

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ СОБАК ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ.

Бокарев А.В., Стекольников А.А.

Санкт-петербургская академия ветеринарной медицины.

Аннотация. В статье представлены результаты исследования чувствительности к термоинактивации изоферментов щелочной фосфатазы сыворотки крови собак. Показано, что костный изофермент обладает наибольшей чувствительностью к термоинактивации. Так при обработке сыворотки крови при 60°C в течении 15 минут, его активность, практически полностью исчезает. При том же режиме обработки активность печеночного изофермента падает более чем на 70%, а стероидиндуцированного, только, на 40%. Метод тепловой инактивации, может быть использован в клинической биохимии, как способ определения доминирующего изофермента щелочной фосфатазы в сыворотке крови собак.

Ключевые слова. Сыворотка крови, собака, фермент, изофермент, тепловая инактивация.

Сокращения и аббревиатуры.

ALP (Alkaline phosphatase) – щелочная фосфатаза, **TALP** (Total Alkaline phosphatase) - общая активность всех сывороточных изоферментов щелочной фосфатазы, **LALP** (Liver Alkaline phosphatase) - печеночный изофермент щелочной фосфатазы, **BALP** (Bone Alkaline phosphatase) - костный изофермент щелочной фосфатазы, **IALP** (Intestinal Alkaline phosphatase) – кишечный изофермент щелочной фосфатазы, **PALP** (placental Alkaline phosphatase) – плацентарный изофермент щелочной фосфатазы, **KALP** (kidney Alkaline phosphatase) – почечный изофермент щелочной фосфатазы, **CALP** (Corticosteroidinduced Alkaline phosphatase) - кортикостероидиндуцированный изофермент щелочной фосфатазы, **WGA** (wheat germ agglutinin) – агглютинин (лектин) из семян пшеницы.

Введение

Сумарная активность фермента щелочная фосфатаза (ALP) (К.Ф. 3.1.3.1) как нормальной, так и патологической сыворотки крови человека и животных обусловлена смесью её органоспецифических изоферментов имеющих кишечное (IALP), костное (BALP), печеночное (LALP, плацентарное (PALP) и др. происхождения (1, 7, 12, 16).

Как активность общей сывороточной ALP, так и вклад в общую активность каждого конкретного изофермента зависят от возраста биологического объекта, а так же от особенностей его физиологического (например, беременность) или патологического состояния (1, 4, 7, 8). Т.е. увеличение в сыворотке крови пациента активности одного из изоферментов ALP может адресно

указывать на место протекания патологического процесса (2, 3, 12, 16). Причем следует отметить, что увеличение активности одного из изоферментов ALP не всегда приводит к увеличению общей активности фермента, которая может оставаться в пределах референтных величин за счет уменьшения активности других изоформ ALP имманентно присутствующих в сыворотке крови (10). Кроме того, на наличие патологического процесса может указывать присутствие атипичной изоформы фермента отсутствующей в сыворотке крови в условиях нормы (кортикостероид-индуцированный изофермент ALP при гипернадпочечности у собак) (18, 19, 21).

Таким образом, установление доминирующей изоформы ALP необходимо:

1 - в случае подъема общей активности ALP, но при отсутствии клинических признаков патогномоничных какому либо заболеванию,

2 - при отсутствии подъема общей активности ALP, но при наличии клинических признаков характерных для поражения органов и тканей с высоким внутренним уровнем активности ALP,

3 - при наличии клинических признаков некоторых заболеваний, диагностика которых базируется на обязательном подтверждении присутствия в крови атипичного изофермента ALP.

Измерение активности ALP обычными методами дает показатель величины активности суммы всех изоферментов ALP без указания на их источник (1, 7, 8, 12, 13). Дифференцированное определение активности различных изоферментов ALP может быть осуществлено при помощи электрофореза (аффинный электрофорез в агарозе, электрофорез на ацетате целлюлозы или изоэлектрическое фокусирование на агарозе), или методом дифференцированного ингибирования используя такие вещества как левамизол, фенилаланин, хомаоаргинин, мочевины, а так же методом преципитации с лицетином или с лектинами, такими как лектин из зародыша пшеницы, Кон-А или ЛПС (3, 6, 11, 14, 16, 17).

Одним из методов дифференцированного определения активности основных, диагностически значимых, изоферментов ALP, является метод тепловой инактивации (2, 7, 8, 13, 15, 16, 17, 20,).

Исследования, проведенные в области медицинской энзимологии, выявили следующую чувствительность ткане-специфичных изоферментов ALP к тепловой инактивации. Наиболее чувствителен кишечный изофермент. Несколько менее чувствительна костная изоформа фермента. Еще меньшая чувствительность регистрируется у печеночного изофермента. И сама низкая - у изофермента выделенного из желчи. Считается, что плацентарный изофермент ALP устойчив к термоинактивации (7, 8, 12,). Однако следует заметить, что данные полученные в опытах с тканевыми экстрактами и в опытах с сывороткой крови не полностью совпадают (13).

Исследования проведенные в области ветеринарной энзимологии так же установили, что основные диагностически значимые сывороточные изоферменты ALP у собак имеют различную чувствительность к термоинактивации. Наименьшая остаточная активность после термической обработки наблюдается у костного изофермента (BALP), промежуточная у печеночного изофермента (LALP), и наибольшая у кортикостероидиндуцированного (CALP) (14, 16, 17, 20, 21).

Однако, не смотря на то, что подобная зависимость является давно установленным фактом и различные прикладные аспекты данной зависимости используются в научных исследованиях, метод не имеет широкого использования в рутинных клинических исследованиях. И на это имеются как объективные, так и субъективные причины.

К основным объективным причинам можно отнести сложность интерпретации результатов, так как, во первых, как до процедуры термоинактивации, так и после нее полученный результат все равно является следствием суммы активностей изоферментов ALP, которые хоть и в разной степени но все, в той или иной степени чувствительны к инактивированию методом термоденатурации. Таким образом, точный количественный подсчет активности каждого конкретного изофермента ALP невозможен, а можно говорить лишь о превалировании активности того или иного изофермента по отношению к полученной величине. В области медицинской биохимии предпринято несколько попыток сделать метод термоинактивации более точным и более специфичным путем введение в тест внутренних тканеспецифических стандартов (13, 15). Однако, подобная модификация метода, увеличивая его точность и специфичность, одновременно усложняет его до такой степени, что он становится трудно выполним в рутинных клиничко-биохимических исследованиях. Кроме выше сказанного, имеют место данные, что чувствительность изоферментов ALP в тесте термоинактивации может значительно варьировать, в зависимости от состава инкубационной среды, т.е. количественного и качественного состава сопутствующих белков и ионов (13).

Не смотря на все вышесказанное, основными причинами, вследствие которых данный метод не имеет широкого использования в рутинных клинических исследованиях (во всяком случае, в ветеринарии) являются причины субъективного характера. Дело в том, что на сегодняшний день отсутствует унифицированная методика определения изоферментного статуса ALP в сыворотке крови собак методом термоинактивации. В различных исследованиях как клинического так и биохимического характера используются различные условия теста. Температурный режим инактивации варьирует от 55 °С до 65 °С, а временной от 1 до 10 минут. Соотносительно этому и данные о устойчивости (и чувствительности) различных изоферментов ALP сыворотки крови собак к термической обработке варьируют в различных научных публикациях. Производным этого являются абсолютно противоположные практические выводы: от «данный метод может, с успехом, применяться на практике в рутинной клинической диагностике» (17, 20), до «этот тест сложен и не достаточно эффективен для получения воспроизводимых результатов (7)».

Цель исследования

1. Изучить кинетические особенности ингибирования общей сывороточной активности ALP в зависимости от соотношения двух переменных: 1 - условий термической обработки, и 2 – доминирующего изофермента ALP (BALP, LALP или CALP) за счет которого сывороточная активность ALP превышает свой физиологический референт.
2. Подобрать оптимальные условия термической обработки образцов сывороток крови, для наиболее точного выявления и идентификации каждого конкретного изофермента.
3. Сопоставить кинетические особенности ингибирования общей сывороточной активности ALP с конкретными заболеваниями и оценить объективность данного диагностического критерия.
4. На основании полученных данных дать практические рекомендации по исполь-

зованию теста термоинактивации для идентификации и полуколичественной оценки в сыворотке крови собак изоферментов ALP.

Материалы и методы исследования

1. Объект исследования – образцы сыворотки или плазмы крови, взятые от собак имеющих повышенный в 5 – 10 раз уровень активности общей сывороточной ALP. Подъем активности общей сывороточной ALP, в каждом конкретном случае, был обусловлен увеличением активности тканевого изофермента специфического для определенной патологии: BALP для костной патологии (рахит), LALP для патологии печени (гепатит), CALP для нарушения обмена глюкокортикостероидов (спонтанный или ятрогенный гиперандрокортицизм).
2. Для обеспечения правильного измерения и для создания заданной активности, образцы сывороток (плазмы) разводили 0.15 М раствором хлорида натрия. Коэффициент разбавления, в каждом конкретном случае, был обусловлен двумя факторами: исходной ALP активностью сыворотки и целью поставленной задачи. При разбавлении более чем в 5 раз активность изоферментов ALP, сопутствующих доминантному, становится ниже чувствительности метода.
3. Активности щелочной фосфатазы в биологических жидкостях определяли «кинетическим методом» с п-Нитрофенилфосфатом. Соотношение сыворотки (плазмы) и субстратной смеси – 1/50. Оптическую плотность растворов измеряли на микрофотокolorиметре МКМФ-02М при светофильтре 405 nm.
4. Термическую обработку сывороточных образцов проводили на водяной бане в пробирках типа «Эпандорф» объемом 1,5 мл. Для более быстрого прогрева образца, объем обрабатываемой сыворотки (плазмы) составлял не более 0,05 мл., который помещался в уже прогретые пробирки.
5. Температурные режимы термоинактивации составляли 56° С, 60° С, 65° С и 100° С..

- Временные режимы термоинактивации составляли от 5 секунд до 25 минут.
- После процедуры термоинактивации образцы быстро переносили в ледяную баню для охлаждения, после чего использовали для измерения ферментативной активности.
- Величины оптической плотности "Е" полученные при измерении переводили в международные единицы активности фермента - Ед/л (U/L).
- Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы «Hrimer Biostatistics» версия 4,03.
- Построение графиков проводили с использованием программы «Microsoft Graph» (1997 год).

Результаты исследования

На рисунках № 1, и 2, графически отражены результаты исследования чувствительности к термоинактивации BALP изофермента ALP, который доминирует в сыворотке крови при патологии костной системы.

При 56°C активность фермента почти полностью подавляется после 20 минутной термической обработке (Рис. 1), а при 60°C после инкубации продолжительностью 10 минут (Рис. 2).

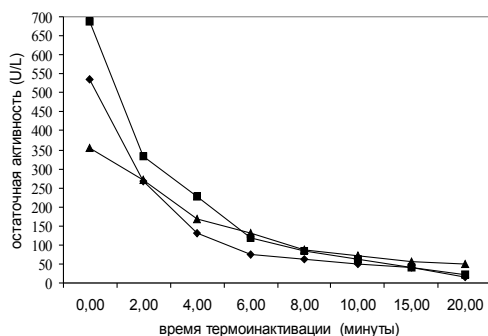


Рис. 1. Динамика подавления активности сывороточной ALP с доминирующим BALP изоферментом при инкубации при 56°C в зависимости от исходной активности фермента и времени термоинактивации. Представлены сыворотки от трех щенков больных рахитом.

Причем при более низкой температуре термоинактивации (56°C), зависимость остаточной активности от активности исходной сохраняется даже при инкубации в течении 6 минут. В то время, как при термоинактивации при 60°C , зависимость остаточной активности BALP изофермента от активности исходной исчезает уже после инкубации продолжительностью в одну минуту.

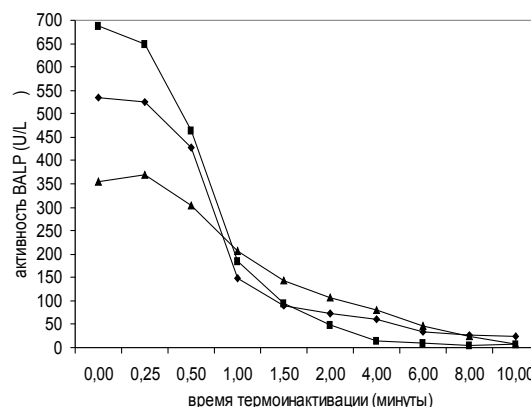


Рис. 2. Динамика подавления активности сывороточной ALP с доминирующим BALP изоферментом в зависимости от исходной активности фермента и времени термоинактивации. Инкубации при 60°C . Представлены сыворотки от трех щенков больных рахитом.

Изофермент ALP (LALP) доминирующий в сыворотках крови, полученных от собак с патологией печени, демонстрирует более высокую устойчивость к термической обработке (Рис. 3; 4; 5), чем BALP изофермент.

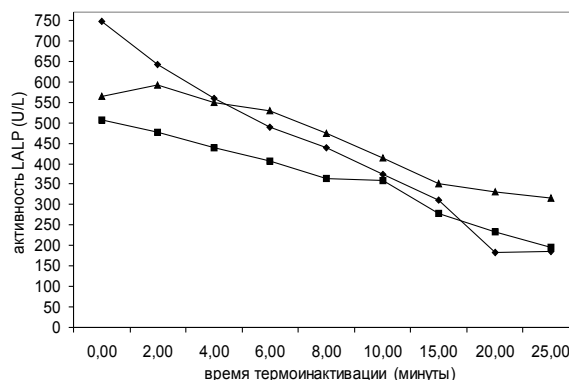


Рис. 3. Динамика подавления активности сывороточной ALP с доминирующей активностью LALP изофермента, в зависимости от исходной активности фермента и времени термоинактивации. Температура инкубации 56°C . Представлены сыворотки от трех собак больных гепатитом.

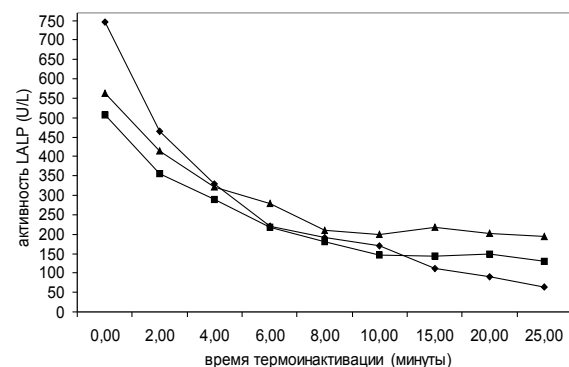


Рис. 4. Динамика подавления активности сывороточной ALP с доминирующей активностью LALP изофермента, в зависимости от исходной активности фермента и времени термоинактивации. Температура инкубации 60°C . Представлены сыворотки от трех собак больных гепатитом.

Для температурных режимов 56°C (Рис. 3) и 60°C (Рис. 4) характерно постепенное уменьшение активности фермента, которое

тем выраженной, чем дольше период термической обработки. Однако, даже при обработке образцов сыворотки в течении 25 минут, активность ALP остается достаточно высокой. Так же, согласно данным эксперимента, независимо от времени термической обработки, большинство биологических образцов, демонстрируют более высокую остаточную активность фермента при более высокой исходной.

При 65 °С динамика подавления активности сывороточной ALP с доминирующей активностью LALP изофермента характеризуется резким падением после двухминутной обработки (Рис. 5).

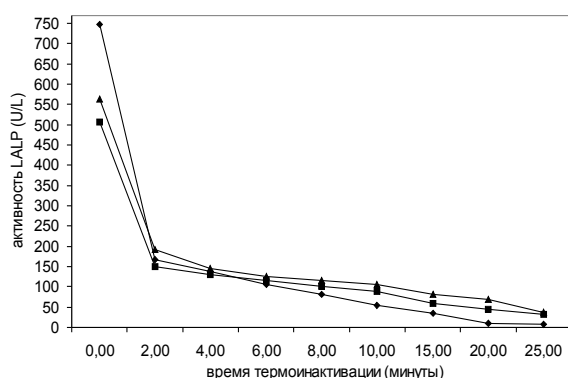


Рис. 5. Динамика подавления активности сывороточной ALP с доминирующей активностью LALP изофермента, в зависимости от исходной активности фермента и времени термоинактивации. Температура инкубации 65 °С. Представлены сыворотки от трех собак больных гепатитом.

Дальнейшее увеличение времени термической обработки характеризуется постепенным линейным падением активности фермента, которая уменьшается, почти, до нуля после инкубирования в течении 25 минут. Следует заметить, что зависимость остаточной активности фермента от исходной, заметна только в процессе первых двух минут термоинактивации и с увеличением времени термической обработки становиться невыраженной.

Согласно результатам исследования изофермент ALP доминирующий в сыворотке крови собак при гипердренокортицизме обладает более высокой термоустойчивостью, чем изоферменты BALP и LALP доминирующие в крови собак с патологией костной и гепатобилиарной систем, соответственно (Рис. 6; 7; 8). При термической обработке при 56 °С активность фермента падает крайне незначительно даже после 25 минутной обработки. А некоторые образцы

сыворотки демонстрируют полную устойчивость к термической инактивации при данном температурном режиме (Рис. 6).

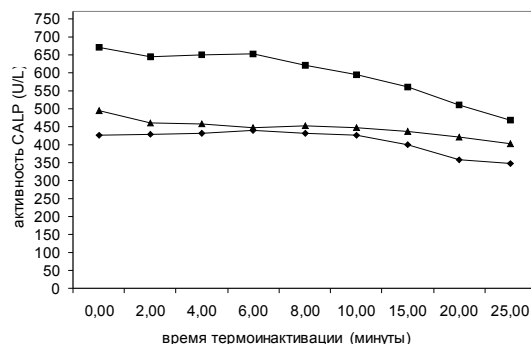


Рис. 6. Динамика подавления активности сывороточной ALP в зависимости от исходной активности фермента и времени термоинактивации. Инкубация при 56 °С. Представлены сыворотки от трех собак больных гипердренокортицизмом.

Термическая обработка CALP изофермента сыворотки при 60 °С оказывает более значительное ингибирующее влияние, линейно уменьшая биокаталитическую активность фермента с увеличением времени термоинактивации (Рис. 7).

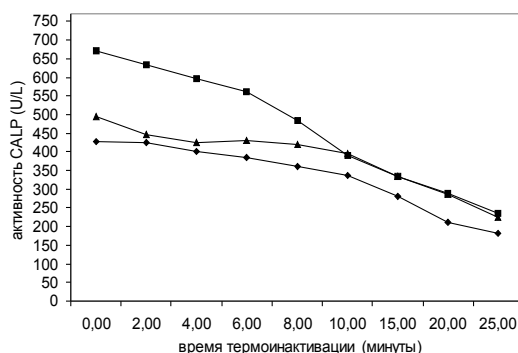


Рис. 7. Динамика подавления активности сывороточной ALP в зависимости от исходной активности фермента и времени термоинактивации. Инкубация при 60 °С. Представлены сыворотки от трех собак больных гипердренокортицизмом.

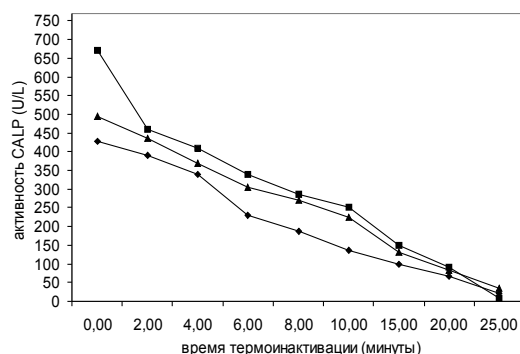


Рис. 8. Динамика подавления активности сывороточной ALP в зависимости от исходной активности фермента и времени термоинактивации. Инкубация при 65 °С. Представлены сыворотки от трех собак больных гипердренокортицизмом.

Однако, как видно из результатов эксперимента, представленных графически, даже при термической обработке продолжительностью 25 минут активность CALP изофер-

мента не подавляется полностью и остается еще достаточно высокой. Дополнительно, следует отметить что, большинство образцов сыворотки демонстрируют зависимость, при которой остаточная активность фермента тем выше, чем была выше его активность до проведения процедуры термической обработки.

График отражающий динамику подавления активности CALP изофермента при 65 °С (Рис. 8), так же как и предыдущий демонстрирует линейное уменьшение активности фермента при увеличении времени термической обработки. Однако угол наклона графика более выражен, что свидетельствует о том, что интенсивность подавления ферментативной активности на единицу времени при 65 °С выше, чем при температуре 60 °С. Однако остается неизменной зависимость, при которой в образцах сывороток крови с более высокой исходной активностью фермента наблюдается и более высокая остаточная активность,

измеряемая после термической обработки. Подобная закономерность отчетливо выражена, вплоть до увеличения времени термической обработки до 15 минут, нивелируется при

увеличении периода термоинактивации до 20 минут и практически исчезает к 25 минуте термической обработки, так как остаточная ALP активность сывороток с доминирующим CALP изоферментом, при столь продолжительном времени инкубации при 65 °С, практически приближается к нулю (Рис.8).

Высокую термоустойчивость CALP изофермента демонстрируют и опыты с термической обработкой сывороток собак при t – 100 °С. CALP изофермент доминирующий в сыворотке собак больных гипердренокортицизмом полностью ингибируется при кипячении продолжительностью 20 секунд. При кипячении продолжительностью 10 секунд данная изоформа фермента теряет только от 40 % до 60 % активности. А кипячение продолжительностью 5 секунд, вообще, не оказывает влияния на его каталитические свойства. В то же время LALP изофермент, доминирующий в сыворотке крови собак больных гепатитом, при кипячении продолжительностью 10 секунд теряет 90 %

и более своей активности. А потери при 5 секундном кипячении (в зависимости от сывороточного образца) превышают 50 %. ALP активность сывороток обогащенных BALP изоферментом подавляется на 100% даже при 5 секундном кипячении.

Обсуждение результатов

Таким образом, результаты исследования, представленные в данной публикации, однозначно свидетельствуют, о том, что образцы сывороточных ALP, полученных от собак с различными патологиями демонстрируют неодинаковую устойчивость к инактивации их биокаталитической активности методом термической обработки, что совпадает с данными других исследователей (7, 12, 14, 16). Наибольшую чувствительность к термоинактивации проявляет BALP изофермент, доминирующий в сыворотке крови собак с патологией костной системы. А, наименьшую – CALP изофермент, появляющийся в сыворотке крови собак с гипердренокортицизмом и доминирующий над другими изоферментами ALP в процессе развития болезни. LALP изофермент доминирующий в сыворотке крови собак страдающих различными гепатопатиями, занимает промежуточное положение, между костным и стероид-стимулированным изоферментами, в отношении чувствительности к термической обработке. Критическими режимами термоинактивации, почти полностью подавляющими активность данных изоферментов, для BALP являются 25 минут при t – 56 °С или 10 - 15 минут при t – 60 °С (Рис. 1, 2), а для LALP и CALP – термическая обработка продолжительностью 25 минут при температуре 65 °С (Рис. 5, 8). Интересно отметить, что, не смотря на различную чувствительность LALP и CALP изоферментов к тем режимам термоинактивации, которые не подавляют их активность полностью (Рис. 3, 4, 6, 7), полное ингибирование их биокаталитической активности происходит при сходных условиях.

Однако, как следует из результатов исследования, использование метода термической инактивации для **количественного** определения изоферментного статуса сыворотки крови собак затруднен тем, что:

1 – практически все изоферменты, в большей или меньшей степени, теряют активность после термической обработки, и не возможно подобрать такие условия, при которых можно было бы поочередно инактивировать 100% активности одного из изоферментов при 100% сохранности активности другого.

2 – остаточная активность любого изофермента зависит от его исходной активности,

3 – степень инактивации любого из изоферментов зависит от температуры и продолжительности термической обработки.

Из всего выше изложенного следует, что **абсолютная величина** активности сывороточной ALP, измеренная после термоинактивации, не может являться аналитически значимой.

Тем не менее, если полученные результаты представить в виде процента (%) ALP активности, оставшейся после процедуры термической обработки, то становится очевидным, что аналитические возможности метода позволяют идентифицировать доминирующий изофермент в общей ALP активности сыворотки крови, т.е. проводить качественный и полуколичественный анализ. Это становится возможным, поскольку исследованные изоферменты при определенных режимах термической обработки, демонстрируют характерный, свойственный только для них, процент остаточной активности, не зависящий от исходной тотальной активности сывороточной ALP (Табл. 1).

Таблица 1. Процент (%) остаточной активности BALP, LALP или CALP изоферментов сыворотки (плазмы) крови собак в зависимости от температуры и времени термической инактивации *

Вид ALP Изофермент	Температура инактивации	Время термоинактивации (минут)								
		0	2	4	6	8	10	15	20	25
BALP	56°C	100	58± 8.84	35± 6.69	23± 7.22	16± 4.00	13± 4.00	9± 2.52	7± 3.67	
LALP		100	95± 5.51	87± 6.64	80± 8.08	72± 7.22	65± 7.36	53± 5.86	43± 9.91	40± 8.96
CALP		100	96± 2.03	97± 2.31	97± 3.76	95± 2.85	93± 3.38	89± 2.89	77± 7.84	77± 3.67
BALP	60°C	100	17± 6.81	12± 5.78	7± 3.46	4± 1.76	2± 1.00			
LALP		100	69± 3.61	53± 4.33	41± 5.61	33± 3.84	29± 3.46	27± 6.69	26± 7.21	23± 7.37
CALP		100	94± 4.06	90± 2.33	87± 1.73	80± 4.18	72± 7.17	61± 5.51	50± 4.36	41± 2.96
BALP	65°C	100	29± 3.22	23± 2.67	20± 2.85	17± 3.00	15± 3.84	10± 2.73	8± 2.96	5± 1.86
LALP		100	83± 7.22	72± 5.69	56± 3.28	47± 3.84	38± 4.10	24± 1.20	16± 0.88	4± 1.76
CALP		100								

* Результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего (M±m) от нескольких измерений. BALP – n=12; LALP – n=11; CALP – n=7.

Сравнительный анализ данных табличных данных, представленных графически (Рис. 9, 10, 11) демонстрируют, что наибо-

лее удобным режимом термоинактивации для определения изоформы фермента ответственного за увеличение общей ALP активности в сыворотке крови собак, является 60 °C в течении 10 минут (Рис. 10).

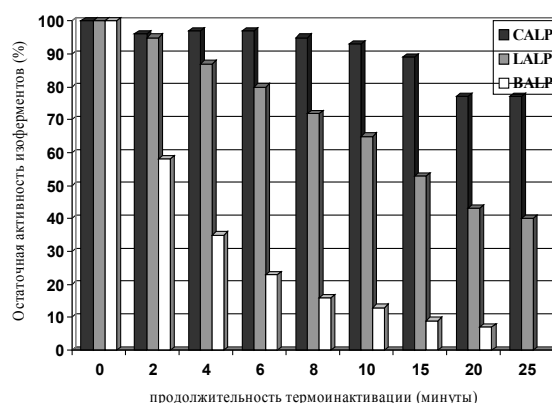


Рис. 9. Процент (%) остаточной активности BALP, LALP и CALP изоферментов в зависимости от продолжительности термической обработки. Температура термоинактивации 56 °C.

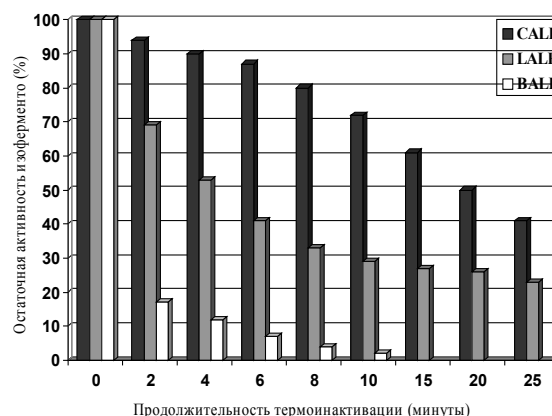


Рис. 10. Процент (%) остаточной активности BALP, LALP и CALP изоферментов в зависимости от продолжительности термической обработки. Температура термоинактивации 60 °C.

В этом случае, при доминировании BALP изофермента, общая ALP активность сыворотки уменьшается на 97-99 %, при доминировании LALP изофермента на 67-75 %, а при преобладании активности CALP изофермента, только на 21-35 %. Данный режим удобен тем, что является наиболее оптимальным по продолжительности проведения процедуры термоинактивации, которое, в то же время, легко контролировать.

Режим термоинактивации продолжительностью 25 минут при температуре 56 °C, так же дает очень выраженную, и с диагностической точки зрения легко интерпретируемую картину остаточной активности BALP, LALP и CALP изоферментов (Рис. 9). Однако, слишком большая продолжительность термической обработки затрудня-

ет использование данного варианта в рутинных клинических исследованиях.

Однако, следует заметить, что режим термической инактивации продолжительностью 25 минут при температуре 56 °С предпочтительнее использовать в том случае, если целью процедуры является полная очистка сыворотки (плазмы) крови собак от активности BALP, но с перспективой дальнейшего изучения каталитической активности LALP или CALP изоферментов. В этом случае процент остаточной активности последних составляет 40 ± 8.96 и 77 ± 3.67 , соответственно (Рис. 9, Табл. 1). В то время как при режиме термической инактивации при температуре 60 °С и продолжительностью 15 минут, когда исчезают даже следы ферментативной активности BALP, остаточная активность LALP составляет 27 ± 6.69 %, а CALP 61 ± 5.51 % (Рис. 10, Табл. 1).

Однако следует заметить, что в клинической диагностике, для постановки или для подтверждения диагноза, крайне редко приходится работать с сыворотками, в которых в определяемых количествах содержатся три и более изоферментов ALP. Более часто имеет место необходимость проводить дифференциальный анализ между активностями BALP и LALP или между LALP и CALP изоферментами. Согласно результатам нашего исследования, используя режим термической обработки продолжительностью 15 минут при температуре 60 °С, можно легко, полуколичественно, определять исходные активности BALP и LALP изоферментов в сыворотке (плазме) крови собак. Для этого необходимо определить общую сывороточную активность ALP до и после термоинактивации. После чего, зная, что общая остаточная активность ALP обусловлена исключительно LALP изоферментом, и составляет 27 % от исходной (Табл. 1, Рис. 10), можно легко вычислить величину активности данной изоформы в нативной сыворотке. Активность BALP изофермента исчисляется путем определения разности между величиной общей сывороточной активности ALP полученной до процедуры термической обработки и величиной исходной активности LALP изофермента вычисленной, как уже сказано выше, со-

гласно коэффициенту термической инактивации.

Режим термической инактивации при температуре 65 °С удобен для обнаружения в сыворотке крови активности CALP изофермента (Рис. 11).

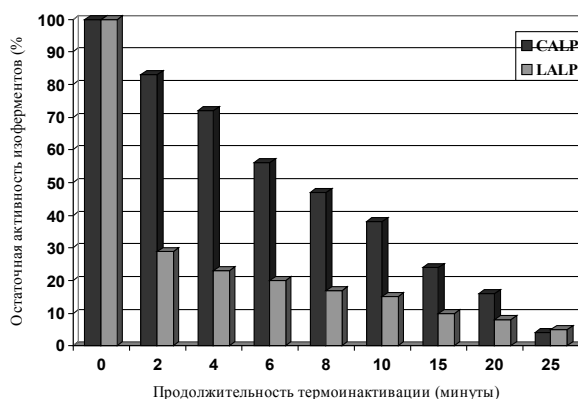


Рис. 11. Процент (%) остаточной активности LALP и CALP изоферментов в зависимости от продолжительности термической обработки. Температура термоинактивации 65 °С.

На графике видно, что активность LALP изофермента резко, более чем на 70 %, уменьшается уже после 2 минутной термической обработки. В то время, как активность CALP изофермента снижается менее, чем на 20%. Таким образом, следует, что если общая активность сывороточной ALP, после термической обработки продолжительностью 2 минуты при температуре 65 °С, останется выше 30 % относительно исходной, можно предполагать, что в сыворотке присутствует CALP изофермент, что в свою очередь является качественным показателем гипердренокортицизма. Однако, как следует из того же графика, при температуре термической обработки 65 °С, невозможно полностью очистить сыворотку крови от активности LALP изофермента, при, хотя бы, частично сохранившейся активности CALP. Так как полная инактивация обеих изоформ фермента происходит при сходных условиях. Из чего следует, что применение данного метода для точного количественного или полуколичественного определения соотношения активностей LALP и CALP изоферментов в нативной сыворотке (плазме) крови собак, не представляется возможным. Однако данное методическое затруднение не является проблемой для клинической диагностики, так как качественное обнаружение активности CALP изофермента в сыворотке крови, уже позво-

ляет поставить диагноз. В то время, как абсолютная величина активности данного изофермента не отражает интенсивность патологического процесса.

Для очистки CALP изофермента от других изоферментов ALP можно воспользоваться режимом термической обработки продолжительностью 10 секунд при температуре 100° С. Как было показано выше, CALP изофермент при кипячении продолжительностью 10 секунд теряет только от 40 % до 60 % активности. В то же время LALP изофермент инактивируется на 90 % и более. Однако метод до конца не отработан и его точность и воспроизводимость не известны. Кроме того, данные полученные в опыте по термоинактивации изоферментов ALP при температуре 65 ° С, наводят на мысль, что LALP изофермент присутствует в сыворотке крови собак в двух формах. Первая, имеет более высокую термочувствительность. Она резко теряет активность при термической обработке в течении 2 минут. Вторая более устойчива к температуре. Ее активность снижается постепенно с увеличением времени термической обработки. И не исчезает полностью даже после 25 минутной инкубации (Табл. 1, Рис. 5, Рис. 11).

Заключение и выводы

Образцы сывороток, полученных от собак с патологиями костной, гепатобилиарной или эндокринной систем, демонстрируют неодинаковую устойчивость фермента щелочная фосфатаза к инактивации его биокаталитической активности методом термической обработки. Графики зависимости остаточной активности сывороточной ALP от температуры и времени термической обработки характерны конкретному патологическому состоянию. Корреляция между характером чувствительности сывороточной ALP к термической обработке и видом патологического процесса обусловлена превалярованием в крови активности одного из изоферментов, который является маркером данного заболевания. Для патологии костной системы характерно доминирование в крови BALP изофермента. Для заболеваний гепатобилиарной системы – LALP изофермента. Для состояния сопровождающего постоян-

ный высокий уровень в крови глюкокортикоидов (гиперадренокортицизм) характерно появление, а в дальнейшем и превалярование CALP изофермента. Исследование, проведенное с целью детального выяснения зависимости чувствительности различных изоферментов ALP сыворотки (плазмы) крови собак к температуре в зависимости от её величины и продолжительности воздействия, показали, что:

1. Термическая обработка, в той или иной степени, подавляет биокаталитическую активность всех исследованных изоферментов ALP сыворотки собак,
2. BALP изофермент проявляет большую термочувствительность, чем LALP изофермент. А LALP изофермент более чувствителен к термоинактивации чем CALP изофермент,
3. BALP изофермент проявляет большую термочувствительность, чем LALP и CALP изоферменты при всех исследованных режимах температурной обработки,
4. BALP изофермент полностью инактивируется в сыворотке (плазме) крови собак при 30 минутном инкубировании при 56 ° С, или при 15 минутном инкубировании при 60 ° С,
5. Разница в термочувствительности между LALP и CALP изоферментами носит сложный характер. При температуре 56 ° С разница в термочувствительности между LALP и CALP изоферментами нарастает с увеличением времени термической обработки. При температуре 60 ° С разница в термочувствительности между LALP и CALP изоферментами нарастает вплоть до 8 минуты термической обработки и далее начинает уменьшаться. При температуре 65 ° С разница в термочувствительности между LALP и CALP изоферментами нарастает только в течении первых 2 минут термической обработки. Далее она начинает уменьшаться. И полностью исчезает к 25 минуте инкубирования,
6. При температуре 65 ° С, продолжительность процедуры термической

обработки для полной инактивации LALP и CALP изоферментов, совпадает.

Практические предложения

1. Режим термической обработки сыворотки (плазмы) крови собак целью которой является дифференцированная инактивация различных изоферментов ALP, должен быть выбран адекватно поставленным целям и задачам исследования.
2. Наиболее удобным, с клинико-диагностической точки зрения, режимом термоинактивации для **качественного** определения изоформы фермента ответственного за увеличение общей ALP активности в сыворотке крови собак, является 60 °С в течении 10 минут (Рис. 10). В том случае, если общая активность ALP сыворотки уменьшается на 97-99 %, следует что, доминирующим является BALP изофермент. При доминировании LALP изофермента, активность снижается на 67-75 %. А при преобладании активности CALP изофермента, активность снижается только на 21-35 %.
3. **Полуколичественное**, определение исходной активностями BALP и LALP изоферментов в сыворотке (плазме) крови собак (в отсутствии CALP изофермента), можно легко определить используя режим термическую обработку продолжительностью 15 минут при температуре 60 °С. Для чего необходимо определить общую сывороточную активность ALP до и после термоинактивации. Методика вычисления описана выше.
4. Для очистки CALP изофермента от других изоферментов ALP можно воспользоваться режимом термической обработки продолжительностью 10 секунд при температуре 100 °С при которой, CALP изофермент теряет только от 40 % до 60 % активности. В то же время LALP изофермент инактивируется на 90 % и более. А активность BALP изофермента подавляется полностью.

Литература

1. Асатиани В.С., Ферментные методы анализа. Москва. Наука. 1969.
2. Бокарев А.В., Стекольников А.А. Активность щелочной фосфатазы и концентрация сиаловых (нейраминовых) кислот в сыворотке крови у собак с некоторыми патологиями костной системы. Актуальные проблемы ветеринарной медицины: сборник научных трудов № 134 – СПбГАВМ. 2002 г. Стр. 31-33.
3. Бокарев А.В., Стекольников А.А., Суворов О.Н. Виды ингибирующего влияния левамизола на ALP, в зависимости от изоферментного состава ее сывороточного пула. Структурно-функциональные особенности биосистем севера (особи, популяции, сообщества). Материалы конференции (26-30 сентября 2005 года, г. Петрозаводск). Часть 1 (А-Л). Петрозаводск. Издательство ПетрГУ. 2005 г. Стр. 50-52.
4. Герке А.Н., Герке В.С., Миролубова С.Ю. Синдром кушинга у щенков породы Лабродор ретривер. Материалы 14 конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины» 14-15 июня. 2001 год. Стр. 59.
5. Елен Миллер. Обоснованное и ошибочное использование глюкокортикоидов в ветеринарной практике. Woltham Focus. Том 9. № 4. 1999 год. Стр. 26-31.
6. Лойда З., Госсрау Р, Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. Москва. «Мир». 1982 г.
7. Майкл Д. Уиллард, Дэвид К. Тведт. Нарушение функции желудочно-кишечного тракта, поджелудочной железы и печени. Лабораторная диагностика в клинике мелких домашних животных. Москва. «Аквариум». 2004 г. стр. 194-235.

8. Меньшиков В.В. и др. Лабораторные методы исследования в клинике. Москва. Медицина. 1987.
9. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Издательство «Медиа Сфера». Москва. 2003 год.
10. Стекольников А.А., Бокарев А.В. Прогностическое значение печеночного изофермента ALP при лечении собак циклофосфаном. Структурно-функциональные особенности биосистем севера (особи, популяции, сообщества). Материалы конференции (26-30 сентября 2005 года, г. Петрозаводск). Часть 2 (М-Я). Петрозаводск. Издательство ПетрГУ. 2005 г. Стр. 152-154.
11. Элиот Д., Досон Р., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика. Москва. «Мир». 1991.
12. Bain PJ: Liver. *In*: Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW: Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology, 4th ed. Ames, Iowa State Press, 2003, pp. 193-214.
13. Farley J. R., Chesnut C. H., Baylink lii, Baylink D. J.. Improved Method for Quantitative Determination in Serum of Alkaline Phosphatase of Skeletal Origin. CLIN. CHEM. 27/12, 2002-2007 (1981)
14. Itoh H, Kakuta T, Genda G, Sakonju I, Takase K.J Canine serum alkaline phosphatase isoenzymes detected by polyacrylamide gel disk electrophoresis. Vet Med Sci. 2002 Jan;64(1):35-9
15. John R. Farley, Susan L. Hall, Daniel Ilacas, Christopher Orcutt, Barbara E. Miller, Craig S. Hill, David J. Baylink1. Quantification of Skeletal Alkaline Phosphatase in Osteoporotic Serum by Wheat Germ Agglutinin Precipitation, Heat Inactivation, and a Two-Site Immunoradiometric Assay. CLINICAL CHEMISTRY, Vol. 40, No. 9, 1994, 1749-1756
16. Leland Raymond J., Heather Tarpley L., Kenneth Latimer S., Perry Bain J. Alkaline Phosphatase Activity as a Clinical Chemistry Diagnostic Aid. Class of 2004 (Raymond) and the Department of Pathology (Tarpley, Latimer), College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, GA 30602-7388.
17. Mahaffey EA, Lago MP. Comparison of techniques for quantifying alkaline phosphatase isoenzymes in canine serum. Vet Clin Pathol. 1991;20(2):51-55
18. Nakagawa H, Umeki K, Yamanaka K, Kida N and Ohtaki S. Macromolecular alkaline phosphatase and an immunoglobulin G that inhibited alkaline phosphatase in a patient's serum. Clinical Chemistry, 1983.Vol 29, pp. 375-378.
19. Okazaki T.; Suzuki M.; Nagai T.. Abnormal alkaline phosphatase isoenzymes detected in the serum of elderly patients. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, October 2004, vol. 64, no. 7, pp. 611-618(8).
20. Teske E, Rothuizen J, de Bruijne JJ, Mol JA. Separation and heat stability of the corticosteroid-induced and hepatic alkaline phosphatase isoenzymes in canine plasma. J Chromatogr. 1986 Nov 21;369(2):349-56.
21. Teske E, Rothuizen J, JJ de Bruijne, and Rijnberk A. Corticosteroid-induced alkaline phosphatase isoenzyme in the diagnosis of canine hypercorticism The Veterinary Record, Vol 125, Issue 1, 12-14. 1989.

STUDY INHIBITIONS ISOENZYMES OF ALKALINE PHOSPHATASE FROM SERUM OF DOGS BY DIFFERENT CONDITIONS OF THERMAL DENATURATION.

Bokarev A.V., Stekolnikov A.A.

In the article the outcomes of research on influence temperature denaturation on activity isoenzymes alkaline phosphatase of dogs are submitted. According to outcomes of research, BALP, LALP and CALP isoenzymes alkaline phosphatase of whey of blood of dogs, exhibit not identical sensitivity to thermal processing. Besides both individual sensitivity particular isoenzym, and distinction in sensitivity between isoenzymes, depend on a mode of thermal processing. I.e. from size and duration of thermal effect. Because of obtained data, the authors offer to use a method thermal inactivation serum ALP for diagnostics of illnesses of dogs, and as offer to apply the given technique as the first stage of separation isoenzymes ALP.

Key words Serum, a dog, an enzyme, isoenzyme, thermal inactivation.

Acronyms and abbreviations.

ALP - Alkaline phosphatase, **TALP** - Total Alkaline phosphatase, **LALP** - Liver Alkaline phosphatase), **BALP** - Bone Alkaline phosphatase, **IALP** - Intestinal Alkaline phosphatase, **PALP** - placental Alkaline phosphatase, **KALP** - kidney Alkaline phosphatase, **CALP** - Corticosteroidinduced Alkaline phosphatase, **WGA** - wheat germ agglutinin.