

Zorica Pavičević¹

**POLIMERI ALBUMINA KAO BIOHEMIJSKI PARAMETAR
OŠTEĆENJA JETRE GOVEDA**
*ALBUMIN POLYMERS AS BIOCHEMICAL PARAMETER OF COWS
LIVER DAMAGE*

Izvod

U krvnom serumu teladi, posle eksperimentalnog oštećenja jetre oralnim davanjem ugljen-tetra hlorida (CCl₄), ispitivane su promene koncentracije ukupnih proteina i albumina, aktivnosti aminotransferaza i prisustvo polimera albumina. Utvrđivano je prisustvo polimera albumina i u krvnom serumu krava sa prethodno dijagnostikovanim oštećenjem jetre velikim metiljem. Rezultati ispitivanja potvrđuju prisustvo polimera albumina u krvnom serumu i teladi i krava sa oštećenom jetrom, što predstavlja još jedan biohemijski parametar koji se može koristiti u proceni funkcionalne očuvanosti jetre.

Ključne reči: polimeri albumina, aminotransferaze, parametar, jetra

Abstract

After experimentally induced liver damage by oral application of carbon tetra-chloride (CCl₄) one has studied changes of total protein concentration, albumin concentration and aminotransferase activity in blood sera of treated calves. Beside this biochemical parameters one has been examined the presence of albumin polymers in blood sera of experimental calves as it as in blood sera of cows with already diagnosed liver damage. The results confirm the presence of albumin polymers in hepatocit damage conditions showing that identification of albumin polymers in bovine blood sera represents one more useful liver damage diagnostic indicator.

Key words: albumin polymers, aminotranspherasis, parameters, liver

¹ Mr Zorica Pavičević, Biotehnički institut, Podgorica

UVOD

Utvrđivanje prisustva polimernog albumina u krvnom serumu dobilo je na značaju posle 1973. godine, kada je otkriven u krvnom serumu ljudi sa raznim hepatopatijama, a kasnije i u kunića sa akutnim i hroničnim oštećenjem jetre. U fiziološkim uslovima kod svih životinjskih vrsta i čoveka polimeri se formiraju u cirkulaciji, ali se njihova niska koncentracija održava zahvaljujući postojanju i delovanju specifičnih receptora na membrani hepatocita. Ti receptori, kada je zdravstveni status jetre očuvan, specifično prepoznaju i uklanjaju polimere albumina iz cirkulacije. Sposobnost receptora da uklone polimere iz krvi se smanjuje ili prekida ako su jetrine ćelije oštećene što dovodi do povećanja koncentracije polimera. Kako "novi" polimerni molekul nosi i nova antigenska mesta, koja imuni sistem prepoznaje kao strani antigen, formiraju se specifična antitela, koja su označena kao anti-polialbumin antitela (ApAA). U dijagnostici služe kao posredni pokazatelj prisustva polimernog albumina u cirkulaciji. Eksperimentalno je potvrđeno da titar ApAA raste sa stepenom oštećenja jetre. Osim pomenutih antitela oštećenje jetre je u korelaciji i sa nekim drugim biohemijskim parametrima. Porast aktivnosti aminotransferaza i pad koncentracija ukupnih proteina i albumina u krvnom serumu su biohemijski pokazatelji koji se već dugo koriste u proceni očuvanosti jetre.

Polazeći od napred iznesenih literaturnih saznanja, cilj ovog rada je ispitivanje prisustva polimera albumina u krvnom serumu teladi sa oštećenom jetrom izazvanom oralnim davanjem CCl_4 i u krvnom serumu odrasle govedu sa već dijagnostikovanim oštećenjem jetre velikim metiljem (*Fasciola hepatica*). Radi potvrde eksperimentalnog oštećenja jetre vršena su i ispitivanja aktivnosti aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT) i koncentracije proteina i albumina u krvnom serumu tretirane teladi.

MATERIJAL I METODE

Ispitivanjem su obuhvaćena telad i krave u laktaciji. Grupi od 6 teladi simentalske rase, u dobi od 2-3 meseca, mase 70-90kg sa prostora Belopavličke ravnice je izvršeno eksperimentalno oštećenje jetre oralnim davanjem CCl_4 . Pre početka eksperimenta životinjama je za kontrolni uzorak uzeta krv i izdvojen serum, a potom je drenč-om aplikovano 200ml smeše tečnog parafina i CCl_4 u dozi 1ml/9kg telesne mase. Posle aplikacije smeše životinjama je 4 puta u intervalu od po 7 dana uzimana krv i izdvojan

serum. Analizom krvnog seruma određivano je prisustvo polimera albumina, koncentracija ukupnih proteina i albumina, aktivnost enzima AST i ALT.

Prisustvo polimera utvrđivano je tehnikom dvostruke imunodifuzije sa *in vitro* pripremljenim polimerom govedeg albumina kao antigenom, a u krvnom serumu je ispitivano prisustvo ApAA kao odgovor na prisustvo nativnog polimera.

Koncentracija ukupnih proteina određivana je biuretskom metodom, a koncentracija albumina na osnovu specifičnog vezivanja boje brom-crezol green.

Aktivnost aminotransferaza određivana je UV- kinetičkom metodom.

Grupa od 10 krava sa dijagnostikovanim oštećenjem jetre formirana je na osnovu pozitivnog nalaza koprološke pretrage 30 krava na Veliki metilj. Ogleadne životinje su bile sivo-smeđe rase i njeni križanci sa drugim rasama starosti 2-10 godina, slabe kondicije i loše uhranjenosti, sa prostora Zetske ravnice. Koprolška pretraga je vršena metodom sedimentacije, a u krvnom serumu krava sa pozitivnim koprološkim nalazom utvrđivano je prisustvo polimera metodom dvostruke imunodifuzije u gelu agaroze.

Dobijeni rezultati su obrađeni uobičajenim metodama varijacione statistike.

REZULTATI I DISKUSIJA

Analizom krvnih seruma teladi ustanovljeno je da smanjenje koncentracije ukupnih proteina nastaje 7 dana po aplikaciji CCL_4 (tab. 1). Nakon 14 dana prosečna koncentracija proteina iznosila je 49.45g/l, što u odnosu na onu iz kontrolnog uzorka (61.65g/l), predstavlja značajno smanjenje ($p < 0.01$). Po protoku tog perioda koncentracije ukupnih proteina se povećava, tako da 21-og dana, po aplikaciji, iznosi 58.13g/l, a 28-og 61.37g/l, što je posledica oporavljenja funkcije jetre.

Koncentracija albumina u kontrolnom uzorku iznosila je 31.90g/l, a u onom 14 dana posle aplikacije 26.88g/l (tab. 2). Utvrđena razlika je statistički vrlo značajna ($p < 0.01$).

Veliki broj autora (KNIGHT, 1978; BARNOUIN i sar. 1982, CHARLTON, 1996), prateći metabolizam proteina i albumina u cirkulaciji kod etiološki različitih hepatopatija potvrđuje smanjenje koncentracije ukupnih proteina i albumina. Tako KNIGHT (1978), analizom krvnih seruma jagnjadi i krava sa veštački izazvanom infekcijom metiljem, uočava značajan pad koncentracije ukupnih proteina, kao posledicu oštećenja

jetre. BARNOUIN (1982), u krvnom serumu 3 grupe od po 12 krava nalazi nizak nivo koncentracije ukupnih proteina i albumina, a žrtvovanjem ovih životinja uočava vidljiva oštećenja na jetri.

Tabela 1. Promena koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu teladi (g/l)

Tab.1. Changes of total protein concentrations in blood sera of calves (g/l)

Broj životinje N ^o of animal	merenje po redu / N ^o of measuring				
	kontrola <i>control</i>	I 7. dan 7 th day	II 14. dan 14 th day	III 21. dan 21 st day	IV 28. dan 28 th day
T-01	65.4	60.6	63.5	65.0	67.0
T-02	66.1	60.1	43.8	57.6	64.2
T-03	58.2	50.6	47.3	56.8	57.7
T-04	60.0	54.1	49.7	58.3	61.1
T-05	60.6	53.6	50.1	59.3	60.2
T-06	59.0	50.1	42.3	51.8	58.0
x	61.55	54.85	49.45	58.13	61.37
Sd	3.36	4.55	7.56	4.26	3.63
Se	1.37	1.86	3.09	1.74	1.48
Cv	5.46	8.29	15.28	7.33	5.92

Tabela 2. Promena koncentracije albumina u krvnom serumu teladi (g/l)

Tab.2. Changes of albumins concentration in blood sera of calves (g/l)

Broj životinje N ^o of animal	merenje po redu / N ^o of measuring				
	kontrola <i>control</i>	I 7. dan 7 th day	II 14. dan 14 th day	III 21. dan 21 st day	IV 28. dan 28 th day
T-01	28.9	27.1	27.4	27.5	28.2
T-02	29.3	25.2	25.1	27.7	27.2
T-03	30.3	27.6	27.4	28.3	29.4
T-04	34.9	29.3	27.3	29.6	32.1
T-05	35.7	30.8	27.2	31.3	32.6
T-06	32.3	27.6	26.9	28.3	29.7
x	31.90	27.90	26.88	28.78	29.87
Sd	2.90	1.92	0.81	1.44	2.13
Se	1.18	0.79	0.89	0.59	0.87
Cv	9.08	6.88	3.01	4.98	7.12

Aktivnost aminotransferaza AST i ALT u krvnom serumu tretiranih teladi sa CCl₄ pokazuje značajne promene posle aplikacije ovog antihelmintika. U kontrolnom uzorku izmerena aktivnost AST je 72.17U/l, 7.dana posle aplikacije je 96.17U/l, a 14.dana posle aplikacije 97.0U/l. (tab. 3). Razlika enzimske aktivnosti koja je dobijena između kontrolnog merenja i 14. dana nakon aplikacije je statistički visoko značajna ($p < 0.001$). Posle 28 dana, aktivnost je približna onoj kontrolnog uzorka. Svi ti rezultati su slični sa rezultatima WYCKOFF i BRADLEY-A (1985) o povećanju aktivnosti AST u uslovima oštećenja jetre. Isti autori, analizom krvnih seruma krava posle veštačke infekcije razvojnim oblicima metilja (metacerkarije), beleže porast aktivnosti AST i ALT, koja kao ističu zavisi od doze unetih metacerkarija. Time je još jednom potvrđena uslovljenost porasta aktivnosti AST i ALT enzima od stepena oštećenja jetre.

Tabela.3. Promena aktivnosti AST (U/l)

Tab.3. Change of AST activity (U/l)

Broj životinje N ^o of animal	merenje po redu / N ^o of measuring				
	kontrola <i>control</i>	I 7. dan 7 th day	II 14. dan 14 th day	III 21. dan 21 st day	IV 28. dan 28 th day
T-01	80	102	101	79	79
T-02	73	97	97	72	72
T-03	79	96	97	79	79
T-04	58	82	84	62	60
T-05	71	100	102	83	80
T-06	72	100	101	81	79
x	72.17	96.17	97	76.0	74.83
Sd	7.89	7.28	6.72	7.80	7.83
Se	3.22	2.97	2.75	3.18	3.20
Cv	10.93	7.57	6.93	10.26	10.47

Promene aktivnosti ALT u krvnom serumu tretiranih teladi pokazuju istu dinamiku promene kao AST (tab.4). Aktivnost ALT je pre aplikacije CCL₄ iznosila 31.17U/l, dok je maksimalna aktivnost od 44.83U/l ustanovljena 14 dana nakon aplikacije što u poređenju sa kontrolnim vrednostima statistički predstavlja vrlo značajnu razliku ($p < 0.01$). Ti

rezultati su u saglasnosti sa podacima koje navodi KANEKO (1989) objašnjavajući porast aktivnosti enzima u krvnom serumu, kao posledicu propadanja jetrinih ćelija i "izlaska" enzima u cirkulaciju. LEE i sar. (1987) kod pacijenata sa akutnim i hroničnim jetrinim oštećenjem nalaze takode trostruko povećanje aktivnosti transaminaza u krvnom serumu ovih bolesnika.

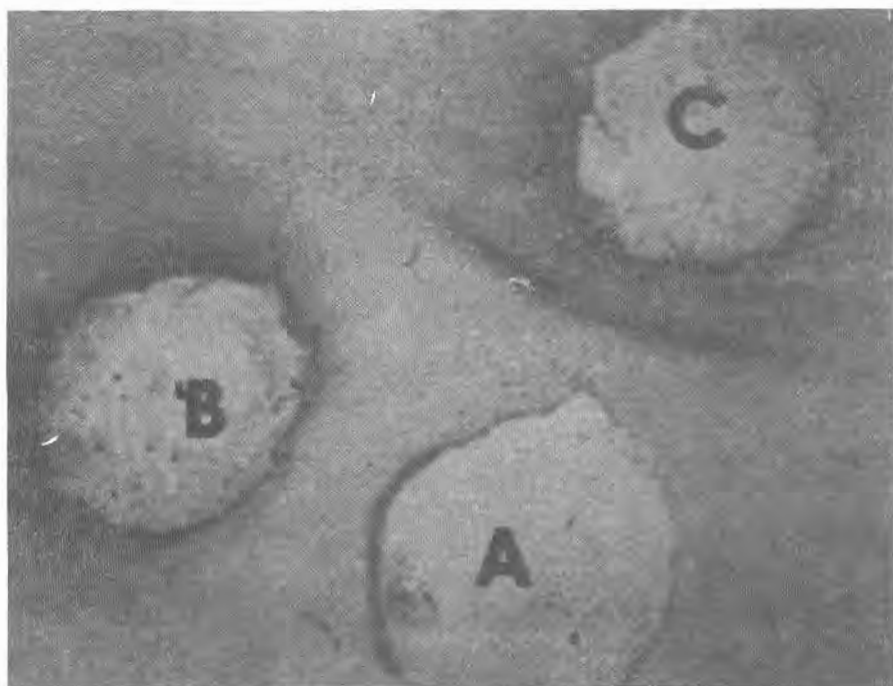
Tabela.4. Promena aktivnosti ALT (U/l)

Tab.4. Change of ALT activity (U/l)

Broj životinje N ^o of animal	merenje po redu / N ^o of measuring				
	kontrola <i>control</i>	I 7. dan 7 th day	II 14. dan 14 th day	III 21. dan 21 st day	IV 28. dan 28 th day
T-01	33	51	50	30	32
T-02	28	43	43	29	30
T-03	37	48	49	30	32
T-04	25	37	37	29	26
T-05	28	39	39	30	29
T-06	36	49	51	34	33
x	31.17	44.50	44.83	30.33	30.33
Sd	4.88	5.72	6.01	1.86	2.58
Se	2.0	2.33	2.46	0.76	1.05
Cv	15.64	12.85	13.41	6.14	8.51

Prisustvo polimera albumina utvrđeno je u krvnom serumu svih ispitivanih životinja. Linija precipitacije kao pozitivna reakcija imunodifuzije dobijena između krvnog seruma teladi jednokratno tretiranih sa CCL₄ i *in vitro* sintetisanog polimera govedeg albumina kao antigena, potvrđuje prisustvo polimera albumina kao posledicu oštećenja jetre (Sl.1). Pozitivna reakcija imunodifuzije dobijena je 14, 21 i 28 dana posle aplikacije CCL₄ kod svih tretiranih teladi. Utvrđeni rezultati ukazuju da su 14 dana posle aplikacije formirana ApAA koja su prema radovima TRIOLO i sar. (1983), IgM klase. Sintetisana antitela predstavljaju odgovor na dejstvo CCL₄, kao agensa koji prema radovima WANG i sar. (1997) i KATIĆ i sar. (1969), oštećuje jetru prvog ili drugog dana posle aplikacije. Nalazi istih autora ukazuju da CCL₄ osim što uzrokuje reverzibilno oštećenje jetre deluje i kao adjuvans i verovatno predstavlja

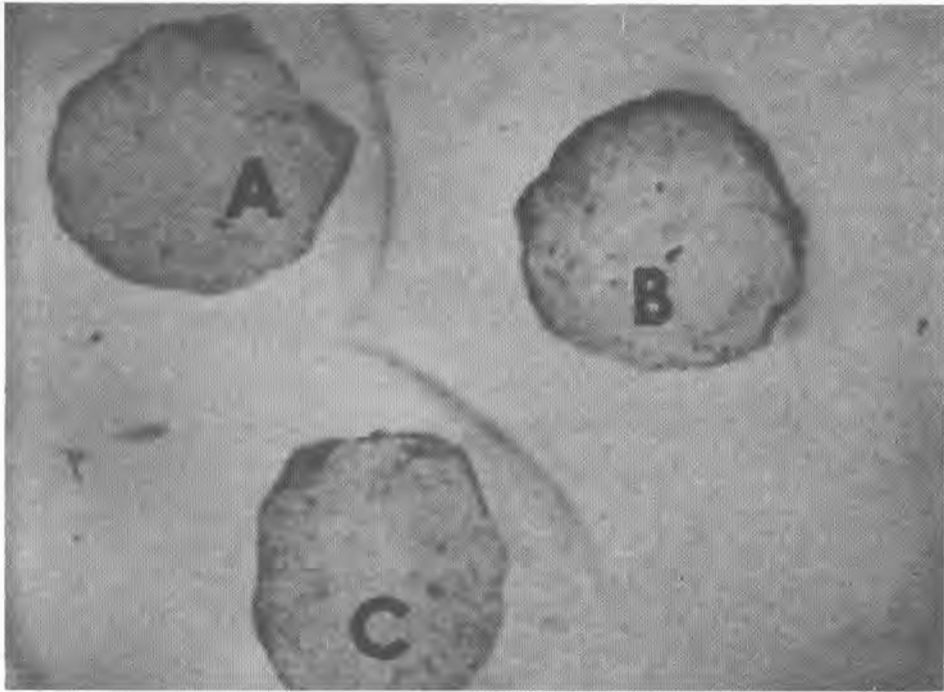
jedan od faktora povećane sinteze ApAA, što može objasniti naš nalaz polimernog albumina 14 dana nakon aplikacije ovog antihelmintika.



Slika 1. Dvostruka imunodifuzija u gelu agaroze krvnog seruma teladi sa eksperimentalno oštećenom jetrom: A-polimer albumina, B-kontrola, C-ispitivani krvni serum teladi 14 dana nakon aplikacije CCl_4

Fig. 2. Double immunodiffusion in agarosa gel in blood sera of calves with experimentaly damaged liver: A-albumin polymers, B-control, C-examined blood sera of calves 14 days after aplication of CCl_4

Nalaz polimernog albumina potvrđen je i u krvnom serumu svih krava sa pozitivnim nalazom koprološke pretrage na Veliki metilj. Linija precipitacije (Sl.2) dobijena između ispitivanih seruma i sintetisanog polimera govedeg albumina kao antigena potvrđuje prisustvo polimernih molekula albumina i posledičnu sintezu ApAA kao odgovor na oštećenje jetre i prisustvo nativnih polimera.



Slika 2. Dvostruka imunodifuzija u gelu agaroze krvnog seruma krava sa pozitivnim koprološkim nalazom (A,C) i sintetisanog antigena (B)

Fig. 2. Double immunodiffusion in agarosa gel in blood sera of cows with coprologically positive diagnosis (A, C) and synthetised antigen (B)

Veliki broj autora takođe potvrđuje prisustvo polimera u krvnom serumu kao posledicu oštećenja jetre. THUNG I GERBER (1981), analizom 114 uzoraka seruma bolesnika sa raznim bolestima jetre, nalaze prisustvo polimera u 62.3% uzoraka. MANNIS i sar. (1984), metodom imunodifuzije su utvrdili polimere albumina u 40% pacijenata sa oštećenjima jetre. Dostupni podaci iz literature su manje brojni kada je u pitanju dijagnostika polialbumina u animalnoj patologiji. LEE i sar. (1993), posle inficiranja jedne vrste veverica (Woodchuck) virusom hepatitisa našli **polimere** u krvnom serumu tih životinja. U krvnom serumu kunića LENKEI i sar. (1974), takođe otkrivaju polimere, a kao posledicu akutnih i hroničnih hepatopatija.

ZAKLJUČCI

Analizom dobijenih rezultata može se zaključiti:

Pad koncentracije ukupnih proteina i albumina uočen je u krvnom serumu svih teladi nakon aplikacije CCL₄. Vrlo značajan pad koncentracija ($p < 0.01$), dobijen je 14 dana posle aplikacije, a 4 nedelje posle davanja CCL₄ merene koncentracije su u fiziološkim granicama.

Aktivnost enzima AST i ALT posle tretiranja teladi su u porastu. Porast aktivnosti AST nakon 7 i 14 dana od davanja CCL₄ je visoko značajan, ($p < 0.001$), a aktivnost enzima ALT u istom periodu je značajno porasla ($p < 0.01$). Nakon 28 dana od davanja CCL₄ aktivnost enzima je bila bliska vrednosti kontrolnog uzorka.

Prisustvo polimernog albumina u krvnom serumu svih ispitivanih teladi utvrđeno je 14, 21 i 28 dana po aplikaciji CCL₄.

Analizirani biohemijski parametri u krvnom serumu teladi nakon tretmana sa CCL₄ ukazuju da je izvršeno reverzibilno eksperimentalno oštećenje jetre.

U krvnom serumu svih krava sa pozitivnim koprološkim nalazom na Veliki metilj, utvrđeno je prisustvo polimera, kao posledica oštećenja jetre ovim parazitom.

Dobijeni rezultati potvrđuju da se nalaz polimera albumina u krvnom serumu goveda može koristiti kao još jedan dijagnostički pokazatelj oštećenja jetre.

LITERATURA

- BARNOUIN J, MAILOT M, LEVIEUX D (1982): Evaluation of hepatic pathology of bovines by a blood sample Relations with histopathologic findings, *Ann Rech Vet*, 12; 4, p.363-9
- CHARLTON MR (1996): Protein metabolism and liver disease, *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 10; 4, p.617-35
- KANEKO JIRO: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Press, San Diego, 1989, p.146-56, 345-52
- KATIĆ R, VUKIĆEVIĆ Z, GAĐANSKI GORDANA, ŠIBALIĆ C, CVETKOVIĆ LJ, ĐUKIĆ BRANKA, MATIĆ G (1969): Ispitivanje uticaja nekih adžuvantnih materija na nastajanje imuniteta kod ovaca vakcinisanih protivu enterotoksemije, *Vet glasnik*, 10; p.735-40
- KNIGHT RA (1978): Experimental cross infections of *Fasciola hepatica* in lamb and calves, *J Parasitol*, 64; 4, p.601-5

- LEE WM, IVERSON A, MCLEOD L, WALPOLE HE, ARNAUD P, COTE PJ, GERIN JL, TENNAND BC (1993): Antibodies to polymerized albumin in woodchuck hepatitis virus infection, *Viral Immunol*, p.13-9
- LENKEI RODICA, GABRIELA MOTA, DAN MARIA-ELENA, LAKY MARIANA (1974): The polymerized albumin and anti-albumin autoantibodies in patients with hepatic diseases, *Rev Roum Biochim*, 11; 4, p.271-6
- MANN S M , MÜLLER M , MEYER ZUM BÜSCHENFELDE KH (1984): Detection of autoantibodies to polymerized human serum albumin, *Leber Magen Darm*, 14; 6, p.271-5
- ONICA DOINA, RODICA LENKEI AND V GHETIE (1978/A): Immunogenicity of glutaraldehyde- treated homologous albumin in rabbits, *Immunochemistry*, 15; p. 687-93
- PAVIĆEVIĆ ZORICA: Određivanje prisustva polimera albumina u krvnom serumu goveda sa oštećenom jetrom; magistarski rad, Fakultet veterinarske medicine Beograd, 1998.
- ŠTRAUS BOŽIDAR: Medicinska biokemija, Jugoslovenska medicinska naklada-Zagreb, 1998, str.765-78
- THUNG SN , GERBER MA (1981): HBsAg-associated albumin receptors and antialbumin antibodies in sera of patients with liver disease, *Gastroenterology*, 80; 2, p.260-4
- TIETZ W NORBERT: Fundamentals of Clinical Chemistry, Third edition, W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1987.
- TRIOLO G, FILIPAZZO MG, PINZELLO G, GIARDINA E, RINALDI A (1983): Detection and Characterization of antibodies to polymerized Human serum albumin (AAA) by ELISA, *Journal of Immunological Methods*, 62; p.257-63
- WANG PY, KANEKO T, TSUKADA H, NAKANO M, NAKAJIMA T, SATO A (1997): Time courses of hepatic injuries induced by chloroform and by carbon tetrachloride: comparison of biochemical and histopathological changes, *Arch Toxicol*, 71; p.638-45
- WYCKOFF JH 3D, BRADLEY RE (1985): Diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in beef calves by plasma enzyme analysis, *Am J Vet Res*, p.1015-9

**ALBUMIN POLYMERS AS BIOCHEMICAL PARAMETER
OF COWS LIVER DAMAGE**

*by Zorica Pavićević,
Biotechnical institute - Podgorica*

Summary

The presence of polymerized albumin due to various liver damages has been primary detected in human blood sera, and later in rabbit blood sera, too. Several immunochemical methods can be applied to detect the altered albumin molecule, using antipolyalbumin antibodies (ApAA) as immune response of the polymerized albumin. There was the task to examine presence of albumin polymers in bovine blood sera by techniques of double immunodiffusion with sintetisedpolymer as antigen, in blood sera calves with liver damaged caused in artificial way by application of carbon-tetrachlorid (CCL₄) and coprologically positive cattle on F. hepatica. In the first group investigated and activities aspartat aminotranspherase (AST), alanin aminotranspherase (ALT) and concentration of albumin and total proteins. The presence of albumin polymers in blood sera was result of liver damage caused by efect of CCL₄ and with F. hepatica. The results obtained in our investigations of the presence of albumin polymers in blood sera could be applied in diagnosing of liver damage diseases.