

Академік НАН України Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко

Особливості формування білкового спектра плазми крові у ссавців у період новонародженості

Встановлено якісні та кількісні зміни білків плазми крові у телят перших 36 годин життя, що обумовлено метаболічною перебудовою в тканинах та абсорбцією нативних білків молозива, у зв'язку з адаптацією новонароджених ссавців до позаутробного існування в нових умовах оточуючого середовища.

Ключові слова: молозиво, новонароджені телята, колостральний імунітет, протеїнограма плазми крові, імуноглобуліни.

Відомо, що в організмі новонароджених ссавців із моменту ініціації власних процесів газообміну спрацьовують і поступово вдосконалюються механізми терморегуляції, детоксикації, травлення, регуляції кислотно-лужного й електролітного балансів та інші, що загалом забезпечується генетично визначеною метаболічною перебудовою в тканинах. Особливе значення в адаптації тварин до позаутробного розвитку належить процесам, які сприяють функціонуванню в їхньому організмі так званого колострального імунітету — унікальної форми імунного захисту новонароджених ссавців у перші місяці життя за рахунок засвоєння нативних імуноглобулінів молозива матері [1–3]. Це явище відмічається тільки протягом перших двох діб життя. При цьому γ -глобуліни молозива здатні проникати з кишечника в кров новонародженого організму без попереднього розщеплення. Власний синтез імунних білків формується протягом наступних 5–6 тижнів життя [4].

Як іноземними, так і вітчизняними вченими [1–7] багато зроблено для розкриття механізмів регуляції формування колострального імунітету та причин розвитку імунодефіцитного стану організму в новонароджених ссавців. Імунодефіцитний стан новонароджених обумовлює підвищення їх чутливості до збудників різноманітних інфекцій і токсинів, що не рідко закінчується летально [5]. Останнє наносить значні збитки галузі тваринництва [8, 9].

Мета дослідження — встановити особливості адаптаційних змін як імуноглобулінів, так і інших білків плазми крові у телят протягом перших 36 год позаутробного життя.

У дослід відбирали телят відразу після народження і утримували їх в експерименті впродовж перших 36 год життя ($n = 12$). Матеріалом дослідження була венозна кров, яку відбирали у тварин тричі: через годину після народження (до випоювання молозива) та на 24-ту і 36-ту год життя (після регулярної годівлі молозивом). У пробах плазми крові визначали вміст загального білка на біохімічному аналізаторі показників крові MicroLab-200 (“AVL”, Німеччина). Фракційний склад білків плазми крові телят досліджували методом вертикального електрофорезу в 10% поліакриламідному гелі з 0,1% розчином DS-Na на системі АВГЕ-1 “Хийу-Каллур” [10]. Математичну обробку денситограм здійснювали на лазерному денситометрі Ultrosan LX Laser Densitometer (LKB-Pharmacia, Швеція). Ідентифікували фракції білків за величиною R_f та маркерних протеїнів HMW (LKB-Pharmacia,

Швеція). Результати експериментальних досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики [11].

У результаті використання методу вертикального електрофорезу в поліакриламідному гелі в плазмі крові новонароджених телят ідентифіковано 16 фракцій білків [6, 10]: 1 — стартова зона представлена сумарною фракцією високомолекулярних білків із молекулярною масою >1000 кДа (зона β -ліпопротеїду і IgM); 2 — 725 кДа (зона α_2 -макроглобуліну); 3 — 340 кДа (зона фібриногену); 4 — 200–220 кДа (зона білків системи комплементу і пропердину); 5 — зона γ -глобулінів з молекулярною масою 161–163 кДа (IgG₁) і 150–154 кДа (IgG₂); 6 — 132 кДа (зона церулоплазміну); 7 — 100 кДа (зона гаптоглобіну); 8 — зона білків з молекулярною масою 96 кДа, що, можливо, є підфракцією гаптоглобіну, оскільки у великої рогатої худоби виявляють значний поліморфізм даного протеїну; 9 — 92 кДа (зона плазміногену); 10, 11, 12 — 79 кДа, 78 і 77 кДа (зона трансферинів); 13 — 72 кДа (зона постальбумінів), до цієї фракції, можливо, належать протромбін (72 кДа) і α -фетопротеїн (70 кДа); 14 — 68 кДа (зона альбуміну), до складу цієї фракції у новонароджених телят входять фетальні протеїни плазми (67,3 кДа); 15, 16 — білки зони преальбумінів з молекулярною масою 60 кДа (зона α_1 -антихімотрипсину і тироксинзв'язуючого глобуліну) та 58 кДа (зона гемопексину і транскортину) відповідно.

Кількісні зміни білків плазми крові телят впродовж перших 36 год життя відрізняються низкою закономірностей (табл. 1), що пояснюється деякими особливостями в цей період процесів травлення, всмоктування та біосинтезу білків у тканинах.

Досліджено, що на момент народження телят до першого випоювання молозива в плазмі крові відмічається низький рівень загального білка і відсутність або слідовий уміст протеїнів γ -глобулінової фракції (див. табл. 1). Імуноглобуліни у таких телят представлені класами G₁ і M [3]. Вказані білки мають важливе значення у формуванні загального й локального імунітету, тому незначний їхній уміст відразу після народження телят характеризує ареаактивний стан організму. Впродовж першої доби життя спостерігається інтенсивне підвищення рівня загального білка на 43% порівняно з вихідними даними.

Збільшення концентрації загального білка у телят на 24-ту год життя, як відомо [1–5], зумовлено значним умістом протеїнів у перших порціях молозива, наявністю інгібіторів протеаз [2, 3] і особливим рецепторним механізмом абсорбції нативних білків у кишечнику [1, 2, 5, 7]. Найактивніше цей процес відбувається при значеннях рН травних соків 6,0–6,5 [3, 4]. Максимальної величини рівень загального білка набуває на 36-ту год життя телят. Разом зі змінами рівня загального білка у плазмі крові телят на 24-ту і 36-ту год життя спостерігається вірогідне підвищення концентрації імуноглобулінів у 4,3 і 5 разів відповідно до часу спостережень. Ці результати свідчать про загальнобіологічне значення явища колострального імунітету у ссавців, що також підтверджується даними про рівень інгібіторів протеаз — α_2 -макроглобуліну і α_1 -антихімотрипсину (див. табл. 1). Встановлено, що на 24-ту год життя в плазмі крові телят вірогідно підвищується рівень α_2 -макроглобуліну на 74 % і α_1 -антихімотрипсину на 93%, а на 36-ту год життя має місце поступове зниження рівня цих білків відповідно на 47 і 50%. Як відомо [9], α_2 -макроглобулін належить до основних імуносупресорних протеїнів постнатального періоду життя. Тому підвищення їхнього вмісту в крові телят протягом першої доби життя з подальшим падінням рівня цих білків на 36-ту год життя свідчить про їхню важливу роль у формуванні імунного статусу організму новонароджених тварин.

Концентрація в плазмі крові альбуміну, що виконує транспортну, буферну та інші функції в організмі ссавців [6], збільшується на 31 і 56% відповідно на 24-ту і 36-ту год життя

(див. табл. 1). Встановлені закономірності щодо змін концентрації альбуміну, ймовірно, пов'язані з посиленням його біосинтезом *de novo* у новонароджених телят. Не виключено, що інтенсивне зростання концентрації цього білка в плазмі крові новонароджених телят відбувається також за рахунок всмоктування нативних альбумінів молозива в кишечнику (на зразок імуноглобулінів).

Останнє припущення стосується і таких фракцій білків, як: зони гаптоглобіну, гемопексину, трансферинів, церулоплазміну, тироксинзв'язуючого протеїну і транскортину, ретинолзв'язуючого протеїну і β -ліпопротеїду, рівень яких у плазмі крові телят також значно підвищується. Це доводить важливість функцій зазначених білків крові, як і імуноглобулінів, для ссавців у період новонародженості.

Таблиця 1. Білки плазми крові у новонароджених телят, $M \pm m$; $n = 12$

Білки крові	Мол. маса, кДа	Од. виміру	Період дослідження		
			до випоювання молозива	на 24-ту год життя	на 36-ту год життя
Загальний білок		г/л	48,70 \pm 0,76	69,80 \pm 0,25*	72,70 \pm 0,20*
1 фр., зона β -ліпопротеїду і IgM	950–1000	%	9,38 \pm 3,01	7,86 \pm 1,11	6,34 \pm 0,72
		г/л	4,41 \pm 1,34	5,59 \pm 0,91	4,64 \pm 0,33
2 фр., зона α_2 -макроглобуліну	725	%	8,05 \pm 0,57	8,93 \pm 0,10	4,31 \pm 0,21
		г/л	3,77 \pm 0,30	6,55 \pm 0,78	3,34 \pm 0,22
3 фр., зона фібриногену	340	%	3,13 \pm 0,71	2,99 \pm 0,61	1,71 \pm 0,31
		г/л	1,53 \pm 0,36	2,05 \pm 0,41	1,28 \pm 0,26
4 фр., зона білків системи комплементу і пропердину	200–220	%	1,21 \pm 0,09	1,66 \pm 0,45	2,14 \pm 0,29*
		г/л	0,58 \pm 0,04	1,20 \pm 0,32	1,61 \pm 0,21
5 фр., зона γ -глобулінів	161–163+	%	4,70 \pm 1,02	14,08 \pm 0,25*	14,81 \pm 0,96*
	+150–154	г/л	2,23 \pm 0,53	9,63 \pm 0,14*	11,17 \pm 0,73*
6 фр., зона церулоплазміну	132	%	2,07 \pm 0,52	4,10 \pm 0,13*	2,23 \pm 0,13
		г/л	1,25 \pm 0,31	2,84 \pm 0,18*	1,67 \pm 0,10
7 фр., зона гаптоглобіну	100	%	1,37 \pm 0,18	3,09 \pm 0,33*	2,85 \pm 0,24*
		г/л	0,77 \pm 0,15	2,14 \pm 0,21*	2,26 \pm 0,18*
8 підфр. гаптоглобіну	96	%	5,13 \pm 0,76	3,82 \pm 0,52	3,26 \pm 0,14*
		г/л	2,60 \pm 0,35	2,62 \pm 0,30	2,44 \pm 0,13
9 фр., зона плазміногену	92	%	1,82 \pm 0,31	1,40 \pm 0,25*	1,23 \pm 0,12
		г/л	0,90 \pm 0,15	0,97 \pm 0,16	0,94 \pm 0,11
10 фр., зона трансферинів	79	%	1,48 \pm 0,22	1,14 \pm 0,15	1,12 \pm 0,11
		г/л	0,72 \pm 0,12	0,81 \pm 0,11	0,86 \pm 0,09
11 фр., зона трансферинів	78	%	2,50 \pm 0,32	2,63 \pm 0,40	1,65 \pm 0,20*
		г/л	1,20 \pm 0,15	1,85 \pm 0,26*	1,24 \pm 0,17
12 фр., зона трансферинів	77	%	4,06 \pm 0,80	2,86 \pm 0,19	3,53 \pm 0,12
		г/л	1,93 \pm 0,34	1,98 \pm 0,11	2,60 \pm 0,06
13 фр., зона постальбумінів	72	%	7,31 \pm 0,78	5,42 \pm 0,41*	5,46 \pm 0,30*
		г/л	3,49 \pm 0,30	3,77 \pm 0,27	4,08 \pm 0,28
14 фр., зона альбуміну	68	%	43,03 \pm 2,62	39,09 \pm 0,21	42,84 \pm 0,69
		г/л	20,59 \pm 0,78	27,09 \pm 0,89	32,09 \pm 1,19*
15 фр., зона α_1 -антихімотрипсину і тироксинзв'язуючого глобуліну	60	%	0,56 \pm 0,05	0,79 \pm 0,06	0,39 \pm 0,09
		г/л	0,30 \pm 0,02	0,58 \pm 0,06	0,29 \pm 0,07*
16 фр., зона гемопексину і транскортину	58	%	2,82 \pm 0,72	3,35 \pm 0,32	4,72 \pm 0,44
		г/л	1,34 \pm 0,32	2,34 \pm 0,24*	3,55 \pm 0,36*
Альбумін/глобулін			0,77	0,61	0,77

*Вірогідна різниця ($p < 0,05$) динаміки вмісту білків плазми крові порівняно з вихідними даними.

Так, в організмі ссавців динаміка концентрації гаптоглобіну, гемопексину і сумарної фракції трансферинів тісно пов'язана з процесами біосинтезу й катаболізму гемоглобіну. Більш того, стабільне збільшення їхньої концентрації в плазмі крові здорових новонароджених телят (відповідно у 2,8, 1,2 і 1,7 раза на 24-ту год життя та у 2,9, 1,2 і 2,6 раза на 36-ту год життя), можливо, зумовлено інтенсивною заміною в організмі фетального типу гемоглобіну на дорослий.

Пік функціональної активності церулоплазміну припадає на 24-ту год життя. У подальшому його рівень поступово знижується (на 42%). Цей купрумвмісний протеїн виявляє оксидазну активність, бере участь у регуляції обміну вказаного металу, транспортує купрум до місць синтезу відповідних ензимів дихального ланцюга [6].

У плазмі крові телят у період дослідження характерно змінюється концентрація сумарних фракцій тироксинзв'язуючого протеїну, транскортину і ретинолзв'язуючого протеїну. Кожна молекула тироксинзв'язуючого протеїну зв'язує одну молекулу тироксину. Такий процес дуже чутливий до змін величини рН [6]. Тому, можливо, вихід новонароджених телят із стану респіраторно-метаболического ацидозу при народженні поєднується з підвищенням його концентрації на 24-ту год життя (на 93%). І навпаки, зсув КЛС крові у кислий бік сприяє зниженню рівня фракції тироксинзв'язуючого протеїну на 36-ту год життя (на 50%). Підвищення в плазмі крові вмісту транскортину, очевидно, пов'язано з необхідністю підтримання в крові новонароджених телят відповідної концентрації активних форм кортикостероїдів. Так, на 24-ту год їхнього життя рівень вказаної білкової фракції збільшується на 75%, а на 36-ту год — на 52%.

Динаміка рівня в плазмі крові телят сумарної фракції β -ліпопротеїду характеризується тенденцією до підвищення на 24-ту год життя (на 27%) і подальшим зменшенням на 17% на 36-ту год. Функція цього протеїну полягає в транспорті в кров'яному руслі нерозчинних у воді ліпідів [6].

Поряд з цим у плазмі крові телят виявляється вірогідне підвищення вмісту білків системи комплементу (у 2,0–2,8 раза порівняно з вихідними даними) як на 24-ту, так і на 36-ту год життя. Комплемент вважають одним із найбільш універсальних факторів природної резистентності [6]. Тому зазначені зміни концентрації протеїнів системи комплементу в крові телят свідчать про підвищення реактивності їхнього організму, починаючи вже з першої доби життя.

Аналогічна тенденція спостерігається щодо динаміки вмісту білків зсідання крові: фібриногену, протромбіну, плазміногену. Останнім часом доведено, що фібриноген виявляє буферні властивості, чим підтримує сталість КЛС крові [10], і сприяє виходу новонароджених телят із природного для цього періоду життя стану респіраторно-метаболического ацидозу.

Отже, у плазмі крові новонароджених телят перших годин життя встановлено якісні та кількісні зміни білкового спектра плазми крові, що збігається з періодом інтенсивного формування колострального імунітету, заміною фетального типу протеїнів на дорослий та забезпечується генетично визначеною метаболическою перебудовою в тканинах, тісно пов'язаною з адаптацією тварин до позаутробного існування. Припускається, що інтенсивне зростання концентрації окремих фракцій протеїнів (200–220 кДа; 161–163+150–154; 100; 96; 68 і 58 кДа) може бути наслідком не тільки активації білоксинтезувальних процесів у тканинах, підвищеного вмісту їхніх фетальних форм у плазмі крові, але й нативного засвоєння протеїнів у кишечнику з молозива на зразок імуноглобулінів. Важливо, що встановлені закономірності щодо формування білкового спектра плазми крові можуть мати місце і у новонароджених дітей.

Цитована література

1. Zarcula S., Cernescu H., Knop R. Colostral immunity in newborn calf: methods for improvement of immunoglobulins absorption // *Lucrări stiinifice medicină veterinară*. – 2009. – **41**. – P. 195–202.
2. Цвіліховський М. І., Мельничук Д. О., Усатюк П. В. Рецепторно-ендоцитозний механізм формування колострального імунітету в новонароджених телят // *Ветеринарна медицина України*. – 2001. – № 5. – С. 42–43.
3. Мельничук Д. О., Цвіліховський М. І., Грищенко В. А. Закономірності формування колострального імунітету в новонароджених телят // *Укр. біохім. журн.* – 2002. – **74**, № 2. – С. 21–24.
4. Hernández-Castellano L. E., Morales-de-laNuez A., Sánchez-Macias D., Moreno-Indias I., Torres A., Capote J., Argüello A., Castro N. The effect of colostrum source (goat vs. sheep) and timing of the first colostrum feeding (2 h vs. 14 h after birth) on body weight and immune status of artificially reared newborn lambs // *J. Dairy Science*. – 2015. – **98**, Is. 1. – P. 204–210.
5. Conneely M., Berry D. P., Murphy J. P., Lorenz I., Doherty M. L., Kennedy E. Effect of feeding colostrum at different volumes and subsequent number of transition milk feeds on the serum immunoglobulin G concentration and health status of dairy calves // *J. Dairy Science*. – 2014. – **97**, Is. 11. – P. 6991–7000.
6. Кухта В. К., Олецкий Э. И., Стожаров А. Н. Белки плазмы крови: патохимия и клиническое значение: справочник. – Минск: Беларусь, 1986. – 80 с.
7. Кармолиев Р. Х. Роль иммуносупрессорных белков в системе иммунитета у крупного рогатого скота // *Ветеринария*. – 1991. – № 8. – С. 23–24.
8. Исаев В. В., Косорлукова З. Я., Хрисанфова Т. Д. и др. Коррекция иммунодефицитов для профилактики желудочно-кишечных болезней новорожденных телят // *Ветеринарная патология*. – 2005. – № 4. – С. 113–116.
9. Лисицын В. В., Мищенко А. В., Кононов А. В. и др. Проблемы колострального иммунитета у новорожденных телят // *Ветеринарная патология*. – 2006. – № 4. – С. 161–164.
10. Laemmly V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature*. – 1970. – **227**, No 5259. – P. 680–685.
11. Кучеренко М. Є., Бабенюк Ю. Д., Войцицький В. М. Сучасні методи біохімічних досліджень. – Київ: Фітосоціоцентр, 2001. – 412 с.
12. Луговской Э. В., Макогоненко Е. М., Комисаренко С. В. Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина: физико-химический и иммунохимический анализ. – Киев: Наук. думка, 2013. – 230 с.

References

1. Zarcula S., Cernescu H., Knop R. *Lucrări stiinifice medicină veterinară*, 2009, **41**: 195–202.
2. Tsvilivovskyy M. I., Melnychuk D. O., Usatyuk P. V. *Veterynarna Medytsyna Ukrainy*, 2001, No 5: 42–43.
3. Melnychuk D. O., Tsvilivovskyy M. I., Gryshchenko V. A. *Ukr. Biokhim. Zh.*, 2002, **74**, No 2: 21–24 (in Ukrainian).
4. Hernández-Castellano L. E., Morales-de-laNuez A., Sánchez-Macias D., Moreno-Indias I., Torres A., Capote J., Argüello A., Castro N. *J. Dairy Science*, 2015, **98**, Is. 1: 204–210.
5. Conneely M., Berry D. P., Murphy J. P., Lorenz I., Doherty M. L., Kennedy E. *J. Dairy Science*, 2014, **97**, Is. 11: 6991–7000.
6. Kuchta V. K., Olecko E. I., Stozharau A. N. *Blood plasma proteins: pathological chemistry and clinical significance: a handbook*, Minsk: Belarus, 1986 (in Russian).
7. Karmoliev R. H. *Veterynaryia*, 1991, No 8: 23–24 (in Russian).
8. Isaev V. V., Kosorlukova Z. Y., Khrisanfova T. D. *Veterynarnaia potolohyia*, 2005, No 4: 113–116 (in Russian).
9. Lisitsyn V., Mischenko A. V., Kononov A. V. *Veterynarnaia potolohyia*, 2006, No 4: 161–164 (in Russian).
10. Laemmly V. K. *Nature*, 1970, **227**, No 5259: 680–685.
11. Kucherenko M. J., Babenyuk Y. D., Voytsitsky V. M. *Modern methods of biochemical research*, Kiev: Fitosocialcentr, 2001 (in Ukrainian).
12. Lugovskoy E. V., Makogonenko E. M., Komisarenko S. V. *Molecular mechanisms of formation and destruction of fibrin: physicochemical and immunochemical analysis*, Kiev: Naukova Dumka, 2013 (in Russian).

Академик НАН Украины Д. А. Мельничук, В. А. Грищенко

Особенности формирования белкового спектра плазмы крови у млекопитающих в период новорожденности

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев

Установлены качественные и количественные изменения белков плазмы крови у телят первых 36 часов жизни, которые обусловлены метаболической перестройкой в тканях и абсорбцией нативных белков молозива, в связи с адаптацией новорожденных млекопитающих к внеутробному существованию в новых условиях окружающей среды.

Ключевые слова: молозиво, новорожденные телята, колостральный иммунитет, протеинограмма плазмы крови, иммуноглобулины.

Academician of the NAS of Ukraine D. O. Melnychuk, V. A. Gryshchenko

The formation peculiarities of the protein spectrum of blood plasma in mammals during the neonatal period

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev

In the calves that are 36 hours old, the qualitative and quantitative changes of the blood plasma proteins, which are caused by the metabolic restructuring in tissues and by the absorption of the colostrum native proteins, in connection with the adaptation of newborn mammals to the extrauterine existence in the new environment, are elicited.

Keywords: colostrum, newborn calves, colostrum immunity, proteinogramme blood plasma, immunoglobulins.