

مقایسه روش‌های غیرفعال سازی حرارتی و مهار با اوره در اندازه گیری ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی آلکالین فسفاتاز

سلیمان محجوب^{۱*}، ژیلا مسروورودسری^۲

۱- استادیار گروه بیوشیمی - بیوفیزیک دانشگاه علوم پزشکی بابل-۲- پزشک عمومی

سابقه و هدف: آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) دارای ایزوآنزیمهای متعددی در بافت‌های مختلف است که عمده‌ترین و مهمترین آنها ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی هستند. هدف از این مطالعه راهاندازی و مقایسه دو روش مهار با اوره و غیرفعال‌سازی حرارتی در اندازه‌گیری فعالیت ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی ALP بوده است.

مواد و روشها: ابتدا بر روی نمونه‌های سرم به دفعات مکرر و طی روزهای متوالی آزمایش‌های اندازه گیری فعالیت ALP تام و ایزوآنزیمهای کبدی و استخوانی انجام شد و سپس دقت و تکرارپذیری روش‌های غیرفعال‌سازی حرارتی و مهار با اوره طی ۱۰ بار تکرار کلیه آزمایشها روی دو نمونه نرمال و یک نمونه کلستازکبدی و یک نمونه پاژه استخوانی تأیید گردید و روش‌های غیرفعال‌سازی حرارتی و مهار با اوره در آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی بابل راه اندازی شد. همچنین روی ۵۰ نمونه سرم افراد بالغ و نرمال نیز اندازه‌گیری فعالیت ALP تام به روش استاندارد فدراسیون بین‌المللی بیوشیمی بالینی (IFCC) و ایزوآنزیمهای کبدی و استخوانی با روش‌های راهاندازی شده انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از روش‌های غیرفعال سازی حرارتی و مهار بوسیله اوره بطور عمده در محدوده یک انحراف معیار از مقدار میانگین قرار داشتند. (ضریب تغییرات) CV روش غیرفعال سازی حرارتی برای ایزوآنزیم کبدی و استخوانی بترتیب ۰/۱۷ و ۰/۲۷ و CV روش مهار با اوره برای ایزوآنزیم کبدی و استخوانی بترتیب ۰/۲۳ و ۰/۴۶ بدست آمد. همبستگی روش غیرفعال‌سازی حرارتی و روش مهار با اوره برای ایزوآنزیم کبدی ۰/۹۶۱ و ایزوآنزیم استخوانی ۰/۹۶۴ بدست آمد.

نتیجه گیری: با توجه به دقت و تکرارپذیری مناسب و همبستگی بالای روش‌های غیرفعال‌سازی حرارتی و مهار با اوره و همچنین ارزان و ساده بودن، می‌توان از این روشها در تعیین فعالیت ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی آلکالین فسفاتاز بویژه در شرایطی که استخوان و کبد هر دو درگیر هستند، استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آلکالین فسفاتاز، ایزوآنزیم استخوانی، ایزوآنزیم کبدی، مهار با اوره، غیرفعال‌سازی حرارتی.

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره هشتم، شماره ۱، زمستان ۱۳۸۴، صفحه ۳۹-۴۳

مقدمه

مربوط به ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی می‌باشد(۱،۲). مقادیر

کمی نیز مربوط به فعالیت ایزوآنزیم روده‌ای است که بویژه در سرم افراد دارای گروه خونی O و B بعد از صرف غذا وجود دارد اگرچه در حالت ناشایی مقدار آن در سرم ناچیز می‌باشد. در طی سه‌ماهه

■ هزینه انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۱۳۸۰۳۷ از

اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل تأمین شده است.

آنژیم آلکالین فسفاتاز (ALP) با کد آنزیمی (EC3-1-3-1) واکنش هیدرولیز فسفاتهای آلی را در pH قلیایی انجام می‌دهد و دارای ایزوآنزیمهای مختلف در بافت‌هایی از قبیل استخوان، کبد، روده، جفت، غدد پستان و کلیه‌ها می‌باشد. ایزوآنزیمهای آلکالین فسفاتاز دارای فعالیت بهینه در pH قلیایی حدود ۱۰ می‌باشند. در سرم نرمال بیش از ۹۰٪ فعالیت آلکالین فسفاتاز تام (Total ALP)

مقدار ۵ میلی لیتر در حالت ناشتاپی بعمل آمد. سپس بر روی نمونه‌های سرم به دفعات مکرر و طی روزهای مختلف، آزمایش‌های اندازه‌گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز تام و ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی بعمل آمد و شرایط مؤثر در نتایج آزمایش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بعد از راهاندازی روش‌های غیرفعالسازی حرارتی و مهار بوسیله اوره به منظور بررسی دقت و تکرارپذیری نتایج حاصل، دو نمونه سرم نرمال، یک نمونه سرم بیمار مبتلا به کلستاز و یک نمونه سرم بیمار مبتلا به پاژه استخوانی انتخاب گردید و بر روی هر کدام از نمونه‌ها ۱۰ بار کلیه آزمایشها تکرار گردید و نتایج حاصل از طریق نرمافزار SPSS و تست تکرارپذیری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و دقت بالا و تکرارپذیری مناسب روش‌های مذکور از لحاظ آماری تأیید گردید. بعد از این مرحله بر روی ۵۰ نمونه سرم افراد بالغ و نرمال آزمایش‌های اندازه‌گیری فعالیت ALP تام به روش استاندارد فدراسیون بین المللی بیوشیمی بالینی و انجمن آمریکایی بیوشیمی بالینی (IFCC & AACC) و همچنین تعیین فعالیت ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی با دو روش غیرفعالسازی حرارتی و مهار بوسیله اوره به اجرا درآمد و نتایج حاصل از دو روش راهاندازی شده با استفاده از آزمون t (paired sample test) و تست همبستگی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز تام: فعالیت آنزیم ALP تام به روش استاندارد IFCC و AACC اندازه‌گیری شد^(۳). در این روش، آنزیم ALP موجود در نمونه سرم، سوبستراتی ۴-نیتروفنیل فسفات (4-NPP) را که بی‌رنگ می‌باشد در pH = ۱۰/۳ در دمای ۳۷°C هیدرولیز می‌کند و گروه فسفات آزاد شده توسط بافر ۲-آمینو-۲-متیل-۱-پروپانول (AMP) گرفته می‌شود. محصول ۴-نیتروفنیل در pH واکنش به ۴-نیتروفنوکسید تبدیل می‌شود که با فرم کیلونی خودکه زرد رنگ است در حالت تعادل می‌باشد. دقیقاً بعد از گذشت ۱۵ دقیقه از مرحله افزودن سوبسترا، با اضافه کردن محلول قلیایی هیدروفکسید سدیم pH محیط واکنش به حدود ۱۲ رسانده شد و فعالیت آنزیم از بین رفته و واکنش آنزیمی متوقف گردید. شدت رنگ محصول بوسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد و با استفاده از فرمول زیر فعالیت آلکالین فسفاتاز تام نمونه محاسبه گردید.

سوم بارداری ایزوآنزیم جفتی که در مقایسه با سایر ایزوآنزیمهای مقاومت بیشتری در مقابل حرارت نشان می‌دهد در خون مادر وجود دارد^(۴). اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز سرم در بررسی دو دسته از بیماریها اهمیت زیادی دارد که شامل بیماری‌های کبدی - صفوای و بیماری‌های استخوانی همراه با افزایش فعالیت استخوان‌سازی می‌باشد. در صورت وجود هم‌مان بیماری‌های کبدی و استخوانی، اندازه‌گیری فعالیت ایزوآنزیمهای مختلف ارزش بالینی زیادی دارد و نشان دهنده میزان و وسعت آسیب بافت مورد نظر می‌باشد. بر اساس مطالعات انجام شده تعیین فعالیت ایزوآنزیمهای ALP در اختلالات مختلف از ارزش تشخیصی زیادی برخوردار است^(۵-۹). علیرغم اهمیت زیاد اندازه‌گیری فعالیت ایزوآنزیمهای مختلف در بیماریها غالباً آزمایش آلکالین فسفاتاز تام درخواست می‌شود که برای تشخیص نوع و میزان وسعت آسیب بافتی اختصاصی نیست.

روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری ایزوآنزیمهای ALP گزارش شده است که از جمله آنها می‌توان به تکنیکهای الکتروفورز^(۱۰)، ایزووالکتریک فوکوسینگ^(۱۲)، غیرفعالسازی حرارتی^(۱۳)، ایمونوادیومتریک اسی (IRMA)^(۱۴)، آنتی بادی منوکنل^(۱۵)، مهار با ترکیبات شیمیایی از قبیل اوره و L-فنیل آلانین^(۱۶) و همچنین روش‌های رسویده با لکتین و آگلوتین دانه گندم و کانکاوالین A اشاره نمود^(۱۷).

هدف از این تحقیق راهاندازی دو روش اختصاصی و در عین حال کم هزینه برای اندازه‌گیری فعالیت ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی آلکالین فسفاتاز بوده است بنحوی که در همه آزمایشگاههای تشخیص طبی و بیمارستانها قابل اجرا باشد. همچنین با بررسی و مقایسه نتایج بدست آمده از دو روش غیرفعالسازی حرارتی و مهار با اوره و اندازه‌گیری فعالیت ایزوآنزیمهای مذکور نسبت به فعالیت ALP تام که به روش استاندارد انجام شد میزان دقت، تکرارپذیری، صحت و همبستگی نتایج حاصل از دو روش راهاندازی شده مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

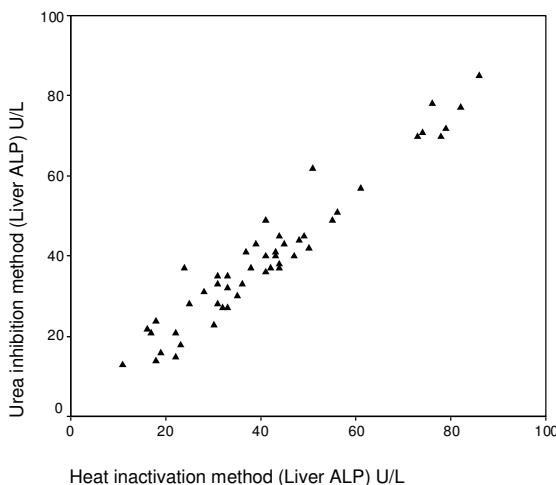
مواد و روشها

روش تحقیق: به منظور راهاندازی دو روش غیرفعالسازی حرارتی و مهار بوسیله اوره از ۵۰ فرد بالغ و نرمال نمونه‌گیری خون وریدی به

به ترتیب به میزان ۸۴٪ و ۵۶٪ مهار می‌گردد(۲و۳). با در نظر گرفتن این اطلاعات میزان فعالیت ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی نسبت به فعالیت ALP تام در نمونه محاسبه گردید.

یافته‌ها

از تعداد ۵۰ فرد بالغ و نرمال نمونه برداری شده تعداد ۳۱ نفر زن و ۱۹ نفر مرد بودند که بین سنین ۱۹ تا ۴۰ سال قرار داشتند. نتایج حاصل از ۱۰ بار تکرار آزمایش‌های اندازه‌گیری آلkalin فسفاتاز تام و ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی در دو نمونه سرم نرمال و یک نمونه کلستاز کبدی و یک نمونه پاژه استخوانی بطور عمده در محدوده $\text{Mean} \pm \text{SD}$ قرار داشتند. مقدار میانگین و انحراف معیار آلkalin فسفاتاز تام بر اساس استاندارد IFCC-AACC برابر $7 \pm 24/2 \pm 91$ می‌شود. مقادیر میانگین و انحراف معیار ایزوآنزیمهای کبدی با روش غیرفعالسازی حرارتی برابر $7/8 \pm 18/5$ و با روش مهار با اوره غیرفعالسازی حرارتی برابر $5/6 \pm 17/4$ و با روش مهار با اوره برابر $9/9 \pm 17/1$ بود. مقدار ضریب همبستگی بین نتایج حاصل از دو روش غیرفعالسازی حرارتی و مهار با اوره در ۵۰ نمونه مورد مطالعه برای ایزوآنزیم کبدی در نمودار ۱ و برای ایزوآنزیم استخوانی در نمودار ۲ مشخص شده است.



نمودار ۱. همبستگی بین نتایج روش‌های غیرفعال سازی حرارتی و مهار با اوره در اندازه‌گیری فعالیت ایزوآنزیم کبدی آلkalin فسفاتاز سرم ($r=0.964$)

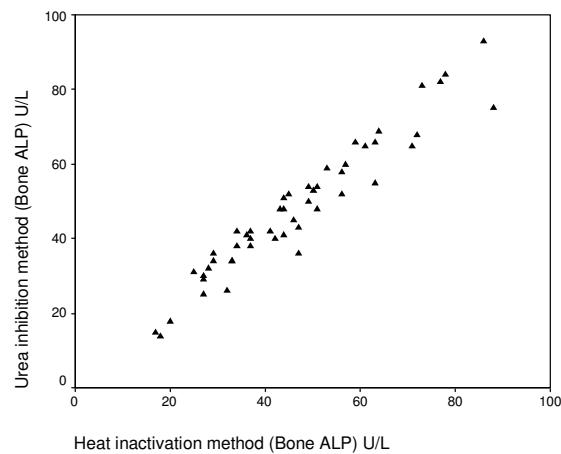
$1000 \times \text{جدب استاندارد}/\text{جدب بلانک سرم} - \text{جدب آزمایش} = \text{فعالیت آلkalin فسفاتاز (واحد بین‌المللی در لیتر)}$

اندازه‌گیری فعالیت ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی ALP به روش غیرفعالسازی حرارتی: این روش براساس یکی از مهمترین ویژگی‌های ایزوآنزیمهای ALP یعنی اختلاف در بخش قندی آنها و تفاوت در میزان غیرفعال شدن ایزوآنزیمهای در درجه حرارت‌های مختلف می‌باشد(۲و۳). اجرای روش غیرفعالسازی حرارتی نیاز به کنترل بسیار دقیق شرایط آزمایشگاهی از قبیل درجه حرارت و مدت زمان انکوباسیون دارد. بخشی از هر نمونه به مدت ۵ دقیقه در حمام آب 45°C قرار داده شد و بلافضله بعد از این مدت نمونه سریعاً سرد گردید. این مرحله انکوباسیون حرارتی باعث غیرفعال شدن ایزوآنزیمهای استخوانی، کبدی و روده‌ای به میزان ۱۰۰٪ می‌شود ولی ایزوآنزیمهای مقاومتر به حرارت مانند جفتی و نئوپلازی در صورتیکه در نمونه وجود داشته باشند در این شرایط فعال باقی مانند. بخش دیگر از هر نمونه به مدت ۱۶ دقیقه در حمام آب 55°C قرار داده شد و نمونه بعد از پایان این مدت سریعاً سرد گشت و میزان غیرفعال شدن ایزوآنزیمهای استخوانی، کبدی و روده‌ای بر طبق اطلاعات منابع مرجع در این شرایط انکوباسیون دمایی (۲و۳) بترتیب 60% ، 65% و 55% می‌باشد. بعد از این مرحله فعالیت آنزیم آلkalin فسفاتاز در نمونه‌های حرارت دیده همزمان همراه با بخشی دیگر از نمونه بدون انکوباسیون حرارتی با استفاده از روش استاندارد اندازه‌گیری شد و میزان نسبی فعالیت ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی در مقایسه با فعالیت ALP تام برای هر نمونه محاسبه گردید. اندازه‌گیری فعالیت ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی ALP به روش مهار با اوره: اساس این روش بر مبنای تفاوت در میزان غیرفعال شدن ایزوآنزیمهای مختلف آنزیم آلkalin فسفاتاز در مجاورت غلظت معینی از محلول اوره می‌باشد(۲). در این روش بخشی از نمونه سرم با محلول اوره 3 مولار به مدت 18 دقیقه در 37°C انکوبه گردید. بعد از مرحله انکوباسیون، با قیمانده فعالیت آنزیم ALP موجود در نمونه موردنظر همراه با بخش‌های دیگر نمونه شامل مرحله حرارتی و بدون مرحله حرارتی در شرایط آزمایشگاهی مشابه به روش استاندارد اندازه‌گیری گردید. ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی ALP در طی انکوباسیون با اوره 3 مولار به مدت 18 دقیقه

نوع گروه خونی نیزبستگی دارد و در افراد دارای گروههای خونی O یا B بعد از صرف غذا مقداری از فعالیت ALP تام مربوط به ایزوآنزیم روده‌ای است(۵و۱). در مطالعه حاضر بدلیل اینکه پارامترهای آماری از قبیل سن، جنس و گروههای خونی و همچنین شرایط آزمایشگاهی برای دو روش راهاندازی شده یکسان بوده است، بنابراین پارامترهای مذکور در این مطالعه مداخله‌ای نداشتند. بعلاوه بدلیل اینکه نمونه‌برداریها در حالت ناشتاپی بعمل آمد بنابراین میزان فعالیت ایزوآنزیم روده‌ای در این شرایط بسیار ناچیز است و بیش از ۹۰٪ فعالیت ALP تام مربوط به ایزوآنزیمهای کبدی و استخوانی می‌باشد(۲و۳).

در روش غیرفعالسازی حرارتی، تنظیم دقیق دمای محیط واکنش و همچنین مدت زمان انکوباسیون بسیار مهم می‌باشد به نحویکه نوسانات دمایی و تغییرات کم زمان انکوباسیون می‌تواند باعث بروز خطای قابل ملاحظه‌ای در نتایج حاصل از این روش گردد. توافق عمومی بین محققین در انتخاب یک درجه حرارت مشخص و زمان معین در روش غیرفعالسازی حرارتی وجود ندارد، اگرچه برای هر کدام از شرایط دمایی و زمانی در روش مذکور میزان نسبی غیرفعال شدن ایزوآنزیمهای ALP مشخص شده است. یکی از شرایط گزارش شده دمای $C^{\circ} ۵۶$ به مدت ۱۰ دقیقه می‌باشد که طی آن باقیمانده فعالیت ایزوآنزیمهای مقاومتر یعنی جفتی و نتوپلازی هر کدام از ۹۰٪ فعالیت خود را در این شرایط حفظ می‌نمایند(۴و۳).

در مطالعه حاضر دو مرحله حرارتی با مدت زمان انکوباسیون مشخص بکار گرفته شد. بخشی از هر نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای $C^{\circ} ۶۵$ قرار گرفت که طی این شرایط ایزوآنزیمهای استخوانی، کبدی و روده‌ای ۱۰۰٪ فعالیت خود را از دست می‌دهند و در صورتیکه در نمونه سرم هنوز فعالیت آنزیم ALP وجود داشته باشد، می‌توان به حضور ایزوآنزیم جفتی یا نتوپلازی مشکوک شد. اگرچه برای اطمینان از وجود این ایزوآنزیمهای می‌باشد نمونه سرم را در درجه حرارت $C^{\circ} ۶۵$ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه نمود. بخشی دیگر از هر نمونه در شرایط دیگر حرارتی یعنی $C^{\circ} ۵۵$ به مدت ۱۶ دقیقه قرار گرفت که طی آن فقط حدود ۵٪ از فعالیت ایزوآنزیم استخوانی باقی می‌ماند، در حالیکه ایزوآنزیم کبدی و روده‌ای بترتیب ۴۰ و ۴۵٪



نمودار ۲. همبستگی بین نتایج روش‌های غیرفعالسازی حرارتی و مهار با اوره در اندازه گیری فعالیت ایزوآنزیم استخوانی آلکالین فسفاتاز سرم ($r=0.961$)

بحث و نتیجه گیری

تاکنون روش‌های متعددی برای اندازه گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز تام و ایزوآنزیمهای آن پیشنهاد شده است. در این مطالعه ALP تام به روش استاندارد پیشنهادی فدارسیون بین‌المللی بیوشیمی بالینی (IFCC) و انجمن آمریکایی بیوشیمی بالینی (AACC) اندازه گیری شد که نسبت به سایر روش‌های موجود از اعتبار بیشتری برخوردار است(۳و۲). روش‌های متعددی نیز برای اندازه گیری فعالیت ایزوآنزیمهای ALP گزارش شده است که بیشتر آنها نیاز به تجهیزات اختصاصی دارند و از لحاظ هزینه نیز چندان مفروض به صرفه نمی‌باشند که از جمله آنها می‌توان روش آنی بازی منوکلنان و تکنیک ایمونو رادیو متریک اسی (IRMA) را نام برد. در یک تحقیق همبستگی بین نتایج IRMA با روش غیرفعالسازی حرارتی $37^{\circ}C$ بوده است(۱۴).

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز سرم ارتباط معنی‌داری با سن دارد بطوریکه در نوزادان حدود ۵ برابر و در کودکان حدود $2/5$ برابر فعالیت آن در بالغین است و علت اصلی این وضعیت افزایش شدید فعالیت ایزوآنزیم استخوانی در دوران رشد می‌باشد. فعالیت این آنزیم در یک سن مشابه نیز با توجه به نوع جنس متفاوت است و در مردان کمی بیشتر از زنان می‌باشد اگرچه در مقایسه با سن از اهمیت کمتری برخوردار است(۱۵و۵). همچنین فعالیت آلکالین فسفاتاز به

محدوده یک انحراف معیار از مقدار میانگین قرارداشتند که نشان دهنده دقت و تکرارپذیری خوب نتایج بدست آمده می‌باشد. همبستگی نتایج حاصل از دو روش غیرفالسازی حرارتی و مهار با اوره در ۵۰ نمونه سرم نرمال با $r=+0.96$ و همچنین ویژگی خط همبستگی که از محل تقاطع محورهای افقی و عمودی می‌گذرد و دارای زاویه حدود ۴۵ درجه می‌باشد، تأییدکننده دقت و بخصوص صحت بالای نتایج بدست آمده می‌باشد.

در خاتمه با توجه به دقت، تکرارپذیری و صحت مناسب نتایج حاصل از دو روش راهاندازی شده و مقرر باشد اجرای این روش‌ها که بویژه با امکانات معمول آزمایشگاههای تشخیص طبی و بیمارستانهای کشور مطابقت دارد، اندازه‌گیری فعالیت ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی آلکالین فسفاتاز بویژه در بیماریهای انسدادی مجاري داخل و خارج کبدی و اختلالات استخوانی با استفاده از این روشها توصیه می‌گردد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل و کلیه دانشجویان عزیزی که در مرحله نمونه برداری همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

فعالیت خود را حفظ می‌نمایند. البته با نمونه‌گیری در حالت ناشتاپی می‌توان از فعالیت جزئی احتمالی مربوط به ایزوآنزیم روده‌ای صرف‌نظر نمود. در نمونه‌های سرم نرمال ایزوآنزیمهای نئوپلازی مانند Regan وجود ندارند و ایزوآنزیم جفتی نیز فقط در زمان بارداری خانمها در سرم وجود دارد، لذا در چنین وضعیتی می‌توان میزان فعالیت ایزوآنزیم استخوانی و کبدی نسبت به فعالیت آلکالین فسفاتاز تام که جداگانه در هر نمونه سرم به روش استاندارد اندازه‌گیری می‌شود را محاسبه نمود. این روش راهاندازی شده از مقبولیت و اعتبار خوبی برخوردار است و در منابع مرجع تأیید شده است(۱۳ و ۲۶). در روش مهار با اوره نیز محققین از غلظت‌های متفاوت محلول اوره استفاده نموده‌اند. برخی از آنان محلول ۲/۴۵ مولار(۳) و یا ۲/۹ مولار اوره (۲۱) را بکار برده‌اند. در مطالعه حاضر، نمونه‌های سرم به مدت ۱۸ دقیقه در دمای 37°C با محلول اوره ۳ مولار انکوبه شدند که در این شرایط فعالیت باقیمانده ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی بترتیب ۱۶ و ۴۴٪ است. در شرایط ناشتاپی و در نمونه‌های نرمال فعالیت سایر ایزوآنزیمهای قابل ملاحظه نمی‌باشد.

نتایج حاصل از ۱۰ بار تکرار آزمایش‌های اندازه‌گیری فعالیت ALP تام و ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی در دو نمونه سرم و یک نمونه کلستاز کبدی و یک نمونه پاژه استخوانی بطور عمدۀ در



References

- Simko V. Alkaline phosphatase in biology and medicine. *Dig Dis* 1991; 9: 189-209.
- Burtis CA, Ash Wood ER. Tietz textbook of clinical chemistry, 3rd ed, Saunders Co 1999; pp: 617-716.
- Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed, Saunders Co 1995; pp: 30-6.
- Griffiths J. An alternate origin for the placental isoenzyme of alkaline phosphatase. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 1019-24.
- Lino S. Clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme analysis. *Nippon Rin Sho* 1995; 53(5): 1157-61.
- Masuhara K, Sugamoto K, Yashikawa H, et al. Purification of bone alkaline phosphatase from human osteosarcoma. *Bone Miner* 1987; 3(2): 159-70.
- Sanchez Navarro MR, Fernandez Conde ME, Oliver Almendros C, et al. Alkaline phosphatase isoenzymes in serum and bronchoalveolar lavage from patients with bronchopulmonary disease. *An Med Interna* 2000; 17(4): 182-5.

8. Bishop ML, Duben Engelkirk JL, Fody EP. Clinical chemistry, 4th ed, Lippincott Williams and Wilkins Co 2000; pp: 185-215.
9. Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 20th ed, Saunders Co 2001; pp: 281-304.
10. Van Hoof VO, Hoylaerts MF, Geryl H, et al. Age and sex distribution of alkaline phosphatase isoenzymes by agarose electrophoresis. Clin Chem 1990; 36(6): 875-8.
11. Hipolito Reis C, Dias PO, Marthis MJ. Importance of assay conditions in visualization and quantitation of serum alkaline phosphatase isoenzymes separated by electrophoresis. Scand J Clin Lab Invest 1999; 59(8): 593-606.
12. Griffiths S, Black J. Separation and identification of alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms in serum of healthy persons by isoelectric focusing. Clin Chem 1987; 33: 2171-7.
13. Farly JR, Hall SL, Herring S, et al. Reference standards for quantification of skeletal alkaline phosphatase activity in serum by heat inactivation and lectin precipitation. Clin Chem 1993; 39 (9): 1878-84.
14. Farley JR, Hall SL, Llacas D, et al. Quantification of skeletal alkaline phosphatase in osteoporotic serum by wheat germ agglutinin precipitation, heat inactivation, and a two-site immunoradiometric assay. Clin Chem 1994; 40(9): 1749-56.
15. Hill CS, Wolfert RL. The preparation of monoclonal antibodies which react preferentially with human bone alkaline phosphatase and not liver alkaline phosphatase. Clin Chem 1989; 186: 315-20.
16. Ueda N. Physicochemical studies on leukocyte alkaline phosphatase. Am J Clin Pathol 1983; 80(3): 342-6.
17. Capelli A, Cerutti CG, Lusuardi M, Donner CF. Identification of pulmonary alkaline phosphatase isoenzymes. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155(4): 1448-52.
18. Burlina A, Plebani M, Secchiero S, et al. Precipitation method for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes. Clin Biochem 1991; 24 (5): 417-23.
19. Day AP, Saward S, Royle CM, et al. Evaluation of two new methods for routine measurement of alkaline phosphatase isoenzyme. J Clin Pathol 1992; 45(1): 68-71.
20. Miura M, Sakagishi Y, Hata K, et al. Differences between the sugar moieties of liver-and bone-type alkaline phosphatase. Ann Clin Biochem 1994; 31: 25-30.
21. Fitzpatrick CP, Pardue HL. Simultaneous of liver- and bone-type alkaline phosphatase by curve-fitting of inhibition kinetic data. Development and evaluation of a fluorescence- based method. Clin Chem 1992; 38(2): 247-55.

* آدرس نویسنده مسئول: بابل، دانشگاه علوم پزشکی، گروه بیوشیمی - بیوفیزیک، تلفن: ۰۱۱۱-۲۲۲۹۰۹۱.

mahjoub_s@yahoo.com