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

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. enzymó, 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 równiez jako LBK). Enzymy te ulegają ekspresji na błonie komórkowej hipertroficznych 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 lipidó 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 pk. 48% z kości. Stosunek ALP wątrobowej do kostnej zmienia się wraz z wiekiem [4]. W szczególnie dużych stężeniach ALP występuje w łóżysku, nabłonku jelitowym,kanalikach nerkowych, osteoblastach i wątrobie. Fosfataza obecna w surowicy zdrowych, dorosłych osób produkowana jest głowni ew wątrobie i kościach [5].

Oznaczanie 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 λ=405 nm [5]. Powyzsza reakcja zachodzi wg równania:

ALP

4-Nitrofenylofosforan + DEA→ Fosforan DEA + 4-Nitrofenol

Oznaczanie 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 czesto oberwowany jest wzrost aktywności ALP (podwyższone wartośći) w surowicy bez pojawienia się konkretnych objawów klinicznych [4]. Podwyższone stężenie fosfatazy obserwuje się o osób z chorobami kości związanymi ze wzmożoną aktywnością osteoblastyczną, a także u osób z chorobami dróg żółciowych i watroby. Wśród tych chorób wymienia się żółtaczki, 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 sa testy służace do oznaczania fosfatazy alkalicznej, które można wykorzystywać do uzytku *in vitr* 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. Próbka 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 przystąpienie do oznaczenia odczynnik roboczy oraz aparat(spektrofotometr lub fotomoetr 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 odczynnika roboczego oraz 20 µL próby badanej
- całość wymieszać, po czym kuwetę włożyć do fotometru, na tym etapie rozpocząć pomiar czasu
- zarejsestrować absorbancję początkową , a następnie w odstępach 1-minutowych wykonać 3 kolejne pomiary
- pomiędzy pzreprowadzonymi pomiarami należy obliczyć różnicę absorbancji, a także średnią różnicę absorbancji na minutę (ΔA/minutę).

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

$$\Delta A/min_{próbki} / \Delta A/min_{kalibratora} \times C_{kalibratora} = U/L$$

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 fosforanomonoestrowe. 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 sowich 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 proceduury 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 $MgCl_2$ i 0,5 ml 0,9% roztworu NaCl. Oznaczenie przeprowadza sie 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 + H_2O → 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 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 kwaśnej, 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 kwaśnej, możliwe jest przeprowadzenie oznaczania aktywności ACP w obecności winianu. Winian jest silnym inhibitorem fosfatazy sterczowej, z kolei inne izoenzymy fosfatazy kwaśnej są na niego niewrażliwe[4].

Apostoł I., Augustyn M. i wsp. (1985) przedstawili własną immunoenzymatyczną metodę oznaczaniaaktywności 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 kwaśnej 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 precypitat 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 Apostoł 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 oznaczaniaa ktywności 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 kwaśnej, 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 λ=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) [9]**.**

Fosfataza alkaliczna katalizuje hydrolizę fosforanu p-nitrofenylu w pH =10.4, uwalniając p-nitrofenyl i fosforan. Szybkośc powstawania p-nitrofenolu mierzona metodą fotometryczną jest proporcjonalna do stężenia fosfatazy w próbce. Jak już wspomniania fosfataza alkaliczna występuje prawie we wszytskich 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 poczatkową wartośc absorbancji próbki (A), uruchomić stoper i odczytywać absorbancję w odstępach 1-minuty (przez 3 minuty). Na postawie otrzymanych wyników oblicza się różnicę pomiędzy absorbancją, a średnią różnicą absorbancji na minutę (ΔA/min) **.** Czułość powyższej metody: 1U/L = 0,0003 AA/min[9].

W trakcie oznaczenia należy miec 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. PMCID: 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/artykul.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

https://laboratoria.net/artykul/20532.html

Informacje dnia: Rozpoczął się pierwszy Festiwal Nauki i Innowacji Co naprawdę skręca polaryzację światła? Szczyt możliwości psychicznych przypada na okres między 55. a 60. r. ż. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego Pierścienie Saturna "zniknęły" W Europie słabnie wolność akademicka Rozpoczął się pierwszy Festiwal Nauki i Innowacji Co naprawdę skręca polaryzację światła? Szczyt możliwości psychicznych przypada na okres między 55. a 60. r. ż. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego Pierścienie Saturna "zniknęły" W Europie słabnie wolność akademicka Rozpoczął się pierwszy Festiwal Nauki i Innowacji Co naprawdę skręca polaryzację światła? Szczyt możliwości psychicznych przypada na okres między 55. a 60. r. ż. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego Pierścienie Saturna "zniknęły" W Europie słabnie wolność akademicka

Partnerzy