

БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Холод В.М., Баран В.П., Бизунов А.В.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

В статье представлены экспериментальные данные по количественному содержанию белка в слезной жидкости крупного рогатого скота и описан белковый спектр слезной жидкости по результатам дифференциального диск-электрофореза в полиакриламидном геле. Ключевые слова: слезная жидкость, белковый состав, диск-электрофорез.

PROTEIN COMPOSITION OF TEAR FLUID OF CATTLE

Kholod V.M., Baran V.P., Bizunov A.V.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

The article presents experimental data on quantitative protein content in the tear fluid of cattle and describes the protein spectrum of the tear fluid based on the results of differential disk electrophoresis in polyacrylamide gel. Keywords: tear fluid, protein composition, disk electrophoresis.

Введение. Изучение химического состава органов и тканей сельскохозяйственных животных позволяет получить достаточно полное представление о процессах обмена веществ, как в норме, так и при патологии. Все большее распространение в ветеринарной медицине получают биохимические тесты для контроля за состоянием здоровья животных, функциональной деятельностью отдельных органов и тканей, режимом кормления и содержания, а также продуктивных качеств животных. Помимо общепринятых клинических методов используют физиологические и биохимические показатели, характеризующие уровень обменных процессов. Эти данные получают обычно в результате химического исследования органов и тканей, физиологических жидкостей.

В основе патологических процессов, происходящих в организме при заболеваниях самого различного генеза, лежат изменения структуры и свойств биомолекул и связанные с ними нарушения обмена веществ. В настоящее время имеется большой экспериментальный материал по химическому составу крови, мочи, желчи, а также других биологических жидкостей и секретов, который используется для определения биохимического статуса организма, диагностики заболеваний, изучения патогенеза и разработке на его основе наиболее эффективных методов лечения и профилактики различных заболеваний [1, 2].

Однако аналогичные биохимические исследования слезной жидкости при глазных заболеваниях у крупного рогатого скота, обусловленные как системными заболеваниями, так и специфическими поражениями тканей глазного яблока, изучены недостаточно. Это касается как преломляющих сред глазного яблока (хрусталик, роговица, стекловидное тело, внутрглазная жидкость), так и биохимического состава слезной жидкости, непосредственно связанного с обменом веществ в этих тканях. Особенности химического состава и обмена веществ в тканях глазного яблока связаны не только с биохимическими процессами, которые обусловлены специфической функцией органа зрения, но и наличием гемато-офтальмического барьера, препятствующего свободному перемещению веществ из крови в ткани и жидкости глазного яблока [3, 4].

Слезная жидкость является специфическим секретом слезной железы и по современным исследованиям отражает химический состав и химические процессы в тканях глазного яблока, как в норме, так и при патологии [5, 8]. Это, в первую очередь, касается белкового состава слезной жидкости, так как белки являются ее основным органическим компонентом. Белки слезы выполняют пластические и транспортные функции, поддерживают необходимое коллоидно-осмотическое давление, обеспечивают функционирование других биосоединений, а также осуществляют защитную функцию. Если белки сыворотки крови сельскохозяйственных животных хорошо изучены и широко используются как в клинической, так и в экспериментальной ветеринарии, то в отношении белков слезной жидкости этого сказать нельзя. В то же время в медицинской офтальмологии имеется большое количество исследований, указывающих на изменение белкового состава слезной жидкости при патологии органа зрения, а также некоторых системных заболеваниях и возможности использования этих изменений в клинико-диагностических целях. Например, при синдроме «сухого глаза» повышается уровень сывороточного альбумина при снижении секреции слезной жидкости, при диабетической ретинопатии в слезной жидкости выявлено существенное изменение содержания таких белков, как липокалин-1, лакритин и лактоферрин [10, 11, 12].

В зависимости от характера заболевания и цели исследования (диагностика, мониторинг заболевания, результаты лечения), исследуются различные белки и белковые кластеры. Так, например, нормализация белкового состава слезной жидкости контролируется по альбумину, а увеличение концентрации лактоферрина характерно для воспалительных процессов. Исследование имму-

ноглобулинов в сыворотке крови и слезной жидкости позволяет оценить состояние общего и местного иммунитета при инфекционных заболеваниях.

Материалы и методы исследований. Был исследован белковый состав слезной жидкости десяти голов крупного рогатого скота (коровы в возрасте 4-5 лет).

Так как содержание белка в слезной жидкости значительно ниже, чем в сыворотке крови, то нами был использован метод Брэдфорда. Предварительный сравнительный анализ показал, что он обладает более высокой чувствительностью, воспроизводимостью по сравнению с другими методами (биуретовым, спектрофотометрическим и др.) [9].

Белковый состав слезной жидкости исследовали методом дифференциального вертикального диско-электрофореза в поликариламидном геле. Данный метод обладает высокой разрешающей способностью, так как разделение зависит не только от заряда белковой молекулы, приобретаемого в буферном растворе с определенным значением pH, но и от эффекта «молекулярного сита», обусловленного размером пор геля, зависящего от концентрации акриламида. Использовалась система из двух разделяющих гелей с концентрацией по акриламиду 4,75 % (гель №1) и 10 % (гель №2). Окраску гелей осуществляли 0,5 % раствором красителя Кумасси G-250. Так как белковый состав слезной жидкости у крупного рогатого скота изучен недостаточно и возможно наличие белков с высокой электрофоретической подвижностью, то при проведении электрофореза устанавливали различную экспозицию по времени - 2, 3 и 5 часов.

В качестве стандарта для сравнения использовались сыворотка крови крупного рогатого скота и белковый спектр слезной жидкости человека, которые изучены достаточно хорошо. Органно-тканевая специфичность исследовалась в реакции иммунодиффузии в геле с использованием антисыворотки к белкам сыворотки крови крупного рогатого скота.

Количественное определение содержания белковых фракций проводилось на сканирующем денситометре DM 2120.

Результаты исследований. Среднее содержание общего белка в слезной жидкости крупного рогатого скота составляет 25 г/л, что в 3-3,5 раза ниже, чем в сыворотке крови. В случае обильного слезотечения оно может значительно снижаться.

Белковый спектр не является стабильным. При использованном методе исследования и режиме проведения электрофореза в нем обнаруживалось от 12 до 16 фракций. Это может быть обусловлено как индивидуальными особенностями животных (полиморфизм белков и др.), так и временем экспозиции. При увеличении времени электрофоретического разделения быстрые фракции «сходят» с разделительного геля и не проявляются на протеинограмме.

К стабильным белкам, фракции которых обнаруживаются, относятся лизоцим, альбумин, Ig G, специфические белки тканей глаза (кристаллины) и белки, имеющие иное происхождение (лактоферрины).

Электрофорез в поликариламидном геле до настоящего времени является одним из наиболее эффективных методов исследования белкового состава органов и тканей. Он позволяет обнаруживать большое количество белковых фракций, но в то же время это создает большие трудности в расшифровке белкового спектра. Поэтому первичная расшифровка его проводится в рамках классификации Тизелиуса с делением всей протеинограммы на альбуминовую, α , β и γ - глобулиновые фракции.

В анодной части протеинограммы слезной жидкости всегда четко просматривается более массивная фракция альбумина, которая легко идентифицируется при сравнении с протеинограммой сыворотки крови крупного рогатого скота и слезной жидкости человека, где она может составлять до 50 % от содержания общего белка в слезной жидкости. Поэтому при оценке протеинограммы слезной жидкости у человека она используется не только при офтальмологических заболеваниях, но и в целях идентификации белкового спектра и количественной оценки всей протеинограммы.

В реакции иммунодиффузии в геле с использованием антисыворотки к белкам сыворотки крови крупного рогатого скота альбумин слезной жидкости и сыворотки крови давал эффект антигенной идентичности.

В зоне α -глобулинов слезной жидкости крупного рогатого скота определяется до 6 белковых фракций, сформированных как белками, характерными для сыворотки крови, так и специфическими белками тканей глаза. Среди α -глобулинов сывороточных белков в слезной жидкости человека идентифицированы церулоплазмин, α -химотрипсин, цинк - α_2 – микроглобулин и др. Фракции с аналогичной подвижностью имеются и на протеинограмме слезной жидкости крупного рогатого скота.

В зоне β -глобулинов в протеинограммах слезной жидкости находится от 5 до 7 фракций с различной электрофоретической подвижностью. В их числе стабильно обнаруживается на границе с γ -областью фракция лактоферрина, специфического белка, относящегося к семейству трансферринов и дающего характерную реакцию на железо. Трансферрины относятся к белкам с явно выраженным полиморфизмом, что может обуславливать различие в количестве белковых фракций, обнаруживаемых на протеинограмме.

В реакции иммунодиффузии с антигетерологичной антисывороткой в этой зоне обнаружились 2 линии преципитации, сформированные белками, имеющими общие антигенные детерминанты с белками сыворотки крови.

В зоне γ -глобулинов находится диффузная фракция иммуноглобулина G, дающая перекрестную реакцию с иммунной сывороткой к белкам сыворотки крови и по своей структуре и электрофоретической подвижности соответствующая аналогичной фракции сыворотки крови. Вблизи старто-вой линии находятся 2-3 фракции белков, обладающих высокой молекулярной массой и низкой электрофоретической подвижностью, которые резко тормозятся при входе в 10 % разделяющий гель с малым размером пор. Именно такой массой обладает иммуноглобулин M (900 кДа) и а-кристаллины хрусталика (700 кДа).

Зона преальбуминов значительно отличается от аналогичной протеинограммы сыворотки крови крупного рогатого скота, в которой при аналогичном режиме электрофореза в полиакриламидном геле обнаруживается только 1 слабая фракция. Протеинограмма белков слезной жидкости в этой области содержит 4-5 более крупных фракций, одна из которых, наиболее массивная, принадлежит лизоциму. В слезной жидкости он составляет 15-17 % от общего белка. Обладая высокой электрофоретической подвижностью, она обнаруживается на протеинограмме только при экспозиции менее 2-х часов. Аналогичная фракция слезной жидкости крупного рогатого скота содержит в среднем 7,12 % от общего белка с индивидуальными колебаниями от 2,32 до 16,1 %. Остальные преальбуминовые фракции, аналоги которых отсутствуют в протеинограмме сыворотки крови крупного рогатого скота, сформированы γ -кристаллинами (20 кДа), электрофоретическая подвижность и молекулярная масса которых позволяет им мигрировать через небольшие поры 10 % разделятельного геля и занимать соответствующее место на протеинограмме (рисунок).

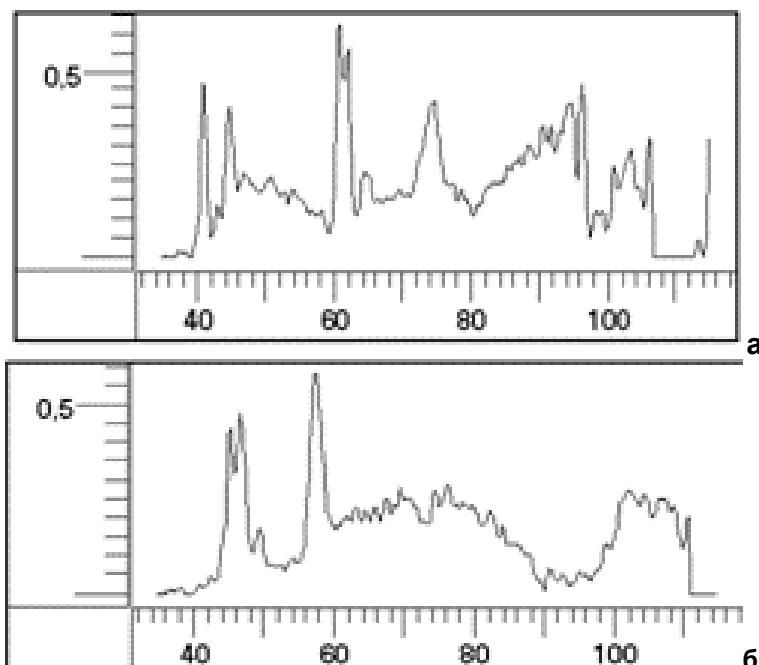


Рисунок – Электрофореграммы белков слезной жидкости при минимальном (а) и максимальном (б) времени экспозиции (максимальный пик принадлежит альбумину, слева - преальбуминовая зона)

Заключение. Исследован белковый состав слезной жидкости крупного рогатого скота. Установлено, что содержание общего белка в ней составляет в среднем 25 г/л, что в 3-3,5 раза ниже, чем в сыворотке крови. Для его количественного определения рекомендован метод Брэдфорда, обладающий более высокой чувствительностью и специфичностью. Описан белковый спектр слезной жидкости по результатам дифференциального диск-электрофореза в полиакриламидном геле. Он представлен как белками сыворотки, способными проходить через гемато-офтальмический барьер (альбумин, IgG), так и специфическими белками тканей глаза (кристаллины). Белковые фракции представлены во всех стандартных зонах электрофоретической протеинограммы: преальбуминовой, альбуминовой, α , β и γ -глобулиновых.

Литература.

- Холод, В. М. Клиническая биохимия : учебное пособие. В 2-х частях / В. М. Холод, А. П. Курдеко. – Витебск : УО ВГАВМ, 2005. – Ч. 1-2.
- Холод, В. М. Справочник по ветеринарной биохимии / В. М. Холод, Г. Ф. Ермолаев..- Минск : Ураджай, 1988. - 168 с.
- Копаева, В. Г. Хрусталик / Глазные болезни : учебник / Под ред. В. Г. Копаевой. – Москва : Медицина, 2002. - 560 с.

4. Морозов, В. И. Гематоофтальмический барьер: структурно-функциональные особенности / В. И. Морозов // Российский офтальмологический журнал. – 2017. - № 10 (4). С. 68-72. doi: 10.21516/2072-0076-2017-10-4-68-72.
5. Бржеский, В. В. Синдром «сухого глаза» / В. В. Бржеский, Н. Е. Сомов. - СПб. : «Аполлон», 1998. - 96 с.
6. Бржеский, В. В. Слезная жидкость в диагностике некоторых повреждений и заболеваний глаз : автореф. дис. ... к. м. н. / В. В. Бржеский. - Ленинград, 1990. – 23 с.
7. Бржеский, В. В. Слезная жидкость - биологический материал для диагностических исследований / В. В. Бржеский, Е. Е. Сомов // Актуальные проблемы детской офтальмологии : науч. материалы. - СПб., 1995. - С. 28-31.
8. Сомов, Е. Е. Слеза / Е. Е. Сомов, В. В. Бржеский. - СПб. : Наука, 1994. – 156 с.
9. Холод, В. М. К возможности определения белка в преломляющих средах глазного яблока крупного рогатого скота / В. М. Холод, В. П. Баран, А. В. Бизунов // Российский ветеринарный журнал. - 2023. - № 3 – С. 21-24. DOI 10.32416/2500-4379-2023-3-21-24.
10. Quantitative analysis of proteins in the tear fluid of patients with diabetic retinopathy / É. Csősz, P. Boross, A. Csutak [et al.] // J. Proteomics. – 2012. - № 75. – Р. 2196–2204. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.01.019.
11. Comparison of tear proteins between healthy and early diabetic retinopathy patients / H. J. Kim, P. K. Kim, H. S. Yoo [et al.] // Clin. Biochem. – 2012. - № 45. – Р. 60–67. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.10.006.
12. Proteomic analysis of human lacrimal and tear fluid in dry eye disease / J. H. Jung, Y. W. Ji, H. S. Hwang [et al.] // Sci Rep. – 2017. - № 7 (1). – Р. 13363. DOI: 10.1038/s41598-017-13817-y.

Поступила в редакцию 08.10.2025.