

Siroz Hastalarında Alkalen Fosfataz İzoenzimlerinin Farklı Yöntemlerle Belirlenmesi

Assignment of Alkaline Phosphatase Isoenzymes in Cirrhosis Patients By Different Methods

Serhat Akça****

Kenan Çelik***
Hakan Alagöz**

Hüseyin Aydın***
Abdülkerim Yılmaz**

Gürsel Yıldız*

* Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nefroloji, Sivas

** Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji, Sivas

*** Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya, Sivas

**** Sivas Numune Hastanesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya, Sivas

ÖZET

Amaç: Alkalen fosfatazlar (ALP) tanımlanmış pek çok işleve sahip glikoprotein yapıda metalofosfatazlardır ALP, kemik, karaciğer, bağırsak ve plasenta gibi dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve bu dokulara ait patolojilerde serum düzeyleri artar. ALP artışının hangi dokudan kaynaklandığının anlaşılması için ALP spesifik doku izoenzimlerinin belirlenmesi gerekir. Sağlıklı insanlarda plazma ALP'sini kemik ve karaciğer izoenzimleri oluşturur. Bu çalışmada ALP düzeyi yüksek olabilen siroz hastalarında, ALP izoenzim ve düzeylerinin belirlenmesinde ısı inaktivasyonu ve agaroz jel elektroforez yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: 50 kontrol ve 50 siroz hastası olmak üzere 100 bireyin serum örneklerinde agaroz jel elektroforezi yöntemi ile elde edilen ALP karaciğer izoenzimi (Jel LALP) ile ısı inaktivasyonu yöntemi ile elde edilen ALP karaciğer izoenzimi (Isı LALP) değerleri, U/L ve toplam ALP'in yüzde aktivitesi olarak karşılaştırıldı.

Bulgular: Isı LALP kontrol grubunda; 25.08 ± 7.75 U/L, hasta grubunda; 37.00 ± 14.58 U/L idi. Jel LALP kontrol grubunda; 39.24 ± 15.67 U/L, hasta grubunda ise; 51.83 ± 21.18 U/L idi. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) idi. Isı LALP yüzde aktivite olarak, kontrol grubu için; 38.93 ± 7.83 , hasta grubu için 40.56 ± 9.38 idi. Jel LALP yüzde aktivite olarak, kontrol grubunda; 59.81 ± 14.20 , hasta grubunda; 58.19 ± 16.80 idi. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$).

Sonuç: Serum ALP izoenzimlerin belirlenmesinde 56°C 'de 10 dakika uygulanan ısı inaktivasyonu yöntemi agaroz jel elektroforezine göre duyarlı değildir.

Anahtar Sözcükler: Alkalen fosfataz, siroz, izoenzim, agaroz jel elektroforezi, ısı inaktivasyonu

ABSTRACT

Objective: Alkaline phosphatases are glycoprotein structured metalophosphatases with several defined functions. The high concentrations of ALP are found in bone, liver, intestine, and the placenta and

ALP serum levels increases in the pathology of these tissues. To understand which tissue caused the ALP increase specific tissue isoenzymes of ALP must be defined. Plasma total ALP consists isoenzymes of bone and liver in healthy people. The aim of this study was; to compare the heat inactivation and agarose gel electrophoresis methods in cirrhosis patients.

Materials and Methods: Values of ALP liver isoenzyme obtained by Agarose gel electrophoresis method (Gel LALP) and heat inactivation method (Heat LALP) were compared with each other either as U/L value or as a percentage of total ALP value in 50 control cases and 50 cirrhosis patients, and the results were evaluated.

Results: Heat LALP values (U/L) were 25.08±7.75 for control group, 37.00±14.58 for patient group. Gel LALP values were 39.24±15.67 for control group, 51.83±21.18 for patient group. Difference between mean values were found to be statistically significant (p<0.05). Heat LALP values (percentage for activity) were 38.93±7.83 for control group, 40.56±9.38 for patient group. Gel LALP values were 59.81±14.20 for control group, 58.19±16.80 for patient group. Difference between mean values were found to be statistically significant (p<0.05).

Conclusion: As a result, heat inactivation method performed at 56°C' for 10 minutes was found not to be sensitive enough in determination of isoenzymes than agarose gel electrophoresis method.

Key Words: Alkaline phosphatase, cirrhosis, isoenzymes, agarose gel electrophoresis, heat inactivation

GİRİŞ

Kronik karaciğer hastalıkları, hepatosellüler hasar ile karakterize olup, genellikle karaciğer fibrozu ve karaciğer sirozu ile sonuçlanmaktadır. Karaciğer sirozu dünyanın pek çok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Hastalığın nedeni özellikle Batı Avrupa ve Kuzey Amerika' da daha çok alkolik hepatit iken ülkemizde viral hepatitlerdir ve bunu biliyer nedenler izlemektedir (1-3). Siroz, etiyojisi ne olursa olsun prekanseröz bir lezyondur. Sirozlu hastalarda yıllık hepatosellüler karsinoma (HCC) gelişme insidansı %3.4'tür (4,5). HCC karaciğerin en sık görülen primer malign tümördür. Prevelansı 4/100.000'dir (6). Semptomatik HCC'da 5 yıllık sağkalım %0-10 iken, rezeksiyon veya karaciğer transplantasyonu yapılan grupta bu oran %50'ye yükselmektedir. Bu nedenle erken evrede hastalığı yakalamak çok önemlidir (7). Enzimlerin tümör belirteci olarak kullanımı onkofetal antijenlerin bulunması ve monoklonal antikörlerin ortaya çıkışından öncedir. Artmış enzim düzeyleri malignite konusunda uyarı olabilir. Enzimlerin izoenzimleri ek bir organ özgüllüğü sağlayabilir.

ALP alkali ortamda farklı türlerdeki fosfat esterlerinin hidrolizini katalizleyen glikozil-

fosfotidilinozitol ile hücre membranına bağlı glikoprotein özellikli bir enzimdir. ALP'yi magnezyum, kobalt ve mangan gibi iyonlar aktive ederken kalsiyum ve inorganik fosfat inhibe eder, çinko ise yapısal rol oynar. ALP'nin başlıca kaynakları; osteoblastlar, hepatositlerin kanaliküler yüzü, biliyer epitelin lümenine bakan yüzü, ince barsakların fırçamsı kenarı, böbrekte proksimal tubulus, plasenta ve lökositlerdir. Normal şartlarda insan serumu dört farklı kaynaktan ALP izoenzimi içermektedir. Bunlar; kemik, karaciğer, ince barsak ve gebelikte plasenta dokularıdır. İzoenzimleri arasındaki farkı, yapısında değişik oranda bulunan siyalik asit oluşturur ayrıca plasental izoenzimin protein miktarı da farklıdır (8,9).

ALP düzeyleri birçok karaciğer hastalığında yükselmekle birlikte en sık safra akımının engellendiği intra ve ekstrahepatik kolestazda veya primer metastatik karaciğer tümörlerinde yükselmektedir ayrıca primer karaciğer kanserlerinde, granüloamatöz hepatitlerde ve infeksiyöz mononükleoz gibi hastalıklarda da yüksek bulunur (10,11). Serum ALP konsantrasyonu artışının hangi dokuya ait izoenzime bağlı olduğunun belirlenmesi son derece önemlidir. Bu amaçla ALP spesifik doku izoenzimlerinin ölçülmesi gerek-

lidir. ALP izoenzimlerinin ayrımında, elektroforetik güçlerindeki farklılıklar, sıcaklık veya üre ile denatürasyona dayanıklılık farkları, seçilmiş inhibitörlere yanıt farklılıkları, çeşitli substratlarla reaksiyon hızlarındaki farklılıklar ve immünokimyasal karakteristik farklılıklarına dayanan yöntemler kullanılır.

Karaciğer, kemik, bağırsak ve plasental kökenli ALP'nin ayrımında agaroz jel elektroforezi ve poliakrilamid jel elektroforezi en güvenilir yöntemlerdir. Plasental ALP ve bazı kanserlerde görülen germ hücresi ALP izoenzimleri 65°C sıcaklıkta stabildir. Bağırsak, kemik, karaciğer ve böbrek ALP 65°C ısıda inaktif olur (11,12,13). Bu çalışmada; ALP izoenzim ayrımında kullanılan ve güvenilirliği kanıtlanmış olan agaroz jel elektroforezi yöntemi ve rutin kullanım için uygun, maliyeti düşük ısı inaktivasyonu yöntemi ile siroz hastalarında total ALP ve izoenzimlerinin belirlenmesi ve iki yöntem arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmaya Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Gastroenteroloji Ana Bilim Dalına başvuran ve karaciğer sirozu tanısı alan, 50 siroz hastası ve kontrol grubu olarak herhangi bir kronik hastalık tanısı olmayan 50 sağlıklı birey alındı. Hastalara cinsiyet ve yaş yönünden bir kısıtlama getirilmedi. Çalışma için Tıp Fakültemizin İnsan Araştırmaları Etik Komitesinden 02.10.2007 tarih ve 2007-8/5 sayılı etik kurul olur kararı alındı.

Kan Örneklerinin Alınması

Karaciğer sirozu tanısı konulmuş hastalardan ve kontrol grubundan sabah aç karnına 10 ml kan örneği kuru tüplere alındı ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjasyona tabi tutularak serumları ayrıştırıldı ve 2-6°C'de saklandı. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan her bir jel 12 örnek kapasiteli olduğu için, serumlar 11 adet olana kadar muhafaza edildi. Her jelde ilk sıra için standart

serum uygulandı. Çalışmamızda bu süre bir haftayı geçmedi.

Total ALP Analizi

Çalışmamızda total ALP düzeyleri "Beckman Coulter Synchron LX-20" otoanalizörü kullanılarak ölçüldü. Substrat olarak p-nitrofenil fosfat ve pH 10.5 devamlılığının sağlanması için 2-amino-2- metil-1- propanol (AMP) tamponu kullanılan Bowers- Mc Comb'un prensibi yöntem olarak kullanıldı.

Isı İnaktivasyonu

Total ALP ölçümleri yapıldıktan sonra termostatlı su banyosunda her örnek 56°C'de 10 dakika ve 65°C'de 30 dakika ısıya tabi tutulmak üzere hazırlandı. İki ayrı sıcaklıkta çalışılacağı için örnekler 2'şer adet hazırlandı. İlk örnekler ısı kontrolü olan ve ısı 56°C'ye getirilen su banyosunda 10 dakika bekletildi sonra buzlu suya konularak Beckman Coulter Synchron LX-20 otoanalizöründe ALP ölçümü yapıldı. İkinci örnekler 65°C'de 30 dakika bekletildi ve sonra buzlu suya konularak otoanalizörde ALP ölçümü yapıldı. Sonuçlar kalan aktivite olarak kaydedildi.

Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi ticari ALP izoenzim kiti kullanılarak Helena SAS-1 ve SAS-2 elektroforez cihazında yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) programı, 13.0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Kontrol ve hasta grubunda ısı inaktivasyonu ve agaroz jel elektroforez yöntemleri ile elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde bağımlı gruplarda eşler arası farkın önemlilik testi olan Paired Sample T testi uygulandı ve yanılma düzeyi = 0.05 olarak alındı.

BULGULAR

Kontrol grubunun 28'i (%56) erkek, 22'si (%44) kadın, hasta grubunun 20'si (%40) erkek,

30'u (%60) kadın idi. Hasta ve kontrol gruplarının yaş orta lamaları sırasıyla 62.3±8.58 yıl ve 42.0±12.66 yıl idi.

Agaroz jel elektroforezi ile belirlenen karaciğer bandı; jel LALP olarak, ısı inaktivasyonu sonucu kalan ALP aktivitesi; ısı LALP olarak adlandırıldı. Toplam ALP değeri kontrol grubunda; 64.98±17.70 U/L, hasta grubunda ise; 95.60±34.36 U/L saptandı. Kontrol grubunda 56 oC ısı LALP değeri; 25.08 ±7.75 U/L, hasta grubunda ise; 37.00±14.58 U/L idi. Kontrol grubunda 56°C ısı kemik ALP değeri; 39.90±12.68 U/L, hasta grubunda ise; 55.59±25.67 U/L idi. Jel LALP değeri kontrol grubunda; 39.24±15.67 U/L, hasta grubunda ise; 51.83±21.18 U/L olarak saptandı. Jel kemik ALP değeri kontrol grubunda; 25.74 ±10.92 U/L, 39.46±27.87 U/L saptandı. Yüzde aktivite olarak (%) 56°C ısı LALP değeri kontrol grubu için; 38.94±7.83, hasta grubu için; 40.56±9.38 idi. Yüzde aktivite olarak (%) Jel LALP değeri kontrol grubu için; 59.82±14.20, hasta grubu için; 58.19±16.80 idi. Sadece hasta grubunda saptanabilen jel bağırsak ALP değeri; 1.30±4.23 U/L ve hasta grubundan sadece 5 bireyde saptanabilen 65°C derece ısıya dayanıklı izoenzim ALP değeri ortalaması 0.15±0.42 U/L olarak saptandı (Tablo 1).

Kontrol ve hasta gruplarında, 56°C ısı LALP ile agaroz jel LALP değerleri U/L olarak ve toplam ALP'nin yüzdesi şeklinde yüzde aktivite olarak karşılaştırıldığında her iki durum-

da da hasta grubunda daha yüksek saptandı ve bu farklılık istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı idi (söylenen sırayla p=0.00, p=0.00) (Tablo 2, 3).

Kontrol ve hasta grubunda 56°C ısı LALP ile jel LALP değerlerinin doğrusal regresyon analizi sonucu güvenilirlik (R2) sırasıyla % 67 ve % 69 olarak saptandı (Grafik 1, 2).

Jel LALP değerinin bireylerin gerçek LALP'ını gösterdiğinden yola çıkarak, bu değerden ısı LALP ve jel bağırsak izoenzim değerlerinin çıkarılması ile elde edilen sonuç total ALP'nin yüzdesi olarak saptandı ve ısı ile inaktif olan LALP olarak adlandırıldı. Buna göre hasta

Tablo 2. Kontrol ve hasta gruplarında, ısı LALP ile agaroz jel LALP değerlerinin (U/L) karşılaştırılması.

Gruplar	Isı LALP (U/L) $\bar{X} \pm SD$	Jel LALP (U/L) $\bar{X} \pm SD$	p değeri*
Hasta	37.00 ± 14.58	51.83 ± 21.18	p=0.001
Kontrol	25.08 ± 7.75	39.24 ± 15.67	p=0.001

*Paired Samples T Testi

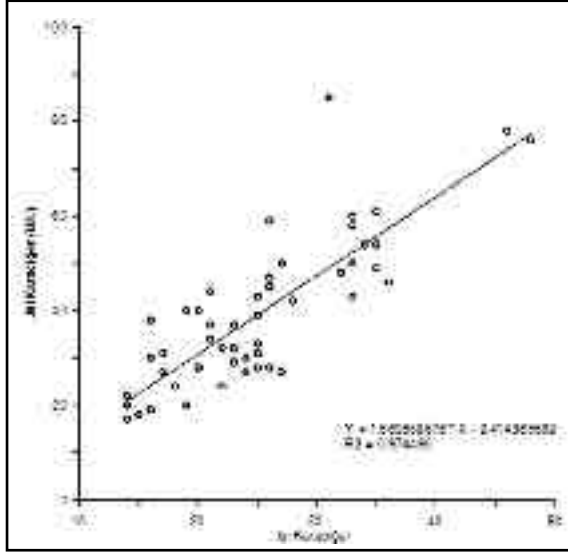
Tablo 3. Kontrol ve hasta gruplarında, ısı LALP ile agaroz jel LALP yüzde aktivite değerlerinin karşılaştırılması.

Gruplar	Isı LALP (U/L) $\bar{X} \pm SD$	Jel LALP (U/L) $\bar{X} \pm SD$	p değeri*
Hasta	40.56 ± 9.38	58.19 ± 16.80	p=0.001
Kontrol	38.93 ± 7.83	59.81 ± 14.20	p=0.001

*Paired Samples T Testi

Tablo 1. Hasta ve kontrol gruplarının laboratuvar verileri.

Parametre	Kontrol grubu (n=50) $\bar{X} \pm SD$	Hasta grubu (n=50) $\bar{X} \pm SD$
Total ALP. (U/L)	64.98 ± 17.69	95.59 ± 34.36
56°C ısı LALP. (U/L)	25.08 ± 7.75	37.00 ± 14.58
56°C ısı Kemik izoenzim. (U/L)	39.90 ± 12.68	55.59 ± 25.67
Jel LALP. (U/L)	39.24 ± 15.67	51.83 ± 21.18
Jel Kemik izoenzim. (U/L)	25.74 ± 10.92	39.46 ± 27.87
JEL Bağırsak izoenzim. (U/L)	0.00 ± 0.000	1.30 ± 4.23
65°C ısı varyant izoenzim. (U/L)	0.00 ± 0.000	0.15 ± 0.42
Jel LALP. (% aktivite)	59.82 ± 14.20	58.19 ± 16.80
56°C ısı LALP. (% aktivite)	38.94 ± 7.83	40.56 ± 9.38



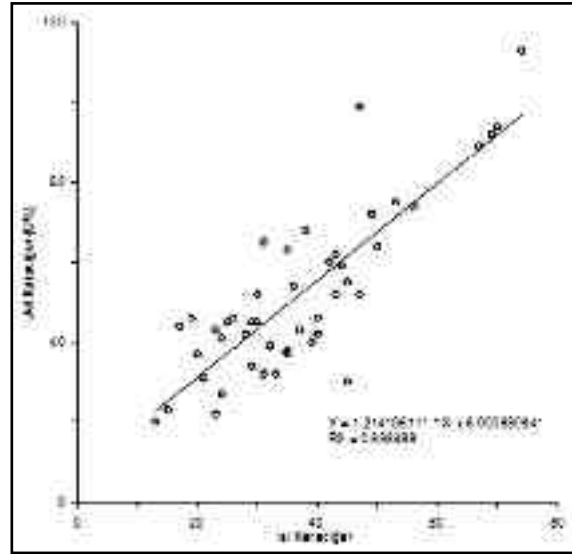
Grafik 1. Kontrol grubunda verilerin doğrusal regresyon analizi.

Jel Karaciğer: Jel LALP. Isı Karaciğer: Isı LALP. R2: güvenilirlik

grubunda ısı ile LALP' nin inaktif olma oranı %10 ile %30 arasında, kontrol grubunda ise bu oran %30 ile %40 arasında dağılım gösterdi.

TARTIŞMA

ALP kısmen genetik faktörler kısmen ile de post-translasyonel modifikasyonlardan dolayı dolaşımında çeşitli izoenzim formlarında bulunurlar. Sağlıklı insanlarda plazma ALP'sini kemik ve karaciğer izoenzimleri oluşturur. Bu nedenle serum ALP ölçümlerinin kemik ve karaciğer hastalıklarında tanısal değeri fazladır. Bu dokulardaki patolojilerde serum ALP değeri kemik ya da karaciğer izoenzimi-ne bağlı olarak yükselir. Toplam ALP değerinin artması aktivitenin yükselmesine neden olan izoenzim ya da izoenzimlerin belirlenmesini gerektirir (8,11). ALP izoenzimlerini belirlemek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar; elektroforez, kolon kromatografisi, HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi), immünoassay, üre denatürasyonu, aminoasit inhibisyonu ve ısı inaktivasyonu yöntemleridir (14). Karaciğer hastalıklarında klinik ve laboratuvar bulguları birçok durumda korelasyon göstermeyebilmektedir. Tek bir biyokimyasal test sonucuna bakılarak kara-



Grafik 2. Hasta grubunda verilerin doğrusal regresyon analizi.

Jel Karaciğer: Jel LALP. Isı Karaciğer: Isı LALP. R2: güvenilirlik

ciğer fonksiyonları hakkında genel bir değerlendirme yapmak güçtür. Günümüzde sayıları her geçen gün artan, özgün olmayan pahalı ve invaziv laboratuvar yöntemlerinin bilinçsiz kullanımları ile tanısal sorunlar daha da artmaktadır. Gelişmiş ülkelerde bile birçok yöntemin bilinçsizce denemesi yerine bazı pratik ve ekonomik yöntemlerin iyi yorumlanmaları önerilmektedir.

Total ALP aktivitesinin yüksek ya da düşük olması vücuttaki bir patolojinin tek belirtisi olabilmektedir. Ancak bu aktivitenin sorumlusu olan izoenzimlerin yüzdeleri ve hangi dokudan kaynaklandığı hakkında bilgi edinilemez ise tanıda bu farklılık fayda sağlamaz. Bazen de total ALP aktivitesi normal aralıklarda olmasına rağmen bir organ veya dokudaki izoenzim anormalliğinden dolayı izoenzimlerin oranı değişebilir. Bu yüzden patolojik durumların teşhis edilmesinde total ALP ölçümü yeterli olmaz. Total ALP'nin yüksek olduğu durumlarda ya da klinik semptomlar gereği izoenzim analizi çok yararlı olacaktır. Çalışmamızda hem ısı inaktivasyonu hem de agaroz jel yöntemiyle bakılan, total ALP ve LALP hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek saptanmıştır. Ayrıca kontrol grubunda saptanamayan ve bir dizi malignitede

yüksek düzeylerde saptanabilen ısı varyant izoenzim, 65°C ısı inaktivasyon yöntemiyle ve sirozda yüksek düzeylerde saptanabilen bağırsak izoenzimi, agaroz jel yöntemiyle hasta grubunda saptanmıştır. Posen ve arkadaşları farklı hasta gruplarının serumlarında ALP'nin sıcaklık inaktivasyon oranlarındaki farkları tanımlamışlardır. Bu çalışmada kemik hastalığı olan bireylerin serum ALP'sinin hepatobiliyer hastalıkları olanlardan daha fazla inaktive olduğunu göstermişlerdir. Sonraki yıllarda bu yöntem birçok laboratuvarında ALP izoenzimlerinin ayırımında kullanılmıştır (12). Johnson ve arkadaşları agaroz jel elektroforezi ile inaktivasyon yöntemlerini kıyasladıkları bir çalışmada her iki yöntemin birlikte ALP izoenzimi ayırımında kullanılabileceğini belirtmişlerdir (15). Agaroz jel elektroforezi ile ALP'nin karaciğer, kemik, bağırsak ve makro karaciğer izoenzimleri kantitatif olarak belirlenebilmektedir. Onica ve arkadaşları nöraminidaz veya lektin uygulaması ile karaciğer, kemik ve sialik asit içermediğinden dolayı bağırsak izoenzimlerinin birbirinden ayrıldığını göstermişlerdir (16). Bağırsak izoenziminin sirozda arttığı ve karaciğer izoenziminin ise kolestaziste çok yükseldiği bilinmektedir (17, 18). Çalışmamızda da bağırsak izoenzimi sadece hasta grubunda saptanmıştır. Bu izoenzim kronik karaciğer hastalarında siroz değerlendirmesinde kullanılabilir ancak daha geniş kapsamlı ve detaylı çalışmalara gereksinim vardır.

Somani ve arkadaşları agaroz jel ve poliakrilamid jel elektroforez yöntemlerinin ALP izoenzimlerini ayırmada diğer elektroforez yöntemlerine göre daha basit, kullanışlı ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir (19). Ancak agaroz jel elektroforezi yönteminde plasental ALP (PALP) ya da Regan (ısıya dayanıklı) izoenziminin, kemik ALP (BALP) ile aynı bant içinde kalması nedeniyle 65°C'de 10 dakika ısı inaktivasyonuna tabi tutulduktan sonra bu izoenzimler belirlenebilmektedir. Isı ile inaktivasyon geri dönüşümsüz kinetik bir reaksiyondur. Çeşitli doku alkalen fosfatlarının sıcaklığa karşı stabiliteyi farklı-

dır. ALP'nin 56 °C ve 65°C sıcaklık denatürasyonunda sınır derecelerdir. Plasental ve Regan izoenzimleri 65°C ısıda 30 dakika stabiliteyi korurlar (20). 56°C'de 10 dakika inkübasyondan sonra kalan enzim aktivitesi total ALP aktivitesinin %20'sinden daha az ise kemik ALP baskın olandır. Kalan aktivite %25-55 arasında ise baskın olan izoenzim karaciğer ve bağırsak ALP'dir (14). Isıtma zamanı ve standart sıcaklık ile ilgili bir fikir birliği yoktur. Birçok araştırmacı 56°C'yi tercih eder ancak süre 10-30 dakika arasında değişmektedir. Çalışmamızda 56°C'de 10-15 ve 20 dakikalık aralıklarla yapılan denemeler sonucu 10 dakikadan sonra inaktivasyondaki ani artış nedeniyle 56°C'de 10 dakika inaktivasyon ve 65°C için 30 dakika inaktivasyon kullanıldı.

Posen ve arkadaşları ile Johnson ve arkadaşları sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında ALP'nin 56°C'de aktivitesinin azaldığını, bu aktivite kaybının sağlıklı erişkin bireylerde 10 dakikada %40 ila %70 arasında olduğunu bildirmişlerdir (12, 15). Çalışmamızda, 56°C'de 10 dakika ısıya tabi tutulan hasta ve kontrol serumlarında kalan ALP aktivitesinin total ALP'ye oranlanması sonucu elde ettiğimiz veriler siroz hastalarında %20 ile %58 arasında, kontrol grubunda ise %24 ile %57 arasında bulunmuştur. Kontrol grubunda ve hasta grubunda karaciğer izoenzimi genel olarak baskın olandı. Total ALP'de karaciğer izoenziminin baskın olmasının nedeni hasta ve kontrol grubu için erişkin ve herhangi bir kemik hastalığı olmayan bireylerin seçilmiş olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Sağlıklı ve herhangi bir kemik hastalığı olmayan erişkinlerde total ALP'in %60'ının karaciğer, %40'ının kemik izoenzimine ait olduğu bildirilmiştir (14). Domar ve arkadaşları bağırsak hastalığı bulunan bireylerin serumunda bağırsak izoenzimine rastlamazken, primer biliyer siroz ve karaciğer sirozu bulunan hastaların serumlarında önemli derecede yüksek bağırsak izoenzimine rastlamışlardır (21). Çalışmamızda siroz hasta-

larında bağırsak ALP izoenzimi (İALP) tespit ettik. Ancak ısı inaktivasyonu yönteminde ısıya direnci karaciğer izoenzimi (LALP) ile benzer olduğu için LALP ve İALP kalan aktivite olarak birlikte yer aldı. Isı inaktivasyonu yöntemi ile İALP saptanamamaktadır. Bununla beraber her hangi bir hastalık durumu olmaksızın B ve O kan grubu olan kişilerin serumunda bu izoenzimin bulunuyor olabilmesi İALP'nin klinik önemini sınırlamaktadır. Bu durum iki yöntemin kıyaslanmasında bir farklılık oluşturmaktadır. Bu nedenle bireylerin kan grubu ve açlık durumları mutlaka göz önünde tutulmalıdır.

Sonuç olarak; ısı inaktivasyonu yönteminde İALP ve LALP birlikte tesbit edilirken, agaroz Jel Elektroforezi yönteminde PALP ve BALP aynı bant içinde görülmektedir. Bu durum her iki yöntemin de dezavantajları olduğunu göstermiştir. Her iki yöntem bir arada kullanıldığında ALP izoenzimi ayrımını sağlamaktadırlar. İALP ve PALP izoenzimlerinin total ALP içindeki paylarının az olmasından dolayı göz ardı edilebilir. Çalışmamızda, 65°C ısı inaktivasyonu uygulanan kontrol ve hasta grubundan yalnızca 5 hastada kalan ALP aktivitesi tespit edilmiştir. Tümör dokularında bulunabilen ısıya dirençli bu varyant (regan) izoenzimin varlığı ile ilgili literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Portugal ve arkadaşları HCC olan hastalarda yaptıkları bir çalışmada hastaların %10'unda, Higashino ve arkadaşları %30'unda ısıya dirençli bu enzimin var olduğunu ve hepatomada tanıyı doğrulamak için alfa fetoprotein ile birlikte kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Yapılan çeşitli çalışmalarda HCC'da regan izoenzimi varlığı ortaya konulmuştur (22-26). Sirozun HCC için önemli bir risk faktörü olması nedeniyle 65°C ısı inaktivasyonu sonrası kalan aktivite, bir tümörün varlığı nedeniyle olabileceği gibi farklı patolojilerin göstergesi de olabilir. Ancak varyant izoenzimlerin sağlıklı bireylerde de az da olsa görülebileceği bildirilmiştir (21). Bu izoenzimin saptandığı hastaların görüntüleme teknikleri ve biyopsi

sonuçları ile desteklenerek daha kapsamlı olarak araştırılması gerektiği düşüncesindedir.

Bu çalışmada agaroz jel elektroforezi ve ısı inaktivasyonu yöntemleri hasta ve kontrol gruplarında ayrı ayrı uygulanmıştır. Elde edilen değerler arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür. Isı inaktivasyonu yönteminde LALP'nin bir kısmı BALP ile birlikte inaktive olmaktadır. LALP'nin inaktivasyon oranı hasta ve kontrol grubu arasında farklılık göstermektedir. Bu veriler 56°C'de 10 dakika olarak uygulanan ısı inaktivasyonu yönteminin ALP izoenzimlerin belirlenmesinde agaroz jel elektroforezi göre duyarlılığını azaltmaktadır. Bu durum izoenzimlerin ısı direncinin bazı patolojilerde çeşitli etkileşimlerle değiştiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Dolar E. Klinik Karaciğer Hastalıkları. Nobel-Günes Tıp Kitabevi Bursa; 2002; s; 343-61.
2. Özel M, Özdoğan O. Klinik gastroenteroloji ve hepatoloji. Nobel Tıp Ankara; 2007.
3. Erlinger S, Benhamou JP. Cirrhosis: clinical aspects. In: Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, et al (Eds): Oxford Textbook of clinical hepatology. New York, Oxford university press 2.nd edition 1999; Vol 2: pp; 629-44.
4. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The Morphology of Cirrhosis. Recommendation on definition, nomenclature and classification by a working group sponsored by The World Health Organization. J Clin Pathol 1978; 31: 395-414.
5. Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, et al. Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance. Gastroenterology 2004; 126: 1005-14.
6. Srivatanakul P, Sriplung H, Deerasamee S. Epidemiology of liver cancer: An overview. Asian Pac J Cancer Prev 2004; 5: 118-25.
7. Liu JH, Chen PW, Asch SM, et al. Surgery for hepatocellular carcinoma: does it improve survival? Ann Surg Oncol 2004; 11: 298-303.
8. Harris H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. Clin Chim Acta 1990; 186: 133-50.
9. Attila G, Matyar S. Plazma enzimlerinin tanısal değerleri. Mersin On Tıp Fak Derg 2002; 1: 73-82.

10. Dufour DR, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests. *Clinical Chemistry* 2000; 46: 2027-49.
11. Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of Abnormal Liver Enzyme Tests in the Asymptomatic Patient. *NEJM* 2000; 342: 1266-71.
12. Posen S, Neale FC, Clubb JS. Heat inactivation in the study of human alkaline phosphatases. *Annals of Internal Medicine* 1965; 62: 1234-43.
13. Le Du MH, Stigbrand T, Taussig MJ, M'enez A, Stura EA. Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 °A resolution: implication for a substrate specificity. *J Bio Chem* 2001; 276: 9158-65.
14. Tietz, NW. Textbook of clinical chemistry. Third edition. WB Saunders Company. Philadelphia London; 1999.
15. Johnson, RB, Ellingboe K, Gibbs P. A Study of Various Electrophoretic and Inhibition Techniques for Separating Serum Alkaline Phosphatase Isoenzymes. *Clinical Chemistry* 1972; 18: 110-5.
16. Onica D, Sundblad L, Waldenlind L, Shanwell A. Characterization of serum alkaline phosphatase isoenzymes by affinity electrophoresis in agarose gel containing lectin combined with agar gel electrophoresis. *Scand J Clin Lab Invest* 1987; 47: 239-45.
17. Wallach J. Interpretation of diagnostic test: a synopsis of laboratuary medicine. Fifth edition Little, Brown and Company; 2000.
18. Eastham RD. Biochemical values in clinical medicine. Seventh Edition. Wright Bristol 1985.
19. Somani BL, Ambade VN, Arora MM. Polyacrylamide gel affinity electrophoresis for separation of enzyme isoforms. *Med J Armed Forces India* 2003; 59: 125-7.
20. Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. Nineteenth edition. WB Saunders Company 1996; 276-385.
21. Domar U, Hirano K, Stigbrand T. Serum levels of human alkaline phosphatase isozymes in relation to blood groups. *Clin Chim Acta* 1991; 203: 305-14.
22. Portugal ML, Azevedo MS, Manso C. Serum alpha-fetoprotein and variant alkaline phosphatase in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1970; 15: 383-7.
23. Higashino K, Otani R, Kudo S, Hashinostume M, Hada T. Hepatocellular carcinoma and a variant alkaline phosphatase. *Ann Intern Med* 1975; 83: 74-8.
24. Stepan J, Macholda F, Konopasek B, Zizkovsky V, Bek V, Kordac V. Alkaline phosphatases in neoplastic diseases. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1977; 78: 131-7.
25. Crofton PM, Smith AF. Regan variant alkaline phosphatase in gastrointestinal carcinoma. *Clin Chim Acta* 1978; 16: 81-8.
26. Bukofzer S, Kew MC, Rowe P. The prevalence of variant alkaline phosphatase in hepatocellular carcinoma in southern African blacks. *Cancer* 1988; 62: 978-81.

Yazışma adresi:

Dr. Gürsel Yıldız
Cumhuriyet Üniversitesi, Nefroloji, Sivas
E-posta :drgursel@yahoo.com
