

БІЛКОВИЙ СКЛАД СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

І. Степанець*, О. Моргаєнко, Л. Остапченко

*Навчально-науковий центр «Інститут біології»
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64, Київ 01601, Україна
e-mail: Stepanetsinna@bigmir.net*

Показано кількісні зміни вмісту білкових фракцій у сироватці крові щурів на різних етапах розвитку алкогольної інтоксикації. Встановлено зростання рівня фракції з м.м. 180 кДа на 22% на 28 добу введення етанолу. Визначено зниження рівня альбуміну (м.м. 67 кДа) на 21% на 14 добу, також показано зменшення вмісту білкової фракції з м. м. 52 кДа на 10% на 7 добу. Спостерігалось зниження вмісту фракції з м.м. 9 кДа на 12%, 27% на 14, 28 добу, тоді як на 7 добу відбулося її підвищення на 25%. Відбулося зростання вмісту фракцій 7 кДа і 208 кДа на 209%, 147%, 46% і 50%, 63%, 56%, відповідно, на 7, 14, 28 добу. Зазначено зростання вмісту фракції 27 кДа на 37% на 7, 14 добу і на 26% на 28 добу. Встановлено підвищення вмісту фракцій 113 кДа на 74% на 7 добу і зниження на 15%, 21% на 14 і 28 добу, відповідно. Відносний вміст фракції 105 кДа і 38 кДа знизився на 16%, 30%, 25% і на 8%, 15%, 17%, відповідно, на 7, 14, 28 добу за умов введення етанолу, а вміст білкової фракції 45кДа зростав на 8%, 17% на 14, 28 добу.

Ключові слова: алкогольна інтоксикація, білкові фракції, електрофорез.

Алкоголізм є однією з актуальних проблем сучасності. Ця проблема виходить за межі медицини і несе загрозу для безпеки як окремої особи, так і суспільства загалом [5]. Вивчення порушень, що виникають при дії етанолу на організм людини, обумовлене нагальною потребою часу [4]. Щорічно від захворювань печінки, спричинених алкоголем, у розвинених країнах Заходу помирає близько 2 млн людей, що тягне за собою дуже високі соціально-економічні затрати. В Україні кожного року від алкоголізму помирає понад 40 тис. осіб, налічується більше 900 тис. алкоголіків і набагато більше людей, які регулярно вживають алкогольні напої [1]. Незважаючи на велику кількість досліджень, що стосуються механізмів біологічної дії алкоголю [6, 7, 12], у літературі недостатньо висвітлені порушення білкового обміну за умов алкогольної інтоксикації. Це значно ускладнює цілісне сприйняття комплексних метаболічних змін, які лежать в основі клінічних проявів алкогольної інтоксикації, оскільки білки займають центральне місце у процесах життєдіяльності організму, входячи до складу всіх клітинних і міжклітинних структур, виконують каталітичну, структурну, регуляторну, рецепторну, транспортну, механічну, захисну та інші функції. Склад білків крові організму змінюється залежно від функціонального стану і зумовлює їхню роль в оцінці здоров'я людини як у нормі, так і за умов різних патологій [2, 9]. Відомо, що у сироватці крові людини міститься близько 100 різних білків. За допомогою електрофорезу їх можна поділити на кілька основних фракцій: альбуміни, α -, β -, γ -глобуліни [25]. Визначення вмісту білкових фракцій крові є показовим, оскільки має велике значення для діагностики багатьох захворювань. Альбуміни становлять найбільшу частину білків крові, відіграють важливу роль у підтримці онкотичного тиску крові, беруть участь у транспорті багатьох біологічних речовин: вуглеводів, ліпідів, окремих гормонів, а також мікроелементів (мідь, цинк, магній тощо) [21]. Вміст альбуміну

в сироватці крові має діагностичне значення, його зниження вказує на дисфункцію печінки, нирок або інших органів. Зазвичай цей показник знижений при цукровому діабеті, важкій алергії, запальних процесах. Рівень альбуміну в крові є показником білок-синтетичної функції печінки [15]. Збільшення вмісту альфа-глобулінів спостерігається при запальних процесах, стресових впливах на організм (травми, опіки, інфаркт міокарда тощо), а також при деяких хронічних захворюваннях, злоякісних новоутвореннях. У той час як зниження вмісту альфа-глобулінів відзначається при пригніченні їх синтезу в печінці за умов різних патологічних процесів, зростання вмісту бета-глобулінів спостерігається при атеросклерозі, цукровому діабеті, нефротичному синдромі. Зміна рівня гамма-глобулінів характерна для захворювань, пов'язаних із виснаженням, пригніченням імунної системи [8].

На сьогодні встановлено, що розвиток хронічної алкогольної інтоксикації супроводжується змінами основних біохімічних показників крові [3, 11]. Проте обмаль даних про зміни білкового складу на різних етапах розвитку алкогольної інтоксикації. Оскільки зміни співвідношення вмісту білкових фракцій можуть свідчити про метаболічні порушення в організмі, їх детальне вивчення під час формування розвитку алкогольної залежності дасть змогу не лише розширити наші уявлення про механізми даного патогенезу, а й розробити нові підходи до діагностики даної патології на ранніх етапах.

Тому метою нашої роботи було охарактеризувати вміст білкових фракцій у сироватці крові щурів на різних етапах за умов розвитку експериментальної моделі алкогольної інтоксикації.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на білих безпородних щурах (самцях) масою 180–200 г, що утримувались на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. Для експерименту було взято 40 щурів. Тварини були розділені на 2 групи: 1 група – інтактні тварини (контроль); 2 група – щури з хронічною алкогольною інтоксикацією, яким вводили етанол (40%) протягом 28 діб натщесерце зондом (з медичної сталі) з розрахунку 2 мл на 100 г маси тварини раз на добу за стандартною методикою М.Х. Халілова, Ш.А. Закірходжаєва [13]. Дана модель алкогольної інтоксикації щурів дає змогу отримати характерні патологічні зміни, властиві людині, за відносно коротким терміном.

Кров для аналізу відбирали на 7, 14, 28 добу. Сироватку отримували шляхом центрифугування крові при 1000 g протягом 15 хв, отриману надосадову рідину (сироватку) швидко відокремлювали від осаду (формених елементів крові) і використовували для дослідження.

Проведені дослідження відповідають основним вимогам щодо утримання та роботи з лабораторними тваринами згідно з правилами Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншими науковими цілями (Страсбург, 1986 р.), а також відповідно до етичних норм за українським законодавством.

Розділення білкових фракцій сироватки крові щурів проводили методом диск-електрофорезу у поліакриламідному гелі (ПААГ) за наявності додецилсульфату натрію (ДСН) за модифікованим методом Леммлі [18]. Концентрація акриламідну становила 12%. Маркерами молекулярних мас були бичачий сироватковий альбумін (БСА), альбумін курячого яйця та лізоцим («Serva», Німеччина). Відносний вміст білкових фракцій визначали за допомогою програми TotalLab 2.0 і виражали у відсотках від загального пулу. Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати і їхнє обговорення

Нами встановлено, що у всіх досліджуваних пробах, як у контрольних, так і за умов розвитку алкогольної інтоксикації, присутні білкові фракції з відносними молекулярними масами від 7 до 208 кДа (рис. 1).

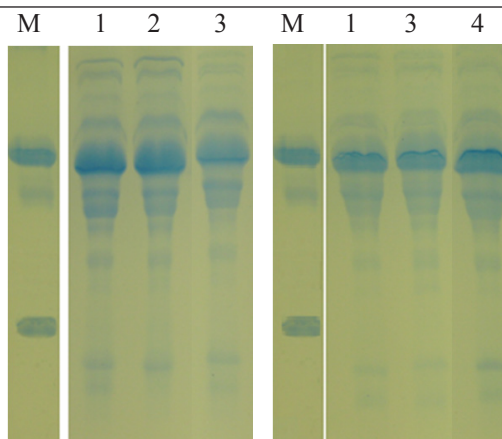


Рис. 1. М – маркери молекулярних мас (БСА-67 кДа, яєчний альбумін – 45 кДа, лізоцим – 14 кДа): 1 – контроль; 2 – етанол 28 діб; 3 – етанол 7 діб; 4 – етанол 14 діб.

При дослідженні вмісту білкових фракцій за умов алкогольної інтоксикації у сироватці крові не виявлено якісних змін білкового вмісту, однак можна відзначити їх кількісні зміни (табл. 1).

Таблиця 1

Відносний вміст білкових фракцій у плазмі крові щурів при алкогольній інтоксикації, % від загального ($M \pm m$, $n=10$)

Відносна ММ, кДа	Контроль	7 доба введення етанолу	14 доба введення етанолу	28 доба введення етанолу
208	1,6±0,03	2,4±0,02*	2,62±0,72*	2,49±0,46*
180	2,9±0,01	3,47±0,01*	3,38±0,54	3,54±0,27*
113	2,89±0,05	5,04±0,05*	2,46±0,58*	2,28±0,36*
105	8,94±0,03	7,48±0,07*	6,3±0,79	6,68±0,09*
67	40,17±0,11	35,42±0,49*	31,75±2,26*	38,87±3,54
52	8,78±0,06	7,94±0,03*	8,34±0,96	8,54±0,34
45	6,35±0,06	6,45±0,06	6,86±0,09*	7,41±1,17*
38	3,46±0,07	3,2±0,18	2,94±0,05*	2,87±0,13*
27	1,8±0,23	2,46±0,06*	2,47±0,35*	1,33±0,1*
9	3,35±0,21	4,18±0,42*	2,94±0,01*	2,45±0,28*
7	1,19±0,14	3,68±0,39*	2,94±0,05*	1,74±0,36*

Примітка. * – $P \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Так, спостерігається зростання рівня фракцій з м.м. 180 кДа на 7, 14 і 28 добу введення етанолу на 20%, 17%, 22%, відповідно. Можливо, зазначена фракція відповідає α_2 -макроглобуліну. Так, з літературних даних відомо, що α_2 -макроглобулін складається з 4-х однакових субодиниць молекулярною масою 180 кДа, належить до білків гострої фази, а його концентрація підвищується за умов патологічного стану (при запальних процесах), що розвивається і при введенні етанолу [24]. Відомо, що макроглобулін- α_2 синтезується у панкреатичній залозі, а вміст його підвищується при цирозі печінки, в якій він знешкоджується [21].

Також нами було встановлено зниження вмісту білкової фракції, найбільш представленої в сироватці – білки альбуміну (67 кДа) на 12% на 7 добу введення етанолу порівняно з контрольними значеннями. Тоді як на 14 добу спостерігалось максимальне зниження (на 21%). Це може свідчити про пригнічення білок-синтетичної функції печінки внаслідок ал-

коголізації, оскільки основним місцем синтезу альбумінів є саме гепатоцити [23]. Помірне зниження рівня альбумінів є ознакою хронічного патологічного процесу в печінці, що може в подальшому призвести до гепатиту, цирозу, інтоксикації, атрофії цього органа [19, 20].

Відомо, що до α -глобулінової фракції належать α_1 – антитрипсин, гаптоглобін, які належать до білків гострої фази, ступінь збільшення α -глобулінів відображає інтенсивність патологічного процесу [10, 11]. У результаті наших досліджень показано зниження вмісту білкової фракції з м.м. 52 кДа, яка відповідає м.м. α_1 -антитрипсину, на 10% на 7 добу введення етанолу порівняно з контрольними значеннями. Антитрипсин- α_1 може слугувати маркером гострофазного запалення на ранніх стадіях алкогольної інтоксикації. Можна припустити, що зміни вмісту зазначеної білкової фракції свідчать про розвиток ушкодження печінки за умов введення етанолу [10].

З літературних даних відомо, що гаптоглобін утворює комплекси з фрагментами гемоглобіну. Так, комплекс «гаптогемоглобін» з м.м від 85-450 кДа має пероксидазну активність. Молекула гаптоглобіну складається з двох ланцюгів по 40 кДа і двох ланцюгів по 16 чи 9 кДа, рівень яких значно зростає за умов різних патологічних станів (запалення, тканинне ушкодження, пухлинний процес та інші) [17, 21]. Зміна концентрації гаптоглобіну в крові може свідчити про запальний процес в організмі [3, 16]. Нами показано підвищення білкової фракції 9 кДа на 25% на 7 добу введення етанолу, тоді як на 14, 28 добу відбулося зниження на 12%, 27% відповідно. Гаптоглобін бере участь у захисті організму від втрати заліза, у процесах детоксикації, захищає білки від протеолізу, забезпечує транспорт вітаміну B_{12} , проявляє антиоксидантні властивості [14]. Зниження концентрації гаптоглобіну спостерігається при тяжкому ушкодженні паренхіми печінки.

Нами показано зростання рівня компонентів γ -глобулінової фракції з м.м. 208 кДа на 50%, 63%, 56% на 7, 14, 28 добу. До даної фракції належать імуноглобуліни А (160–380 кДа), G (150–170 кДа), **М (970 кДа), що володіють захисними властивостями, забезпечуючи гуморальний захист організму.** Імуноглобуліни (Ig) являють собою глікопротеїни з молекулярною масою від 150 до 1000 кДа. Молекули імуноглобулінів складаються з 4 ланцюгів: 2 однакових важких ланцюгів (50–70 кДа) і 2 легких ланцюгів (по 23 кДа) [22]. Це свідчить про активацію імунної системи, що зумовлює розвиток запального процесу [21].

Нами встановлено зростання вмісту білкової фракції у сироватці крові щурів з відносною м.м. 27 кДа на 37% на 7, 14 добу і 26% на 28 добу. Відбулося зростання вмісту білкової фракції з м. м. 7 кДа на 209%, 147%, 46% на 7, 14, 28 добу. Також встановлено зміни вмісту фракцій 113 кДа. Відбулося підвищення на 74% на 7 добу відповідно і зниження 15%, 21% на 14, 28 добу. Вміст фракції 105 кДа, 38 кДа знизився з 16%, 30%, 25% на 8%, 15%, 17% на 7, 14, 28 добу за умов введення етанолу, а вміст білкової фракції 45 кДа підвищувався на 8%, 17% на 14, 28 добу.

Таким чином, нами виявлено зміни відносного вмісту білкових фракцій у сироватці крові щурів у динаміці за умов розвитку алкогольної інтоксикації. Подальші дослідження особливостей змін білкового складу крові сприятимуть кращому розумінню біохімічних процесів за умов даної патології, що є важливим для розробки принципів нових підходів діагностики і лікування алкогольної залежності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бсленічев І. Ф., Соколик О. П., Абрамов А. В.* Фармакологічна модуляція сигналіngu апоптозу нейронів СА1-зони гіпокампа щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією // Фармакологія та лікарська токсикологія. 2011. Т. 25. № 6. С. 15–21.

2. Божко Г. Х., Волошин П. В. Действие этанола на белки тканей и сыворотки крови человека и животных // Успехи совр. биологии. 1989. Т. 108. Вып. 1. С. 58–65.
3. Граматюк С. М. Динаміка рівня білків гострої фази у хворих на хронічний вірусний гепатит С з нормальною та підвищеною активністю АлСТ // Медицина сьогодні і завтра. 2009. № 1. С. 103–105.
4. Гулий М. Ф. Про метаболічні порушення та корекція їх в організмі людини за алкоголізму та наркоманії // Укр. біохім. журнал. 2000. Т. 72. № 6. С. 103–106.
5. Дереча Л. М. Алкоголь та його дія на організм: огляд літератури // Вісн. Харків. ун-ту. 2007. Вип. 6. № 788. С. 7–16.
6. Дунаєв О. В. Вплив алкоголю на динаміку імунних показників крові померлих від ішемічної хвороби серця (ІХС) при встановленні давності настання смерті // Укр. судово-мед. вісн. 2000. № 1. С. 36–38.
7. Зейтц Г. Алкогольная болезнь печени // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2001. Т. 11. № 4. С. 62–63.
8. 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.
9. Кліц І. М., Криницька І. Я., Бекус І. Р. Вплив карнітину хлориду на показники білкового обміну у щурів за умов гострого алкогольного отруєння на тлі інтоксикації солями кадмію та свинцю // Медична хімія. 2006. Т. 8. № 3. С. 122–125.
10. Колесникова Е. В. Альфа-1-антитрипсиновая недостаточность: современный взгляд на проблему // Современная гастроэнтерология. 2008. Т. 40. № 2. С. 93–98.
11. Корякин А. М., Дадыка И. В., Епифанцева Н. Н. и др. С-реактивный белок и другие белки острой фазы воспаления у больных хроническим алкоголизмом // Сибирский мед. журнал. 2007. Т. 22. № 2. С. 38–39.
12. Нужный В. П. Механизмы и клинические проявления токсического действия алкоголя: Руководство по наркологии / под ред. чл.-корр. РАМН проф. Н.Н.Иванца. М.: Медпрактика, 2002. Т. 1. С. 74–93.
13. Халилов М. Х., Закиходжаев Ш. Я. К характеристике некоторых патохимических сдвигов в крови, тканях печени и головного мозга при экспериментальной алкогольной интоксикации // Вопросы клиники алкоголизма: науч. тр. Ташкент, 1983. С. 38–41.
14. Циганенко А. Я. Стан білків гострої фази (гаптоглобіну та церуплазміну) і показник антиоксидатного захисту супероксиддисмутази у хворих на хронічний гепатит // Гепатологія. 2011. № 2. С. 34–38.
15. Das S. K., Mukherjee S., Vasudevan D. M. Effects of long term ethanol consumption on cell death in liver // Clin Biochem. 2011. Vol. 26. N 13. P. 84–87.
16. Hossein Sadrzadeh S. M., Jafar Bozorgmehr. Haptoglobin Phenotypes in Health and Disorders // Am. J. Clin Pathol. 2004. Vol. 121. P. 97–104.
17. Iqbal Valette, Marcel Waks, John C. et al. Haptoglobin heavy and light chains // J. Biol. Chem. 1981. Vol. 256. P. 672–679.
18. Laemli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
19. Lieber C. S. Metabolism of alcohol and its implications for the pathogenesis of disease // Alcohol and the Gastrointestinal Tract. 1996. P. 19–29.
20. Marjolaine Roche, Philippe Rondeau, Nihar Ranjan et al. The antioxidant properties of serum albumin // FEBS Letters. 2008. N 582. P. 1783–1787.

21. *Ritchie R.* Wellness assessment: Targeted testing for specific problems which are not the measurement of health // *Serum Proteins in Clinical Medicine*. 1999. Vol. II, Clinical Section. – Foundation for Blood Research. Publishers: Scarborough. P. 120.00-1–120.00-9.
22. *Schroeder H. W. Jr., Cavacini L.* Structure and function of immunoglobulins // *J. Allergy Clin Immunol*. 2010. Vol. 125. N 2.P. 41–52.
23. *Tuma D. J., Sorrell M. F.* Effects of ethanol on protein trafficking in the liver // *Seminars in liver disease*. 1988. Vol. 8. N 1. P. 69–80.
24. *Vandenven F.* Human α 2-macroglobulin: structure and function // *Trends. Biochem. Sci.* 1982. Vol. 7. N 5. P. 185–187.
25. *Waqar A., Saad A., Khalid A.* et al. Diagnostic significance of serum protein electrophoresis // *Biomedica*. 2004. Vol. 20. P. 40–44.

Стаття: надійшла до редакції 05.06.12

доопрацьована 19.02.13

прийнята до друку 27.02.13

THE PROTEIN CONTENT IN BLOOD SERUM OF RATS UNDER ALCOHOL INTOXICATION DEVELOPMENT

I. Stepanets, O. Morgaienko, L. Ostapchenko

Educational and Scientific Center «Institute of Biology»

Taras Shevchenko National University of Kiev

64, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine

e-mail: Stepanetsinna@bigmir.net

The quantitative changes of protein fractions content in blood serum of rats at different stages under alcohol intoxication development it was shown. There was an increase of fraction level with m.m. 180 кДа by 22% on the 28th day of introduction of ethanol. The level of albumin with m.m. 67 кДа was decreased by 21% on the 14th day, the level of protein fraction with m.m. 52 кДа by 10% was also decreased by the 7th day. It was observed the reduction of protein fraction with m.m. 9 кДа by 12%, 27% on the 14, 28th days while on the 7th day there was an increase by 25%. Increase of protein fractions content with m.m. 7 кДа, 208 кДа by 209%, 147%, 46% and by 50%, 63%, 56% on the 7, 14, 28 days was established, the increase of the protein fractions content with m.m. 27 кДа by 37% on the 7, 14th days and by 26% on the 28th days was noted. Increase of fractions content with m.m. 113 кДа by 74% on the 7th day and decrease by 15%, 21% on the 14, 28th days were shown. The relative content of fractions with m.m. 105 кДа, 38 кДа was decreased by 16%, 30%, 25% and by 8%, 15%, 17% on the 7, 14, 28th days, and the protein fraction content with m.m. 45 кДа raised by 8%, 17% on the 14, 28th days.

Keywords: alcohol intoxication, proteins fraction, electrophoresis.

**БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ
ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ****И. Степанец, А. Моргаєнко, Л. Остапченко**

*Учебно-научный центр «Институт биологии»
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
ул. Владимирская, 64, Киев 01601, Украина
e-mail: Stepanetsinna@bigmir.net*

Показаны количественные изменения содержания белковых фракций в сыворотке крови крыс на разных этапах развития алкогольной интоксикации. Произошло повышение уровня фракции с м.м. 180 кДа на 22% на 28 сутки введения этанола. Установлено снижение уровня альбумина с м.м. 67 кДа на 21% на 14 сутки, также показано снижение содержания белковой фракции с м. м. 52 кДа, на 10% на 7 сутки. Наблюдалось снижение содержания фракции с м.м. 9 кДа на 12%, 27% на 14, 28 сутки, тогда как на 7 сутки произошло повышение на 25%. Установлено повышение содержания фракций 7 кДа, 208кДа на 209%, 147%, 46% и на 50%, 63%, 56% на 7, 14, 28 сутки. Отмечено увеличение содержания фракции 27 кДа на 37% на 7, 14 сутки и 26 % на 28 сутки. Показано повышение содержания фракций 113 кДа на 74% на 7 сутки и снижение на 15%, 21% на 14, 28 сутки. Относительное содержание фракций 105 кДа, 38 кДа снизилось на 16%, 30%, 25% и на 8%, 15%, 17% на 7, 14, 28 сутки, а содержание белковой фракции 45кДа повысилось на 8%, 17% на 14, 28 сутки.

Ключевые слова: алкогольная интоксикация, фракции белков, электрофорез.