

Иммунитет и ветеринария

УДК 636.053:619:577.112

**СВЯЗЫВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ АЛЬБУМИНА
И КОНЦЕНТРАЦИЯ МОЛЕКУЛ СРЕДНЕЙ МАССЫ
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ТЕЛЯТ ПРИ ДИАРЕЕ**

Р.В. БОРЧЕНКО, Р.Е. КИСЕЛЕВА, И.П. МАКОГОН

У телят черно-пестрой породы исследовали загруженность сывороточного альбумина лигандами при разной длительности и формах диареи. Определяли общую и эффективную концентрацию белка, а также концентрацию низкомолекулярных пептидов. На этом основании рассчитывали следующие параметры: коэффициент резерва связывания альбумина, индекс токсичности, критерий интоксикации. Оценивали изменение связывающей функции сывороточного альбумина в зависимости от концентрации среднемолекулярных пептидов в сыворотке крови.

Сыворотка крови представляет собой сложную многокомпонентную систему. В ее состав входит большое число неорганических и органических соединений, среди которых особое место занимают белки, обеспечивающие интеграцию обменных процессов. Один из основных сывороточных белков — альбумин. Кроме поддержания осмотического давления крови и белкового резерва организма, альбумин осуществляет транспортировку и депонирование слаборастворимых веществ экзогенного и эндогенного происхождения, содержащихся в крови (1, 2), участвуя тем самым в процессах детоксикации. Загруженность альбумина ксенобиотиками или метаболитами не только характеризует его активность при выведении токсинов из организма, но и позволяет косвенно оценить эффективность функционирования печени и почек как основных элементов системы детоксикации. Следовательно, определение связывающей активности альбумина важно для оценки уровня интоксикации и эффективности детоксикации.

Вещества, связывающиеся с альбумином, в основном гидрофобны или амфифильны (3, 4). Именно гидрофобные соединения — продукты свободнорадикального окисления, протеолиза и деградации белков считаются наиболее токсичными, поскольку легко связываются с клеточными мембранами и внутриклеточными белками, модифицируя их структуру, что приводит к изменению мембранной проницаемости и снижению ферментативной активности (5, 6). Эти вещества практически полностью находятся в связанном состоянии в виде комплексов с транспортными белками (в частности, альбумином) и липопротеинами низкой плотности, но при различных патологиях связывающая способность альбумина снижается (7, 8).

Универсальным показателем метаболических нарушений и снижения естественной детоксикации является также концентрация молекул средней массы в водорастворимой фракции сыворотки крови, содержащей и другие токсины (например, билирубин и мочевины). К средним молекулам относятся пептидные компоненты с молекулярной массой 500-5000 Да (гликопептиды, нуклеопептиды, олигосахара, некоторые спирты и производные глюконовых кислот). В норме их количество невелико, однако повышение концентрации молекул средней массы ведет к нарушению свойств биомембран, физиологических функций клеток и организма в целом (9-11).

Таким образом, эндогенная интоксикация определяется степенью дисбаланса между накоплением токсинов в крови и их выведением из организма. Следовательно, концентрацию молекул средней массы, харак-

теризующую процесс накопления водорастворимых токсинов в сыворотке крови, и лигандные свойства альбумина, отражающие состояние основной системы элиминации гидрофобных токсинов из кровяного русла, можно принять в качестве параметров оценки развития эндогенной интоксикации.

В задачу нашей работы входило определение альбуминовых показателей и концентрации молекул средней массы в динамике при диспепсии новорожденных телят. В общей структуре заболеваемости и падежа животных симптомокомплекс диареи занимает одно из первых мест и является предметом пристального внимания исследователей (12, 13), однако многое в этой патологии остается неясным, несмотря на значительные результаты в изучении этиологии и разработке методов лечения.

Методика. Объектом исследования служил клинически здоровый молодняк ($n = 40$), 1-, 3-, 5- и 10-суточные телята черно-пестрой породы с диареей ($n = 35$), а также телята в возрасте 1-10 сут с простой (легкой) ($n = 20$) и токсической (тяжелой) ($n = 22$) формами болезни (всего 117 гол.). Для оценки токсического действия метаболитов и степени загруженности сывороточного альбумина лигандами использовали флуоресцентный метод определения общей и эффективной концентрации альбумина (соответственно ОКА и ЭКА) с использованием зонда катиона К-35 (Ю.И. Миллер с соавт., 1994). Концентрацию молекул средней массы (МСМ) как показатель эндогенной интоксикации определяли спектрофотометрически по общепринятой методике (Н.И. Габриэлян с соавт., 1984). Расчетные коэффициенты РСА (резерв связывания альбумина), ИТ (индекс токсичности) и КИ (критерий интоксикации) вычисляли по формулам:

$$РСА = \frac{ЭКА}{ОКА} \cdot 100 \%; \quad ИТ = \frac{ОКА}{ЭКА} - 1; \quad КИ = \frac{МСМ}{ЭКА} \cdot 1000.$$

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программы «Statistica 6.0» и общепринятых методов (Г.Ф. Лакин, 1980).

Результаты. Эффективная концентрация альбумина (ЭКА) — это концентрация не занятых лигандами центров связывания альбумина, находящегося в сыворотке крови (имеется в виду связывание лигандов разной природы). Отношение ЭКА к ОКА, или резерв связывания альбумина (РСА), характеризует удельную лигандную активность альбумина. РСА не зависит от общей концентрации сывороточного альбумина. Индекс токсичности (ИТ), рассчитанный как отношение общей и эффективной концентрации альбумина минус 1, отражает степень накопления токсических метаболитов в организме (14).

В течение всего периода болезни, а также при разной степени тяжести заболевания общая концентрация альбумина (ОКА) оставалась в пределах нормы или изменялась незначительно, но отмечалось снижение ЭКА, отражающее падение его связывающей способности (табл.). Так, если в 1-е сут величина ЭКА в сыворотке крови телят практически не изменялась, то к 3-м сут показатель снижался на 21 %, а к 5-м — на 40 %. На 10-е сут заболевания наряду с незначительным повышением ОКА (относительно 5-х сут) его эффективная концентрация и резерв связывания (сорбционная емкость молекулы альбумина) возрастали на 17 %. Все это свидетельствует о снижении полноценности альбумина как сорбента лигандов и блокировании соответствующих центров связывания при развитии симптомокомплекса диареи.

Экспериментальные и расчетные показатели интоксикации в норме и при разной тяжести и длительности диспепсии у телят черно-пестрой породы

Показатель	Контроль (здоровые животные)	Форма заболевания		Продолжительность заболевания, сут			
		легкая	тяжелая	1-е	3-и	5-е	10-е
ОКА, г/л	45,93±1,50	45,75±1,83*	41,71±1,34**	46,13±1,51*	45,13±1,59*	43,20±1,44*	46,13±0,65**
ЭКА, г/л	42,73±1,38	28,63±1,16**	21,86±0,96**	40,40±1,39*	34,53±1,40*	25,73±1,11**	32,20±0,47**
РСА, %	93,05±0,64	62,74±1,81	52,29±0,94	87,54±0,60	76,39±0,87	59,41±1,06	69,84±0,71
ИТ, усл. ед.	0,07±0,008	0,60±0,05	0,92±0,03	0,14±0,008	0,31±0,02	0,69±0,03	0,43±0,01
МСМ, усл. ед.	0,30±0,006	0,32±0,007*	0,39±0,005*	0,32±0,003**	0,33±0,005*	0,34±0,002**	0,36±0,003*
КИ, усл. ед.	7,12±0,18	12,80±0,46	17,95±0,65	8,26±0,31	9,95±0,42	13,64±0,46	11,86±0,27

* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ (достоверность по отношению к исходным данным).

П р и м е ч а н и е. ОКА — общая концентрация альбумина; ЭКА — эффективная концентрация альбумина; РСА — резерв связывания альбумина; ИТ — индекс токсичности по альбумину; КИ — критерий интоксикации. Определение и расчет показателей описаны в разделе «Методика».

Чем тяжелее протекала диспепсия, тем ниже были значения регистрируемых показателей ЭКА и ОКА сыворотки крови относительно нормы. Наименьшие величины ЭКА и РСА и, как результат, более выраженное нарушение транспортной функции сывороточного альбумина были зафиксированы при токсической форме диареи — соответственно 52,6 и 54 %. При легкой форме частичная нормализация связывающей способности альбумина отмечалась при первых признаках выздоровления, когда у животных появлялся аппетит, прощупывался пульс. У 23 % исследуемых животных болезнь переходила в хроническую форму. У телят на фоне базовой терапии наблюдали улучшение общего состояния, некоторые симптомы проявлялись в стертой форме (непостоянный, менее выраженный понос, фекалии кашеобразные, реже жидкие). Животные с охотой принимали корм, но продолжали худеть.

Рост индекса токсичности по альбумину указывал на усиление токсикоза и означал повышение загруженности активных центров альбумина лигандами. В таком состоянии детоксикационные возможности молекулы альбумина уменьшаются вследствие снижения связывающей способности. Наибольшее увеличение ИТ отмечалось на 5-е и 10-е сут заболевания (соответственно в 9,5 и 6,4 раза).

С увеличением продолжительности заболевания происходило накопление МСМ в сыворотке крови. На протяжении 10 сут количество МСМ изменялось на 8-21 % по сравнению с нормой (контроль). Известно, что повышение концентрации средних молекул в сыворотке крови животных связано с активизацией микрофлоры кишечника: патогенные микроорганизмы продуцируют энтеротоксины, которые стимулируют аденилатциклазу мембран эпителиальных клеток через простагландины, образующиеся в кишечнике при воспалении. В результате усиливается секреция жидкости из крови в кишечник, что ведет к обезвоживанию организма. Усиление протеолиза белков, которое наблюдается при длительном воспалении, — еще один из источников пополнения пула молекул средней массы в плазме крови.

Изменения значений критерия интоксикации (КИ), рассчитанного на основании величин МСМ и ЭКА и характеризующего связь между количеством эндотоксинов и активностью системы детоксикации, имели колебательный характер. В 1-е сут КИ превышал контрольное значение на 14 %, на 3-е — на 42 %, а уже на 5-е сут — в 1,9 раза, но к 10-м сут отмечалось его снижение до значения, превышающего норму в 1,6 раза (см. табл.). Такой выраженный дисбаланс между накоплением и детоксикацией (связыванием) токсинов в сыворотке крови служит серьезным основанием для проведения детоксикационной терапии у больных животных.

Таким образом, возникающая у телят эндогенная интоксикация обусловлена накоплением биологически активных компонентов, усилением катаболических процессов, снижением активности детоксикационных систем. Выявленные изменения коррелируют со степенью тяжести состояния больных животных, а потому могут быть использованы в качестве дополнительного дифференциально-диагностического критерия при установлении формы и стадии симптомокомплекса диареи у новорожденных телят.

В заключение отметим, что сорбцию гидрофобных токсинов альбумином и липопротеинами рассматривают как важный механизм детоксикации крови, обеспечивающий многократное снижение количества токсинов и их доставку в печень для дальнейшего выведения из организма.

Особое значение этот механизм приобретает в случае низко- и среднемолекулярных токсинов, на которые не реагирует иммунная система из-за отсутствия у них иммуногенности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д о р ж и й н Н. Регуляция структурно-физических и функциональных свойств сывороточного альбумина физико-химическими факторами среды. Докт. дис. Пушкино, 1993.
2. К о л ы ш е в В.А. Связывание и транспорт веществ альбумином сыворотки крови. *Вопр. мед. хим.*, 1993, 1: 339-350.
3. Т и т о в В.Н. Альбумин, транспорт насыщенных жирных кислот и метаболический стресс-синдром (обзор литературы). *Клин. лаб. диагн.*, 1999, 4: 3-8.
4. У в е р с к и й В.Н., Н а р и ж н е в а Н.В. Влияние природных лигандов на структурные свойства и конформационную стабильность белков. *Биохимия*, 1998, 63 (4): 500-515.
5. Л о п у х и н Ю.М., Д о б р е ц о в Г.Е., Г р ы з у н о в Ю.А. Конформационные изменения молекулы альбумина: новый тип реакции на патологический процесс. *Бюл. exper. биол. и мед.*, 2000, 130(7): 4-9.
6. М и л л е р Ю.И. Связывание ксенобиотиков альбумином сыворотки крови. *Клин. лаб. диагн.*, 1993, 1: 34-40.
7. Г а в р и л о в В.Б., Б и д у л а М.М., Ф у р м а н ч у к Д.А. и др. Оценка интоксикации организма по нарушению баланса между накоплением и связыванием токсинов в плазме крови. *Клин. лаб. диагн.*, 1999, 2: 13-17.
8. Ж у к о в а Л.И., К о з ы р е в а В.В., Т а р а с о в а Л.С. Связывающая способность альбумина сыворотки крови у больных дифтерией. *Клин. лаб. диагн.*, 1999, 5: 16-19.
9. Г а в р и л о в Ю.А., Д и к и х Н.Ю., К р у ч и н к и н а Т.В. и др. Молекулы средней массы — показатель эндогенной интоксикации крупного рогатого скота. *Докл. РАСХН*, 2004, 3: 90-92.
10. С т е п а н о в а И.П., В л а с о в а И.В., Д м и т р и е в а Л.М. Интегральный метод диагностики метаболических нарушений у коров. *С.-х. биол.*, 2003, 4: 109-113.
11. С т е п а н о в а И.П., Д м и т р и е в а Л.М., П а т ю к о в А.Г. и др. Взаимосвязь между пероксидным окислением липидов, активностью антиоксидантной системы защиты и содержанием веществ низкой и средней молекулярной массы при интоксикации животных ацетальдегидом. *С.-х. биол.*, 2004, 4: 16-19.
12. Ф а з у л л и н Х.В., Ч у л и ч к о в а Т.В. Неполноценное кормление стельных коров как причина диспепсии у телят. *Био*, 2003, 11: 35-37.
13. К о н д р а х и н И.П. Диспепсия новорожденных телят — успехи, проблемы. *Ветеринария*, 2003, 1: 39-43.
14. Д о б р е ц о в Г.Е. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине /Под ред. Ю.А. Грызунова, Г.Е. Добрецова. М., 1998, кн. 2.

ГОУ ВПО Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева,
430000, г. Саранск, ул. Большевикская, 68;
e-mail: borchenko_rus@rambler.ru

Поступила в редакцию
12 сентября 2005 года

BINDING ACTIVITY OF ALBUMIN AND CONCENTRATION OF MOLECULES OF AVERAGE MASS IN CALVES BLOOD SERUM DURING DIARRHEA

R.V. Borchenko, R.E. Kiseleva, I.P. Makogon

S u m m a r y

In the calves of the Black-and-White breed the authors estimates «the loading» of serum albumin by ligands during of the different duration and form diarrhea. The total and effective concentration of protein and also the concentration of low-molecular peptides were determined. On this basis the following parameters were calculated: the coefficient of the binding reserve of albumin, the index of toxicity, the criterion of intoxication. The change of binding function of serum albumin was marked in connection with concentration of average-molecular peptides in blood serum. The investigated parameters may be used as additional differential-diagnostic criterion at the elucidation of the form and the stage of diarrhea symptomo-complex in newborn calves and for the substantiation of the detoxicational therapy carrying out.