,054	0,054	0	0	∞	∞
2	0,18	0,283	0,043	0,240	26,34	0,038	5,56
3	0,36	0,464	0,038	0,426	46,75	0,021	2,78
4	0,54	0,540	0,040	0,500	54,87	0,018	1,85
5	0,72	0,590	0,039	0,551	60,46	0,017	1,39
6	0,90	0,628	0,036	0,592	64,96	0,015	1,11
7	1,08	0,624	0,036	0,558	64,52	0,015	0,93
8	1,26	0,640	0,038	0,602	66,10	0,015	0,79

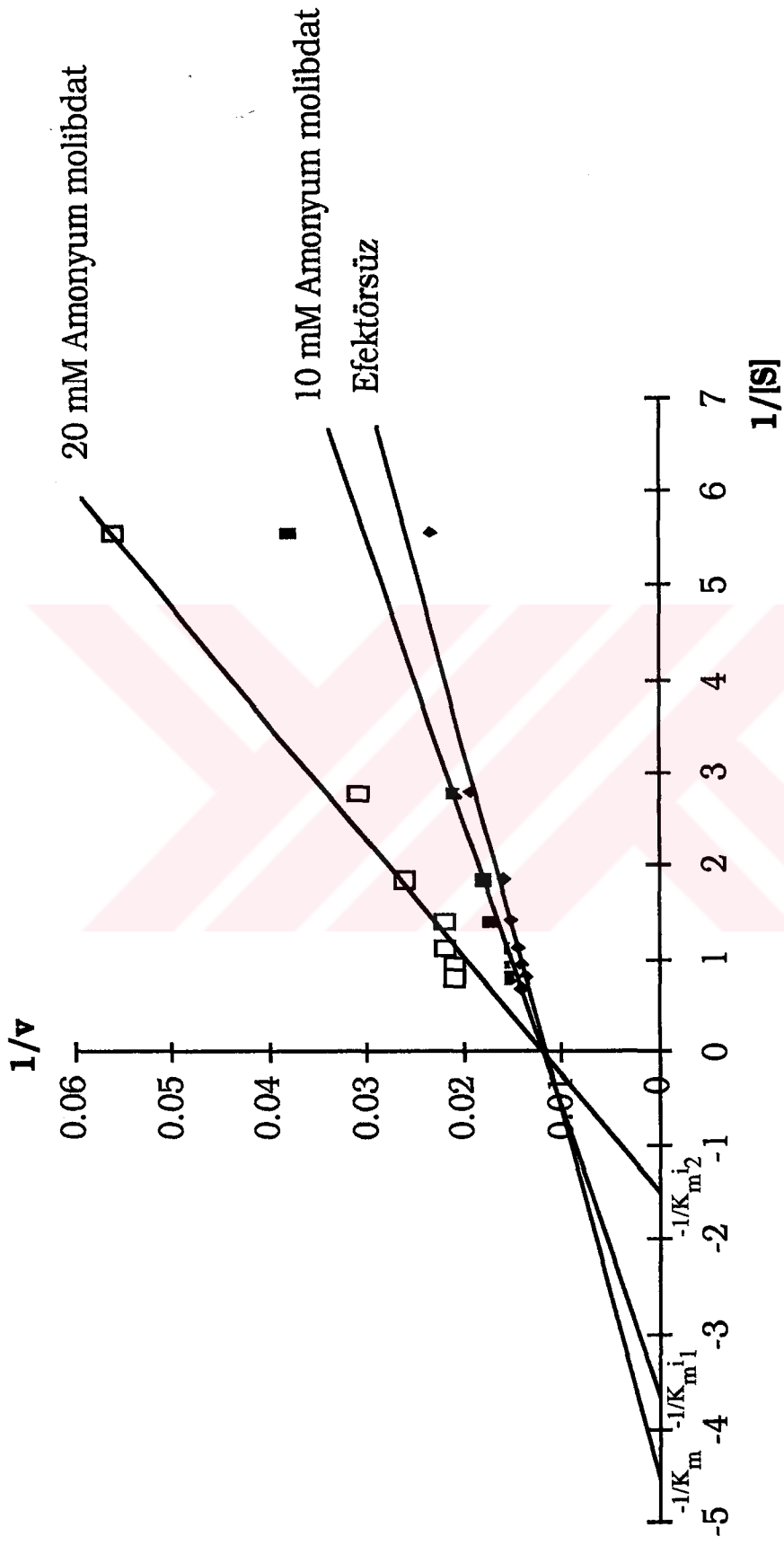
Tablo 4.4.b. 20 mM lik Amonyum Molibdatın Artan p-Nitrofenil Fosfat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar.

Tüp No	[S] mM (p-NPP)	O.D.		ΔOD	Aktivite (mU/ml) ($\Delta OD \times 109,73$)	1/v (mU ⁻¹)	1/[S] (mM ⁻¹)
		N	K				
1	0	0,050	0,048	0	0	∞	∞
2	0,18	0,210	0,046	0,164	18,0	0,056	5,56
3	0,36	0,338	0,042	0,296	32,53	0,031	2,78
4	0,54	0,399	0,044	0,355	39,0	0,026	1,85
5	0,72	0,450	0,041	0,409	44,83	0,022	1,39
6	0,90	0,456	0,038	0,418	45,92	0,022	1,11
7	1,08	0,472	0,036	0,436	47,85	0,021	0,93
8	1,26	0,465	0,040	0,425	46,67	0,021	0,79

Aktivite (mU/ml)



Şekil 4.5.a. Amonyum Molibdatın Artan p-Nitrofenil Fosfat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisi (Michaelis-Menten Grafiği).



Şekil 4.5.b. Amonyum Molibdatın Artan p-Nitrofenil Fosfat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği)

4.2.3.2. Arsenik Asidinin Artan p-nitrofenilfosfat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar

Bu deney 3.2.2.3.2 de anlatıldığı şekilde Tablo 3.5 deki deney şemasına uygun olarak yapılmış ve Tablo 4.5.a ve 4.5.b deki sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.6.a ve 4.6.b de ise bu sonuçlara göre çizilen Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri görülmektedir.

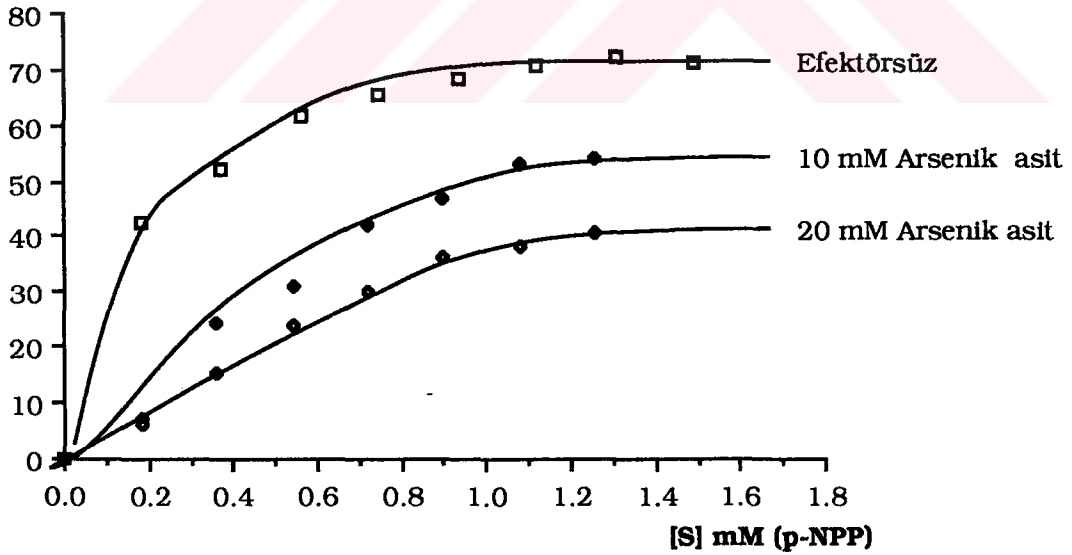
Tablo 4.5.a. 10 mM lık Arsenik Asidinin Artan p-Nitrofenil Fosfat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar.

Tüp No	[S] mM (p-NPP)	O.D.		ΔOD	Aktivite (mU/ml) ($\Delta OD \times 109,73$)	1/v (mU^{-1})	1/[S] (mM^{-1})
		N	K				
1	0	0,033	0,034	0	0	∞	∞
2	0,18	0,104	0,037	0,067	7,35	0,136	5,56
3	0,36	0,259	0,037	0,222	24,36	0,041	2,78
4	0,54	0,322	0,037	0,285	31,27	0,032	1,85
5	0,72	0,423	0,038	0,385	42,25	0,024	1,39
6	0,90	0,469	0,040	0,429	47,07	0,021	1,11
7	1,08	0,521	0,038	0,483	53,00	0,019	0,93
8	1,26	0,532	0,039	0,493	54,10	0,018	0,79

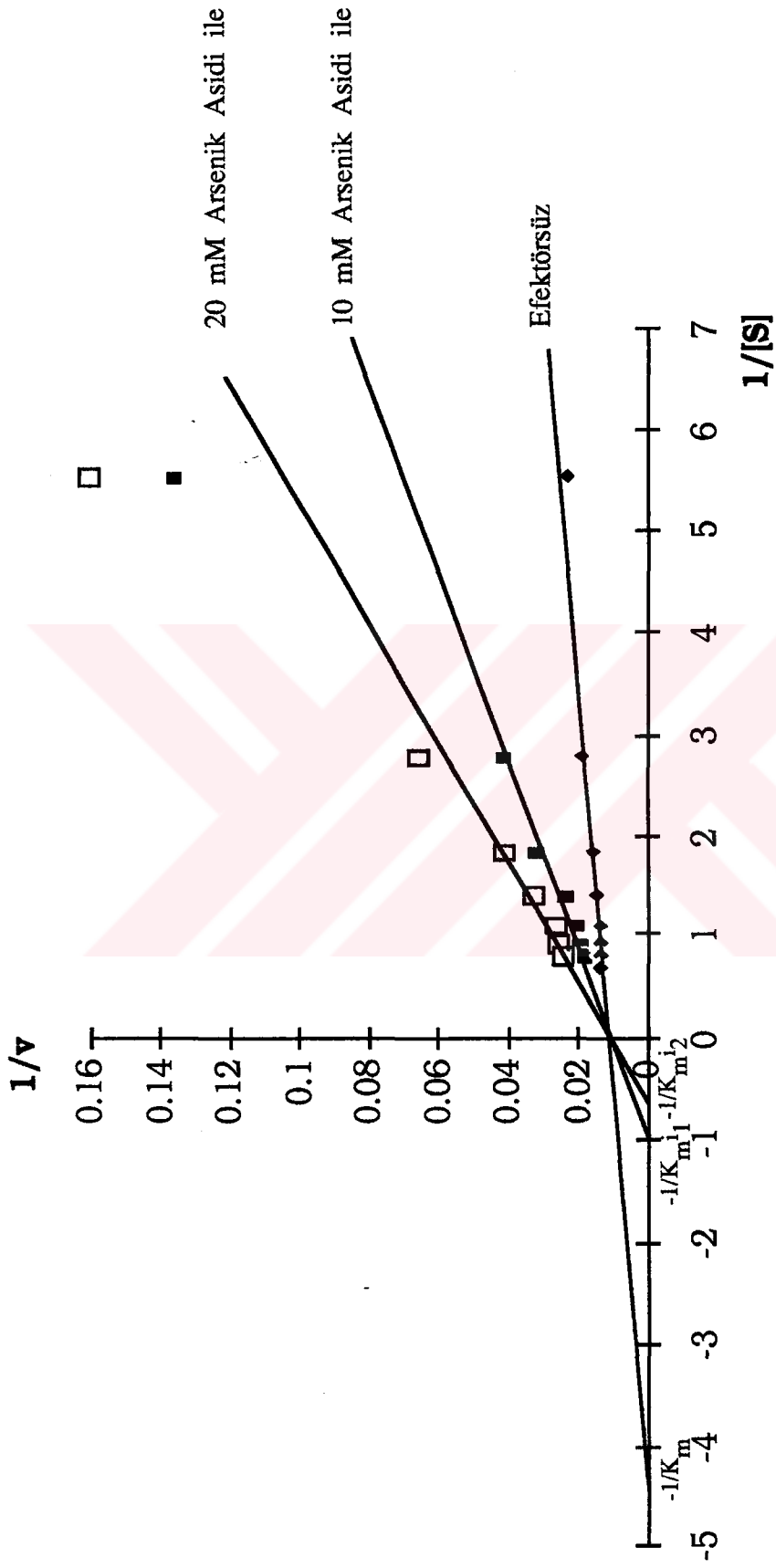
Tablo 4.5.b. 20 mM lık Arsenik Asidinin Artan p-Nitrofenil Fosfat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar.

Tüp No	[S] mM (p-NPP)	O.D.		Δ OD	Aktivite (mU/ml) (Δ ODx109,73)	1/v (mU ⁻¹)	1/[S] (mM ⁻¹)
		N	K				
1	0	0,033	0,032	0	0	∞	∞
2	0,18	0,092	0,035	0,057	6,25	0,160	5,56
3	0,36	0,175	0,037	0,138	15,17	0,066	2,78
4	0,54	0,251	0,034	0,217	23,85	0,042	1,85
5	0,72	0,308	0,034	0,274	30,05	0,033	1,39
6	0,90	0,371	0,038	0,333	36,52	0,027	1,11
7	1,08	0,384	0,033	0,351	38,53	0,026	0,93
8	1,26	0,407	0,038	0,369	40,48	0,025	0,79

Aktivite (mU/ml)



Şekil 4.6.a. Arsenik Asidinin Artan p-Nitrofenil Fosfat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisi (Michaelis-Menten Grafiği).



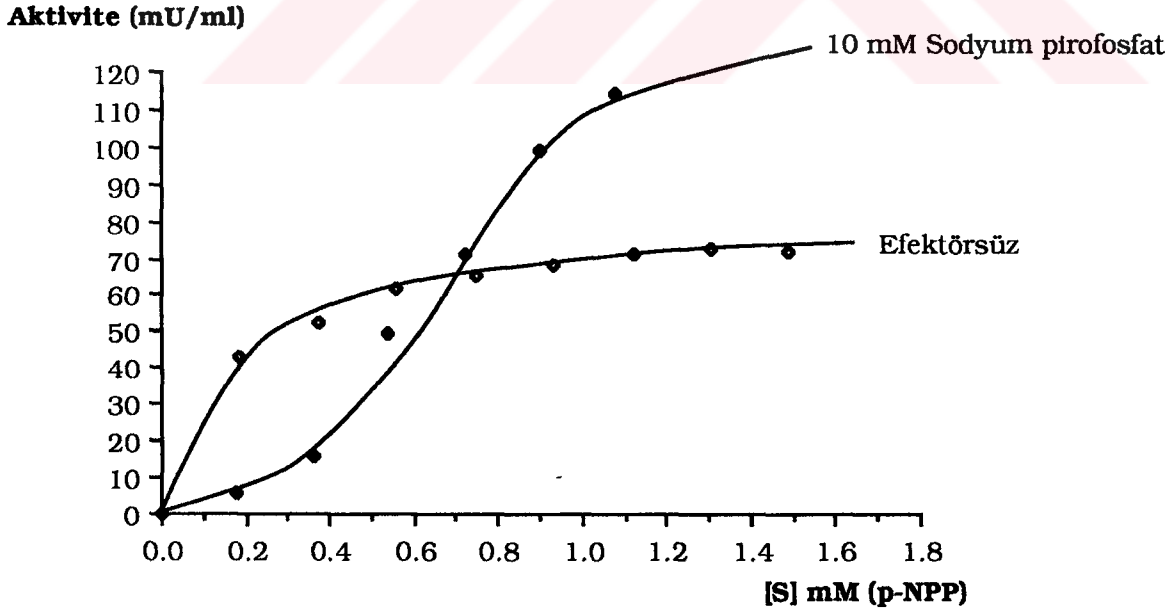
Şekil 4.6.b. Arsenik Asidinin Artan p-Nitrofenil Fosfat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği)

4.2.3.3. Sodyum Pirofosfatın Artan p-nitrofenilfosfat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar

Bu deney 3.2.2.3.3. de anlatıldığı şekilde Tablo 3.5 deki deney şemasına uygun olarak yapılmış ve Tablo 4.6 daki sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.7’de ise elde edilen sigmoid eğrinin efektörsüz Michaelis-Menten grafiği ile karşılaştırılması görülmektedir.

Tablo 4.6. 10 mM Sodyum Pirofosfatın Artan p-Nitrofenil Fosfat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar.

Tüp No	[S] mM (p-NPP)	O.D.		Δ OD	Aktivite (mU/ml) (Δ ODx109,73)
		N	K		
1	0	0,036	0,036	0	0
2	0,18	0,107	0,052	0,055	6,04
3	0,36	0,218	0,075	0,143	15,69
4	0,54	0,534	0,083	0,451	49,5
5	0,72	0,739	0,090	0,649	71,21
6	0,90	1,026	0,122	0,904	99,2
7	1,08	1,164	0,122	1,042	114,34



Şekil 4.7. Sodyum Pirofosfatın Artan p-Nitrofenil Fosfat Konsantrasyonlarında Enzim Aktivitesine Etkisi.

4.2.4. Sabit Substrat Konsantrasyonunda Artan Efektör Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar

4.2.4.1. Sabit Substrat Konsantrasyonunda Artan Prolin Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar

Bu deney 3.2.2.4.1 de anlatıldığı şekilde Tablo 3.6 daki deney şemasına uygun olarak yapılmış ve Tablo 4.7 deki sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.8 de ise bu tabloya göre çizilen grafik görülmektedir.

Tablo 4.7. Sabit Substrat Konsantrasyonunda Artan Prolin Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar.

Tüp No	OD		Δ OD	% Kalan Aktivite	Prolin Kons. (% gr)
	N	K			
1	0,838	0,193	0,645	100	0
2	0,837	0,181	0,656	101,7	0,156
3	0,839	0,195	0,644	99,84	0,312
4	0,837	0,143	0,644	107,6	0,469
5	0,832	0,151	0,681	105,6	0,625
6	0,832	0,185	0,647	100,3	0,781

4.2.4.2. Sabit Substrat Konsantrasyonunda Artan Lityum Sülfat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar

Bu deney 3.2.2.4.2 de anlatıldığı şekilde Tablo 3.6 daki deney şemasına uygun olarak yapılmış ve Tablo 4.8 deki sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.8 de ise bu tabloya göre çizilen grafik görülmektedir.

Tablo 4.8. Sabit Substrat Konsantrasyonunda Artan Lityum Sülfat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar.

Tüp No	OD		Δ OD	% Kalan Aktivite	Lityum sülfat Kons. (mM)
	N	K			
1	0,622	0,157	0,465	100	0
2	0,880	0,174	0,706	151,8	0,156
3	0,882	0,192	0,690	148,4	0,312
4	0,900	0,212	0,688	148,0	0,469
5	0,916	0,208	0,708	152,3	0,625
6	0,969	0,243	0,726	156,1	0,781

4.2.4.3. Sabit Substrat Konsantrasyonunda Artan Amonyum Molibdat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar.

Bu deney 3.2.2.4.3 de anlatıldığı şekilde Tablo 3.6 daki deney şemasına uygun olarak yapılmış ve Tablo 4.9 daki sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.8 de ise bu tabloya göre çizilen grafik görülmektedir.

Tablo 4.9. Sabit Substrat Konsantrasyonunda Artan Amonyum Molibdat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar.

Tüp No	OD		Δ OD	% Kalan Aktivite	Amon. Molibdat Kons. (mM)
	N	K			
1	0,760	0,091	0,669	100	0
2	0,654	0,082	0,572	85,5	0,156
3	0,606	0,082	0,524	78,3	0,312
4	0,562	0,080	0,482	71,8	0,469
5	0,542	0,077	0,465	64,5	0,625
6	0,433	0,077	0,356	53,2	0,781

4.2.4.4. Sabit Substrat Konsantrasyonunda Artan Arsenik Asit Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar

Bu deney 3.2.2.4.4 de anlatıldığı şekilde Tablo 3.6 daki deney şemasına uygun olarak yapılmış ve Tablo 4.10 daki sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.8 de ise bu tabloya göre çizilen grafik görülmektedir.

Tablo 4.10. Sabit Substrat Konsantrasyonunda Artan Arsenik Asidi Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar.

Tüp No	OD		Δ OD	% Kalan Aktivite	Arsenik Asit Kons. (mM)
	N	K			
1	0,674	0,085	0,589	100	0
2	0,545	0,098	0,447	75,9	0,156
3	0,339	0,098	0,241	40,9	0,312
4	0,303	0,075	0,228	38,7	0,469
5	0,262	0,070	0,192	32,6	0,625
6	0,187	0,068	0,119	20,2	0,781

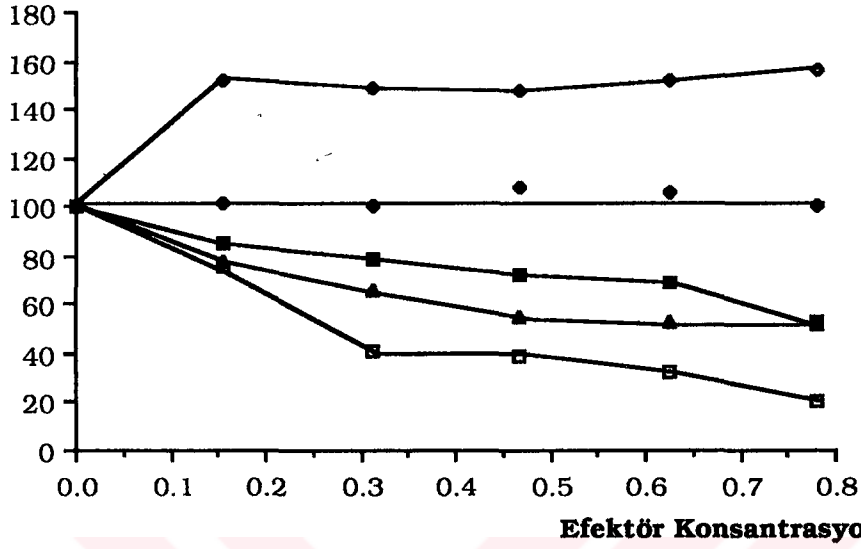
4.2.4.5. Sabit Substrat Konsantrasyonunda Artan Sodyum Pirofosfat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar

Bu deney 3.2.2.4.5 de anlatıldığı şekilde Tablo 3.6 daki deney şemasına uygun olarak yapılmış ve Tablo 4.11 deki sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.8 de ise bu tabloya göre çizilen grafik görülmektedir.

Tablo 4.11. Sabit Substrat Konsantrasyonunda Artan Sodyum Pirofosfat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar

Tüp No	OD		Δ OD	% Kalan Aktivite	Sodyum Pirofosfat Kons. (mM)
	N	K			
1	0,850	0,160	0,690	100	0
2	0,717	0,180	0,537	77,8	0,156
3	0,615	0,160	0,455	65,9	0,312
4	0,554	0,175	0,379	54,9	0,469
5	0,543	0,177	0,366	53,0	0,625
6	0,533	0,175	0,358	51,9	0,781

% Kalan Aktivite



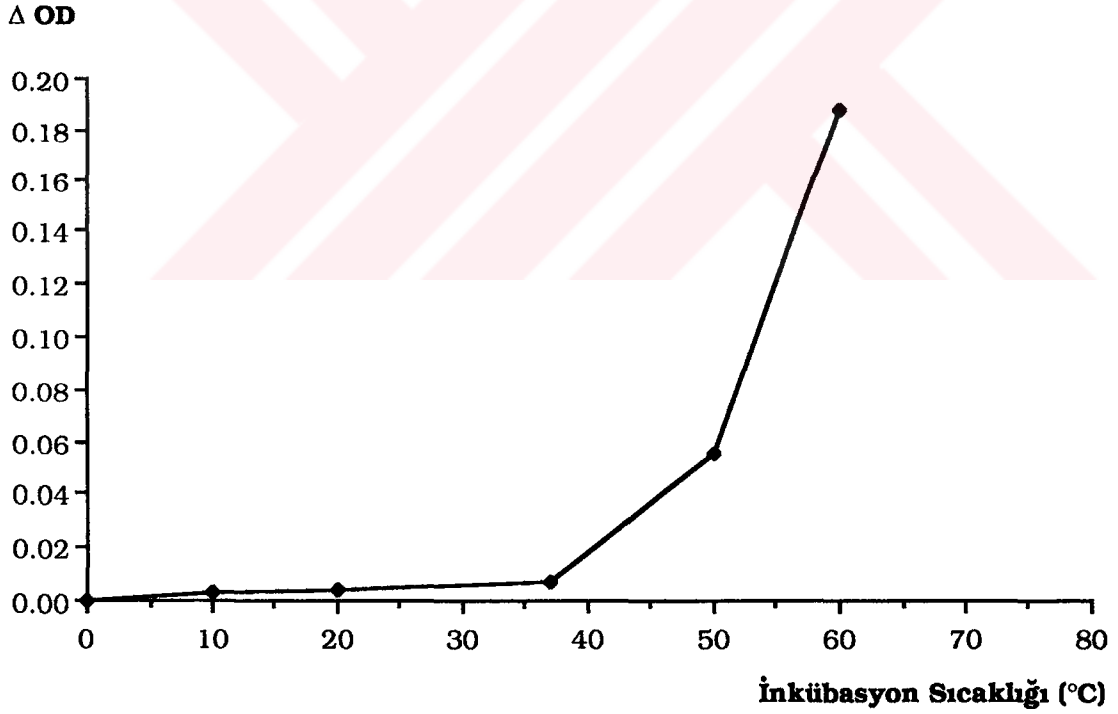
Şekil 4.8. Sabit Substrat Konsantrasyonunda Artan Efektör Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisine Ait Sonuçlar (Prolin % 10 gr, Lityum Sülfat 10 mM, Amonyum Molibdat 10 mM, Arsenik Asit 10 mM, Sodyum Pirofosfat 10 mM).

4.2.5. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisine Ait Sonuçlar

Bu deney 3.2.2.5 de anlatıldığı şekilde yapılarak Tablo 4.12 deki sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.9 de ise bu tabloya göre çizilen grafik görülmektedir.

Tablo 4.12. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisine Ait Sonuçlar.

Tüp No	İnkubasyon sıcaklığı (°C)	OD		ΔOD
		N	K	
1	0	0,078	0,078	0
2	10	0,078	0,075	0,003
3	20	0,080	0,076	0,004
4	37	0,085	0,078	0,007
5	50	0,131	0,075	0,056
6	60	0,264	0,076	0,188



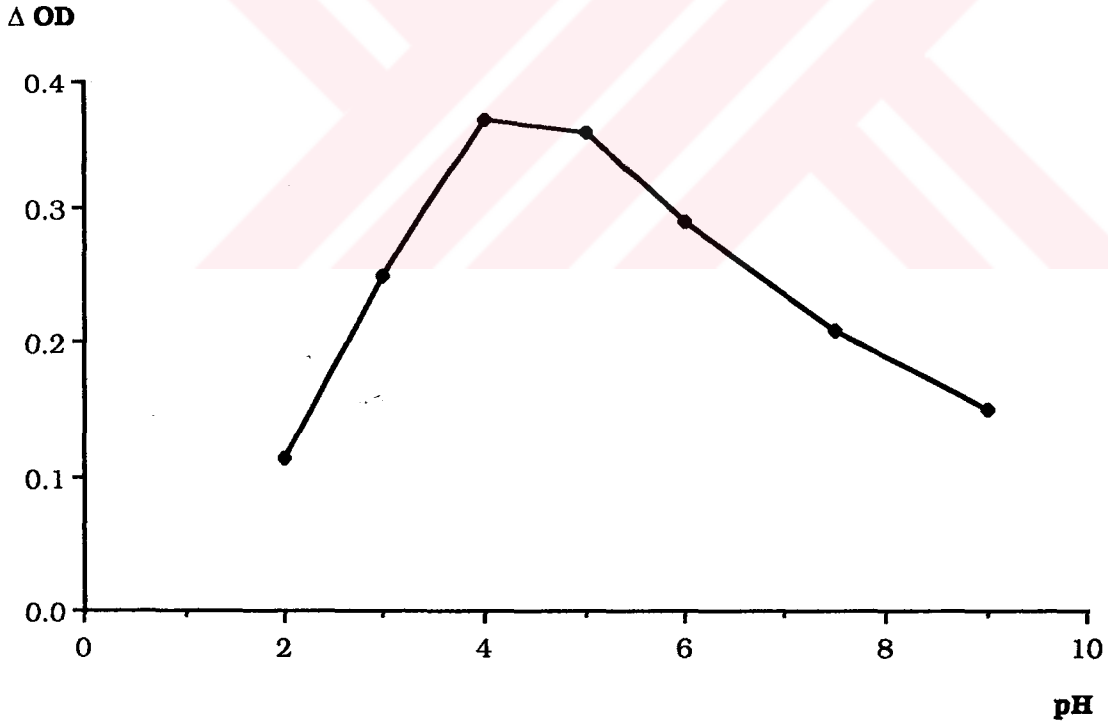
Şekil 4.9. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.

4.2.6.pH nın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisine Ait Sonuçlar

Bu deney 3.2.2.6 da anlatıldığı şekilde yapılarak Tablo 4.13 deki sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.10 de ise bu tabloya göre çizilen grafik görülmektedir.

Tablo 4.13. pH nın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisine Ait Sonuçlar.

Tüp No	pH	ΔOD
1	2	0,115
2	3	0,25
3	4	0,37
4	5	0,36
5	6	0,29
6	7,5	0,21
7	9	0,15



Şekil 4.10. pH nın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.

TARTIŞMA

Asit fosfataz enzimi, bugüne kadar pek çok araştırmacı tarafından çeşitli bitkilerden, mikroorganizmalardan, çeşitli hayvanların ve insanın değişik organ ve dokularından saflaştırılarak fizikokimyasal ve kinetik özellikleri incelenmiştir (4, 15, 16, 30, 31, 32, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 44, 51, 55, 57, 68, 73, 75, 76).

Bizim bu çalışmamızda asit fosfataz enzimi sığır dalağından kısmen saflaştırılarak fizikokimyasal ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar arasında, diğer hayvan organ ve dokularıyla yapılan çalışmalar olduğu gibi, sığır dalağıyla yapılan çalışmalarda, sınırlı sayıda da olsa vardır (73).

Literatürde, asit fosfataz'ın saflaştırılması için değişik metodların kullanıldığı görüldü (22, 30, 38, 51, 76). Bizim bu çalışmamızdaki saflaştırma işleminde Davidson ve Fishman tarafından insan prostatından asit fosfatazın saflaştırılması için kullanılan metod uygulanmıştır (70). Bilindiği gibi bu metotta kullanılan Amonyum sülfat çöktürmesi, enzim saflaştırmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Saflaştırma işleminin her basamağında ve daha sona yapılan kinetik deneylerde enzim aktivitesini ölçmek için Bessey-Lowry Scott'un asit fosfataz tayin metodu kullanıldı (79). Bu metotta enzim substratı olarak p-nitrofenil fosfat kullanılmaktadır (79). Bugüne kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde asit fosfataz'ın bilinen substratları arasında en yüksek affiniteyi p-nitrofenil fosfata karşı gösterdiği görülmektedir (1, 16, 22, 27, 38, 44, 54, 57).

Diğer fosfat esterlerini de substrat olarak kullanmakla birlikte, bunlara karşı gösterdiği affinite, p-nitrofenil fosfattan daha azdır (16, 40, 54, 55, 57).

Avila ve arkadaşları, Amerikan *Leishmania promastigot*larından saflaştırdıkları asit fosfataz enziminin spesifik aktivitesini saflaştırmanın son basamağında 124 kat saflaştırarak 450,13 ünite/mg bulmuşlardır (4). Stepan ve arkadaşları, insan hairy-cell lösemili dalağından saflaştırdıkları asit fosfataz'ın spesifik aktivitesini saflaştırmanın son basamağında 3343 kat saflaştırarak 481 ünite/mg bulmuşlardır (68). Waymack ve arkadaşları, buğday tohumundan saflaştırdıktan asit fosfatazın spesifik aktivitesini saflaştırmanın son basamağında 7030 kat saflaştırarak 605 ünite/mg bulmuşlardır (76). Duff ve arkadaşları, siyah hardal hücre süspansiyon kültüründen yaptıkları saflaştırmada asit fosfatazın spesifik aktivitesini saflaştırmanın son basamağında 1633 kat saflaştırarak 1225 ünite/mg olarak bulmuşlardır (16). Bizim çalışmamızda ise spesifik aktivite saflaştırmanın son basamağında 66,1 kat saflaştırılarak 300 ünite/mg olarak bulunmuştur (Tablo 4.1).

Saflaştırma işlemi tamamlandıktan sonra enzimin kinetik özelliklerinin incelenmesine geçildi. İlk olarak artan substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine ekisi araştırıldı. p-nitro fenilfosfat substratı ile Tablo 4.2 ye göre yapılan bu çalışmanın neticesinde saflaştırdığımız enzimin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluk gösterdiği görüldü (Şekil 4.2). p-nitrofenil fosfat substratı ile 37°C'de, pH: 4,8 0,1 M sitrat tamponuyla yapılan bu çalışmanın sonucuna göre çizilen Michaelis-Menten grafiğinden $K_m = 0,14$ mM olarak hesaplandı. Bu sonuçları literatürle karşılaştırdığımızda, Avila ve arkadaşlarının Amerikan *Leishmania promastigot*larından saflaştırdıkları asit fosfataz enzimi için p-nitrofenilfosfat substratı ile pH : 5,2 de, K_m değerini 1,0 mM olarak buldukları (4), Duff ve arkadaşlarının siyah hardal hücre süspansiyonu kültüründen saflaştırdıkları enzim için, p-nitrofenitfosfat substratı ile pH : 5,6'da, K_m değerini 0,29 (16) Panara ve arkadaşlarının *Rana esculenta* karaciğerinden saflaştırdıkları asit fosfataz'ın 4 izoenzimi ile yaptıkları çalışmada, 37°C'de ve pH: 5'de p-nitrofenil fosfat substratı

için, K_m değerini 0,16-0,2 mM (54), Panara ve arkadaşlarının bir başka çalışmada arpa kökünden saflaştırdıkları asit fosfataz enzimi için, p-nitrofenil fosfat substratı ile pH: 4,8 de, K_m değerini 0,12 mM (57), ve yine Panara'nın yaptığı diğer bir çalışmada tavuk karaciğerinden saflaştırdığı 2 asit fosfataz izoenzimi için; p-nitrofenil fosfat substratı ile, sırasıyla pH: 4,5-4,8'de $K_m = 0,16$ mM ve pH = 5,2-5,5'da $K_m = 0,10$ mM lik sonuçlarını elde ettikleri bildirilmektedir (55).

Artan enzim miktarının aktiviteye etkisinin incelenmesi maksadıyla yaptığımız deneyde, enzim miktarının artışıyla doğru orantılı olarak aktivitede de lineer bir artış olduğu görüldü. (Şekil 4.4).

Amonyum molibdat, arsenik asiti ve sodyum pirofosfatın artan substrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesine etkilerini incelemek maksadıyla yaptığımız deneylerde bu maddelerden amonyum molibdat ve arsenik asidinin enzim üzerinde kompetitif inhibisyona yol açtığı gözlenmiştir (Şekil 4.5. a,b ve 4.6.a,b). Literatürdeki evvelce yapılmış çalışmalarda; amonyum molibdat ve arsenik asidi ile ilgili olarak benzer sonuçların alındığı görüldü (16, 55, 57, 73, 76).

Sodyum pirofosfatla yaptığımız çalışmada ise düşük substrat konsantrasyonlarında inhibisyon yaptığı, belli bir kritik seviyeden sonra ise enzimi aktiveleştirdiği görüldü. Şekil 4.7 de çizilen grafikte görüldüğü gibi sigmoid bir eğri elde edildi. Bu durum allosterik inhibisyon tipine uymaktadır. Bu son çalışmamızla ilgili olarak literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

Prolin, lityum sülfat, amonyum molibdat, arsenik asidi ve sodyum pirofosfatın artan konsantrasyonlarının sabit substrat konsantrasyonunda enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi için yaptığımız deneylerde, prolin'in enzim aktivitesi üzerine hiçbir etkisinin olmadığı, lityum sülfatın enzim aktivitesini artırdığı amo-

nyum molibdat, arsenik asidi ve sodyum pirofosfatın ise enzim aktivitesinde azalmaya yol açtığı gözlemlendi (Şekil 4.8).

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla yapılan deneyde, 37°C'nin üzerindeki deney sıcaklıklarında, 60°C ye kadar enzim aktivitesinde ani bir yükselme gözlenmiştir (Şekil 4.9).

Literatürde sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalarda farklı sonuçların alındığı, hatta aynı dokudan elde edilen farklı izoenzimlerin bile farklı davranış gösterdikleri tespit edilmişti. Meselâ Panara ve arkadaşlarının Rana esculenta karaciğerinden saflaştırdıkları asit fosfatazın, 4 izoenzimi ile yaptıkları çalışmada II. nin 50°C ye dayanıklı olduğu, IV.'nün 50°C de 10 dakikada inaktive olduğu, I. nin II. ile IV. arasında bir davranış gösterdiği, III. ün ise 50°C de belirgin aktivasyon gösterdiği, bu aktivasyonun 60°C ye kadar devam ettiği, 70°C de ise 10 dakikada inaktive olduğu belirtilmektedir. Gene bu çalışmada 4 izoenzimin optimal aktivitelerini 37-42°C ler arasında gösterdiği bildirilmektedir (54). Panara ve arkadaşlarının arpa kökü ile yaptığı bir başka çalışmada ise saflaştırılan enzimin yarı ömrünün 40°C de 40 dakika 50°C de 5 dakika olduğu, 60°C de hızla inaktif hale geçtiği ve optimal sıcaklığının 30-35°C civarında bulunduğu bildirilmektedir (57).

pH'nın asit fosfataz enzimi üzerine etkisini incelemek için yaptığımız deneyde, saflaştırdığımız enzimin pH 4-5 arasında en yüksek aktiviteyi gösterdiği gözlemlendi. Waymack ve arkadaşları, buğday tohumundan saflaştırdıkları asit fosfataz için maksimal stabilite elde edilen pH aralığının 4-7, (76), Janska ve arkadaşları, yayın balığı karaciğerinden elde ettikleri asit fosfataz için optimum pH ı 4,8 (37), Panara tavuk karaciğerinden elde ettiği asit fosfataz izoenzimlerinden I. için pH aralığını 4,5-4,8 ve II. için 5,2-5,5 (55), Duff ve arkadaşları, siyah hardal hücre süspansiyon kültüründen saflaştırdıkları asit fosfatazın optimum pH'ını

5,6 (16) Avila ve arkadaşları American Leishmania promastigotlarından elde ettikleri asit fosfatazın optimum pH ını 5,2 (4) ve Himeno ve arkadaşları, sıçan karaciğerinden izole ettikleri asit fosfatazın optimum pH'ını 5,0 (31) olarak bildirmişlerdir.

Sonuç olarak bu çalışmada amonyum mobildat ve arsenik asidinin enzim üzerinde kompetitif inhibisyon meydana getirdiği, sodyumpirofosfatın allosterik inhibisyona yol açtığı, prolinin enzim aktivitesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı, lityum sülfatın enzim aktivitesini artırdığı, sıcaklığın etkisinin 37°C ile 60°C arasında ani bir aktivite artışı şeklinde ortaya çıktığı ve bu enzim için optimal pH nın 4-5 arasında bulunduğu tespit edilmiştir.

ÖZET

Bu çalışmada, sığır dalağından asit fosfataz enzimi kısmen saflaştırılarak, fizikokimyasal ve kinetik özellikleri incelenmiştir.

Saflaştırılan enzimin önce p-nitrofenil fosfat substratı için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_m değeri 0,14 mM olarak hesaplanmıştır. Daha sonra amonyum molibdat, arsenik asit, sodyum pirofosfat, prolin, lityum sülfat, sıcaklık ve pH'nın enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Amonyum molibdat ve arsenik asit'in enzim üzerinde kompetitif inhibisyon meydana getirdiği, sodyumpirofosfatın, allosterik inhibisyona yol açtığı, prolinin enzim aktivitesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı, lityum sülfatın enzim aktivitesini artırdığı, sıcaklığın etkisinin 37°C ile 60°C arasında ani bir aktivite artışı şeklinde ortaya çıktığı ve bu enzim için optimal pH'nın 4-5 arasında bulunduğu tespit edilmiştir.

SUMMARY

In this study, enzyme acid phosphatase had partially purified from bovine spleen and its physicochemical and kinetic properties were detected.

Initially, we calculate the K_m value of the enzyme as 0,14 mM for substrate p-nitrophenylphosphate, after drawing the graphics of Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk. Then, effects of ammonium molybdate, arsenic acid, sodium pyrophosphate, prolin, lityum sulphate, temperature and pH on the enzyme activity were detected.

At the end of our study, we have found the results that: 1-Ammonium molybdate and arsenic acid are competitive inhibitors of the enzyme 2-sodium-pyrophosphate has an allosteric effect on the behaviour of the enzyme. 3-prolin has no significant effect on the enzyme 4-Lityum sulphate activates the enzyme 5-When we increase the experimental incubation temperature, between 37°C and 60°C, enzyme activity shows a sharp rise. 6-The optimal pH range for this enzyme is 4-5.

KAYNAKLAR

1. Anderson T.R., Toverud S.U. Purification and characterization of purple acid phosphatase from developing rat bone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 247(1): 131-139, 1986.
2. Andriole G.L., Coplen D.E., Mikkelsen D.J., Catalona W.J. Sonographic and pathological staging of patients with clinically localized prostate cancer. *The Journal of Urology*. 142: 1259-1261, 1989.
3. Arnold W.N., Sakai K.H., Mann L.C. Selective inactivation of an extra-cytoplasmic acid phosphatase of yeast-like cells of *Sporothrix schenckii* by sodium fluoride. *Journal of General Microbiology*. 133: 1503-1509, 1987.
4. Avila J.L., Hernandez-Morales Dr. Polegre M.A., Convit J. On the acid phosphatase isoenzymes existing in American *Leishmania* promastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 94 B(2): 335-342, 1989.
5. Barboni E., Kemeny D.M., Campos S., Vernon C.A. The purification of acid phosphatase from honey bee venom (*Apis mellifica*). *Toxicon*. 25(10): 1097-1103, 1987.
6. Barclay R., Threlfall D.R., Leighton I. Separation and properties of the haemolysins and extracellular enzymes of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*. *The Journal of Medical Microbiology*. 30: 119-127, 1989.
7. Barman T.E. *Enzyme Handbook*. Vol. II. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 1969.

8. Basboa O., Sharma J.D and C.B. Solubilization, purification and characterization of an acid phosphatase from the plasma membranes of peanut cotyledons. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 24: 24-28, 1987.
9. Basha S.M. Purification and characterization of an acid phosphatase from peanut (*Arachis hypogaea*) seed. *Canadian Journal of Botany* 62: 385-391, 1984.
10. Bergmeyer H.U. *Methoden Der Enzymatischen Analyse*. Band 1. Verlag Chemie. Weinheim/Bergstr. 1974.
11. Calbreath, D.F. *Clinical Chemistry. A Fundamental Textbook*. W.B. Saunders Company. 1992.
12. Chevalier S., Landry D., Chapdelaine A. Phosphotyrosine phosphatase activity of human and canine acid phosphatases of prostatic origin. *The Prostate* 12: 209-219, 1988.
13. Curtius H.C., Roth M. *Clinical Biochemistry. Principles and Methods*. Vol. II. Walter de Gruyter. Berlin, New York. 1974.
14. De Vries G.P., Slob A.W., Jöbsis A.C., Meijer H., Sanders G.T.B. Prostate-specific acid phosphatase. Purification and specific antibody production in rabbits. *American Journal of Clinical Pathology*. 72: 944-951, 1979.
15. Dissing J., Svensmark O. Human red cell acid phosphatase: Purification and properties of the A, B and C isozymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1041, 232-242, 1990.

16. Duff S.M.G., Lefebvre D.D, Plaxton W.C. Purification, characterization, and Subcellular localization of an acid phosphatase from black mustard cell-suspension cultures. Comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase. *Arc. Biochem. Biophy.* Vol. 286, No. 1, 226-232 (1991).
17. El-Shirbiny A.M., Nilson T., Pawar H.N. Serum prostate-specific antigen: hourly change /24 hours compared with prostatic acid phosphatase. *Urology.* 35(1): 88-92, 1990.
18. El-Shirbiny A.M., Shridhar P., Aladnani M.S., Suresh L.K. Enzyme immunoassay of prostatic acid phosphatase after prostatic examination. Correlation with prostate size and immunopathology. *Urology* 32(5): 469-473, 1988.
19. El-Shirbiny A.M., Pawar H.N., Nilson T.G. Diurnal variation of prostatic acid phosphatase (PAP) in urological patients with nonprostatic disease. *Urology* 27(4): 302-305, 1986.
20. Filmus J.E., Podhajcer O.L., Mareso E., Guman N., Mordoh J. Acid phosphatase in human breast cancer tissue. *Cancer.* 53: 301-305, 1984.
21. Fujimoto S., Takebayashi M., Kawamoto N., Ohara A. Chemical modification of essential histidine residues in Mn (III)-Acid phosphatase by Diethylpyrocarbonate in the presence of F⁻ ion. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 35(5): 2011-2015, 1987.
22. Fujimoto S., Urata Y., Nakagawa T., Ohara A. Characterization of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from bovine kidney cortex. *Journal of Biochemistry.* 96: 1079-1088, 1984.

23. Gieselmann V., Lemonsky P., Hasılık A., Von Figura K., Waheed A., Van Etten R.L. Human tartrate-inhibitable lysosomal acid phosphatase. Purification, characterization, biosynthesis and intracellular transport. *Acta Biochimica Polonica*. 33(2): 119-126, 1986.
24. Gökhan İ.H. Sıçan böbrek ve karaciğer alkali fosfatazları üzerine metil ve etil parationun tesirleri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 30(1): 23-24, 1977.
25. Gundlach G., Luttermann-Semmer E. The effect of pH and temperature on the stability and enzymatic activity of prostatic acid phosphatase. Studies on the optimization of a continuous monitored determination of acid phosphatase, II. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*. 25(7): 441-446, 1987.
26. Hara A., Sawada H., Nakayama T., Matsumoto Y. Affinity separation of an acid phosphatase from rat tissues and Gaucher spleen with immobilized Cibacron Blue. *Journal of Biochemistry*. 94(3): 721-727, 1983.
27. Hara A., Sawada H., Kato T., Nakayama T., Yamamoto H., Matsumoto H. Purification and characterization of a purple acid phosphatase from rat spleen. *Journal of Biochemistry*. 95(1): 67-74, 1984.
28. Haschen R.J. *Enzymdiagnostik*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 1970.
29. Hibbard M.D., McCarthy R.C., Markowitz H. Isolation and characterization of electrophoretic variants of human prostatic acid phosphatase. *Clinical Chemistry*. 29(11): 1886-1889, 1983.

30. Himeno M., Koutoku H., Tsuji H., Kato K. Purification and characterization of acid phosphatase in rat liver lysosomal contents. *Journal of Biochemistry*. 104(5): 773-776, 1988.
31. Himeno M., Koutoku H., Ishikawa T., Kato K. Acid phosphatase in rat liver lysosomal membranes: Purification and characterization. *Journal of Biochemistry*. 105(3): 449-456, 1989.
32. Himeno M., Fujita H., Noguchi Y., Kono A., Kato K. Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding acid phosphatase in rat liver lysosomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 162(3): 1044-1053, 1989.
33. Hollander V.P., Acid Phosphatases. In Boyer P.D. *The Enzymes*. 3 th. ed. Vol: IV Academic Press. New York, London 1971.
34. Höyhty M., Wihko P., Vuolas L., Tryggvason K., Vihko R. High-affinity monoclonal antibodies specific for human prostatic acid phosphatase. *Clinical Chemistry*. 33(1): 103-107, 1987.
35. Huben R.P. Early detection of prostate cancer. *Seminars in Surgical Oncology*. 5: 201-204, 1989.
36. Janska H., Kubicz A. Studies on the heterogeneity of carp liver acid phosphatases: Acid phosphatase-1. Subunit structure and carbohydrate composition. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 82 B(3): 563-567, 1985.
37. Janska H., Kubicz A., Bem M. Catfish liver acid phosphatases: Differently glycosylated enzyme molecules with altered kinetic properties. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 85 B(4): 753-758, 1986.

38. Janska H., Kubicz A., Szalewicz A., Harazna J. The high molecular weight and the low molecular weight acid phosphatases of the frog liver and their phosphotyrosine activity. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 90 B (1): 173-178, 1988.
39. Janska H., Kubicz A., Szalewicz A. The lower molecular weight acid phosphatase from the frog liver: Isolation of homogeneous AcPase III and IV representing glycoforms with different bioactivity. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 92 B(2): 341-346, 1989.
40. Kato T., Hara A., Nakayama T., Sawada H., Hamatake M., Matsumoto Y. Purification and characterization of purple acid phosphatase from rat bone. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 83 B(4): 813-817, 1986.
41. Ketcham C.M., Roberts R.M., Simmen R.C.M., Nick H.S. Molecular cloning of the type 5, iron-containing, tartrate-resistant acid phosphatase from human placenta. *The Journal of Biological Chemistry*. 264(1): 557-563, 1989.
42. Kubic A., Szalewicz A., Chrambach A., Studies on the oligosaccharide heterogeneity of the isoelectric forms of the lower molecular weight acid phosphatase of frog Liver. *Int. J. Biochem.* Vol 23, No. 4, 413-419, 1991.
43. Kubicz A., Waheed A., Van Etten R.L. Isolation and characterization of a homogeneous acid phosphatase from catfish liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 81 B(1): 177-183, 1985.
44. Lau K.H.W., Freeman T.K., Baylink D.J.. Purification and characterization of an acid phosphatase that displays phosphotyrosyl-protein phosphatase activity from bovine cortical bone matrix. *The Journal of Biological Chemistry*. 262(3): 1389-1397, 1987.

45. Lin M.F., Lee C., Li S.L.L., Chu T.M. Purification and characterization of a new human prostatic acid phosphatase isoenzyme. *Biochemistry*. 22: 1055-1062, 1983.
46. Lopandic K., Deana A.D., Barbaric S., Pinna L.A. Biochemical and genetic evidence that yeast extracellular protein phosphatase activity due to acid phosphatase. *Biochemistry International*. 14(4): 627-633, 1987.
47. Lovelace J.K., Dwyer D.M., Gottlieb M. Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 20: 243-251, 1986.
48. Lovelace J.K., Gottlieb M. Effect of tunicamycin on the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 22: 19-28, 1987.
49. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall R.J. *J. Biol. Chem.* 193. 265-275, 1951.
50. Mc Carley D.L, Weiner R.S. Diagnostic and therapeutic utility of monoclonal antibodies in urologic oncology. *Seminars in Surgical Oncology*. 5: 293-301, 1989.
51. Mc Dougal D.B., Mc Dougal S.H., Johnson E.M. Effect of Capsaicin upon fluoride sensitive acid phosphatases in selected ganglia and spinal cord and upon neuronal size and number in dorsal root ganglion. *Brain Research*. 331: 63-70, 1985.
52. Moran A., Burguillo. J., Lopez M.C., Dominguez A. Kinetic properties of derepressible acid phosphatase from the yeast form of *Yarrowia lipolytica*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 990: 228-296, 1989.

53. Oser B.L. Hawk's Physiological Chemistry. 14th ed. Mc Graw-Hill Book Company. New York, Toronto, Sydney, London, 1965.
54. Panara F., Angiolillo A., Pascolini R. Acid phosphatases from liver of *Rana esculenta*. Subcellular localization and partial characterization of multiple forms. *Comp. Biochem. Physiol.* 93 B(4): 877-882, 1989.
55. Panara F. Isolation and partial characterization of high and low molecular weight acid phosphatases from chicken liver. *International Journal of Biochemistry.* 17(11): 1213-1217, 1985.
56. Panara F., Mileti A. Subcellular localization of high-and low-molecular weight acid phosphatases from chicken liver. *International Journal of Biochemistry* 18(11): 1057-1059, 1986.
57. Panara F., Pasqualini S., Antonielli M. Multiple forms of barley root acid phosphatase: Purification and some characteristics of the major cytoplasmic isoenzyme. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1037: 73-80, 1990.
58. Podhajcer O.L., Filmus J.E., Guman N., Mordoh J. A high-molecular weight complex with acid phosphatase activity in human breast cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 64: 145-153, 1984.
59. Podhajcer O.L., Filmus J.E., Mordoh J. Characterization of lysosomal acid phosphatase from normal and malignant mammary tissue. *Clinical Chemistry.* 32(2): 279-282, 1986.
60. Richterich R., Colombo J.P. *Klinische Chemie. Theorie, Praxis, Interpretation.* S. Karger. Basel, München, Paris, London, New York, Sydney. 1978.

61. Rosalki S.B. Monoclonal antibodies to enzymes. *Clinica Chimica Acta*. 183: 45-58, 1989.
62. Rusciano D., Agostini E., Ceccarini C., Terrana B. One-step, high-yield purification of human prostatic acid phosphatase from seminal fluid by gel-filtration HPLC under nondenaturing conditions. *Clinical Chemistry*. 34 (5): 984-986, 1988.
63. Schell D., Stierhof Y.D., Overath P. Purification and characterization of a tartarate-sensitive acid-phosphatase of *Trypanosoma brucei*. *FEBS*, 271(1-2), 67-70, 1990.
64. Schifman R.B., Ahmann F.R., Elvick A., Ahmann M., Coulis K., Brawer M.K. Analytical and physiological characteristics of prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase in serum compared. *Clinical Chemistry*. 33 (11): 2086-2088; 1987.
65. Schindelmeiser J., Radzun H.J., Münstermann D. Tartrate resistant, purple acid phosphatase in Gaucher cells of the spleen. *Path. Res. Pract.* 187, 209-213, 1991.
66. Schweingruber M.E., Fluri R., Maundrell K., Schweingruber A.M., Dumermuth E. Identification and characterization of thiamin repressible acid phosphatase in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*. 261(34): 15877-15882, 1986.
67. Siddall J.K., Cooper E.H., Newling D.W.W., Robinson M.R.G., Whelan P. An evaluation of the immunochemical measurement of prostatic acid phosphatase and prostatic specific antigen in carcinoma of the prostate. *European Urology*. 12: 123-130, 1986.

68. Stepan J.J., Lau K.H.W., Mohan S., Kraenzlin M., Baylink D.J. Purification and N-terminal sequence of two tartarate-resistant acid phosphatases type-5 from the hairy-cell leukemia spleen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 165(3): 1027-1034, 1989.
69. Terracio L., Rule A., Salvato J., Douglas W. H.S. Immunofluorescent localization of an androgen-dependent isoenzyme of prostatic acid phosphatase in rat ventral prostate. *The Anatomical Record*. 213: 131-139, 1985.
70. Thierfelder/Hoppe-Seyler. *Handbuch der Physiologisch-und pathologisch-chemischen Analyse*. Springer Verlag. Berlin. 1966.
71. Tietz N.W. *Textbook of Clinical Chemistry*. WB Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo, Hong Kong. 1986.
72. VanEtten R.L., Saini M.S. Selective purification of tartrate-inhibitable acid phosphatases: rapid and efficient purification (to homogeneity) of human and canine prostatic acid phosphatases. *Clinical Chemistry*. 24(9): 1525-1530, 1978.
73. Vincent J.B., Crowder M.W., Averill B.A. Spectroscopic and kinetics studies of a high-salt-stabilized form of the purple acid phosphatase from bovine spleen. *Biochemistry* 30, 3025-3034, 1991.
74. Wadström J., Huber P., Rutishauser G. Elevation of serum prostatic acid phosphatase levels after prostatic massage. *Urology*. 24(6): 550-551, 1984.

75. Waheed A., Laidler P.M., Wo Y.Y.P., Van Etten R.L. Purification and physicochemical characterization of a human plasental acid phosphatase possessing phosphotyrosyl protein phosphatase activity. *Biochemistry*. 27: 4265-4273, 1988.
76. Waymack P.P. Van Etten R.L. Isolation and characterization of a homogeneous isoenzyme of wheat germ acid phosphatase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 288(2): 621-633, 1991.
77. Webb J.L. *Enzyme and Metabolic Inhibitors. Vol: II.* Academic Press. New York, London. 1966.
78. Webb J.L. *Enzyme and Metabolic Inhibitors Vol: III.* Academic Press. New York, London, 1966.
79. Weber H., Wegmann T. *Atlas der Klinischen Enzymologie. Methoden und Arbeitsvorschriften.* Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 1968.

ÖZGEÇMİŞ

1964 yılında Konya'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi 1969-1981 yılları arasında Konya'da tamamladım. Yüksek öğrenimimi 1981-1987 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yaptım. Mart 1988-Mart 1989 yılları arasında Siirt-Eruh'ta Sağlık Ocağı hekimi olarak çalıştım. Nisan 1989'dan beri Konya'da Sağlık Ocağı hekimi olarak çalışmaktayım. Eylül 1990'da Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü doktora yönetmeliği gereğince Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Biyokimya Doktora çalışmalarına başladım. Haziran 1992'de Doktora derslerimi tamamladım. Kasım 1992'de Doktora yeterlilik sınavını başarıyla verdim.

Evli ve 2 çocuk babasıyım.

Dr. H. Serdar ÖZTÜRK