

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

سلیمان محبوب^{۱*}، ژیل مسرور و دسری^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 ایزو آنزیمهای استخوانی و کبدی هستند. هدف از این مطالعه راه‌اندازی و مقایسه دو روش مهار با اوره و غیر فعالسازی حرارتی در اندازه‌گیری فعالیت ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی ALP بوده است.

مواد و روشها: ابتدا بر روی نمونه های 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 غیر فعالسازی حرارتی و مهار با اوره طی ۱۰ بار تکرار کلیه آزمایشها روی دو نمونه نرمال و یک نمونه کلسنازکبدی و یک نمونه پاژه استخوانی تأیید گردید و روشهای غیر فعالسازی 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 بین المللی 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 غیر فعال سازی حرارتی برای ایزوآنزیم کبدی و استخوانی بترتیب ۳/۱۷ و ۳/۳۷ و CV روش مهار با اوره برای ایزوآنزیم کبدی و استخوانی بترتیب ۳/۳۳ و ۴/۴۶ بدست آمد. همبستگی روش غیرفعالسازی حرارتی و روش مهار با اوره برای ایزوآنزیم کبدی $r=0.964$ و ایزو آنزیم استخوانی $r=0.961$ 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، می توان 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 ۳۹-۳۴

مقدمه

آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) با کُد آنزیمی (EC۳-۱-۳-۱) 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)

مربوط به ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی می‌باشد (۱و۲). 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 ناشتایی مقدار آن در سرم ناچیز می باشد. در طی سه‌ماهه □ هزینه انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۱۳۸۰۳۷ از اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل تامین شده است.

سوم بارداری ایزوآنزیم جفتی که در مقایسه با سایر ایزوآنزیمها مقاومت بیشتری در مقابل حرارت نشان می‌دهد در خون مادر وجود دارد (۳ و ۴). اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز سرم در بررسی دو دسته از بیماریها اهمیت زیادی دارد که شامل بیماری‌های کبدی- صفراوی و بیماریهای استخوانی همراه با افزایش فعالیت استخوان‌سازی می‌باشد. در صورت وجود همزمان 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 (۱۱ و ۱۰)، ایزوالکتریک فوکوسینگ (۱۲)، غیرفعالسازی حرارتی (۱۳)، ایمونورادیومتریک اسی (IRMA) (۱۴)، آنتی بادی منوکلنال (۱۵)، مهار با ترکیبات شیمیایی از قبیل اوره و L- فنیل آلانین (۱۶ و ۱۷) و همچنین روشهای رسوبدهی با لکتین و آگلوتنین دانه گندم و کانکوالین A اشاره نمود (۱۸ و ۱۹).

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

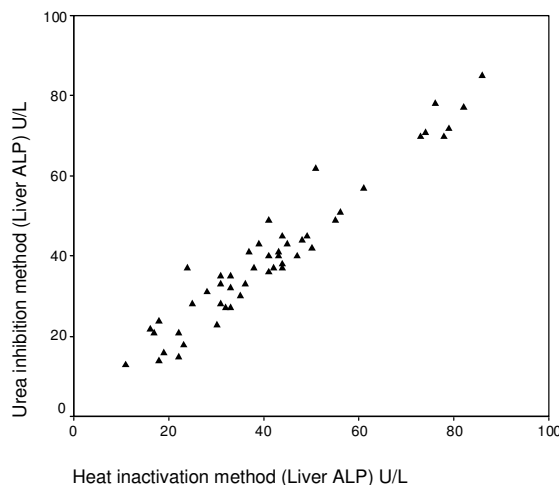
مقدار ۵ میلی لیتر در حالت ناشتایی بعمل آمد. سپس بر روی نمونه‌های سرم به دفعات مکرر و طی روزهای مختلف، آزمایشهای اندازه‌گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز تام و ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی بعمل آمد و شرایط مؤثر در نتایج آزمایشها مورد بررسی قرار گرفت. بعد از راه‌اندازی روشهای غیرفعالسازی حرارتی و مهار بوسیله 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 پازه 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 (AACC & IFCC) 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 AACC و IFCC اندازه‌گیری شد (۲ و ۳). در این روش، آنزیم ALP موجود در نمونه سرم، سوبسترای ۴- نیتروفنیل فسفات (4-NPP) را که بی‌رنگ می‌باشد در $\text{pH} = 10/3$ در دمای 37°C هیدرولیز می‌کند و گروه فسفات آزاد شده توسط بافر ۲- آمینو-۲- متیل -۱- پروپانل (AMP) گرفته می‌شود. محصول ۴- نیتروفنل در pH واکنش به ۴- نیترو فنوکسید تبدیل می‌شود که با فرم کینونی خود که زرد رنگ است در حالت تعادل می‌باشد. دقیقاً بعد از گذشت ۱۵ دقیقه از مرحله افزودن سوبسترا، با اضافه کردن محلول قلیایی هیدروکسید 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 اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد و با استفاده از فرمول زیر فعالیت آلکالین فسفاتاز تام نمونه محاسبه گردید.

به ترتیب به میزان ۸۴٪ و ۵۶٪ مهار می‌گردند (۲۰۳). 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 نمونه‌برداری 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 آلکالین 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 $Mean \pm SD$ قرار داشتند. مقدار میانگین و انحراف معیار آلکالین فسفاتاز تام بروش استاندارد FCC-AACC برابر $91/2 \pm 24/7$ بود. مقادیر میانگین و انحراف معیار ایزوآنزیمهای کبدی با روش غیرفعالسازی حرارتی برابر $41/5 \pm 18/7$ و با روش مهار با اوره $40/1 \pm 17/8$ بدست آمد. همچنین برای ایزوآنزیم استخوانی با روش غیرفعالسازی حرارتی برابر $46/6 \pm 17/5$ و با روش مهار با اوره برابر $48/1 \pm 17/9$ 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 اندازه گیری فعالیت ایزوآنزیم کبدی آلکالین فسفاتاز سرم ($r=0/964$)

۱۰۰۰× جذب استاندارد/جذب بلانک سرم- جذب آزمایش= فعالیت آلکالین فسفاتاز (واحد بین‌المللی در لیتر)

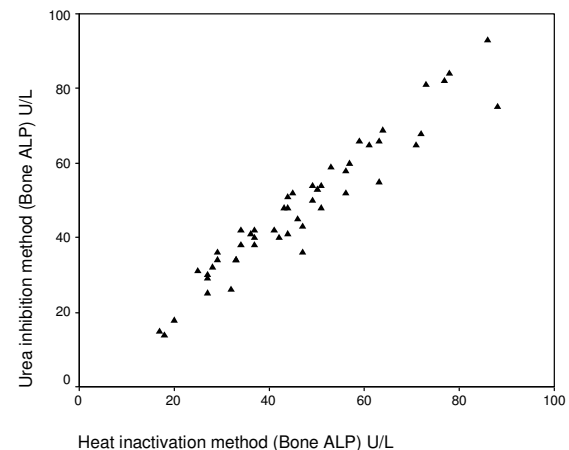
اندازه‌گیری فعالیت ایزوآنزیمهای استخوانی و کبدی ALP به روش غیرفعالسازی حرارتی: این روش براساس یکی از مهمترین ویژگی‌های ایزوآنزیمهای ALP یعنی اختلاف در بخش قندی آنها و تفاوت در میزان غیرفعال شدن ایزوآنزیمها در درجه حرارت‌های مختلف می‌باشد (۲۰۲). اجرای روش غیرفعالسازی حرارتی نیاز به کنترل بسیار دقیق شرایط آزمایشگاهی از قبیل درجه حرارت و مدت زمان انکوباسیون دارد. بخشی از هر نمونه به مدت ۵ دقیقه در حمام آب C ۶۵° قرار داده شد و بلافاصله 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 می‌مانند. بخش دیگر از هر نمونه به مدت ۱۶ دقیقه در حمام آب C ۵۵° 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 (۲۰۳) بترتیب ۹۵٪، ۶۰٪ و ۵۵٪ می‌باشد. بعد از این مرحله فعالیت آنزیم آلکالین 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 آلکالین فسفاتاز در مجاورت غلظت معینی از محلول اوره می‌باشد (۲). در این روش بخشی از نمونه سرم با محلول اوره ۳ مولار به مدت ۱۸ دقیقه در C ۳۷° انکوبه گردید. بعد از مرحله انکوباسیون، باقیمانده 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 ۳ مولار به مدت ۱۸ دقیقه

نوع گروه خونی نیز بستگی دارد و در افراد دارای گروههای خونی O یا B بعد از صرف غذا مقداری از فعالیت ALP تام مربوط به ایزوآنزیم روده‌ای است (۱۵). 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 ناشتایی 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 (۹ و ۳۰).

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 56°C به مدت ۱۰ دقیقه می‌باشد که طی آن باقیمانده فعالیت ایزوآنزیمهای مقاومتر یعنی جفتی و نئوپلازی هر کدام ۹۰٪ فعالیت خود را در این شرایط حفظ می‌نمایند (۴ و ۳۰).

در مطالعه حاضر دو مرحله حرارتی با مدت زمان انکوباسیون مشخص بکار گرفته شد. بخشی از هر نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای 65°C 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 نئوپلازی مشکوک شد. اگرچه برای اطمینان از وجود این ایزوآنزیمها می‌بایست نمونه سرم را در درجه حرارت 65°C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه نمود. بخشی دیگر از هر نمونه در شرایط دیگر حرارتی یعنی 55°C 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 غیرفعال سازی 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 اندازه‌گیری 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) اندازه‌گیری شد که نسبت به سایر روشهای موجود از اعتبار بیشتری برخوردار است (۹ و ۳۰). روشهای متعددی نیز برای اندازه‌گیری فعالیت ایزوآنزیمهای ALP گزارش شده است که بیشتر آنها نیاز به تجهیزات اختصاصی دارند و از لحاظ هزینه نیز چندان مقرون به صرفه نمی‌باشند که از جمله آنها می‌توان روش آنتی‌بادی منوکلنال و تکنیک ایمونو رادیو متریک اسی (IRMA) را نام برد. در یک تحقیق همبستگی بین نتایج IRMA با روش غیرفعالسازی حرارتی $r=0.673$ بوده است (۱۴).

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز سرم ارتباط معنی‌داری با سن دارد بطوریکه در نوزادان حدود ۵ برابر و در کودکان حدود ۲/۵ 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 (۱۵ و ۹۵). همچنین فعالیت آلکالین فسفاتاز به

فعالیت خود را حفظ می‌نماید. البته با نمونه‌گیری در حالت ناشتایی 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 ۹ و ۳). 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 ناشتایی و در نمونه‌های نرمال فعالیت سایر ایزوآنزیمها 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 عمده در

محدوده یک انحراف معیار از مقدار میانگین قرارداداشتند که نشان دهنده دقت و تکرارپذیری خوب نتایج بدست آمده می‌باشد. همبستگی نتایج حاصل از دو روش غیرفعالسازی 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 مقرون به صرفه بودن 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 مجاری 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.

References

1. Simko V. Alkaline phosphatase in biology and medicine. Dig Dis 1991; 9: 189-209.
2. Burtis CA, Ash Wood ER. Tietz textbook of clinical chemistry, 3rd ed, Saunders Co 1999; pp: 617-716.
3. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed, Saunders Co 1995; pp: 30-6.
4. Griffiths J. An alternate origin for the placental isoenzyme of alkaline phosphatase. Arch Pathol Lab Med 1992; 116: 1019-24.
5. Lino S. Clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme analysis. Nippon Rin Sho 1995; 53(5): 1157-61.
6. Masuhara K, Sugamoto K, Yashikava H, et al. Purification of bone alkaline phosphatase from human osteosarcoma. Bone Miner 1987; 3(2): 159-70.
7. 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 osteoporetic 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 Phathol 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: ۰۱۱۱-۲۲۲۹۵۹۱-۴

mahjoub_s@yahoo.com