

SİROZ HASTALARINDA ALKALEN FOSFATAZ  
İZOENZİMLERİNİN İKİ FARKLI YÖNTEMLE  
BELİRLENMESİ

SERHAT AKÇA

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI  
2008

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİROZ HASTALARINDA ALKALEN FOSFATAZ İZOENZİMLERİNİN  
İKİ FARKLI YÖNTEMLE BELİRLENMESİ

SERHAT AKÇA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI  
YRD. DOÇ. DR. V. KENAN ÇELİK

SİVAS  
2008

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı	Yrd. Doç. Dr. V. Kenan ÇELİK (Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)
Üye	Prof. Dr. Sevtap BAKIR (Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)
Üye	Yrd. Doç. Dr. Ercan ÖZDEMİR (Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı)

#### ONAY

Bu tez çalışması, 24/12/2008 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez 24.09.2007 tarih ve 26653 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Cumhuriyet Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 17, 18, 29, 30, 34. maddelerine dayanılarak hazırlanan Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

## ÖZET

### SİROZ HASTALARINDA ALKALEN FOSFATAZ İZOENZİMLERİNİN İKİ FARKLI YÖNTEMLE BELİRLENMESİ

Serhat AKÇA

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. V. Kenan ÇELİK

2008, 61 sayfa

Alkaleen fosfatazlar (ALP) tanımlanmış pek çok işleve sahip glikoprotein yapıda metalofosfatazlardır. Enzim alkali pH'da çeşitli monofosfat esterlerinin hidrolizini katalizler. Bakterilerden memelilere kadar tüm canlılarda birçok dokuda mevcuttur. Kemik, karaciğer, bağırsak ve plasentada yüksek konsantrasyonlarda bulunur. ALP artışının hangi dokudan kaynaklandığının anlaşılması için ALP spesifik doku izoenzimlerinin belirlenmesi gerekir.

Bu çalışmada 50 kontrol ve 50 siroz hastası olmak üzere 100 bireyin serum örneklerinde ALP izoenzimlerinin ısı inaktivasyonu ve agaroz jel elektroforez yöntemleri ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Agaroz Jel Elektroforezi yöntemi ile elde edilen ALP karaciğer izoenzimi (Jel LALP) ile Isı inaktivasyonu yöntemi ile elde edilen ALP karaciğer izoenzimi (Isı LALP) değerleri U/L ve Total ALP' in yüzde aktivitesi olarak hasta ve kontrol grubunda istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Isı LALP değeri (U/L) kontrol grubu için;  $25.08 \pm 7.75$ , hasta grubu için;  $37.00 \pm 14.58$ 'dir. Jel LALP değeri kontrol grubu için;  $39.24 \pm 15.67$ , hasta grubu için ise;  $51.83 \pm 21.18$ 'dir. Ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ ).

Isı LALP değeri (yüzde aktivite) kontrol grubu için;  $38.93 \pm 7.83$ , hasta grubu için  $40.56 \pm 9.38$ 'dir. Jel LALP değeri kontrol grubu için;  $59.81 \pm 14.20$ , hasta grubu için;  $58.19 \pm 16.80$ 'dir. Ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

Sonuç olarak,  $56^{\circ}\text{C}$ ' de 10 dakika uygulanan ısı inaktivasyonu yönteminin serum total ALP aktivitesine sebep olan izoenzimlerin belirlenmesinde çok duyarlı olmadığı saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Alkalen Fosfataz, Siroz, İzoenzim, Agaroz Jel Elektroforezi, Isı İnaktivasyonu

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF ALKALINE PHOSPHATASE ISOENZYMES IN CIRRHOSIS PATIENT BY TWO DIFFERENT METHODS

AKÇA, Serhat

Master of Science Thesis, Department of Biochemistry

Supervisor: Asist. Prof. Dr. V. Kenan ÇELİK

2008, 61 pages

Alkaline phosphatases is glycoprotein structured metalophosphatase with several defined functions. The enzyme may catalyse the hydrolysis of various monophosphate esters at alkaline pH. It is present in many tissues of all living beings from bacteria to mammals. The greatest concentrations of ALP are found in bone, liver, intestine, and the placenta. To understand which tissue caused the ALP increase specific tissue isoenzymes of ALP must be defined.

The aim of this study is; to determine the ALP isoenzymes in 100 serum samples, which are obtained from 50 controls and 50 cirrhosis patients, via heat inactivation and agarose gel electrophoresis methods.

Values of ALP liver isoenzyme obtained by Agarose gel electrophoresis method (Gel LALP) and values of ALP liver isoenzyme obtained by Heat inaktivation method (Heat LALP) were compared with each other either as U/L value or as a percentage of total ALP value in both control and patient group and the results were evaluated statistically.

Heat LALP values (U/L) were  $25.08 \pm 7.75$  for control group,  $37.00 \pm 14.58$  for patient group. Gel LALP values were  $39.24 \pm 15.67$  for control group,  $51.83 \pm 21.18$  for patient group. Difference between mean values were found to be statistically significant ( $p < 0.05$ ).

Heat LALP values (percentage for activity) were  $38.93 \pm 7.83$  for control group,  $40.56 \pm 9.38$  for patient group. Gel LALP values were  $59.81 \pm 14.20$  for control group,  $58.19 \pm 16.80$  for patient group. Difference between mean values were found to be statistically significant ( $p < 0.05$ ).

As a result, heat inactivation method performed at 56 °C' for 10 minutes was found not to be sensitive enough in determination of isoenzymes which causes increase in serum total ALP activity.

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



## TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında ve yetişmemde emeği geçen başta; sayın hocam Yrd. Doç. Dr. V. Kenan ÇELİK' e, Biyokimya alanında değerli bilgileriyle katkılarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Öge ÇETİNKAYA, Prof. Dr. Sevtap BAKIR, Doç. Dr. Hatice PINARBAŞI ve Yrd. Doç. Dr. Yavuz SİLİĞ'e, İstatistiksel analiz konusunda yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Ziyet ÇINAR' a ve dostum Dr. Dursun Erik' e, kaynak ve materyal elde etmemde yardım ve desteklerini esirgemeyen Cumhuriyet Üniversitesi, Numune Hastanesi ve Derman Polikliniđi Gastroenteroloji servis ve poliklinik çalışanlarına, destek ve ilgilerini hep yakınımnda hissettiren aileme, dostlarıma ve Biyokimya Laboratuvarı personeline yürek dolusu teőkükür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA No
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Alkale Fosfataz ( ALP).....	3
2.1.1. ALP İle İlgili Çalışmaların Tarihsel Gelişimi.....	3
2.1.2. ALP' in Bulunduğu Yerler.....	5
2.1.3. ALP' in Yapısal ve Moleküler Özellikleri.....	5
2.1.4. ALP' in Kataliz Mekanizması ve Substratları.....	7
2.1.5. ALP' in Aktivatör ve İnhibitörleri.....	9
2.1.6. ALP' in İzoenzimleri ve Özellikleri.....	10
2.1.7. Total ALP Ölçümü ve İzoenzimlerin Belirlenmesi....	14
2.1.8. ALP' in Metabolik Fonksiyonu.....	18
2.1.9. ALP Aktivitesindeki Fizyolojik Değişiklikler.....	19
2.1.10. ALP ve İzoenzimlerinin Klinik Önemi.....	20
2.2. Karaciğer Hastalıkları.....	25
2.2.1. Siroz.....	27
2.2.2. Hepatosellüler Karsinoma.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. Kullanılan Cihazlar Ve Malzemeler.....	33
3.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler.....	33
3.3. Kit bileşenleri.....	33
3.4. Hasta Ve Kontroller.....	34
3.4.1. Hastalar .....	34
3.4.2. Kontroller .....	34
3.5. Kan Örneklerinin Alınması.....	34
3.6. Total ALP Analizi.....	35
3.7. Agaroz Jel Elektroforezi.....	35
3.8. Isı İnaktivasyonu.....	35
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	39
5. BULGULAR.....	40
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
KAYNAKLAR.....	50

EKLER		
EK-1	HASTALAR İÇİN SORGU FORMU.....	55
EK-2	VERİLER.....	57
EK-3	YEREL ETİK KURUL KARARI.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....		61

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	ALP' in genel reaksiyonu.....	3
Şekil 2.2	ALP enziminin moleküler yapısı.....	7
Şekil 2.3	ALP enzim aktivitesi.....	8
Şekil 2.4	Alkalen fosfataz izoenzimlerinin kromozom konumları .....	11
Şekil 2.5	4 - NPP' in hidrolizi.....	14
Şekil 2.6	Karaciğer hastalığının normal geçmişi.....	27
Şekil 3.1	Agaroz Jelde Bantların görünümü.....	38
Şekil 5.1a	Kontrol grubunda yaş dağılımı.....	40
Şekil 5.1b	Hasta grubunda yaş dağılımı.....	41
Şekil 5.2a	Kontrollerde Doğrusal Regresyon Analizi.....	44
Şekil 5.2b	Hastalarda Doğrusal Regresyon Analizi.....	44
Şekil 5.3a	Hasta grubunda inaktif karaciğer fraksiyonunun dağılımı.....	45
Şekil 5.3b	Kontrol grubunda inaktif karaciğer fraksiyonunun dağılımı...	45
Şekil E1.1	Hasta ve kontroller için sorgu formu	55
Şekil E2.1	Kontrol Gubu Verileri	57
Şekil E2.2	Hasta Grubu Verileri	58

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Alkalen fosfataz izoenzimlerinin dizi benzerlikleri.....	11
Çizelge 2.2	İnsan doku Alkalen fosfataz izoenzimlerinin ayırım özellikleri.....	18
Çizelge 2.3	Tümör göstergesi olabilen bazı enzimler.....	23
Çizelge 2.4	Sirozun sınıflaması.....	28
Çizelge 5.1a	Kontrol grubu için tanımlayıcı istatistiksel değerlendirme.....	42
Çizelge 5.1b	Hasta grubu için tanımlayıcı istatistiksel değerlendirme.....	42
Çizelge 5.2a	U/ L Paired Samples T Testi.....	43
Çizelge 5.2b	Yüzde Paired Samples T Testi.....	43
Çizelge E1.1	Hasta ve kontroller için sorgu formu	55
Çizelge E2.1	Kontrol Gubu Verileri	57
Çizelge E2.2	Hasta Grubu Verileri	58

## KISALTMALAR DİZİNİ

2A2M1P	2-amino-2-metil-1-propanol
ALP	Alkalen Fosfataz
ACP	Asit fosfataz
AFP	Alfa fetoprotein
BALP	Kemik alkalen fosfataz
cDNA	Komplementer DNA
CEA	Karsino embriyonik antijen
DEA	Dietanolamine
DM	Diabetes Mellitus
E. coli	Escherichia coli
ER	Endoplazmik retikulum
GALP	Germ hücresi alkalen fosfataz
GGT	Gama glutamil transferaz
GPI	Fosfatidil inositol glikan
HCC	Hepatosellüler karsinoma
HMW-ALP	Yüksek molekül ağırlıklı Alkalen fosfataz
IFCC	Uluslararası Klinik Biyokimya ve Tıbbi Laboratuvarlar Federasyonu
IgG	İmmünglobulin G
İALP	Bağırsak alkalen fosfataz
LALP	Karaciğer alkalen fosfataz
mRNA	Haberci RNA
PALP	Plasenta alkalen fosfataz
Pi	İnorganik fosfat
PNNP	p- nitrofenil fosfat
PNP	p- nitrofenol
TNALP	Dokuya özgü olmayan alkalen fosfataz
TRIS	Hidroksimetil aminometan
TSALP	Dokuya özgü alkalen fosfataz

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik karaciğer hastalıkları, hepatosellüler hasar ile karakterize olup, genellikle karaciğer fibrozu ve karaciğer sirozu ile sonuçlanmaktadır. Siroz, karaciğerin anatomik yapısının fibrozis ve nodülleşme sonucu bozulması olarak tanımlanan kronik ve çoğu kez ilerleyici bir hastalıktır. 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 aşırı alkol kullanımı iken ülkemizde viral hepatitlerdir ve bunu biliyer nedenler izlemektedir [1-3].

Karaciğer sirozu morfolojik özelliklerine, fonksiyonel durumuna, klinik evresine ve etiyojisine göre sınıflandırılabilir. Siroz etiyojisi ne olursa olsun bir prekanseröz lezyondur. Sirozlu hastalarda yıllık Hepatosellüler karsinoma (HCC) gelişim insidansı % 3,4 bulunmuştur [4,5]. HCC karaciğerin en sık görülen primer malign tümörüdür. Kronik karaciğer hastalığı zemininde gelişir. Hepatositlerden köken alan HCC' nin tüm maligniteler içinde görülme sıklığı % 2'dir. Prevelansı 100,000'de 4 olarak bildirilmiştir [6]. Türkiye'de tümörün sıklıkla ileri yaşlarda ve sirotik karaciğer zemininde meydana geldiği rapor edilmiştir. 207 HCC' lı hasta üzerinde yapılan bir çalışmada sirozla birliktelik %87 olarak bulunmuştur [7]. Semptomatik HCC' da 5 yıllık sağ kalım %0-10 iken rezeksiyon veya karaciğer transplantasyonu yapılan grupta bu oran %50 civarındadır. Bu nedenle erken evrede hastalığı yakalamak önem arz eder [8].

Enzimlerin tümör belirteci olarak kullanımı onkofetal antijenlerin bulunması ve monoklonal antikorların ortaya çıkışından öncedir. Artmış enzim düzeyleri malignite konusunda uyarı olabilir. Enzimlerin izoenzimleri ek bir organ özgüllüğü sağlayabilir. Alkalin fosfataz (ALP) düzeyleri birçok karaciğer hastalığında yükselmekle birlikte en sık safra akımının engellendiği intra ve ekstrahepatik kolestazda veya primer metastatik karaciğer tümörlerinde yükselmektedir. ALP; karaciğer kanserlerinde, granüloamatöz hepatitlerde ve infeksiyöz mononükleoz gibi hastalıklarda fazlasıyla yüksek bulunur [9,10].

ALP alkali ortamda farklı türlerdeki fosfat esterlerinin hidrolizini katalizleyen glikozilfosfotidilinozitol ile hücre membranına bağlı glikoprotein özellikli bir enzimdir. Enzimi magnezyum kobalt ve mangan gibi iyonlar aktive ederken kalsiyum ve inorganik fosfat inhibe eder, çinko ise yapısal rol oynar. Enzimin başlıca kaynakları; osteoblastlar, hepatositlerin kanaliküler yüzü, biliyer epitelyumun lümen bakan yüzü,

ince barsakların fırçamsı kenarı, böbrekte proksimal tubulus, plasenta ve lökositlerdir. Normal şartlarda insan serumu 4 farklı kaynaktan ALP izoenzimi içermektedir. Bunlar; kemik, karaciğer, ince barsak ve gebelikte plasenta dokularından kaynaklanırlar. İzoenzimleri arasındaki farkı, yapıda değişik oranda bulunan siyalik asit oluşturur ve plasental izoenzimin protein miktarı da farklıdır [11,12].

Serum ALP konsantrasyonu özellikle hepatobilyer hastalıklar ve osteoblastik aktivitenin arttığı kemik hastalıklarında artar. Bu gibi durumlarda hangi dokuya ait izoenzimin arttığının belirlenmesi son derece önemlidir. Bu amaçla ALP spesifik doku izoenzimlerinin ölçülmesi gereklidir. ALP izoenzimlerinin ayırımında, elektroforetik göçlerindeki farklılıklar, sıcaklık veya üre ile denatürasyona dayanıklılık farkları, seçilmiş inhibitörler varlığında yanıt farklılıkları, çeşitli substratlarla reaksiyon hızlarındaki farklılıklar ve immünokimyasal karakteristik farklılıklara dayanan yöntemler kullanılır. Karaciğer, kemik, bağırsak ve plasental kökenli ALP' ın ayırımında agaroz jel elektroforezi ve poliakrilamid jel elektroforezi en güvenilir metodlardır. Plasental ALP ve bazı kanserlerde görülen Germ hücresi ALP izoenzimleri 65 °C ısıda stabildir. Bağırsak ALP ve dokuya özgün olmayan ALP (kemik, karaciğer ve böbrek ALP ) 65 °C ısıda inaktif olur [10,13,14].

Bu çalışmada; ALP izoenzim ayırımında kullanılan ve güvenilirliği kanıtlanmış olan agaroz jel elektroforezi yöntemi ile rutin kullanım için uygun, maliyeti düşük ısı inaktivasyonu yöntemini kullanarak siroz hastalarında ALP izoenzimlerinin belirlenmesi ve iki yöntem arasında anlamlı bir ilişkinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.





farklı canlı türlerinin organ ve dokularından saflaştırılarak fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir [17].

1923'te Robinson, ALP' in kemiğin mineralizasyonunu sağlayarak kemik gelişiminde rol oynadığını, Bertsen ve Van den Bos' da ALP'ın fosfat iyonlarının konsantrasyonlarını artırarak kemik kalsifikasyonunu sağladığını göstermişlerdir. Yine 1923 yılında Bodansky, serum ALP'ın tek bir dokudan değil birçok dokudan kaynaklandığını saptamıştır [18,19]. 1930 yılında Roberts ve arkadaşları tarafından tıkanma sarılığına bağlı serum ALP aktivitesinde bir artış olduğunu tesbit etmişlerdir [20]. Sonraki yıllarda karaciğerin birçok malign ve benign hastalığında ALP aktivitesinin arttığı saptanmıştır. 1941'de Gomori, bağırsakta epitelyum hücrelerinin yüzeyinde pozitif bir ALP aktivitesi gözlemiş, 1934 yılında Coryn gebelik esnasında serum ALP'nın arttığını bulmuş, 1950 yılında Jung ve arkadaşları bu artışın plasentadan gelen bir izoenzime bağlı olduğunu iddia etmişlerdir. Memeli lökositlerinde ALP enziminin varlığı, ilk olarak Roche tarafından ortaya çıkarılmış ve lökosit ALP düzeyinin %85'inin sitoplazmik granüllerde yer aldığı gözlenmiştir [21-22].

1954 yılında ise ilk kez serum ALP'nın birden çok değişik formu olabileceği kağıt elektroforezinde iki bandın gözlenmesiyle ortaya çıkmıştır. 1961 de Boyer ALP' ın 15 den fazla izoenzime sahip olduğunu göstermiştir [23]. 1960 yılından sonra yapılan çalışmalarda özellikle akciğer, meme, serviks kanserleri başta olmak üzere birçok kanserde tümör dokusundan, kinetik özellikleri plasental ALP' a benzeyen ısıya dayanıklı bir enzimin ektopik olarak salgılandığı saptanmıştır [24]. 1968'de Fishman serum ALP seviyesi çok yüksek olan akciğer kanserli bir hastanın tümöral dokusunun ALP ihtiva ettiğini ve serumdaki enzimin bu dokudan dolaşıma geçtiğini gözlemiştir. Buna ilk bulunan vakanın adına izafeten Regan izoenzimi adı verilmiştir. Aynı yıllarda Timperley serum ALP'ı yüksek olan bir şahısta tümörün ALP ihtiva ettiğini fakat bu izoenzimin Regan izoenziminden ısı hassasiyeti ve aminoasit inhibisyonu bakımından farklı bir izoenzim olduğunu gözlemiştir ve bu izoenzime Nagao izoenzimi adı verilmiştir. Daha sonraki yıllarda hepatomalı bir hastada bağırsak ALP benzeri Kasahara izoenzimi bulunmuştur [25,26].

Son yıllarda çalışmalar ALP enziminin genetik yapısını aydınlatmaya yönelmiştir. Özellikle plasental ALP izoenziminin, gen seviyesinde ortak allellerin kombinasyonlarındaki farklılığa bağlı olarak polimorfizm gösterdiği ve 15 ayrı fenotipinin olduğu saptanmıştır [27].

### **2.1.2. ALP' in Bulunduğu Yerler**

Alkalen fosfataz tabiiatta prokaryotlardan ökaryotlara birçok canlı türünde bulunmaktadır. Memeli türlerinin büyük çoğunluğunun doku, kan ve sekresyonlarında ALP varlığı gözlenmiştir. En yüksek aktivitenin görüldüğü dokular etkin taşımının olduğu böbrek proksimal tübülleri, bağırsak epiteli, karaciğer ve plasentadır. Osteoblastlar, safra kanallikülleri ve meme bezleride ALP' ca zengindir. Mide, endokrin bezler ve granüler lökositler ise ALP'ın az bulunduğu dokulardır. Enzimin doku içi dağılımının homojen olmadığı böbrek ve intestinal mukozada yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır [28-30].

Alkalen fosfatazın hücre içi yerleşimi yüksek devirli santrifüj ve elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda ALP' in en fazla hücre membranında, daha az olarakta çekirdek ve golgi aparatında yer aldığı saptanmıştır. ALP hücre yüzeyinde özellikle hücre dışı membranının hemen altında yer alır. Sandborn ve arkadaşları, ince bağırsak epitelyum hücrelerindeki mikrovillüslerin plazma membranında ve lateral hücre membranında enzim aktivitesinin yüksek olduğunu, ayrıca apikal veziküller, golgi kompleksi, lizozomlar ve endoplazmik retikulumda (ER) az da olsa ALP aktivitesi bulunduğunu saptamışlardır [29,30]

ALP sitoplazmik membrana fosfatidil inositol glikan (GPI) molekülü aracılığıyla tutunur. GPI molekülüne karboksil ucundan bağlanır ve bu yapı sayesinde membranın hücre dışına bakan yüzeyine tutunur. Bu yapının varlığı, membrana bağlı fosfotidilinositole özgü olan fosfolipaz C' nin fosfotidilinositolü parçalaması ve ALP' ın membran içine salınımıyla kanıtlanmıştır [31].

ALP' in sentezi ve lokalizasyonuna ait çalışmalarda, enzimin endoplazmik retikulumda sentezlendiği, golgi cisimciğinde glikozillendikten sonra hücre membran yüzeyine ulaştığı gözlenmiştir. Hücre membranında ALP lateral mobilite gösterir ve keseciklerde birikir. ALP' ın dolaşıma giriş mekanizması karaciğer, kemik, ince bağırsak, böbrek ve plaseenta gibi enzimce zengin hücre yüzey mikrovilluslarının hasarına bağlıdır. Serumda ALP katabolizması diğer proteinler ile benzerlik göstermektedir. Damardan, işaretli plasental ALP verilerek yapılan çalışmalarda enzimin yarı ömrünün 7 gün olduğu saptanmıştır [9,31,32].

### **2.1.3. ALP' in Yapısal ve Moleküler Özellikleri**

Çeşitli hayvansal dokulardan elde edilen ALP' lar 40.000 – 200.000 dalton arasında değişen molekül ağırlığına sahiptirler. E. coli ALP monomerlerinin molekül ağırlığı

40.000 ve 45.000 daltondur. Plasental ALP' in molekül ağırlığı ise 58.000 ve 116.000 dalton olarak bulunmuştur [33,34].

ALP grubu enzimler, alkali pH da maksimum aktivite gösteren, fosfat monoesterlerinden inorganik fosfat (Pi) ayrılmasını katalize eden ve herbir monomerinin aktif merkezinde iki  $Zn^{+2}$  ve bir  $Mg^{+2}$  iyonu bulunduran dimerik metaloproteinlerdir. Çinko ve magnezyum iyonlarının oluşturduğu bu yapı içerisinde metallerin birbirine uzaklıkları 3.94, 4.88 ve 7.09 Å 'dur. Dimerik yapılanma ve divalen katyonların uygun oranda varlığı enzimin aktivitesi için gereklidir.  $Zn^{+2}$  iyonu enzimin prostetik grubunu oluşturur, katalitik aktivite için önemlidir ve substrat bağlanmasında rol alır [11,17,33].

Memelilerdeki ALP izoenzimleri çeşitli derecelerde glikozillenmiş proteinlerdir. Enzim üzerindeki karbohidrat zincirleri, N-bağlı glikozillenme özelliği gösterir. Bu tip glikozillenme protein üzerindeki asparajin kalıntısı üzerinden gerçekleşir. Karbohidrat içerikleri kaynaklandıkları dokuya göre farklılık göstermektedir. Plasental ALP'da fukoz, mannoz, galaktoz bulunmaktadır. ALP' in ince bağırsak izoenzimi hariç diğer izoenzimleri önemli miktarda sialik asit içermektedir. Bu karbohidrat yapılar enzimatik aktivitenin korunmasına yardımcı olmaktadır. Karaciğer alkaleen fosfatazında bulunan sialik asit enzimin aktivitesini regüle etmektedir. Oligosakkarit, proteine translasyon sırasında ER' un lümen bölgesinde eklenir. Bu zincire eklenecek şekerler bazı proteinler için ikincil bir adres işlevi görerek nerede bulunmaları gerektiğine dair veri teşkil ederler. Glikoproteinler üzerindeki karbohidrat kalıntıları, kanserden gelişime kadar pek çok fiziksel olayın habercisi olabilir. İnsanlarda çeşitli dokulardan elde edilmiş ALP enziminin aktivitesinin devamlılığı karbohidrat gruplarının özellikleriyle ilgilidir [35-38].

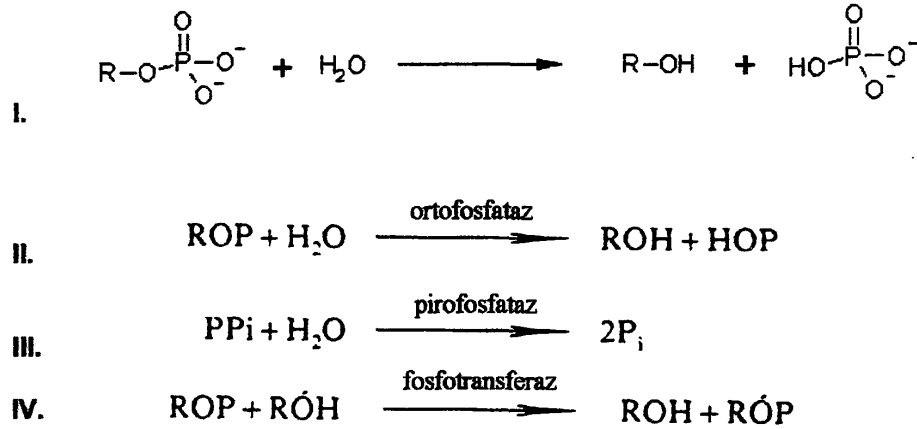
İnsan ALP enziminin primer yapısı incelendiğinde, aktif merkezin etrafında 36 amino asitin dizili olduğu görülmüştür. Bu yapı E. coli ALP' ında bulunmamaktadır. Enzimin aktif merkezinde serin kalıntısı bulunmakta ve bu kalıntı enzimin tersinir olarak fosforilasyonunu sağlamaktadır. Bakteri ve memeli ALP' larının cDNA klonları ve birincil yapıları karşılaştırılmış ve %25-30 oranında dizi benzerliği olduğu görülmüştür [17,33,39]. İnsan plasental ALP' ının aminoasit bileşimi %50 oranında nonpolar aminoasitlerden oluşmaktadır. Farklı araştırmacılar aynı doku için farklı sonuçlar elde ettiğinden alkaleen fosfatazların bazı özellikleri kesin olarak öğrenilememiştir. ALP' ın moleküler yapısı hakkındaki araştırmalar devam etmektedir [34,38]. ALP enziminin moleküler yapısı Şekil 2.2' de görülmektedir.



**Şekil- 2.2.** ALP enziminin moleküler yapısı: Beta tabakaları harflerle, alfa sarmalları ise başlangıç kalıntısının sayısıyla belirtilmiştir.

#### 2.1.4. ALP' in Kataliz Mekanizması ve Substratları

ALP alkali pH' da fosfat esterleri ve fosfoproteinlerden inorganik fosfatı hidrolitik olarak ayırmaktadır. Enzimin aktivitesi için lizinin  $\text{NH}_2$  grubu, sisteinin SH grubu ve çinko iyonu gereklidir.  $\text{NH}_2$  grubu enzime substrat bağlanmasında, SH ve çinko ise katalitik aktivitede rol almaktadır. Enzimin katalitik bölgesinde yer alan Mg iyonu, Zn iyonlarına yakın bir konumda yer almasına rağmen katalitik aktiviteye katılmaz. Reaksiyon iki basamakta gerçekleşmektedir. Birinci basamakta enzim-substrat kompleksi oluşur sonra substrat hidrolizi ile fosforillenmiş enzim ve ürün oluşur. İkinci basamakta ise fosforillenen enzimden hidroliz ile serbest enzim ve inorganik fosfat açığa çıkar. ALP enziminin katalizlediği reaksiyonlar Şekil 2.3' de gösterilmektedir [17,40-43].



- I. Fosforik asit esterlerinin hidrolizi
- II. Ortofosfat esterlerinin hidrolizi
- III. İnorganik fosfatın hidrolizi
- IV. Fosfat grubunun alıcı bir alkole transferi

### Şekil- 2.3. ALP enzim aktivitesi

ALP aktivitesinin belirlenmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Kolaylıkla hidroliz olan substrat veya fosfat alan tamponlar ile ölçümün sürekli izlenmesini sağlayan yöntemler seçilerek, çalışmanın hızının ve duyarlılığının artırılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Enzimin katalitik aktivitesi, substrat türü ve konsantrasyonuna, pH' ya, aktivatör ve inhibitörlerin konsantrasyonuna, enzim miktarına ve tampon tipine göre değişmektedir [44].

İnsan doku alkalen fosfatazları substratlara karşı farklı afinite gösterir. Enzimin substrat spesifikliğı düşüktür. İnsan doku alkalen fosfatazlarının tipik substratları; primer ve sekonder alkollerin fosfat esterleri, şeker alkoller ve fenollerin fosfat esterleri, nükleozid monofosfatlardır. Alkale fosfataz aktivite tayinlerinde en çok kullanılan substratlar:  $\beta$ -gliserofosfat, fenil fosfat, p-nitrofenil fosfat,  $\beta$ -naftil fosfat, fenolftalein monofosfat ve timolftalein fosfattır [45].

ALP için en popüler kromojenik substrat 4- nitrofenil fosfattır (4- NPP olarak kısaltılır ama eski ismi p- nitrofenil fosfattan ötürü PNNP olarak da kısaltılmaktadır). ALP ile katalizlenen 4-NPP' nin hidrolizi sonucu dilüe asidik çözeltilerde renksiz olan fosfat ve serbest 4- nitrofenol (4- NP, PNP) oluşur. Alkali ortamda 4-NP, koyu sarı

renkli 4- nitrofenoksid iyonuna çevrilir. Bu ALP yöntemlerinde açığa çıkan fosfat grubu suya aktarılır. Fosfataz etkisinin hızı, tampon olarak kullanılan bazı alkoller ile artırılır. Bu aktivatörler arasında 2-amino-2-metil-1-propanol (2A2M1P), dietanolamine (DEA), hidroksimetil aminometan (TRIS) ve N- metil- D- glukamin bulunur. Substrat olarak 4-NP ve fosfat alıcı tampon olarak 2A2M1P kullanılması IFCC tarafından önerilir. 4-NPP alkali pH' da rensiz olup 311 nm.'de maksimum absorbans verir. Reaksiyon ürünü 4- NP ise sarı renkli olup 403 nm. 'de pik yapmaktadır [42,44,45].

### 2.1.5. ALP' ın Aktivatör ve İnhibitörleri

ALP' ın inhibitörleri; metal şelatı oluşturan maddeler, bazı +2 değerli katyonlar, ortofosfat ve benzeri polivalan anyonlar olmak üzere 3 grup da toplanmaktadır. Metal şelatı oluşturan maddelerin başında EDTA gelmektedir. Sistein,  $\alpha$ -dipiridil ve fenantrolin'de metal şelatı yapmaktadır. Bu maddeler enzimin yapısındaki çinko ile şelat yaparak ALP' ı kuvvetle inhibe etmektedir. Zayıf etkili metal şelatı oluşturan maddeler histidin, siyanür, iyodobenzoat, iyodo asetamid ve serindir. Bunlar yüksek konsantrasyonda inhibisyon yapar. İnhibitör etkili +2 değerli metal iyonlar; Be, Cd, Ni, Sn, Hg, Fe'dir.  $Zn^{+2}$  düşük konsantrasyonlarda ( $10^{-6}$  M) aktivatör etkili olmasına rağmen  $10^{-4}$  M'da intibitör etkilidir. Polivalan anyonlar; poliöstradiol fosfat ve polifluoretan fosfattır. Böbrek ve bağırsak izoenzimini kuvvetle inhibe ederler. Arsenat, pirofosfat, borat, oksalat, karbonat ve vanadat da enzimin inhibitörleridir [46,47]. Taurokolat; karaciğer, kemik, böbrek alkalen fosfatazını, L-fenil alanin ise bağırsak, plasenta ve Regan izoenzimlerini kuvvetle inhibe etmektedir. ALP' ın tüm izoenzimleri fosfat tarafından kompetitif tipte inhibe edilir [46].

Aminoasitlerin yalnız L- formları enzimin zayıf inhibitörleridir, D- formları ise etkisizdir. L-homoarginin, L- triptofan, L-fenil alanin bağırsak ve plasental alkalen fosfatazları inhibe eder. Levamizol ve imidazol karaciğer ve kemik izoenzimlerini ankompetitif tipte inhibe eder. Alfostatin karaciğer izoenzimini, triptofan ise plasental izoenzimi inhibe eder. Memeli karaciğer alkalen fosfatazı üzerine yapılan çalışmada 2 M ürenin enzimi %60 oranında, 3 M ürenin enzimi %90 oranında inhibe ettiği, 4 M ürenin ise enzimi tamamen inaktif hale geçirdiği tespit edilmiştir [48,42].

Özellikle  $Zn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve  $Co^{+2}$  gibi iki değerlikli metal iyonlarının ALP' ın aktivatörleri olduğu saptanmıştır. Bu metal iyonları içinde  $Zn^{+2}$  aynı zamanda enzimin yapısında da bulunduğundan enzimin optimal aktivite gösterebilmesi için  $Mg^{+2}/ Zn^{+2}$  oranı çok önemlidir. İnce bağırsak alkalen fosfatazı için spesifik aktivatör sodyum

deoksikolat'dır.  $Zn^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  'un yüksek konsantrasyonları ise enzimi inhibe etmektedir [33,44].

### 2.1.6. ALP İzoenzimleri ve Özellikleri

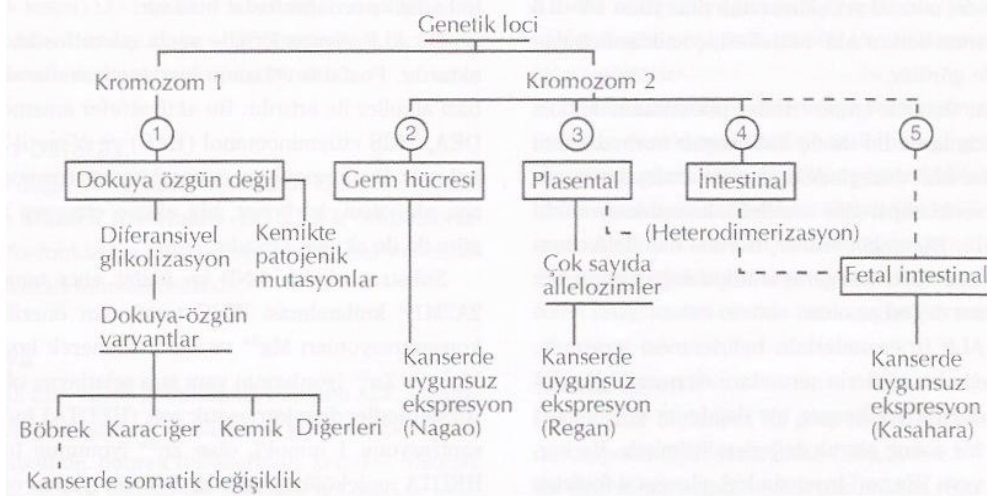
Katalitik aktiviteleri aynı, ancak elektroforetik göç hızları, doku dağılımları, ısıya, aktivatör ve inhibitörlere yanıtları farklı olan enzim formlarına izoenzim denir. İzoenzimler aynı tepkimeyi kolaylaştırırlar fakat izoenzimler arasında bu ortak tepkimede substratın cinsi ve konsantrasyonu, optimum pH, çeşitli inhibitör ve aktivatörlerin etkinliği yönünden büyük farklılıklar vardır [49].

ALP' larda kısmen genetik faktörler kısmende post-translasyonel modifikasyonlardan dolayı dolaşımında çeşitli izoenzim formlarında bulunurlar. İnsan ALP izoenzimleri glikoprotein yapıdadır ve protein kısımları en az dört farklı gen tarafından kodlanmaktadır. [11,50]

1. Dokuya özgü olmayan alkalin fosfataz (TNALP) lokusu; karaciğer alkalin fosfataz (LALP), kemik alkalin fosfataz (BALP) ve böbrek alkalin fosfatazı kodlar. TNALP birçok dokuda sentezlenir [51].
2. Bağırsak lokusu; bağırsak mukozasında bağırsak alkalin fosfatazını (İALP) eksprese eder. İALP epitelyum hücrelerinin membranında sentezlenir [52].
3. Plasenta lokusu; plasenta alkalin fosfatazını (PALP) kodlar. Hamileliğin 8. haftasından itibaren plasentada eksprese edilir. Bu süre boyunca sinsitiotrofoblastlarda sentezlenir. Akciğer ve servikste de az miktarda eksprese edilir [53].
4. Plasentaya benzer (Germ Hücresi) alkalin fosfataz lokusu; germ hücresi alkalin fosfatazı (GALP) kodlar. Bu izoenzim özellikleri ve yapısıyla plasental alkalin fosfataza benzer. Sağlıklı bireylerin testis ve timusların da bulunur [54].

İnsan genomunda bu dört lokusun dışında İALP' in fetal ve yetişkin formları bulunmaktadır. Ancak bu farklılığın, protein kısmının farklı lokuslarda kodlanmasından mı, yoksa mRNA ya da protein seviyesinde kırılma farklılıklarından mı kaynaklandığı bilinmemektedir (Şekil 2.4)[44].





**Şekil 2.4.** Alkalen fosfataz izoenzimlerinin kromozomal konumları.

Bağırsak, plasenta ve germ hücresi lokusları birbirleriyle yakın konumda 2 numaralı kromozomun uzun kolunun sonunda yer alırlar [2(q34-q37)]. TNALP lokusu ise 1 numaralı kromozomun kısa kolunun sonuna yakın konumlanmıştır [1(p36-p34)] [11].

TNALP geninin posttranslasyonel modifikasyonu ile oluşan BALP, LALP ve böbrek ALP' lar izoenzim olarak adlandırılırsalarda gerçekte tek bir gen ürününün modifikasyonundan oluşan izoformlardır. Bu izoformların farklı elektroforetik mobiliteleri sialik asit içeriklerine bağlıdır [51].

PALP, GALP ve İALP genleri ve ürünleri benzer baz ve aminoasit dizilerine sahiptir. Plasental ve germ hücre ALP arasında yalnızca 7-10 aminoasit birimi fark vardır ve % 98 homoloji gösterir. Plasental ve bağırsak ALP arasında % 87 homoloji vardır. Bağırsak ALP ile TNALP arasında % 56,6 dizi homolojisi mevcuttur (Çizelge 2.1)[11,27].

**Çizelge 2.1.** Alkalen fosfataz izoenzimlerinin dizi benzerlikleri

	% dizi benzerlikleri
Plasental ile Germ Hücresi ALP	% 98
Bağırsak ile Plasental ya da Germ Hücresi ALP	% 87
TNALP ile Bağırsak ve Plasental ya da GALP	% 50-60

Plasental ALP' in diğer izoenzimlerden fizikokimyasal farklılığı net olarak ortaya konmuştur. İnsan plasentası 3. trimesterin sonuna kadar dokuya özgü olmayan alkalin fosfatazi sentezler. Hamileliğin 12. haftasından sonra maternal dolaşıma salınır. Placenta alkalin fosfatazi oldukça polimorfik bir enzimdir, 3 genel varyantı ve 15 alleli vardır. Diğer alkalin fosfataz izoenzimleri placenta alkalin fosfatazi kadar çeşitli polimorfizm göstermezler [27, 53].

ALP izoenzimlerini birbirlerinden ayırmak için, değişik substratlarla reaksiyon hızlarındaki göreceli farklar, verilen inhibitörlere karşı farklı tepkiler, ısı ya da üre ile denatürasyona karşı farklı dirençler, elektroforetik göçlerindeki farklılıklar ve immünokimyasal özellikler gibi kriterler kullanılır. Bu metodlarla serumda 11 farklı izoenzim tesbit edilmiştir. Normal şartlarda insan serumu 4 farklı kaynaktan ALP izoenzimi içermektedir. Bunlar; kemik, karaciğer, ince barsak ve gebelikte plasentadır [11,42,44].

**a) Karaciğer ALP:**

Hepatositlerin sinüsoidal membranlarında, safra kanallarının mikrovilluslarında, vena portal ve vena santralisin endotel hücrelerinde lokalizedir. Karaciğer izoenziminin iki tipi vardır. 1. Hepatositlerden salınan yavaş tip, 2. Plazma membranından köken alan yüksek moleküler ağırlıklı ve daha hızlı tip. Enzimin bu formuna fast liver veya biliyer ALP adı verilir [55].

**b) Kemik ALP:**

Osteoblastların plazma membranına yerleşik bir protein olup osteoblast aktivitesi varsa dolaşıma salınır. Osteoblastlar tarafından üretilir ve kemik yapımı için esansiyeldir. Kemikte pirofosfatı hidrolize ederek, hidroksiapatit kristallerinde depolanmak üzere gerekli olan fosfatı sağlar ve mineralizasyonu aktive eder [56].

**c) İntestinal ALP:**

Bağırsak epitelyum hücrelerinin membranında yüksek derişimde yer alır. Ca iyonuna bağımlı ATPaz aktivitesi gösterir, yağ asitlerinin transportunda ve kalsiyum emiliminde görev alır. Diğer izoenzimlerden en önemli farkı sialik asit bulundurmamasıdır. Bu özelliği dolayısıyla neuraminidaza dirençlidir [42,52]. Karaciğer ve kemik fosfatazların serumdaki düzeyini, üretildikleri dokudan dolaşıma giriş hızları belirlerken bağırsak ALP' in serum düzeyini esas olarak dolaşımdan alınma hızı belirler. Bağırsak ALP

dolaşıma büyük oranda torasik lenf yoluyla girer. Dolaşımdan temizlenmesi oldukça hızlıdır. Bu yüzden kan grubu B ve 0 olanlarda bile serum aktivitesi oldukça düşüktür. Serum İALP ve hastalıklar arasında iyi bir korelasyon kurulamaz ancak kronik karaciğer hastalarında özellikle sirozda kan grubu B ve 0 olanlarda İALP aktivitesinde artış gözlenmiştir [52,12].

#### **d) Plasental ALP:**

Plasenta da sinsityotrofoblastların mikrovillüslerinden salgılanan bir glikoproteindir. Plasental izoenzimin en önemli özelliği ısıya dayanıklılığıdır. 65 °C' de 30 dakika bekletildiğinde aktivitesinde bir değişiklik olmaz, bu ısıda diğer izoenzimler aktivitelerini tam olarak kaybederler [29]. Plasental ALP gebelik sırasında gerekli antikörlerin anneden fetüse geçmesini sağlamaktadır. Plasental ALP Fc reseptörü olarak görev almakta ve gestasyon sırasında pasif immünizasyonu sağlayan maternal IgG lerin fetüse geçmesini sağlamaktadır [57]. Plasental ALP sadece insan ve büyük maymunlarda görülen bir enzimdir [53].

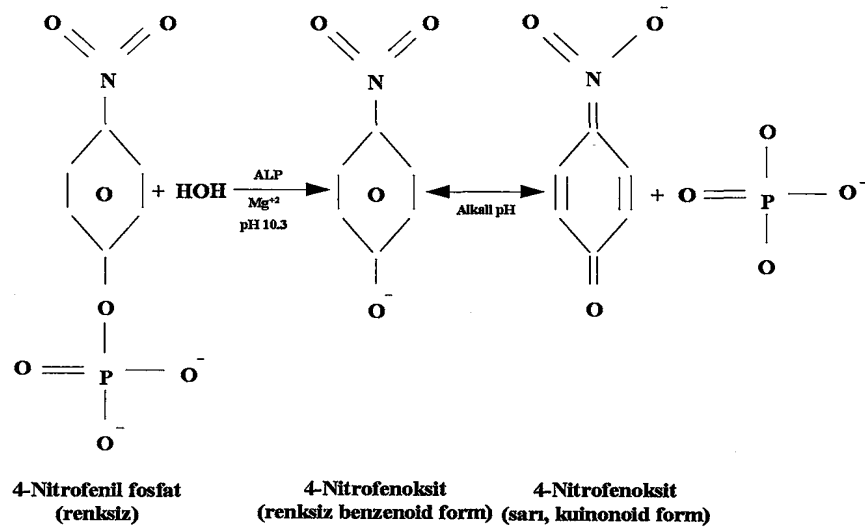
Çeşitli doku alkalen fosfatazlarının sıcaklığa karşı stabiliteleri farklıdır. Alkalen fosfataz ısı ile denatürasyona uğratıldığında kemik, karaciğer, bağırsak ve plasenta izoenzimlerine ayrılır. Serum 56 °C' de ısıtılınca kemiğe ait enzim %90-100 oranında, karaciğer ve bağırsak enzimi %50-60 oranında aktivite kaybetmektedir [16]. 56 °C ve 65 °C enzimlerin sıcaklıkla denatürasyonunda sınır derecelerdir. Bu sıcaklık derecelerindeki denatürasyon izoenzimlerin tiplendirilmesinde kullanılan önemli bir kriterdir. Enzim 37 °C' de maksimum aktivite gösterir. Isıya en dayanıksız olan izoenzim kemik alkalen fosfatazı, en dayanıklı olan izoenzim ise plasental alkalen fosfatazdır. Regan izoenzimi de ısıya dayanıklıdır [13,29,44].

Serum ALP' ı +4 °C' de 20 gün, -20 °C' de dondurulduğunda birkaç ay stabil kalmaktadır. Saf enzime çinko ilave edilince (0,2 mM) -20 °C' de bir yıl stabil kalmaktadır [16].

ALP, alkali ve nötral pH' da stabildir, asit pH' da stabilitesini kaybeder. ALP' lar pH = 7' nin üstünde aktivite gösterir. Çeşitli dokulardan elde edilen alkalen fosfatazların optimum pH' ları farklıdır. Karaciğer alkalen fosfatazı için optimum pH = 10.2' dir. Bağırsak alkalen fosfatazı için optimum pH = 7.35' dir [29]. Çeşitli çalışmalarda substrat konsantrasyonunun azalması ile optimal pH' nın azaldığı tespit edilmiştir. Sığır ince bağırsak alkalen fosfatazı üzerinde yapılan araştırmada ısı ve pH' nın artırılmasıyla enzimin  $\alpha$ -heliks yapısının bozulduğu görülmüştür [48].

### 2.1.7. Total ALP Ölçümü ve İzoenzimlerin Belirlenmesi

ALP ölçümünde en yaygın kullanılan substrat daha önce de belirttiğimiz gibi 4-nitrofenil fosfattır (4-NPP ya da PNPP). 1946' da Bessey, Lowry ve Bock fenil fosfat yerine 4-NPP' i kullanmışlardır. Bu ester renksizdir fakat reaksiyon ürünü olan 4-nitrofenol alkali koşullarda sarı renkli olan 4- nitrofenoksit iyonlarını (kuinonoid form) oluşturur. 4- nitrofenoksit iyonlarının sarı renk oluşturma hızının sürekli izlenmesiyle reaksiyon gözlenebilir. Bu reaksiyon ALP ölçümü için önerilen standart metodun temelidir. 4- nitrofenil fosfatın, 4- nitrofenole dönüşüm hızı 30 °C' de 405 nm.'de spektrofotometrik olarak izlenebilir (Şekil 2.5)[42,44].



Şekil 2.5. 4-NPP' in hidrolizi

Alkali ortamda 4-NPP, koyu sarı renkli 4- nitrofenoksit iyonuna çevrilir. Bütün ALP ölçüm yöntemlerinde açığa çıkan fosfat grubu suya aktarılır yani reaksiyon hidrolitiktir. Bazı amino alkoller tampon olarak kullanıldığında fosfat transferi hızlandırılır. Bu aktivatörler arasında 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), dietanolamine (DEA), hidroksimetil aminometan (TRIS) ve etilaminoetanol (EAE) bulunur [44]. Bunlar alifatik amin türevleridir, nitrojen atomundaki protonları bağlayarak tampon etkisi gösterirler ve fosfat grubu alıcısıdırlar. Bunların varlığında fosfat transfer reaksiyonu kolaylaştığından reaksiyon hızı artar [42].

Bowers ve McComb 4- NPP' in substrat olduğu metotta fosfat alıcısı tampon kullanılarak sensitivitenin arttığını ve reaksiyon süresinin kısaldığını göstermişlerdir. Bu tamponların kullanımı enzim reaksiyon kinetiklerini etkiler, çünkü reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna olduğu kadar alıcı tampon konsantrasyonuna da bağıdır [42,45].

ALP izoenzimlerini ayırmak için kullanılan kriterler; değişik substratlarla farklı reaksiyon hızlarının oluşması, verilen inhibitörlere karşı farklı tepkiler, ısı ya da üre ile denatürasyona karşı farklı dirençler, elektroforetik hareketteki değişiklikler ve immünokimyasal özelliklerdir [44]. Bunlar aşağıda kısaca özetlenmektedir.

#### **a) Elektroforetik Teknikler:**

Serum proteinlerinin ayırımında kullanılan elektroforetik tekniklerle ALP izoenzimlerinin ayırımında kullanılan teknikler arasında fazla fark yoktur. Yalnız izoenzim elektroforezinde enzim inaktivasyonunu önlemek için oda ısısının soğuk olmasına dikkat etmek gerekir. Elektroforezden sonra jel kromojenik ve tamponlanmış substrat solüsyonunda inkübe edilerek görünür hale getirilir [58].

ALP izoenzimlerinin elektroforetik ayırımı için nişasta, agar, agaroz, poliakrilamid jel ve selüloz asetat membranı kullanılmıştır. Poliakrilamid jellerin kullanıma girmesiyle nişasta jelleri kullanımı bırakılmıştır. Her destek ortamın kendine göre avantaj ve dezavantajları vardır. Bunlardan hangisi kullanılırsa kullanılsın önemli olan, seçilen metod kullanıldığında tekrarlanan sonuçlar elde edilmesidir [59].

Farklı ALP izoenzimlerini içeren serum örnekleri alkali pH' da elektroforeze tabi tutulduğunda LALP' in anoda en hızlı göçtüğü görülür. BALP karaciğer izoenzimine göre anoda daha yavaş göçer ve daha geniş bir band verir. Bu iki band genellikle üst üste gelir ve iyi bir ayırma olanak vermez. İALP kemik izoenziminden daha yavaş göçer. Plasental izoenzim ise fenotipine bağı olarak karaciğer veya kemik izoenzimiyle aynı hızda göçer [44,59].

Kemik ve karaciğer izoenzimlerinin elektroforetik ayırımının tam olabilmesi ve dansitometrik olarak kantitatif ölçülebilmesi için serum nöraminidaz veya wheat germ lectin ile muamele edilir. Her iki metod da izoenzimlerin karbonhidrat kısımlarındaki farklılığı kullanmaktadır. Wheat-germ lektin varlığında gerçekleştirilen metod da lektin kompleksi selektif olarak kemik izoenzimine bağlanır ve düşük elektroforetik mobilitesinden dolayı kemik izoenziminin karaciğer izoenziminden daha yavaş göçmesini sağlar [60].

Diğer metod da ise serum kısa bir süre *Vibrio cholerae*'dan elde edilen neuraminidaz ile işleme tabi tutulur. BALP' in terminal sialik asit kalıntıları karaciğer izoenziminkinden daha fazla harap olur, BALP' in mobilitesi azalır ve anoda göçü iyice yavaşlar. Böylece her iki izoformun üst üste binmesi engellenmiş olur. Elektroforezde İALP varlığından şüphelenildiğinde neuraminidaz ile daha uzun bir inkübasyondan sonra diğer izoformların negatif yüklü sialik asit kalıntıları tamamen ayrılır. İALP dışındaki izoenzimlerin anoda hareketi yavaşlar ve İALP ayrımı sağlanır. İALP' da sialik asit kalıntısı bulunmadığından neuraminidaza dirençlidir [42,45]

Kolestazı olan hastaların serum elektroforezlerinde karaciğer ALP iki band gösterir. Selüloz asetat ya da agaroz gibi gözeneksiz ortamlarda bu bandlardan biri anoda doğru daha hızlı göçer. Bu da onun negatif yükünün daha fazla olduğunu gösterir ve “ fast liver “ bandı olarak nitelendirilir. Buna ek olarak diğer membrana bağlı enzimler ( 5'- nükleotidaz ve GGT) de bu fraksiyonda yer alırlar. Bu fraksiyona yüksek molekül ağırlıklı ALP ( HMW-ALP) ve safra ALP' ı adıda verilir. Bazı kolestatik olgularda HMW-ALP fraksiyonuyla Lipoprotein-X kompleksinin birleştiğide görülür. Lipoprotein-X fosfolipid, serbest kolesterol, protein, apo C ve albumin içeren bir komplekstir. Safra geri akımını takiben serumda şekillenir ve bu yüzden kolestatik hastalarda tanısal değeri olduğu ileri sürülmüştür. ALP- Lipoprotein-X kompleksine kolestatik kompleks adı verilmiştir ve böylece hepatik malignitelerde Lipoprotein-X olmaksızın gözlenen HMW-ALP' dan ayırdedilmesi düşünülmüştür [20,26]. Bu negatif yüklü “fast liver” fraksiyonunun bulunması, bilier obstrüksiyonun özellikle karaciğer metaztazının neden olduğu intrahepatik obstrüksiyonun bir göstergesi olarak öne sürülmüştür. Ancak bu fraksiyon karaciğer izoenzim fraksiyonundan daha spesifik ya da sensitif değildir [15,36,55].

#### **b) Isı ile inaktivasyon:**

Çeşitli doku alkalen fosfatazlarının sıcaklığa karşı stabiliteyi farklıdır. Alkalen fosfataz ısı ile denatürasyona uğratıldığında kemik, karaciğer, bağırsak ve plasenta izoenzimlerine ayrılır. Serum 56 °C' de ısıtılınca kemiğe ait enzim %90-100 oranında, karaciğer ve bağırsak enzimi %50-60 oranında aktivite kaybetmektedir [16]. ALP izoenzimlerinin denatürasyon sıcaklık sınırları 56 °C ve 65 °C' lerdir. Plasental ve Regan izoenzimi 65 °C ısıda 30 dakika stabiliteyi korurlar. 56 °C' de 10 dakika inkübasyondan sonra kalan enzim aktivitesi TALP aktivitesinin % 20' sinden daha azsa kemik izoenzimi baskın olandır. Kalan aktivite % 25-55 arasında ise baskın olan

izoenzim karaciğer fraksiyonuna ait olmalıdır. 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. Bu testin anlamlı olabilmesi için deney şartlarının çok dikkatli kontrol edilmesi gerekir [15,16,61].

**c) Üre inhibisyonu:**

Yüksek konsantrasyonlardaki üre enzimi inhibe eder. Bu inhibisyon geri dönüşüzdür ve ALP' ın doku orijinine göre değişiklik gösterir. Kemik izoenzimi üre denatürasyonuna en hassastır. Ürenin 3 mol/L konsantrasyonunda 37 °C' de 18 dakika muameleden sonra kalan aktivite total aktivitenin % 16' sıdır. Karaciğer izoenziminde kalan aktivite % 44' dür. En dirençli izoenzimler bağırsak ve plasental izoenzimlerdir ve kalan aktivite % 69' dur [61,45].

**d) Kimyasal İnhibisyon:**

Kimyasal inhibitör olarak L-Phenylalanin kullanıldığında 5 mol/L konsantrasyonda bağırsak, plasental ve regan izoenzimlerini belirgin şekilde inhibe ederken, kemik ve karaciğer izoenzimlerini daha az etkiler. Levamisole ise kemik ve karaciğer izoenzimlerini çok düşük konsantrasyonlarda tercihli olarak inhibe eder [61].

**e) İmmünolojik Teknikler:**

Spesifik doku fosfatazlarına karşı hazırlanmış antiserumların kullanılmasıyla ALP izoenzimleri ayrılabilir. Plasental ve bağırsak fosfatazlara monospesifik antiserumlar hazırlanmıştır. Ancak kemik ve karaciğer için olan antiserumlar çapraz reaksiyon gösterirler. Bu nedenle İmmünolojik yöntem plasental ve bağırsak fosfatazların ölçümü için kullanılabilir [44].

ALP izoenzimlerinin tam ve doğru bir şekilde ayrılabilmesi için elektroforez, ısı inhibisyonu ve L-Phenylalanin ya da üre inhibisyonu yöntemlerinden en az ikisinin kullanılması önerilmektedir (Çizelge 2.2.) [42].

**Çizelge 2.2.** İnsan doku Alkalen fosfataz izoenzimlerinin ayırım özellikleri.

İnhibisyon	Alkali Fosfatazlar			
	Kemik	Karaciğer	Bağırsak	Plasenta
56°C'de 10 dakika	++	+	+	-
65°C'de 10 dakika	++	++	+	-
Üre	++	+	+/-	-
L-fenilalanin	-	-	+	+
L-p-bromotetramizol	-	++	-	-
L-triptofan	-	-	+	+
L-homoarjinin	++	++	-	-
Levamizol	++	++	-	-
Nöraminidaz muamelesi sonucu elektroforezdeki hareketi	yavaşlar	yavaşlar	değişmez	yavaşlar

- : inhibisyon yok  
+ : orta derecede inhibisyon  
++ : tam inhibisyon

### 2.1.8. ALP' ın Metabolik Fonksiyonu

Enzim üzerinde uzun yıllardır devam ettirilen çalışmalarla ALP' ın metabolik fonksiyonu henüz tam olarak anlaşılmasına rağmen özellikle bağırsak, plasenta ve böbrekte aktif transport ve absorpsiyon yapan hücrelerin membranında lokalize olması enzimin membran transportunda rol aldığını düşündürmektedir [41]. Enzimin fonksiyonunu açıklamaya yönelik olarak ortaya atılan teorilerin herbiri izoenzimlerin rolüyle yakından ilgilidir. Günümüzde ALP' ın en iyi anlaşılmış fizyolojik fonksiyonu, enzimin kemik gelişimindeki rolüdür. Bunun en iyi kanıtı kalıtsal hipofosfatazi bozukluğudur. Osteoblast hücre membranlarındaki dokuya özgü olmayan ALP olarak bilinen karaciğer, kemik ve böbrek ALP' ı kemik mineralizasyonundan sorumludur. Enzimin eksikliği ya da fonksiyonundaki bozukluk bu hastalıktaki kemik mineralizasyonu bozukluğuna sebep olur. ALP, kemik mineralizasyonu sırasında inorganik fosfat konsantrasyonunun yüksek olduğu bölgelerde organik fosfat esterlerinin hidrolizini sağlayarak kalsiyum fosfat presipitasyonunu, inorganik pirofosfat gibi büyüme inhibitörlerinin yıkımını, inorganik fosfat transportunu ve ATPaz etkisi göstererek,  $Ca^{+2}$  ve Pi aktif transportunu gerçekleştirmektedir [41,56,62].



Dokuya özgü olmayan ALP' ın bununla birlikte kalp ve beyin damarlarında sentezlenerek bu damarların sertleşmesine sebep oldukları düşünülmektedir [30].

Enzim embriyonik gelişim sırasında neredeyse tüm dokularda bulunmaktadır. Yetişkinlerde ise özellikle kemik, karaciğer, böbrek ve B- lenfositlerde eksprese edilir. Dokuya özgü olmayan ALP' ın fibroblast membranındaki ekspresyonunun kronik inflamasyon ve yara iyileşmesi durumlarında artması doku yenilenmesine katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur [30,42].

Plasental ALP gebelik sırasında gerekli antikorların anneden fetüse geçmesini sağlamaktadır. Plasental ALP Fc reseptörü olarak görev almakta ve gestasyon sırasında pasif immünizasyonu sağlayan maternal IgG lerin fetüse geçmesini sağlamaktadır [57].

Bağırsak izoenzimi yağ asitlerinin transportunda ve kalsiyum emiliminde görev alır [42]. Yağ emilimi sırasında bağırsak ALP ın dolaşımında artması iyi tanımlanmış bir fenomendir. Uzun zincirli yağ asitleri bağırsak fırçamsı kenardaki ALP' ı azaltır. ALP ile çevrelenen yağ parçacıkları, mukoza yoluyla lamina proprianın interstisiyumuna geçer ve sonra lacteal ya da lenf damarlarına gider. Uzun zincirli yağ asitleri hücre membranı içine nüfuz edebilir ve ALP' ın fosfatidil inositol ucunu kolaylıkla membranda lipit miçel içine çekebilir. Bu, yağ emilimi sırasında ALP' ın şilomikronları sarması durumunu açıklayabilir. Erişkinde, bağırsak ALP' ın karbonhidrat zincirinde terminal sialik asit bulunmaması, onun lenf dolaşımı yoluyla hepatositlere gidişini açıklar. Hepatositler, sialik asit bulundurmayan glikoproteinleri alırlar [11,52]. Ayrıca bağırsak ve böbrek izoenzimlerinin fosfat absorpsiyonunu kolaylaştırdıklarına inanılmaktadır [43].

### **2.1.9. ALP Aktivitesindeki Fizyolojik Değişiklikler**

Serum ALP aktivitesi fizyolojik karekterlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bunun önemi, aldığımız sonucun patolojik bir sebebe bağlı olup olmadığını ayırtmaktır. Gebelikte, plasentadan salgılanan ALP aktivitesi 2. ve 3. trimesterlerde normal yetişkin düzeyinin çoğunlukla iki veya üç katına çıkar. Ancak bazı durumlarda referans değerlerin üst sınırını aşmayabilir. Plasental ALP düzeyindeki iniş ve çıkış eğilimleri bir komplikasyonun habercisi (hipertansiyon ya da preeklampsi gibi) olabilir ancak tek bir ölçümün tanısal değeri çok azdır [42,63].

Çocuklarda ALP değeri normal yetişkin değerinin yaklaşık üç katıdır. Bu artış normal kemik gelişimindeki yoğun osteoblastik aktiviteye bağlıdır. Erişkinlerde ALP' ın serum düzeyi erkeklerde kadınlardakinden daha yüksektir. Ancak yaklaşık 50 yaştan

sonra, enzim aktivitesi kadınlarda artarken erkeklerde değişmeden kalır. Kadınlardaki bu artışın, menapoz döneminde östrojen sentezinin azalması sonucunda kemik yapısında oluşan subklinik bozulmaları yansıttığı düşünülür [62,42].

Yağlı bir yemekten sonra, bağırsak ALP fraksiyonu plazma enzim aktivitesinde geçici bir yükselmeye neden olur. Bu durum kan grubu 0 ve B olan şahıslarda daha çok görülür. Bu yüzden plazma ALP aktivitesi ölçümü için istenen kan ortalama sekiz saatlik bir açlıktan sonra alınmalıdır [52,16].

### **2.1.10. ALP ve İzoenzimlerinin Klinik Önemi**

Serumda ALP aktivitesinin artması çeşitli patolojik durumlarda ortaya çıkmaktadır. ALP aktivitesi en fazla osteoblastik aktivitenin arttığı kemik hastalıklarında ve lokalize veya yaygın kolestaz neticesinde safra asitlerinin birikmesine yol açan hepatobilyer sistem hastalıklarında artmaktadır. Her iki durumda da serum ALP aktivitesinin artış sebebi enzim sentezinin artması nedeniyledir. Serumda bağırsak ALP artışı ise enzim yıkımındaki azalma nedeniyledir [12,63,64].

### **Alkalen fosfataz düzeyinde artmaya yol açan bazı patolojiler:**

#### **A. İskelet sistimini etkileyen hastalıklar:**

1. Primer Hiperparatiroidi
2. Sekonder hiperparatiroidi
3. Kırık iyileşmesi
4. Paget hastalığı
5. Osteomalazi
6. Ankilozan spondilitis
7. Cushing sendromu
8. Herediter hiperfosfatazemi
9. Neoplastik hastalıklar:
  - Osteojenik sarkoma
  - Multiple myeloma
  - Kemik metastazları
10. Gauher hastalığı

#### **B. Hepatobilyer Hastalıklar:**

1. Kolelitiyazis ile tıkanma
2. Karaciğer apsesi

3. Biliyer siroz
4. Primer ya da metastatik karaciğer tümörü
5. Viral hepatit
6. Sarkoidozis
7. Amiloidozis
8. Alkolik hepatit
9. Pankreatit
10. Enfeksiyöz mononükleozis
11. Kist hidatik
12. CMV enfeksiyonu
13. İlaçlara bağlı karaciğer hastalığı

**C. Diğer nedenler:**

1. Sepsis
2. Böbrek yetmezliği
3. DM
4. Hipertiroidizm
5. Lösemiler
6. Renal Karsinoma
7. Meme karsinomu ve metastazları
8. Konjestif kalp yetmezliği
9. Renal rikets
10. İlaçlar

**Alkalen fosfataz düzeyinde azalmaya yol açan bazı patolojiler:**

1. Hipotroidi
2. Herediter hipofosfazemi
3. Anemiler
4. Akondroplazi
5. Kretenizm
6. Kwashiorkor
7. C vitamini eksikliği
8. Klobitrat tedavisi

### **Hepatobiliyer Hastalıklarda ALP:**

Karaciğerin herhangi bir tıkanmaya cevabı daha fazla ALP sentezlemek şeklindedir ki bu bir enzim indüksiyonudur. Biliyer kanalcıklara bitişik hepatositler enzimin ana sentez yeri olmakla birlikte portal ve sentral ven etrafındaki endotelial hücreler ve sinusoidlerde de bu enzim bulunur. Safra kanalının deneysel olarak bağlanması sonucunda mekanik tıkanmanın atılımı engellemesi yanında ALP'ın denovo sentezinin safra tuzları tarafından uyarılarak arttığı bildirilmiştir. Yapılan seri çalışmalarda gözlenen bu denovo sentezin transkripsiyon artmasına değil, mRNA' nın translasyonundaki artmaya bağlı olduğu gösterilmiştir. Yeni oluşan enzimler dolaşıma girerek serumda enzim düzeyini yükseltirler [12,63].

Ekstrahepatik tıkanmalarda intrahepatik tıkanmalara göre 3 kat kadar enzim artışı olur. Serum enzim aktivitesi üst sınırın 10-12 katına çıkabilir ve tıkanmanın cerrahi müdahale ile giderilmesi sonucu normale döner. Safra akımının intrahepatik tıkanmalarında da serum ALP düzeyi yükselir ancak bu artış ekstra hepatik tıkanmada görülene kıyasla daha azdır. Karaciğerin parankimal hücrelerini etkileyen hastalıklarda da ılımlı bir artış, hatta normal düzeyler dahi görülebilir. Kronik karaciğer hastalarında özellikle sirozda kan grubu 0 ve B olanlarda İALP aktivitesinde artış gözlenmiştir [10,58,65].

Yeni yapılan çalışmalarda gebeliğin 16 ve 18. haftalarında alınan amniyon sıvısında fetal İALP nin düşük düzeylerinin fetusta kistik fibrozisin prenatal tanısında güvenilir bir şekilde kullanılabilceği gösterilmiştir [28].

Romatizmal hastalıklarda total ALP yüksekliğini yorumlamak zor olmakla birlikte bu yükselme sistemik hastalığın karaciğer yansımasını gösteren bir bulgudur. Romatoid artrit, vaskülitler, Wegener granülomatozis, poliartrit, Sjögren sendromu ve Felty sendromunda görülen değişen oranlardaki ALP yükselmeleri olasılıkla hepatobiliyer sisteme bağlı olmaktadır [58].

ALP izoenzimlerinde artışa sebep olan patolojik durumlar;

- Kemik ALP artışı: Paget, Osteomalazi, Kemik tümörleri, Kemik fraktürleri, Hipertroid, Pulmonar infarkt, Kronik renal rahatsızlık, Hiperfosfatemi.
- Karaciğer ALP artışı: Akut ve kronik pankreatit, Kardiyak bozukluk, Hepatik tıkanıklık, Siroz.
- Bağırsak ALP artışı: İnce bağırsak lezyonları, B ve 0 kan grubu kişiler.
- Plasental ALP artışı: Gebeliğin 3. trimesteri boyunca

- Varyant ALP ( Regan, Nagao, Kasahara) artışı: Akciğer, meme over ve kolon kanserleri başta olmak üzere çeşitli malignansilerde görülür (50,58).

### **Tümör Marker'ı Olarak ALP:**

Tümör belirteci kanda, vücut sıvılarında veya dokularda artmış miktarlarda bulunarak bir kanser tipinin varlığını düşündürebilecek bir maddedir. Tümör belirteçleri hücrelerde, dokularda veya vücut sıvılarında bulunurlar. Kanserin varlığını belirtmek üzere nitel veya nicel olarak kimyasal, immünolojik ve moleküler biyolojik yöntemler ile ölçülürler. Tümör belirteçleri enzimleri, hormonları, onkofetal antijenleri, proteinleri, reseptörleri veya genleri kapsar [66].

Enzimlerin tarihsel olarak tümör belirteci olarak kullanımı onkofetal antijenlerin bulunması ve monoklonal antikorların ortaya çıkışından öncedir. Enzimlerin belirteç olarak anormallikleri fetal formlarının (izoenzim) ekspresyonu veya ektopik üretimleri şeklindedir. Kanserli hastalarda çok sık artan plazma enzim aktiviteleri, tümör hücreleri tarafından enzim salınımından çok, tümörün sekonder bir etkisi sonucu görüldüğünden, tümör-kaynaklı değil, tümörle-ilişkili kabul edilir. Enzimler, sistemik dolaşıma tümörün nekrozu veya kanser hücrelerinin membran permeabilitesinin değişmesi sonucu salgılanırlar. Enzim veya izoenzimlerdeki artış, birkaç enzim dışında, kanser tipini veya özgün organ tutulumunu belirlemek için yeterince özgün ve duyarlı değildir. Bu sebeple non-spesifik tümör göstergeleri olarak düşünülmeleri uygundur (Çizelge 2.3)[59].

### **Çizelge- 2.3. Tümör göstergesi olabilen bazı enzimler**

<b>Enzim</b>	<b>Tümör tipi ve ilgili bozukluklar</b>
Alkalen Fosfataz (ALP)	Lösemi, sarkom, hepatik infiltrasyonlu lenfoma
Kemik izoenzimi (BALP)	Selim ve metastatik kemik hastalığı
Karaciğer izoenzimi	Metastatik karaciğer hastalığı
Plasenta izoenzimi (PALP, Regan izoenzimi)	Uterus, over, meme, akciğer kanserleri, seminom
Kreatin kinaz (CK)- BB izoenzimi	Küçük hücreli akciğer kanseri, prostat kanseri
Laktat Dehidrogenaz (LDH)	Lenfomalar (Burkitt), bazı karsinomlar
LDH-5 izoenzimi	Karaciğer ve beyin metastazlı karsinomlar
Nöron spesifik enolaz (NSE)	Küçük hücreli akciğer kanseri, prostat kanseri, nöroblastom, diğer tümörler
Prostatik asit fosfataz (PAP)	Prostat
Prostat spesifik antijen (PSA)	Prostat

Enzimler grubunda, Alkalen fosfataz önemli bir yer tutmaktadır. Tümör hücrelerinin Golgi kompleksinde, ER'unda ve özellikle hücre membranında ALP depolanması artmaktadır. Zamanla hızla gelişen tümör dokusu etrafındaki normal dokuyu da harabetmekte ve membran enzimi ALP tümörün civarında ekstrasellüler ortamda artmaktadır (26). Şimdiye kadar kanserli hastalarda farklı genetik lokuslardan kodlanan üç farklı ALP izoenzimi gösterilmiştir [67]. Bunlar:

- Regan izoenzimi ya da term plasental ALP
- Nagao izoenzimi testikular ya da PLAP-like
- Kasahara izoenzimi ya da fetal bağırsak ALP' dır [58].

Dokuya özgü alkalen fosfatazların (TSALP) malignant durumlardaki ekspresyonu genel olarak iki grupta toplanabilir:

1. Normal dokuda varolan izoenzimin üretimini artırması (ötopik ekspresyon)
2. Normal dokuda tanımlanmamış bir ya da daha fazla izoenzimin ifadenmesi (ektopik ekspresyon).

Pek çok tümör bu kategorilerden ikincisine dahildir. Hatta pek çok tümörde iki ya da daha fazla farklı izoenzim eksprese edilir [67]. Malignansilerde plasental ALP, plasentaya benzeyen ALP (varyant ALP) ve İALP'lara rastlanmıştır. Bu durum ilgili dokudaki artmış gen ekspresyonuna bağlanmaktadır. Hamile olmayan normal sıhhatli birisinde PLAP'ın bulunması bir malignansiyi ifade edebilen kuvvetli bir delildir. Fakat sigara içme gibi faktörlerle PLAP'da hafif bir artış görülmektedir. Sigara içenlerde yapılan bir araştırmada yüksek PLAP ve yüksek karsino embriyonik antijene (CEA) rastlanması, bu izoenzimin akciğerden salgılandığını göstermiştir [22].

PALP' ın ektopik ekspresyonuna akciğer, yumurtalık, rahim, sindirim sistemi ve diğer kanser türlerinde rastlanmıştır. Eşey hücresi ALP 'ı testis seminomlarında ötopik olarak sentezlenir, aynı zamanda yumurtalık kanseri ile pineal bezi ve timus tümörlerinde de bu enzime rastlanır. Bağırsak alkalen fosfatazı diğer tümörlerde de görülmesine rağmen özellikle hepatomlarda ektopik olarak eksprese olan bir enzimdir. ALP izoenzimleri malignant durumdaki hastalıkların sadece bir kısmında gözlenirken, seminomların büyük kısmında eşey hücresi ALP' ı sentezlenir [49].

Fishman ve çalışma grubunun 1960'ların sonlarında, erkek bir akciğer kanseri hastasında Regan izoenzimi olarak adlandırılan plasenta alkalen fosfatazına rastlamaları, embriyonun gelişimi sırasında eksprese edilmiş olan genlerin (onkogenler) tümör oluşumunda önemli roller oynadıkları düşüncesinin doğmasına sebep olmuştur

[25]. Regan izoenzimi, alfa fetoprotein (AFP) ve CEA ile birlikte ilk onkogelişimsel belirteçlerden biri olarak bilinmektedir. Over, akciğer, trofoblastik ve gastrointestinal kanserler, seminoma ve Hodgkin hastalığı gibi bir dizi malignensi de yükselir. Ancak PALP maligniteye özgü olmayıp siroz, ülseratif kolit ve divertikülit gibi selim hastalıklarda da görülebilir. PALP düzeyleri bireysel olarak hastalarda tedaviye yanıtla uyum gösterse bile, kanserde çok sık artmaması ve kanser için zayıf özgünlüğü onun tümör göstergesi olarak kullanımını kısıtlamaktadır [49].

Muensh ve arkadaşları PALP seviyesinin 286 kanserli hastanın %23'ünde yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca PALP seviyesinin kolon kanserli hastaların %54'ünde, akciğer kanserli hastaların %40'ında, ovaryal kanserli hastaların %44'ünde yüksek olduğunu belirtmiştir. Başka bir çalışmada da meme kanserli hastaların %30-40'ında PALP seviyesinin yükseldiği bildirilmiştir [68,69].

Nakayama ve çalışma arkadaşları, belirli kanser durumlarında plasenta alkalin fosfatına çok benzeyen ancak aminoasit inhibisyonu açısından farklılık gösteren bir başka ALP izoenzimini buldu. Bu izoenzim "Nagao" izoenzimi olarak adlandırıldı. Son olarakta hepatomlarda karşılaşılan "Kasahara" izoenzimi bulundu ve bu enzimin de fetal ALP' ı olduğu anlaşıldı. Ancak bu bahsedilen enzimlerle her kanser vakasında karşılaşılmaz. Bunun muhtemel sebebi enzimlerin farklı tümör dokularında, farklı nedenlerden ötürü ortaya çıkmış olmasında gizlidir [25-26,49].

Tümör hücrelerinde ALP sentezini sağlayan pekçok mekanizma öne sürülebilir. ALP' ın tümör oluşumuna fonksiyonel katkısı bulunabilir, çok faktörlü etiyolojinin bir ayağını teşkil edebilir ya da bu ekspresyon ALP geninin hastalıkla ilgili genle yakın bağlantı içerisinde bulunmasından kaynaklanabilir. Hatta bunlara ek olarak ALP geni ile hastalığa sebep olan genin eş zamanlı deregülasyonundan bahsedilebilir. Bu ihtimaller göz önünde bulundurularak kanser durumlarında ALP' ın artan ekspresyonunun sebeplerini anlayabilmek için genin ektopik ve ötopik ekspresyonu arasındaki farklar ortaya konmalıdır [67].

## **2. 2. Karaciğer Hastalıkları**

Karaciğer hastalıkları;

### **I. Parankim Hastalıkları**

A- Hepatitler

B- Siroz

1. Laennec Sirozu (portal siroz, alkolik siroz)

2. Post-nekrotik siroz

3. Biliyer siroz

4. Wilson sirozu

C- İnfiltrasyonlar: Glikojen, yağ, amioid infiltrasyonları

D- Yer Tutan Lezyonlar: Hepatoma, metastatik tümörler, apse ve kistler.

E- Sarılıkla Birlikte Bulunan Yapısal Hastalıklar: Gilbert sendromu, Crigler Najja sendromu, Dubin Johnson ve Rotor sendromu ve gebelikte gelişen kolestaz.

## II. Hepatobiliyer Hastalıklar

Ekstrahepatik safra yollarının taş ya da tümör ile tıkanması ve kolanjit safra yolları enflamasyonu.

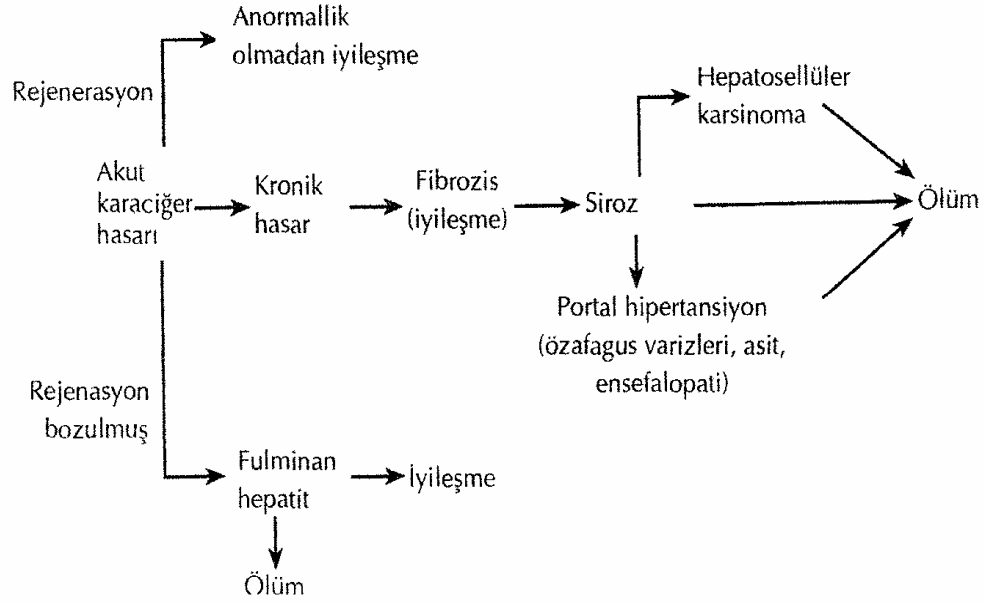
## III. Vasküler Hastalıklar

Kronik konjesyon ve kardiyak siroz, vena hepatica veya vena porta trombozu ve flebit olarak sınıflandırılmaktadır [66].

Viral hepatit ABD’de her yıl 500 000 akut olgu ve 4 milyondan fazla bireyin kronik olarak infekte olduğu kaydedilen en yaygın üçüncü veya dördüncü enfeksiyondur. ABD’de her yıl 12 000 kişi alkolik karaciğer hastalığından ölmektedir. Hemokromatoz için gen prevalansı 1/15-1/20, hastalık prevalansı 1/400’dür. Hepatosellüler karsinoma (HCC) her yıl 7 500 ölüme sebep olmaktadır ve dünya genelinde kanser ölümleri içinde üçüncü veya dördüncü sırayı almaktadır [6,8].

Karaciğer hastalıklarında hücre hasarı ve ölümü; nekroz, apoptoz (programlı hücre ölümü) veya her ikisi tarafından oluşmaktadır. Hasarın modelini hedef hücre belirlemektedir (örneğin, hepatite yol açan hepatosit hasarı ve kolestazise yol açan biliyer hücre hasarı). Siroz veya karsinoma oluşumunu belirleyecek şekilde genetik faktörlerin ve hasarın süresi ile bütün hücre hasarları yanıt olarak fibrozisi indüklemektedir (Şekil 2.6). Zararlı çevrenin sonucu olarak hücre nekroz oluşur. Hücrelerin şişmesi ve membran bütünlüğünün kaybı ile karakterizedir. Karbon tetraklorür, aspirin ve asetaminofen gibi bileşiklerden kaynaklanan toksik hasar çoğunlukla nekroz sonucu oluşmaktadır. Hücre ölünce içeriği salınır, bu da sitokinler ve toksik oksijen türlerinden kaynaklanacak hücre hasarına yol açan inflamatuvar yanıtı uyarır [2].





**Şekil- 2.6.** Karaciğer hastalığının normal geçmişi

### 2. 2. 1. Siroz

Siroz hepatosit hasarına bağlı olarak ortaya çıkan karmaşık bir sürecin son evresidir. Siroz, karaciğer parankiminin değişik nedenlerle oluşan inflamasyonu ve yıkımı (nekrozu), nodül oluşturarak yenilenmesi, yaygın fibrosis ve parankim için oluşan fibröz bantlar ile karakterize, kronik ve çoğu kez ilerleyici bir karaciğer hastalığıdır [2].

Karaciğerin hepatosellüler nekroza karşı cevabı; hepatik lobüllerde kollaps, diffüz fibröz, septa oluşumu, vasküler yatakların yön değiştirmesi ve hepatositlerde nodüler büyümedir. Etiyolojisi ne olursa olsun histolojik patern aynıdır. Hepatosit hasarı ile başlayan olay iltihabi infiltrasyonla ilerleme kaydeder ve fibrozisin parankimi parçalaması ile sirotik safhaya ulaşır [70].

Siroza ilerleyen tüm kronik karaciğer hastalıklarının ortak histolojik bulguları hepatik fibrozis ve nodüler rejenerasyondur. Oysa klinik olarak hastaların semptom ve bulguları altta yatan etiyolojik faktöre göre farklılık gösterebilir. Sirozun ileri evrelerinde klinik bulgulara bakarak etiyolojik faktörü ayırabilmek çok zordur [2].

Karaciğer sirozu morfolojik özelliklerine, fonksiyonel durumuna, klinik evresine ve etiyolojisine göre sınıflandırılabilir (Çizelge 2.4). Günümüzde etiyolojik ve klinik evreye göre sınıflamalar daha çok kullanılmaktadır [4].

#### Çizelge- 2.4. Sirozun sınıflandırılması

<u>MORFOLOJİK</u>	<u>FONKSİYONEL</u>	<u>KLİNİK EVRE</u>	<u>ETİYOLOJİK</u>
1-Makronodüler	1-Aktif	1-Kompanze	1-Viral
2-Mikronodüler	2-İnaktif	2-Dekompanze	2-Otoimmün
3-Karışık (miks)			3-Biliyer
			4-Metabolik
			5-İlaç ve toksinler
			6-Vasküler
			7-Diğer

#### Sirozun Etiyolojisi

Karaciğer sirozu dünyanın pek çok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de önemli ölüm nedenlerinden biridir. Etiyolojik faktörlerin sıklığı kültürel ve ekonomik nedenlerle sıkı bir ilişki içindedir. Kuzey Avrupa ve Amerika'da en önemli neden alkol iken Asya ve Afrika'da viral hepatitlerdir. Ülkemizde yapılan çeşitli araştırmalarda etiyolojik olarak viral hepatitlerin görülme sıklığı %50-90 arasında değişmekteyken, alkolik siroz sıklığı %10 civarındadır. Olguların bir kısmının ise etiyolojisi belirlenemez, bu siroz çeşidine kriptojenik siroz denir. Karaciğer sirozunun etiyolojisi aşağıda gösterilmiştir [3,71].

1. Viral hepatit (B, B+D,C)
2. Alkol
3. Biliyer tıkanıklık
4. Venöz akım tıkanıklığı
5. Otoimmün hepatit
6. Toksin ve ilaçlar
7. Metabolik nedenler
  - Wilson hastalığı
  - Hemokromatozis
  - $\alpha$ -1 antitripsin eksikliği
  - Tip-IV Glikojenez
  - Galaktozemi
  - Herediter tirozinemi

- Kistik fibrozis
- 8. Herediter hemorajik telenjiektazi
- 9. A hipervitaminozu
- 10. Sarkoidoz
- 11. Yenidoğan sifilizi
- 12. İnce bağırsak by- pass' ı
- 13. Hindistan çocukluk çağı sirozu
- 14. Kriptojenik siroz

### **Siroz Şekilleri**

1) Portal Siroz; Laennec sirozu-Alkolik siroz, yağlı siroz gibi terimler kullanılan bu siroz, beslenme bozukluğu ve fazla alkol alımı ile birlikte olduğunda gelişir.

2) Post Nekrotik Siroz; Viral hepatitlerde bazen harap olan hücrelerin yerinde bağ dokusu artması olur. Bunun giderek artması sonucu siroz oluşur.

3) Biliyer Siroz; Safranin akmasına engel olan herhangi bir nedenle safra koledok yolu ile duodenuma akıtılamaz ve karaciğerdeki safra kapillerinde birikirse zamanla doku değişikliği ve siroz gelişir.

4) Kardiyak Siroz; Sağ kalp yetmezliğine bağlı olarak vena kava inferior da basınç artması giderek karaciğerde staza neden olur. Bu stazın devam etmesi vena sentralislerde basınç artmasına ve giderek hücrelerin harabiyetine ve siroza neden olur.

5) Wilson Sirozu; Normalde bakır kanda, seruloplazmin denen bir proteine bağlı olarak dolaşır, bu madde olmadığı zaman bakır kanda serbest kalır ve dokularda, karaciğerde, beyinde ve gözde birikir. Bakır, tahriş edici etkisi nedeniyle karaciğer hücrelerinde dejenerasyona ve siroza neden olur [66].

### **Sirozun Kliniği**

Klinikte sirozun bulguları portal hipertansiyon ve hepatosellüler yetersizliğe bağlıdır. Prognoz ve tedavi bu iki faktörün derecesi ile ilgilidir. Kompanse siroz olgularında tanı rutin muayene ve laboratuvar incelemeleri sırasında konur. Biyokimyasal incelemeler tamamen normal olabileceği gibi Gama glutamil transferaz (GGT) ve transaminaz düzeylerinde hafif yükselmeler saptanabilir. Hastaların bir kısmı başka bir nedenden ölene kadar kompanse siroz aşamasında kalabilirler. Diğer kısmı ise aylar ya da yıllar süren bir dönem içinde dekompanse siroz dönemine girerler [71].

Dekompanse sirozlu hastalar asit ve/veya sarılık nedeni ile hekime başvururlar. Halsizlik, yorgunluk, adale erimesi ve kilo kaybı ile başvurabilirler. Sürekli hafif ateş, septisemi, devam eden hepatosit nekrozu ya da gelişmekte olan hepatosellüler karsinom nedeni ile olabilir. İktter hepatosit yıkımının yapımından fazla olduğuna işaret eder. Kanamaya eğilim vardır. Vücut kıllarında azalma, vasküler spider, palmar eritem, beyaz tırnak ve gonad atrofisi siktir [70,71].

### **Sirozun Tanısı**

Siroz şüphesi olan hastalarda yapılacak ilk tetkiklerden birisi ultrasondur. Endoskopi özefagus varislerinin varlığı ve derecesi hakkında önemli bilgiler verdiği için sirozlu bir hastanın değerlendirilmesinde önem taşır. Siroz tanısında en önemli tanı metodu iğne biyopsisidir. Biyopsi neticesinde fibrozisin yanısıra rejenerasyon nodülleri görülür ve bu bulgular tanı için önemlidir. Biyopsi ile hastalığın derecesi ve aktivitesi saptanırken etiyolojik faktör hakkında da bilgi edinilebilir. Biyopsi yapılamayan durumlarda tanı, fizik muayene ve laboratuvar tetkikleri ile konabilir. US ile splenomegali ve asit saptanması, özefagus varislerinin varlığı, laboratuvar bulguları ve bir etiyolojik faktörün tesbiti tanı için yeterlidir [70].

Sirozun tanısında laboratuvar bulguları önemli yer tutar. En çok diagnostik değeri olan bulgu; serum albumininde azalma ve protrombin zamanında uzamadır. Bilirubinindeki artış ise kötü prognostik göstergedir. Transaminazlar aktif sirozda yüksektir. ALP yükselebilir, albumin düşer, gamaglobulinlerde artış, ester kolesterol oranında düşme görülebilir. Alfa fetoproteinde hafif yükseklik olabilir, devamlı yüksekliği hepatosellüler karsinomayı akla getirir. Anemi, lökopeni ve trombositopeni görülebilir. Protrombin zamanı uzamıştır, idrarda bilirubin ve ürobilinojen görülebilir [71,72].

Serum albumin düzeyi ve protrombin zamanı hastalığın şiddeti hakkında, bilirubin hastalığın prognozu hakkında, transaminazlar sirozda aktivite bakımından, HBV ve HCV' ye ait marker' ların bulunması etiyoloji açısından önemlidir. ALP malign infiltrasyon ve kolestaz hakkında bilgi verir. Bilier sirozda belirgin yükselen ALP, inaktif sirozda normal bulunur. Alkolik sirozda ise ağır yağlanmaya bağlı olarak intrahepatik kolestazın gelişmesi sonucu yükselebilir. Makronodüler sirozda mikronodüler siroza oranla ALP yükselişi daha belirgindir [9,71].

### **Sirozun Prognozu**

Prognoz; etioloji, klinik (hastalığın tanı konulduğu zamanki karaciğer hücre yetmezliği ve komplikasyonların varlığı), laboratuvar bulguları, histolojik lezyonun şiddeti ve tedavi olanaklarına bağlıdır. Genel olarak dekompanze sirozda, tanı konulduktan sonra 3 yıllık sağ kalım %15 ve 5 yıllık sağ kalım %7 ile %10 arasındadır. Kompanse sirozlu hastalarda dekompanzasyon oranı yılda yaklaşık %10 civarındadır. Hastalarda prognozu belirlemede kullanılan en önemli objektif parametre karaciğer yetmezliğinin derecesini gösteren Child-Pugh sınıflamasıdır. Child-Pugh evresi hastanın prognozu ile korelasyon gösterir ve klinik olarak çok sık kullanılır [72].

### **Sirozun Komplikasyonları**

Siroz tıbbi denetim ve tedaviyi gerektiren ciddi ve kronik bir hastalıktır. Hastalarda hastalık sürecinde hayatı tehdit eden, hızla ve hemen müdahale edilmez ise ölümlerle sonuçlanabilecek komplikasyonlar görülür [5]. Bunlar;

- 1-Portal hipertansiyon (Özefagus varis kanamaları, asit)
- 2- Asit ve spontan asit enfeksiyonları (spontan bakteriyel peritonit)
- 3- Hepatik ensefalopati
- 4- Hepatoselüler karsinoma
- 5- Karaciğer yetmezliği
- 6- Hepatorenal sendrom
- 7- Hepatopulmoner sendrom
- 8- Hiperplenizm ve Hematolojik bozukluklar
- 9- Enfeksiyonlar
- 10-Endokrin bozukluklar
- 11-Gastrointestinal komplikasyonlardır.

Portal Hipertansiyon: Sirozlu hastaların %60'ından fazlasında klinik olarak anlamlı bir şekilde portal hipertansiyon gelişir. Portal hipertansiyon sonucu gastroözofageal varis kanamaları, splenomegali, asit ve ensefalopati gelişir [66].

Asit: Karında biriken asit diyafragma basıncı yapacağından sirozlu hastalarda dispne görülebilir, bunun için hasta oturur pozisyonda daha çok rahat eder [71].

Hepatik Ensefalopati - (Amonyak intoksikasyonu) Hepatik Koma: Sirozlu hastada kan amonyak düzeyi yükseldikçe amonyak zehirlenmesi ortaya çıkar. Bilindiği gibi amonyak beyne toksik bir maddedir, kan düzeyi arttıkça kişilik değişikliği, ajitasyon, mental konfüzyon, flapping tremor gelişir ve hasta hepatik komaya girer [71].

Gastrointestinal kanamalar: Sirozlu hastada gelişen bu komplikasyon özofagusta gelişen varislerin kanaması veya mide ve duodenumdaki ülserlerin kanaması şeklinde olmaktadır. Daha önce belirtildiği gibi karaciğer fonksiyon bozukluğu nedeniyle hastanın protrombin zamanı uzamıştır ve trombositopeni mevcuttur. Bu nedenlerle de hastalarda kanama kolay gelişir. Kanama, hastada melena veya hematemez şeklinde ve kanama derecesine göre hipovolemi ve hipotansiyon bulguları ile ortaya çıkar [66].

### **2. 2. 2. Hepatosellüler Karsinoma**

Hepatosellüler karsinoma (HCC) karaciğerin hepatosellüler orjinli malign tümörüdür. Kanseler arasında 5. sırada ve kansere bağlı ölümlerin nedenleri içinde 3. sırada yer almaktadır. HCC risk faktörleri en iyi bilinen kanseler arasındadır. Tüm dünyada birincil neden % 80 olasılıkla siroz olarak belirtilmektedir ve siroz hastaları içinde HCC geliştirme riski daha fazla olan hastalar; ileri yaş, erkek ve siroz evresi ileri olanlardır [5]. Sirozlu hastalarda yıllık HCC gelişim insidansı % 3.4 bulunmuştur. Ökten ve arkadaşları, HCC vakalarının % 92.4'ünde siroz teşhis etmişlerdir [73].

Türkiyede tümörün sıklıkla ileri yaşlarda ve sirotik karaciğer zemininde meydana geldiği rapor edilmiştir. Uzunalimoğlu ve arkadaşları tarafından yayınlanan toplam 207 hastayı içeren araştırmada Türkiye' de etiyolojide ilk sırada HBV enfeksiyonu (%56), ikinci sırada HCV enfeksiyonu (%23.2), üçüncü sırada ise alkolik karaciğer hastalığı olarak bildirilmiştir [1,7]. HCC için tarama testleri serolojik ve radyolojik testlerdir. En önemli serolojik tarama testi alfa fetoprotein ( AFP)' dir. AFP nin sensitivitesi % 60' dır [74].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3. 1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- Masaüstü Santrifüj (Üniversel 32, Hettich)
- Vorteks (Nuvemix)
- Mikropipetler 10µl, 20µl, 200µl ve 1000µl (Gilson)
- Otomatik pipet uçları (Sarı, mavi, beyaz)
- SAS-1 Tek kullanımlık numune kapları
- SAS-1 Aplikatör (10x12) ( Kat.No: 210200, Helena)
- Steril pipetler 5ml ve 10ml
- Ependorf tüp
- Steril kuru tüp (Vacuetta)
- SAS-1 Plus Elektroforez cihazı (Kat. No: 1531, Helena)
- SAS-2 Auto-Stainer (Kat. No:1212, Helena)
- Dansitometre (Platinum Gel Scan )(Kat. No: 1668-1670, Helena)
- Biyokimya Otoanalizörü (Beckman Coulter Synchron LX-20)
- Su banyosu (Memmer)
- Derin dondurucu (Arçelik)
- Parafilm

#### 3. 2. Kimyasal Maddeler ve Kitler

- Total ALP Aktivite Ölçüm Kiti (Ref: 44670, Beckman Coulter)
- ALP izoenzim elektroforez kiti (Cat.No. 200800, 200801, 200802, Helena)
- REP Prep Solüsyon (Kat. No: 3100, Helena Biosciences Europe)
- Asetik asit (Riedel- de Haen)

#### 3. 3. Kit Bileşenleri

- Total ALP Substrat ( disodium 4- nitrofenil fosfat 179 mmol/L)
- Total ALP Tampon ( 2-amino-2- metil-1- propanol 393 mmol/L)
- SAS-1 ALP izoenzim jel; kullanıma hazırdır.
- Separation Enhancer; kullanıma hazırdır

- ALP izoenzim substrat; kullanıma hazırdır
- ALP izoenzim kromojen; şişelerin içinde toz halindedir
- Bloterler (kağıtlar),
- Reaktif yayma filmi
- ALP izoenzim kontrol (Kat. No: 3055, Helena)

### **3. 4. Hasta ve Kontroller**

#### **3. 4. 1. Hastalar**

Araştırmamızda, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Gastroenteroloji Ana Bilim Dalına başvuran ve karaciğer sirozu tanısı alan, 50 siroz hastası çalışmaya alındı. Hastalara cinsiyet ve yaş yönünden bir kısıtlama getirilmedi. Tüm hastalar için Ek-1 de verilen soru formu, soru- cevap şeklinde dolduruldu. Çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Komitesinin 02.10.2007 tarih ve 2007-8/5 sayılı kararı ile uygun bulunmuştur ( Ek-3).

#### **3.4.2. Kontroller**

Araştırmamızda, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne başvuran, her hangi bir kronik hastalık tanısı konulmamış 50 kişi kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Tüm kontroller için Ek-1 de verilen soru formu, soru- cevap şeklinde doldurulmuştur.

### **3.5. Kan Örneklerinin Alınması**

Karaciğer sirozu tanısı konulmuş hastalardan ve her hangi bir kronik hastalık tanısı almamış kontrol grubundan sabah aç karnına 10 ml kan örneği kuru tüplere alındı ve laboratuvara ulaştırılarak 4000 rpm' de 10 dakika santrifigasyona tabi tutularak serumları ayrıştırıldı. Elde edilen serumlar bir başka kuru tüpe alınarak çalışmaların yapılması için gerekli sayıya ulaşana kadar 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 geçmemiştir.



### 3.6. Total ALP Analizi

Çalışmamızda total ALP düzeyleri “Beckman Coulter Synchron LX-20” otoanalizörü kullanılarak ölçülmüştür. Metodumuz, substrat olarak p-nitrofenil fosfat ve pH 10.5 devamlılığının sağlanması için 2-amino-2- metil-1- propanol (AMP) tamponu kullanılan Bowers- McComb’ un prensibine dayanır. Synchron sistem total ALP kitinde bulunan reaktiflerin konsantrasyonları şöyledir:

Substrat; disodium 4- nitrofenil fosfat 179 mmol/L

Tampon; 2-amino-2- metil-1- propanol 393 mmol/L

Bu yöntemle sonuçlar U/L olarak elde edildi. Normal değerler her iki erişkin cinsiyette de 38-126 U/L olarak belirtilmiştir.

### 3.7. Isı İnaktivasyonu

Total ALP ölçümleri yapıldıktan sonra termostatlı su banyosunda her numune 56 °C ‘ de 10 dakika ve 65 °C’ de 30 dakika ısıya tabi tutulmak için hazırlandı. İşlemlerin yapılışı:

1. Yaklaşık 0,5 ml serum ince duvarlı cam bir tüpe pipetlendi ve parafilm ile ağzı kapatıldı. Biz iki ayrı sıcaklıkta çalışacağımız için her numuneden 2 şer tane hazırladık.
2. Tüpler, termostat kontrolü olan ve ısısı 56 °C’ ye getirilen su banyosuna yerleştirildi ve 10 dakika bekletildi. Sonra tüpler alındı ve buzlu suya konularak biyokimya otoanalizöründe ALP ölçümü yapıldı. Sonuçlar kalan aktivite olarak kaydedildi.
3. Bu arada su banyosunun ısısı 65 °C ye getirildi ve ikinci numunelerde bu ısıda 30 dakika bekletildi. Tüpler alındı ve buzlu suya konularak biyokimya otoanalizöründe ALP ölçümü yapıldı. Sonuçlar kalan aktivite olarak kaydedildi.

### 3.8. Agaroz Jel Elektrofrez

Agaroz jel elektrofrez ticari ALP izoenzim kiti (Cat.No. 200800, 200801, 200802) kullanılarak Helena SAS-1ve SAS-2 elektrofrez cihazında yapılmıştır. Kit içeriği şöyledir;

- a) SAS-1 ALP izoenzim jel: Kullanıma hazır 12 li 10 jel halindedir. Her bir jel, optimum performans sağlayacak ve zarar vermeyecek şekilde eklenen 1

gr/dL agaroz; pH 9.1±0,05 tris-barbital tampon ve % 0.10 sodyum azide ihtiva eder. Alkalen fosfataz izoenzim elektroforezi çalışmak için destekdir.

- b) Separation Enhancer: Kullanıma hazırdır. Vibrio cholerae'dan sağlanan nöraminidaz içerir.
- c) ALP izoenzim substrat: Kullanıma hazırdır. 2-amino-2-metil-1- propanol tampon (AMP) pH 10, içinde 5-bromo-4-chloro-3-indolil fosfat (BCIP) ve maksimum performans elde etmek için konsantre zararsız katkıları ihtiva eder. Görülebilir solüsyon hazırlamak için kullanıldı.
- d) ALP izoenzim kromojen: Şişelerin içinde toz halindedir. Nitroblue tetrazolium (NBT) ihtiva eder. Bir şişe izoenzim kromojen 1ml. ALP izoenzim substrat ile sulandırılıp 30 saniye karıştırılarak 10 dakika içinde kullanıldı.
- e) Bloterler (kağıtlar): Tek kullanımlık emici bu kağıt örnek uygulamadan önce jel üzerindeki fazla sıvının alınması için kullanıldı.
- f) Reaktif yayma filmi: Enzimatik görülebilirlik için kullanıldı.

Elektroforez işlemini yapacağımız SAS 1, SAS 2 cihazlarına ve bilgisayar programına ALP izoenzim elektroforezi deney standartları kit içeriğine göre tanıtıldı. Bu kodlar; SAS 1 için;

Elektroforez: 220 volt, 13 dakika, 23 °C, 6 aplikasyon.

İnkübasyon: 1:30 dakika 45 °C olarak

SAS 2 için;

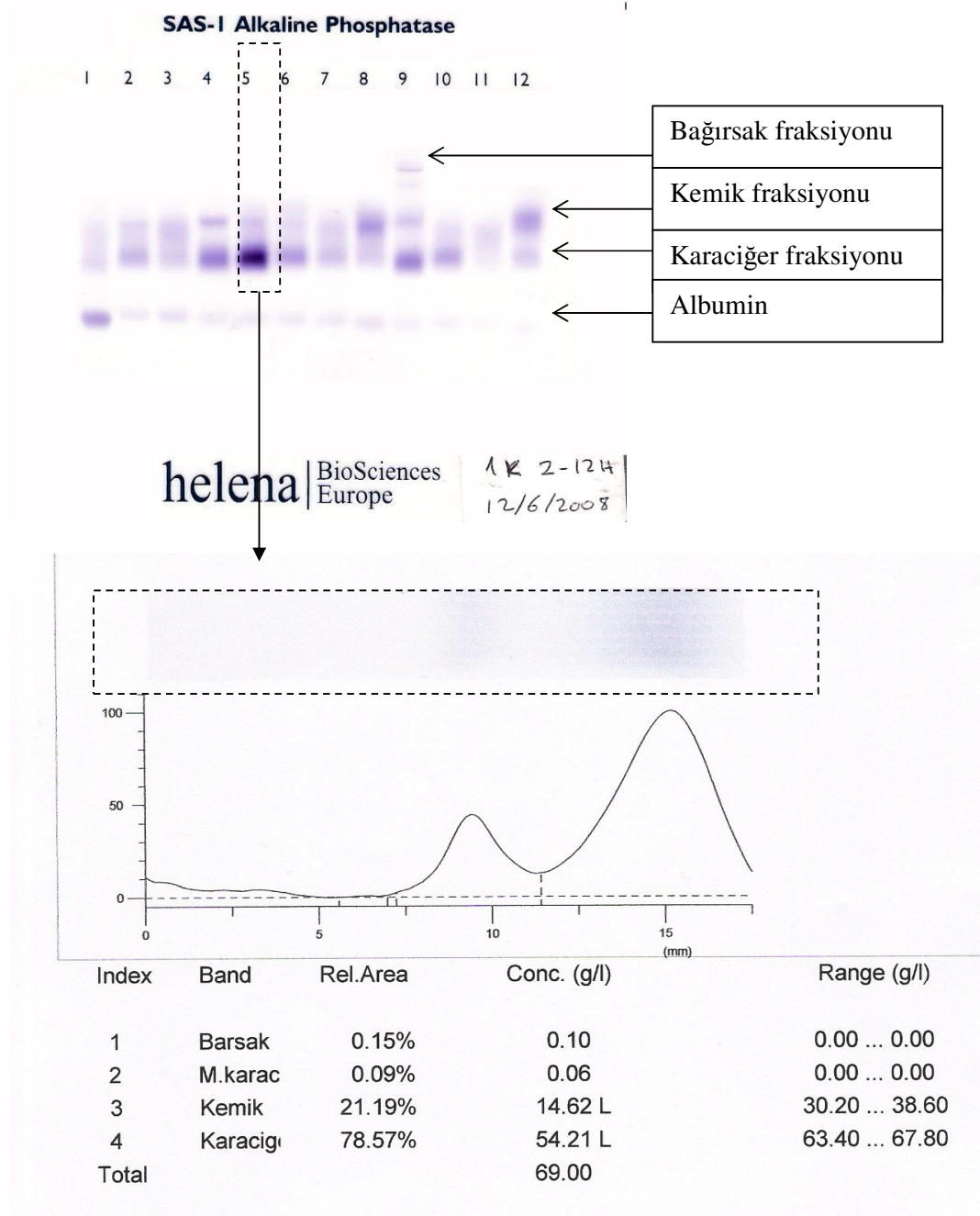
Dry1-	5:00 dakika 55 °C
Destain1-	5:00 dakika 3 port
Wash1-	1:00 dakika 1 port
Dry2-	15:00 dakika 65 °C
Destain2-	5:00 dakika 3 port
Wash2-	1:00 dakika 1 port
Dry3-	5:00 dakika 65 °C

Bilgisayar proramına tanıtılan kit standart değerleri;

	Mean	CV(%)
Karaciğer	65.6%	4.4%
Kemik	34.4%	8.4%

#### Deneyin yapılışı;

1. On bir adet hasta serumu ve bir adet ALP izoenzim kontrolden 30' ar µl her biri için ayrı bir godeye alındı, üzerlerine 10' ar µl ALP separation enhancer ilave edildi ve karıştırıldı.
2. Hazırlanan numunelerden tek kullanımlık numune kaplarının her kuyucuğuna sırayla 35' er mikrolitre konuldu, numune kapları SAS 1 cihazının numune tepsisine takıldı ve tabladaki pozisyonuna yerleştirildi.
3. Isıtıcı bloğun üzerine 400 µl REP Prep solüsyonundan yayıldı. Koruyucusundan çıkarttığımız agaroz jeli – ve + taraflara pozisyonlayarak jel kısmı üstte kalacak ve hava kabarcığı olmayacak şekilde ısıtıcı bloğa yerleştirildi.
4. Blotter ile jelin üzerindeki fazla sıvı alındı ve blotter atıldı. Jelin üzerindeki bloklara elektrotlar yerleştirildi ve birkaç saniye kontak etmesi için beklendi ve elektroforez başlatıldı.
5. Elektroforezin bitimine 10 dakika kala bir şişe izoenzim kromojen 1ml. ALP izoenzim substrat ile sulandırılıp 30 saniye karıştırıldı ve kullanılıncaya kadar kendi haline bırakıldı.
6. Elektroforezden sonra elektrotları alıp, jelin üzerine, daha önce hazırlayıp beklettiğimiz kromojen solüsyonu boşaltıldı ve yayma filmi ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılarak inkübasyon işlemi için program devam ettirildi.
7. İnkübasyondan sonra yayma filmi jel üzerinden alındı, jel bir spatula yardımı ile bloklarından ayrıldı ve boyama tank aparatına takılarak SAS 2 boyama ünitesine yerleştirildi.
8. SAS 2 boyama ünitesinin distile su ve destain solüsyonları eklenerek ALP programı seçildi ve cihaz çalıştırıldı.
9. Cihazın çalışması bitince jel plağı çıkartıldı temizlendi ve scanner da taranarak Dansitometri aracılığıyla jel üzerindeki her bir bandın kantitatif olarak değerlendirilmesi yapıldı ( Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Agaroz Jelde Bantların görünümü (1. sırada ki standart serum, diğerleri hasta ve kontrol serumlarıdır) ve 5 numaralı hasta serum örneğinin dansitometri aracılığıyla kantitatif olarak değerlendirilmesi.

#### 4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmada hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin yaş, cinsiyet ve analiz sonuçlarının tanımlayıcı istatistiksel değerlendirilmesi yapılarak karşılaştırılmıştır. Isı inaktivasyonu ve agaroz jel elektroforez yöntemleri ile elde edilen analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde bağımlı gruplarda eşler arası farkın önemlilik testi olan Paired Sample T Testi uygulanmış ve yanılma düzeyi  $\alpha = 0,05$  olarak alınmıştır.

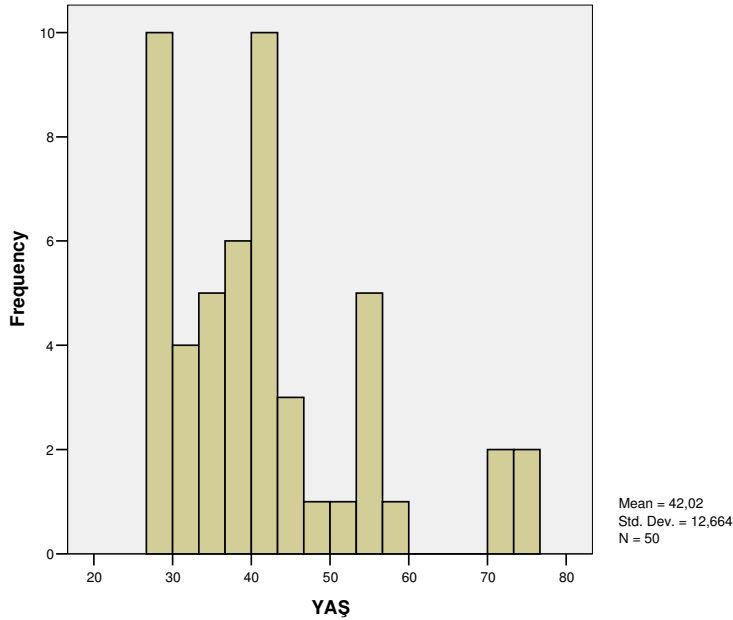
Verilerin istatistiksel analizi Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) programı, 13.0 versiyonu kullanılarak yapılmıştır.

## 5. BULGULAR

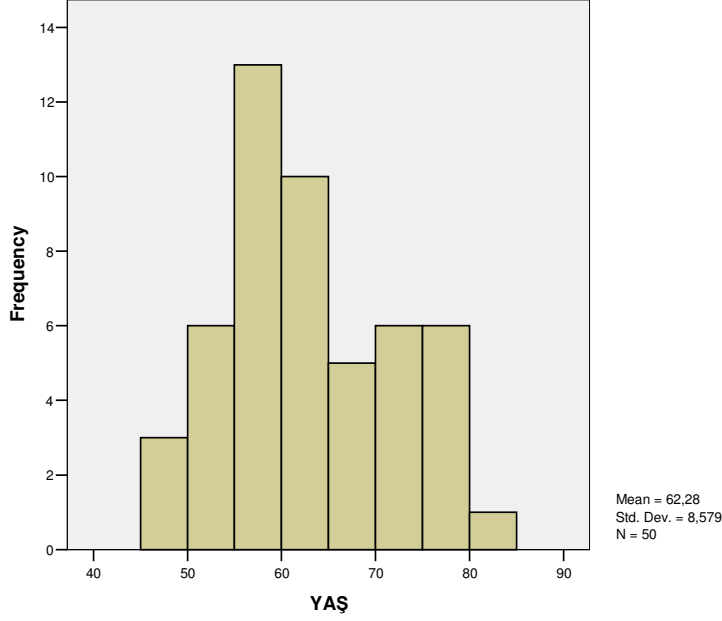
Bu çalışma Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Gastroenteroloji Ana Bilim Dalı'nda karaciğer sirozu tanısı alan 50 hasta ve aynı hastaneye başvuran her hangi bir kronik hastalık tanısı konulmamış 50 kontrol üzerinde yapıldı. Çalışmaya alınan tüm hasta ve kontrollerle yüz yüze görüşülerek, kendilerine yöneltilen Ek-1 deki soruları cevaplamaları istendi. İsi inaktivasyonu ve agaroz jel elektroforezi yöntemleriyle yapılan analiz sonuçlarında elde edilen veriler (Ek-2) ile iki yöntem arasındaki istatistiksel ilişki Paired Sample T Testi kullanılarak belirlenmiştir.

Agaroz jel elektroforezi ile belirlenen karaciğer bandı; jel LALP olarak, ısı inaktivasyonu sonucu kalan ALP aktivitesi; ısı LALP olarak adlandırıldı.

Bu çalışmaya alınan kontrollerin 28' i (% 56) erkek, 22' si (% 44) kadın, hastaların ise 20' si (% 40) erkek, 30' u (% 60) kadın bireylerden oluşmuştur. Hasta ve kontrollerin yaş ortalamaları sırasıyla  $62.3 \pm 8.58$  ve  $42.0 \pm 12.66$ 'dır. Kadınlarda yaş ortalaması hastalar ve kontrollerde sırasıyla  $62.5 \pm 8.36$  ve  $45.5 \pm 14.43$ , erkeklerde ise  $61.8 \pm 9.09$  ve  $39.3 \pm 10.56$ ' dır. Hasta ve kontrol grubunda yaş dağılımı histogramı Şekil 5.1a ve Şekil 5.1b' de gösterilmektedir.



Şekil 5.1a. Kontrol grubunda yaş dağılımı



**Şekil 5.1b.** Hasta grubunda yaş dağılımı

Siroz hastaları ve kontrollerin yaş, cinsiyet ve analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi Çizelge 5.1a ve Çizelge 5.1b’ de görülmektedir. Her iki gruba ait analiz sonuçlarına göre total ALP değeri kontrol grubu için; 42-111 U/L arasında, ortalaması  $64.98 \pm 17.70$ , hasta grubunda ise; 37-192 U/L arasında, ortalama  $95.60 \pm 34.36$ ’ dir.  $56^{\circ}\text{C}$  ısı LALP değeri kontrol grubu için; 14-48 U/L arasında, ortalaması  $25.08 \pm 7.75$ , hasta grubunda ise; 13-74 U/L arasında, ortalaması  $37.00 \pm 14.58$ ’ dir.  $56^{\circ}\text{C}$  ısı kemik değeri kontrol grubu için; 21-76 U/L arasında, ortalaması  $39.90 \pm 12.68$ , hasta grubunda ise; 24-136 U/L arasında, ortalaması  $55.59 \pm 25.67$ ’ dir. Jel LALP değeri kontrol grubu için; 17-85 U/L arasında, ortalaması  $39.24 \pm 15.67$ , hasta grubunda ise; 20-113 U/L arasında, ortalaması  $51.83 \pm 21.18$ ’ dir. Jel kemik değeri kontrol grubu için; 13-51 U/L arasında, ortalaması  $25.74 \pm 10.92$ , hasta grubunda ise; 14-134 U/L arasında, ortalaması  $39.46 \pm 27.87$ ’ dir. %  $56^{\circ}\text{C}$  ısı LALP değeri kontrol grubu için; 24.14-56.90 arasında, ortalaması  $38.94 \pm 7.83$ , hasta grubunda ise; 20.17-57.69 arasında, ortalaması  $40.56 \pm 9.38$ ’ dir. % Jel LALP değeri kontrol grubu için; 32.08-86.73 arasında, ortalaması  $59.82 \pm 14.20$ , hasta grubunda ise; 17,10-86.80 arasında, ortalaması  $58.19 \pm 16.80$ ’ dir. Sadece hasta grubunda saptanan Jel bağırsak değeri; 0-25 U/L arasında, ortalaması  $1.30 \pm 4.23$ ’ dür. Hasta grubundan 5 bireyde saptanan  $65^{\circ}\text{C}$  derece ısıya dayanıklı izoenzim değeri ortalaması  $0.15 \pm 0.42$  olarak tesbit edilmiştir.

**Çizelge 5.1a.** Kontrol grubu için tanımlayıcı istatistiksel değerlendirme

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Std. Sapma
Yaş	50	28	75	42,02	12,66
Total ALP	50	42	111	64,98	17,69
56 °C ısı LALP	50	14	48	25,08	7,75
56 °C ısı Kemik izoenzim	50	21	76	39,90	12,68
Jel LALP	50	17	85	39,24	15,67
Jel Kemik izoenzim	50	13	51	25,74	10,92
JEL Bağırsak izoenzim	50	0	0	,00	,000
65°C ısı varyant izoenzim	50	0	0	,00	,000
% Jel LALP	50	32,08	86,73	59,82	14,20
% 56 °C ısı LALP	50	24,14	56,90	38,94	7,83

**Çizelge 5.1b.** Hasta grubu için tanımlayıcı istatistiksel değerlendirme

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Std. Sapma
Yaş	46	47	81	62,26	8,45
Total ALP	46	37	192	95,59	34,36
56 °C ısı LALP	46	13	74	37,00	14,58
56 °C ısı Kemik izoenzim	46	24	136	55,59	25,67
Jel LALP	46	20	113	51,83	21,18
Jel Kemik izoenzim	46	14	134	39,46	27,87
JEL Bağırsak izoenzim	46	0	25	1,30	4,23
65°C ısı varyant izoenzim	46	0	2	,15	,42
% Jel LALP	46	17,1	86,8	58,19	16,80
% 56 °C ısı LALP	46	20,17	57,69	40,56	9,38

Jel LALP ile 56°C ısı LALP değerleri U/L ve Yüzde aktivite olarak hasta ve kontrol grubu için Paired Sample T Testi kullanılarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir (Çizelge 5.2a ve Çizelge 5.2b). Testte yanılma düzeyi 0.05 olarak alınmıştır.

Test sonuçları;

U/L değerler alındığında; hasta grubu için t değeri 8.35, p değeri ise 0.00' dır. Kontrol grubu için ise t değeri 9.71, p değeri 0.00'dır. Yüzde değerler alındığında; hasta grubu için t değeri 9.13, p değeri 0.00' dır. Kontrol grubu için ise t değeri 12.09, p değeri 0.00'dır. Jel karaciğer değeri ile 56°C ısı karaciğer değeri ortalamaları arasında ki fark anlamlı bulunmuştur (p<0.05).



**Çizelge 5.2a** U/ L Paired Samples T Testi

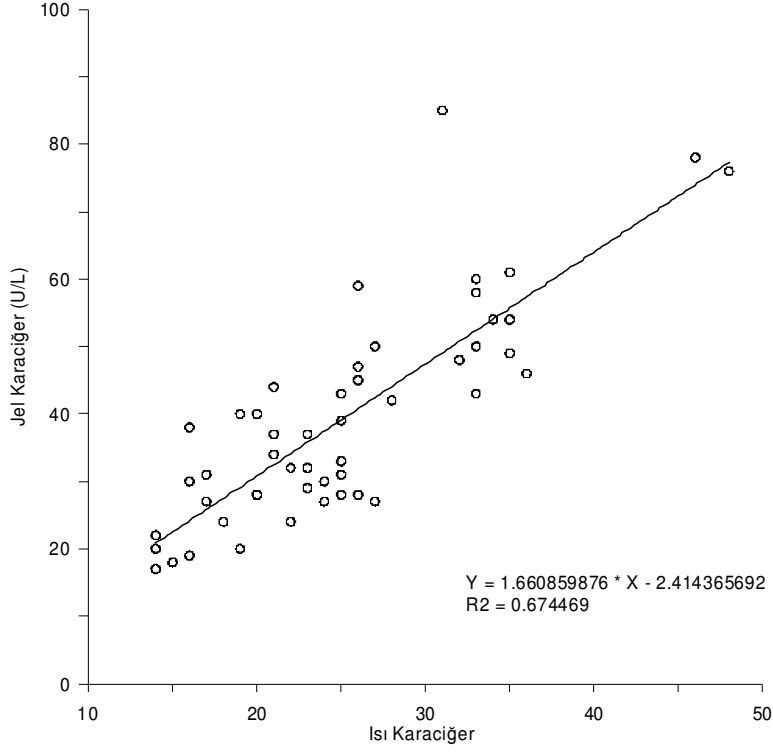
Gruplar	Isı LALP (U/L) X ± SD	Jel LALP (U/L) X ± SD	t değeri	p değeri
Hasta	37.00 ± 14.58	51.83 ± 21.18	8.35	0.00 < 0.05
Kontrol	25.08 ± 7.75	39.24 ± 15.67	9.71	0.00 < 0.05

**Çizelge 5.2b** Yüzde Paired Samples T Testi

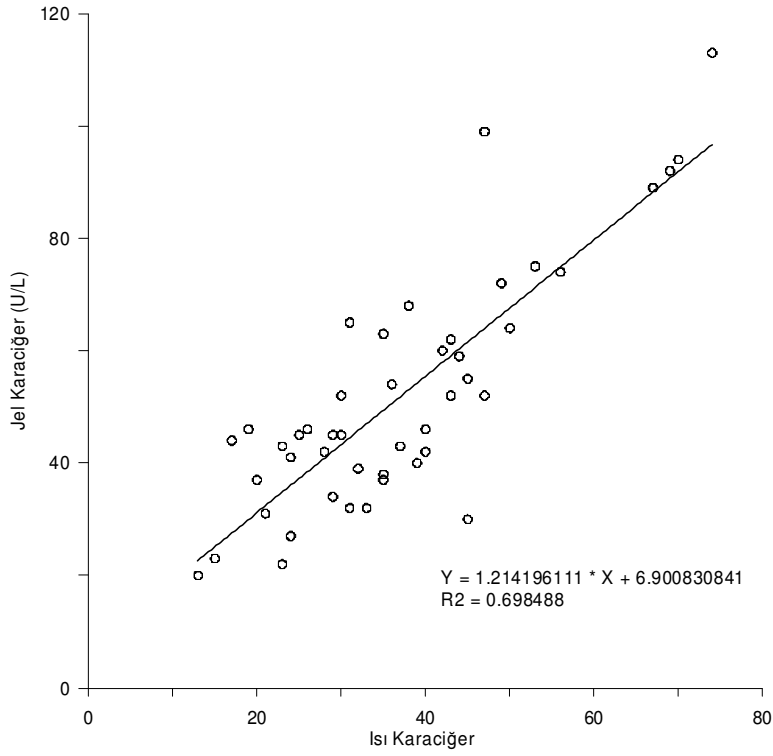
Gruplar	Isı LALP (%) X ± SD	Jel LALP (%) X ± SD	t değeri	p değeri
Hasta	40.56 ± 9.38	58.19 ± 16.80	9.13	0.00 < 0.05
Kontrol	38.93 ± 7.83	59.81 ± 14.20	12.09	0.00 < 0.05

Kontrollerde ve hastalarda ısı LALP ile jel LALP değerlerinin doğrusal regresyon analizi sonucu güvenilirlik ( $R^2$ ) sırasıyla % 67 ve % 69 olarak bulunmuştur (Şekil 5.2a, Şekil 5.2b).

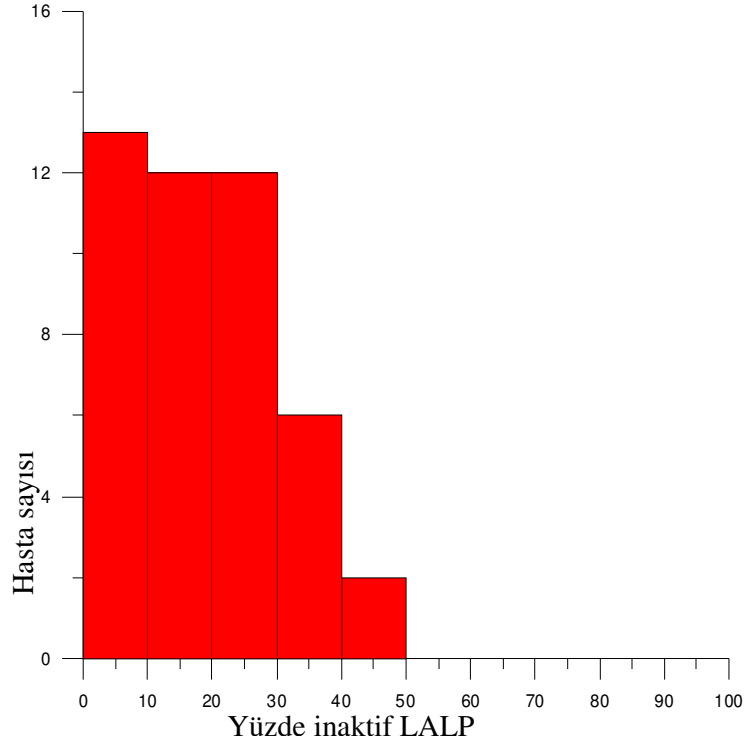
Jel LALP değerinin bireylerin gerçek LALP' ını gösterdiğinden yola çıkarak, bu değerden ısı LALP ve jel bağırsak izoenzim değerlerinin çıkarılması ile elde edilen sonuç total ALP nin yüzdesi olarak saptandı ve ısı ile inaktif olan LALP olarak adlandırıldı. Bu değer in bireyler arasındaki dağılımı Şekil 5.3a ve Şekil 5.3b.' de görülmektedir. Buna göre hasta grubunda ısı ile LALP' nin inaktif olma oranı %10 ile % 30 arasında dağılım göstermektedir. Kontrol grubunda ise bu oran % 30 ile % 40 arasında dağılım göstermektedir.



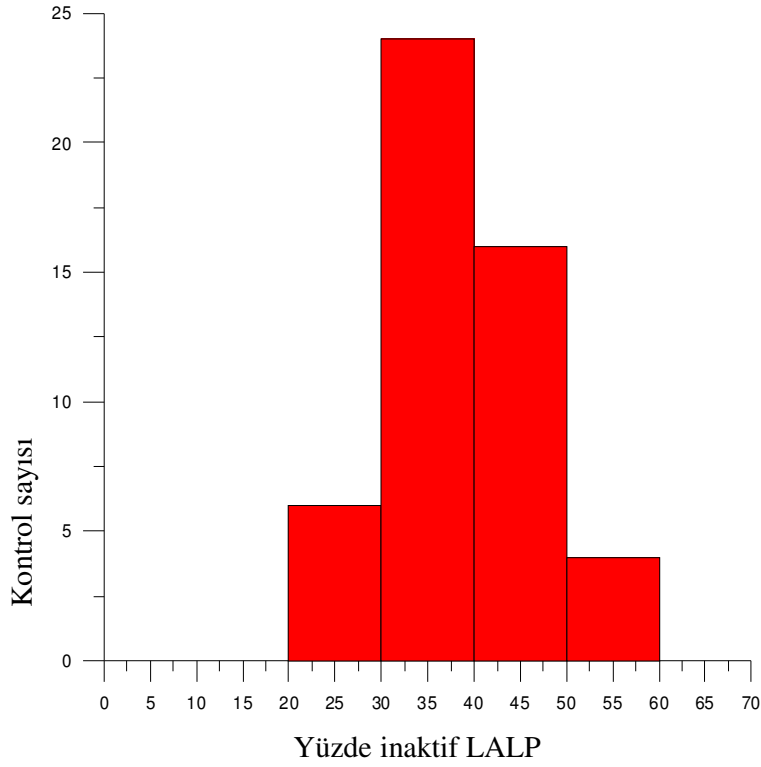
**Şekil 5.2a.** Kontrollerde Doğrusal Regresyon Analizi.



**Şekil 5.2b.** Hastalarda Doğrusal Regresyon Analizi. Jel Karaciğer: Jel LALP, Isı Karaciğer: Isı LALP, R<sup>2</sup>: güvenilirliği göstermektedir.



**Şekil 5.3a.** Hasta grubunda 56°C' ısı ile inaktif olan karaciğer fraksiyonunun total ALP yüzdesi olarak dağılımı.



**Şekil 5.3b.** Kontrol grubunda 56°C' ısı ile inaktif olan karaciğer fraksiyonunun total ALP yüzdesi olarak dağılımı.

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Alkalen fosfatazlar (ALP) kısmen genetik faktörler kısmende post-translasyonel modifikasyonlardan dolayı dolaşımında çeşitli izoenzim formlarında bulunurlar. Sağlıklı insanlarda plazma ALP' ını kemik ve karaciğer izoenzimi oluşturur. Bu nedenle serum ALP ölçümlerinin kemik ve karaciğer hastalıklarında tanısal değeri fazladır. Bu dokulardaki patolojilerde serum ALP değeri kemik ya da karaciğer izoenzimine bağlı olarak yükselir. Total ALP değerinin artması aktivitenin yükselmesine neden olan izoenzim ya da izoenzimlerin belirlenmesini gerektirir [10,11].

ALP izoenzimlerini birbirlerinden ayırmak için, değişik substratlarla reaksiyon hızlarındaki göreceli farklar, verilen inhibitörlere karşı farklı tepkiler, ısı ya da üre ile denatürasyona karşı farklı dirençler, elektroforetik göçlerindeki farklılıklar ve immünokimyasal özellikler gibi kriterler kullanılır. ALP izoenzimlerini belirlemek için birçok metod geliştirilmiştir. Bunlar; elektroforez, kolon kromatografisi, HPLC, immünoassay, üre denatürasyonu, aminoasit inhibisyonu ve ısı inaktivasyonu yöntemleridir [44].

Karaciğer değişik fonksiyonel ve anatomik yapılardan oluşmuş en büyük ve en önemli metabolik organdır. Karaciğer hastalıklarında klinik ve laboratuvar bulguları birçok durumda örtüşmeyebilmektedir. Bu durum, farklı patolojilerin karaciğerin değişik fonksiyonel bölümlerini daha fazla etkilemeleri, bazı klinik ve laboratuvar bulgularının hastalığın erken döneminde olmaması veya belirsiz olması ile açıklanabilir. Tek bir biyokimyasal test sonucuna bakılarak karaciğer fonksiyonları hakkında genel bir değerlendirme yapmak güçtür. Örneğin inaktif siroz olgularında, hepatosellüler karsinomada karaciğer fonksiyon testlerinin önemli bir bölümü normal olarak saptanabilmektedir. Günümüzde sayıları her geçen gün artan, özgün olmayan pahalı ve *invaziv* laboratuvar yöntemlerinin bilinçsiz kullanımları ile tanısal problemler daha da artmaktadır. Gelişmiş ülkelerde bile birçok yöntemin bilinçsizce denenmesi yerine bazı pratik ve ekonomik yöntemlerin iyi yorumlanmaları önerilmektedir [1].

Total ALP aktivitesi laboratuvarımızda 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 prensibine dayanılarak ölçülmüş ve sonuçlar U/L olarak elde edilmiştir. Laboratuvarımıza uyarlanan bu yöntemde normal değerler her iki erişkin cinsiyette de 38-126 U/L' dir. Total ALP aktivitesi, çeşitli rahatsızlıklarda

özellikle karaciğer ve kemik hastalıklarında artış gösterir. Total ALP aktivitesinin yüksek ya da düşük olması vücutta ki bir patolojinin belirtisi sayılır. Ancak bu aktivitenin sorumlusu olan izoenzimlerin yüzdeleri ve hangi dokudan kaynaklandığı hakkında bilgi edinilemez. Bazen de total ALP aktivitesi normal aralıklarda olmasına rağmen bir organ veya dokuda ki izoenzim anormalliğinden dolayı izoenzimlerin oranı değişebilir. Bu yüzden patolojik durumların teşhis edilmesinde total ALP ölçümü yeterli olmaz. Total ALP' ın yüksek olduğu durumlarda ya da klinik semptomlar gereği izoenzim analizi yararlı olacaktır. Total ALP aktivitesinin yüzde kaçının hangi dokuya ait olduğunu söylemek bu metodlarla mümkündür [44,60].

1965 yılında Posen ve arkadaşları farklı hasta gruplarının serumlarında ALP' ın sıcaklık inaktivasyon oranlarında ki farkları tanımlamışlardır. Bu çalışmada kemik hastalığı olan bireylerin serum ALP' ının hepatobilyer hastalıkları olanlardan daha fazla inaktive olduğunu göstermişlerdir. Sonraki yıllarda bu yöntem birçok laboratuvarında ALP izoenzimlerinin ayırımında kullanılmıştır [13]. 1972 yılında Johnson ve arkadaşları agaroz jel elektroforezi ile inaktivasyon yöntemlerini kıyasladığı bir çalışmada her iki yöntemin birlikte ALP izoenzimi ayırımında kullanılabileceğini belirtmişlerdir [75].

Çalışmamızda ALP izoenzimlerinin belirlenmesinde Agaroz jel elektroforezi referans metod seçilerek daha ekonomik ve rutin kullanım için uygun olan ısı inaktivasyonu metodu ile karşılaştırılmıştır.

Agaroz jel elektroforezi ile ALP' ın karaciğer, kemik, bağırsak ve makro karaciğer izoenzimleri kantitatif olarak belirlenebilmektedir. Onica ve arkadaşları 1986' da Nöraminidaz veya lektin tatbiki ile karaciğer, kemik ve sialik asit içermediğinden dolayı bağırsak izoenzimlerinin birbirinden ayrıldığını göstermişlerdir [60]. 1985 de Eastham ve 1992 de Wallach bağırsak izoenziminin siroz da arttığı ve karaciğer izoenziminin kolestaziste çok yüksek çıktığını bildirilmiştir [76,61]. Bütün bu çalışmalar da sağlıklı bireylerde ve siroz hastalarında izoenzimlerin dağılımı ile bizim elde ettiğimiz sonuçlar örtüşmekte idi. 2003 yılında Somani ve arkadaşları Agaroz jel ve poliakrilamid jel elektroforez yöntemlerinin ALP izoenzimlerini ayırmada diğer elektroforez yöntemlerine göre daha basit, kullanışlı ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir [59]. Ancak Agaroz jel elektroforezi yönteminde plasental ALP (PALP) ya da Regan 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 fosfatazlarının sıcaklığa karşı stabiliteleri farklıdır. 56 °C ve 65 °C enzimin sıcaklıkla denatürasyonunda sınır derecelerdir. Plasental ve regan izoenzimleri 65 °C ısıda 30 dakika stabilitelerini korurlar [16]. 56 °C’ de 10 dakika inkübasyondan sonra kalan enzim aktivitesi total ALP aktivitesinin % 20’sinden daha az ise BALP baskın olandır. Kalan aktivite % 25-55 arasında ise baskın olan izoenzim karaciğer ve bağırsak ALP’dır [44]. 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.

1965 yılında Posen ve arkadaşları, 1972 yılında Johnson ve arkadaşları sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında ALP’ ın 56 °C’ de aktivitesinin azaldığını, bu aktivite kaybının sağlıklı erişkin bireylerde 10 dakikada % 40 ila % 70 arasında olduğunu bildirmişlerdir [13- 75]. Çalışmamızda, 56 °C’ de 10 dakika ısıya tabi tutulan hasta ve kontrol serumlarında kalan ALP aktivitesinin total ALP’ a oranlanması sonucu elde ettiğimiz veriler siroz hastalarında % 20 ile % 58 arasında, kontrol grubunda ise % 24 ile % 57 arasında bulunmuştur ve literatürle uyumludur. Kontrol grubunda ve hasta grubunda karaciğer izoenzimi genel olarak baskın olandır. Total ALP’ da karaciğer izoenziminin baskın olmasının nedeni hasta ve kontrol grubu için erişkin ve herhangi bir kemik hastalığı olmayan bireylerin seçilmiş olmasından kaynaklanmıştır. Sağlıklı ve her hangi bir kemik hastalığı olmayan erişkinlerde total ALP’ ın % 60’ ının karaciğer % 40’ının kemik izoenzimine ait olduğu bildirilmiştir [44]. Domar ve arkadaşları (1991) bağırsak hastalığı bulunan bireylerin serumunda bağırsak izoenzimine rastlamazken, primer biliyer siroz ve karaciğer sirozu bulunan hastaların kan grupları ne olursa olsun serumlarında önemli derecede yüksek bağırsak izoenzimine rastlamışlardır [65]. Bu tez çalışmasında siroz hastalarında bağırsak ALP izoenzimi (İALP) tespit edilmiştir. 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’ ın tesbiti mümkün olmamaktadır. Bununla beraber her hangi bir hastalık durumu olmaksızın B ve 0 kan grubu olan kişilerin serumunda bu izoenzimin bulunuşu İALP’ ın 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 Elektroföresi yönteminde PALP ve BALP aynı bant içinde görölmektedir. Bu durum her iki yöntemin de dezavantajları olduğunu göstermiştir. Her iki yöntem bir arada ALP izoenzimi ayırımını tam olarak sağlar. 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 bulunan ısıya dirençli bu varyant (regan) izoenzimin varlığı ile ilgili literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan; Poertugal ve arkadaşları (1970) Hepatosellüler Karsinomu (HCC) olan hastalarda yaptıkları bir çalışmada hastaların % 10'unda, Higashino ve arkadaşları (1975) % 30'unda ısıya dirençli bu enzimin var olduğunu ve hepatoma da teşhisi doğrulamak için alfa fetoprotein ile birlikte kullanılabileceğini belirtmişlerdir. 1977 de Macholda ve arkadaşları, 1978' de Crofton ve Smith, 1988 yılında da Bukofzer ve arkadaşları HCC' da Regan izoenzimi varlığını ortaya koymuşlardır [77-81]. Sirozun HCC için önemli bir risk faktörü olması nedeniyle 65 °C ısı inaktivasyonu sonrası kalan aktivite bir tümör varlığı olabileceği gibi farklı patolojilerin göstergesi de olabilir. Ancak varyant izoenzimlerin sağlıklı bireylerde de az da olsa görülebileceği bildirilmiştir [65]. Bu durumun görüntüleme teknikleri ve biyopsi sonuçları ile desteklenerek daha kapsamlı olarak araştırılması gerektiği düşüncesindeyiz.

Bu çalışmada Agaroz jel elektroföresi ve ısı inaktivasyonu yöntemleri hasta ve kontrol gruplarında ayrı ayrı uygulanmıştır. Elde edilen değerler arasında fark olduğu görölmüştür. Bu farkların önemli olup olmadığı Sample Paried T Testi ile değerlendirilmiştir. Test sonucuna göre farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir.

Isı inaktivasyonu yönteminde LALP' ın bir kısmı BALP ile birlikte inaktive olmaktadır. LALP' ın inaktivasyon oranı hasta ve kontrol grubu arasında farklılık göstermektedir. Bu durum izoenzimlerin ısı direncinin bazı patolojilerde çeşitli etkileşimlerle değiştiğini düşündürmektedir. Tüm bu bulgular sonucunda, 56 °C' de 10 dakika olarak uygulanan ısı inaktivasyonu yönteminin serum total ALP aktivitesine sebep olan izoenzimlerin belirlenmesinde çok duyarlı olmadığı saptanmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Dolar E. (2002). Klinik Karaciğer Hastalıkları, Karaciğer Sirozu. Nobel- Güneş Tıp Kitabevi, Bursa.
2. Özel M., Ozdoğan O. (2007). Klinik gastroenteroloji ve hepatoloji. Nobel tıp kitap sarayı, Ankara.
3. Erlinger S, Benhamou JP. (1999). 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, Vol 2, pp. 629-644.
4. Anthony PP, Ihsak KG, Nayak NC, et al. (1977). The Morphology of Cirrhosis. Recommendation on definition, nomenclature and classification by a working group sponsored by The World Health Organization. Journal of Clinical Pathology, 31:395
5. Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, et al. (2004). Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance. Gastroenterology,126:1005-14.
6. Srivatanakul P, Sriplung H, Deerasamee S. (2004). Epidemiology of liver cancer: An overview. Asian Pac J Cancer Prev, 5:118-25.
7. Uzunalimoğlu O. (2001). Risk factors for hepatocellular carcinoma in Turkey. Dig Dis Sci. 46(5):1022-8.
8. Liu JH, Chen PW, Asch SM et al (2004). Surgery for hepatocellular carcinoma:does it improve survival? Ann Surg Oncol. 11:298-303.
9. Dufour D.R., Nolte F.S., Gretch D.R., Koff R.S. and Seeff L.B. (2000). Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests Clinical Chemistry, 46:2027-2049.
10. Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of Abnormal Liver Enzyme Tests in the Asymptomatic Patient. (2000). New England Journal of Medicine, 342:1266-1271.
11. Harris, H. (1990) The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. Clin. Chim. Acta 186, 133±150.
12. Attila G, Matyar S (2002). Plazma enzimlerinin tanısal değerleri. Mersin On.Tıp Fak.Derg.1:73- 82.
13. Posen S, Neale FC, Clubb JS. (1965). Heat inactivation in the study of human alkaline phosphatases. Annals of Internal Medicine. 62:1234–1243.
14. Le Du MH., Stigbrand T., Taussig MJ., M'enez A., Stura EA. (2001). Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 °A resolution: implication for a substrate specificity. Journal of Biological Chemistry. 276(12), 9158–9165.
15. Özgünen T., Üstdal M. (1997). Hekimlikte Biyokimya: Hangi test istenmeli?, Barış Kitabevi, İstanbul.
16. Henry JB. (1996). Clinical diagnosis and management by laboratory methods. Nineteenth edition. WB Saunders Company, 276-385.
17. Coleman JE. (1992). Structure and mechanism of alkaline phosphatase. Annu Rev Biophys Biomol Struct 21, 441-483.
18. Martland, M., Robinson, R. (1926). Possible significance of hexosphosphoric esters in ossification VI phosphoric acid esters in blood plasma. Biochem J, 20, 847.
19. Bodansky, A. (1934). Phosphatase studies VI Non osseus origins of serum phosphatase. Its increase after ingestion of carbohydrates. J Biol Chem, 104, 473.
20. Roberts, W.M., (1930). Variations in the phosphatase activity of blood in disease Br J Exp Pathol, 11, 90-95.
21. Fernley, H.N. (1971). Mammalian alkaline phosphatases. The enzyme Vol IV.



- Boyer, D.Ed. Academic Pres New York, 3. Ed. 417- 447.
22. Tartter, P.I. Slater, G. Gelernt, I. Aufses, A.H. (1981). Screening for liver metastases from colorectal cancer with carcinoembryonic antigen and alkaline phosphatase. *Ann. Surg.*, 193,3, 357-360
  23. Boyer, S. (1961). Alkaline phosphatase in human sera and placenta. *Science*, 134, 1002.
  24. Stolbach, L.L., Krant, M.J., Fishman, W.H. (1969). Ectopic production of an alkaline phosphatase isoenzyme in patients with cancer. *N Engl J Med*, 281, 757-762.
  25. Fishman, W.H., Inglis, N.R., Gren, S., et al. (1968). Immunology and biochemistry of Regan isoenzyme of alkaline phosphatase in human cancer. *Nature*, 219, 697-699.
  26. Timperley W.R. (1968). Alkaline phosphatase secreting tumour of lung. *The Lancet*, 10, 356.
  27. Haris, H., Hopkinson, D.A., Robson, E.B. ( 1974). The incidence of rare alleles determining electrophoretic variants: data on 43 enzyme loci in man. *Ann Hum Genet Lond*, 37, 237-253.
  28. Moss, D.W. (1992). Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin chem*, 38, 2486-2492.
  29. Fishman, W.H. (1974). Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *Am J Med*, 56:617-50.
  30. Sandborn, E.B., Makita, T. (1969). The effect of dimethyl sulfoxide on aldehyde fixation and the localization of alkaline phosphatase activity in tissues. *J Cell Biol*, 43:121.
  31. Fishman, W.H. (1990). Alkaline phosphatase isoenzymes: Recent Progress. *Clin. Biochem.*, vol. 23, 99-104.
  32. Clubb, J.S., Neale, F.C., Posen, S. (1965). The Behaviour of infused placental alkaline phosphatase in human subjects. *J. Lab. Clin. Med.* 66:493.
  33. Murphy, JE., Xu, X., Kantrowitz, ER. (1993). Conversion of a magnesium binding site into a zinc binding site by single aminoacid substitution in *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *J Biol Chem* 268(29), 21497-500.
  34. Gottlieb, A.J., Susman, H.H. (1968). Human placental alkaline phosphatase: molecular weight and subunit structure. *Biochim Biophys Acta*, 160, 167.
  35. Mueller WH., Kleefeld D., Khattab B., Meissner JD., Scheibe RJ. (2000). Effect of retinoic acid on N- Glycosylation and mRNA stability of the liver/ bone/ kidney alkaline phosphatase in neural cells. *J Cell Physiol.* 182: 50-61.
  36. Eguchi, M. (1995). Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Biochem Mol Biol.*, 111(2), 151-62.
  37. Canoruç, N., Canoruç, F., Özden, T., Şen, C. (1993). Gastrointestinal sistem kanserlerinde sialik asit ve alkalen fosfatazın serum düzeyleri ve tanıdaki önemleri. *Gastroenteroloji*, 4(4), 656-60.
  38. Bublitz R., Hoppe H., Cumme GA., Thiele M., Attey A., Hom A. (2001). Structural study on the carbohydrate moiety of calf intestinal alkaline phosphatase. *J Mass Spect.*, 36: 960-972.
  39. Millan, JL. (1988) . Oncodevelopmental expression and structure of alkaline phosphatase genes. *Anticancer Res.* 8: 995- 1004.
  40. Fishman, W.H., Ghosh, N.K. (1967). Isoenzymes of human alkaline phosphatase. *Adv Clin Chem.* 10, 255-370.
  41. Whyte, MP. (1989). Alkaline phosphatase: physiological role explored in hypophosphatasia. *Bone Miner Res.*, 6:175-218
  42. Calbreath, FD. (1992). *Clinical chemistry a fundamental textbook.* WB Saunders Company. 186-90.

43. Simopoulos TT., Jencks WP. (1994). Alkaline phosphatase is an almost perfect enzyme. *Biochemistry*. 33, 10375-10380.
44. Tietz, N.W. (1999). *Textbook of clinical chemistry*. Third edition. WB Saunders Company. Philadelphia, London.
45. Solomon, P. (1967). Alkaline phosphatase. *Ann Int Med*, 67, 183-203.
46. Gültepe, M., Bülbül, M. (1993). Quantitative determinations of alkaline phosphatase isoenzymes by chemical inactivation and its application to automation. *Tr J of Medical Sciences* 18(1), 23-9.
47. Mersol, J.V., Steel, D.G., Gafhi, A. (1993). Detection of intermediate protein conformations by room temperature tryptophan phosphorescence spectroscopy during denaturation of *Escherichia coli* alkaline phosphates. *Biopsy Chem.*, 48(2), 281-91.
48. Türköz Y, Üstdal M. (1994). Sığır karaciğer alkalen fosfatazının saflaştırılması, fizikokimyasal ve kinetik özelliklerinin araştırılması. *Optimal Tıp Dergisi*, 7 (1), 31-7.
49. Gürdöl F., Ademoğlu E. (2006). *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitabevleri 1. Baskı: 161-864. İstanbul.
50. Anderson, S.C., Cockayne, S. (1993). *Clinical Chemistry, concepts and applications*, an HBJ international Edition WB Saunders Company.
51. Wiess MJ., Henthom PS., Lafferty MA., Slaughter C, Raducha M ., Haris H. (1986). Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83, 7182-7186.
52. Henthom MS., Raducha M., Kadesch T., Weiss MJ., Haris H. (1988). Sequence and characterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem*. 163, 12011-19.
53. Knoll BJ., Rothblum KN., Longley M. (1988). Nucleotide sequence of the human placental alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem*. 263(24), 12020-12027.
54. Hofmann MC., Millan JL. (1993). Developmental expression of alkaline phosphatase genes: Reexpression in germ cell tumors and immortalized germ cells. *Eur Urol*. 23, 38-45.
55. De Broe ME, Roels F, Nouwen EJ, Claeys L, Wieme RJ. (1985). Liver plasma membrane: the source of high molecular weight alkaline phosphatase in human serum. *Hepatology*, 5, 118-28.
56. Momet, E., Stura, E., Lia-Baldini, A.S., Stigbrand, T., Menez, A., Le Du, M.H. (2001). Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem.*, 276(33), 31171-31178.
57. Makiya R., Thornell, L.E., et al. (1982). Placental alkaline phosphatase: A GPI-anchored protein. Is clustered in clathrin-coated vesicles. *Biochem Biophys Res Commun*, 183, 803-8.
58. Meyer-Sabellek, W., Sinha, P. and Köttgen, E. (1988). Alkaline Phosphatase: Laboratory and Clinical Implications. *Journal of Chromatography*, 429, 419-444.
59. Somani, B.L., Ambade, V.N., Arora M.M. (2003). Polyacrylamide Gel Affinity Electrophoresis for Separation of Enzyme Isoforms. 59, 125-127
60. Onica, D., Sundblad, L., Waldenlind, L. (1987). Separation of alkaline phosphatase isoenzymes using affinity electrophoresis in agarose gel containing lectin is combined with agar gel electrophoresis. 47(3), 239-45.
61. Wallach, J. (1992). Interpretation of diagnostic test: a synopsis of laboratory medicine.
62. Haspolat K., Söker M. (2002). Kemiğe ait biyokimyasal değerler ve onkoloji. *Dicle Tıp Dergisi*, C: 29, S:3.
63. Van Hoof, V.O., De Broe, M.E. (1994). Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit. Rev. Clin. Lab Sci.*, 31(3), 197-293.

64. Erbil, K. (2007). Laboratuvar testleri ve klinik kullanımı. Copyright GATA Komutanlığı Basımevi, Ankara.
65. Domar, U., Hirano, K., Stigbrand, T. (1991). Serum levels of human alkaline phosphatase isozymes in relation to blood groups. *Clin. Chim. Acta.* 203, 305-314
66. Birol, L., Akdemir N., Bedük T. İç Hastalıkları Hemşireliği. Vehbi Koç Vakfı Yayınları, Ankara 1993:422-429
67. Millan, J.L. (1992). Alkaline phosphatase as a reporter of cancerous transformation. *Clin Chem Acta.*, 209, 123- 129.
68. Muensch, H.A., Maslow, W.C., Azama, F., Bertrand, M. (1986). Placental-like alkaline phosphatase, *Cancer*, 58, 1689-1694
69. Ben-Arie, A., Hagay, Z., Ben-Hur, H., Open, M., Dgani, R. (1999). Elevated serum alkaline phosphatase may enable early diagnosis of ovarian cancer *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 86, 69-71.
70. Sherlock, S., Dooley, J. (2002). Hepatic cirrhosis. In: *Disease of the liver disease and biliary system.* 2.th. ed, Blackwell scientific pub., pp.365-377, London.
71. Aksöz, K., Yazıcıoğlu, N., Ünsal, B., Karadağ, M., Ender, G., Göneç, H. (1995). 325 Karaciğer sirozlu hastanın değerlendirilmesi. *Türk J. Gastroenterol*, 6, 210-211.
72. Karagöz, İ., Haktanır, A. (2004). Derleme; Kronik karaciğer hastalıkları. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2(2), 33-40.
73. Ökten, A., Demir, K., Kaymakoğlu, S., Özdil, S., Dinçer, D., Durakoğlu, Z. ve ark. (2001). Karaciğer sirozunda hepatosellüler karsinoma sıklığı ve etiyolojisi. *Güncel Gastroenteroloji*, 1(5), 293-7.
74. Sherman, M., Peltekian, K.M., Lee, C. (1995). Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population. *Hepatology*, 22, 432-438
75. Johnson, R.B., Ellingboe, K., Gibbs, P. (1972) - A Study of Various Electrophoretic and Inhibition Techniques for Separating Serum Alkaline Phosphatase Isoenzymes. *Clinical Chemistry*, 18(2), 110-5
76. Eastham, R.D. (1985). *Biochemical values in clinical medicine.* Seventh Edition. Wright Bristol.
77. Portugal, M.L., Azevedo, M.S, Manso, C. (1970). Serum alpha-fetoprotein and variant alkaline phosphatase in human hepatocellular carcinoma *Int J Cancer.* 6(3),383-7.
78. Higashino K, Otani R, Kudo S, Hashinostume M, Hada T. (1975). Hepatocellular carcinoma and a variant alkaline phosphatase. *Ann Intern Med.* 83(1),74-8.
79. Stepan, J., Macholda, F., Konopasek, B., Zizkovsky, V., Bek, V., Kordac, V. (1977). Alkaline phosphatases in neoplastic diseases. *Acta Univ Carol Med Monogr.* (78 Pt 2),131-7.
80. Crofton, P.M, Smith, A.F. (1978). Regan variant alkaline phosphatase in gastrointestinal carcinoma. *Clin Chim Acta.* 16, 86(1), 81-8.
81. Bukofzer, S., Kew, M.C, Rowe, P. (1988). The prevalence of variant alkaline phosphatase in hepatocellular carcinoma in southern African blacks. *Cancer.* 1, 62(5), 978-81.

EK-1  
HASTA VE KONTROLLERE AIT SORGU FORMU

EK-1.1 HASTA VE KONTROLLERE AİT SORGU FORMU

No:		
Tarih:		
Adı Soyadı:		
Cinsiyeti:		
Adres:		
Tel Ev:		
Tel Cep:		
Doğum Yeri:		
Doğum Tarihi:		
Kan Grubu:		
Sigara Kullanımı:	Evet	Hayır
Alkol Kullanımı:	Evet	Hayır
Tanı:		

EK-2  
VERİLER

EK-2.1 KONTROL GRUBU VERİLERİ

	İSİM	DURUM	YAŞ	CİNS	TOTAL ALP	56 DERECE LALP	JEL LALP	JEL BALP	JEL İALP	65 DERECE VARYANT İZOENZİM
1	H.Y	KONTROL	28	E	54	23	32	22	0	0
2	S.K	KONTROL	29	E	77	34	54	23	0	0
3	N.A	KONTROL	31	E	53	14	17	36	0	0
4	F.A	KONTROL	29	E	61	21	34	27	0	0
5	H.Ç	KONTROL	28	E	76	25	31	45	0	0
6	B.Ö	KONTROL	33	E	61	25	28	33	0	0
7	E.G	KONTROL	42	E	63	26	47	16	0	0
8	H.T	KONTROL	45	E	69	32	48	21	0	0
9	M.K	KONTROL	42	E	98	31	85	13	0	0
10	M.G	KONTROL	57	E	51	16	38	13	0	0
11	M.K	KONTROL	34	E	76	35	54	22	0	0
12	İ.Ş	KONTROL	40	E	54	20	40	14	0	0
13	O.Y	KONTROL	41	E	111	35	61	50	0	0
14	Y.Y	KONTROL	45	E	73	25	43	30	0	0
15	C.K	KONTROL	56	E	70	33	50	20	0	0
16	S.E	KONTROL	53	E	70	28	42	28	0	0
17	Z.S	KONTROL	28	E	93	26	45	48	0	0
18	A.Ç	KONTROL	35	E	84	33	60	24	0	0
19	M.Y	KONTROL	72	E	58	14	22	36	0	0
20	S.V	KONTROL	28	E	73	27	50	23	0	0
21	N.B	KONTROL	40	E	106	48	76	30	0	0
22	O.B	KONTROL	35	E	106	46	78	28	0	0
23	İ.K	KONTROL	43	E	58	33	43	15	0	0
24	H.D	KONTROL	43	E	44	22	24	20	0	0
25	Ş.Y	KONTROL	38	E	63	24	27	36	0	0
26	Ç.T	KONTROL	42	E	66	21	44	22	0	0
27	S.A	KONTROL	35	E	80	26	59	21	0	0
28	H.M.T	KONTROL	28	E	49	24	30	19	0	0
29	E.K	KONTROL	37	K	54	23	37	17	0	0
30	N.T	KONTROL	37	K	66	36	46	20	0	0
31	T.D	KONTROL	28	K	73	27	27	46	0	0
32	A.B	KONTROL	40	K	44	23	29	15	0	0
33	F.K	KONTROL	41	K	58	20	28	30	0	0
34	Z.Ş	KONTROL	28	K	51	18	24	27	0	0
35	Z.E	KONTROL	48	K	53	25	39	14	0	0
36	E.Y	KONTROL	46	K	54	19	40	14	0	0
37	Ş.D	KONTROL	54	K	47	25	33	14	0	0
38	F.G	KONTROL	55	K	50	15	18	32	0	0
39	M.C	KONTROL	36	K	42	19	20	22	0	0
40	N.S	KONTROL	74	K	79	26	28	51	0	0
41	E.B	KONTROL	56	K	46	14	20	26	0	0
42	Z.A	KONTROL	75	K	56	21	37	19	0	0
43	D.K	KONTROL	43	K	43	16	30	13	0	0
44	M.A	KONTROL	73	K	71	33	58	13	0	0
45	S.S	KONTROL	41	K	46	17	31	15	0	0
46	Y.D	KONTROL	33	K	49	22	32	17	0	0
47	A.A	KONTROL	54	K	95	35	49	46	0	0
48	Z.İ	KONTROL	32	K	62	17	27	35	0	0
49	N.F	KONTROL	28	K	70	20	28	42	0	0
50	G.A	KONTROL	42	K	43	16	19	24	0	0

EK-2.2 HASTA GRUBU VERİLERİ

	İSİM	DURUM	YAŞ	CİNS	TOTAL ALP	56 DERECE LALP	JEL LALP	JEL BALP	JEL İALP	65 DERECE VARYANT İZOENZİM
1	K.K	SİROZ	63	E	80	43	62	17	1	0
2	T.K	SİROZ	48	E	441	221	356	85	0	0
3	M.A	SİROZ	73	E	134	74	113	21	0	0
4	M.Y	SİROZ	65	E	96	50	64	20	12	0
5	İ.Y	SİROZ	64	E	95	35	38	57	0	0
6	Ş.Ç	SİROZ	66	E	69	30	52	17	0	0
7	N.K	SİROZ	63	E	371	217	325	46	0	0
8	İ.S	SİROZ	72	E	82	44	59	23	0	0
9	A.T	SİROZ	57	E	107	56	74	33	0	0
10	B.K	SİROZ	59	E	175	45	30	120	25	1
11	K.E	SİROZ	56	E	60	29	34	26	0	0
12	N.G	SİROZ	55	E	141	70	94	47	0	1
13	E.Y	SİROZ	47	E	88	43	52	30	6	0
14	M.E	SİROZ	49	E	114	47	99	15	0	0
15	H.D	SİROZ	81	E	55	20	37	18	0	1
16	T.U	SİROZ	76	E	306	168	248	58	0	0
17	A.K	SİROZ	65	E	37	13	20	17	0	1
18	Y.E	SİROZ	59	E	192	67	89	103	0	0
19	Y.Ş	SİROZ	56	E	95	35	63	32	0	0
20	A.C	SİROZ	63	E	88	31	65	23	0	0
21	E.D	SİROZ	60	K	44	15	23	21	0	0
22	H.Y	SİROZ	73	K	69	36	54	15	0	0
23	N.K	SİROZ	75	K	96	31	32	64	0	0
24	D.Y	SİROZ	59	K	86	26	46	36	4	0
25	E.S	SİROZ	52	K	66	33	32	33	1	0
26	G.B	SİROZ	54	K	121	47	52	69	0	0
27	R.K	SİROZ	52	K	64	21	31	33	0	0
28	N.Ö	SİROZ	75	K	78	45	55	18	5	0
29	P.İ	SİROZ	68	K	89	40	46	43	0	0
30	N.K	SİROZ	75	K	72	23	22	44	6	0
31	F.Y	SİROZ	55	K	58	17	44	14	0	0
32	N.Ç	SİROZ	62	K	111	42	60	51	0	2
33	G.C	SİROZ	78	K	127	38	68	59	0	0
34	A.B	SİROZ	70	K	104	32	39	65	0	0
35	F.K	SİROZ	50	K	105	53	75	30	0	0
36	F.K	SİROZ	60	K	85	39	40	45	0	0
37	A.K	SİROZ	65	K	68	30	45	23	0	0
38	H.Y	SİROZ	75	K	132	69	92	40	0	0
39	S.S	SİROZ	70	K	176	40	42	134	0	0
40	D.K	SİROZ	56	K	94	37	43	51	0	0
41	A.G	SİROZ	59	K	69	19	46	23	0	0
42	B.B	SİROZ	63	K	124	49	72	52	0	0
43	D.K	SİROZ	56	K	60	23	43	17	0	0
44	B.B	SİROZ	63	K	234	121	163	66	5	0
45	S.Ö	SİROZ	70	K	86	35	37	49	0	0
46	P.K	SİROZ	61	K	58	28	42	16	0	1
47	Ş.İ	SİROZ	54	K	119	24	27	92	0	0
48	Z.Z	SİROZ	54	K	60	25	45	15	0	0
49	F.T	SİROZ	56	K	68	24	41	27	0	0
50	Z.A	SİROZ	57	K	62	29	45	17	0	0



EK-3  
YEREL ETİK KURUL KARARI



T. C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

Sayın : B.30.2.CUM.0.1H.00.00- 07/01

02.10.2007

Konu : **Karar No: 2007 - 8/5**

Yrd.Doç.Dr.Kenan ÇELİK'in yürütücüsü olduğu Yüksek Lisans öğrencisi Serhat AKÇA'ya ait "Siroz Hastalarında Alkalen Fosfataz İzoenzimlerinin İki Farklı Yöntemle Belirlenmesi" konulu Yüksek Lisans Tezinin Yerel Etik Kurul Kararında uygun olduğuna;

**Karar Verilmiştir.**

Ünvanı/Adı Soyadı	Etik Kurul Üyeliği	Uzmanlık Dalı	İmzası
Prof.Dr.Suat TOPAKTAŞ	Başkan	Nöroloji	Katılmadı
Doç.Dr.Şahin YILDIRIM	Başkan Yrd.	Klinik Farmakoloji	
Yrd.Doç.Dr.Özen KARADAĞ	Raportör	Beyin ve Sinir Cerrahisi	
Prof.Dr.İlyas DÖKMETAŞ	Üye	Klinik Bak.ve İnfeksiyon Hastalıkları	
Prof.Dr.Dilara İÇAĞASIOĞLU	Üye	Çocuk Sağ. ve Hastalıkları Pediatrik Nörolojisi	Katılmadı
Prof.Dr.Tijen KAYA	Üye	Farmakolog	
Doç.Dr.Esin YILDIZ	Üye	Tıbbi Patoloji	
Doç.Dr.Hatice PINARBAŞI	Üye	Tıbbi Biyokimya	Katılmadı

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Serhat Akça
Doğum Yeri ve Tarihi	Ankara, 09/09/1973
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Numune Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı 58100-Sivas
E-posta Adresi	<a href="mailto:serhatakca19@hotmail.com.tr">serhatakca19@hotmail.com.tr</a>

### Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Mecitözü Lisesi, 1990
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edb. Fak. Biyoloji Bölümü, 1998
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı, 2008

### İş Tecrübesi

Numune Hastanesi	Laboratuvar Teknisyeni, 1994-
------------------	-------------------------------