

УДК 661.727.1.083

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЗАБУФЕРЕННОГО ФОРМАЛИНА НА АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА

К. Офир¹, А. Н. Белкин^{2*}, Г. Г. Фрейнд², М. Д. Кацнельсон³, В. Дергачев¹,
С. Н. Лицын¹, Й. Шэхам-Диаманд¹, В. А. Четвертных², Л. Н. Кротов³

¹Тель-Авивский Университет, Тель-Авив, Израиль,

²Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е. А. Вагнера,

³Пермский национальный исследовательский политехнический университет,
г. Пермь, Россия

ASSESSMENT OF BUFFERED FORMALIN EFFECT ON ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY BY MEANS OF ELECTROCHEMICAL METHOD

K. Ofir¹, A.N. Belkin^{2*}, G. G. Freind², M. D. Katsnelson³, V. Dergachev¹, S. N. Litsin¹,
Y. Sheham-Diamond¹, V. A. Chetvertnykh², L. N. Krotov³

¹Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel,

²Perm State Academy of Medicine named after Academician E. A. Wagner,

³Perm National Research Polytechnical University, Perm, Russian Federation

Цель. Оценить влияние формалина на активность ЩФ *in vitro* с помощью электрохимического метода.

Материалы и методы. Разработан метод, основанный на оценке активности щелочной фосфатазы по продуктам распада субстрата (1-нафтил-фосфата), который обладают электрохимической активностью. Смешивали образцы растворов щелочной фосфатазы с забуференным формалином (концентрация 10%) в соотношении 50:50 и держали их от 10 до 240 минут при комнатной температуре. Контролем служили образцы щелочной фосфатазы без добавления формалина. Затем проводили хроноамперометрическое измерение активности фермента после добавления субстрата (1-нафтил фосфат).

Результаты. Установлено, что активность щелочной фосфатазы значительно снижается уже через 2 часа после контакта с забуференным формалином.

Выводы. Это подтверждает, что целесообразно определять активность ЩФ в нефиксированных биологических тканях или при их фиксации в 10%-ном нейтральном формалине в течение не более двух часов.

Ключевые слова. Щелочная фосфатаза, формалин, хроноамперометрия.

© Офир К., Белкин А. Н., Фрейнд Г. Г., Кацнельсон М. Д., Дергачев В., Лицын С. Н., Шэхам-Диаманд Й., Четвертных В. А., Кротов Л. Н., 2013

e-mail: belkinanton87@gmail.com

тел. 8 (342) 263 30 10

[Кармит О. – аспирант кафедры электронных систем; Белкин А. Н. (*контактное лицо) – аспирант кафедры патологической анатомии с секционным курсом; Фрейнд Г. Г. – профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии с секционным курсом; Кацнельсон М. Д. – профессор кафедры металлорежущих станков и инструментов; Дергачев В. – аспирант кафедры молекулярной биологии и биотехнологии; Лицын С. Н. – профессор кафедры электронных систем; Шэхам-Диаманд Й. – профессор, заведующий кафедрой физической электроники; Четвертных В. А. – профессор, заведующий кафедрой цитологии, гистологии и эмбриологии; Кротов Л. Н. – профессор, доктор физических наук, профессор кафедры прикладной физики].

Aim. To assess the effect of formalin on the activity of alkaline phosphatase *in vitro* using electrochemical method.

Materials and methods. The method based on assessment of alkaline phosphatase activity by its substrate decay products (1-naphthyl phosphate) possessing electrochemical activity was developed. Alkaline phosphatase solution samples were mixed with buffered formalin (10% concentration) in the ratio of 50:50 and stored during 10–240 minutes at the room temperature. Alkaline phosphatase samples free of formalin served as the control. Then, chronoamperometric measurement of enzyme activity after addition of substrate (1-naphthyl phosphate) was performed.

Results. It was established that alkaline phosphatase activity is significantly reduced already in 2 hours after its contact with buffered formalin.

Conclusion. It is recommended to determine AP activity in nonfixed biological tissues or in 10% neutral formalin fixed tissues for not more than two hours.

Key words. Alkaline phosphatase, formalin, chronoamperometry.

ВВЕДЕНИЕ

Щелочная фосфатаза (ЩФ) – фермент из класса гидролаз, обеспечивающий процессы дефосфорилирования многих макромолекул (белков, нуклеотидов и др.). ЩФ представлена в тканях животных и человека тремя основными изоферментами: кишечная (ALPI), плацентарная (ALPP) и неспецифическая (ALPL). Концентрация неспецифической ЩФ наивысшая в эпителии почечных канальцев, в остеобластах, эпителии молочной и предстательной желез, в гепатоцитах и эпителии желчных протоков. Определение ЩФ имеет большое значение в диагностике заболеваний печени, сопровождающихся холестатическим синдромом (гепатиты, цирроз печени, желчно-каменная болезнь), а также болезни Педжета костей и других заболеваний. Кишечная щелочная фосфатаза обнаруживается в основном в эпителии щеточной каемки слизистой оболочки кишки [2]. Плацентарная ЩФ – в цитоплазматической мембране синцитиотрофобласта ворсинок хориона, играет важную роль в метаболизме в системе «мать–плацента–плод». В настоящее время кишечная щелочная фосфатаза рассматривается как важный маркер дифференцировки кишечного эпителия [3, 9, 11]. В проведенном исследовании мы обнаружили различие в концентрации ЩФ в нормальном эпителии и злокачественных эпители-

альных опухолях толстой кишки [1]. Это, вероятно всего, связано с тем, что со снижением степени дифференцировки эпителия в опухоли изменяются и его функциональные свойства: одним из проявлений функционального атипизма является снижение синтеза щелочной фосфатазы. Поскольку в стандартных условиях образцы тканей, полученные при проведении эндоскопического исследования, фиксируют в 10%-ном нейтральном формалине, представляет интерес изучение влияния формалина на активность щелочной фосфатазы. Данные литературных источников по устойчивости гидролаз, в частности ЩФ, к воздействию альдегидов расходятся. По данным одних источников, ЩФ устойчива к действию многих фиксаторов, в частности альдегидов [2], однако при длительном воздействии некоторые интенсивно реагирующие альдегиды инактивируют фермент в ряде органов [4]. По данным других исследователей, многие гидролазы (кислая и щелочная фосфатаза, каталаза, АТФ-аза и другие ферменты) через 2–24 часа фиксации в формалине сохраняют свою ферментативную активность [5–8, 10]. Таким образом, выявление изменения активности ЩФ под действием формалина представляет интерес для исследования как в клинике, так и в эксперименте.

Цель работы – оценить влияние формалина на активность ЩФ *in vitro* с помощью электрохимического метода.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ**

Использовали ЩФ, полученную из слизистой оболочки тонкой кишки быка (Sigma, Великобритания). Готовили опытные образцы раствора ЩФ: фермент смешивали с фосфатным буфером до получения раствора с концентрацией ЩФ 3 мг/мл буфера. Также готовили контрольный образец раствора ЩФ. Концентрация ЩФ в контрольном растворе составляла 1,5 мг/мл буфера. Всего было приготовлено 6 опытных и 1 контрольный образец раствора ЩФ. Опытные образцы смешивали с забуференным формалином в соотношении 50:50 и хранили при комнатной температуре в течение 10, 20, 30, 60, 120, 240 минут каждый опытный образец соответственно. Затем все образцы растворов помещали в камеры с 225 мкл фосфатного буфера (по 25 мкл каждого раствора в отдельную камеру), которые были оборудованы в нижней части электрода. Общий объем раствора в каждой камере составлял 250 мкл. Конструкция кремниевой электрохимической ячейки содержала планарный золотой рабочий электрод, золотой противозлектрод и хлорсеребряный электрод сравнения, изготовленные методами фотолитографии, напыления (золотые) и гальваностегии (хлорсеребряный). Все электроды соединялись восьмиканальным мультиплексором и работали в непрерывном режиме в условиях перемешивания. Потенциал относительно хлорсеребряного электрода сравнения составлял 300 мВ. После короткого времени установления равновесия, необходимого для стабилизации системы и определения фонового сигнала, обусловленного фоновыми электрохимическими и биохимическими реакциями (200 секунд), добавляли субстрат – 1-нафтил фосфат (далее 1-НФ) (Sigma, Великобритания) в количестве 25 мкл. Конечная концентрация 1-НФ в каждой камере составлял 0,1 мг/мл. Конечная концентрация ЩФ

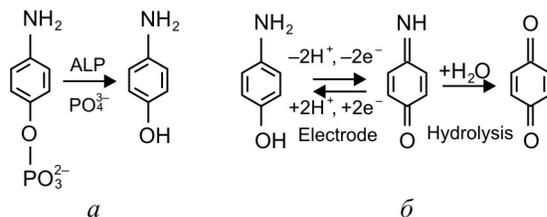


Рис. 1. Субстрат (п-аминофенилфосфат) подвергается дефосфорилированию под действием ЩФ (а); образовавшийся п-аминофенол окисляется на электроде с потенциалом 0,22 В, создавая ток (б)

в каждой камере составляла 0,136 мг/мл. Измерения проводились в течение 2000 секунд. При наличии фермента (кишечной щелочной фосфатазы) добавленный 1-НФ претерпевает дефосфорилирование до парааминофенола (ПАФ). Образовавшийся ПАФ далее окисляется на рабочем электроде при низком положительном потенциале относительно хлорсеребряного электрода сравнения (0,3 В) до иминохинона. Затем образовавшийся иминохинон подвергается гидролизу до хинона. Продукты химической реакции обладают электрохимической активностью. Электрохимическая реакция, за которой следует ферментативный катализ, показана на рис. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты отражены на рис. 2.

Из рис. 2 видно, что имеются различия в силе получаемого тока при исследовании разных образцов. При расщеплении ЩФ без наличия формалина сила тока нарастает, достигая максимального пика 4,61 мкА в интервале с 600-й по 800-ю секунду, затем постепенно снижается. Это обусловлено тем, что 1-НФ расщепляет ЩФ, и в дальнейшем происходит частичная дегградация электрохимически активных продуктов распада 1-НФ. Величина силы тока отличается при исследовании образцов ЩФ, которые были смешаны

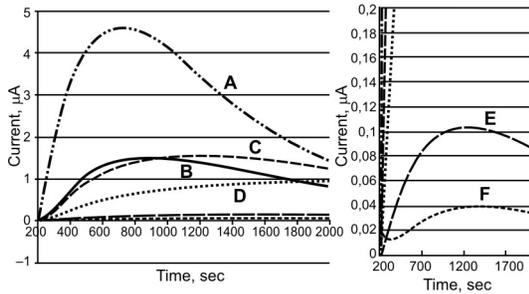


Рис. 2. Результаты хроноамперометрического исследования активности ЩФ при добавлении 1-НФ без воздействия формалина (А) и после воздействия формалина в течение 10 (В), 30 (С), 60 (D), 120 (Е) и 240 (F) минут

с формалином. Данные, полученные при исследовании образцов ЩФ, которые содержали формалин в течение 10 и 30 минут, практически не отличаются, и максимальная сила тока составляет здесь соответственно 1,52 и 1,56 мкА. При исследовании остальных образцов ЩФ также видно, что происходит снижение величины получаемой максимальной силы тока, и она составляет 0,96, 0,1 и 0,039 мкА при исследовании образцов ЩФ с формалином соответственно 60, 120 и 240 минут. Полученные данные свидетельствуют о том, что количество электрохимически активных продуктов химической реакции становится меньше, что связано с преждевременной инактивацией ЩФ формалином. По величине силы полученного тока мы можем судить, что активность ЩФ снижается в 3 раза от изначальной при инкубации в формалине в течение 30 минут, в 4,8 раза – в течение 60 минут, в 46 раз – в течение 120 минут и в 118 раз – в течение 240 минут. Эти данные говорят о том, что образцы биологических тканей и опухолей, которые в дальнейшем будут исследованы с целью выявления ЩФ электрохимически и иными методами, нежелательно фиксировать в забуференном формалине (концентрация 10%) или фиксировать в нем в течение максимально короткого времени и учитывать это при дальнейшем исследовании содержания ЩФ.

ВЫВОДЫ

1. Активность ЩФ при смешивании с нейтральным формалином в соотношении 50:50 снижается.

2. Целесообразно определять активность ЩФ в нефиксированных биологических тканях или при их фиксации в 10%-ном нейтральном формалине в течение не более двух часов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Верник С., Белкин А. Н., Фрейнд Г. Г., Кацнельсон М. Д., Шахам-Диаманд Й., Лицын С. Н., Четвертных В. А. Морфологическое обоснование возможности использования электрохимических биосенсоров в диагностике колоректального рака. Пермский медицинский журнал 2012; 5: 5–7.
2. Гайер Г. Электронная гистохимия: пер. с нем. И. Б. Бухвалова. М.: Мир, 1974; 458.
3. Christudoss P., Selvakumar R., Pulimood A. B., Fleming J. J., Mathew G. Zinc and zinc related enzymes in precancerous and cancerous tissue in the colon of dimethyl hydrazine treated rats. Asian Pacific Journal of cancer prevention 2012; 13: 487–492.
4. Feustel E.-M., Gayer G. Zureinigung der acroleinfixierung fur histochemie. Acta Histochemistry 1966; 25: 219–233.
5. Fox C. H., Johnson F. B., Whiting J., Roller P. P. Formaldehyde fixation. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 1985; 33 (8): 845–853.
6. Goosen N. K., Broers C. A., Hombergen E.-J., Stumm C. K., Vogels G. D. Effect of fixation on activity and cytochemistry of hydrogenosomal enzymes in Trichomonas vaginalis. Journal of General Microbiology 1990; 136: 2189–2193.
7. Hoopwood D. Some aspects of fixation with glutaraldehyde. A biochemical and histochemical comparison of the effects of formaldehyde and glutaraldehyde fixation

- on various enzymes and glycogen, with a note on penetration of glutaraldehyde into liver. *Journal of anatomy* 1967; 101: 83–92.
8. *Puchtler H, Meloan S. N.* On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* 1985; 82 (3): 201–204.
 9. *Tsai C.Y, Chen Y.H, Chien Y.W, Huang W.H, Lin S.H.* Effect of soy saponin on the growth of human colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology* 2010; 16 (27): 3371–3376.
 10. *Verbaert P, Walgraeve H, Downer R.* Alkaline phosphatase activity in the brain of the American cockroach *Periplaneta Americana* L. *The Histochemical Journal* 1990; 22 (11): 628–635.
 11. *Wang Q, Zhou Y, Rychabou P, Liu C, Weiss H.L, Evers B.M.* NFAT5 represses canonical Wnt signaling via inhibition of β -catenin acetylation and participates in regulating intestinal cell differentiation. *Cell Death and Disease* 2013; 4: 671.

Материал поступил в редакцию 10.10.2013