

Uit de laboratoriumpraktijk

De bepaling van iso-enzymen van alkalische fosfatase: negen bijzondere migratiepatronen

H. RUSSCHER, J. LINDEMANS en J.G. BOONSTRA

Alkalische fosfatase wordt gesynthetiseerd in verschillende weefsels. Dientengevolge bestaat de totale alkalischefosfataseactiviteit in de circulatie uit verschillende fracties, voornamelijk afkomstig uit lever, bot en darm. Deze kunnen van elkaar gescheiden worden met behulp van elektroforese. In dit artikel wordt aan de hand van negen bijzondere migratiepatronen, afkomstig van patiënten met uiteenlopende ziektebeelden, duidelijk gemaakt welke extra informatie met deze techniek over de conditie van de patiënt kan worden verkregen, in het bijzonder bij onbegrepen verhoogde alkalischefosfataseactiviteit, en hoe die informatie van grote invloed kan zijn op behandeling en follow-up. Bovendien wordt gedemonstreerd hoe ook benigne alkalische fosfatase verhogingen worden onderscheiden van pathologische oorzaken, waardoor onnodig, langdurig en belastend vervolgonderzoek kan worden voorkomen.

Trefwoorden: alkalische fosfatase, iso-enzymen, elektroforese

Alkalische fosfatase (AF) wordt gesynthetiseerd in verschillende weefsels. Dientengevolge bestaat de totale AF-activiteit in de circulatie uit verschillende fracties, voornamelijk afkomstig uit lever, bot en darm (1, 2). Bij een verhoogd totaal-AF zal, in combinatie met andere laboratoriumuitslagen, in de meeste gevallen niet getwijfeld worden aan de bron die verantwoordelijk is voor de toename in AF-activiteit. Wanneer ook γ -glutamyltransferase (γ -GT) verhoogd is, wordt aan lever- of galproblematiek gedacht, terwijl anders vrij snel geconcludeerd wordt dat de oorzaak van de AF-stijging moet liggen in een botaandoening. Toch zijn er méér pathologische, maar ook benigne factoren die de productie van AF beïnvloeden. Er blijft daarom behoefte, vooral bij onbegrepen consistent verhoogde AF-concentraties, de verschillende AF-fracties te kunnen identificeren en eventueel kwantificeren. Daarvoor kan gebruik gemaakt worden van hun specifieke elektroforetische eigenschappen. Zodoende kan onnodig en soms ingrijpend vervolgonderzoek worden voorkomen.

Correspondentie: dr. H. Russcher, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum Rotterdam, Afdeling Klinische Chemie, 's Gravendijkwal 230, 3015 CE Rotterdam
E-mail: h.russcher@erasmusmc.nl

AF-expressie

De voorkomende AF-iso-enzymen in de mens worden gecodeerd door vier verschillende genen. Het niet-weefselspecifieke AF dat vooral tot expressie komt in leverparenchym, maar ook in niercellen, leukocyten, galwegepithel en osteoblasten, wordt gecodeerd door een gen op chromosoom 1. De overige drie genen liggen op chromosoom 2; ze komen weefselspecifiek tot expressie en worden darm-, placentair-, en kiemcel-AF genoemd (3). De homologie tussen de producten van deze vier genen is hoog. Placentair- en kiemcel-AF bestaan uit 513 aminozuren die voor 98% met elkaar overeen komen. Er zijn 12 aminozuren, verspreid over het hele enzym, die verschillen. Het darm-AF bestaat uit 509 aminozuren en laat 87% homologie zien met het placentaire- en kiemcel-AF, terwijl de aminozuurvolgorde van het niet-weefselspecifieke AF, dat uit 507 aminozuren bestaat, voor 50-60% homogeen is (4). AF is een glycoproteïne, waarbij de mate van sialylering orgaanspecifiek is. De koolhydraatketens van darm-AF zijn als enige niet gesialyleerd, terwijl bot-AF het hoogste sialzuurgehalte heeft (5). In de zuivere zin van het woord zijn darm-, placentair-, kiemcel- en niet-weefselspecifiek-AF iso-enzymen van elkaar omdat hun aminozuurvolgorde verschilt. Lever- en bot-AF hebben dezelfde aminozuurvolgorde, maar verschillen in koolhydraat- en sialzuurgehalte en zijn daarom strikt genomen geen iso-enzymen, maar isovormen van elkaar. Om praktische redenen zullen wij lever- en bot-AF hier ook iso-enzymen noemen.

Fysiologische functie

AF is een fosfomono-esterase en katalyseert natuurlijke en synthetische substraten, waarbij het enzym zich, afhankelijk van de zuurgraad, gedraagt als een orthofosfatase, een pyrofosfatase of een fosfotransferase. Hoewel de precieze functie in het menselijk lichaam nog niet helemaal duidelijk is, lijkt AF een actieve rol te spelen in het reduceren en induceren van respectievelijk gal- en γ -GT-secretie in hepatocyten bij cholestase, het calcificatieproces in bot, bij transport van vetten in de darm, absorptie en reabsorptie van fosfaat in de darm en de nier, en bij transport van maternale IgG-antilichamen door de placenta naar de foetus (5, 6).

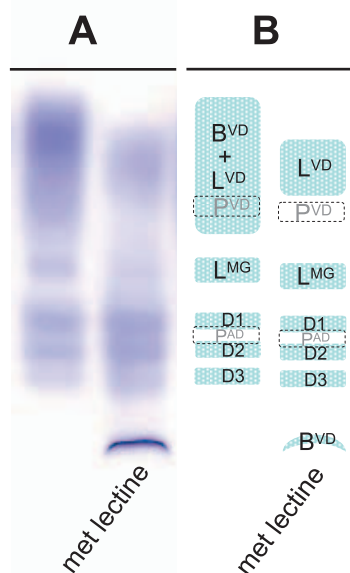
Vrije homodimere, ankergebonden en membraangebonden AF-fracties

Het AF-enzym behoort tot de groep eiwitten die door middel van een glycaanfosfatidylinositol(GPI)-anker vast zit aan de buitenkant van de celmembraan (7). Onder invloed van detergenten zoals galzouten kan het AF inclusief anker uit de celmembraan worden vrijgemaakt, waarna fosfolipase C dit anker kan afsplitsen (8). Op deze wijze komt AF in een vrije homodimere vorm in de bloedbaan terecht. De aanwezigheid van membraangebonden- en ankerdragend AF in de circulatie is meestal een teken van pathologie. De enige uitzondering hierop wordt gevormd door vrouwen in het laatste trimester van hun zwangerschap. In hun serum kan naast het vrije homodimere placentair-AF ook ankerdragend placentair-AF worden aangetoond (9). Membraanfragmenten kunnen bij beschadiging van epitheelcellen in de vorm van vesicles in de circulatie terechtkomen. Vanwege het hydrofobe karakter van het anker vormt AF complexen met serum-eiwitten zoals lipoproteïnes en immuuglobulines of aggregaten van meerdere AF-moleculen (3).

AF-iso-enzymenelektroforese, scheidingsprincipe

Er zijn veel methodes om AF-iso-enzymen te scheiden en te kwantificeren. Goede en reproduceerbare resultaten worden bereikt met commercieel beschikbare agaroseelektroforesesystemen, aankleuring van de AF-fracties met een chromogeen substraat (nitrobluetetrazolium) en densitometrische kwantificering. De vier genproducten, niet-weefsel-specifiek-, darm-, placentair- en kiemcel-AF, kunnen worden gescheiden met de Iso-Pal iso-enzymprocedure van Sebia (Issy-les-Moulineux, France) op basis van hun verschil in grootte en lading, terwijl de lever en bot fractie, die beide gesynthetiseerd worden van het

niet-weefsel-specifieke-AF gen, gescheiden kunnen worden door gebruik te maken van verschil in sialylering van koolhydraatzijketens. De vrije homodimere lever- en de vrije homodimere botfractie migreren het meest naar de pluspool, maar zijn in eerste instantie niet van elkaar te scheiden (figuur 1). Bovendien, als placentair-AF tot expressie komt zal de vrije homodimere fractie hiervan zich ook in dit gebied bevinden. Daarom wordt naast onbehandeld serum ook serum van dezelfde patiënt meegenomen na voorbehandeling met het lectine-‘wheat-germ’-agglutinine. Lectines zijn eiwitten die een specifieke, Ca^{2+} -afhankelijke binding kunnen aangaan met N-acetylglucosamineresiduen van de koolhydraatzijketens. In tegenstelling tot de lever- en placentaire fractie worden deze zijketens van de botfractie sterker aan lectine gebonden. Dit bot-AF-lectine complex blijft tijdens elektroforese op de opbrengplaats, waardoor de vrije homodimere bot-, lever- en eventuele placentaire fracties beter kwantificeerbaar zijn (figuur 1). De heterogene darmfractie -er kunnen drie banden zichtbaar zijn-, de placentaire ankergebonden fractie en -onder pathologische condities- de membraangebonden lever- en ankergebonden botfracties zijn in het onbehandelde monster al beter identificeerbaar. Echter, thermodenaturatie kan helpen om met meer zekerheid een fractie te identificeren. Als het te analyseren monster voor elektroforese tien minuten verhit wordt tot $56^{\circ}C$ denatureert het bot-AF, terwijl bij $65^{\circ}C$ alle fracties denatureren behalve de placentaire (9-11). Een andere manier om een betere scheiding te krijgen van de verschillende AF-iso-enzymen is de chemische inhibitie door aminozuren en de chemische denaturatie door ureum (12-14). Darm- en placentair-AF worden geïnhibeerd door L-fenylalanine en L-tryptofaan, niet-weefsel-specifiek-AF door L-homoarginine, terwijl bot-AF het gevoeligst is voor denaturatie met ureum (tabel 1). Ook kunnen de monsters behandeld worden met neuraminidase, wat sialzuurgroepen afsplitst. Omdat darm-AF in tegenstelling tot de andere iso-enzymen niet gesialyleerd is, zal hierdoor alleen de wijze waarop darm-AF in de gel migreert onaangetast blijven. Complexen, zoals lipoproteïne-AF- en immuuglobuline-AF-complexen (zie hieronder) kunnen verbroken worden met respectievelijk cetavlon (een anion-actief detergent) en ficine (heeft eiwitplitsende activiteit) (15).



Figuur 1. Migratiepatroon van AF-iso-enzymen. A. Iso-enzymen in serum van een gezond persoon gescheiden d.m.v. Iso-pal iso-enzymprocedure van Sebia (Issy-les Moulineux, Frankrijk). B. De posities van AF-isoenzymfracties die zichtbaar zijn in het migratiepatroon met in grijs de positie van de eventuele placentaire fracties. L=lever, B=bot, D=darm, P=placentair, VD=vrije homodimere AF, MG=membraangebonden-AF, AD=ankerdragend AF.

AF-iso-enzymenonderzoek

Onderzoek naar AF-iso-enzymen kan in de meeste gevallen worden aangevraagd bij een onbegrepen stijging of constant verhoogd niveau van de AF-activiteit. Op deze manier kan meer inzicht verkregen worden in de bron die verantwoordelijk is voor deze stijging. Hieronder staan 9 casussen beschreven waarbij met behulp van AF-iso-enzymenonderzoek meer inzicht is verkregen hoe de beschreven pathologie de AF-concentratie beïnvloedt.

Bot-AF

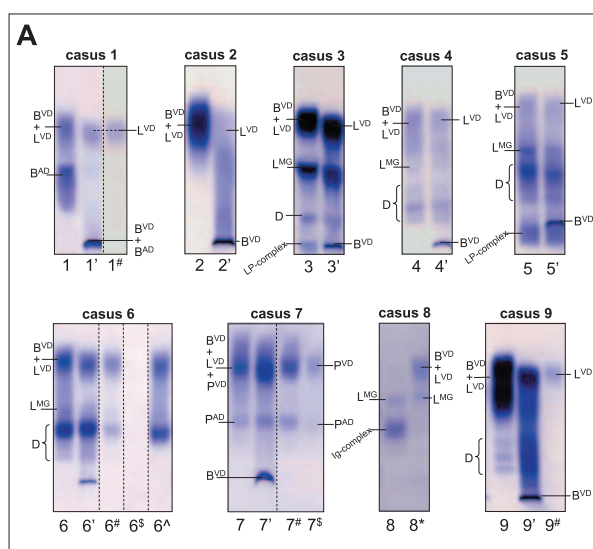
De circulerende activiteit van bot-AF is evenredig met de osteoblastenactiviteit en een toename kan veroorzaakt worden door botgroei bij kinderen (vooral

tijdens de pubertijd), botheling na een breuk, verschillende ziektes zoals osteomalacie (rachitis bij kinderen), de ziekte van Paget, (renale) osteodystrofie en hyperparathyroïdie, maar ook door het gebruik van bepaalde medicijnen (5, 12). Normaal gesproken komt alleen het vrije homodimere bot-AF in de circulatie, maar bij ernstige botziekten kan ook de ankergebonden-AF-fractie aangetoond worden. Membraangebonden bot-AF komt eigenlijk nooit voor in de circulatie (5). Het AF-iso-enzympatroon van casus 1 (figuur 2A), een 40-jarige man met botpijnen als gevolg van zijn ziekte (pro-B-ALL), laat zo'n extra bot-variant zien, die volledig gebonden wordt door lectine (laan 1') en onderhevig is aan thermodenaturatie bij 56° C (laan 1#). Ook het AF-iso-enzympatroon van casus twee laat een verhoogde bot-AF (vrij homodimeer) zien. Deze 67-jarige patiënte leidt aan primaire hyperparathyroïdie. Parathormoon stimuleert de osteoclastenactiviteit waardoor botresorptie plaats vindt en calcium en fosfaat vrijkomen in de circulatie. Tegelijkertijd met dit proces wordt ook de activiteit van de osteblasten aangesproken met een verhoogde AF-synthese tot gevolg (16).

Een verlaagde bot-AF-activiteit in serum weerspiegelt een lage osteoblastenactiviteit. Malabsorptie, patiënten met de ziekte van Kahler of hypoparathyroïdie kunnen een verlaagde AF-activiteit laten zien. Bij de ziekte van Kahler is de botformatie volledig losgekoppeld van de botresorptie en aangezien myelomacellen naast osteoclastactiverende factoren ook osteoblast-inhiberende factoren uitscheiden, wordt de osteoblast-activiteit geremd met een verlaagde bot-AF-fractie als gevolg (17). Bij kinderen kan een lage osteoblasten-activiteit gevonden worden als ze groeihormoondeficiënt of ernstig ziek zijn, waardoor de lengtegroei stagneert (5).

Lever-AF

De AF-synthese in de lever is verhoogd bij aandoeningen als hepatitis, cholestase, cirrose en metastasen, maar kan ook geïnduceerd worden door hepatotoxische medicatie (18). Omdat in het serum voor-



B

Casus	Totaal AF	LVD	LMG	BVD	BAD	D	P	complex
1. ♂, 40 jr	203 UII	29%	<1	10%	61%	<1	<1	-
2. ♀, 67 jr	809 UII	7%(L)	<1	93%(H)	<1	<1	<1	-
3. ♀, 3 jr	689 UII	57%(H)	27%(H)	5%(L)	<1	6%	<1	5%(H)
4. ♂, 41 jr	74 UII	17%	<1	54%	<1	29%(H)	<1	-
5. ♂, 74 jr	182 UII	9%(L)	14%(H)	9%(L)	<1	46%(H)	<1	22%(H)
6. ♂, 42 jr	179 UII	32%	8%	10%(L)	<1	50%(H)	<1	-
7. ♀, 36 jr	163 UII	15%(L)	5%	17%(L)	<1	2%	61%	-
8. ♂, 54 jr	64 UII	Aanw.	10%	Aanw.	<1	Aanw.	<1	90%(H)
9. ♂, 2 jr	1850 UII	30%	<1	66%	<1	4%	<1	-

C

	normaalwaarden in de gezonde populatie		
	Vrouwen (n=50)	Mannen (n=50)	Kinderen, tot 20 jr (n=50)
Lever (L ^{VD})	18-72%	15-71%	1-31%
Lever (L ^{MG})	1-14%	1-9%	1-7%
Bot (B ^{VD})	20-74%	23-75%	62-100%
Heterogeen darm	Aanwezig bij slechts 40% normale populatie. Indien aanwezig <14%.		
Placentair	Zwangerschap, vanaf week 4. Soms ook verhoogd bij stevige rokers.		

Figuur 2. Alkalischefosfatase-iso-enzymenbepaling van 9 casussen. A. Iso-enzymmenmigratiepatronen in serum van 9 casussen gescheiden d.m.v. Isopal iso-enzymprocedure. B. Procentuele bijdrages van de verschillende iso-enzymen aan totaal-AF gemeten in serum van de 9 casussen. C. Normaalwaarden in de gezonde populatie. L=liver, B=bot, D=darm, P=placentair, VD=vrije homodimere-AF, MG=membraangebonden AF, AD=ankerdragend-AF, '=behandeld met lectine, #=10 min 56 °C, \$=10 min 65 °C, ^=behandeld met cetavlon, *=behandeld met ficine.

Tabel 1. Fysisch-chemische methodes voor de scheiding en indentificatie van AF-iso-enzymen

	niet weefsel-specifiek				
	bot-AF	lever-AF	darm-AF	placentair-AF	kiemcel-AF
10 min. 56 °C	++	+	+	-	-
10 min. 65 °C	++	++	+	-	-
ureum	++	+	+/-	-	-
L-fenylalanine	-	-	+	+	+
L-tryptofaan	-	-	+	+	+/-
L-homoarginine	++	++	-	-	-
L-leucine	-	-	-	-	++
neuraminidase	vv	v	n	v	v
lectine	vvv	n	n	n	n
C-fosfolipase	verwijderd ankergebonden AF-fragmenten				
cetavlon	verbreekt lipoproteïne-AF-complexen				
ficine	verbreekt immuunglobuline-AF-complexen				

-: minimale, +: matige, ++:sterke inhibitie

n: elektroforetische mobiliteit niet veranderd, v: matige, vv: sterke, vvv: zeer sterke verandering

namelijk twee leverfracties aangetoond kunnen worden, de vrije homodimere en de membraangebonden leverfractie (ook wel galfractie genoemd), kan op basis van dit iso-enzym patroon ten dele herleid worden van welke leveraandoening er sprake is. Bij hepatitis zal vooral de vrije homodimere leverfractie verhoogd zijn, maar virale, toxische of alcoholische hepatitis kunnen niet van elkaar onderscheiden worden. Bij cholestase, veroorzaakt door obstructie van de galafvoer door bijvoorbeeld galstenen of een pancreaskoptumor, zal zowel de vrije homodimere, als de membraangebonden fractie fors verhoogd zijn. Bij zeer ernstige cholestase, waarvan ook primaire of secundaire hepatische tumoren de oorzaak kunnen zijn, worden ook vaak lipoproteïne-AF-complexen gezien (19, 20). Normaal gesproken worden deze AF-complexen afgevoerd via galwegen en darm, maar ze kunnen bij ernstige leverschade tevens in de circulatie terecht komen. Een voorbeeld hiervan is het iso-enzym patroon van casus 3 (figuur 2), een kind van 3 jaar met ernstig leverfalen. Naast een fors verhoogde vrije homodimere, en membraangebonden (gal) leverfractie is op het applicatiepunt een extra band waarneembaar wat het lipoproteïne-AF is. De bot-AF-activiteit (34 U/L) is ernstig verlaagd, zeker voor een kind, wat zoals eerder besproken een bekend fenomeen is bij ernstige ziekte. Het AF-iso-enzym patroon geeft geen grond voor discriminatie tussen intrahepatische of extrahepatische cholestase, noch tussen maligne of benigne leverziekte, primaire of secundaire levertumor.

Darm-AF

Darm-AF wordt slechts bij ongeveer 40% van de normale populatie aangetoond, is heterogeen van aard, en heeft op zichzelf geen pathologische betekenis. Darm-AF is vaker aantoonbaar in serum van individuen met bloedgroep O en B en in patiënten met diabetes mellitus, maar ondanks vele hypothesen is de precieze oorzaak voor deze fenomenen nog niet opgehelderd (21, 22). Casus 4, waarvan het AF-iso-enzym patroon is weergegeven in figuur 2 is een patiënt met diabetes mellitus type 1, waarbij een verhoogde darmfractie is waargenomen, terwijl toch zijn totale AF niet verhoogd was (74 U/l). Tevens kan darm-AF verhoogd zijn na het nuttigen van een vette maaltijd omdat AF betrokken is bij het lipidentransport van de laterale naar de basolaterale zijde van de enterocyt. Sterk verhoogde darm-AF-fractiebanden zijn erg karakteristiek bij leverfalen. Door de tertiaire structuur van darm-AF kunnen de koolhydraatgroepen die gebonden zijn aan het enzym slecht gesialyleerd worden. Hierdoor kan darm-AF via de asialoglycoproteïne-receptor, die op de celmembraan van endotheelcellen in de lever tot expressie komen, efficiënt uit de circulatie verwijderd worden. Bij leverfalen presteert dit hepatische reticulo-endotheliale systeem matig. Bovendien vindt er hypersialylering plaats tijdens cirrose, waardoor het darm-AF veel minder efficiënt uit de circulatie verwijderd wordt (5). Casus 5 en 6 zijn beide gediagnosticeerd met leverfalen waarbij in het AF-iso-enzym patroon een verhoogde darmfractie waargenomen is (figuur 2).

Bovendien is bij casus 5 een lipoproteïne fractie waarneembaar, wat de ernst van het leverfalen, veroorzaakt door alcoholabusus, onderstreept. Bij casus 6 werd in eerste instantie gedacht aan een placentaire-AF of een ankerdragende bot-AF-fractie, maar dit werd uitgesloten met de thermodenaturatiemethode bij 56 °C (laan 6[#]) en 65 °C (laan 6^S). Omdat deze band ook niet verdween via ficinebehandeling (laan 6[^]), kon de conclusie getrokken worden dat het hier een fors verhoogde darmfractie betrof, wat kan passen bij levercirrose.

Placentair AF

Placentair AF komt als benigne vorm alleen tot expressie tijdens zwangerschap. Het AF-iso-enzym patroon van casus 7 in figuur 2 is van een vrouw in het laatste trimester van haar zwangerschap. Ook stevige rokers kunnen in serum een verhoogde placentaire-AF activiteit hebben omdat onder invloed van sigarettenrook placentair-AF tot expressie komt in de laterale zijde van longepitheel en vervolgens naar de circulatie kan lekken. Placentair-AF is in tegenstelling tot alle andere iso-enzymen stabiel bij 65 °C (laan 7^S).

AF producerende tumoren

AF kan ook ectopisch door diverse tumoren worden geproduceerd. Placentair AF kan tot expressie komen in plaveiselepitheelcel tumoren van de long, darm, vulva en andere organen. Omdat dit tumor-geassocieerde enzym voor het eerst is aangetoond in longweefsel van ene patiënt Regan, wordt deze variant wordt ook wel het Regan-iso-enzym genoemd (23). Twee jaar na de ontdekking van het Regan-iso-enzym is het Nagao-AF beschreven, eveneens vernoemd naar de eerste patiënt. Nagao-AF lijkt sterk op placentair AF, is tevens stabiel bij 65 °C, en wordt daarom ook aangeduid als placental-like AF. Tegenwoordig wordt deze variant aangeduid met kiemcel-AF omdat hij vooral tot expressie komt in tumoren van testikels, maar ook in long- en bepaalde hersentumoren (1). Een derde variant die voornamelijk is gevonden in levercarcinoma wordt het Kasahara iso-enzym genoemd en is een AF dat onder fysiologische condities alleen tot expressie komt in de foetale darm (24). Deze Regan-, Nagao- en Kasahara-iso-enzymen zijn obsoleet geraakt in de tumordiagnostiek omdat deze geen toegevoegde waarde hebben naast de reguliere markers (SCC, CA 125, β -HCG, AFP) bij deze tumoren. Alleen in de pediatrie is placentair-AF een zinvolle marker bij verdenking op een gonadoblastoom of dysgerminoom in geval van gonadale dysgenese, waarbij er sprake is van een stoornis in de aanleg of differentiatie van de gonaden. Dertig procent van de kinderen met genitale ontwikkelingsstoornissen ontwikkelt een benigne gonadale kiemceltumor, welke zich kan ontwikkelen tot een maligne vorm (3% van de maligniteiten bij kinderen). In serum kan het enzym worden aangetoond met behulp van een EIA ('enzyme immuno assay') van Innogenetics, waarbij gebruik gemaakt wordt van een monokonaal antilichaam tegen humaan placentair AF (25, 26).

Familiaire hyperfosfatasemie

Er zijn enkele families beschreven met een totale AF-concentratieplasma in plasma die bij drie opeenvolgende generaties ver boven het gemiddelde van de normale populatie liggen, terwijl er geen sprake is van ziekte. Veelal is de genetische achtergrond voor dit fenomeen niet bekend, maar moet gezocht worden in abnormaliteiten in het metabolisme van AF (27). Klinisch gezien is het belangrijk om deze benigne hyperfosfatasemieën tijdig te herkennen om onnodig diagnostisch vervolgonderzoek te voorkomen.

AF-macro-enzymcomplexen

Naast het lipoproteïne-AF-complex kan AF ook complexen vormen met immuunglobulines. Deze macro-enzymcomplexen hopen zich op in de circulatie omdat ze te groot zijn om door de nier geklaard te worden, waardoor er een verhoogde totale AF-activiteit gemeten wordt (28). In tegenstelling tot lipoproteïne-AF is het vóórkomen van immuunglobuline-AF complexen klinisch niet van betekenis. Deze complexen komen wel vaker voor in de zieke -vooral bij auto-immuunziektes- dan in de gezonde populatie en moeten daarom tijdig herkend worden om ook nu onnodig vervolgonderzoek bij de patiënt te voorkomen. De herkenning is vrij eenvoudig omdat na elektroforese een band te zien is die niet op de applicatieplaats blijft zoals bij het lipoproteïne-AF-complex, maar wel slecht de gel in migreert en niet overeenkomt met een band van de bekende iso-enzymen. Zoals eerder genoemd doet een ficinebehandeling zo'n immuunglobuline-AF-complex uit elkaar vallen. Over de preciese interactie tussen het AF en het immuunglobuline bestaat nog veel onduidelijkheid. Echter, een antigeen-antistofinteractie wordt onwaarschijnlijk geacht en gedacht wordt dat er een niet-immunologische interactie bestaat tussen het AF en het immuunglobuline (28). Er worden vooral IgG-ei-

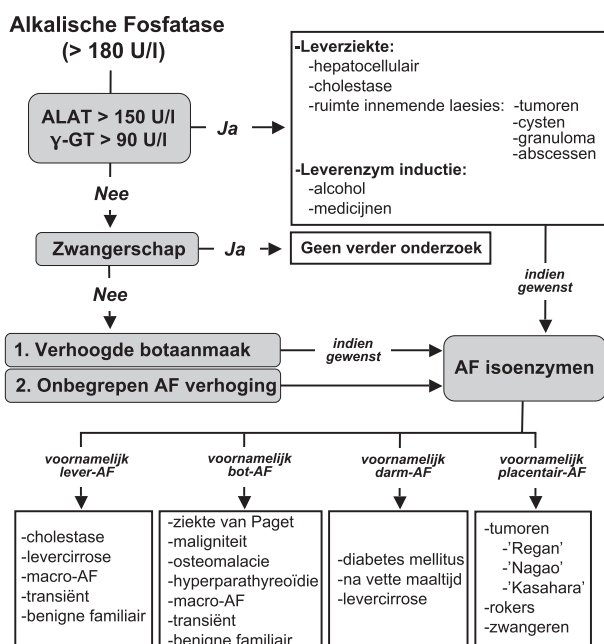
witten gevonden, gecomplexeerd met vooral weefsel-on-specifiek AF, maar er zijn ook macro-enzymcomplexen met andere immuunglobulines en AF-typen beschreven (29). Het AF-iso-enzympatroon van casus 8 laat een immuunglobuline-AF-complex zien (figuur 2). Een ficinebehandeling (laan 8*) doet een immuunglobuline-AF-complex uit elkaar vallen, waarna normale bot- en leverfractie gekarakteriseerd konden worden.

Transiënte hyperfosfatasemie

Extreem hoge AF-activiteit kan in episodes voorkomen bij kinderen jonger dan vijf jaar zonder dat er aanwijzingen voor een bot- of leverziekte zijn. Deze transiënte hyperfosfatasemie duurt doorgaans niet langer dan enige weken, is volledig onschuldig van aard en wordt waarschijnlijk opgewekt door een virale infectie, waardoor er hypersialylering plaats vindt (30). Virale infecties bij kinderen komen het meest voor in de herfst en juist in deze periode (sept.-dec.) ligt de incidentie van transiënte hyperfosfatasemie het hoogst (5). In figuur 2 is het AF-iso-enzympatroon van een peuter (casus 9) te zien waarbij het totaal-AF sterk verhoogd bleek te zijn (1850 U/l), maar waarbij geen bot- of leverziekte gediagnosticeerd kon worden. Uit het iso-enzymenpatroon, geapliceerd zonder en met lectine, bleek zowel de leverals bot-AF-fractie verhoogd te zijn. De smeer die aanwezig is in het patroon van het met lectine behandelde monster wordt veroorzaakt door onverzadigd bot-AF met lectine. Een scherpere scheiding kan verkregen worden door verdunning van het monster of door een hogere concentratie lectine te gebruiken.

Conclusie

Lichamelijk onderzoek en overige laboratoriumuitlagen leveren doorgaans voldoende informatie op om de bron van een verhoogd alkalisch fosfatase te identificeren, waarbij het evaluatieschema weergegeven in figuur 3 een hulpmiddel kan zijn. Een verhoogd ALAT en γ -GT wijzen op een leverziekte of leverenzyminductie door alcohol- of medicijngebruik, terwijl een verhoogde osteoblastenactiviteit, die mede bevestigd kan worden door afwijkende calcium-, fosfaat-, vitamine-D- en parathormoonuitslagen, wijst op een botziekte, botgroei of hyperparathyreoïdie. Het scheiden van totaal AF in iso-enzymen kan de behandelend arts waardevolle extra informatie verschaffen over de conditie van de patiënt bij onbegrepen verhoogde AF-activiteit en om conclusies te trekken over behandeling en follow-up bij voornamelijk lever- en botziektes. Met name als bepaalde verhoogde fracties ogenschijnlijk niets met het ziektebeeld te maken lijken te hebben, zoals de darmfractie verhoogd kan zijn bij levercirrose, is een juiste interpretatie van de AF-iso-enzymenelektroforesepatronen onontbeerlijk. De AF-iso-enzymenbepaling is bepalend om benigne AF-verhogingen, zoals het geval bij transiënte hyperfosfatasemie, immunoglobuline-AF-complexen en familiäre hyperfosfatasemie, te onderscheiden van pathologische oorzaken, waarmee onnodig, langdurig en belastend vervolgonderzoek wordt voorkomen.



Figuur 3. Evaluatieschema van een verhoogd alkalische fosfatase.

Referenties

1. Millan JL, Manes T. Seminoma-derived Nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3024-8.
2. Henthorn PS, Raducha M, Edwards YH, Weiss MJ, Slaughter C, Lafferty MA, Harris H. Nucleotide and amino acid sequences of human intestinal alkaline phosphatase: close homology to placental alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1234-8.
3. Harris H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta* 1990; 186: 133-50.
4. Weiss MJ, Henthorn PS, Lafferty MA, Slaughter C, Raducha M, Harris H. Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 7182-6.
5. Van Hoof VO, De Broe ME. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1994; 31: 197-293.
6. Suzuki N, Irie M, Iwata K, Nakane H, Yoshikane M, Koyama Y, Uehara Y, et al. Altered expression of alkaline phosphatase (ALP) in the liver of primary biliary cirrhosis (PBC) patients. *Hepatol Res* 2006; 35: 37-44.
7. Low MG, Zilversmit DB. Role of phosphatidylinositol in attachment of alkaline phosphatase to membranes. *Biochemistry* 1980; 19: 3913-8.
8. Hawrylak K, Stinson RA. The solubilization of tetrameric alkaline phosphatase from human liver and its conversion into various forms by phosphatidylinositol phospholipase C or proteolysis. *J Biol Chem* 1988; 263: 14368-73.
9. Neale FC, Clubb JS, Hotchkis D, Posen S. Heat Stability of Human Placental Alkaline Phosphatase. *J Clin Pathol* 1965; 18: 359-63.
10. PetitClerc C. Quantitative fractionation of alkaline phosphatase isoenzymes according to their thermostability. *Clin Chem* 1976; 22: 42-8.
11. Whitby LG, Moss DW. Analysis of heat inactivation curves of alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin Chim Acta* 1975; 59: 361-7.
12. Price CP. Multiple forms of human serum alkaline phosphatase: detection and quantitation. *Ann Clin Biochem* 1993; 30 (Pt 4): 355-72.
13. Fishman WH, Sie HG. Organ-specific inhibition of human alkaline phosphatase isoenzymes of liver, bone, intestine and placenta; L-phenylalanine, L-tryptophan and L homo-arginine. *Enzymologia* 1971; 41: 141-67.
14. Bahr M, Wilkinson JH. Urea as a selective inhibitor of human tissue alkaline phosphatases. *Clin Chim Acta* 1967; 17: 367-70.
15. Van Hoof VO, Lepoutre LG, Hoylaerts MF, Chevigne R, De Broe ME. Improved agarose electrophoretic method for separating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin Chem* 1988; 34: 1857-62.
16. Stepan JJ, Silinkova-Malkova E, Havranek T, Formankova J, Zichova M, Lachmanova J, Strakova M et al. Relationship of plasma tartrate resistant acid phosphatase to the bone isoenzyme of serum alkaline phosphatase in hyperparathyroidism. *Clin Chim Acta* 1983; 133: 189-200.
17. Van Hoof VO, Hoylaerts MF, Van Mullen M, Lepoutre LG, De Broe ME. Identification of intestinal, intestinal variant, and high-Mr alkaline phosphatase with the resolve-ALP isoelectric focusing system. *Clin Chem* 1991; 37: 304-5.
18. Crofton PM, Elton RA, Smith AF. High molecular weight alkaline phosphatase: a clinical study. *Clin Chim Acta* 1979; 98: 263-75.
19. Crofton PM, Smith AF. High-molecular-mass alkaline phosphatase in serum and bile: nature and relationship with lipoprotein-X. *Clin Chem* 1981; 27: 867-74.
20. Koett J, Howell J, Wolf PL. Clinical significance of an ultrafast alkaline phosphatase isoenzyme. *J Clin Pathol* 1979; 32: 1286-92.
21. Matsushita M, Irino T, Oh-le K, Komoda T. Specific gel electrophoresis method detects two isoforms of human intestinal alkaline phosphatase. *Electrophoresis* 2000; 21: 281-4.
22. Matsushita M, Irino T, Stigbrand T, Nakajima T, Komoda T. Changes in intestinal alkaline phosphatase isoforms in healthy subjects bearing the blood group secretor and non-secretor. *Clin Chim Acta* 1998; 277: 13-24.
23. Moss DW. Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin Chem* 1992; 38:2486-2492.
24. Higashino K, Kudo S, Otani R, Yamamura Y. A hepatoma-associated alkaline phosphatase, the Kasahara isozyme, compared with one of the isozymes of FL amnion cells. *Ann N Y Acad Sci* 1975; 259: 337-46.
25. Cools M, Drop SL, Wolffenbuttel KP, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new directions, moving frontiers. *Endocr Rev* 2006; 27: 468-84.
26. Cools M, Stoop H, Kersemaekers AM, Drop SL, Wolffenbuttel KP, Bourguignon JP, Slowikowska-Hilczler J, et al. Gonadoblastoma arising in undifferentiated gonadal tissue within dysgenetic gonads. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 2404-13.
27. Lieverse AG, Essen GG van, Beukeveld GJ, Gazendam J, Dompeling EC, ten Kate LP, van Belle SA et al. Familial increased serum intestinal alkaline phosphatase: a new variant associated with Gilbert's syndrome. *J Clin Pathol* 1990; 43: 125-8.
28. Crofton PM, Kilpatrick DC, Leitch AG. Complexes in serum between alkaline phosphatase and immunoglobulin G: immunological and clinical aspects. *Clin Chim Acta* 1981; 111: 257-65.
29. Remaley AT, Wilding P. Macroenzymes: biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. *Clin Chem* 1989; 35: 2261-70.
30. Crofton PM. What is the cause of benign transient hyperphosphatasemia? A study of 35 cases. *Clin Chem* 1988; 34: 335-40.

Summary

Electrophoretic separation of alkaline phosphatase isoenzymes: nine special migration patterns. Russcher H, Lindemans J, Boonstra JG. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007; 32: 159-164.

Alkaline phosphatase is synthesized in various tissues. These isoforms, predominantly generated in the liver, bone and intestines, leak to the circulation and could be separated by electrophoresis. In this article, nine special electrophoretic migration patterns were discussed corresponding to diseases of varying aetiology. The identification and quantification of raised alkaline phosphatase levels, especially those which are difficult to explain, provide valuable information about the condition of the patient. This largely influences patient's treatment and follow-up, predominantly when benign increases in alkaline phosphatase levels could be discriminated from the pathological causes.

Keywords: alkaline phosphatase; isoenzymes; electrophoresis