



Вплив одноразового перорального введення щурам асоціату таурин-декстрин на концентрацію амінокислот у плазмі крові

Р. Д. Остапів^{1,2}, О. І. Лукащук^{1,2}, В. Я. Самарик³, М. І. Нагорняк³, С. М. Варваренко³
romostapiv@gmail.com

¹Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Університетська, 1, м. Львів, 79007, Україна

²Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок,
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

³Національний університет «Львівська політехніка»,
вул. Степана Бандери, 12, м. Львів, 79013, Україна

Метою роботи було дослідити здатність декстринових частинок різних розмірів, модифікованих N-стеорійлглутаміновою кислотою, підвищувати транспорт таурину в плазму крові щурів. Для досягнення мети щурів лінії *Wistar* масою 240–260 г розділили на контрольну і чотири дослідні групи. Щурам контрольної групи одноразово перорально вводили воду, щурам першої (I) експериментальної групи — водний розчин таурину дозою 100 мг/кг, другої (II) та третьої (III) — розчин асоціату таурин-декстрин з розмірами часточок 60–90 та 500–800 нм відповідно, в яких доза таурину була 100 мг/кг; четвертої (IV) — тільки декстрин. Через 30 хвилин після введення діючих речовин щурів декапітували та брали кров. Осаджували форменні елементи крові та протеїни і проводили дериватизацію 1-флуоро-2,4-динітробенzenом. Вільні амінокислоти плазми крові розділяли на рідинному хроматографі *Dionex Ultimate 3000*, оснащеному спектрофотометричним детектором, хроматографічною колоною *Luna C18 (2) 250×4,6 мм* за градієнтного типу елюювання. Встановлено, що у плазмі крові щурів I та III дослідних груп вміст таурину на 33,8% вищий, ніж у контролі. Пероральне введення асоціату таурин-декстрин з часточками 60–90 нм збільшує вміст таурину на 62,6% порівняно з контролем і на 21,6% порівняно з I та III експериментальними групами, що вказує на ефективний транспорт таурину декстрину лише з часточками 60–90 нм. Зареєстровано, що введення як таурину, так і асоціату таурин-декстрин знижувало концентрацію глутаміну, метіоніну, лізину, аланіну, фенілаланіну та гістидину. Причиною зменшення вмісту останніх двох амінокислот був не тільки таурин, але й сам транспортер. За введення тільки транспортеру знижується концентрація аспарагіну, а вміст аргініну, навпаки, зростає. У I експериментальній групі знижується концентрація аспарагінової кислоти та серину, а в II — валіну, лейцину та триптофану, у III — глутамінова кислота. Вміст гліцину зростає у II експериментальній групі, а концентрація орнітину у всіх групах, крім III, порівняно з контролем. Отже, модифікований декстрин з розміром частинок 60–90 нм підвищує транспорт таурину в кров.

Ключові слова: декстрин, N-стеорійлглутамінова кислота, транспортер, таурин, амінокислоти, високоефективна рідинна хроматографія

Таурин — сульфовмісна похідна амінокислот цистеїну та метіоніну, яка бере участь у підтримці осмотичного тиску, окисного метаболізму, кальцієвого гомеостазу, вуглеводного та ліпідного обмінів [3]. Для більшості ссавців таурин є напівзамінною або незамінною амінокислотою [5]. Зниження вмісту таурину в організмі призводить до ретинопатій, кардіоміопатій, міопатій, жирового переродження печінки та інших системних розладів [2]. Тому концентрацію

таурину в організмі необхідно підтримувати на фізіологічному рівні — 20–40 мкмоль/л у плазмі крові та 4–16 мкмоль/г тканини в органах [1]. Оскільки транспорт таурину в органи і тканини є обмеженим і регулюється натрієзалежним тауриновим симпортером TauT [4], важливо збільшити його біодоступність транспортерами. Одним з таких потенційно може бути декстрин, модифікований N-стеорійлглутаміновою кислотою [7]. Розгалуження відбувається за рахунок

взаємодії обох карбоксильних груп похідної глютамінової кислоти з гідроксильними групами декстрину.

Модифікований декстрин є біфільною сполукою і має поверхнево активні властивості. За рахунок цього забезпечується спроможність до утворення у водних середовищах стабілізованої дисперсної фази, яка може неспецифічно зв'язувати речовини адсорбцією [7]. Сполука має високу проникність у клітину, низьку токсичність. Однак на сьогодні невідомо, чи здатний вказаний транспортер переносити речовини з кишечника до кров'яного русла. Метою роботи було дослідити вплив асоціату таурин-декстрин на концентрацію амінокислот у плазмі крові.

Матеріали і методи

Як транспортери таурину використовували модифіковані декстринові полімери розміром частинок 60–90 нм та 500–800 нм, синтезовані на базі хімічного факультету Національного університету «Львівська Політехніка».

Дослідження можливостей транспортеру проводили на білих щурах-самцях лінії *Wistar* масою 220–250 г та віком 5 місяців, яких поділили на 5 груп — одну контрольну і чотири дослідних (по 4 щури в групі). Тваринам контрольної групи перорально вводили питну воду в кількості 1 мл. Першій експериментальній групі щурів вводили водний розчин таурину 1 мл дозою 100 мг/кг. Тваринам другої і третьої експериментальних груп перорально вводили 1 мл водного розчин асоціату декстрин-таурин в дозі 100 мг/кг з розмірами часточок 60–90 та 500–800 н відповідно. Щурам четвертої експериментальної групи вводили лише 1 мл 1% розчину декстрину. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, і Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Оскільки на 30 хв. після перорального введення вміст таурину в плазмі крові є найвищим [9], щурів через 30 хв. декапітували під легким хлороформ-

ним наркозом, брали кров у пробірки, попередньо додавши гепарин. Для осадження формених елементів крові пробірки центрифугували 5 хв. за 3000 g. Після цього плазму крові відбирали і проводили осадження протеїнів 20% сульфосаліциловою кислотою протягом доби за температури +2–+4°C та центрифугували 15 хв. за 9000 g.

Для визначення амінокислотного складу використали стандартні зразки амінокислот виробництва *Sigma Aldrich*. Амінокислоти розчиняли у 0,05 М натрію тетрабораті до концентрацій 10 мкг/мл. Стандартні зразки і депротейнізовану плазму крові дериватизували 1-флуоро-2,4-динітробенzenом протягом 40 хв. на водяній бані за 40°C [11]. Розділення амінокислот проводили за допомогою ВЕРХ на хроматографі *Dionex Ultimate 3000*, оснащеного спектрофотометричним детектором, хроматографічною колоною *Luna C18* (2) 250×4,6 мм. Мобільна фаза являла собою суміш 0,02 М NaH_2PO_4 з рН 2,0 і ацетонітрилом. Програма градієнтного елюювання наведена у табл. 1.

Швидкість елюції становила 1 мл/хв. Похідні амінокислот були виявлені за $\lambda_{\text{abs}} = 350$ нм. Площі хроматографічних піків та обрахунки статистичних даних проводили за допомогою програми *Chromeleon Software*.

Результати й обговорення

У результаті досліджень було розділено та ідентифіковано 20 амінокислот (рис.).

Встановлено, що концентрація таурину у плазмі крові щурів контрольної групи становила $24,37 \pm \pm 0,38$ мкмоль/л (табл. 2)

Одноразове пероральне введення водного розчину таурину дозою 100 мг/кг спричинювало його зростання на 33,8% у плазмі крові щурів. У плазмі крові щурів II експериментальної групи вміст таурину на 62,6% вищий порівняно з контролем і на 21,6 % ($P < 0,05$), ніж у I експериментальній групі тварин. Вміст таурину в III експериментальній групі був на рівні I групи. Тобто концентрація таурину є найвищою у плазмі крові щурів II експериментальної групи, модифікований декстрин з розмірами частинок 60–90 нм підвищує транспорт таурину в кров, а частинки 500–800 нм не сприяють його транспорту. Це прямо вказує на залежність ефективності транспорту від розміру декстринових частинок — малі частинки ефективніше переносять таурин у кров через кишечник.

Одноразове введення таурину і декстринового асоціату спричинило зміну концентрації й інших амінокислот. Вміст глутаміну у плазмі крові щурів I та II експериментальних груп знижувався на 29,2 і 27,1% порівняно з контролем (табл. 2). У тварин III експериментальної групи концентрація глутаміну була на 14,3 % ($P < 0,01$) нижчою від контрольних показників. Подібну тенденцію спостерігали за дослідження вмісту метіоніну, лізину та аланіну, величини значень яких у плазмі крові щурів I експериментальної групи знижувались на 48,8, 51,1 та 67,2%, у тварин II експериментальної групи — на 50,4, 43,2 та 39,7% та у III експериментальній групі — на 30,2, 20,3 та 56,6% відповідно порівняно з контролем. У плазмі крові тварин IV експериментальної групи вміст глутаміну, лізину, метіоніну та аланіну залишається

Таблиця 1. Програма градієнтного елюювання
Table 1. Gradient elution program

Час, хв Time, min	Ацетонітрил, % Acetonitrile, %	0,02 М NaH_2PO_4 , %
0	17	83
22	17	83
23	25	75
37	25	75
43	40	60
48	50	50
57	50	50
64	55	45
78	17	83
110	17	83

Таблиця 2. Вплив одноразового перорального введення таурину та асоціату таурин-декстрин на концентрацію вільних амінокислот у плазмі крові щурів, мкмоль/л**Table 2.** The effect of a single oral administration of taurine and taurine-dextrin associate on the concentration of free amino acids in the blood plasma of rats, $\mu\text{mol/l}$

Амінокислота Amino acid	Групи тварин Animal groups	Контроль Control (n=4)	Експериментальні групи / Experimental groups			
			I (n=4)	II (n=4)	III (n=4)	IV (n=4)
Таурин / Taurine		24,37 \pm 0,38	32,60 \pm 1,33*	39,63 \pm 2,10**#	32,89 \pm 1,18*	24,20 \pm 0,69
Глутамін / Glutamine		536,23 \pm 12,45	415,00 \pm 5,24***	421,69 \pm 12,32***	469,18 \pm 4,39**	563,02 \pm 31,46
Метіонін / Methionin		72,60 \pm 1,22	48,75 \pm 3,45**	48,26 \pm 4,74**	55,75 \pm 1,52**	70,79 \pm 5,33
Лізин / Lysine		106,44 \pm 2,59	70,46 \pm 4,24**	74,32 \pm 2,91***	88,41 \pm 1,33***	98,12 \pm 3,69
Аланін / Alanine		227,61 \pm 7,27	136,14 \pm 1,62***	162,88 \pm 16,74**	145,38 \pm 19,87*	225,50 \pm 17,89
Феніланін / Phenylalanine		70,46 \pm 1,06	47,74 \pm 1,91**	47,53 \pm 3,85**	51,24 \pm 3,12*	38,89 \pm 0,45***
Гістидин / Histidine		157,63 \pm 5,40	132,57 \pm 13,69	100,38 \pm 6,43**	127,82 \pm 2,98***	127,91 \pm 2,32**
Аспарагін / Asparagine		62,26 \pm 5,75	45,32 \pm 0,15	47,62 \pm 3,71	52,21 \pm 3,34	42,80 \pm 1,56*
Серин / Serine		75,69 \pm 0,42	64,64 \pm 0,26***	64,45 \pm 4,46	71,41 \pm 1,29	71,51 \pm 2,06
Аспарагінова кислота / Aspartic acid		26,82 \pm 1,06	21,00 \pm 1,23*	20,66 \pm 2,99	20,08 \pm 1,72	24,10 \pm 2,42
Валін / Valine		104,77 \pm 3,13	99,16 \pm 2,07	78,42 \pm 1,99***	100,14 \pm 3,38	91,29 \pm 4,37
Лейцин / Leucine		44,50 \pm 1,76	42,17 \pm 1,43	32,67 \pm 2,18**	46,45 \pm 4,94	40,46 \pm 2,75
Триптофан / Tryptophan		63,79 \pm 3,64	56,27 \pm 1,64	47,09 \pm 2,54*	57,93 \pm 3,21	57,52 \pm 3,07
Глутамінова кислота / Glutamic acid		91,89 \pm 3,26	73,95 \pm 5,53	73,99 \pm 9,42	70,85 \pm 3,52*	110,31 \pm 6,64
Гліцин / Glycine		191,36 \pm 5,35	181,02 \pm 13,48	229,05 \pm 10,21*	254,28 \pm 15,00	214,03 \pm 8,05
Аргінін / Arginine		14,12 \pm 0,76	11,93 \pm 0,05	16,08 \pm 2,86	33,62 \pm 10,22	25,76 \pm 0,80***
Орнітин / Ornithine		72,52 \pm 4,25	91,43 \pm 3,58*	99,36 \pm 7,72*	76,43 \pm 5,73	119,44 \pm 8,64*

Примітка: статистично вірогідна різниця щодо показників контролю: * — $P < 0,05$, ** — $P < 0,01$, *** — $P < 0,001$;
 статистично вірогідна різниця щодо показників першої дослідної групи: # — $P < 0,05$.

Note: statistically significant difference to control group: * — $P < 0,05$, ** — $P < 0,01$, *** — $P < 0,001$;
 statistically significant difference to first experimental group: # — $P < 0,05$.

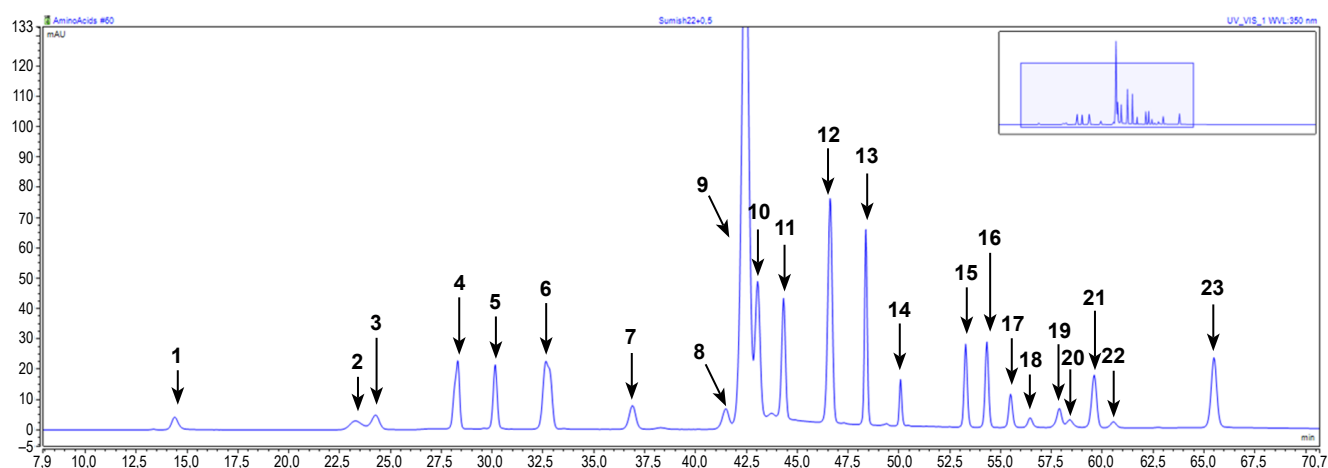


Рис. Хромотограма розчину суміші стандартів дериватизованих амінокислот: 1 — фосфосерин; 2 — аргінін; 3 — таурин; 4 — аспарагін; 5 — глутамін; 6 — цитрулін; 7 — аспарагінова; 8 — глутамінова; 9 — дериватизаційний реагент; 10 — гліцин; 11 — саркозин; 12 — дериватизаційний реагент; 13 — аланін; 14 — гістидин; 15 — метіонін; 16 — валін; 17 — феніланін; 18 — триптофан; 19 — лейцин; 20 — ізолейцин; 21 — орнітин; 22 — дериватизаційний реагент, 23 — лізин.

Fig. Chromatogram of the derivatized amino acids standard solution: 1 — phosphoserine; 2 — arginine; 3 — taurine; 4 — asparagine; 5 — glutamine; 6 — citrulline; 7 — asparaginic; 8 — glutaminic; 9 — derivatization reagent; 10 — glycine; 11 — sarcosine; 12 — derivatization reagent; 13 — alanine; 14 — histidine; 15 — methionine; 16 — valine; 17 — phenylalanine; 18 — tryptophan; 19 — leucine; 20 — isoleucine; 21 — ornithine; 22 — derivatization reagent, 23 — lysine.

на рівні контролю, тобто на концентрацію вказаних амінокислот у крові щурів впливає не транспортер, а тільки таурин. Збільшення концентрації сульфохлоридних амінокислот може пришвидшувати їх транспорт у клітину з плазми крові [6]. Крім цього, таурин є антагоністом за транспортом у організм до аланіну та глутаміну і їхня концентрація знижується за його високого вмісту у плазмі крові [5].

Вміст фенілаланіну у I–III експериментальних групах на 37,5–47,5% зменшувався порівняно з величинами значень у контролі (табл. 2.). Найбільше зниження концентрації вказаної амінокислоти зареєстроване у плазмі крові щурів IV експериментальної групи — на 81,8% нижче, ніж у контролі. Подібна тенденція з менш вираженими змінами (зниження концентрації 23,3–57,0%) спостерігається за дослідження вмісту гістидину. Концентрація аспарагіну у плазмі крові щурів, яким вводили лише модифікований декстрин, вірогідно знижується на 45,5%. Встановлені зміни вмісту фенілаланіну, гістидину й аспарагіну узгоджуються з літературними даними, де введення декстину знижувало величини значень вказаних амінокислот [12].

Одноразове введення таурину дозою 100 мг/кг знижувало вміст серину та аспарагінової кислоти у плазмі крові дослідних тварин на 17,1 та 27,7% порівняно з контролем. Такий ефект може бути викликаний збільшенням синтезу фосфатидилсерину через підвищення концентрації таурину [4]. Крім цього, зростання вмісту таурину може призводити до збільшення синтезу N-метил-D-аспартату, а значить, до зменшення аспарагінової кислоти [1]. За перорального введення асоціату таурин-декстрин з розмірами часточок 60–90 нм концентрація валіну, лейцину та триптофану на 33,6–36,4% нижча, ніж у контролі. Можливо, зниження вмісту цих амінокислот відбулось внаслідок збільшення концентрації таурину або це синергічний вплив таурину та транспортеру. У плазмі крові щурів III експериментальної групи вміст глутамінової кислоти знижувався на 29,7% порівняно з контролем, що може бути результатом одночасного впливу таурину і транспортеру з великими розміром часточок.

Після введення асоціату декстрин-таурин розмірами часточок 500–800 нм вміст гліцину зростає на 19,7%, а концентрація аргініну збільшується вдвічі у плазмі крові IV експериментальної групи. Вміст орнітину зростає на 26,1–64,7% у тварин I, II та IV експериментальних груп. Зростання орнітину та аргініну може вказувати на короткотривале збільшення активності циклу сечовини [8].

Нашими дослідженнями встановлено, що одноразове введення асоціату декстрин-таурин розміром часточок 60–90 нм підвищує концентрацію таурину в плазмі крові порівняно як з контролем, так і з I експериментальною групою, що доводить властивості декстину модифікованого N-стеорилглутаміновою кислотою як транспортеру. Механізм зниження фенілаланіну, гістидину та аспарагіну за введення тільки декстину ще потребує досліджень. Літературні дані вказують, що ці амінокислоти можуть використовуватись для синтезу інсуліну. Інсулін, своєю чергою, сприяє абсорбції глюкози, утвореної за розщеплення декстину [10]. Зниження серину й аспарагінової кислоти за одноразового введення таурину зареєстровано і в літературних даних [6]. Однак механізм такої дії залишається невідомим.

Висновки

Одноразове пероральне введення асоціату декстрин-таурин з розмірами часточок 60–90 нм збільшує на 21,6% концентрацію таурину у плазмі крові порівняно з водним розчином таурину. Це доводить здатність декстину модифікованого N-стеорилглутаміновою кислотою транспортувати таурин зі шлунково-кишкового тракту в кров і дає можливість надалі розробляти препарати на основі асоціату. Крім цього, виявлено, що за введення транспортеру знижується концентрація фенілаланіну, гістидину й аспарагіну та зростає вміст орнітину і аргініну. За синергічної дії декстину і таурину знижуються валін, лейцин та триптофан.

Перспективи подальших досліджень

Дослідити механізми впливу декстринового транспортеру на концентрацію амінокислот у плазмі крові та токсичність новосинтезованої сполуки.

1. Chan CY, Sun HS, Shah SM, Agovic MS, Friedman E, Banerjee SP. Modes of direct modulation by taurine of the glutamate NMDA receptor in rat cortex. *Neuropharmacology and analgesia*. 2014; 728: 167–175. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.01.025.
2. Hansen SH, Andersen ML, Birkedal H, Cornett C, Wibrand F. The important role of taurine in oxidative metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006; 583: 129–135. DOI: 10.1007/978-0-387-33504-9_13.
3. Hansen SH, Andersen ML, Cornett CI, Gradinaru R, Grunnet N. A role for taurine in mitochondrial function. *Journal of Biomedical Science*. 2010; 17 (1): S23. DOI: 10.1186/1423-0127-17-S1-S23.
4. Heller-Stilb B, van Roeyen CI, Rascher K, Hartwig HG, Huth A, Seeliger MW, Warskulat U, Häussinger D. Disruption of the taurine transporter gene (*taut*) leads to retinal degeneration in mice. *FJ Express Summaries*. 2002; 16 (2): 1–18. DOI: 10.1096/fj.01-0691fje.
5. Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 1992; 72 (1): 101–163. DOI: 10.1152/physrev.1992.72.1.101.
6. Lajtha A. (ed). *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology*. Springer US (USA), 2007: 418 p. ISBN 978-0-387-30342-0.
7. Nagornyak M, Figurka N, Samaryk V, Varvarenko S, Ferens M, Oleksa V. Modification of polysaccharides by N-derivates of glutamic acid using Steglich reaction. *Chemistry and Chemical Technology*. 2016; 10: 23–27. DOI: 10.23939/chcht10.04.423.
8. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of biochemistry*. 5th ed. New York, WH Freeman and company. 2011: 1282 p. ISBN 978-1-4292-3414-6. Available at: https://www.researchgate.net/publication/48376766_Lehninger_Principles_of_Biochemistry
9. Nielsen CU, Bjerg M, Ulaganathan N, Holm R. Oral and intravenous pharmacokinetics of taurine in sprague dawley rats: the influence of dose and the possible involvement of the proton coupled amino acid transporter, PAT1, in oral taurine absorption. *Physiol. Rep.* 2017; 19 (5): e13467. DOI: 10.14814/phy2.13467.
10. Ribeiro RA, Bonfleur ML, Amaral AG, Vanzela EC, Rocco SA, Boschero AC, Carneiro EM. Taurine supplementation enhances nutrient-induced insulin secretion in pancreatic mice islets. *Diabetes Metabolism. Research and Reviews*. 2009; 25 (4): 370–379. DOI: 10.1002/dmrr.959.
11. Toyoka T. *Modern Derivatization Methods for Separation Sciences*. New York, John Wiley and sons. 1999: 303 p. ISBN 978-0-4719-8364-4.
12. Yokogoshi H, Wurtman RJ. Meal composition and plasma amino acid ratios: effect of various proteins or carbohydrates, and of various protein concentrations. *Metabolism*. 1986; 35 (9): 837–842. DOI: 10.1016/0026-0495(86)90225-8.

Influence of single oral administration of taurine-dextrin associate on concentration of amino acids in rat plasma

R. D. Ostapiv^{1,2}, O. I. Lukashchuk^{1,2}, V. Ya. Samaryk³, M. I. Nagornyak³, S. M. Varvarenko³
romostapiv@gmail.com

¹Ivan Franko National University of Lviv,
1 Universytetska str., Lviv, 79007, Ukraine

²State Scientific Research Control Institute of veterinary drugs and feed additives,
Donetska str., 11, Lviv, 79019, Ukraine

³Lviv Polytechnic National University,
12 Stepana Bandery str., Lviv, 79013, Ukraine

The aim of the study was to test the ability of dextrin particles of different sizes, modified with N-stearylglutamic acid, to increase the transport of taurine into the blood plasma of rats. To achieve this goal, Wistar rats weighing 240–260 g were divided into control and four experimental groups. The control group was administered once perorally with water. The first experimental group was administered perorally with an aqueous solution of taurine at a dose of 100 mg/kg, the second and third — a solution of taurine-dextrin associate with particle sizes of 60–90 nm and 500–800 nm, in which the dose of taurine was 100 mg/kg. The fourth experimental group (IV) was administered only dextrin. In 30 min, the rats were decapitated, and blood was collected. Blood cells and proteins were precipitated, and samples were derivatized with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. Free amino acids of plasma were separated on a *Dionex Ultimate 3000* liquid chromatograph equipped with a spectrophotometric detector, chromatographic column *Luna C18* (2) 250×4.6 mm, elution type was gradient. It was registered that in the first and third experimental groups the content of taurine in the blood plasma of rats was 33.8% higher than in the control. Oral administration of taurine-dextrin associate with 60–90 nm particles increases the taurine content by 62.6% compared to the control and by 21.6% more than in the first and third experimental groups. This indicates efficient transport of taurine by dextrin only with particles of 60–90 nm. Administration of both taurine and taurine-dextrin associate reduced concentrations of glutamine, methionine, lysine, alanine, phenylalanine, and histidine. Moreover, the reason for the decrease in the content of the last two amino acids was not only taurine, but also the transporter itself. With the administration of the transporter the concentration of asparagine was lower than in control, and the content of arginine, on the contrary, higher. In the first experimental group, the concentration of aspartic acid and serine decreased, and in the second — valine, leucine and tryptophan, in the third — glutamic acid. The glycine content increased in the second experimental group. Ornithine content in all experimental groups except the third was higher, compared with the control. Thus, modified dextrin with a particle size of 60–90 nm increases the transport of taurine into the blood.

Keywords: dextrin, transporter, taurine, amino acids, high performance liquid chromatography

Ostapiv RD, Lukashchuk OI, Samaryk VY, Nagornyak MI, Varvarenko SM. Influence of single oral administration of taurine-dextrin associate on concentration of amino acids in rat plasma. *Biol. Tvarin.* 2020; 22 (2): 15–19. DOI: 10.15407/animbiol22.02.015.