

УДК:619: 612.128: 577.152.313

РАЗДЕЛЕНИЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ ALP СЫВОРОТКИ КРОВИ СОБАК МЕТОДОМ ЛЕКТИНОПРЕЦИПИТАЦИИ С WGA.

(Тестирование полученных фракций на устойчивость к термоинактивации и ингибированию левамизолом).

А.В. Бокарев¹, А. А. Стекольников¹, С.А. Такшеев²

1. ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной
медицины» (СПГАВМ)

2. Институт биологии Карельского НЦ РАН

Резюме. Представлены результаты разделения изоферментов щелочной фосфатазы сыворотки крови собак, методом преципитации лектином из зародышевой пшеницы (WGA). Показано, что при обработке WGA сывороток крови, полученных от собак с заболеваниями печени: в осадке выявляется ALP чувствительная к ингибированию левамизолом и чувствительная к нагреванию, соответствующая BALP изоферменту. А, в надосадочной фракции выявляется ALP чувствительная к ингибированию левамизолом и слабо чувствительная к нагреванию, которая соответствует LALP изоферменту. Однако разделение не было полным. При обработке WGA сывороток крови, полученных от собак с гипердренокортицизмом, в осадке выявляется ALP с низкой чувствительностью к ингибированию левамизолом и нагреванию. А, в надосадочной фракции выявляется ALP имеющая среднюю чувствительность к нагреванию, но высокую устойчивость к ингибированию левамизолом. Свойства ALP выявляемой в осадке точно соответствовали CALP изоферменту. В то время как, свойства ALP выявляемой в супернатанте только по чувствительности к нагреванию соответствовали LALP изоферменту.

Ключевые слова: Собака, сыворотка крови, ферменты, щелочная фосфатаза, лектины, лектин из зародышевой пшеницы.

Сокращения: 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

Известно, что фермент щелочная фосфатаза (ALP) содержится практически во всех тканях организма млекопитающих. Однако, варианты ALP, имеющие различное тканевое происхождение (изоферменты), хоть и имеют сходную специфичность в отношении субстрата и продуктов его катализа, но отличаются по своей структуре. Поэтому принято говорить о тканеспецифичности ALP. Наиболее значительные структурные различия тканевых ALP обусловлены качественными и количественными различиями в гликозилировании их белковой молекулы благодаря чему они могут быть разделены путем преципитации различными лектинами с последующим центрифугированием (3, 4). Т.е. изоферменты имеющие высокую степень гликозилирования, а значит имеющие значительное количество сайтов связывания с лектином, при смешивании с данным лектином будут образовывать преципитаты, которые после центрифугирования выпадают в осадок. В то время как, те из изоферментов, которые имеют низкую степень гликозилирования (или не имеют ее вовсе), после обработки лектином и центрифугирования не выпадают в осадок и их активность может быть определена в супернатанте. Таким образом, сумма изоферментов ALP сыворотки крови может быть разделена на две группы: с высокой и низкой степенью гликозилирования, т.е. выпадающие и не выпадающие в осадок после смешивания с лектином и последующего центрифугирования.

Из множества лектинов, исследованных в отношении способности к селективному связыванию с определенными изоферментами ALP собак, наиболее эффективным

оказался лектин из зародышей пшеницы (WGA), который способен преципитировать BALP и CALP изоферменты и не преципитирует LALP изофермент (1, 4). Таким образом после WGA-преципитации и центрифугирования активность BALP и CALP выявляется в осадке, а активность LALP остается в супернатанте.

Однако, следует отметить, что часть исследователей, используя метод WGA-преципитации, не получили достаточно чистого разделения основных, диагностически значимых изоферментов ALP. Поэтому они склонны считать, что без введения в методику дополнительных процедур, данный метод нельзя использовать не только как полуколичественный, но и как качественный анализ.

Напротив, результаты как наших собственных исследования, так и экспериментальные данные других исследователей, показали, что данный метод, позволяет с высокой точностью идентифицировать изофермент ALP обусловившей увеличение активности TALP в сыворотки крови пациента, и таким образом выявить органный источник патологического процесса (1). Однако остается невыясненным вопрос, на сколько чисто метод лектинопреципитации с WGA способен разделить два тканеспецифичных изофермента? Т.е. можно ли величину активности выделенных фракций использовать для количественного (или полуколичественного) мониторинга патологического процесса? И можно ли метод лектинопреципитации с WGA использовать для предварительной очистки изоферментов ALP с целью их дальнейшего изучения? Следует отметить, что преципитируемые и неприципитируемые изоферменты ALP, в разной степени чувствительны к термоинактивации и ингибированию левамизолом (**Табл.1**). Эти различия их свойств можно использовать для определения чистоты изоферментов ALP разделенных методом лектинопреципитации.

ТАБЛИЦА №1. Свойства изоферментов ALP сыворотки крови собак (2)

ИЗОФЕРМЕНТ	ТЕРМОИНАКТИВАЦИЯ (2 мин. при 60 °С) Остаточная активность в %	ИНГИБИРОВАНИЕ ЛЕВАМИЗОЛОМ (10 ⁻⁴ М) Остаточная активность в %	ПРЕЦИПИТАЦИЯ ЛЕКТИНОМ ЗАРОДЫША ПШЕНИЦЫ (1мг/мл)
BALP	18	28	+
CALP	95	85	
LALP	70	27	-

Цель исследования

1. Определить зависимость между термочувствительность TALP сыворотки крови собак и количественным соотношением изоферментов ALP фракционированных методом лектинопреципитации с WGA.
2. Используя термоинактивацию и ингибирование левамизолом, выяснить чистоту фракционирования изоферментов ALP сыворотки крови собак методом WGA-преципитации.
3. Проверить влияние разведения образцов сыворотки и влияние концентрации WGA на эффективность фракционирования изоферментов ALP методом WGA-преципитации.

Материалы и методы исследования

1. Объект исследования – образцы сыворотки или плазмы крови с активностью TALP превышающий физиологический референт, взятые от собак имеющих в анамнезе гепатоцеллюлярную патологию, или патологию обмена глюкокортикостероидов (гиперадренкортицизм).
2. Активности щелочной фосфатазы в биологических жидкостях определяли кинетическим методом с п-Нитрофенилфосфатом.

3. Для разделения изоферментов ALP методом преципитации использовали лектин из зародышей пшеницы (*Triticum vulgaris agglutinin (WGA)*) выпускаемый фирмой «SIGMA» и лабораторией "LECTINOTEST".
4. Процедуру разделения проводили следующим образом: исследуемую сыворотку и рабочий раствор WGA на 0.15 М растворе хлорида натрия, смешивали в равных объемах (по 50 мкл.) в пробирках «Эппендорф». Выдерживали при комнатной температуре 15 – 20 минут. После чего центрифугировали 15 минут при скорости 6000 об/мин. в угловом роторе на центрифуге ОПН – 8. После окончания процедуры центрифугирования надосадочную жидкость аккуратно переносили в чистую пробирку, а осадок ресуспендировали в 50 мкл. 0.15 М раствора хлорида натрия для восстановления исходного объема.
5. При определении активности ALP надосадочной фракции, учитывая, что в процессе разделения сыворотка смешивалась с раствором WGA из расчета 1/1, конечный результат умножали в 2 раза. При определении активности ALP осадка, полученный результат являлся окончательным, так как осадок ресуспендировался в растворителе количественно эквивалентном исходному объему сыворотки.
6. Термоинактивацию ALP сыворотки крови или фракций проводили в течение двух минут при $t - 60^{\circ} \text{C}$.
7. Для проверки чувствительности фракций ALP к левамизолу использовали левамизолгидрохлорид фирмы «SIGMA». Концентрация рабочего раствора левамизола (на 0,15 М хлориде натрия) составляет $2,0 \times 10^{-2}$ М. Соотношение инкубационная смесь/плазма/левамизол составляет – 1000/20/5 соответственно. Конечная концентрация левамизола в смеси составила 10^{-4} М.
8. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы «Hrimer Biostatistics» версия 4,03.
9. Построение графиков проводили с использованием программы «Microsoft Graph» (11.5510.5606).

Результаты исследования

Корреляция между термоустойчивостью TALP сыворотки крови собак и величиной ALP-активностей надосадочной и осадочной фракцией выделенных из сыворотки методом лектинопреципитации с WGA. В одних и тех же сыворотках определяли активностью TALP до и после термоинактивации, а так же активность ALP надосадочной фракции и активность ALP в осадке после разделения методом WGA-преципитации. После проведения анализа рассчитывали остаточную активность TALP после термоинактивации (в%) и соответствующее той же сывороточной пробе, отношение активности ALP в надосадочной пробе к активности ALP в осадке.

Анализ полученных результатов показал наличие прямой корреляции между остаточной активностью TALP сыворотки крови после термоинактивации и величиной отражающей отношение ALP активности супернатанта к ALP активности осадка после процедуры WGA-преципитации. Т.е. термоустойчивость TALP образца сыворотки тем выше, чем выше ALP активность супернатанта по отношению к активности осадка (**Рис. 1**).

Термочувствительность ALP-активностей надосадочной и осадочной фракцией после обработки методом WGA-преципитации сывороток крови собак с патологией печени. Образцы сывороток крови с умеренно повышенной TALP (до 1000 U/L), взятые у собак страдающих безжелтушными формами гепатопатологии, фракционировали методом WGA преципитации. После разделения, дважды, т.е. до и после термической обработки определяли ALP-активность осадка и ALP-активность супернатанта. Как показали результаты эксперимента, ALP образующая преципитат с WGA и выпадающая в осадок и ALP остающаяся в супернатанте, имеют различную чувствительность к

термоинактивации. Так остаточная активность надосадочной фракции ALP составляет $42,00 \pm 6,91$ %, а остаточная активность ALP осадка составляет $27,33 \pm 3,964$ % (**Рис. 2**).

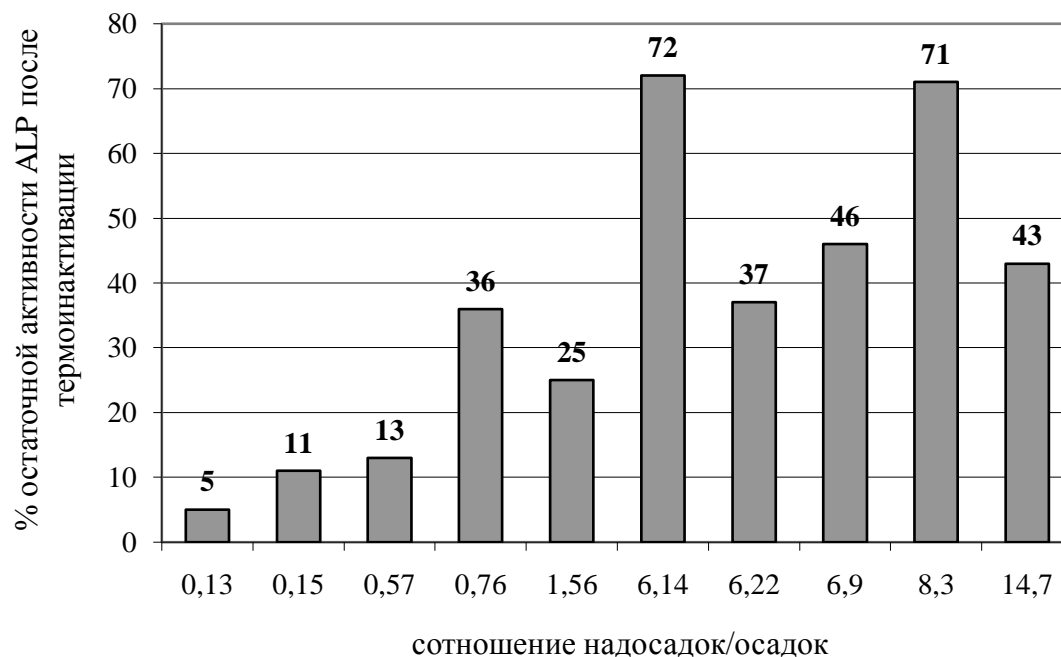


Рис. 1. Корреляция между остаточной активностью сывороточной TALP после термоинактивации ($t - 60^{\circ}\text{C}$ в течении 2 минут) и величиной отношения активности надосадочной фракции к активности осадка после фракционирования методом WGA-лектинопреципитации. $n = 10$, $r = 0,65$, $P = 0,041$

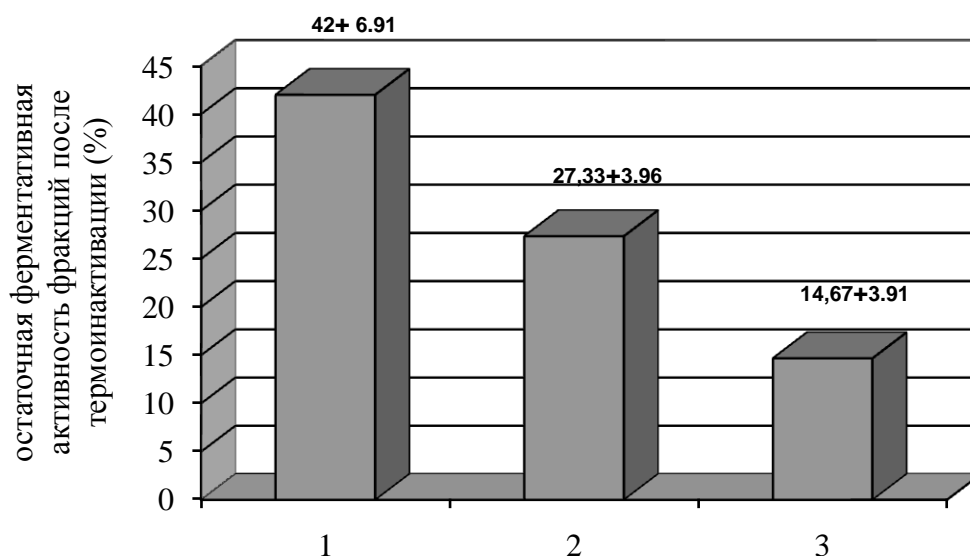


Рис. 2 Остаточная активность (в %) надосадочной фракции ALP (столбец № 1) и осадка (стлбец № 2) разделенных методом лектинопреципитации с WGA, с последующей термоинактивацией при $t-60^{\circ}\text{C}$ в течении 2 минут. Столбец № 3 демонстрирует различие в остаточной ферментативной активности надосадочной фракции и осадка. $n=6$, Критерий достоверности различия t (по Стьеденту) между №1 и №2 = 1,84 при $p=0,095$.

Достоверность различия t (по Стьюденту) между термоустойчивостью ALP супернатанта и осадка = 1,84. При доверительном интервале 95% данную величину критерия

достоверности различия можно считать достаточной, что бы считать, что в процессе фракционирования сыворотки крови собак методом лектинопреципитации с WGA в осадке и супернатанте аккумулируются различные изоферменты ALP.

Термочувствительность и левамизолочувствительность ALP-активностей надосадочной и осадочной фракций после обработки методом WGA-преципитации сывороток крови собак больных гипердренокортицизмом. В исследовании использовали образцы сывороток крови собак больных гипердренокортицизмом. Сыворотку фракционировали методом WGA-преципитации и после чего определяли исходную активность ALP в супернатанте и в осадке. На следующем этапе активность ALP в супернатанте и в осадке определяли еще дважды, но в одном случае после термической обработки, а в другом, в присутствии левамизола. На графике показано, что фракция фермента, которая аккумулировалась в осадке, имела более высокую устойчивость как к термоинактивации (остаточная активность $83.50 \pm 1.94 \%$), так и к ингибированию левамизолом (остаточная активность $91.50 \pm 0.87 \%$) чем фермент, чья активность осталась в супернатанте ($58,00 \pm 2.89 \%$ и $63.75 \pm 6.63 \%$ соответственно) (**Рис. 3**). Поэтому, полученные данные, так же, демонстрируют высокую эффективность разделения изоферментов ALP сыворотки крови собак методом WGA-преципитации.

Влияние разведения сыворотки на соотношение ALP- активностей в надосадочной и осадочной фракций после разделения методом WGA-преципитации. В исследовании использовали сыворотки с высокой активностью TALP полученные от животных с патологией печени.

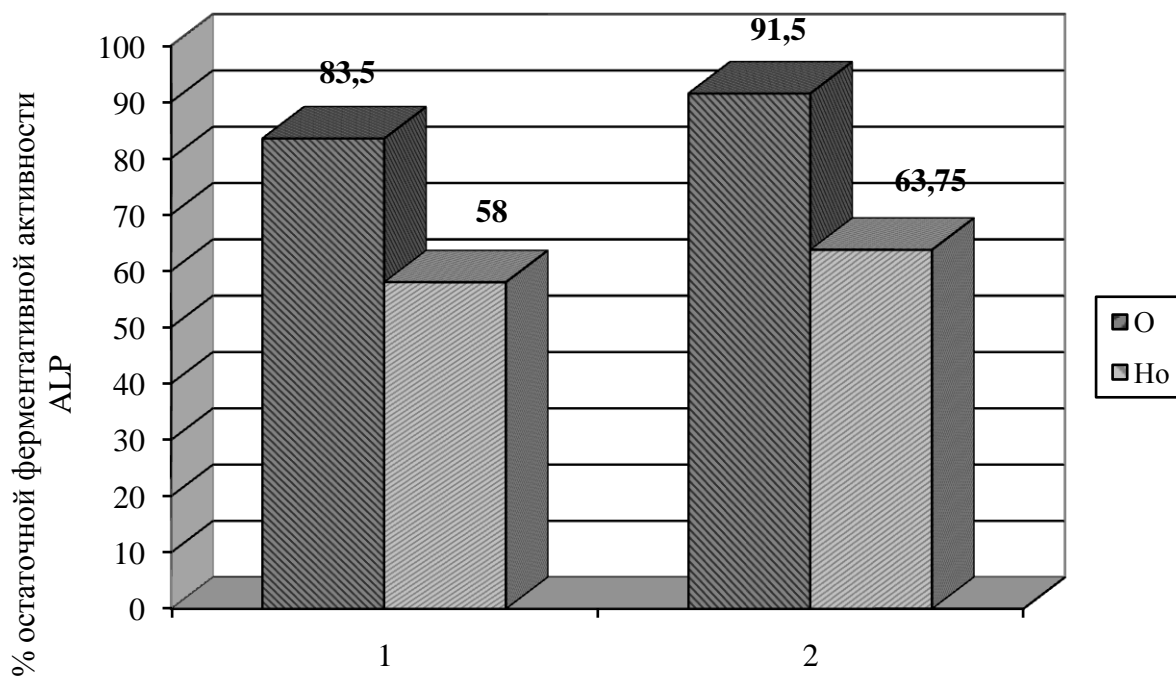


Рис.3 Устойчивость к термоинактивации (1) и ингибированию левамизолом (2) надосадочной (Ho) и осадочной (O) фракций ALP, выделенных методом WGA-преципитации из сыворотки собак с гипердренокортицизмом. (Режим термоинактивации – 60°C – 2 минуты., ингибирующая доза левамизола 10^{-4}M). Достоверность различия (t) к термоинактивации между надосадочной фракцией и осадком = 7,34 при $P= 0,00$. Достоверность различия (t) к ингибированию левамизолом между надосадочной фракцией и осадком = 4,15 при $P= 0,006$. $n=8$

Готовили растворы сывороток различной степени разведения, после чего их фракционировали методом WGA-преципитации. После фракционирования измеряли ALP-активность надосадочных фракций и ALP-активность осадка относительно к определенной степени разведения.

Согласно результатам исследования, разведение сыворотки крови влияет на распределение активностей ALP между супернатантом и осадком. Графически это выражается в том, что величина, отражающая отношение ALP-активности супернатанта к ALP-активности осадка постепенно убывает с увеличением коэффициента разбавления сыворотки (**Рис. 4**). Т.е. с увеличением степени разведения сыворотки, активность надосадочной фракции ALP убывает быстрее, чем ALP-активность осадка. Из чего следует, что при более высоких степенях разбавления, в осадок уходит некоторая часть ALP активности, которая при разбавлении более низкого порядка обнаруживается в супернатанте.

Сравнительная термочувствительность надосадочной и осадочной фракций ALP выделенных методом WGA-преципитации из сыворотки крови различной степени разведения. В исследовании использовали сыворотку с высокой активностью TALP (6010 U/L) полученную от животного с патологией печени. Из сыворотки готовили растворы различной степени разведения, и фракционировали их методом WGA-преципитации. После фракционирования измеряли ALP-активность надосадочных фракций и ALP-активность осадка, до и после термической обработки. Вычисляли % остаточной ферментативной активности супернатанта и осадка относительно с определенной степенью разведения. Согласно результатам исследования, с увеличением степени разведения сыворотки, возрастала устойчивость к инактивации нагреванием той фракции ALP, которая выявлялась в осадке. И, одновременно, уменьшалась устойчивость к температурной инактивации фракции ALP выявляемой в супернатанте (**Рис. 5**).

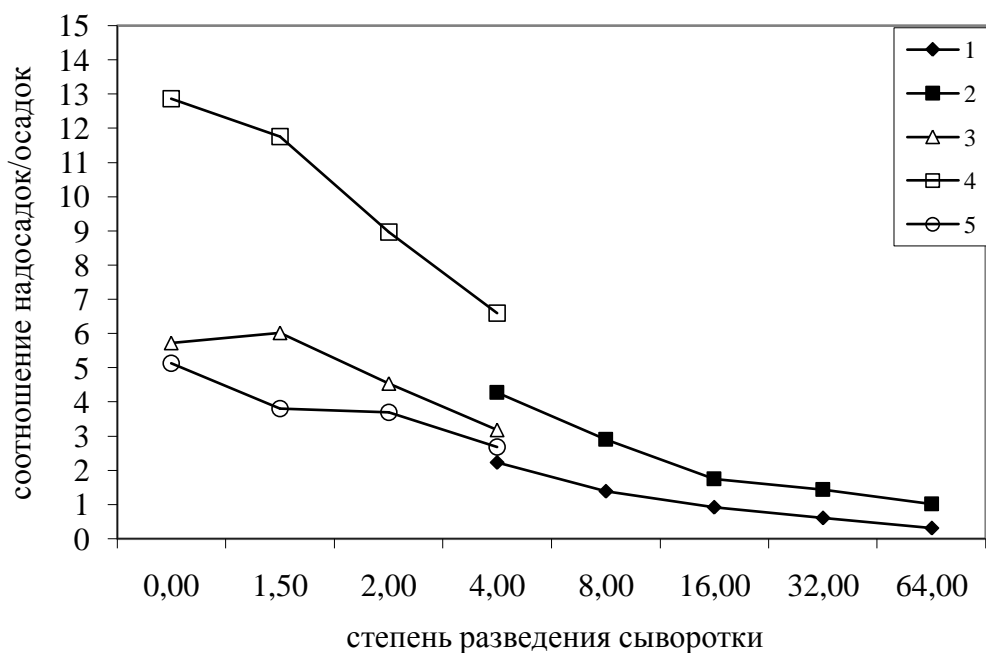


Рис.4. Динамика изменения соотношения активности ALP надосадок/осадок после преципитации ЛЗП в зависимости от степени разведения сыворотки. № 1 и № 2 - сыворотки с активностью TALP более 6000 U/L. № 3, № 4 и № 5- сыворотки с активностью TALP не более 1000 U/L.

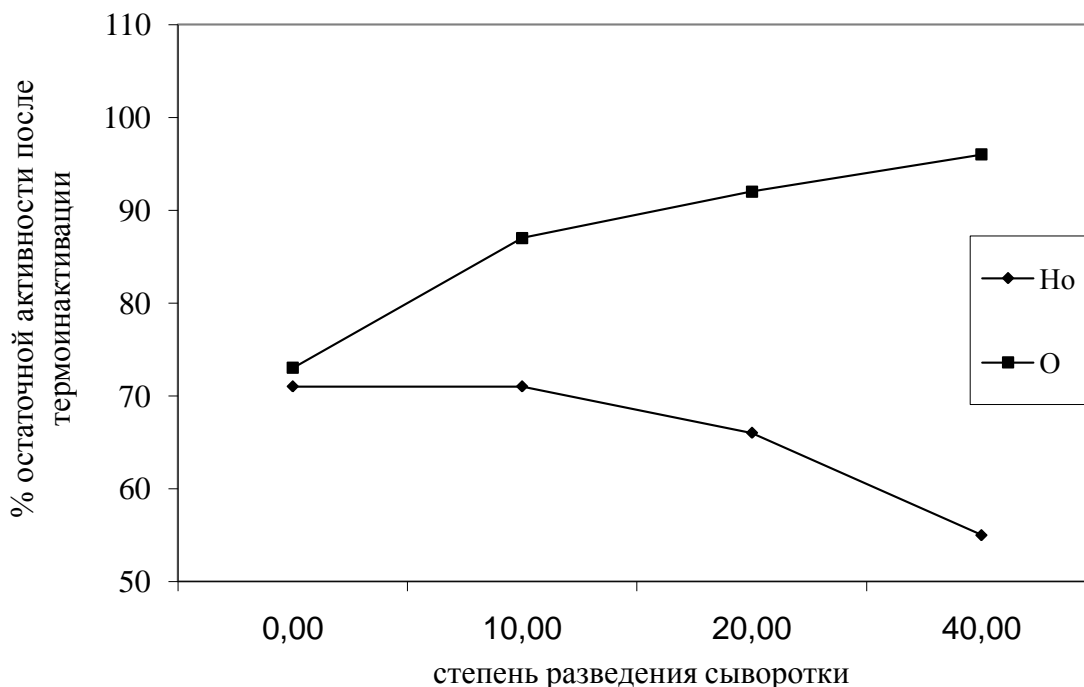


Рис. 5. Динамика изменения термоустойчивости ALP в надосадочной фракции и в осадке после WGA-преципитации, в зависимости от степени разведения сыворотки. Исследована сыворотка собаки с тяжелым поражением печени (TALP = 6010 U/L). Режим термоинактивации $t = 60^{\circ}\text{C}$ в течении 2 минут. Ho – ALP-активность надосадка. O – ALP-активность осадка.

Таким образом, если при фракционировании неразведенной сыворотки устойчивость к термоинактивации ALP выявляемой в осадке и ALP выявляемой в супернатанте, были, примерно, равны – 73% и 71% остаточной активности, соответственно, то при разведении сыворотки в 40 раз, устойчивость к термоинактивации ALP выявляемой в осадке возросла до 96% исходной активности, а устойчивость к термоинактивации ALP выявляемой в супернатанте снижается до 55%.

Сравнительная термочувствительность осадочных фракций ALP выделенных различными концентрациями WGA. В исследовании использовали сыворотку с высокой активностью TALP (6010 U/L) полученную от животного с патологией печени. Неразведенную сыворотку фракционировали методом WGA-преципитации используя различные концентрации лектина. После фракционирования измеряли активность ALP в осадке, до и после термической обработки. Высчитывали % остаточной ферментативной активности ALP осадка после инактивации нагреванием, относительно определенной концентрацией WGA используемой для разделения. Исследования показали, что абсолютные величины общей и термоустойчивой ALP-активности осадка стабильно повышаются с увеличением концентрации WGA (**Рис.6**). Но динамика изменения чувствительности фермента к термической обработке не имеет строгой закономерности. Из результатов исследования видно, что при увеличении концентрации WGA устойчивость к температуре осадочной фракции фермента сначала понижается, затем повышается и, снова понижается (**Таблица № 2**).

Обсуждение полученных результатов

При неспецифической клинической картине заболевания сопровождающейся повышением активности TALP в сыворотке крови, с диагностической точки зрения, целесообразно выяснение тканевого источника ALP за счет которой произошло её общее повышение.

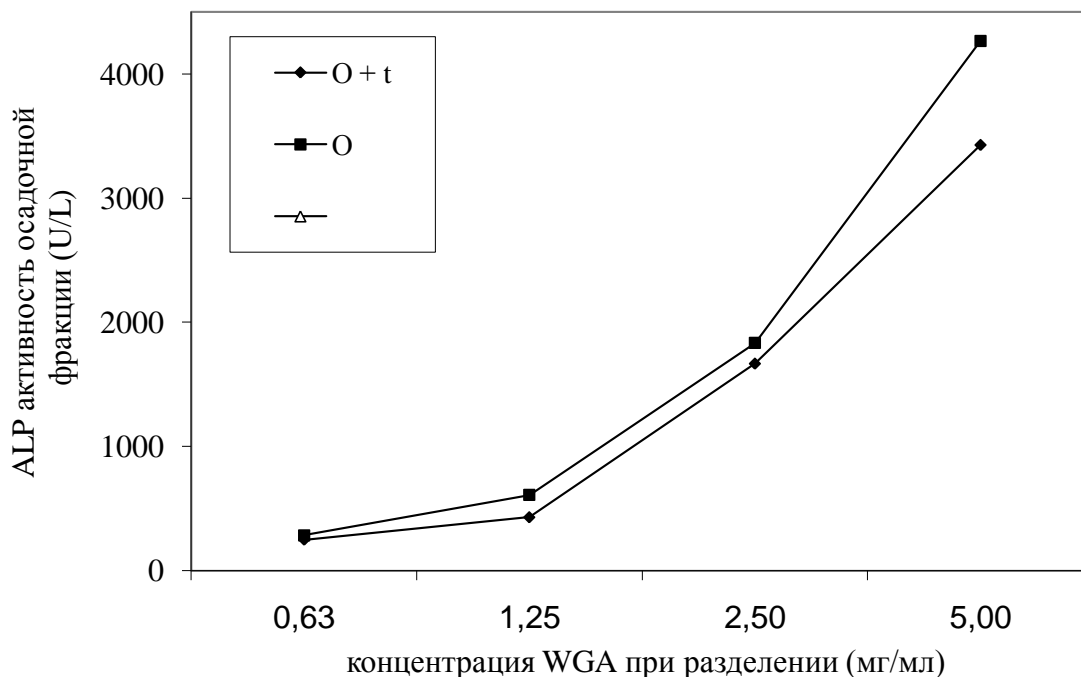


Рис. 6. Динамика изменения общей и термоустойчивой ALP-активности в осадке после WGA-преципитации, в зависимости от концентрации WGA. Исследована сыворотка собаки с тяжелым поражением печени (TALP = 6010 U/L. Режим термоинактивации $t = 60^{\circ}\text{C}$ в течении 2 минут. (O) – нативная ALP-активность осадка. (O + t) – ALP-активность осадка после термоинактивации.

ТАБЛИЦА № 2. Термочувствительность осадочных фракций ALP выделенных различными концентрациями WGA.

	Концентрация WGA при разделении (мг/мл)			
	0,625	1,25	2,5	5,0
Остаточная активность ALP осадка после термической обработки (в %)	87,32	70,61	91,0	80,38

Не смотря на то, что современная биохимия располагает данными о существовании более чем 10 сывороточных изоформ ALP, в повседневной диагностической практике существует необходимость, дифференцировать относительную активность BALP от LALP изофермента или LALP от CALP изофермента.

Современные данные о свойствах LALP и BALP изоферментов свидетельствуют о том, что LALP изофермент не вступает в реакцию преципитации с WGA и обладает высокой устойчивостью к термоинактивации. В то же время, BALP изофермент, напротив, преципитируется WGA и обладает низкой устойчивостью к термоинактивации (Таблица 1). Из выше сказанного следует, что если процедура WGA-преципитации адекватно разделяет LALP изофермент в надосадочную фракцию, а BALP изофермент в осадок, то между величиной термоустойчивости TALP сыворотки крови и величиной отношения ALP-активности надосадка к величине ALP-активности осадка, должна существовать прямая корреляция. Проведенные исследования показали, что *зависимость между термоустойчивостью TALP сыворотки крови и величиной отношения ALP активности супернатанта к ALP активности осадка, действительно существует (Рис. 1)*. Данная зависимость демонстрирует прямую корреляцию средней силы ($r = 0,65$).

Т.е. термоустойчивость TALP образца сыворотки тем выше, чем выше ALP активность супернатанта по отношению к активности осадка. Отсутствие между данными величинами сильной корреляционной связи ($r = 0,7$ и более) обусловлено (как это видно из графика) наличием таких сывороточных образцов в которых термоустойчивость TALP оказалась более высокой, чем можно было предположить исходя из соотношения ALP-активностей их надосадочной и осадочной фракций. Гипотетически, можно предположить, что повышенная термоустойчивость данных образцов может быть обусловлена тем, что фракция LALP изофермента неоднородна. Косвенным подтверждением данного предположения является то, что LALP человека состоит из двух самостоятельных изоферментов: паренхиматозной, обладающей умеренной термоустойчивостью и LALP желчи устойчивость к температуре которой значительно выше.

Как показали результаты следующего эксперимента, проведенного с использованием тех же сывороточных образцов, ALP, которая выпадает в осадок в следствии образования преципитата с WGA и ALP остающаяся в супернатанте, имеют различную чувствительность к термоинактивации (**Рис.2**). Так остаточная активность надосадочной фракции ALP составляет $42,00 \pm 6,91 \%$, а остаточная активность ALP осадка составляет $27,33 \pm 3,96 \%$. Достоверность различия данных величин $t = 1,84$, что считается достаточным при доверительном интервале 95%. Из чего следует вывод, что после обработки сыворотки крови собак методом WGA-преципитации в осадке и супернатанте аккумулируются различные изоферменты ALP. Однако следует заметить, что термоустойчивость надосадочной фракции ALP оказалась ниже установленной нами ранее термоустойчивости LALP собак, остаточная активность которой, после нагревания при $60^{\circ}C$ в течении 2 минут, составляет $69 \pm 3,61\%$ от исходной. И, в то же время, термоустойчивость ALP осадка выше термоустойчивости BALP, чья остаточная активность при тех же условиях термоинактивации должна составлять $17 \pm 6,81 \%$ (2, 4, 5).

Из вышесказанного следует, что метод WGA преципитации не обеспечивает полного разделения LALP и BALP изоферментов и в осадок выпадает некоторое количество LALP изофермента, в следствии чего термоустойчивость осадочной фракции оказывается выше, чем установленная для BALP изофермента. А в супернатанте кроме LALP изофермента, остается некоторое количество BALP, в следствии чего общая термоустойчивость супернатанта оказывается ниже, чем термоустойчивость установленная для чистой печеночной ALP. В качестве объяснения такого неполного разделения можно высказать предположение, что как среди LALP изофермента, так и среди BALP изофермента имеются молекулы с разной степенью гликозилирования. Т.е. среди молекул LALP изофермента встречаются такие у которых гликозилирование белковых молекул выражено в большей степени. И именно эти молекулы выпадают в осадок с общей массой BALP изофермента. Но в то же время, среди молекул BALP изофермента встречаются такие у которых гликозилирование белковых молекул выражено в меньшей степени. И именно эти молекулы остаются в супернатанте с общей массой LALP изофермента. И если данное предположение верно, то тогда, закономерно, следует вывод, что **термоустойчивость молекулы ALP не связана с её гликозилированием.**

Предположение о том, что в сыворотке крови собак с патологией печени могут одновременно присутствовать молекулы LALP с различной степенью гликозилирования, косвенно, подтверждается тем, что разведение сыворотки влияет на соотношение надосадочной и осадочной активностей ALP, фракционированных методом WGA-преципитации. Графически это выражается тем, что величина, отражающая отношение ALP-активности супернатанта к ALP-активности осадка постепенно убывает соотносительно с увеличением коэффициента разбавления сыворотки (**Рис. 4**). Т.е. с увеличением коэффициента разведения, активность надосадочной фракции ALP убывает

быстрее, чем ALP-активность осадка. Из чего следует, что *при более высоких степенях разбавления, в осадок уходит та часть ALP активности, которая при разбавлении более низкого порядка обнаруживается в супернатанте*. Причем, как видно из другого графика, с увеличением разведения сыворотки, в осадок постепенно выпадает изофермент, обладающий более высокой термоустойчивостью, вследствие чего термоустойчивость надосадочной фракции понижается (**Рис.5**). Таким образом, с увеличением коэффициента разбавления, TALP исследуемой сыворотки, (имеющая исходную термоустойчивость 73%) разделяется на две фракции: с более высокой (остаточная активность 96 %) и более низкой (остаточная активность 55 %) устойчивостью к термоинактивации, первая из которых, постепенно, выпадает в осадок, а вторая остается в супернатанте. Учитывая, что обе ферментные фракции были высоко чувствительны к ингибированию левамизолом их следует отнести к LALP изоферменту. Причем изоферментную фракцию осадка, как более устойчивую к термоинактивации, повидимому, следует отнести к желчному варианту LALP. А фракцию супернатанта, как менее устойчивую к термоинактивации - к паренхиматозному.

Можно было бы предположить, что эффективность разделения LALP изофермента на более термоустойчивый и менее термоустойчивый как то связана с количественным соотношением WGA и ALP. Т.е. при увеличении кратности разведения сыворотки, но при неизменной концентрации раствора WGA, относительное соотношение WGA к ALP возрастает. Но в таком случае аналогичная зависимость разделения LALP должна сохраняться и при таких условиях эксперимента, когда кратность разведения сыворотки будет неизменна, а повышаться будет концентрации раствора WGA. Однако как следует из результатов исследования, в последнем случае данная особенность разделения сохраняется только частично. Т.е. с повышением концентрации WGA и, соответственно, увеличении соотношения WGA/ALP, активность ALP в супернатанте падает, а в осадке возрастает (**Рис. 6**). Однако, не смотря на то, что в осадке, по мере увеличения концентрации WGA, возрастает активность как общей, так и термоустойчивой ALP, линейного возрастания термоустойчивости этой фракции не происходит. Т.е. она (термоустойчивость) варьирует, хоть и в пределах достаточно высоких значений (**Таблица №2**). Однако на данном этапе исследований объяснить этот артефакт не представляется возможным. В то же время результаты представленных исследований однозначно свидетельствуют о том, что *при тяжелых поражениях печени в сыворотке крови собак может присутствовать два варианта левамизол чувствительной ALP идентифицированная как LALP. Первая, высокотермоустойчивая (остаточная активность 96 %) и преципитируемая при относительно высоких концентрациях WGA. И вторая, имеющая среднюю устойчивость к нагреванию (остаточная активность 55 %) и непреципитируемая при относительно высоких концентрациях WGA*. Если в последующих исследованиях подтвердится то, что эти два варианта левамизол чувствительной термоустойчивой ALP, представляют желчную и паренхиматозную LALP, соответственно, то простой тест на термостабильность TALP сыворотки крови собак с симптомами гепатопатии может быть использован для дифференциальной диагностики поражения паренхимы и билиарной системы печени. В то же время, на основании полученных данных, можно утверждать, что *для разделения методом лектинопреципитации изоферментов ALP, близких в отношении способности связываться с WGA, необходимо использовать растворы сывороток различной степени разведения*.

Результаты эксперимента по разделению и последующему тестированию ALP из сыворотки крови собак с диагностированным гипердренокортицизмом демонстрируют сильное различие между свойствами тех изоферментов, которые выпадают в осадок в виде преципитата с WGA, и тех, которые остаются растворенными в супернатанте (**Рис. 3**). Как известно, повышение в крови собак концентрации глюкокортикоидов индуцирует резкое и

быстрое увеличение активности сывороточной LALP, а через некоторое время появление CALP. Эти два изофермента ALP отличаются, по крайней мере, по трем позициям. Изофермент CALP преципитируется WGA и его активность слабо подавляется нагреванием и незначительно ингибируется в присутствии левамизола. В то время как LALP изофермент не преципитируется WGA, высоко чувствителен к ингибированию левамизолом и имеет более низкую устойчивость к термоинактивации. Проведенное исследование выявило высокую достоверность различия по Стьюденту (t) в устойчивости к термоинактивации и ингибированию левамизолом между надосадочной фракцией и осадком, которая составляет 7,34 и 4,15 соответственно (**Рис. 3**). Очевидно, что такие свойства осадочной фракции ALP как: преципитация с WGA, высокая термоустойчивость, высокая устойчивость к левамизолу, позволяют идентифицировать ее как CALP изофермент. Как видно из результатов исследования, фракция ALP аккумулярованная в осадке после выделенная методом WGA-преципитации, имеет устойчивость к ингибированию левамизолом даже выше чем TALP сыворотки взятой от собак с поздней стадией гипердренокортицизма при которой суммарная ALP-активность очень высокая и практически полностью обусловлена CALP изоферментом (**Таблица № 3**).

Однако, обращает на себя внимание то, что надосадочная фракция ALP, которую следует идентифицировать, как LALP имеет устойчивость к левамизолу значительно выше, чем LALP выделенная из сывороток крови пациентов с поражением печени. Если предположить, что повышенная левамизолустойчивость надосадочной фракции ALP обусловлена ее кантаминацией CALP изоферментом, то закономерно, что и устойчивость к термоинактивации данной фракции должна быть выше, чем у LALP изофермента.

ТАБЛИЦА №3. Характеристика свойств надосадочной (НО) и осадочной (О) фракций ALP, выделенных методом WGA-преципитации из сывороток крови собак больных гипердренокортицизмом

Изоферменты ALP	Остаточная активность изофермента при концентрации левамизола в инкубационной культуре 10×10^{-5} М			Остаточная активность изофермента при термоинактивации в течении 2 минуты при 60°C		
	До разделения *	После разделения		До разделения *	После разделения	
		НО	О		НО	О
CALP (M±m)	84,70±6,58	63.75 ± 6.63	91.50 ± 0.87	94±4.06	58,00 ± 2.89	83.50 ± 1.94
LALP (M±m)	26,95±4,20**			69±3.61**		

Тем не менее, из данных таблицы, видно, что термоустойчивость надосадочной фракции ALP близка, и даже несколько ниже, термоустойчивости ALP сывороток крови собак с тяжелым поражением печени. Из известных на сегодня изоферментов ALP сыворотки крови собак ни один не обладает суммой таких свойств как: неспособность преципитироваться WGA, средняя термоустойчивость и высокая устойчивость к ингибированию левамизолом. Поэтому следует предположить, что *изофермент, выделенный в супернатанте является LALP изоферментом который вследствие посттрансляционной модификации индуцированной гипердренокортицизмом приобрел повышенную устойчивость к ингибированию левамизолом.* Это предположение более чем вероятно, так как до сих пор не исследованы ни причина, ни механизмы постепенной замены в сыворотке крови собак больных гипердренокортицизмом LALP изофермента на CALP изофермент. Однако, учитывая, что при длительной персистенции в организме высоких концентраций глюкокортикоидных гормонов имеет место значительное изменение и белкового, и жирового, и углеводного обменов, гипотеза о том, что CALP изофермент является

модифицированным вариантом LALP изофермента кажется более убедительной чем то, что повышенная концентрация глюкокортикоидов в сыворотке крови запускает специальный ген CALP изофермента. Учитывая, что гипердренокортицизм часто сопровождается повышением уровня глюкозы в крови, можно предположить, что изменение свойств LALP изофермента обусловлено неферментным гликозелированием его молекулы как это происходит со многими белками у больных сахарным диабетом. Косвенным подтверждением данного предположения является то, что в сыворотке крови собак больных диабетом так же может выявляться CALP изофермент.

Литература

1. Бокарев А.В., Стекольников А.А., Бокарева Е.В. ALP-изоферментная диагностика и дифференциальная диагностика заболеваний костной и гепатобилиарной систем собак методом WGA – преципитации. Исследование чувствительности и специфичности метода. Ветеринарная патология. № 2 (21) 2007 Стр. 69 – 77.
2. Бокарев А. В., Стекольников А. А. Исследование ингибирования изоферментов щелочной фосфатазы сыворотки крови собак при разных режимах тепловой денатурации. Актуальные вопросы ветеринарной биологии № 1 (5), 2010., стр. 8 – 18.
3. Игнатов В.В. Углеводузнающие белки – лектины. Соросовский образовательный журнал. Биология. № 2, 1997 г, стр. 14-20.
4. Calderon de la Barca AM. Jensen AL. Bog-Hansen TC. Affinity methods with lectins: a tool to identify canine alkaline phosphatase isoenzymes. Journal of Biochemical & Biophysical Methods. 27(3):169-80, 1993 Oct.

DIVISION OF ISOENZYMES OF THE ALKALINE PHOSPHATASE OF WHEY OF BLOOD OF DOGS BY THE METHOD OF THE PRECIPITATION WITH THE WGA.

(Testing of obtained fractions for resistance to warming and inhibition by a levamisole).

A.V. Bokarev¹, A.A. Stekolnicov¹, S.A. Taksheev².

1. Chair the common and a specialty surgery of the St.-Petersburg academy of veterinary medicine.
2. Institute of biology of the Karelian Centre of science of the Russian Academy of sciences

Resume. *In paper a findings of investigation on division of isoenzymes of an alkaline phosphatase of whey of blood of dogs by a method of a precipitation by an agglutinin from germs of wheat presented. Researches have shown, that at machining by WGA of wheys of the blood obtained from dogs with diseases of a liver: in a upsetting the ALP responsive to inhibition by the Levamisole and heat-sensitive is taped, and in the Supernatant fraction the ALP responsive to inhibition by the Levamisole and weakly heat-sensitive is taped. Properties of the ALP detected in the Supernatant, to the greatest degree conformed to LALP isoenzyme, and properties of the ALP detected in a upsetting to the greatest degree conformed to BALP isoenzyme. However, division was not complete. At machining by WGA of wheys of the blood obtained from dogs with gyperadrenokortitsizm, in a upsetting it is taped ALP with low responsive to inhibition by the Levamisole and with low sensitivity to inhibition by warming. And, in the supernatant the ALP having medium sensitivity to warming, but tall resistance to inhibition by the Levamisole is taped. Properties of the ALP detected in a upsetting precisely conformed to CALP isoenzyme. While, properties of the ALP detected in the supernatant conformed to LALP isoenzyme, only, on sensitivity to warming.*

Keywords: *Dog, blood whey, enzymes, alkaline phosphatase, agglutinins, agglutinin from wheat germs.*

Reductions: *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.