

## ВМІСТ БІЛКОВИХ ФРАКЦІЙ ПЛАЗМИ КРОВІ ТВАРИН ЗА УМОВ БІЛКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

Г. П. КОПИЛЬЧУК, І. М. БУЧКОВСЬКА, Р. О. НІКОЛАЄВ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,  
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58000  
e-mail: kopilchuk@gmail.com

У роботі проведено дослідження вмісту білкових фракцій плазми крові щурів за умов аліментарної білкової недостатності. Значна увага приділяється визначенню вмісту загального протеїну в плазмі крові тварин. З метою дослідження особливостей змін даних біохімічних показників за умов аліментарної депривації протеїну дослідних тварин протягом 28 днів утримували на напівсинтетичному низькопротеїновому раціоні з урахуванням принципу парного харчування. Для дослідження використовували цитровану кров, взятую із *vena portae hepatis* загальноприйнятим методом. Плазму крові отримували шляхом центрифугування. Визначення концентрації загального білка плазми крові проводили біуретовим методом. Кількісне співвідношення альбумінів,  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\gamma$ -глобулінів визначали турбідиметричним методом, який ґрунтується на тому, що фосфатні розчини визначеної концентрації осаджують білкові фракції плазми крові з утворенням суспензії, ступінь каламутності якої визначають нефелометрично при довжині хвилі 590 – 670 нм. Встановлено, що при нестачі протеїну в харчовому раціоні у тварин спостерігається розвиток гіпопротеїнемії внаслідок зниження концентрації загального білка в плазмі крові. Слід відмітити, що зниження концентрації загального протеїну в плазмі крові дослідних тварин відбувається внаслідок зменшення вмісту альбумінів та вказує на наявність гіпоальбумінемії. Водночас перебування щурів на низькопротеїновому раціоні супроводжується зростанням вмісту  $\alpha$ - та  $\gamma$ -глобулінових фракцій плазми крові тварин. Слід відмітити, що рівень  $\alpha$ -глобулінів підвищується лише за рахунок  $\alpha_1$ -протеїнової фракції, значення якої вірогідно перевищують показники контрольної групи. Щодо  $\alpha_2$ - та  $\beta$ -глобулінів, верифікації змін їх вмісту за умов нестачі протеїну нами не виявлено. За умов білкової недостатності коефіцієнт альбуміно-глобулінового співвідношення знаходиться в межах 0,83, що вказує на зниження резерву легкодоступних амінокислот та зростання катаболізму протеїнів за даних експериментальних умов, що, в свою чергу, може виступати першопрчиною розвитку патологічних станів печінки.

*Ключові слова:* загальний білок, альбуміни,  $\alpha_1$ -глобуліни,  $\alpha_2$ -глобуліни,  $\beta$ -глобуліни,  $\gamma$ -глобуліни, плазма крові, білкова недостатність

**Вступ.** Білки плазми крові – лабільна динамічна система, що перебуває в рівновазі з протеїнами тканин та значною мірою визначає біохімічний гомеостаз організму (Eghtesad et al., 2013; Alberghina et al., 2011). Відомо, що протеїни плазми здійснюють транспорт численних екзогенних та ендогенних метаболітів, беруть участь у зв'язуванні гормонів, ліпідів, жиророзчинних вітамінів тощо (Пшенкина, 2011; Van der Vusse, 2009). Будучи амфотерними електролітами, вони відіграють важливу роль у підтриманні кислотно-основного балансу організму, є факторами зсідання крові, антитілами (Schroeder, Cavacini, 2010), а також використовуються як пластичний матеріал для синтезу білків тканин (Шульга, Безроднова, 2013; Kragh-Hansen et al., 2002).

Основна маса білків плазми крові синтезується в клітинах печінки – альбуміни,  $\alpha$ -глобуліни, частина  $\beta$ -глобулінів, фібриноген, компоненти системи зсідання крові (II, V, VII, IX, X, XI фактори) (Voss et al., 2002; Singh et al.,

2012), більша частина  $\beta$ - та  $\gamma$ -глобулінів – у клітинах імунної системи (Fairbanks et al., 2008; Schroeder, Cavacini, 2010).

Диспротеїнемія, що спостерігається під час багатьох захворювань, призводить до порушення гомеостазу та розвитку специфічних реакцій організму (Schroeder, Cavacini, 2010; Добреля, 2007), досить частими причинами яких може виступати незбалансоване харчування з надлишком або дефіцитом основних макро- та мікронутрієнтів, зокрема білків та вітамінів. Відомо, що загальний білок плазми являє собою сумарну концентрацію всіх циркулюючих білків і є основною складовою частиною крові. За даними літератури (Eghtesad et al., 2013; Лившиц, 2001) зниження даного показника спостерігається при відсутності протеїну в харчовому раціоні, ендогенних інтоксикаціях (Fairbanks et al., 2008), посиленому катаболізмі білка або його перерозподілі внаслідок виходу із кров'яного русла з утворенням трансудат-ексудативних комплексів (Dideriksen, 2013).

Водночас вміст альбумінів – найчисельнішої фракції білків плазми крові – має діагностичне значення, а його зниження вказує на дисфункцію печінки, нирок та інших органів (Quinlan et al., 2005).

Метою роботи було дослідити зміни співвідношення вмісту білкових фракцій плазми крові за умов білкової-енергетичної недостатності.

**Об'єкт і методи.** Дослідження проводили на білих безпородних щурах віком 2,5-3 місяці та масою 100-120 г. Утримання тварин та маніпуляції з ними здійснювали з дотриманням «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986). Протягом експерименту тварини знаходились у пластмасових клітках із піщаною підстилкою та вільним доступом до води. Нормування добового раціону проводили з урахуванням принципу парного харчування (Mashiko et al., 2007).

Дослідні тварини були поділені на групи:

1 – тварини, які утримувалися на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами – група контролю (К);

2 – тварини, які протягом 28 днів до початку експерименту отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон (1/3 загальноприйнятої норми добової потреби протеїну) (НПР) (Reeves et al., 1993).

Цервікальну дислокацію дослідних тварин під легким ефірним наркозом проводили на 28 добу експерименту. Для дослідження використовували цитровану кров, взятую із *vena portae hepatis* загальноприйнятим методом. Плазму крові отримували шляхом центрифугування при 1500 г (Топіков, Дяченко, 2006).

Визначення концентрації загального білка плазми крові проводили біуретовим методом з використанням стандартного набору реактивів «Філісіт-Діагностика» (Україна). Вміст загального білка виражали в г/л.

Кількісне співвідношення білкових фракцій плазми крові визначали турбідиметричним методом (Горячковский, 2005). Принцип методу ґрунтується на тому, що фосфатні розчини визначеної концентрації осаджують білкові фракції плазми крові з утворенням суспензії, ступінь каламутності якої визначають

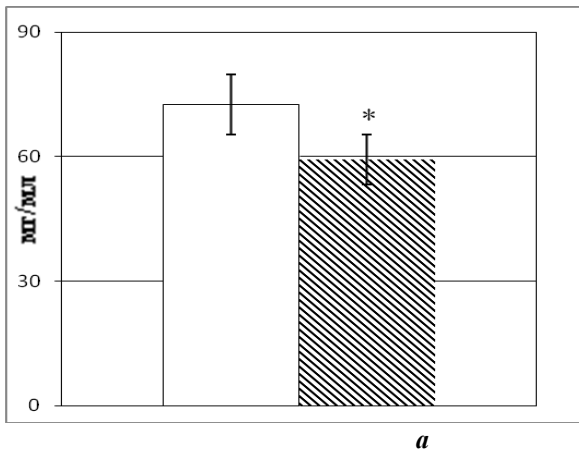
нефелометрично при довжині хвилі 590 – 670 нм. Вміст кожної фракції обчислювали у %, приймаючи їх загальну суму за 100%.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики. Порівняння між двома групами здійснювали за допомогою програми *Microsoft Excel*, використовуючи двовибірковий *t*-критерій Стьюдента для незалежних вибірок. Вірогідними вважали відмінності між групами при  $P \leq 0,05$ .

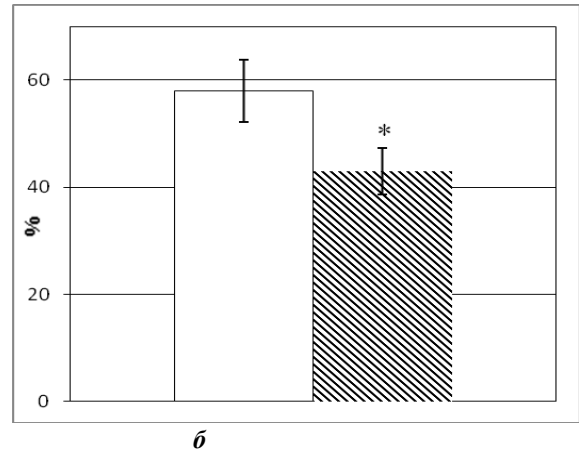
**Результати та їх обговорення.** Результати досліджень показали, що в плазмі крові щурів, які знаходилися на низькопротеїновому раціоні, спостерігається зниження концентрації загального білка (рис. 1, а) в 1,3 рази порівняно зі значеннями контролю. Вірогідно, таке зниження за умов білкової недостатності відбувається не лише внаслідок обмеженого надходження харчового протеїну, але й зменшення вмісту альбумінів за даних експериментальних умов (рис. 1, б).

За даними літератури (Степанець та ін., 2013; Клімова та ін., 2011; Finfer et al., 2004) у кількісному співвідношенні альбуміни є найважливішими, оскільки на 80% визначають колоїдно-осмотичний тиск плазми крові, беруть безпосередню участь в забезпеченні буферної ємності, підвищують резерви вільних амінокислот в організмі тощо. Слід відмітити, що синтез альбуміну відбувається в гепатоцитах та безпосередньо залежить від надходження амінокислот з їжею, зокрема, триптофану, а також наявності АТФ, глутатіонтрансферази (Voss et al., 2002; Singh et al., 2012) та іонів  $Mg^{2+}$  (Barle et al., 2002; Ruot et al., 2000).

Вірогідно, виникнення гіпоальбумінемії у нашому випадку, з одного боку, пов'язано з порушенням синтетичної функції печінки, що зумовлено зменшенням кількості гепатоцитів або погіршенням їх функціональної здатності (Quinlan et al., 2005), з іншого, – посиленням використання альбумінів як легкомобілізованих білків для поповнення метаболічного пулу амінокислот (Шульга, Безроднова, 2013; Kragh-Hansen et al., 2002). Окрім того, не виключено, що зниженням рівня досліджуваного показника за умов білкової недостатності зумовлено пригніченням одного з факторів трансляції поліпептидного ланцюга альбуміну в клітинах печінки – глутатіонтрансферази, що підтверджується нашими попередніми дослідженнями (Копильчук, Бучковська, 2014; Копильчук и др., 2014).



**Рис. 1.** Вміст загального білка (а) та альбуміну (б) в плазмі крові щурів за умов білкової недостатності



**Pic. 1.** The content of total protein (a) and albumin (b) in plasma of rats under the conditions of protein deficiency

Примітка (тут і надалі):

- – тварини, які утримувалися на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами – група контролю (К);
- ▨ – тварини, які протягом 28 днів знаходилися на низькопротеїновому раціоні (НПР);

\* - статистично достовірна різниця порівняно з контролем,  $P \leq 0,05$ .

Note (thereafter):

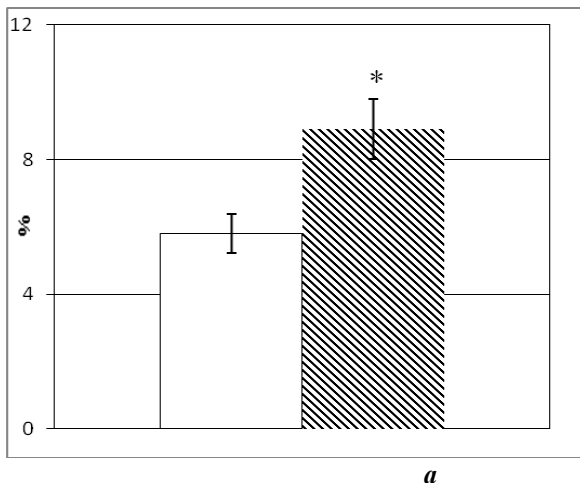
- – animals are kept in semi-synthetic diet in all nutrients – control group (C);
- ▨ – animals that were over 28 days on the low-protein diet (LPD);

\* – statistically significant difference compared with control,  $P \leq 0,05$ .

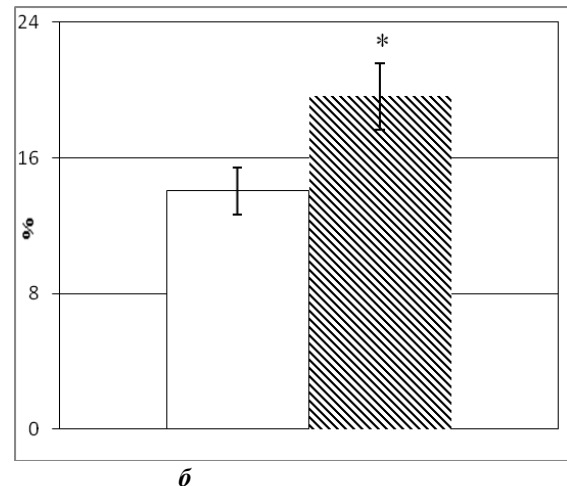
З літератури (Пшенкіна 2011; Van der Vusse, 2009) відомо, що в регуляції зв'язувальної здатності альбуміну важлива роль належить вільним жирним кислотам (ВЖК). За фізіологічних умов молекула альбуміну може зв'язувати та транспортувати 2-4 ВЖК, що забезпечує зниження концентрації активних вільних жирних кислот у плазмі крові. Тому, можна припустити, що встановлене нами зменшення кількості альбумінів за умов білкової недостатності може виступати однією з причин розвитку жирової інфільтрації печінки.

Водночас перебування тварин на низькопротеїновій дієті супроводжується порушенням співвідношення гетерогенної фракції білків плазми крові, до складу якої

входять  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\gamma$ -глобуліни. Так, нами встановлено, що за умов аліментарної білкової недостатності в плазмі крові щурів підвищення вмісту  $\alpha_1$ -глобулінів відбувається за рахунок зростання лише  $\alpha_1$ -протеїнової фракції (рис. 2, а), значення якої в 1,5 рази перевищують показники контрольної групи. Відомо, що до  $\alpha_1$ -глобулінів належать  $\alpha_1$ -антитрипсин,  $\alpha_1$ -антихімотрипсин,  $\alpha_1$ -кислий глікопротеїн, альфа-фетопротеїн тощо (Степанець та ін., 2013; Fairbanks et al., 2008). Зростання вмісту цих протеїнів може відбуватися у випадку надходження в кров значної кількості протеолітичних ензимів із тканин, наприклад, при гострому панкреатиті, що може мати місце й за даних експериментальних умов.



**Рис. 2.** Вміст  $\alpha_1$ -глобулінів (а) та  $\gamma$ -глобулінів (б) в плазмі крові щурів за умов білкової недостатності

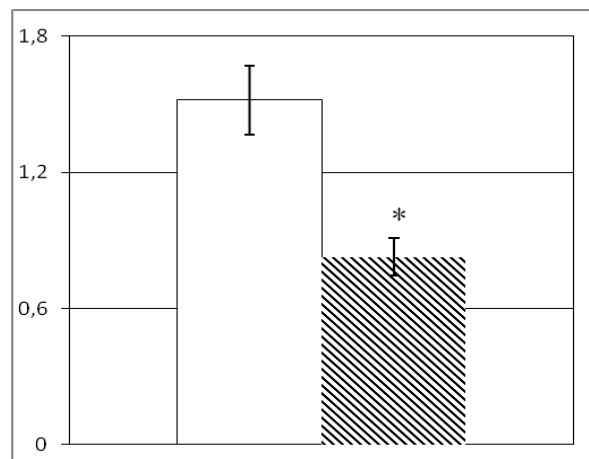


**Pic. 2.** Content  $\alpha_1$ -globulin (a) and  $\gamma$ -globulin (b) in plasma of rats under the conditions of protein deficiency

Слід відмітити, що біологічна функція  $\alpha_1$ -антитрипсину та  $\alpha_1$ -антихімотрипсину реалізується шляхом зв'язування з трипсином, хімотрипсином, плазміном, тромбіном та призводить до пригнічення активності даних протеїназ.

Щодо  $\alpha_2$ -глобулінів, які включають гаптоглобін,  $\alpha_2$ -макроглобулін, церулоплазмін, С-реактивний білок тощо, верифікації змін їх вмісту за умов нестачі протеїну нами не виявлено, що однозначно підтверджується результатами попередніх досліджень (Копильчук, Волощук и др., 2014). Слід відмітити, що відсотковий вміст  $\beta$ -глобулінової фракції у плазмі крові дослідних тварин також знаходився в межах норми та не перевищував 15%. Водночас нами встановлено, що в плазмі крові щурів, які зазнавали аліментарної білкової депривації, спостерігається зростання кількості  $\gamma$ -глобулінів, до складу яких, як відомо, належать імуноглобуліни – IgG, IgA, IgM, IgD, IgE – функціональні антитіла, що забезпечують гуморальний імунітет (Schroeder, Cavasini, 2010). Так, як видно з рис. 2, вміст  $\gamma$ -глобулінів у плазмі крові дослідних тварин в 1,4 рази перевищує значення контролю (рис. 2, б). Слід відмітити, що показник кількості білків вказаної фракції є найстабільнішим, проте його зміни можуть бути свідченням адекватної реакції імунної системи у відповідь на нестачу протеїну. Враховуючи те, що обмежене споживання білка, як показано у роботі (Добреля, 2007) призводить до зниження кількості продукування антитіл, але практично не виявляє жодного впливу на функції клітин, які їх виробляють, можна припустити, що підвищення вмісту  $\gamma$ -глобулінів у плазмі крові дослідних тварин відбувається внаслідок надмірного утворення імунокомпетентними клітинами системи В-лімфоцитів патологічних білків – парапротеїнів (PIg) (Smogorzewska et al., 2004).

Відомо, що коефіцієнт альбуміно-глобулінового співвідношення (А/Г) – важливий діагностичний показник стану білкового обміну в організмі, який у нормі складає 1,2-2. Аналіз отриманих нами результатів засвідчує, що рівень А/Г-співвідношення знаходиться в межах 0,83 та виявляється нижчим значень контролю в 1,8 рази (рис. 3). Таким чином, низькі значення цього показника вказують на зниження резерву легкодоступних амінокислот та зростання катаболізму протеїнів (Alberghina et al., 2011) за умов білкової недостатності, що, в свою чергу, може виступати першопричиною розвитку патологічних станів печінки, зокрема гепатостеатозу, гепатиту тощо.



**Рис. 3. Альбуміно-глобуліновий коефіцієнт плазми крові щурів за умов білкової недостатності**

**Fig. 3. Albumin-globulin ratio blood plasma of rats under the conditions of protein deficiency**

**Висновки.** Отже, аліментарна білкова недостатність супроводжується розвитком диспротеїнемії, що характеризується зниженням концентрації альбуміну з одночасним зростанням вмісту  $\alpha$ - та  $\gamma$ -глобулінових фракцій плазми крові тварин.

#### Список літератури:

- Горячковский А.М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике: справочное пособие. – Изд. 3-е. – Одесса: Экология, 2005. – 616 с.
- Добреля И.В. Роль белка в поддержании иммунной защиты и усилении иммунной функции. – 2007. – Ел.ресурс: [http://east-house.org.ru/journals/vetklinika/2007/03Mar/08\\_page13-14.pdf](http://east-house.org.ru/journals/vetklinika/2007/03Mar/08_page13-14.pdf).
- Електрофоретичне дослідження білків і ферментів крові людини та тварин. методичні вказівки / Уклад. Топіков В.А., Дяченко Л.Ф. – Одеса: Б.в., 2006. – 56с.
- Клімова О., Звягінцева О., Малишев А. Зміна співвідношення білкових фракцій сироватки крові у експериментальних тварин різного віку після імунізації цитотоксичною сироваткою хворих з аутоімунним захворюванням – міастенією // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2011. – Вип. 55. – С. 27-33.
- Копильчук Г.П., Бучковська І.М. Стан глутатіонової системи клітин печінки щурів за низькопротеїнового раціону та гострого гепатотоксичного ураження // Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, N 5 (Supplement 1). – P. 165-166.
- Копильчук Г.П., Борщовецкая Н.Л., Чопик Н.В., Бучковская И.М. Активность ключевых ферментов синтеза и конъюгации глутатиона в гепатоцитах крыс при алиментарной белковой недостаточности // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2014. – № 6-1. – С. 70-73.
- Копильчук Г.П., Волощук О.Н., Аврам И.И. Особенности острофазового ответа при токсическом гепатите, развивающемся на фоне алиментарной депривации протеина // Актуальные проблемы

- гуманитарных и естественных наук. – 2014. – №6-1. – С. 33-35.
8. Лившиц В.М. Биохимические анализы в клинике. Справочник / В. М. Лившиц, В.И. Сидельникова // М: Мед. информационное агентство, 2001. – 303 с.
9. Пшенкина Н.Н. Структура альбумина и транспорт лекарств // Медицинский академический журнал. – 2011. – Т. 11, № 3. – С. 3-15.
10. Степанец І., Моргаєнко О., Остапченко Л. Білковий склад сироватки крові щурів за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2013. – Вип. 61. – С. 30-36.
11. Шульга И.М., Безроднова С.М. Дискриминантный анализ в изучении детей и подростков с недостаточным, достаточным питанием и больных туберкулёзом Клиническая медицина. – 2013. – Т. 14. – С. 647-655.
12. Alberghina D., Giannetto C., Vazzana I. et al. Reference intervals for total protein concentration, serum protein fractions, and albumin/globulin ratios in clinically healthy dairy cows // J. Vet. Diagn. Invest. – 2011. – Vol. 23. – P. 111-114.
13. Barle H., Januszkiewicz A., Hailstro L. et al. Albumin synthesis in humans increases immediately following the administration of endotoxin // Clinical Science. – 2002. – Vol. 103. – P. 525-531.
14. Dideriksen K. Influence of Amino Acids, Dietary Protein, and Physical Activity on Muscle Mass Development in Humans / K. Dideriksen, S. Reitelseder, L. Holm // Nutrients. – 2013. – № 5. – С. 852-876.
15. Eghtesad S. Malnutrition in Liver Cirrhosis: The Influence of Protein and Sodium / S. Eghtesad, H. Poustchi, R. Malekzadeh // Middle East Journal of Digestive Diseases. – 2013. – Vol. 5, № 2. – P. 65-75.
16. Fairbanks K.D., Tavill M.D., Tavill A.S. Liver Disease in Alpha 1-Antitrypsin Deficiency: A Review // Am J Gastroenterol. – 2008. – Vol. 103. – P. 2136-2141.
17. Finfer S., Bellomo R., Boyce N. et al. A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit // Engl. J. Med. – 2004. – Vol. 22. – P. 2247-2256.
18. Kragh-Hansen U., Chuang V., Otagiri M. Practical aspects of the ligandbinding and enzymatic properties of human serum albumin // Biol. Pharm. Bull. – 2002. – Vol. 25. – P. 695-704.
19. Mashiko S., Ishihara A., Iwaasa H. et al. Pair-Feeding Study Reveals That a Y5 Antagonist Causes Weight Loss in Diet-Induced Obese Mice by Modulating Food Intake and Energy Expenditure // Molecular pharmacology. – 2007. – Vol. 71, № 2. – P. 602-608.
20. Quinlan G.J., Martin G.S., Evans T.W. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential // Hepatology. – 2005. – Vol. 41. – P. 1211-1219.
21. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet // The journal of nutrition. – 1993. – № 5. – P. 1939-1951.
22. Ruot B., Breuille D., Rambourdin F. et al. Synthesis rate of plasma albumin is a good indicator of liver albumin synthesis in sepsis // Am J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2000. – Vol. 279. – P. 244-251.
23. Schroeder H.W., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins // J Allergy Clin. Immunol. – 2010. – Vol. 125, № 2. – P. 41-52.
24. Singh M., Aggarwal H., Aggarwa S. Significance of the Glutathione-S-Transferase Activity and the Total Thiols Status in Chronic Alcoholics // J. Clin. and Diagn. Res. – 2012. – Vol. 6, № 1. – P. 31-33.
25. Smogorzewska A., Flood J.G., Long W.H. et al. Paraprotein Interference in Automated Chemistry Analyzers // Clinical Chemistry. – 2004. – Vol. 50, № 9. – P. 1691-1693.
26. Van der Vusse G.J. Albumin as fatty acid transporter // Drug Metab. Pharmacokinet. – 2009. – Vol. 24, № 4. – P. 300-307.
27. Voss S., Whalen R., Boyer T. Mechanism of negative regulation of rat glutathione S-transferase A2 by the cytokine interleukin 6 // Biochem J. – 2002. – Vol. № 1. – P. 229-237.

## CONTENT OF PROTEIN FRACTIONS OF BLOOD PLASMA IN ANIMALS UNDER THE CONDITIONS OF PROTEIN DEFICIENCY

H. P. Kopylchuk, I. M. Buchkovska, R. O. Nikolaev

*In work considered the researches the content of protein fractions in blood plasma of rats under conditions of alimentary protein deficiency. Much attention is paid to the determination of total protein content in the blood plasma of animals. In order to study the characteristics changes of the data of biochemical parameters in the conditions of alimentary deprivation protein research animals kept for 28 days on a semi-synthetic low-protein diet based on the principle of paired food. For research use sodium citrate blood taken from the vena portae hepatis conventional method. Plasma obtained by centrifugation. Determination of the concentration of total protein in blood plasma was performed biuret method. The proportion of albumin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -globulin was determined turbidimetry method that is based on the fact that phosphate solutions of certain concentration precipitated protein fraction of blood plasma to form a suspensions, which determine the degree of turbidity nephelometric at a wavelength of 590 – 670 nm. Found that the shortage of protein in the diet of animals seen the development of hypoproteinemia due to lower total protein concentration in blood plasma. It should be noted that the decrease in the concentration of total protein in the blood plasma of experimental animals is due to reduce the content of albumin and indicates the presence of hypoalbuminemia. At the same time staying in rats low-protein diet accompanied by increased content of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -globulin plasma fractions animals. It should be noted that the level of  $\alpha$ -globulin is increased only at the expense  $\alpha_1$ -protein fraction whose value significantly higher than those in the control group. As for  $\alpha_2$ - and  $\beta$ -globulin, verification of changes in their content a shortage of protein not found us. Under conditions protein deficiency rate of albumin-globulin ratio is in the range of 0.83, indicating a decrease in reserve readily available amino acids and increased catabolism of proteins under these experimental conditions, which in turn may be a primary cause development of pathological conditions of the liver.*

*Keywords: total protein, albumin,  $\alpha_1$ -globulin,  $\alpha_2$ -globulins,  $\beta$ -globulins,  $\gamma$ -globulins, blood plasma, protein deficiency*

*Одержано редколлегією 27.02.2015*