

[Akceptuję](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal](#) [Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

Znaczenie diagnostyczne i oznaczanie fosfatazy alkalicznej (ALP) i fosfatazy kwasowej (AP)

Fosfatazy zaliczane są do klasy hydrolaz. Ich zadaniem jest katalizowanie rozkładu monoestrów kwasu fosforowego. Enzymy te są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, ponieważ wytwarzane są zarówno przez organizmy zwierzęce jak i roślinne, a także przez drobnoustroje. Większość z fosfataz znalazło zastosowanie nie tylko w diagnostyce klinicznej lecz również w przemyśle [3].

Fosfataza zasadowa (alkaliczna, ALP)

Ten rodzaj fosfotaz zaliczany jest do tzw. ektoenzymów, tj. enzymów, które zawierają swoje centrum aktywne zwrócone na zewnątrz komórki. Fosfatazy zasadowe działają w warunkach wysokiego pH (w granicach 8-10). Znane jest 4 podstawowe typy ALP:

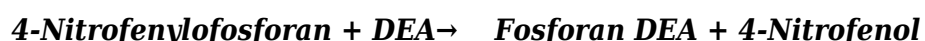
1. fosfatazy tkankowo-niespecyficzne (znane również jako LBK). Enzymy te ulegają ekspresji na błonie komórkowej hipertroficznym chondrocytów czy osteoblastów. Ponadto, skoncentrowane są także na membranach odrywających się od komórki pęcherzyków
2. fosfatazy jelitowe
3. fosfatazy łożyskowe
4. fosfatazy związane z komórkami rozrodczymi [3].

Fosfataza zasadowa uczestniczy w transporcie lipidów w jelicie, a także w procesie kalcyfikacji kości. Enzym ten występuje powszechnie w organizmie, w różnych rodzajach komórek i tkankach w postaci izoenzymów i izoform. Około 50% ALP w surowicy pochodzi z wątroby i ok. 48% z kości. Stosunek ALP wątrobowej do kostnej zmienia się wraz z wiekiem [4]. W szczególnie dużych stężeniach ALP występuje w łożysku, nabłonku jelitowym, kanalikach nerkowych, osteoblastach i wątrobie. Fosfataza obecna w surowicy zdrowych, dorosłych osób produkowana jest głównie w wątrobie i kościach [5].

Oznaczenie ALP

ALP w środowisku alkalicznym katalizuje przeniesienie grupy fosforanowej z 4-nitrofenylofosforanu na dwuetanoloaminę (DEA), w wyniku czego dochodzi do uwolnienia 4-nitrofenolu. Stężenie związku oznaczane jest na podstawie szybkości powstawania 4-nitrofenolu, mierzonego przy długości fali $\lambda=405$ nm [5]. Powyższa reakcja zachodzi wg równania:

ALP



Oznaczenie enzymu wykonywane jest bardzo często w podejrzeniu wielu różnych chorób, ze względu na fakt, że fosfataza alkaliczna wchodzi w skład wielu narządowych profili diagnostycznych. Bardzo często obserwowany jest wzrost aktywności ALP (podwyższone wartości) w surowicy bez pojawienia się konkretnych objawów klinicznych [4]. Podwyższone stężenie fosfatazy obserwuje się u osób z chorobami kości związanymi ze wzmożoną aktywnością osteoblastyczną, a także u osób z chorobami dróg żółciowych i wątroby. Wśród tych chorób wymienia się żółtaczkę, uszkodzenia wątroby czy raka wątroby. Niektóre zmiany fizjologiczne, w tym przyrost masy kostnej i ciąża mogą powodować wzrost aktywności (stężenia) ALP w surowicy [5].

Na rynku dostępne są testy służące do oznaczania fosfatazy alkalicznej, które można wykorzystywać do użytku *in vitro* w laboratoriach klinicznych (zestaw Fosfataza alkaliczna (ALP)-DEA, BioSystems) [5].

W celu wykonania oznaczenia jako materiał do badań można wykorzystać surowicę lub osocze pobrane zgodnie ze standardowymi procedurami. Próbkę może być pobrana na antykoagulant (w tym celu można używać heparyny). W trakcie oznaczenia należy mieć na uwadze fakt, że fosfataza alkaliczna w surowicy lub osoczu jest stabilna przez 7 dni, w momencie przechowywania w temperaturze od 2 do 8°C [5].

Przed przystąpieniem do oznaczenia odczynnik roboczy oraz aparat (spektrofotometr lub fotometr z termostatowanymi gniazdami na 25, 30 lub 37°C oraz filtrem o długości fali 405 nm) należy doprowadzić do temperatury reakcji, oraz odpowiednio przygotować załączone w zestawie odczynniki (dwuetanoloamina, 4-nitrofenylofosforan) [5].

Wykonanie oznaczenia ALP (z wykorzystaniem zestawu firmy BioSystems):

- do kuwety odpipetować 1 ml odczynnik roboczy oraz 20 µL próby badanej
- całość wymieszać, po czym kuwetę włożyć do fotometru, na tym etapie rozpocząć pomiar czasu
- zarejestrować absorbancję początkową, a następnie w odstępach 1-minutowych wykonać 3 kolejne pomiary
- pomiędzy przeprowadzonymi pomiarami należy obliczyć różnicę absorbancji, a także średnią różnicę absorbancji na minutę ($\Delta A/\text{minutę}$).

Z otrzymanych wyników oblicza się stężenie fosfatazy zasadowej w badanej próbce, wykorzystując w tym celu poniższy wzór:

$$\Delta A/\text{min}_{\text{próbki}} \cdot \Delta A/\text{min}_{\text{kalibratora}} \times C_{\text{kalibratora}} = \text{U/L}$$

Powyższy test wykazuje granicę detekcji (oznaczalności) równą 1,6 U/L = 0,027 µkat/l [5].

Enzymy są cząsteczkami białkowymi, mającymi trójwymiarowe kuliste kształty. Ich zadaniem jest przyspieszanie szybkości zachodzenia reakcji chemicznych, w szczególności w komórkach organizmów. Enzymy są w związku z tym biologicznymi katalizatorami. Reakcje te zachodzą w tzw. „miejscach aktywnych” cząsteczek enzymu. Wynikiem katalizowanej reakcji chemicznej są specyficzne zmiany w podłożu, które tworzą nową cząsteczkę chemiczną lub "produkt", a cząsteczka enzymu sama w sobie pozostaje bez zmian (po zajściu tych reakcji) [1]. Wszystkie enzymy sklasyfikowane są w sześciu grupach, w zależności od katalizowanych przez nie reakcji. I tak, transferazy katalizują przeniesienie małej części (lub grupy cząsteczkowej) z jednego substratu do innego, z kolei ligazy odpowiedzialne są za powstawanie wiązań pomiędzy dwoma substratami, tworząc tym samym jedną większą cząsteczkę. Oksydazy katalizują przenoszenie wodoru na tlen, w wyniku czego powstaje woda lub nadtlenek wodoru. Z kolei, liazy katalizują rozszczepienie cząsteczki związku na dwie części lub łączenie molekuł dwóch substancji w jedną. Podobnie, hydrolazy rozszczepiają cząsteczki, ale w przeciwieństwie do liaz proces ten zachodzi zawsze w obecności wody (woda jest częścią procesu). Fosfatazy natomiast należą do hydrolaz, które hydrolizują wiązania fosforanomonooestrowe. W wyniku ich działania zachodzi defosforylacja cząsteczki. W zależności od pH środowiska, w którym fosfatazy wykazują aktywność, dzielą się na: fosfatazy kwaśne i zasadowe (zwane także alkalicznymi) [1].

Wzrost kości i ich przebudowa to normalne zjawiska fizjologiczne, które występują w dużej ilości w dzieciństwie i okresie dojrzewania, a w mniejszym stopniu w ciągu dorosłego życia. Zjawiska te są wynikiem aktywności dwóch typów komórek kości, które mają działania przeciwne: tych, które syntetyzują nowy materiał kostny (głównie osteoblasty) oraz komórek zwanych osteoklastami (które odpowiedzialne są za resorpcję lub podział istniejącego materiału kostnego). Przesadne tempo resorpcji kości leży u podstaw patofizjologii wielu chorób człowieka np. choroby Pageta, złośliwej hiperkalcemii, osteodystrofii nerek, nadczynność tarczycy, nadczynność przytarczyc. Wynikiem

resorpcji jest postępujące rozrzedzenie kości, a także zwiększone ryzyko złamań [1].

Stężenie fosfatazy alkalicznej w surowicy zwiększa się wyraźnie w krzywicy, po czym jej poziom wraca całkowicie do normy dopiero po zakończeniu leczenia. Ze względu na ten fakt, fosfataza surowicy uważana jest za najlepszy wskaźnik wykorzystywany do wykrywania tego niedoboru. Aktywność fosfatazy w surowicy nie jest ściśle specyficzna w tym zakresie, ale okazała się klinicznie przydatna w diagnozowaniu wielu innych stanów patologicznych, na przykład, choroby Pageta, nadczynności przytarczyc, chorób wątroby, itp [1].

Vaentine i Beck (1951), Wachstein (1946), Wiltshaw i Moloney (1958) oraz Williams i Mendel (1954) w swoich badaniach zgłaszali istotne różnice w aktywności fosfatazy alkalicznej z leukocytów zaobserwowane w niektórych chorobach. Duży wzrost tego enzymu zauważono np. w zakażeniach, czerwienicy prawdziwej czy przewlekłej białaczce szpikowej. Zauważone zmiany zostały udokumentowane i potwierdzone wieloma biochemicznymi i histochemicznymi metodami, w celu uzasadnienia ich zastosowania w diagnostyce [1].

Oczyszczanie fosfatazy zasadowej z ludzkich leukocytów [2].

Metoda separacji leukocytów z krwi ludzkiej po raz pierwszy została opisana przez Trubowitz, Feldmana, Benante & Kirman (1957). W metodzie tej, w przybliżeniu wykorzystywano 50 l świeżo pobranej krwi ludzkiej, którą następnie dzielono na 5 l frakcje. Przemyte leukocyty (z każdej 5 l porcji) zawieszano w 200 ml wody, a następnie homogenizowano z wykorzystaniem homogenizatora szklanego w temperaturze od 0-5 °C przez 5 minut. Tak przygotowane próbki przechowywano w temperaturze -20°C [2]. W trakcie procedury oczyszczania, alkaliczną fosfatazę określano przez inkubację 0,3 ml preparatu enzymu, 9 ml glicerolu sodu (sodium glycerol 2-phosphate) buforowanego przy pH 9.9 za pomocą 0,1 M wodorotlenku sodu, 0,02 M barbituranu dietylowego sodu, 0,2 ml 0,05 M MgCl₂ i 0,5 ml 0,9% roztworu NaCl. Oznaczenie przeprowadza się w dwóch powtórzeniach. Powyższą reakcję zatrzymano po upływie 1 godziny w 37°C przez dodanie 2 ml 30% kwasu trichlorooctowego. Następnie, próbkę przefiltrowano (w celu usunięcia wytrąconego materiału) [2].

Kwaśna fosfataza (AP)

Enzym ten katalizuje reakcje: ***monoester fosforanowy + H₂O → alkohol + Pi***

Fosfatazy kwaśne mają zdolność hydrolizowania monomerów ortofosforanu w kwaśnym pH (w granicach 4 do 6). Ludzkie AP można podzielić na kilka odrębnych typów, które to różnią się między sobą m.in.: masą cząsteczkową, homologią aminokwasów czy długością sekwencji.

Kwaśne fosfatazy występują zazwyczaj w niskich stężeniach i zlokalizowane są w różnych tkankach organizmu. Zmiany w tempie i syntezy tych enzymów obserwowane są w momencie pojawienia się niektórych stanów chorobowych, dzięki czemu AP mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako serologiczne i tkankowe markery [3]. W warunkach normalnych u ludzi AP występuje w niskich stężeniach, a jej wzrost (wyraźne zmiany w syntezie) występują w poszczególnych chorobach, gdzie zazwyczaj niezwykle wysoka lub niska ekspresja enzymu postrzegana jest jako część procesu patofizjologicznego. Tak więc, kwaśna fosfataza wykorzystywana może być jako serologiczny i histologiczny marker chorób [1].

W komórce fosfataza kwaśna zlokalizowana jest głównie w lizosomach, a jej głównym źródłem jest

gruczoł krokowy. Duże ilości tego enzymu występują także w erytrocytach, płytkach krwi, szpiku, kościach, nerkach bądź wątrobie. W osoczu występuje 5 izoenzymów fosfatazy kwasnej, przy czym 30% stanowi fosfataza sterczowa. Fosfataza sterczowa (ang. prostatic acid phosphatase- PAP) jest bardzo nietrwała w temperaturach powyżej 37°C oraz w pH wyższym od 7.0. Do odróżnienia PAP od innych izoenzymów fosfatazy kwasnej, możliwe jest przeprowadzenie oznaczania aktywności ACP w obecności winianu. Winian jest silnym inhibitorem fosfatazy sterczowej, z kolei inne izoenzymy fosfatazy kwasnej są na niego niewrażliwe[4].

Apostoł I., Augustyn M. i wsp. (1985) przedstawili własną immunoenzymatyczną metodę oznaczania aktywności AP sterczowej w surowicy. Opisana przez autorów metoda opierała się na pomiarze aktywności izoenzymu sterczowego wyizolowanego z badanego materiału przy użyciu swoistego przeciwciała. Z racji tego, że oznaczanie aktywności kwasnej fosfatazy w surowicy krwi jest pomocne w rozpoznawaniu oraz kontroli leczenia chorych na raka stercza, opisana metoda ma duży potencjał diagnostyczny. Jako materiał do przeprowadzenia oznaczenia wykorzystywano m.in. oczyszczony preparat fosfatazy sterczowej. Następnie, przeprowadzono immunoprecypitację kompleksu fosfatazy sterczowej z przeciwciałem surowicy królika w 1,0% agarozie, a otrzymany precipitat kompleksu barwiono błękitem Coomasie (CBB) [6].

Odczynniki wykorzystywane w metodzie:

- przeciwciało I (Ab I): w postaci 100-krotnie rozcieńczonej solą fizjologiczną surowicy królika immunizowanego fosfatazą sterczową. Surowica stabilizowana za pomocą 0,02% azydku sodu.
- przeciwciało II (Ab II): surowica kozia skierowana przeciwko immunoglobulinom królika, rozcieńczona 20x a pomocą soli fizjologicznej z dodatkiem 3,5% glikolu polietylenowego 6000.
- substrat: 15,3 mM roztwór p-nitrofenylofosforanu sodu w 0,2 M buforze octanowym (pH 5,0) [6].

Wykonanie (immunoenzymatyczna metoda oznaczania zawartości fosfatazy pochodzenia sterczowego w surowicy krwi ludzkiej wg Apostoła i wsp. (1985)) :

- Do 0,2 ml surowicy ludzkiej wprowadzono 0,2 ml przeciwciała I. Próbkę dokładnie wymieszano, po czym inkubowano przez noc w temperaturze 20°C
- Następnie, do każdej próbki dodawano po 1 ml przeciwciała II, próbki inkubowano w temp. 20°C przez 1 h, zaś po upływie czasu inkubacji zbierano osad wytrąconego kompleksu- w tym celu próbki odwirowano przy 10 000x g przez 5 minut. Na tym etapie przystąpiono do oznaczania aktywności fosfatazy. Oznaczenie przeprowadzano w 3 równoległych próbkach. Przygotowano również próbę kontrolną, która zamiast surowicy zawierała 0,9% roztwór chlorku sodu [6].

Fosfataza sterczowa (AcP-P lub ACP ST) jest izoenzymem fosfatazy kwasnej, która związana jest z prostatą. Zmiany w aktywności fosfatazy sterczowej związane są ze zmianami w obrębie gruczołu krokowego. Frakcja sterczowa stanowi u mężczyzn ok. 30% całkowitej aktywności enzymu, w związku z czym monitorowanie poziomu tej frakcji enzymu ma bardzo duże znaczenie diagnostyczne [7]. Oznaczenie aktywności enzymu stosuje się głównie w monitorowaniu leczenia hormonalnego raka prostaty [7].

Oznaczanie aktywności fosfatazy sterczowej (Apostoł i wsp. (1985)):

Otrzymany osad wytrąconego kompleksu fosfatazy sterczowej (z przeciwciałem I i II) zawieszano w 0,2 ml 0,9% chlorku sodowego. Następnie, do próbki dodawano po 0,2 ml 15,3mM p-nitrofenylofosforanu sodowego w 0,2 M buforze octanowym (pH 5,0). Próbkę enzymu inkubowano

z substratem przez 30 minut w temperaturze 37°C, a po upływie czasu inkubacji, reakcję zatrzymywano dodając do próbki 2 ml 0,1M wodorotlenku sodu (NaOH). Na koniec, w próbce mierzono absorbancję przy $\lambda=405$ nm względem próbki kontrolnej. Na podstawie wyników pomiaru absorbancji określano ilość powstałego produktu [6].

Związki fenolowe dają czerwone lub fioletowe zabarwienie z 4-aminoantypiryną (A.A.P) w obecności zasadowych środków utleniających. Grupy aminowe z 4-aminoantypiryny łączą się z fenolem, w wyniku czego otrzymuje się substancję, która jest utleniana do barwnego chinonu [8].

Ilościowe oznaczanie fosfatazy alkalicznej (ALP) (wg procedury kitu Atlas Medical, [http://www.atlas-site.co.uk/index_files/website/\\$8.05.03.1.0060%20Alkaline%20Posphatase%204x15ml%20S06.pdf](http://www.atlas-site.co.uk/index_files/website/$8.05.03.1.0060%20Alkaline%20Posphatase%204x15ml%20S06.pdf)) [9].

Fosfataza alkaliczna katalizuje hydrolizę fosforanu p-nitrofenylu w pH =10.4, uwalniając p-nitrofenyl i fosforan. Szybkość powstawania p-nitrofenolu mierzona metodą fotometryczną jest proporcjonalna do stężenia fosfatazy w próbce. Jak już wspomniana fosfataza alkaliczna występuje prawie we wszystkich splotach organizmu, a najwięcej w kościach, wątrobie, łożysku czy nerkach. Zarówno wzrost poziomu tego enzymu, jak i jego spadek, mają bardzo duże znaczenie kliniczne [9].

Odczynniki zastosowane w kicie:

Bufor 1 (R1):

- Dietanoloamina (DEA) pH=10.4 (1mmol/L)
- Chlorek magnezu (0,5 mmol/L)

Substrat (R2):

- Fosforan p-nitrofenylu (pNPP) (10mmol/L)

Przygotowanie: Należy rozpuścić jedną tabletkę substratu R2 w 15 ml buforu R1. Próbkę zamknąć i dokładnie wymieszać, aż do momentu rozpuszczenia zawartości. Stabilność otrzymanego roztworu wynosi 21 dni w temperaturze 2-8°C lub 5 dni w temperaturze pokojowej (15-25°C) [9].

Próbki (próby badane): surowica lub heparynizowane osocze.

Wykonanie oznaczanie:

Oznaczanie ALP należy wykonywać przy 405 nm, w 1-cm kuwetach, w stałych temperaturach: 25,30, 37°C.

Przed rozpoczęciem oznaczenia należy wyzerować spektrofotometr do wody destylowanej. Do 1,2 ml mixu (R2+R1) należy dodać 20 uL próbki badanej, następnie inkubować mix przez 1 minutę, po czym rozpocząć pomiar. W tym celu, należy zczytać początkową wartość absorbancji próbki (A), uruchomić stoper i odczytywać absorbancję w odstępach 1-minuty (przez 3 minuty). Na podstawie otrzymanych wyników oblicza się różnicę pomiędzy absorbancją, a średnią różnicą absorbancji na minutę ($\Delta A/\text{min}$). Czulość powyższej metody: $1\text{U/L} = 0,0003\text{ AA}/\text{min}$ [9].

W trakcie oznaczenia należy mieć na uwadze, że fluorki, szczawian, cytrynian, a także EDTA hamują aktywność fosfatazy, w związku z czym związki te nie powinny być wykorzystywane jako antykoagulanty [9].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

[1]. Bull H., Murray P.G., Thomas D., Fraser A.M., Nelson P.N., 2002. Acid phosphatases. Mol Pathol. 2002 April; 55(2): 65-72. PMID: PMC1187150. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1187150/>

[2]. Trubowitz S., Feldman D., Morgenstern S.W., Hunt V.M., 1961. The isolation, purification and some properties of the alkaline phosphatase of Human Leucocytes. Biochem. J. (1961), 80, 369. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1244009/pdf/biochemj00812-0152.pdf>

[3]. <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/Fosfatazy/>

[4]. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. Skrypt. Diagnostyka laboratoryjna. Tom I. Gdański Uniwersytet Medyczny, Zlecenie KW/224/09. Recenzent prof. dr hab. Wiesława Łysiak-Szydłowska. S. 59-60.

[5]. Fosfataza Alkaliczna (ALP) -DEA, BioSystems. <http://chemklin.sum.edu.pl/uploaded/Biochemia%20narzadowa/Fosfataza%20alkaliczna%20%28ALP%29%20-%20DEA%20-%20metoda.pdf>

[6]. Apostoł I., Augustyn M., Kuciel R., Kulpa J., Wasylewska E., Leńko J., Marczyńska A., Ostrowski W.S., 1985. Immunoenzymatyczna metoda oznaczania aktywności fosfatazy sterczowej w surowicy krwi. Urologia Polska 1985/38/4, kwartalnik ISSN 0500-7208. www.urologiapolska.pl/artukul.php?1691

[7].

http://www.invicta.pl/1198/bad,284/fosfataza_kwasna_frakcja_sterczowa_acp_st_w_surowicy.html

[8]. Powell M.E.A., Smith M.J.H., 1953. The determination of serum acid and alkaline phosphatase activity with 4-aminoantipyrine (A.A.P). J.clin. Path. (1954), 7, 245. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1023800/pdf/jclinpath00028-0071.pdf>

[9].

[http://www.atlassite.co.uk/index_files/website/\\$8.05.03.1.0060%20Alkaline%20Posphatase%204x15ml%20S06.pdf](http://www.atlassite.co.uk/index_files/website/$8.05.03.1.0060%20Alkaline%20Posphatase%204x15ml%20S06.pdf)

<http://laboratoria.net/artukul/20532.html>

Informacje dnia: [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#) [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#) [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#)

Partnerzy