Thesis Title Patterns and Identities of Serum Alkaline Phosphatase Isoenzymes in Diseases of the Liver

Author Miss Nutchanat Nonsee

M.S. Medical Technology

Examining Committee :

Associate Professor Rujapa Nimsung	Chairman
Assistant Professor Dr. Audomsark Haesungcharern	Member
Associate Professor Dr. Maitree Suttajit	Member
Assistant Professor Dr. Prachya Kongtawelert	Member

ABSTRACT

Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1; ALP) is a glycoprotein encoded for by at least four different gene loci, tissue non-specific, intestinal, placental and germ cell ALP. Significant increase in amounts of ALP are found in serum under both normal and pathological conditions. Liver disease such as hepatitis, hepatoma, cirrhosis, and cholestasis (e.g. bile duct obstruction) are associated with an increase of liver ALP activity. Serum ALP isoenzymes have been used as markers for altered conditions of this organ.

To investigate the effects of liver disease on the nature of ALP molecules as compared with the normal control, The ALP isoenzymes were partially purified from sera of normal and liver disease patients using DEAE Sepharose column chromatography. Three separated protein eluates obtained were identified for the ALP isoenzymes by an agarose gel electrophoresis. Liver and bone isoenzyme fractions were discriminated further by heat inactivation technique. Fast liver isoenzyme fraction eluted in high salt fraction was found in trace amounts in normal and significant amounts in patient sera. Fractionation of ALP isoenzyme from serum by DEAE Sepharose column chromatography were sufficiently purified and gave enough yield to allow extensive structural analyses. By means of

lectin precipitation, it was possible to investigate sugar moieties on the carbohydrate chains of these purified ALP isoenzyme fractions.Wheat germ agglutinin (WGA) precipitated varying amounts of 50-80% of ALP activity in liver and bone isoenzyme fractions by binding to both N-acetylglucosamine (GlcNAc) and sialic acid residues on carbohydrate chains of isoenzyme molecules. Fast liver ALP fractions showed less WGA precipitation variation. Concanavalin A (Con A) precipitated approximately 80-85% and 70-80% of ALP activity from liver and fast liver fractions respectively, of which significantly higher than normal person ($P < 0.05$). The liver ALP from patients with hepatoma and fast liver ALP from patients with cirrhosis were shown to be sensitive to *Pisum sativum* (PSA) precipitation.

Treatment of all liver isoenzyme and some of the fast liver isoenzyme fractions with neuraminidase resulted in the loss of negative charges on the glycosylated ALP fractions. Neuraminidase from different sources, *Clostridium perfringens* (C-Neu) and *Vibrio cholerae* (V-Neu), were used to removing sialic acid from the ALP isoenzyme fractions. Differences of C-Neu and V-Neu digested ALPs used for preparing the asialo-form were found in the liver ALP fraction of hepatoma, hepatitis and cholestasis (bile duct obstruction) patients. These findings suggested that either the amount of sialic acid or nature of sialic acid linkages to ALP isoenzymes might be altered in those of liver diseases. Treatment of asialo-form ALPs (C-Neu digested) with α 2,6 - sialyltransferase (α 2,6- ST) demonstrated the similar manner of sialic acid linkages at the terminal of liver and some of the fast liver ALP fractions separated from both normal and patient sera. Sialylation could not occur, when the asialo-form ALPs of hepatitis and bile duct obstruction patients were treated with α 2,6- ST. This result indicated some heterogeneity of sialic acid linkages at the carbohydrate chains of those liver ALP isoenzymes.

In conclusion, serum ALP isoenzyme patterns in liver disease varied with respect to the pathological causes. Liver ALP isoenzyme activity is increased in all forms of liver disease whereas fast liver isoenzyme is increased in occasionally seen in some cases of liver disease. On molecular basis, liver ALP isoenzyme in sera of liver disease patients were not identical. The heterogeneity of the carbohydrate chain with respect to the amounts and sequences of sugar moieties or sialic acid linkage could affect the pattern of separation of ALP isoenzymes and could be identified by lectin precipitation and cellulose acetate electrophoretic methods.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ รูปแบบและเอกลักษณ์ของ อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทสไอโซเอนไซม์ในซีรัมผู้ป่วยโรคตับ

ชื่อผู้เขียน นางสาวนุชนาถ นนทรีย์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. รุจาภา นิ่มสังข์	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. อุดมศักดิ์ เห่วซึ่งเจริญ	กรรมการ
รศ. ดร. ไมตรี สุทธจิตต์	กรรมการ
ผศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	กรรมการ

บทคัดย่อ

เอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส (Alkaline phosphatase) (EC 3.1.3.1; ALP) เป็นไกลโคโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่ถ่ายทอดมาจากยีนอย่างน้อย 4 แหล่งต่างๆกันก่อให้เกิด tissue - non specific, intestinal, placental และ germ cell ALP การเพิ่มสูงขึ้นของ ALP พบได้ทั้งในทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยา ในผู้ป่วยโรคตับ เช่น ตับอักเสบ มะเร็งตับ ตับแข็งและการหยุดไหลของน้ำดีในโรคท่อน้ำดีอุดตัน จะเกิดร่วมไปกับการพบว่ามีระดับของ ALP activity จากตับสูงขึ้น การตรวจ ALP isoenzyme ในซีรัม ได้นำมาใช้แสดงถึงความผิดปกติของอวัยวะเหล่านี้ เพื่อตรวจหาผลกระทบของโรคตับที่มีต่อลักษณะของโมเลกุลของ ALP ในซีรัมผู้ป่วยโรคตับเทียบกับคนปกติ ได้นำตัวอย่างซีรัมของคนปกติและผู้ป่วยโรคตับมาทำให้บริสุทธิ์แต่เพียงบางส่วน โดยใช้ DEAE Sepharose column chromatography โปรตีนที่ถูกชะ (protein eluate) แยกออกเป็น 3 ส่วน นำมาตรวจพิสูจน์ลักษณะของ ALP isoenzyme โดยใช้เทคนิค Agarose gel electrophoresis โดยที่ส่วนของ isoenzyme จากตับและกระดูก ได้นำมาตรวจแยกลักษณะต่อด้วยวิธีใช้ความร้อน ส่วนของ

fast liver isoenzyme ซึ่งแยกได้จากโปรตีนที่ถูกชะส่วนสุดท้าย โดยใช้ความเข้มข้นของเกลือสูง พบว่ามีปริมาณน้อยมากในคนปกติ แต่มีปริมาณที่สูงอย่างมีนัยสำคัญในซีรัมผู้ป่วย การแยก ALP isoenzyme จากซีรัมโดยเทคนิค DEAE Sepharose column chromatography นี้ ให้ความบริสุทธิ์และความเพียงพอที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะของโครงสร้าง โดยอาศัยเทคนิคการตกตะกอนด้วยเลคติน ทำให้สามารถหาลักษณะหรือองค์ประกอบของน้ำตาลบนสายคาร์โบไฮเดรตของ ALP isoenzyme ที่ถูกแยกส่วนให้บริสุทธิ์ออกได้ Wheat germ agglutinin (WGA) สามารถตกตะกอน ALP isoenzyme จากตับและกระดูกในปริมาณตั้งแต่ 50 ถึง 80 % โดยการจับกับ N-acetylglucosamine (GlcNAc) และกรดไซอะลิก บนสายคาร์โบไฮเดรตของโมเลกุลของ ALP isoenzyme สำหรับ fast liver isoenzyme นั้นพบว่ามีความแปรปรวนในการตกตะกอนกับ WGA น้อยมากในซีรัมผู้ป่วย การตกตะกอนของ ALP isoenzyme จากตับและ fast liver isoenzyme กับ Concanavalin A (ConA) มีค่าประมาณ 80 ถึง 85 % และ 70 ถึง 80 % ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ALP isoenzyme จากตับในผู้ป่วยมะเร็งตับและ fast liver isoenzyme จากผู้ป่วยโรคตับแข็งพบว่ามีความไวในการตกตะกอนกับ *Pisum sativum* agglutinin (PSA)

จากการให้ ALP isoenzyme จากตับ และ fast liver isoenzyme ทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์ neuraminidase จะเป็นผลให้เสียประจุลบไปจากสายน้ำตาลที่ต่อกับโมเลกุลของ ALP การนำเอนไซม์ neuraminidase จากแหล่งผลิตต่างกันได้แก่จากเชื้อ *Clostridium perfringens* (C-Neu) และ *Vibrio cholerae* (V-Neu) ที่มี activity เท่ากัน มาตัดกรดไซอะลิคออกจากโมเลกุลของ ALP isoenzyme ผลการทดลองพบความแตกต่างจากการย่อยด้วย C-Neu และ V-Neu ในโมเลกุลของ ALP isoenzyme ที่ใช้ในการเตรียม asialo-form ALP ในผู้ป่วยโรคตับแข็ง ตับอักเสบและท่อน้ำดีอุดตัน จากการตรวจพบเช่นนี้ชี้ให้เห็นว่า ปริมาณของกรดไซอะลิคหรือลักษณะการติดกรดไซอะลิคเข้าไปกับโมเลกุลของ ALP isoenzyme ได้เปลี่ยนไปในภาวะโรคตับเหล่านั้น การติดกรดไซอะลิค โดยอาศัยเอนไซม์ α 2,6- sialyltransferase (α 2,6-ST) เข้าไปยัง asialo-form ALP ซึ่งเตรียมจากการย่อยด้วย C-Neu แสดงให้เห็นถึงลักษณะที่เหมือนกันของการเชื่อมต่อของกรดไซอะลิคที่ปลายสายโมเลกุลของ ALP isoenzyme ซึ่งแยกได้จากคนปกติและผู้ป่วย การติดกรดไซอะลิคเข้าไปกับ asialo-form ALP ของผู้ป่วยโรคตับอักเสบและท่อน้ำดีอุดตันนั้น ทำไม่สำเร็จ

แสดงให้เห็นว่ามี heterogeneity ของกรดไซอะลิคที่สายน้ำตาลของ ALP isoenzyme ในผู้ป่วยทั้งสองแบบนี้

สรุปได้ว่ารูปแบบของ ALP isoenzyme ในผู้ป่วยโรคตับ แปรเปลี่ยนไปตามสาเหตุของพยาธิสภาพ ALP isoenzyme จากตับมีปริมาณเพิ่มขึ้นในโรคตับทุกชนิด ในส่วนของ fast liver enzyme พบได้ในโรคท่อน้ำดีอุดตัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพิ่มสูงขึ้นในภาวะการอุดตันภายนอกตับ ALP isoenzyme จากลำไส้ พบได้ในผู้ป่วยโรคตับบางราย จากการศึกษาในระดับโมเลกุลของ ALP พบว่า ALP isoenzyme จากตับนั้นมีโครงสร้างของน้ำตาล (คาร์โบไฮเดรต) ไม่เหมือนกัน ความแตกต่างบนสายน้ำตาลเกิดขึ้นได้ทั้งองค์ประกอบ ปริมาณของน้ำตาลและการเชื่อมต่อกับกรดไซอะลิค ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลกระทบต่อวิธีการตรวจแยก ALP isoenzyme สามารถพิสูจน์ได้โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเลคติน และ การแยกโดยวิธี cellulose acetate electrophoresis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University