

Ааре КИРСИПУУ

К МЕТОДИКЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ РЫБ

В исследованиях по физиологии метаболизма рыб часто в качестве одного из важнейших показателей рассматривается изменение (или различие) так наз. абсолютного количества белка в сыворотке или плазме крови, т. е. количество белка, выраженное в грамм-процентах ($g\%$). Этим показателем можно пользоваться при оценке физиологического состояния рыбы (Сорвачев, 1957; Кузьмина, 1966; Коромыслов, 1969; Любина, 1970; Haider, 1970), а также при характеристике физиологических процессов, протекающих в организме рыбы (Сорвачев, 1957; Кузьмина, 1966; Литвинова, 1968; Haider, 1970; Pesch, 1970; Недина, 1971). Далее, на основе этого показателя вычисляют «абсолютное количество» белка в каждой фракции белков сыворотки (плазмы) и выясняют их динамику (Кузьмина, 1966; Квасова, 1968; Недина, 1971).

По существу этот показатель мы не можем назвать «абсолютным» (термин взят из медицинской литературы), так как в действительности он является относительным как и все выраженные в процентах отношения. В таком случае вернее говорить о концентрации белка (общего или белка данной фракции) в грамм-процентах в отличие от относительного количества (или содержания) белка во фракции в процентах.

Абсолютным мы можем назвать только количество белка (общего или белка любой фракции), рассчитанное на единицу веса тела, как это предлагал П. А. Коржув (Коржув, 1967; Квасова, 1968).

Определение концентрации белка в сыворотке (или плазме) крови рыб производится до сих пор весьма различными методами.

Одним из наиболее распространенных методов, особенно среди исследователей Советского Союза, является определение концентрации белка в сыворотке (плазме) крови рыб через показатель преломления (Сорвачев, 1957; Сорвачев и др., 1962; Кирсипуу, 1964 и 1966; Кузьмина, 1966; Шатуновский и др., 1967; Кузьмина, 1968; Huang Chau-Ting, Hickman, 1968; Исаев и др., 1969; Любина, 1970; Римш, 1970; Недина, 1971). Однако при этом часто не указываются таблицы, с помощью которых рассчитываются концентрации белка. Используются также определение азота по Кьельдалю (Deutsch, McShan, 1949; Lysak, Wojcik, 1960; Головки, 1964) и методы, основанные на биуретовой реакции (Got, 1965; Литвинова, 1968; Haider, 1970). Разнообразие методов не позволяет сравнивать результаты исследований различных авторов.

Поскольку о пригодности рефрактометрического метода определения содержания белка в сыворотке крови были выражены сомнения (Кирси-

пуу, 1964; Литвинова, 1968), мы сравнивали полученные методом биуретовой реакции по Лоури и сотрудников данные о концентрации белка в сыворотке (плазме) крови некоторых видов рыб с показателями преломления тех же сывороток.

Материал и методика

Исследовалось 28 лещей, выловленных в ноябре 1966 г. и в январе—феврале 1967 г., 13 судаков (сентябрь 1966 г. и январь 1967 г.), 13 щук (январь—февраль 1967 г.) и 97 экземпляров радужной форели, доставленных в апреле 1969 г. из рыбхоза «Пылула» (ЭССР).

Кровь брали у открытой рыбы стеклянной пипеткой из сердца, отделяли центрифугированием гепаринизированную плазму (у радужной форели) или давали крови отстоять, пока не отделилась сыворотка (у остальных видов).

Концентрацию белка в сыворотке (плазме) определяли по методу Лоури и др. (Тодоров, 1963), а показатель преломления — с помощью термостатированного при температуре 20 °С рефрактометра РЛ-2.

Результаты и обсуждение

Связь между данными, полученными о концентрации белка в сыворотке (плазме) по Лоури и др., и показателем преломления представлена на рис. 1—4.

Если через найденные точки провести кривую, которая должна выражать корреляцию между концентрацией в сыворотке белка и показателем преломления, то можно установить следующее.

1. У всех изученных видов, кроме радужной форели, наблюдается довольно тесная связь между показателем преломления и содержанием белка в сыворотке крови. Из-за небольшого количества особой коэффициент корреляции был вычислен по формуле Спирмена $\rho = \frac{6\Sigma d^2}{N(N^2-1)}$. У радужной форели корреляция вычислена на ЭВМ Урал-4.

Как выясняется из табл. 1, у разных видов рыб коэффициент корреляции между концентрацией белка и показателем преломления сильно различен (даже в пределах одного вида в разные времена года). У радужной форели названная корреляция в данном случае совсем не наблюдалась (рис. 4).

2. Разбросанность точек (случаев) вокруг линии предполагаемой корреляции у разных видов различается (лещ — рис. 1, щука — рис. 2), что указывает на различное у разных видов влияние биохимического состава крови на белковую его систему.

3. Разные виды рыб имеют различный угол линии предполагаемой корреляции: у щуки и судака зимой угол наклона сходен, а у леща он отличается (рис. 1—3).

4. Угол наклона, по-видимому, различен и у представителей одного и того же вида в зависимости от времени года (рис. 3, судак).

Необходимо отметить, что имеющиеся в нашем распоряжении материалы не показывают половых различий в корреляции между концентрацией белка и показателем преломления сыворотки крови рыб.

Из указанных положений следует, что показатель преломления может быть использован для определения концентрации белка в сыворотке (или плазме) крови рыб, но только при условии, что для каждого вида в разный сезон года на основе прямого определения белка будет составлен контрольный график (или таблицы). По-видимому, на показатель преломления сыворотки (плазмы) влияет не только содержание в последней белка, но и других оптически активных веществ, в первую очередь

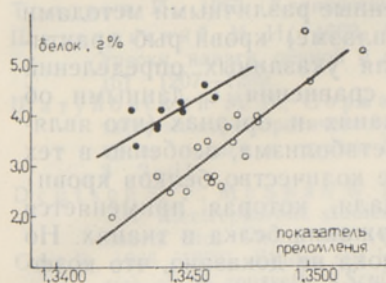


Рис. 1. Связь между концентрацией белка и показателем преломления сыворотки крови леща. ● — ноябрь, о — январь—февраль

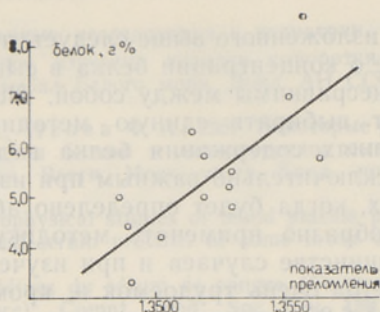


Рис. 2. Связь между концентрацией белка и показателем преломления сыворотки крови щуки (январь—февраль)

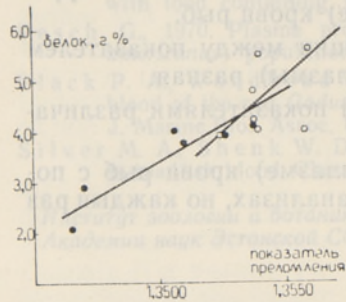


Рис. 3. Связь между концентрацией белка и показателем преломления сыворотки крови судака. ● — сентябрь, о — январь—февраль

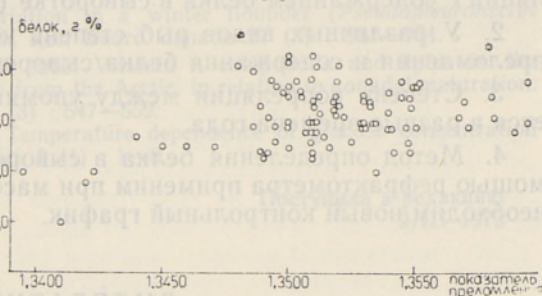


Рис. 4. Связь между концентрацией белка и показателем преломления сыворотки крови радужной форели (апрель).

Корреляция между содержанием белка и показателем преломления сыворотки (плазмы) крови у различных видов рыб

Вид рыбы	Осенью			Зимой		
	N	$\rho(r)$	$d=0,01$	N	$\rho(r)$	$d=0,01$
Лещ	9	0,800	0,735	19	0,859	0,549
Судак	6	0,962	0,834	7	0,630	0,798
Щука	—	—	—	13	0,662	0,641
Радужная форель	—	—	—	97	0,052	0,258

липидов и сахаров, содержание которых в крови рыб может колебаться в значительных пределах. Например, у *Opsanus tau* при 0° в крови сахара 90 мг/100 мл, а при 19° — 23 мг/100 мл (Silver, Shenk, 1968). Значительные сезонные колебания и половые различия в содержании липидов крови трески обнаружили П. А. Плэк и П. М. Д. Вудхэд (Plack, Woodhead, 1966) и М. И. Шатуновский (1969). Так как по данным названных авторов содержание сахара и липидов в крови рыб значительно повышается при низкой температуре (зимой), то этим, вероятно, объясняется и высокое содержание белка в крови рыб, описанное на основе рефрактометрических определений Н. Н. Литвиновой (1968) и А. Кирсипу (1964).

Из изложенного выше следует, что полученные различными методами данные о концентрации белка в сыворотке (плазме) крови рыб практически несравнимы между собой. Поэтому для указанных определений следует выбирать единую методику. Для сравнения с данными об изменениях содержания белка в других тканях и органах (что является исключительно важным при изучении метаболизма, особенно в тех случаях, когда будет определено абсолютное количество белков крови) целесообразно применять методику Кьельдаля, которая применяется в большинстве случаев и при изучении содержания белка в тканях. Но этот метод очень трудоемок и, кроме того, пока не доказано, что коэффициент 6,25 является правильным в отношении белков рыб и что он для рыб разных систематических групп не различается.

Выводы

1. Показатель преломления находится до некоторой степени в корреляции с содержанием белка в сыворотке (плазме) крови рыб.
2. У различных видов рыб степень корреляции между показателем преломления и содержания белка сыворотки (плазмы) разная.
3. Степень корреляции между упомянутыми показателями различается в разные времена года.
4. Метод определения белка в сыворотке (плазме) крови рыб с помощью рефрактометра применим при массовых анализах, но каждый раз необходим новый контрольный график.

ЛИТЕРАТУРА

- Головко Н. И., 1964. Электрофоретическое исследование белков сыворотки крови «крупной» и «мелкой» ставрид Черного моря. Тр. АзЧерНИРО, Вып. 22 : 73—94.
- Исаев Ф. А., Макарова Н. П., Сорвачев К. Ф., Шатуновский М. И., 1969. Состав липидов печени, гонад и сывороточных белков беломорской трески и наваги. Вестн. Моск. ун-та. Биол., почвовед. (1) : 7—14.
- Квасова И. П., 1968. О белковой системе сыворотки крови налима. В сб.: Эколого-физиологические особенности крови рыб. М. : 110—115.
- Кирсипуу А., 1964. О сезонных изменениях соотношений белковых фракций сыворотки крови рыб. Изв. АН ЭССР, сер. биол. 13 (4) : 278—283.
- Кирсипуу А., 1966. Сравнение белкового состава сыворотки крови судака Пярусского залива и озера Выртъярв. Изв. АН ЭССР, сер. биол. 15 (1) : 77—82.
- Коржуев П. А., 1967. Некоторые проблемы биохимии рыб. В сб.: Обмен веществ и биохимия рыб. М.
- Коромыслов Г. Ф., 1969. Белковый состав сыворотки крови молоди карпов в норме и патологии. Бюл. Всес. ин-та эксперим. ветеринарии. Вып. 6 : 36—39.
- Кузьмина В. В., 1966. Электрофоретическое изучение белков сыворотки крови рыб при длительном голодании. Гидробиол. ж. 2 (4) : 74—77.
- Кузьмина С. А., 1968. Характеристика плазмы крови судака Курского залива Балтийского моря. В сб.: Эколого-физиологические особенности рыб. М. : 116—120.
- Литвинова Н. Н., 1968. О сезонных соотношениях белковых фракций в сыворотке крови донского судака. Науч. докл. высш. школы. Биол. н. 10 : 35—38.
- Любина Т. В., 1970. Изучение белкового состава сыворотки крови рыб при лигулэзе. Сб. науч. работ Сиб. н.-и. вет. ин-т. Вып. 17 : 285—291.
- Недина Н. С., 1971. Белковый состав сыворотки крови тарани (*Rutilus rutilus heckeli* Nordm.) Азовского моря в зависимости от пола, возраста, времени года и места обитания. Тр. Упр. кадров и учебн. заведений М-ва рыбн. х-ва СССР. Вып. 30 : 35—41.
- Римш Е. Я., 1970. Некоторые особенности белкового и липидного обмена у белого амура. Тр. ВНИИ мор. рыбн. х-ва и океаногр. 74 : 222—243.
- Сорвачев К. Ф., 1957. Изменение белков сыворотки крови карпа во время зимовки. Биохимия 22 (5) : 822—827.
- Сорвачев К. Ф., Задворочнов С. Ф., Исаев Ф. А., 1962. К вопросу об иммунизации рыб. Биохимия 27 (2) : 202—207.

- Тодоров И., 1963. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. София.
- Шатуновский М. И., 1969. Сравнительное изучение липидов сыворотки крови трески, наваги, речной и полярной камбал Белого моря. Докл. АН СССР 184 (5) : 1207—1209.
- Шатуновский М. И., Сорвачев К. Ф., Исаев Ф. А., 1967. Некоторые результаты электрофоретического исследования белков и липопротеидов сыворотки крови наваги и трески Белого моря. Вестн. Моск. ун-та. Биол., почвовед. 3 : 3—11.
- Deutsch H. F., McShan W. H., 1949. Biophysical studies of blood plasma proteins. XII. Electrophoretic studies of the blood serum proteins of some lower animals. Journ. Biol. Chem. 180 (1).
- Got R., 1965 (1966). Etudes sur les glycoprotéines du sérum de congre (*Conger vulgaris*) et de roussette (*Scyllium stellare*). Compt. rend. Soc. biol. 159 (12) : 2323—2326.
- Haider G., 1970. Alters- und saisonbedingte Veränderungen im Serumeiweißbild der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* Rich.). Z. Fischerei 18 (1—2) : 107—124.
- Huang Chau-Ting, Hickman C. P. Jr., 1968. Binding of inorganic iodide to the plasma proteins of teleost fishes. J. Fish. Res. Board Canada 25 (8) : 1651—1666.
- Lysak A., Wojcik K., 1960. Electrophoretic investigations on the blood of carp fed with food containing various protein amounts. Acta Hydrobiologica 2(1).
- Pesch G., 1970. Plasma protein variation in a winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) population. J. Fish. Res. Board Canada 27 (5) : 951—954.
- Plack P. A., Woodhead P. M. J., 1966. Vitamin A compounds and lipids in the blood of the cod *Gadus morhua* from the Arctic, in relation to gonadal maturation. J. Marine Biol. Assoc. U. K. 46 (3) : 547—559.
- Silver M. A., Shenk W. D., 1968. Temperature dependence of glucose concentration in toadfish blood. Chesapeake Sci. 9 (1) : 1—8.

Институт зоологии и ботаники
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
9/III 1973

Aare KIRSIPUU

VALGU KONTSETRATSIOONI MÄÄRAMISE METOODIKAST KALADE VERESEERUMIS (PLASMAS)

Resümee

Lowry jt. meetodil määrati valgu kontsentratsioon 28 latika, 13 koha ja 13 haugi vereseerumis ning 97 vikerforelli vereplasmas. Nende seerumite (plasmade) murdumisnäitajad määrati refraktomeetri abil. Valgusisalduste ja murdumisnäitajate võrdlemisel selgus, et nende vahel valitseb positiivne korrelatsioon, mis aga erinevatel liikidel on erineva suurusega, samuti erineb see samal liigil erinevatel aastaegadel. Järelikult tuleb valgu kontsentratsiooni refraktomeetrilisel määramisel kalade vereseerumis (plasmas) iga liigi jaoks igal aastaajal teha oma kontrollgraafik.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Zoologia ja Botaanika Instituut

Toimetusse saanud
9. III 1973

Aare KIRSIPUU

ON THE METHODS OF THE MEASUREMENT OF PROTEIN CONCENTRATION IN THE BLOOD SERUM (PLASMA) IN FISHES

Summary

By the technique by Lowry et al. the protein concentration was measured in the blood serum of 28 breams, 13 pike-perches and 13 pikes and in the blood plasma of 97 rainbow trouts, and by means of a refractometer the refraction index was estimated. When comparing the protein concentrations and refraction indices it became evident

