

# EDTA VE 8-HİDROKSİ KİNOLİN İLE METAL İYONLARININ SERUM ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTE DÜZEYLERİNE ETKİSİ

**Metin GEZİCİ\***, **Yüksel ÖZDEMİR\*\***

*Anahtar Terimler: Serum alkalen fosfataz, EDTA, 8-Hidroksi kinolin, Zn, Mg*

*Key Words: Serum alkaline phosphatase, EDTA, 8-Hydroxy quinoline, Zn, Mg*

## ÖZET

Bu çalışmada; EDTA ve 8-hidroksi kinolininin serum alkalen fosfataz aktivite düzeyleri üzerine inhibitör etkileri incelenmiştir. Alkalen fosfataz aktivite düzeyleri EDTA ile % 90, 8-Hidroksi kinolin ile % 64 azalma göstermiştir. İnhibisyonun ardından ortalama eklenen Zn ve Mg iyonları ile elde edilen reaktivasyonlar ile aktivite düzeyleri tekrar yükselmiştir. Zn ilavesiyle elde edilen reaktivasyon Mg ile elde edilenden daha yüksek olarak elde edilmiştir.

## SUMMARY

**The Effects of EDTA, 8-Hydroxy Quinoline and Metal Ions on the Serum Alkaline Phosphatase Activity Levels**

In this study, the inhibition effects of EDTA and 8-Hydroxy quinoline upon the serum alkaline phosphatase activity were examined. After this inhibition, the alkaline phosphatase activity level was decreased (% 90) using EDTA and (% 64) using 8-hydroxy quinoline. The alkaline phosphatase activity was restored with addition Zn and Mg ions after inhibition. Reactivation of alkaline phosphatase activity due addition of Zn was higher than Mg.

## GİRİŞ

Alkalen fosfataz (ALP, Ortofosforik monoester fosfohidrolaz, E.C 3. 1. 3. 1), ortofosforik asit esterlerinden fosfat ayrılmasını alkali pH'da (pH:10) katalize eden glikoprotein yapıda bir enzimdir(1). Molekül ağırlığı 70-120 Kd arasında değişen enzim vücudun birçok dokularında bulunmaktadır(2). İnsanlarda farklı dokulardan kaynaklanan ALP'lar birbirinden farklı özelliklere sahiptirler. Anılan farklılık kriterleri değişik substratlara karşı affinite, selektif inhibitörlere karşı oluşan yanıtta, ısı ve üreye karşı oluşan denaturasyondaki değişiklik, elektroforetik mobilite ve immünolojik farklılıklar olarak belirlenebilir(3). Bu yöntemler kullanılarak başlıca kemik, karaciğer, plasenta, intestinal, böbrek, Regan(Fetal), Nagao, Kassahara ve diğ. olarak bilinen izoenzimler ayrıştırılmıştır(4,5,6,7,8).

\* *Biyokimya Uzman Dr., Zonguldak Devlet Hastanesi, Zonguldak*

\*\* *Geziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD.Doç.Dr.*

Fenil alanin 5 mM konsantrasyonda plasental, Regan, İntestinal izoenzimleri inhibe ederken karaciğer ve kemik izoenzimlerine daha az etkilidir. Plasental ALP'ın diğer izoenzimlerden ayrılmasında ise L-Lösinin kullanılabileceği bildirilmiştir(9). İnsan ve sıçan karaciğer tümörleri üzerinde yapılan çalışmalarda ise L-homoargininin L-fenil alaninden daha etkili olduğu gösterilmiştir(10).

Metallo enzim olan ALP yapısında Zn iyonu bulundurur. Bunun yanısıra Mg, Co, Mn gibi bazı divalan iyonlar da enzimin aktivatörleridirler(8).

Çelatör etkili EDTA'nın ALP üzerinde inhibitör etkisi olduğu bilinmektedir(10). Aynı şekilde 8-Hidroksi kinolin-5 sülfonik asidin de bu enzim aktivitesi üzerinde % 90'dan fazla inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir(11). 8-Hidroksi kinolin daha çok Mg bağlayan çelatör ajan olup spektrofotometrik Ca saptanmasında Mg interferansını önlemek amacıyla kullanılmaktadır(12,13).

Bu çalışmamızda; Zn, Mg gibi metal iyonlarının serum ALP enzim aktivitesi üzerine etkileri ile divalan iyon çelatörü olarak kullanılan EDTA ve 8-Hidroksi kinolinin serum ALP enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma gereçlerini oluşturan kan örnekleri Fırat Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya Laboratuanna başvuran 28 kişiden (10 kadın, 18 erkek) sağlanmıştır.

Alınan kan örnekleri 2500 RPM'de santrifüj edilerek serumlar elde edilmiş ve çalışma tamamlanuncaya kadar serumlar +4°C'da saklanmıştır. Serumlarda ALP aktivite düzeyi p-NPP(para nitro fenil fosfat) yöntemi ile saptanmıştır(14). İnhibitör maddelerden EDTA 10 mM, 8-Hidroksi kinolin 5 mM konsantrasyonlarda kullanılmış bu maddelerle serum inkübasyonundan önce muamele edilmiş ve 10 dakika preinkübasyonu takiben alınan örneklerde ALP aktivite düzeyi saptanmıştır. İkinci bölümde ise EDTA ve 8-Hidroksi Kinolin ile muameleden önce ve sonra ortama Zn (10 mM) ve Mg (10 mM) eklenerek enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Merck marka olup analitik saflıktadır.

## BULGULAR

Serum ALP aktivitesi üzerine en etkili EDTA konsantrasyonunu saptamak amacıyla yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1:EDTA'nın serum ALP'az aktivitesine etkisi

Serum ALP Aktivitesi (Ü / L)		
Total Aktivite	EDTA (5 mM)	EDTA (10 mM)
32.5±5.5	11.5±6.1	3.2±1.8

\*n:7

Tablodan görüldüğü gibi 10 mM EDTA ile elde edilen inhibisyon 5 mM ile elde edilenden daha yüksektir.

İnhibisyonu takiben ortalama eklenen aynı konsantrasyondaki Zn ve Mg iyonlarının ALP enzim aktive düzeylerine etkisi Tablo 2'de görülmektedir.

Tablo 2:Serum ALP aktivitesine EDTA ve Zn, Mg etkisi

Serum ALP Aktivitesi (Ü/L)			
Total aktivite	Serum+EDTA	Serum+EDTA+Mg	Serum+EDTA+Zn
124	2.2(% 1.77)	43.5(% 35.0)	143.6(% 115)
45	3.3(% 7.30)	19.3(% 42.6)	43.9(% 97.5)

\*EDTA, Zn ve Mg konsantrasyonları 10 mM'dür.

Tablo 2'den görülebileceği gibi Serum ALP aktivitesi EDTA ile inhibe edilirken ortama eklenen iyonlarla EDTA inhibisyonu önlenmektedir. Bu önlemede Zn iyonu Mg'a oranla daha etkili olup reaktivasyon gücü daha fazladır.

EDTA inhibisyonundan önce ortama eklenen iyonların serum ALP aktivitesi üzerine etkilerini göstermek için EDTA uygulamasından önce ilgili enzim kaynağı serum, Zn ve Mg (10 mM) iyonları ile inkübe edilmiş daha sonra ortama EDTA eklenmiştir. Elde edilen sonuçlar tablo 3'de sunulmuştur.

Tablo 3:EDTA inhibisyonundan önce Zn ve Mg inkübasyonunun serum ALP aktivitesi üzerine etkisi

Serum ALP Aktivitesi (Ü / L)				
Total Aktivite	Serum+Mg	Serum+Zn	Serum+Mg+EDTA	Serum+Zn+EDTA
38	40.7(% 107.1)	44.0(% 115.8)	7.8(% 20.5)	45.8(% 120.5)
74	68.1(% 92.0)	83.6(% 112.9)	5.2(% 7.0)	85.1(% 115.0)

\*Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ve EDTA konsantrasyonları 10 mM'dür.

Tablo 3'den de gözlenebileceği gibi Mg iyonları serum ALP enzimini EDTA inhibisyonuna karşı koruyamazken Zn iyonları hem inhibitörün etkisini ortadan kaldırmakta bunun yanı sıra enzim aktivitesini başlangıç aktivitesine oranla da arttırmaktadır.

Zn ve Mg iyonlarının inhibitör ile birlikte uygulanmasının serum ALP enzim aktivitesi üzerine etkilerini gözlemek amacıyla yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4:Zn, Mg iyonlarının EDTA ile birlikte uygulanmasının serum ALP aktivitesi üzerine etkisi.

Serum ALP Aktivitesi (Ü/L)			
Total Aktivite	Serum+Mg+Zn	Serum+Mg+Zn+EDTA	Serum+EDTA
38	38.5(% 101)	44.5(% 117)	4.4(% 11.6)
74	79.2(% 107)	78.6(% 106)	3.3(% 4.4)

\*Zn.Mg ve EDTA konsantrasyonları 10 mM'dür.

Tablodan izlenebileceği gibi Zn ve Mg iyonlarıyla inkübasyondan sonra EDTA ile inhibe edilen serum ALP aktivitesi ile, bu iyonların birlikte kullanılmasıyla inhibisyona karşı koruyucu etkilerini daha kuvvetli olarak yaptıklarını göstermektedirler.

Serum ALP aktivitesi üzerine EDTA'ya benzer etki göstereceği düşünülen 8-Hidroksi kinolin enzimle inkübe edildikten sonra ortama eklenen Zn iyonunun etkisi Tablo 5'de görülmektedir.

Tablo 5:Zn ve 8-Hidroksi kinolininin serum ALP aktivitesine etkisi.

Serum ALP Aktivitesi (Ü/L)			
Total Aktivite	Serum+8-OH kinolin	Serum+8-OH kinolin+Zn(10 mM)	Serum+8-OH kinolin+Zn(20mM)
37	13.7±5.9	39.0±7.4	41.9±9.4

\* 8-OH kinolin konsantrasyonu 5 mM'dür.

\*\* n:4

Serum alkalin fosfatase aktivitesi üzerine 8-Hidroksi kinolin etkisi incelendiğinde, bu madde ile oluşan inhibisyonun daha sonra ortama eklenen Zn iyonları ile ortadan kaldırıldığı gözlenmektedir. Bu reaktivasyon Zn iyon konsantrasyonlarının artırılması ile daha da etkili olmaktadır.

Serum ALP aktivitesi üzerine 8-Hidroksi kinolin inhibisyonunu önlemede Mg iyonlarının etkisi Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6:Serum ALP aktivitesine 8-Hidroksi kinolin ve Mg iyonlarının etkisi

Serum ALP Aktivitesi (Ü/L)		
Total Aktivite	Serum+8-OH kinolin	Serum+8-OH Kinolin+Mg
38	16.5(% 43.4)	28.8(% 75.7)
74	13.2(% 17.6)	22.2(% 30.0)

\* 8-OH kinolin konsantrasyonu 5 mM, Mg konsantrasyonu 10 mM'dür.

Tablodan da gözlenebileceği gibi Mg iyonlarının enzimi 8-Hidroksi kinolin inhibisyonuna karşı koruma oranı Zn'ya oranla daha düşük olarak elde edilmiştir.

## TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan divalan iyon çelatörü EDTA'nın serum ALP aktivitesine % 90 inhibisyon etki yaptığı görülmüştür. Bunu da enzimin aktivitesi için gerekli divalan iyonu kendine bağlayarak sağladığı düşünülmektedir. Enzim aktivite ölçümünde, inkübasyon ortamına eklenen Zn iyonlarıyla bu inhibisyonun ortadan kaldırılması da enzimin katalitik aktivitesi için Zn iyonlarına gereksinim olduğu bilgilerini doğrular niteliktedir(8). Mg iyonlarının bu anlamda etkisinin Zn iyonlarına oranla az olması da ALP enziminin Zn gerektiren bir metallo enzim olması özelliğinden ileri gelmektedir.

Benzer etki 8-Hidroksi kinolin ile de gözlenmiştir. Her iki tür inhibisyonda enzim aktivitesinin reaktifte edilmesi Zn iyonlarıyla daha yüksek oranda olmaktadır. Burada iyonların inkübasyon ortamına inhibitör maddelerden önce veya sonra katılmasının sonuç üzerine fazla etkisi olmadığı görülmektedir.

Bu çalışmada enzim kaynağı olarak serum kullanılmasının nedeni laboratuvar koşullarımızın enzim saflaştırma olanaklarına uygun olmamasıydı. Aynı çalışmanın saflaştırılmış ALP preparatlarında tekrarlanması ile daha ileri bilgilerin elde edilebileceği kanısındayız.

## KAYNAKLAR

- 1- Barman TE.:Enzyme Handbook.Springer-Verlag.Newyork, 521-522, 1969.
- 2- Stieber P., Nagel D., Ritzke C., et al.:Significance of bone alkaline phosphatase CA 15-3 and CEA in the detection of bone metastases during the follow-up of patients suffering from breast carcinoma. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 30:12, 809-814, 1992.
- 3- Walach N., Gar Y.:Leukocyte alkaline phosphatase and carcinoembryonic antigen in lung cancer patients.Oncology, 50:4, 279-284, 1993.
- 4- Lavrence AK.:Clinical chemistry, theory, analysis and correlation. The C.V.Mosby Company, Philadelphia, Second edition, 898-901, 1989.
- 5- Hirano K., Matsumato II., Tanaka T., et al.:Specific assays for human alkaline phosphatase isoenzymes.Clin Chem Acta, 166, 265-273, 1987.
- 6- Harris H.:The human alkaline phosphatases, what we know and what we don't know.Clin Chem Acta, 186, 133-150, 1989.
- 7- Oadri F., Shameem GMM.:Isolation and purification of placental type alkaline phosphatase from a seminoma. Clin Chem 33:2, 248-252, 1987.
- 8- Imanishi H., Hada T., Muratani K., et al.:An alkaline phosphatase reacting with both monoclonal antibodies to intestinal and placental isoenzymes. Clin Chem Acta, 186, 309-314, 1989.
- 9- Kowalszky I., Kralovansky J., Jeney A., et al.:Alkaline phosphatase activity in human and rat liver tumors. Oncology, 48:2, 144-148, 1991.
- 10- Scoot T., Eaglesan M.:Concise Encyclopedia Biochemistry, Walter de Gruyter, Berlin, second edition, 190-191, 1988.

- 11- Munson L., Fall RR.:Purification and characterization of Escheria Coli alkaline phosphatase, *Practical biochemistry for colleges*, first edition, 25-27, 1989.
- 12- Tietz NW.:Textbook of clinical chemistry, W.B.Saunders Company. Philadelphia. 1350-1351, 1986.
- 13- Pappas PW.:Activation and inhibition of the brush border membrane-bound alkaline phosphatase activity of *Hymenolepis Diminuta* (Cestoda) by divalent cations, *Parasitology*, 102, 141-145, 1991.
- 14- Bauer JD., Ackermann PG., Toro G.:Clinical laboratory methods. The C.V. Mosby Company St. Louis, 752-754, 1974.