

УДК 612.603:577.15

М. Г. Касаткина

АКТИВНОСТЬ И ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СПЕКТР ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ

Щелочная фосфатаза сыворотки крови происходит из различных органов [11, 15]. У здоровых крыс фермент сыворотки в основном кишечного происхождения [8, 12] и в небольшом количестве — костно-печеночного. Поражение печени сопровождается изменением общей активности и изоферментного спектра в сыворотке крови [7, 13].

Частичная экстирпация печени с одной стороны приводит к повреждению печеночных клеток [18], с другой — к резкой активации пролиферативных процессов [3, 4], что сопровождается значительными ферментативными сдвигами в печени животных [2], в частности, значительным усилением активности ЩФ [9, 14], вследствие повышения активности фосфатазы, локализуемой в плазматических мембранах [17].

Однако, среди литературных данных, в которых отмечается изменение общей активности ЩФ в сыворотке крови при регенерации печени нет сведений о том, какое влияние оказывает частичная гепатэктомия на изоферментный спектр ЩФ, являющийся более тонким индикатором нарушения метаболических сдвигов в ходе патологического процесса, и как он изменяется в ходе восстановительных процессов.

Мы изучали изоферментный спектр ЩФ сыворотки крови крыс при частичной экстирпации здоровой и пораженной печени.

Методика исследований

Эксперименты проведены на 40 беспородных крысах-самцах весом 200—250 г, распределенных на пять групп (в каждой группе по 8 животных); I и II — контрольные (соответственно здоровые животные и с лапаротомией); III — с экстирпацией 2/3 печени; IV — с экстирпацией 2/3 печени, пораженной дезоксихолевой кислотой; V — с поражением печени дезоксихолевой кислотой без экстирпации. Исследования проводили через 1, 2, 3, 6, 14, 30 сут после частичной гепатэктомии. Экстирпацию печени у крыс проводили по общепринятой методике [10] под эфирным наркозом. Поражение печени вызывали добавлением в обычный рацион животных 0,8% от веса пищи дезоксихолевой кислоты, ежедневно в течение двух недель. Пищу тщательно измельчали и перемешивали.

Активность ЩФ определяли по [6]. Ферментативную активность выражали в международных единицах, означающих количество микромолей *n*-нитрофенола, освобожденного за 1 мин 1 л сыворотки. Разделение изоферментного спектра проводили в 7% полиакриламидном геле с последующим гистохимическим окрашиванием по Гомори [1] в модификации Яворского [5]. Электрофоретическую подвижность (*R*) вычисляли посредством деления скорости передвижения ферментной фракции на скорость передвижения альбуминов.

Результаты исследований

Как показали проведенные исследования, в сыворотке крови крыс с частичной экстирпацией печени отмечено увеличение активности ЩФ

с максимальным повышением на 2—3 сут после экстирпации. В этот период активность ЩФ превышала показатели здоровых животных в три раза. Затем наблюдалось постепенное снижение активности фермента. К шестым суткам активность ЩФ значительно снижалась по сравнению с предыдущим сроком эксперимента. Ее показатели опре-

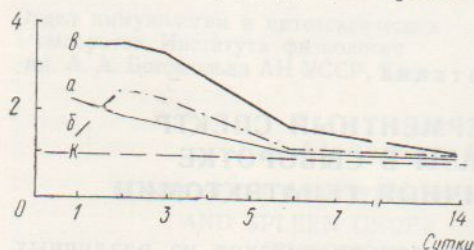


Рис. 1. Кратность изменения активности (по вертикали) щелочной фосфатазы сыворотки крови крыс в процессе регенерации при частичной гепатэктомии у здоровых животных и при поражении печени.

К — контроль, а — поражение печени дезоксихолевой кислотой, б — частичная экстирпация здоровой печени, в — частичная экстирпация пораженной дезоксихолевой кислотой.

делялись на уровне верхних границ нормы или были несколько повышенными (на 25%) у двух животных из семи. Через 14 сут в одном опыте из шести активность ЩФ превышала показатели здоровых жи-

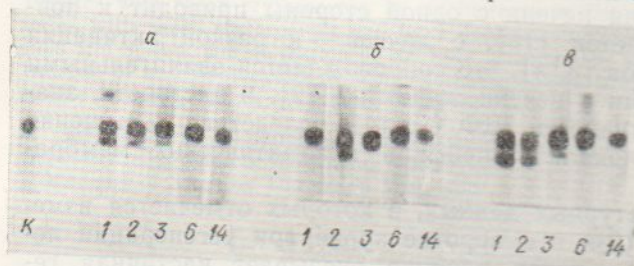


Рис. 2. Изоферментный спектр щелочной фосфатазы сыворотки крови здоровых животных (К), в процессе регенерации после поражения печени дезоксихолевой кислотой (а), после частичной экстирпации здоровой (б) и пораженной дезоксихолевой кислотой печени (в).

вотных на 80%. Средние показатели ЩФ этой группы животных были на 18% выше, чем в контрольной. Через 30 сут активность фермента не отличалась от наблюдаемой у контрольных животных.

Повышение общей активности ЩФ сопровождается изменениями в изоферментном спектре, выраженными либо в количественных различиях, либо в появлении фракций, не характерных для здоровых животных. Через сутки после частичной гепатэктомии на электрофореграмме определялся один характерный для здоровых животных изофермент с $R = 0,30$, более интенсивно окрашенный (рис. 1). Через 2 сут появлялся второй изофермент с большей электрофоретической подвижностью ($R = 0,39$), менее интенсивный, чем первый. Через 3 сут изофермент с $R = 0,39$ определялся у двух животных из 11. Интенсивность изофермента с $R = 0,30$ достигала нормальной к концу первой недели эксперимента.

Скармливание животных дезоксихолевой кислотой приводило к изменениям активности ЩФ сыворотки крови. Спустя сутки после прекращения скармливания дезоксихолевой кислоты активность ЩФ в сыворотке крови увеличивалась в 2,3 раза, по сравнению с наблюдаемой у здоровых животных. Через 2 сут она снижалась на 110 по сравнению с определяемой в первые сутки, но в 2,1 раза превышала средние показатели активности у контрольных животных. Через 3 сут снижение активности ЩФ продолжалось, она была на 23% ниже, чем в первые сутки эксперимента и на 84% превышала показатели контрольных животных. Через 6 сут средние показатели активности фермента превышали нормальный уровень на 27%, но из восьми животных у двух она была как у контрольных, а у двух других — в пределах верхней

границы нормы. К 14 сут эксперимента активность ЩФ была в пределах величин, определяемых у контрольных животных.

При скормливания животных дезоксихолевой кислотой в изоферментном спектре ЩФ сыворотки крови, кроме присутствующего у здоровых крыс изофермента с $R = 0,30$, появляется изофермент с большей электрофоретической подвижностью ($R = 0,39$), достаточно интенсивный, но значительно уступающий по площади изоферменту с $R = 0,30$. Через двое суток его интенсивность несколько снижалась, через трое — она была едва заметной, а к шестым суткам эксперимента — не определялась. Фракция с $R = 0,30$, значительно увеличенная в начале эксперимента, постепенно уменьшалась по площади, оставаясь к 6 сут более интенсивно окрашенной, чем в контроле. К 14 сут ее размеры и интенсивность достигали уровня, определяемого у здоровых животных.

Данные, представленные на рис. 2, показывают, что при частичной экстирпации печени, пораженной скормливанием животных дезоксихолевой кислотой, уже в первые сутки активность ЩФ резко повышалась. Так, по сравнению с показателями контрольных групп (здоровых животных и с лапаротомией), активность была выше в 3,7 раза, а по сравнению с животными с поражением печени дезоксихолевой кислотой без частичной экстирпации, активность ЩФ повышалась в 1,6 раза. Через 3 сут активность фермента у животных с поражением печени дезоксихолевой кислотой без экстирпации несколько снижалась, у животных с частичной гепатэктомией в указанный срок сохранялись высокие показатели активности. Через 6 сут активность ЩФ в подопытной группе заметно снижалась по сравнению с первыми тремя сутками, однако превышала показатели здоровых животных в два раза. Через 2 нед из шести животных у двух активность фермента определялась в пределах верхних границ показателей здоровых животных, а у двух — на 63 и 19% выше контроля. Через месяц активность ЩФ не отличалась от наблюдаемой у животных контрольных групп.

У животных с частичной экстирпацией печени на фоне ее поражения дезоксихолевой кислотой, как и у животных с поражением печени дезоксихолевой кислотой без частичной экстирпации, в изоферментном спектре ЩФ сыворотки крови, в отличие от наблюдаемого у контрольных животных (здоровых), определяли две фракции с $R = 0,30$ и $0,39$, более выраженные, чем у животных с поражением печени дезоксихолевой кислотой без частичной экстирпации. По мере восстановления функции печени, интенсивность обеих фракций постепенно уменьшалась. Через 6 сут в изоферментном спектре определяли только фракцию с $R = 0,30$, несколько более интенсивную, чем у здоровых животных и с лапаротомией. Через 2 нед интенсивность изофермента $R = 0,30$ не отличалась от наблюдаемой у животных контрольных групп.

Для решения различных проблем, связанных с функцией печени, длительное время применяли модель частичной гепатэктомии. Непосредственно после полной или частичной гепатэктомии активность фермента временно повышается в регенерирующей печени и в сыворотке крови. Показано, что повышение активности ЩФ в сыворотке крови зависит от количества удаленной паренхимы: при удалении трех долей (75%) активность фермента значительно превышала наблюдаемую в группе животных, у которых было удалено лишь 30% ткани печени [14]. Механизм этого явления связывают с гиперактивностью гепатоцитов. Цитохимически наиболее активная реакция наблюдалась через

48 ч после операции [9]. Этим данным соответствуют результаты наших исследований. Активность ЩФ повышается уже в первые сутки. В это же время повышается интенсивность изофермента с $R = 0,30$, определяемого у здоровых животных, что можно объяснить задержкой в сыворотке крови изоферментов, присутствующих в норме, в связи с уменьшением количества печеночных клеток, способных катаболизировать ЩФ.

Вместе с тем, появление через 2 сут в изоферментном спектре фракции с $R = 0,39$ в период максимального повышения общей активности фермента, можно объяснить усилением синтетических процессов регенерирующей печени, в частности усиленного синтеза ЩФ.

Повышение активности ЩФ в сыворотке крови животных с экспериментальной холемией, вызванной скормливанием дезоксихолевой кислоты, объясняется взаимодействием с клеточными мембранами желчных кислот, приводящим к их дезорганизации вследствие разрушения липидных комплексов [16]. Таким образом, появление изофермента с $R = 0,39$ при экспериментальной холемии можно объяснить тем, что ЩФ, входящая в липопротеидные комплексы наружных мембран гепатоцитов, может непосредственно высвобождаться из них при значительно повышенном содержании желчных кислот в сыворотке крови.

Сопоставление активности ЩФ после частичной экстирпации печени у здоровых животных с наблюдаемой при поражении ее, вызванном дезоксихолевой кислотой, показало, что у животных с предшествующим поражением печени не только более резко повышается активность фермента, но и удлиняется время ее нормализации.

Значительные различия отмечены в изоферментном спектре ЩФ сыворотки крови. В то время, как у здоровых животных с частичной гепатэктомией фракция с $R = 0,39$ появлялась на вторые сутки и на третьи не определялась, у животных с частичной экстирпацией печени, пораженной дезоксихолевой кислотой, эта фракция наблюдалась с первых суток, определялась в течение трех суток и была значительно интенсивнее, чем у животных сравняемой группы.

Выводы

1. Частичная гепатэктомия у крыс приводит к повышению общей активности ЩФ в сыворотке крови. В период максимального повышения активности ЩФ, кроме увеличения интенсивности изофермента, присутствующего в норме, наблюдается появление нового, не характерного для здоровых животных.

2. Скармливание крысам дезоксихолевой кислоты увеличивает общую активность ЩФ в сыворотке и активность изофермента, присутствующего в норме, а также приводит к появлению изофермента с большей электрофоретической подвижностью.

3. При частичной экстирпации печени, пораженной дезоксихолевой кислотой, общая активность ЩФ в также интенсивность ее изоферментов повышается в большей степени, чем при частичной экстирпации здоровой печени; задерживается нормализация показателей активности ЩФ.

Литература

1. Пирс В. Гистохимия теоретическая и прикладная.— М.: ИЛ, 1962.—344 с.
2. Радзевич И. М., Онойко В. К., Касаткина М. Г., Шкурова О. С. Ферменты печени и сыворотки крови в процессах регенерации в эксперименте.—Вопросы экспериментальной и клинической гепатологии. Тернополь, 1976, с. 97—99.

3. Сидорова В. Ф., Рябина З. А., Лейкина Е. М. Регенерация печени у млекопитающих.— Л.: Медицина, 1966.—203 с.
4. Солопаев Б. П., Коваленко И. А., Садовникова В. В., Ермакова Г. А., Горбачев Г. С., О механизмах репаративной регенерации патологически измененной печени.— Бюл. эксперим. биол. и мед., 1973, № 11, с. 50—56.
5. Яворський І. Г. Ізоферменти лужної фосфатази в сироватці крові білих щурів за експериментального ураження печінки й жовчних шляхів.— Укр. біохім. журн., 1971, 43, № 2, с. 254—257.
6. Bessey O., Lowry O., Brock M. A method for the determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum.— J. biol. chem., 1946 N 2, 164, p. 321—327.
7. Bornig H., Stepak J., Hork A., Geirtler R., Theiele C., Vecerek B. Intracelluläre Verteilung der alkalischen Phosphatase der Ratte Leber und ihr Verhalten nach Unterbindung des Ductus choledochus.— Hoppe Seyler's Z. physiol. chem. 1967, 348, p. 1311—1318.
8. Foliot A., Petite J. M., Husson J. M., Etienne J. P., Housset E. Inhibition des phosphatases alcalines sériques par le l-phenylalanine. Etude expérimentale chez le rat.— Biologie et gastroenterologie, 1972, N 9, p. 135—143.
9. Gawlik L., Najberg G., Aleksandrowicz W. I. E. The activity of alkaline phosphatase in the progress of regeneration of rat liver.— Folie histochem et cytochem., 1976, 14, N 2, p. 91—97.
10. Higgins G. M., Andersen E. M. Experimental pathology of the liver.— Arch. pathol., 1931, N 12, p. 186—202.
11. Hodson A. W., Lather A. L. Isoenzymes of alkaline phosphatase.— Clin. chim. acta, 1962, 7, N 1, p. 1—16.
12. Jackson S. H. The effect of lead ingestion on intestinal and serum alkaline phosphatase in rats.— J. biol. chem., 1952, 198, N 2, p. 559—564.
13. Kaplan M. M., Righetti A. Induction of liver alkaline phosphatase by duct ligation.— Biochem., biophys. acta, 1968, 184, p. 1311—1318.
14. Karon H. Morphological and functional changes of the rat liver after its partial hepatectomy.— Pat. pol., 1972, N 23, p. 525—529.
15. Keiding N. R. Phosphatase isoenzymes in human serum.— Scand J. clin. invest., 1974, 33, N 1, p. 1—8.
16. Palmer R. H. Bile acids, liver injury, and liver disease.— Arch. intern. med., 1972, 130, N 4, p. 606—617.
17. Pekarty I., Sort J., Lansiny A., Lieberman J. Function and control of liver alkaline phosphatase.— J. biol. chem., 1972, 247, N 6, p. 1767—1774.
18. Pilo B., Asnani M. V., Shah R. V. Studies on wound healing and repair in pigeon liver. III. Histochemical studies on the acid and alkaline phosphatases during the processes.— J. animal morphol. and physiol., 1972, 19, N 2, p. 205—212.

Киевский институт инфекционных болезней

Поступила в редакцию
30.III 1978 г.

M. G. Kasatkina

ACTIVITY AND ISOENZYME SPECTRUM OF ALKALINE PHOSPHATASE IN BLOOD SERUM OF RATS WITH PARTIAL HEPATECTOMY

Summary

Total activity and isoenzyme spectrum of rat blood serum alkaline phosphatase (AP) were studied in the regeneration process after partial liver extirpation in healthy animals and in those with liver affection. Maximum rise in the AP activity is established to occur on the 2nd-3rd day of the experiment. In this period in the AP isoenzyme spectrum there appears isoenzymes of cytomembrane origin not typical of the spectrum of healthy animals. Under conditions of partial extirpation of the liver, damaged with deoxycholic acid, normalization of AP activity is delayed.

Institute of Infectious Diseases, Kiev