

В. А. ПУШНЯКОЎ, В. М. ХОЛАД

ЭЛЕКТРАФАРЭТЫЧНЫЯ І ІМУНАХІМІЧНЫЯ ЎЛАСЦІВАСЦІ БЯЛКОЎ НЫРАК БУЙНОЙ РАГАТАЙ ЖЫВЁЛЫ

З хімічнага пункту гледжання бялкі адносяцца да асабліва рэактыўных рэчываў, таму яны з'яўляюцца важным фактам біяхімічнай адаптациі арганізма як у фізіялагічных умовах, так і пры паталогії.

Вывучэнне структуры, фізіка-хімічных і антыгенных уласцівасцей бялкоў органаў і тканак садзейнічае раскрыццю іх ролі ў метабалічных працэсах у арганізме жывёлін. Аналіз літаратурных даных паказвае на недастатковую вывучанасць фізіка-хімічных і імунагенічных уласцівасцей бялкоў органаў і тканак сельскагаспадарчых жывёлін, за выключеннем крыві, што ў складніце ацэнку іх функцыянальных асаблівасцей, біялагічную ролю, сувязь структуры і функцыі. Змяненне біяхімічных працэсаў у розных ўзроставых перыяды, залежнасць іх ад розных умоў існавання, патагенез многіх захворванняў не могуць быць дэталёва выучаны без уліку ўласцівасцей бялкоў і асаблівасцей бялковага метабалізму.

Вядома, што найбольш важнай прыкметай, якая характерызуе захворванні нырак, з'яўляецца пратэінурыя [1, 2]. Пры гэтым у мачу могуць пераходзіць як бялкі сывараткі крыві (пры парушэнні фільтрацыйна-рэабарбуючага механізма), так і бялкі нырак (пры пашкоджванні нырачнай тканкі). Дыферэнцыяцыя іх у мачы можа мець значэнне ў мэтах дыагностикі — для высвятлення характеристу нырачнай паталогіі. Хоць, як паказалі нашы даследаванні, пашкоджанні нырак у сельскагаспадарчых жывёлін сустракаюцца даволі часта, электрафарэтычныя і імунагенічныя ўласцівасці бялкоў нырак вывучаны мала [3, 4].

Намі была паставлена задача вывучыць электрафарэтычную карціну бялкоў нырак, параваны з бялковым спектрам сывараткі крыві, правесці параўнальны антыгенный аналіз бялкоў сывараткі крыві і нырак.

Даследаванні праводзілі на матэрыяле, атрыманым на Віцебскім мясакамбінаце. Ныркі бралі ад клінічна здаровых жывёлін у час забою. Для электрафарэтычнага аналізу матэрыял быў узяты ад 10, а для імунагенічнага — ад 20 жывёлін.

Для атрымання гомагенатаў з ныркі выразалі тонкія пласцінкі коркавага і мазгавога сладоў, абіскроўлівалі іх шляхам сціскання паміж лістамі фільтравальнай паперы і прымывалі фізіялагічным раствором. Гомагенізавалі тканку расціраннем са шклом у фізіялагічным растворы (1 : 10) і наступным двухразовым замарожваннем. Адтая гомагенаты цэнтрыфугавалі 15 мін пры 3000 аб/мін. Цэнтрыфугат выкарыстоўвалі для пастаноўкі дыск-электрафарэза ў поліакрыламідным гелі і імунагенетычнага аналізу.

Дыск-электрафарэз у поліакрыламідным гелі праводзілі, выкарыстоўваючы раздзяляльныя гелі 4,75- і 10%-най канцэнтрацыі па акрыламіду, імунагенетычнага аналізу — па класічнай схеме Грабара [5, 6]. У якасці кантролю пры дыск-электрафарэзе ў поліакрыламідным гелі выкарыстоўвалі сываратку крыві, якая разводзілася такім чынам, каб канцэнтрацыя альбуміну ў ёй прыкладна адпавядала гомагенату. На гелевыя калонкі наносілі па 0,1 мл цэнтрыфугату і 0,015 мл разведзенай сывараткі крыві.

Імунную сываратку да бялкоў нырак атрымлівалі шляхам працяглай імунізацыі трусоў гомагенатамі органа. Першы этап уключаў шэсць унутрывенных ін'екций ва ўзрасточных дозах з інтэрвалам адзін-дні. У далейшым праводзілі троі размножалі з інтэрвалам 30 дзён і на-

**Характеристика бялкоў нырак буйной рагатай жывёлы па даных
электрафарэзу ў ПААГ**

Нумар фракцыі	Коркавы слой			Мазгавы слой			
	зона	рухомасць, $M \pm t$	сустра- кальнасць, %	Нумар фракцыі	зона	рухомасць, $M \pm t$	сустра- кальнасць, %
1	Прэальбумінавая	$1,316 \pm 0,005$	100	1	Прэальбумінавая	$1,307 \pm 0,003$	100
2	Тое ж	$1,061 \pm 0,003$	100	2	Тое ж	$1,065 \pm 0,001$	100
3	Альбумінавая	$1,000 \pm 0,000$	100	3	Альбумінавая	$1,000 \pm 0,000$	100
4	α -глабулінавая	$0,949 \pm 0,005$	100	4	α -глабулінавая	$0,937 \pm 0,002$	100
5	Тое ж	$0,886 \pm 0,002$	100	5	Тое ж	$0,917 \pm 0,002$	50
6	»	$0,814 \pm 0,004$	100	6	»	$0,838 \pm 0,008$	60
7	β -глабулінавая	$0,707 \pm 0,002$	100	7	»	$0,781 \pm 0,004$	50
8	γ -глабулінавая	$0,611 \pm 0,004$	100	8	»	$0,745 \pm 0,004$	100
9	Тое ж	$0,535 \pm 0,004$	60	9	β -глабулінавая	$0,679 \pm 0,005$	100
10	»	$0,405 \pm 0,004$	100	10	γ -глабулінавая	$0,604 \pm 0,005$	100
11	»	$0,247 \pm 0,002$	100	11	Тое ж	$0,503 \pm 0,004$	100
12	»	$0,016 \pm 0,000$	100	12	»	$0,385 \pm 0,005$	100
				13	»	$0,231 \pm 0,005$	100
				14	»	$0,017 \pm 0,000$	100

сёмы дзень пасля апошняй бралі кроў. Па гэтай жа схеме атрымлівалі імунную сываратку да бялкоў сывараткі крыві.

Імунаэлектрафарэз ставілі на фотапласцінках 9×12 , адмытых ад эмульсіі ў 1%-ным агаравым гелі на веранал-медыналавым буферы (рН 8,2, іонная сіла 0,05) пры градыенце патэнцыялу 4,5 В/см.

Пры ацэнцы электрафарэграм іх падзялялі на зоны, якія па электрафарэтычнай рухомасці адпавядаюць асноўным бялковым фракцыям сывараткі крыві. У адпаведнасці з гэтым прынцыпам атрыманыя электрафарэграмы разбівалі на прэальбумінавую, альбумінавую, α -, β - і γ -глабулінавыя зоны. Электрафарэтычную рухомасць фракцыі вызначалі ў адносінах да альбуміну (табліца).

У бялковым спектры коркавага слоя нырак выяўляецца каля 12 фракцыяў. Характэрнай асаблівасцю электрафарэграм бялкоў нырак з'яўляецца наяўнасць слаба афарбаванага фону, які назіраецца ў зонах α -, β - і γ -глабулінаў. Ён ствараецца, відаць, гетэрагеннымі бялкамі, якія слаба дыферэнцыруюцца ў дадзеных умовах раздзялення. У прэальбумінавай зоне пастаянна прысутнічаюць дзве фракцыі з электрафарэтычнай рухомасцю 1,316 і 1,061. У контрольнай сываратцы крыві (разведзенай у 7—10 разоў) бялковыя фракцыі ў прэальбумінавай зоне не выяўляюцца.

Пры даследаванні мачы жывёлін з паталогіяй нырак (інтэрстыцыяльны нефрит) у прэальбумінавай зоне выяўляюцца бялковыя фракцыі. Пры аналізе урапратэінаў бялкі гэтай зоны лічацца бялкамі нырачнага паходжання [3].

Фракцыя, якая адпавядае сываратачнаму альбуміну, шчыльная, гамагенная з ярка выражанымі граніцамі; электрафарэтычная рухомасць яе прынята за 1.

У зоне α -глабулінаў выяўляюцца трох фракцыі: адна ніткападобная з электрафарэтычнай рухомасцю, блізкай да альбуміну, і дзве з больш нізкай рухомасцю, буйныя, добра выражаныя. У зоне β -глабулінаў ёсьць масіўная фракцыя з электрафарэтычнай рухомасцю 0,707. У пратэінаграме сывараткі крыві ў зоне α - і β -глабулінаў праглядаюцца трох-чатыры слаба прыкметныя фракцыі.

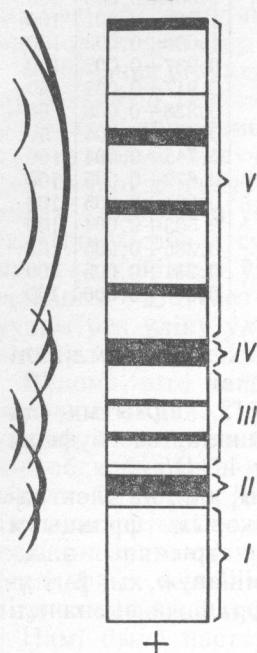
Зона γ -глабулінаў у бялковым спектры нырак не мае выразных граніц. Бялкі размяркоўваюцца ў гэтай зоне дыфузна, але ў ёй выдзяляюцца больш інтэнсіўна афарбаваныя фракцыі, якія адпавядаюць бялкам з электрафарэтычнай рухомасцю 0,611, 0,535, 0,405, 0,247, 0,016. У сываратцы крыві дыфузная імунаглабулінавая зона, якая назіраецца ў гэ-

тай частцы пратэінаграмы, малапрыкметная і не мае асобна выдзеленых фракций.

У мазгавым слоі нырак выяўляецца каля 14 фракцый. Большасць бялковых фракций мазгавога слоя нырак па электрафарэтычнай рухомасці і тапаграфіі супадаюць з бялкамі коркавага слоя. Некаторыя адрозненні назіраюцца толькі ў α -глабулінавай зоне, дзе ёсць больш фракций, але сустракаюцца яны не на ўсіх электрафарэграмах.

Увогуле пратэінаграмы бялкоў нырак і сывараткі крыві вельмі ад-
ропніваюцца, што сведчыць аб істотных адроз-
неннях іх фізіка-хімічных уласцівасцей, якія
добра прыкметны пры візуальнай ацэнцы акрыл-
амідных пратэінаграм.

Адрозненне фізіка-хімічных асаблівасцяў да-
звале праводзіць дыферэнцыяцию нырачных і
сывараточных бялкоў і пры біяхімічных дыяг-
настычных даследаваннях. Пры цяжкіх пратэі-
нурыях у мачы могуць выяўляцца і γ -глабуліна-
вая фракцыі, аднак вырашыць пытанне аб іх
тканкавай прыналежнасці простым электрафа-
рэтычным даследаваннем цяжка. Выкарыстанне
спецыяльнага асаджальніка бялкоў — поліэты-
ленгліколю-6000 дазваляе паказаць наяўнасць
 γ -глабулінаў нырачнага паходжання. Калі бялкі
сывараткі крыві, якія мігрыруюць у зону γ -гла-
булінаў, поўнасцю асаджаюцца поліэтленглі-



Бялковы спектр коркавага слоя нырак буйной рагатай жы-
вёлы: I — прэальбумінавая, II — альбумінавая, III — α -гла-
булінавая, IV — β -глабулінавая, V — γ -глабулінавая зоны

колем-6000 пры 15%-най канцэнтрацыі, то бялкі нырак часткова заста-
юцца ў растворы.

Антыхімічны ўласцівасці бялкоў нырак вывучаліся пры выкарыстан-
ні антысываратак да бялкоў нырак і бялкоў сывараткі крыві. Пры іму-
напраяўленні бялкоў нырак антысываратакі да бялкоў сывараткі крыві
ў імунаэлектрафарэтычным спектры выяўляюцца лініі прэцыпітацыі аль-
буміну і імунаглабуліну G, прычым у мазгавым слоі яны выражаны ў
больш значнай ступені.

У імунаэлектрафарэтычным, аналізе з антысываратакі да бялкоў
нырак выяўляецца ад 7 да 10 ліній прэцыпітацыі. Антыгенны спектр ны-
рак з'яўляецца больш бедным у параўнанні з антыгенным спектрам сыв-
араткі крыві, хоць насычанаецца электрафарэтычнага спектра бялкамі
ў яго не ніжэйшая. Улічаючы аднолькавую схему імунізацыі, можна
заключыць, што бялкі нырак у буйной рагатай жывёлы валодаюць больш
нізкай імунагенасцю, што, відаць, звязана з асаблівасцямі іх антыген-
най структуры.

Па аналогіі з электрафарэтычным (у адпаведнасці з класіфікацыяй
Грабара) імунаэлектрафарэтычны спектр падзяляецца на прэальбумі-
навую, альбумінавую, α -, β - і γ -глабулінавыя зоны.

У альбумінавай зоне выяўляюцца адна лінія прэцыпітацыі, па тапа-
графіі аналагічная лініі прэцыпітацыі альбуміну сывараткі крыві, але
менш інтэнсіўная. Слабая прэальбумінавая лінія прэцыпітацыі перася-
кае яе ў анодным канцы. У зоне α -глабулінаў выяўляюцца дзве-тры лі-
ніі прэцыпітацыі, якія адрозніваюцца па інтэнсіўнасці, ступені выгну-
ласці і размяшчэнні ў адносінах да рэзервуара з антыгенам і антысыва-

раткай. У зоне β -глабулінаў знаходзяцца дзве, а ў зоне γ -глабулінаў — каля чатырох ліній прэцыпітацыі. Адна з іх цягнецца праз зоны γ , β - і α -глабулінаў і па тапаграфіі аналагічная імунаглабуліну G сывараткі крыва; трох іншых, валодаючы меншай электрафарэтычнай рухомасцю, фарміруюць дугі прэцыпітацыі ў катоднай частцы імунаэлектрафарэграмы (рысунак).

Паколькі поўнасцю абяскровіць ныркі практычна немагчыма і, акрамя таго, бялкі сывараткі крыва могуць сінтэзацца не толькі ў печані, але ў невялікай колькасці і ў іншых органах, быў праведзены параўнальны антыгенны аналіз бялкоў сывараткі крыва і ныркі. З гэтай мэтай аслаблялі імунную сываратку да бялкоў нырак сывараткай крыва. Вынікі адсорбцыі паказалі, што вялікая частка бялкоў, якія сфарміравалі лініі прэцыпітацыі ў імунаэлектрафарэтычным спектры нырак, маюць агульныя антыгенные дэтэрмінанты з бялкамі сывараткі крыва. Пасля аслаблення выяўляюцца дзве лініі прэцыпітацыі ў зоне γ -глабулінаў і адна ў зоне прэальбумінаў.

Вынікі электрафарэтычнага і імунахімічнага даследавання бялкоў нырак сведчаць аб пэўных адрозненнях фізіка-хімічных і антыгенных уласцівасцяў у параўнанні з бялкамі крыва. Гэтыя адрозненні могуць быць выкарыстаны пры вывучэнні патагенезу і дыагностицы нефропатый, пры аналізе сывараткі крыва і мачы хворых жывёлін.

Summary

The work presents the results of electrophoretic and immunochemical study of kidney proteins in cattle. The kidney protein spectrum has been described here, occurrence and electrophoretic mobility of certain fractions has been also shown. The comparative antigenic analysis of kidney proteins and blood serum has been made.

Літаратура

1. Чиж А. С. Протеинурия. Клиническое значение и патогенез. Минск, 1983. 142 с.
2. Шюк О. Функциональное исследование почек. Прага, 1975. 334 с.
3. Пушняков В. А., Холод В. М., Вантеев В. В. // Ветеринарная наука — производству: Межвед. сб. Минск, 1988. Вып. 26. С. 123—126.
4. Пушняков В. А., Холод В. М. // Физиол. и биохим. основы повышения продуктивности с.-х. животных: Сб. науч. тр. Ленинград. вет. ин-та. 1984. № 77. С. 73—79.
5. Холод В. М. Белки сыворотки крови в клинической и экспериментальной ветеринарии. Минск, 1983. 78 с.
6. Грабар П., Буртэн П. Иммуноэлектрофоретический анализ. М., 1963. 206 с.