

# Izoenzymy alkalické fosfatázy u dítěte po transplantaci kostní dřeně s izolovanou jaterní reakcí štěpu proti hostiteli

Zikmundová K.<sup>1</sup>, Průša R.<sup>1</sup>, Kukačka J.<sup>1</sup>, Zdráhalová K.<sup>2</sup>, Sedláček P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav klinické biochemie a patobiochemie, 2. LF UK a FN Motol

<sup>2</sup> Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN Motol

## SOUHRN

Popisujeme případ třináctiměsíčního chlapce po transplantaci kostní dřeně s následnou jaterní reakcí štěpu proti hostiteli, u kterého bylo z důvodu izolovaného vzestupu ALP (S-ALP 24,7  $\mu$ kat/l) provedeno elektroforetické vyšetření izoenzymů ALP. V oblasti bodu aplikace jsme prokázali atypickou frakci, která se fyziologicky na elektroforeogramu nevyskytuje. Jedná se pravděpodobně o komplex některého z izoenzymů ALP s lipoproteinem X.

*Klíčová slova:* alkalická fosfatáza, izoenzymy ALP, lipoprotein X.

## SUMMARY

**Zikmundová K., Průša R., Kukačka J., Zdráhalová K., Sedláček P.: Isoenzymes of alkaline phosphatase in a child after bone marrow transplantation with detached liver graft versus host disease**

We describe the case of a 13-month-old child with highly increased ALP in serum (S-ALP 24.7  $\mu$ kat/l) after bone marrow transplantation and subsequent liver graft versus host disease. We performed laboratory investigation of isoenzymes of alkaline phosphatase and we detected unusual fraction. We suggest that it corresponds of a complex of ALP with lipoprotein X.

*Key words:* alkaline phosphatase, isoenzymes of ALP, lipoprotein X.

## Úvod

Alkalická fosfatáza (EC 3.1.3.1., ALP) je metaloglykoprotein, o molekulové hmotnosti 130–220 kDa, s monofosfoesterázovou aktivitou, katalyzující hydrolyzu řady monofosforečných esterů v alkalickém prostředí [1, 2, 3]. ALP je ukotvena pomocí glykosyl-fosfatidylinositolu na vnější straně buněčné membrány [4]. Rozlišujeme tři izoenzymy ALP, které se liší primární strukturou, a tedy i kódované odlišnými geny. Placentární izoenzym ALP se vyskytuje v séru těhotných žen. Historicky se jedná o první popsany případ polymorfního placentárního proteinu [5]. Je kódován genem umístěným na dlouhém raménku chromosomu 2 (2q37). Mezi tímto a genem, který kóduje střevní izoenzym, je vysoký stupeň homologie [6]. Třetí izoenzym ALP je exprimován v kostech, v játrech a v ledvinách. Tento typ izoenzymu se ve jmenovaných orgánech liší nestejným obsahem sacharidů včetně kyseliny sialové. Tak lze dále odlišit kostní, jaterní a renální izoformu ALP, která se však v krvi nevyskytuje. Izoformy jsou produkty stejného genu, které byly posttranslačně modifikovány. Gen pro tento nespecifický izoenzym je umístěn na chromosomu 1 (1p36.1–p34) [7]. Jaterní a kostní izoformy (nespecifické), které je třeba od sebe odlišit nejčastěji k rozpoznání orgánového původu zvýšené ALP v séru, si jsou strukturálně nejpodobnější [8]. K jejich stanovení se obvykle užívá vazba kostní ALP na speciální lektin [9]. Ve vzácných případech se vyskytují při elektroforetickém stanovení izoenzymů ALP frakce, které se obtížně interpretují a mohou vést k diagnostickým omylům.

## Kazuistika

Tato kazuistika pojednává o třináctiměsíčním chlapci zdravých nepřibuzných rodičů, bez sourozence, který je léčen ve Fakultní nemocnici v Motole s diagnózou Di Georgův syndrom od 2 měsíců věku. Ve 20. týdnu gravidity byl zjištěn polyhydramnion, a proto byla provedena amniocentéza (zjištěn normální karyotyp 46, XY). Porod proběhl ve 38. týdnu sekci (pro známky hypoxie plodu), porodní hmotnost byla 2750 g, Apgar v 1. minutě 1. Chlapec byl intubován a byla zahájena umělá plicní ventilace. V prvních dnech života byla postupně zjištěna atérie jícnu, oboustranná choanální atérie a hemodynamicky významná dužej nereagující na léčbu indometacinem. Všechny tyto vady byly chirurgicky řešeny v průběhu prvních 2 týdnů života. Další zjištěné vady: pravostranný oblouk aorty, *foramen ovale apertum* s levoppravým zkratem, cévní anomálie, faciální stigmatizace, malformace uší, hypogonadismus, mikropenis, colobom sítnice bilaterální, postupně progredující atrofie mozku. Imunologické vyšetření prokázalo ve dvou měsících věku dítěte kompletní DiGeorgeův syndrom (nepřítomnost T lymfocytů i thymu, absence odpovědi na mitogeny), i když typická mikrolece 22q11 nebyla zjištěna. Hodnoty koncentrací imunoglobulinů: IgA < 0,3 g/l; IgG 3,5 g/l; IgM < 0,1 g/l; IgE < 1,5 kIU/l. Byla zahájena preventivní antibiotická a antimykotická léčba a byl podán intravenózně imunoglobulin. Opakované infekce a sepse až septické šoky s multiorgánovým selháním a opakované respirační insuficience vedly k téměř trvalé ventilační podpoře do 7 měsíců věku dítěte. Z důvodu imunodeficitu byl pacient indikován k nepřibuzenské

transplantaci kostní dřeně. Ve věku 6 měsíců dítěte byla provedena 1. transplantace, infuze dárcovských lymfocytů (1. DLI  $1 \times 10^6/\text{kg}$  CD3+;  $0.2 \times 10^6/\text{kg}$  CD34+) bez conditioningu, nepřibuzný dárce z registru, shoda 8/10 (B, Cw), bez prevence GVHD (graft-versus-host-disease). Deset dnů po transplantaci (D+10) se rozvíjí akutní GVHD – izolovaná kožní (stage 3, grade II), dochází k sepsi, oběhové nestabilitě, capillary leak syndromu. Po zahájení imunosupresivní léčby (D+10) cyklosporinem A, rATG Fresenius (25mg/kg 3x D+10, D+12, D+14) a kortikoidy (metylprednisolon 2 mg/kg od D+10) GVHD ustoupila. Dávky kortikoidů byly po postupném snižování (2 týdny 2 mg/kg, 1 týden 1 mg/kg, 1 týden 0,5 mg/kg) vysazeny úplně (D+35), cyklosporin A byl ponechán. Vzhledem k nedostatečné korekci imunodeficitu (stále nízké hodnotě T lymfocytů) byla ve věku 7 měsíců dítěte provedena 2. transplantace kostní dřeně (2. DLI,  $0.89 \times 10^6/\text{kg}$  CD3+), opět bez conditioningu, na pokračující léčbě cyklosporinem A jako prevenci GVHD. 27 dnů po 2. transplantaci (D+27) byl zjištěn významný nárůst EBV kopií – EBV infekce (proliferace B lymfocytů, oligoklonalita, vysoká hladina IgM), bez klinické manifestace, přesto byl vysazen cyklosporin A a podán 1krát Rituximab ( $375 \text{ mg}/\text{m}^2$ ). V té době začíná významná proliferace CD8+ T lymfocytů. Zároveň se poprvé objevuje ikterus (D+34) s bilirubinem  $71 \mu\text{mol}/\text{l}$  s převahou přímého; transaminázy, které byly dosud kolem  $1\text{--}2 \mu\text{kat}/\text{l}$ , nyní stoupají: AST  $4,0 \mu\text{kat}/\text{l}$ , ALT  $7,2 \mu\text{kat}/\text{l}$ , ALP  $15,6 \mu\text{kat}/\text{l}$ , GMT  $23,2 \mu\text{kat}/\text{l}$ . Diferenciálně diagnosticky je zvažována:

1. jaterní GVHD,
2. EBV lymfoproliferace,
3. hepatální infekce (*Cryptosporidium*, atypická mycobacteria. Hepatitidy B, C, hepatolienální kandidóza – vše PCR negativní).

Je zvažována i možnost toxicity léků, a proto jsou přechodně vysazena antimykotika. Pacientovi je 35 dnů po druhé transplantaci podána 2. dávka Rituximabu ( $375 \text{ mg}/\text{m}^2$ ) – EBV lymfoproliferace, od D+41 opět nasazena imunosuprese (metylprednisolon 1 mg/kg), 45 dnů po transplantaci byl metylprednisolon zvýšen na 2 mg/kg a pro možnou GVHD přidán cyklosporin A. Od D+55 nasazena preventivně antibiotika a antimykotika. Progredující hepatopatie je uzavírána jako izolovaná jaterní GVHD (stage 3, grade III). Laboratorní vyšetření 55 dnů po druhé transplantaci: bilirubin celkový  $236 \mu\text{mol}/\text{l}$ , přímý  $163 \mu\text{mol}/\text{l}$ , AST  $2,2 \mu\text{kat}/\text{l}$ , ALT  $4,8 \mu\text{kat}/\text{l}$ , GMT  $51,8 \mu\text{kat}/\text{l}$ , ALP  $16,1 \mu\text{kat}/\text{l}$ . Při postupném zvyšování absolutního počtu T lymfocytů a procenta CD8+HLADR+ lymfocytů a při progresi hepatopatie pravděpodobně na podkladě GVHD, byla D+56 podána 1 dávka rATG Fresenius (25 mg/kg).

Následně došlo k vzestupu (D+57) celkového bilirubinu až na  $407 \mu\text{mol}/\text{l}$  (izolovaná jaterní GVHD stage 4, grade IV).

V dalším období dochází k postupnému snižování hodnot jaterních enzymů. D+67: bilirubin celkový  $236 \mu\text{mol}/\text{l}$ , přímý  $195 \mu\text{mol}/\text{l}$ , ALT  $5,8 \mu\text{kat}/\text{l}$ , AST  $2,7 \mu\text{kat}/\text{l}$ , GMT  $62,3 \mu\text{kat}/\text{l}$ , ALP  $11,7 \mu\text{kat}/\text{l}$ . V tomto rozmezí se pak jaterní testy pohybují s mírným kolísáním několik týdnů. D+108: bilirubin celkový  $91 \mu\text{mol}/\text{l}$ , přímý  $79 \mu\text{mol}/\text{l}$ ,

ALT  $6,5 \mu\text{kat}/\text{l}$ , AST  $4,1 \mu\text{kat}/\text{l}$ , GMT  $67,2 \mu\text{kat}/\text{l}$ , ALP  $14,6 \mu\text{kat}/\text{l}$ . Klesá i počet aktivovaných CD8+ T lymfocytů, což svědčí pro zklidnění GVHD reakce. D+159 byly vysazeny kortikoidy, v léčbě cyklosporinem A se pokračovalo. Dochází k dalšímu poklesu hodnot jaterních enzymů a bilirubinu (D+129: bilirubin celkový  $41 \mu\text{mol}/\text{l}$ , přímý  $36 \mu\text{mol}/\text{l}$ , AST  $2,3 \mu\text{kat}/\text{l}$ , ALT  $3,7 \mu\text{kat}/\text{l}$ , GMT  $54,2 \mu\text{kat}/\text{l}$ , ALP  $9,8 \mu\text{kat}/\text{l}$ ; D+171: bilirubin celkový  $20 \mu\text{mol}/\text{l}$ , AST  $2,3 \mu\text{kat}/\text{l}$ , ALT  $2,8 \mu\text{kat}/\text{l}$ , GMT  $40,6 \mu\text{kat}/\text{l}$ , ALP  $24,7 \mu\text{kat}/\text{l}$ . D+171 dochází k izolovanému vzestupu ALP na  $24,7 \mu\text{kat}/\text{l}$ , jsou znovu nasazeny kortikoidy v dávce 1 mg/kg a od D+177 se dávka zvýšila na 1,5 mg/kg. Přehled všech výše uvedených biochemických parametrů je uveden v tabulce 1.

**Table 1.** The summary of results of biochemical parameters in the patient after the second bone marrow transplantation

	ALP [ $\mu\text{kat}/\text{l}$ ]	ALT [ $\mu\text{kat}/\text{l}$ ]	AST [ $\mu\text{kat}/\text{l}$ ]	GMT [ $\mu\text{kat}/\text{l}$ ]	Bilirubin total [ $\mu\text{mol}/\text{l}$ ]	Bilirubin direct [ $\mu\text{mol}/\text{l}$ ]
D+34	15.6	7.2	4.0	23.2	71	
D+55	16.1	4.8	2.2	51.8	236	163
D+67	11.7	5.8	2.7	62.3	236	195
D+108	14.6	6.5	4.1	67.2	91	79
D+129	9.8	3.7	2.3	54.2	41	36
D+171	24.7	2.8	2.3	40.6	20	

Z důvodu dlouhodobého zvýšení jaterních enzymů a pozdějšího přetrvávajícího izolovaného vzestupu ALP bylo indikováno vyšetření izoenzymů ALP k vyloučení kostního původu. Isoenzymy ALP byly separovány podle rozdílnosti nábojů vznikajících glykosylací. Výsledkem elektroforetické migrace vzorků lidského séra na gelech Hydragel ISO-PAL (Sebia), provedené na analyzátoru Hydrasys, je rozlišení téměř všech izoenzymů ALP. Od anody ke katodě následují jednotlivé frakce v pořadí: jaterní frakce (L1) a kostní frakce (B), které jsou seskupeny v jednu společnou širokou frakci, dále druhá frakce jaterního izoenzymu (L2), též nazývaná rychlá, a střevní izoenzymy (I1, I2, I3). Placentární izoenzym, pokud je přítomen, je lokalizován mezi I1 a I2 [10]. Při vlastním provádění metody byly vzorky nanášeny v duplikátu. V průběhu elektroforetické migrace izoenzymy ALP v jednom z duplikátů procházejí zónou s aplikovaným lektinem, který vykazuje silnou afinitu pro část molekuly izoenzymů s navázanou kyselinou sialovou, a nastává tedy interakce mezi skupinami kyseliny sialové a lektinem. Kyselina sialová je nejvíce obsažena v kostním izoenzymu. Kostní frakce ve stopě s lektinem dostatečně precipituje a zůstává blíže aplikačnímu bodu [9]. Je tedy úplně oddělena od jaterní frakce L1 a obě mohou být kvantifikovány. Enzymatickou aktivitu každé frakce jsme vypočítali z procentuálních hodnot zjištěných denzitometricky a z celkové aktivity ALP.

Z proužku s lektinem jsme určili izoenzym L1, hodnotu kostní frakce jsme zjistili po odečtení L1 frakce z lektinového proužku od bloku L1-B skenovaného v proužku bez lektinu. Fyziologické hodnoty izoenzymů ALP závisí na věku, pohlaví, těhotenství, menopauze, pubertě a užívání léčiv. U dětí je celková

ALP vyšší, významný je kostní izoenzym. Zvýšená aktivita sérové ALP u dětí bývá nejčastěji spojena s poruchami primárně nebo sekundárně postihujícími kosti a s hepatobiliárními onemocněními [11]. Při interpretaci našich výsledků elektroforetického dělení izoenzymů ALP jsme vzali v úvahu celkovou aktivitu ALP, věk pacienta a skutečnost, že prodělal těžkou cholestatickou hepatotoxickou hepatitidu. Densitometrickým vyšetřením (obr. 1) jsme zjistili následující: Kostní frakce zaujímala 29,7 % a jaterní frakce 39,1 % z celkového množství ALP. Následovala jaterní frakce L2, tzv. rychlá, která činila 25,7 %. Střevní frakce nebyly téměř patrné (0,3 %). Podařilo se nám prokázat atypickou frakci v oblasti aplikačního bodu, těsně za startem (obr. 2). Taková frakce se fyziologicky na elektroforeogramu nevy-

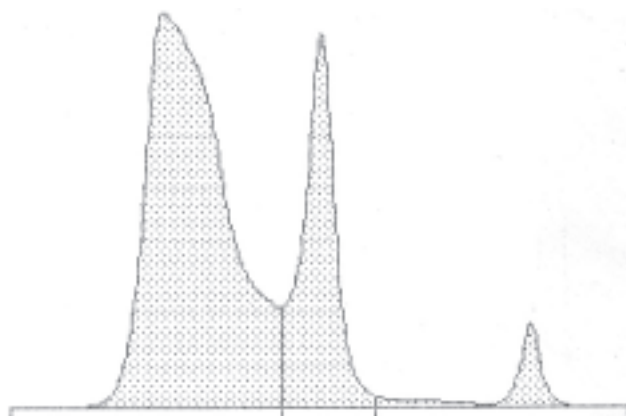


Fig. 1. Densitogram

The first peak represents a complex of liver (L1) and bone (B) isoforms, the next peak is a liver 2 fraction and the last one represents probably a complex of ALP with lipoprotein X.

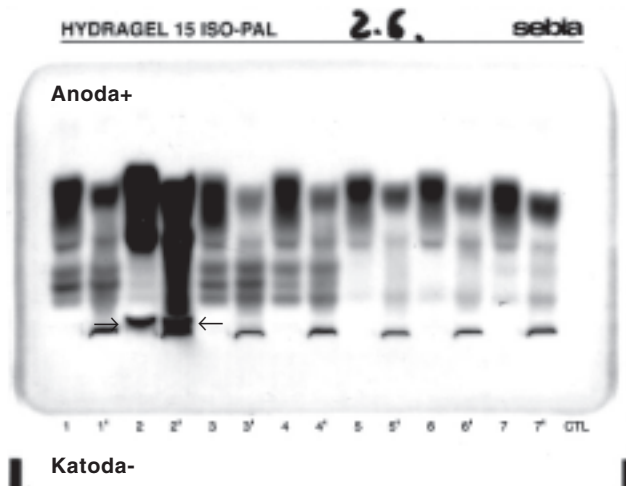


Fig. 2. The second sample (track 2 without lectin and track 2' with lectin)

On this sample we can observe a very strong activity corresponding to high liver 1 and liver 2 fractions, and the extra-fraction at the point of application on both tracks. This band corresponds to a complex of ALP with lipoprotein X.

skytuje. Frakce je přítomná v obou stopách, ve stopě s lektinem (2') i bez lektinu (2). Domníváme se, že by se mohlo jednat o relativně pevný komplex jaterního izoenzymu L1 s lipoproteinem X, který je typický pro biliární onemocnění s obstrukcí.

## Literatura

1. Meyer-Sabellek, W. Alkaline phosphatase. Laboratory and clinical implications. *J. Chromatogr.*, 1988, 429, p. 419–444.
2. Crofton, P. M. Biochemistry of alkaline phosphatase isoenzymes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 1982, 16, p. 161–194.
3. Dziedziejko, V., Safranov, K., Slowik-Zylka, D., Machoy-Mokrzynska, A., Millo, B., Machoy, Z., Chlubek, D. Comparison of rat and human alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms using HPLC and electroforesis. *Biochimica and Biophysica Acta*, 2005, 1752, p. 26–33.
4. Calvo, M. S., Eyre, D. R., Gundberd, C. M. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr. Rev.*, 1996, 17, p. 333–368.
5. Rondon, E. B., Hartus, H. Genetics of the alkaline phosphatase polymorphism of the human placenta, *Nature*, 1965, 207, p. 1257–1259.
6. Knoll, B. J., Rothblum, K. N., Longley, M. Nucleotide sequence of the human placental alkaline phosphatase gene: evolution of the 5-prime flanking region by deletion/substitution. *J. Biol. Chem.* 1988, 263, p. 12020–12027.
7. Smith, M., Weiss, M. J., Griffin, C. A., Murray, J. C., Buetow, K. H., Emanuel, B. S., Henthorn, P. S., Hartus, H. Regional assignment of the gene for human liver/bone/kidney alkaline phosphatase to chromosome 1p36.1–p34. *Genomics*, 1988, 2, p. 139–143.
8. Magnusson, P., Lofman, O., Larsson, L. Determination of alkaline phosphatase isoenzymes in serum by high-performance liquid chromatography with post-column reaction detection. *J. Chromatogr.*, 1992, 576, p. 79–86.
9. Jackson B., Eastell, R., Russell, R. G., Lanyon, L. E., Price, J. C. Measurement of bone specific alkaline fosfatase in the horse; a comparison of two techniques. *Res. Vet. Sci.*, 1996, 61, p. 160–164.
10. Van Hoof, V. O., Van Mullem, M., De Broe, M. E., Lepoutre, L. G. Comparison of two commercially available systems for the electroforetic separation of alkaline phosphatase isoenzymes. *J. Chromatogr.*, 1993, 646, p. 235–243.
11. Behúlová, D., Bzdúch, V., Holešová, D., Vasilenková, A., Ponec, J. Tranzitórna hyperfosfatázémia detského veku – záhadný, nie však zriedkavý syndrom. *Klin. Biochem. Metab.*, 2000, 8 (29), No. 3, s. 183–186.

Do redakce došlo 25. 11. 2005.

Adresa pro korespondenci:

Bc. Kateřina Zikmundová

Ústav klinické biochemie a patobiochemie 2. LF UK a FN Motol

V Úvalu 84

150 06 Praha 5

e-mail: katerina.zikmundova@fnmotol.cz