

Süt Çocukluğu Çağında Serum 5'-Nükleotidaz Enzim Aktivitesinin Normal Değerleri ve Süt Çocuğu Hastalıklarının Ayırdedici Tanısındaki Önemi*

Dr. Murat KAÇAR**

Dr. Nurten MERİÇ***

ÖZET

Safra ile itrah edilen ve bu yüzden safra enzimleri adını da alan Alkalen fosfataz ve 5'-Nükleotidaz enzimleri, 50 normal sağlıklı ve 68 hastalıklı bebekte incelendi.

Normal süt çocuklarında, serum 5'-Nükleotidaz enzim düzeyinin ortalama 5.5 İÜ/lit olduğu saptandı.

Hasta grupların (hepato-bilier hastalıklar, sepsis, raşitizm, enfeksiyonlar, serebral travma, fizyolojik ikter) incelenmesinde: Hepatobilier sarılıklı grupta olan hastalarda, intrahepatik ve ekstrahepatik bilier tıkanıklıklarda, 5'-Nükleotidaz enzim aktivitesinin arttığı saptandı. Bu hastalık grubunda Alkalen fosfataz değerleri de anlamlı şekilde yükselmekte idi. Diğer hastalık gruplarından, raşitik çocuklarda Alkalen fosfataz değerleri yüksek olduğu halde, 5'-Nükleotidaz değerleri normal hudutlarda bulundu.

Hepatobilier hastalık geçiren raşitik bir çocukta, serum Alkalen fosfataz düzeyi ölçümüne nazaran, serum 5'-Nükleotidaz enzim aktivitesi ölçümünün çok daha faydalı bilgi verip tanıya yardımcı olabileceği kanısına varıldı.

SUMMARY

NORMAL VALUES OF SERUM 5'-NUCLEOTIDASE ENZYME LEVELS IN INFANCY and ITS IMPORTANCE IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF VARIOUS DISEASES OF INFANCY

In this study normal ranges and diagnostic value of serum 5'-Nucleotidase and Alkaline phosphatase activities has been determined in infancy. Determinations of serum Alkaline phosphatase and 5'-Nucleotidase activities have been carried out in 50 healthy and 68 sick children.

In infants with hepatobiliary diseases serum 5'-Nucleotidase enzyme levels are markedly elevated and are significantly different from other childhood diseases. We confirmed normal values of 5'-Nucleotidase enzyme level 5.5 İÜ/lit in childhood. Serum 5'-Nucleotidase and Alkaline phosphatase levels are raised in hepatobiliary diseases, intra and extra hepatic biliary obstructions.

Çeşitli hastalıkların ayırdedici tanısına yardımcı olmaları yönünden bugün pek

(*) Bu araştırma Ulusal Çocuk Sağlığı Kongresinde (31 Mayıs - 7 Haziran 1980, Kıbrıs) tebliğ edilmiştir.

(**) Bursa Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği Uzmanı

(***) " " " " " " " " Doçenti

çok serum enzim aktivitesi ölçüm metodu bilinmekte ve her geçen gün sayıları artmaktadır¹⁻⁴.

Hücre içi metabolik faaliyetlerin vazgeçilmez aracı olan enzimler, ya hücre içinde lokalize olurlar veya hücre yıkımı sonucu kan dolaşımına geçerler. Büyük miktarlarda karaciğer dokusunda mevcut olan enzimlerin serum aktiviteleri, karaciğer hücresi zedelenmesi sonucu veya bir enzim bağlayıcı proses tarafından bloke edildiklerinde değişikliğe uğrayarak artma veya azalma gösterebilir.

Enzimler nadiren organa spesifiktirler, dolayısıyla serum konsantrasyonlarındaki değişiklikler bir veya daha fazla organın zedelenmesini yansıtabilir.

Nükleoprotein Metabolizması ile ilgili bir enzim olan 5'-Nükleotidaz enzimi ilk defa Ahmet ve Reis⁵ tarafından karaciğer dokusundan izole edilmiş, daha sonra Essner ve Ark.⁶ tarafından yapılan elektron mikroskopu çalışmaları ile bu enzimin karaciğer hücresi plazma membranında ve safra kanalliküllerinde bulunduğu gösterilmiştir.

5'-Nükleotidaz enzimi, Adenosin monofosforik asitin (AMP), riboz molekülündeki 5. Karbon atomuna ester bağı ile bağlı fosfatı hidrolize ederek, bunun fosfat ve adenosin moleküllerine parçalanmasını sağlar⁷.

5'-Nükleotidaz enziminin, yetişkinlerin hepatobiliar hastalıklarında, spinal neoplazmlarda, polikistik böbrek hastalığında, karaciğerin infiltratif lezyonlarında arttığına dair çeşitli yayınlar varsa da^{1,8-13}, çocuklarda özellikle süt çocukluğu çağında çeşitli hastalıklarda artma gösterip göstermediği hususunda araştırmalar çok azdır^{2,6,14}.

Biz süt çocukluğu çağında, normal serum 5'-Nükleotidaz enzim düzeyinin ne olduğunu, süt çocukluğunda bu enzimin hangi hastalıklarda yükseldiğini,

hepatobiliar hastalıklarda ve kemik hastalıklarında diğer bir fosfataz türevi olan Alkalen fosfataz enzimi ile ilişkisini saptamak amacı ile bu çalışmayı yaptık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırma Şubat 1978—Şubat 1979 tarihleri arasında Bursa Üniversitesi Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği ile polikliniğe başvuran olgular arasında rastgele (random sampling) seçilen 0-12 ay arası süt çocuklarında yapıldı. 50 normal, 68 hasta olmak üzere toplam 118 olgu incelendi. Tamamen sağlıklı kontrol grubundaki olguların 29'u erkek, 21'i kız olup yaşları 1 gün-12 ay arasında idi.

Hasta grubundaki 68 olgunun 37'si erkek, 31'i kız olup yaşları 1 gün-13 ay arasında bulunmakta idi. Bu olgular, hepatobiliar hastalıklar, raşitizm, enfeksiyon hastalıkları, neonatal sepsis, serebral travma ve hastalıklar, fizyolojik sarılık olmak üzere ayrıca 6 grupta incelendiler.

Yöntem:

Kontrol ve hasta grubundaki bütün kan örnekleri sabah aç karnına alınıp, 15 dak. pıhtılaşma için bekletildi, 20 dakika 3000 dev/dak. santrifüje edilerek ayrılan serumlar deep-freeze'de saklanıp, daha sonra gruplar halinde çalışıldı.

Serum 5'-Nükleotidaz enzim aktivitesi ölçümü için modifiye Wootton metodu kullanıldı^{15,16} bu testin normal değerleri 1.6—17 İÜ/lt'dir.

Serum alkalen fosfataz ölçümü için kolorimetrik metod kullanıldı¹⁷. Bu metoda göre normal değerler 151-471 İÜ/lt'dir.

BULGULAR

Sağlam çalışma grubunda, serum alkalen fosfataz ve 5'-Nükleotidaz enzim düzeyleri ortalama değerlerinin yaşa göre

analizi Tablo: 1'de gösterilmiştir. Serum alkalin fosfataz değerleri, yenidoğan dönemine nazaran 1-3 aylık dönemde anlamlı düşme göstermektedir ($p < 0.02$). 4-6 ve 7-12 aylık dönemlerde ise yükselmeler görülmüş ve bunlar istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.02$).

Yalnız bu yükselmelerin, 1-3 aylık döneme oranla anlamlı olduğu, yenidoğan ve 1 günlük bebeğin ortalama değerlerine nazaran anlamsız olduğu bu çalışma ile belirlenmiştir. Çalışmamızda, yaşa bağlı gözlenen bu değişikliklere karşın cinse göre dağılımda anlamlı bir farklılık izlenmemiştir.

Sağlam grupta serum 5'-Nükleotidaz enzim düzeylerinde yaşa ve cinse bağlı anlamlı bir değişiklik görülmemiştir ($p > 0.03$).

Araştırma yapılan sağlam ve hasta gruplarında, elde edilen serum Alkalin fosfataz ve 5'-Nükleotidaz enzim aktivasyonlarının istatistik analiz sonuçları Tablo: 2'de görülmektedir. Tablonun tetkikinden anlaşılacağı gibi hepatobilyer hastalıklarda serum alkalin fosfataz ve 5'-Nükleotidaz düzeylerinde kontrol grubuna nazaran anlamlı artış izlenmektedir. Her iki enzimin ortalama değerlerindeki artışlar istatistik olarak anlamlıdır ($p < 0.01$).

Tablo: 2'de görüldüğü gibi Alkalin fosfataz enzimi hepatobilyer hastalıkların yanısıra kemik hastalıklarında anlamlı yükselmeler göstermektedir ($p < 0.01$).

Serum 5'-Nükleotidaz enzim düzeyi hepatobilyer hastalıklarda anlamlı bir yükselme göstermesine karşın kemik hastalıkları grubunda anlamlı bir artış göstermemektedir.

Hepatobilyer hastalıklar grubunda, her iki enzim aktivitesi ortalama değerleri arasında oldukça kuvvetli pozitif bir ilişki görülmüştür ($r: 0,6194$).

Enfeksiyon hastalıkları, neonatal sep-

Yaş Değişebilirlik Sınırı	Ortalama (x)	Olgu Sayısı (n)	Alkalin Fosfataz			5' - Nükleotidaz			
			Standart Sapma (SD)	Standart Hata (SE)	Ortalama (x)	Standart Sapma (SD)	Standart Hata (SE)	p	
Yenidoğan	-	10	154	± 49	220	5,8	2,5	± 0,8	> 0,05
1 Günlük	-	10	292	± 92	215	4,8	2,5	± 0,8	> 0,05
1-3 ay	1,6 ay	10	39	± 12	140	5,1	1,8	± 0,6	> 0,05
4-6 ay	4,9 ay	10	61	± 19	201	5,8	2,24	± 0,7	> 0,05
7-12 ay	10,1 ay	10	75	± 24	281	6,0	1,5	± 0,5	> 0,05

Tablo: 1 - Sağlam Grupta Serum Alkalin Fosfataz ve 5' - Nükleotidaz Ortalama Değerlerinin Yaşa Göre Analizi

(İstatistik Analiz, Alkalin fosfataz)

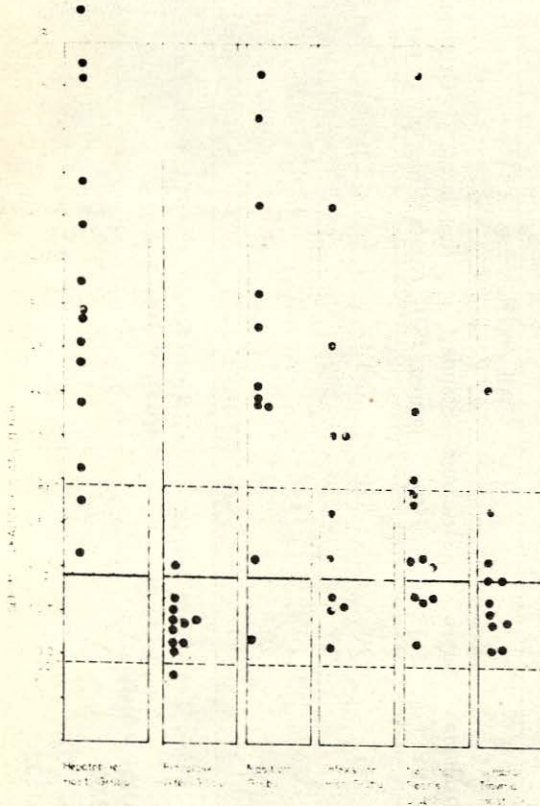
1-3 ay/4-6 ay $p < 0.02$

1-3 ay/7-12 ay $p < 0.001$

4-6 ay/7-12 ay $p < 0.02$

sis, serebral hastalık ve travma, fizyolojik sarılık gruplarında, elde edilen Alkalen fosfataz ve 5'-Nükleotidaz enzim aktivasyonu ortalama değerlerinin sağlam grup değerlerine karşın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p > 0.01$).

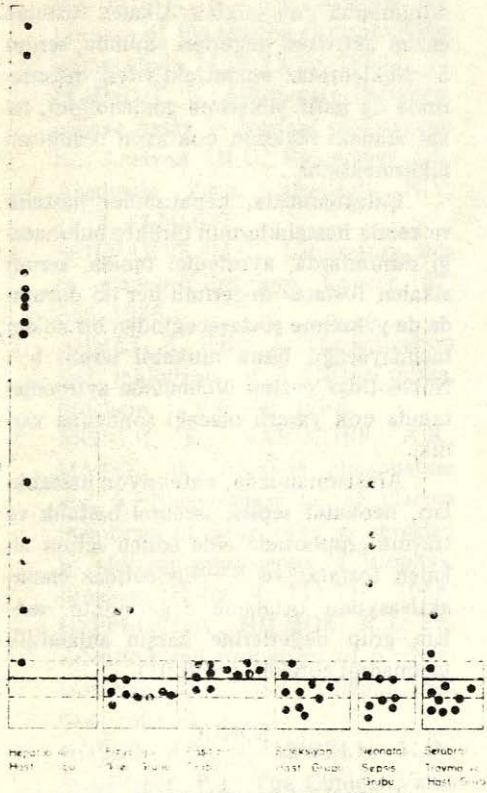
Şekil 1 ve 2'de ise Alkalen fosfataz ve 5'-Nükleotidaz enzim düzeylerinin ortalama ve standart sapma hudutları gözönüne alınarak dağılımları grafik şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 1—Hastalık Gruplarına Göre Serum Alkalen Fosfataz Enzim Düzeyinin Ortalama ve Standart Sapma Hudutları Gözönüne Alınarak Dağılımları.

Grup	Alkalen Fosfataz (İ.Ü. / lt.)			5' - Nükleotidaz (İ.Ü./lt.)		
	Olgu Sayısı	Ortalama	Standart	Ortalama	Standart	p
Sağlam kontrol grubu	50	193	± 14	5.6	± 0.3	—
Hepato-bilier hastalıklar grubu	13	527	± 72	42.6	± 6.8	$p < 0.01$
Fizyolojik İktet Grubu	11	140	± 9	5.8	± 1.1	$p > 0.01$
Kemik Hastalıkları Grubu	11	464	± 64	6.2	± 0.3	$p > 0.01$
Enfeksiyon Hast. Grubu	10	285	± 48	4.4	± 0.5	$p > 0.01$
Neonatal Sepsis Grubu	12	283	± 57	10.0	± 2.7	$p > 0.01$
Serebral travma ve Hast. Grubu	11	195	± 25	5.2	± 1.0	$p > 0.01$

Tablo: 2—Araştırmaya Girenlerde Serum Alkalen Fosfataz ve 5'-Nükleotidaz Aktivitesi Değerlerinde Gözlenen Değişikliklerin Analizi.



Şekil: 2— Hastalık Gruplarına Göre Serum 5'— Nükleotidaz Enzim Düzeyinin Ortalama ve Standart Sapma Hudutları Gözönüne Alınarak Dağılımları.

TARTIŞMA

A— Sağlam Kontrol Grubu Süt Çocuğu Olgularından Elde Edilen Sonuçların İrdelenmesi:

Çalışmamıza dahil edilen olgularda serum alkalin fosfataz enzim aktivitesi ortalama değerleri 193 İÜ/lit bulunmuştur.

Yenidoğan döneminde serum alkalin fosfataz enzim düzeyinin, gebeliğin son evresinde plasentadan gelen maternal alkalin fosfatazın fetal dolaşıma geçmesi ile iki katı değere ulaştığı Mc Master⁷ ve Birkett'in⁸ yapmış olduğu çalışmalarda gösterilmiştir.

Yeung¹³, osteoblastik aktivitenin artmış olduğu süratli büyüme dönemlerinde, serum alkalin fosfataz düzeylerinde geçici bir artış olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, bu bulgulara paralellik göstermektedir. Yenidoğan ve 1 günlük bebek döneminde yüksek olan alkalin fosfataz ortalama değerlerinin, 1-3 aylık dönemde belirgin şekilde düştüğünü, 4-6 ve 7-12 aylık gibi osteoblastik aktivitenin başladığı dönemlerde ise giderek yükselme gösterdiğini saptadık. Bu yükselmelerin 1-3 aylık döneme oranla anlamlı olduğu, fakat yenidoğan ve 1 günlük bebeğin ortalama değerine nazaran anlamsız olduğu sonucuna vardık.

Çalışmamızda yaşa bağlı gözlediğimiz değişikliklere karşın, cinse bağlı anlamlı farklılıklar gözlenmemesi, çeşitli araştırmaların bulgularına uyum göstermektedir^{8,20,21}.

Serum 5'—Nükleotidaz enzim aktivitesi ortalama değeri, çalışmamızda 5.5 İÜ/lit bulundu. Bu enzimin serum değerlerinde, yaşa bağlı anlamlı bir değişiklik saptandı. Belfield ve Goldberg de^{19,21} yapmış oldukları iki ayrı araştırmada, 5'—Nükleotidaz serum düzeylerinde yaş ve cinse bağlı farklılık görmediklerini bildirmişlerdir.

B— Hasta Gruplarında Elde Edilen Sonuçların İrdelenmesi:

Hepatobiliyer hastalıklar grubunda, serum alkalin fosfataz ve 5'—Nükleotidaz enzim aktivitesi düzeylerinde anlamlı artış izlendi.

Her iki enzim aktivitesi ortalama değerlerindeki artışlar oldukça kuvvetli pozitif bir ilişkiyi göstermektedir (r: 0,6194).

Araştırmaların büyük bir kısmı, hepatobiliyer hastalıklarındaki 5'—Nükleotidaz değerlerindeki yükselmenin, Alkalin fosfataz değerlerindeki yükselmelere nazaran ayırdedici tanıda daha değerli bir test ol-

duğunu vurgulamakta iseler de^{8.10.21-24} bir grup araştırmacı bu üstünlüğü kabul etmemektedir^{13.25}.

Bir grup araştırmacı, tıkayıcı tipte yeni doğan ve süt çocuğu hepatobilyer hastalıkları ile hepatosellüler zedelenme ile seyreden hepatobilyer hastalıkların ayırdedici tanısında, serum 5'-Nükleotidaz enzim aktivitesi ölçümünün, serum alkalen fosfataz, alfa-fetoprotein, leucin aminopeptidase aranması gibi testlere oranla daha hassas olduğunu vurgulamakta ise de^{8.9.14.26.27} çalışmamızda tıkayıcı tipte sarılıklı olgular anlamlı bir sayıya ulaşmadığından bu konuda halen kesin bir yorum yapacak sonuca varmış değiliz.

Fizyolojik sarılık grubunda, serum alkalen fosfataz düzeyi, kontrol grubuna nazaran anlamlı bir artış göstermiştir ($p < 0.01$).

Belfield ve Goldberg¹⁹, fizyolojik iktet döneminde serum alkalen fosfataz düzeylerinde bu geçici artışı, karaciğerdeki enzimatik aktivasyonun başlamasındaki gecikme ile izah etmektedirler. Karaciğerde bulunan sitoplazmik akseptör proteinlerden Z proteini, fetal hayatta gelişmesini tamamladığı halde Y proteini, doğumda hiç bulunmamakta, ancak hayatın 2.ci haftasında normal değerlerine ulaşmaktadır¹⁴.

Çalışmamızda, fizyolojik sarılık grubunda serum 5'-Nükleotidaz düzeyinde bir değişme saptamadık. Kemik hastalıkları grubunda 5'-Nükleotidaz düzeyleri normal kalırken serum alkalen fosfataz aktivitesi ortalama değerlerinde anlamlı bir artış olduğunu saptadık ($p < 0.01$).

Organizmada, hepatobilyer sistem ve kemik dokusunun yanısıra bağırsak, plaseenta ve böbreklerin de Alkalen fosfataz enzimi ihtiva ettiği bilinmektedir^{27.28}.

Van der Slik ve ark.¹¹ çalışmalarında raşitizm, Pott, kırıklar ve çabuk büyüme gibi osteoblastik aktivasyonun hızlandığı

durumlarda çok yüksek Alkalen fosfataz enzim aktivitesi değerleri yanında, serum 5'-Nükleotidaz enzim aktivitesi değerlerinde de hafif yükselme gözlemlendiğini, fakat aradaki ilişkinin çok zayıf olduğunu bildirmektedir.

Çalışmamızda, hepatobilyer hastalık ve kemik hastalıklarının birlikte bulunacağı durumlarda, ayırdedici tanıda, serum alkalen fosfataz değerinin her iki durumda da yükselme göstereceğinden bir anlam taşımayacağı, buna mukabil serum 5'-Nükleotidaz enzimi ölçümünün ayırdedici tanıda çok yararlı olacağı sonucuna vardık.

Araştırmamızda, enfeksiyon hastalıkları, neonatal sepsis, serebral hastalık ve travma gruplarında elde edilen serum alkalen fosfataz ve 5'-Nükleotidaz enzim aktivasyonu ortalama değerlerinin, sağlam grup değerlerine karşın anlamlılık taşımadığı görüldü ($p > 0.01$).

SONUÇ

Normal süt çocukluğunda, serum 5'-Nükleotidaz enzim düzeyini ortalama 5.5 İÜ/lt olduğu saptandı.

Hepatobilyer hastalık geçiren raşitizm bir çocukta serum alkalen fosfataz düzeyi ölçümüne nazaran serum 5'-Nükleotidaz enzim aktivitesi ölçümünün tanıda daha faydalı olacağı sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. KIM, K. NOE, WALID, G.Y., ETHER, F.F., ANNE, I.G., ATHANASIOS, T.: Value of Alkaline phosphatase., 5'-Nükleotidase, γ - Glutamil transferase and glutamate dehydrogenase activity measurements (single and combined) in serum in diagnosis of metastasis to the liver. Clin. Chem. 23, 2: 2034-2037, 1977.

2. RICHTERIC, R.: The diagnostic significans of the plazma enzymes, Ciba Symposium, 12, 3: 12-15, 1964.
3. SCHMIDT, E.: Glutamate Dehydrogenase Assay in Method of Enzymatic Analysis (H.U. Bergmeyer ed). Academic Press, Newyork. N.Y. 1973, p.650-657.
4. SCHWARTZ, M.K.: Laboratory aids to diagnosis-Enzymes. Cancer, 37: 542, 1976.
5. AHMET, Z., REIS, J.: The activation and inhibition of 5'-Nücleotidase, Biochem. J., 69: 386, 1958.
6. ESSNER, E., NAVIKOFF, A.B., MASEK, B.: Alkaline phosphatase and 5'-Nücleotidase in the plazma membran of liver cells as revealed by electron microscopy, J. Biophys. Biochem. Cytol. 4: 711-716, 1958.
7. HEPPEL, L.A., HILMOE, R.J.: Purification and properties of 5'-Nücleotidase, Jour, Biol., Chem., 188: 665, 1951.
8. HOBBS, J.R., CAMPBELL, M.D., SCHEUER, P.J.: The Clinical Value of Serum 5'-Nücleotidase Assay. 6 th. Inter. Cong. Clin. Chem. Munich, 1966, vol. 2, Clinical Enzymology, Karger, Basen/Newyork, 1968, p. 106-107.
9. BOONE, D., ROUTH, J., SCH-RANTZ, R.: γ - Glutamyl transpeptidase and 5'-Nücleotidase-comparision as diagnostics for hepatic disease, Amer., J. Clin. Patho. 61: 1321, 1974.
10. KOWLESSAR, O.D., HAEFFNER, I. J., RILEY, E.M., SLEIZENGER, M. H.: Comparative study of serum leucine aminopeptidase, 5'-Nücleotidase and nonspecific alkaline phosphatase in effecting the pancreas, hepatobilier tree and hone disease, Amer. J. Med. 31: 231-237, 1961.
11. PERSIJN, J.P., VAN DER SLIK, TIMLER, C.J., BON, A.W.M.: A new method for the determination of serum 5'-Nücleotidase: A simplified procedure, Z. Clin. Chem. Biochem., 7: 199, 1969.
12. SCHWARTZ, M.K., BODANSKY, O.: Serum 5'-Nücleotidase in patients with cancer, 18: 891, 1965.
13. YEUNG, C.Y.: Serum 5'-Nücleotidase in neonatal hepatitis and bilier atresia: Premiliminary observations, Pediatrics, 50, 5: 812-816, Nov. 1976.
14. DEREN, J.J., WILLIAMS, I.A., MUENCH, H., CHALMERS, T., ZAMCHENCK, N.: Comparative study of four methods of determining alkaline phosphatase, New. End. Med. Jour. 270: 1277, 1964.
15. LYNCH, M., RAPHAEL, S., MELLER, L., SPARE, P., INWOOD, M.: Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology, (Second edition). W.B. Saunders Comp., 1969, p. 314-337.
16. ÖZKAN, K., TÜRKVAN, M.: Klinik Biokimya, Bursa Üniv. Tıp Fak. Yayınları, Bursa Üniv. Basımevi, No: 2, 1977, s. 344-46.
17. MC MASTER, Y., TENNET, R., CLUBB, J.S., NEALE, F.C., POSEN, S.: The mechanism of the elevation of serum alkaline phosphatase in pregnancy, J. Obstet. Gynecol. Bri. Emp. 71: 735, 1964.
18. BIRKETT, D.J., DONE, J., NEALE, F.C., POSEN, S.: Serum alkaline phosphatase in pregnancy: An Immunological Study, Bri. Med. Jour. 1: 1210, 1966.
19. BELFIELD, A., GOLDBERG, M.D.: Normal ranges and diagnostic value of serum 5'-Nücleotidase and Alkaline phosphatase activities in infancy, Arch. of Childhood, 48: 842, 1971.

20. HILL, P.G., SAMMONDS, H.G.: An assesment of 5'-Nücleotidase as a liver function test, *Quart. J. Med.* 36: 457, 1967.
21. BELFIELD, A., GOLDBERG, M.D.: Application of the continous spectrophotometric assay for 5'-Nücleotidase activity in normal subjects and patients with and bone disease, *Clin. Chem.* 15, 10: 931-339, 1969.
22. THALER, M.M., GELLIS, S.S.: Studies in neonatal hepatitis and bilier atresis, I. —Long term prognosis of neonatal hepatitis, *Amer. J. Dis. Child.* 116: 257-261, 1968.
23. YOUNG, I.I.: Serum 5'-Nücleotidase: Characterization and evaluation in diseases states. *Ann. Newyork, Acad. Science.*, 75: 357, 1958.
24. ZIMMERMANN, J.C.: Symposium on diseases of liver, *Med. Clin. of North Ame.* 59, 4: 1015-1017, 1975.
25. CHIANDUSSI, L., GREENE, S.F., SHERLOCK, S.: Serum alkaline phosphatase fractions in hepatobiliary and bone diseases, *Clin. Sci.* 22: 425, 1962.
26. POSEN, S.: Alkaline phosphatase, *Ann. Int. Med.* 67: 183, 1967.
27. BOYER, S.: Alkaline phosphatase in human sera and placentae, *Science*, 134: 1002, 1961.
28. Test Combination Alkaline Phosphatase Opt. Colorimetric method Boehringer-Mannheim, katalog. No: 123862.