

УДК 591.415; 591.112; 612.423

*Юри ВАЙГА, Сийри ВАЙГА*

## **О ТРАНСКАПИЛЛЯРНОМ ОБМЕНЕ БЕЛКОВ КРОВИ И ЛИМФЫ У ОВЕЦ**

Важной функцией лимфатической системы в обменных процессах является резорбция из интерстициального пространства белков и других веществ, вышедших в ходе циркуляции из кровеносного русла. Благодаря своим структурно-функциональным особенностям лимфатические капилляры способны резорбировать из интерстициального пространства крупномолекулярные частицы. Кровяные капилляры же из-за свойственных им органоспецифических морфофункциональных особенностей обуславливают процесс селективности. Белковый состав лимфы во многом определяется степенью проницаемости стенок кровеносных капилляров, которую принято выражать путем соотношения содержания соответствующих белковых фракций сыворотки лимфы и крови. Однако это не означает еще уменьшения роли процессов клеточного обмена, избирательности интерстиция в пропускании белковых молекул и лимфодинамики в лимфообразовании (Потапов, 1977; Айнсон, Айнсон, 1983).

В литературе отсутствуют данные об исследованиях лимфы овец с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Сыворотка крови и лимфы овец изучалась в основном методом электрофореза на бумаге (Айнсон, 1970). Установлено, что белки сыворотки крови с одинаковым электрическим зарядом молекул, которые при использовании метода электрофореза на бумаге образуют гомогенные фракции, могут резко различаться по своим свойствам при анализе методом электрофореза в полиакриламидном геле и поэтому полученные данные часто трудно сопоставимы. Целью настоящей работы явилось: охарактеризовать транскапиллярный обмен белков лимфы и крови в органах пищеварения и в области шеи и головы у овец с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).

### **Материал и методика**

Материалом для исследования служили сыворотки крови и лимфы, взятые у 11 баранов эстонской темноголовой породы 1,5-годовалого возраста. Для взятия проб подопытным животным между яремной веной и грудным лимфатическим протоком накладывали искусственный лимфенозный анастомоз и канюлировали шейный проток лимфы. В пробах венозной крови, грудной и шейной лимфы после свертывания клеточной части полученных сывороток микробиуретовым методом определяли общий белок и методом электрофореза в ПААГ — количественное содержание отдельных белковых фракций. Аппарат АВГЭ-1 для электрофореза в вертикальных пластинках геля обеспечивает одновременное разделение 13—26 проб в стандартных условиях. Использовали методику Дэвиса и Орнштейна в модификации Т. Ф. Пироговой (1979). Для этого использовали: трис-глициновый электродный буфер (рН 8,3), 2,5%-ный концентрирующий и 7,5%-ный разделяющий гель акриламида. Сила тока в течение 30 мин составляла 35 мА, в дальнейшем — 60 мА на две

## Протеинограмма сыворотки венозной крови и грудной и шейной лимфы овец

Белковые фракции	Подвижность	Содержание белка, мг/мл сыворотки		
		Кровь	Грудная лимфа	Шейная лимфа
МГ	0,0—0,1	9,29±1,03	4,22±0,41	4,37±0,44
ИГ	0,1—0,4	18,94±2,10	7,66±0,78	7,12±0,82
ПТ-2	0,6—0,7	1,63±0,30	0,40±0,07	0,38±0,07
ПТ-1	0,8—0,9	1,51±0,29	0,46±0,08	0,52±0,10
Т	1,0	5,56±0,52	2,91±0,25	2,71±0,22
ПА-2	1,1—1,2	1,50±0,22	0,87±0,12	0,53±0,09
ПА-1	1,2—1,3	1,68±0,25	0,84±0,13	0,74±0,12
А	1,4—1,6	32,26±3,11	20,48±1,96	18,56±1,98

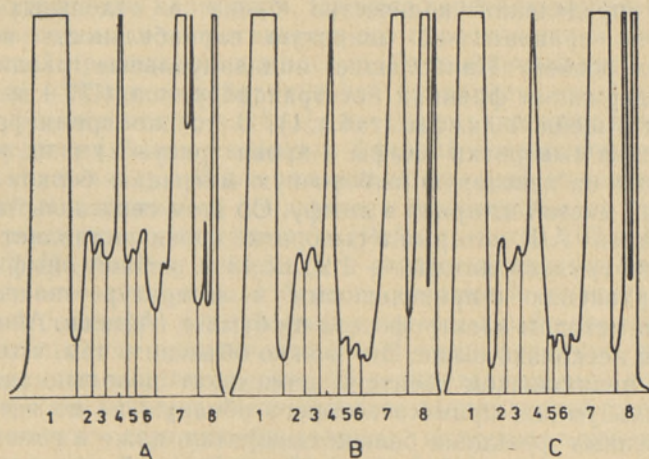
Условные обозначения: А — альбумины, ПА-1 — первая фракция постальбуминов, ПА-2 — вторая фракция постальбуминов, Т — трансферрины, ПТ-1 — первая фракция посттрансферринов, ПТ-2 — вторая фракция посттрансферринов, ИГ — иммуноглобулины и гаптоглобины, МГ — макроглобулины

Таблица 2

Коэффициенты проницаемости отдельных белковых фракций ( $R$ ) в зависимости от их электрофоретической подвижности

Белковые фракции	Подвижность	В органах пищеварения		В органах шеи и головы	
		$R$	$R'$	$R$	$R'$
МГ	0,0—0,1	0,48±0,04	0,88±0,06	0,47±0,06	0,94±0,06
ИГ	0,1—0,4	0,41±0,05	0,82±0,05	0,37±0,03	0,81±0,07
ПТ-2	0,6—0,7	0,31±0,07	0,46±0,06	0,21±0,04	0,48±0,04
ПТ-1	0,8—0,9	0,34±0,08	0,63±0,09	0,37±0,07	0,61±0,15
Т	1,0	0,47±0,06	0,98±0,06	0,47±0,04	1,00±0,08
ПА-2	1,1—1,2	0,56±0,09	1,09±0,10	0,38±0,08	0,87±0,09
ПА-1	1,2—1,3	0,53±0,10	1,02±0,10	0,43±0,10	0,90±0,11
А	1,4—1,6	0,64±0,03	1,22±0,03	0,56±0,06	1,20±0,05

$R'$  — соотношение относительного содержания соответствующих белковых фракций в лимфе и крови; название белковых фракций см. в табл. 1.



Денситограмма сывороток венозной крови (А), грудной лимфы (В) и шейной лимфы (С) овец. 1 — А; 2 — ПА-1; 3 — ПА-2; 4 — Т; 5 — ПТ-1; 6 — ПТ-2; 7 — ИГ; 8 — МГ.

пластинки (26 проб). Продолжительность электрофореза 3—3,5 ч, температура 8—10 °С. Сыворотки крови и лимфы перед нанесением на гель разводили 40%-ным раствором сахарозы (1:1). Окраску белковых фракций производили 0,5%-ным раствором амидочерного 10 Б, графическую запись полученных фореграмм проводили на денситометре УТ-7608. Для определения местоположения белков использовали коэффициент подвижности относительно трансферрина (подвижность трансферрина = 1). Последний идентифицировали путем предварительного осаждения 1,5%-ным раствором риванола (2-этоксид-6,9-диаминоакридинлактат), так как этот реагент осаждает все белки сыворотки крови, кроме иммуноглобулинов и трансферрина (Рафиков, 1977).

В сыворотках крови и лимфы было выявлено до 16 фракций. Учитывая разную частоту встречаемости отдельных фракций, считали возможным на основе электрофоретической подвижности разделить денситограмму на 8 зон: альбуминовая (А), первая и вторая фракции постальбуминов (ПА-1 и ПА-2), трансферриновая (Т), первая и вторая фракции посттрансферринов (ПТ-1 и ПТ-2), иммуноглобулиновая и гаптоглобулиновая (ИГ) и макроглобулиновая (МГ) (табл. 1 и 2, рисунок). Количественное содержание альбуминовой и семи глобулиновых фракций определяли путем подсчета площади денситометрического пика каждой из них. Площадь, находящуюся под денситометрической кривой, считали равной всему количеству белка, нанесенного на гель.

По полученным данным были рассчитаны белковый коэффициент (А/Г), т. е. соотношение содержания альбуминов и глобулинов, и коэффициент проницаемости для отдельных белковых фракций (R), т. е. соотношение содержания соответствующих белковых фракций сыворотки лимфы и крови.

## Результаты и обсуждение

Хотя доказательств о неидентичности количественного состава грудной и шейной лимфы имеется достаточно много (Ainson, 1968; Ganot и др., 1970; Саленко и др., 1979; Орешкина, 1980), наши данные лишь подтверждают это. Прежде всего это относится к близости не уровня содержания общего белка, а основных его фракций. По нашим данным, содержание белка в сыворотке венозной крови, грудной и шейной лимфы овец составляет 72,4, 43,1 и 38,2 мг/мл соответственно. Результаты определения количества белка в отдельных фракциях указывают на сравнительно широкую вариабельность показателей у изучаемых особей. Наибольшие индивидуальные различия отмечаются в содержании фракций посттрансферринов (ПТ-1 и ПТ-2) как грудной, так и шейной лимфы (табл. 1). В то же время фракционное сходство белков сыворотки лимфы и крови (рисунок) и их распределение указывают на некоторую выборочную миграцию белков с меньшей молекулярной массой из крови в лимфу. Об этом свидетельствует белковый коэффициент А/Г, который в сыворотке крови составляет  $0,80 \pm 0,07$ , а в сыворотке грудной лимфы —  $1,20 \pm 0,11$  и шейной лимфы —  $1,13 \pm 0,14$ . По сравнению с приведенными в литературе значениями А/Г, полученными методом электрофореза на бумаге (Айнсон, Айнсон, 1981), наши данные несколько выше. Это можно объяснить тем, что при электрофорезе на целлюлозном носителе происходит довольно значительная адсорбция альбумина, примесь которого обнаружена во всех препаративно выделенных фракциях белков сыворотки, даже в гомогенных при электрофорезе на бумаге  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулиновых фракциях (Пирогова и др., 1979). Электрофоретическое разделение белков на ПААГ выявило в основном одинаковое число фракций в сыворотках как лимфы, так и

крови, но в несколько измененном количественном составе, свидетельствующем о наличии избирательного механизма в процессе перехода отдельных белков из кровеносных сосудов в лимфатические.

Важным фактором тканевого метаболизма, определяющим уровень транскапиллярного обмена, является капиллярная проницаемость ( $R$ ), которую принято выражать соотношением содержания соответствующих белковых фракций в сыворотках лимфы и крови. Проницаемость капилляров ( $R$ ) в органах пищеварения для электрофоретически быстродвижущихся альбуминов ( $0,64 \pm 0,03$ ) и медленнодвижущихся макроглобулинов ( $0,48 \pm 0,04$ ) достоверно выше ее для среднедвижущихся посттрансферринов ПТ-1 ( $0,34 \pm 0,08$ ) и ПТ-2 ( $0,31 \pm 0,07$ ) (табл. 2). Привлекает внимание то обстоятельство, что в лимфе и крови, взятых у овец в области шеи и головы, выявляются аналогичные различия. Возможно, что относительно низкие показатели  $R$  для ПТ-1 и ПТ-2 обусловлены не столько особенностями проникновения их через капиллярную стенку, сколько вовлечением самих посттрансферринов ПТ-1 и ПТ-2 в процессы клеточного обмена, в результате чего просвета лимфатических капилляров достигает гораздо меньшее их количество, чем остальных глобулинов. В сыворотках лимфы и крови, взятых в области шеи и головы, отмечено некоторое увеличение  $R$  основных белковых фракций (ИГ, Т и А) по мере роста их электрофоретической подвижности (табл. 2). Отклонение от этой закономерности у макроглобулинов, очевидно, связано с непосредственным всасыванием части белков этой группы — липопротеинов — в лимфу. Достоверные различия обнаружены нами и для коэффициентов проницаемости постальбуминов (ПА-1 и ПА-2) (табл. 2). В состав ПА-1 и ПА-2 входят белки, относящиеся в основном к  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -глобулинам (Неменова и др., 1979). Нетрудно заметить, что более высокое значение  $R$  у постальбуминов в органах пищеварительного тракта исходит из большего количества этих белков в грудной лимфе (табл. 1). Можно полагать, что преимущественная проницаемость постальбуминов в органах пищеварения связана с деятельностью этих органов и их структурными особенностями. Решение этих вопросов в ходе дальнейших исследований имеет немаловажное значение для уточнения наших представлений о сущности комплексных процессов обеспечения циркуляторно-тканевого гомеостаза белков в организме.

Полученные результаты позволяют считать, что в образовании белкового состава лимфы происходит молекулярное ситование плазменных белков через стенку кровяного капилляра градиентом гидростатического давления внутри и вне капилляра. Процесс перехода при этом по своему характеру пассивный и селективность его определяется в основном размером и массой просеиваемых молекул. Описываемый путь не является единственным в процессе избирательной проницаемости. Судя по коэффициентам проницаемости, наиболее пассивно участвуют в экстравакулярной циркуляции белки минорных фракций посттрансферринов ПТ-1 и ПТ-2. Низкие величины  $R$  для указанных фракций со средней электрофоретической подвижностью обнаружены у многих видов позвоночных: у амфибий, птиц и млекопитающих (Рейхель и др., 1971; Лукьяненко, Попов, 1971). По нашему мнению, это свидетельствует о филогенетической гомогенности плазменных белков, играющей значительную роль в обеспечении белкового равновесия в процессе лимфо-кровой циркуляции. Избирательность проникновения посттрансферринов в грудную и шейную лимфу, по-видимому, связана с эндотелиальным слоем стенки кровеносного капилляра, в частности с ее везикулярной системой. Возможно, что именно везикулообразование является ключевым этапом подбора отдельных фракций плазменных белков при выходе из капилляра. В пользу этого говорит обилие ферментных систем на многих эндотелиальных мембранах, в том числе и на везикулярных (Шахламов,

1971). Непременно следует учитывать и роль химической структуры белков: простые белки легче преодолевают гемато-лимфатический барьер, а сложные проявляют зависимость от структуры молекулы, в частности от наличия углеводного или липидного компонента (Witte, 1981).

Таким образом, результаты наших опытов показывают, что лимфо-кровное соотношение содержания белков, наряду с другими показателями интенсивности транскапиллярного обмена, является существенным критерием определения функционального состояния сосудистой системы. Заслуживает внимания тот факт, что у овец в процессе лимфообразования для белков с высокой и низкой электрофоретической подвижностью характерна большая обменная активность, чем для белков со средней электрофоретической подвижностью как в органах пищеварения, так и в области шеи и головы. По-видимому, это связано с существованием в лимфообразовании филогенетических закономерностей, которые не исключают воздействия происходящих в интерстиции процессов клеточного обмена. Это тем более важно, что в остальной экстравакулярной циркуляции плазменных белков имеют место определенные регионарные особенности.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Айнсон Х. Х. Сравнительная характеристика состава лимфы у кур и овец и влияние на него некоторых факторов // Автореф. дис. докт. биол. н., Таллинн, 1970.
- Айнсон Х. Х., Айнсон Э. И. Действие серотонина на транскапиллярный обмен и циркуляторный гомеостаз белков // Физиол. журн. СССР, 1981, 67, № 1, 148—152.
- Айнсон Х. Х., Айнсон Э. И. Физиологические основы процессов лимфообразования // Изв. АН ЭССР. Биол., 1983, 32, № 1, 49—59.
- Лукияненко В. И., Попов А. В. Электрофоретическая гетерогенность сывороточных белков хрящевых, костно-хрящевых и костистых рыб // Журн. эвол. биохим. и физиол., 1971, 7, № 1, 35—40.
- Неменова Ю. М., Екисенина Н. И., Лупинович В. Л. Исследование белков сыворотки крови у больных хроническим энтеритом // Лаб. дело, 1979, 2, 84—87.
- Орешкина С. П. Белки сыворотки крови и лимфы крупного рогатого скота // Докл. ВАСХНИЛ, 1980, 10, 44—45.
- Пирогова Т. Ф. Определение фенотипов некоторых белков сыворотки крови человека // Лаб. дело, 1979, 12, 726—729.
- Потапов А. И. Очерки физиологии лимфообразования. Алма-Ата, 1977.
- Рафиков Х. С. К методу выявления генетических вариантов трансферрина, гаптоглобина и гемоглобина после диск-электрофореза на полиакриламидном геле // Лаб. дело, 1977, 12, 746.
- Рейхель А., Гербштедт Х., Цюлке Г., Шмидт М., Крантц С., Бухгольц О. О белках плазмы и лимфы лягушки *Rana esculenta* // Журн. эвол. биохим. и физиол., 1971, 7, № 1, 30—34.
- Саленко Л. С., Николаева Н. В., Иткин Б. С., Линевиц Л. И. Содержание белков и гликопротеинов в сыворотке крови и лимфы крупного рогатого скота в норме и при лимфолейкозе // Изв. АН СССР, Биол., 1979, 1, 28—37.
- Шахламов В. А. Капилляры. М., 1971.
- Ainson, H. Venosse vere ning tsentraalse ja perifeerse lümfi valgulise koostise omapärase lammastel // ENSV TA Toim. Biol., 1968, 17, Nr. 2, 172—178.
- Ganrot, P.-O., Laurell, C.-B., Ohlson, K. Concentration of trypsin inhibitors of different molecular size and of albumin and haptoglobin in blood and in lymph of various organs in the dogs // Acta Physiol. Sci., 1970, 7, 201—210.
- Witte, S. Concentration of macromolecules in the tissues and lymphatics // Adv. Physiol. Sci., 1981, 7, 201—210.

## LÜMFI JA VERE VALKUDE TRANSCAPILLAARSEST VAHETUSEST LAMMASTEL

Uuriti vere- ja lümfikapillaaride valguvahetuse seost lümfii moodustumisega seede-elundites ja pea piirkonnas. Valgu ja selle fraktsioonide sisaldus lümfis oleneb vastava organi või koe funktsionaalsest aktiivsusest ning verekapillaaride seinte organospetsiifilisest morfofunktsionaalsest ehitusest. Tsentraalse ja perifeerse lümfii ning venoosse vere seerumi PAA geelelektroforeesil saadud densitogrammid jagati kaheksaks tsooniks: albumiin, postalbumiin — 1 ja postalbumiin — 2, transferriinid, posttransferriin — 1 ja posttransferriin — 2, immunoglobuliinid, makroglobuliinid. Nendes täheldatud kvantitatiivsed erinevused viitavad valikulise mehhanismi olemasolule vere- ja lümfikapillaaride seinas ning interstiitsiumis. Saadud valgufraktsioonide läbivuskoeffitsientide (lümfii- ja verevalgu vastavate fraktsioonide sisalduse suhte) sõltuvus nende elektroforeetilise liikuvusest oli ühesugune mõlemas uuritavas piirkonnas. Ilmnes põhivalgude (immunoglobuliin, transferriin, albumiin) fraktsioonide läbivuskoeffitsientide ja elektroforeetilise liikuvuse samasuunaline suurenemine. Minoorsete valkude (posttransferriinid) ekstravaskulaarne migratsioon osutus põhifraktsioonide omast oluliselt aeglasemaks. Seedeelundites täheldati minoorsete postalbumiinide suuremat läbivust võrreldes pea piirkonnaga.

Saadud andmed lubavad järeldada lümfii valgulise koostise kujunemist nii põhivalgude molekulaarse filtratsiooni kui ka minoorsete valkude aktiivse valikulise läbivuse teel. Lümfii moodustumises osalevad suurema ja väiksema elektroforeetilise liikuvusega valgud intensiivsemalt kui keskmise elektroforeetilise liikuvusega valgud.

Jüri VAIGA and Siiri VAIGA

## ON THE TRANSCAPILLARY EXCHANGE OF LYMPH AND BLOOD PROTEINS IN SHEEP

The interrelation between blood and lymph protein capillary exchange and lymph formation was studied. The protein and its fractions content in the lymph depends on the definite organ or tissue functional activity and on similar way on the morphological structure of blood capillary wall. The lymph/blood serum quotients of concentrations of identical protein fractions were graphically displayed in relation on their migration velocity within the gel. The provided dependence was similar both in digestive organs and in neck and head regions. Separation of venous blood, central and peripheral lymph serum proteins was performed by means of disc electrophoresis. The densitographs following electrophoresis were divided into 8 quantitatively determined fractions: albumins, 1st and 2nd postalbumins, transferrins, 1st and 2nd posttransferrins, immunoglobulins and macroglobulins. The established differences in their content reveal that extravascular circulation does not take place in all plasma proteins to the same extent. These findings may be interpreted as the presence of any selective principle at the blood-lymph permeation. As it was to be expected the permeation coefficient of base serum proteins (immunoglobulins, transferrins, albumins) and their electrophoretic migration velocity revealed the correlation. The extravascular migration of other minor proteins (1st and 2nd posttransferrins) in respect of base proteins proved take place considerably slower. The higher permeation of minor postalbumins in digestive organs in respect to the region of neck and head were found.

By the provided results of the performed investigation we may conclude that the formation of lymph protein composition takes place in two different way: by means of molecular filtration of base proteins and of some active permeation processes of minor proteins. The proteins of high and slow electrophoretic migration velocity take part in the process of lymph formation more actively than the proteins of the mean electrophoretic migration velocity. The results confirm the finding of former experiments with other animals by an analogous model.