

увеличение данного показателя в 1,2 раза по сравнению с началом опыта. Также у животных первой группы, где применялся препарат «Экофильтрум» происходило снижение такого показателя, как концентрация билирубина, что также говорит о снижении уровня эндогенной интоксикации и нормализации функции печени. При этом данный показатель у поросят второй группы увеличился в 1,3 раза.

Кроме того, при проведении опыта было обнаружено, что у животных первой группы возросли такие показатели, как ГГТ (в 1,1 раза) триглицериды (в 2,1 раза) и мочевины (в 1,9 раза). У животных второй группы соответствующие показатели составили: ГГТ – снизился в 0,9 раза, триглицериды – снизился в 1,1 раза, а мочевины возросла в 1,1 раз.

**Заключение.** Таким образом, изучая динамику показателей общего клинического анализа крови, ряда биохимических тестов можно прийти к заключению, что препарат «Экофильтрум» обладает высокими детоксикационными, гепатопротективными свойствами и является эффективным профилактическим средством при гастроэнтерите поросят.

**Литература.** 1.Владимиров, Ю.А. *Физико-химические основы патологии клетки.* Москва: МГУ, 2000. – 200 с.  
2.Желудочно – кишечные болезни поросят и их лечение / В.И. Божко // *Ветеринария.* 1984. - № 3. С. 61 – 63.  
3.Желудочно – кишечные болезни свиней / А.Г. Бахтин [и др.]; под общ. ред. А.Г. Бахтина. - Москва: Колос, 1967. – 210 с.  
4.Крыжановский, Г.Н. *Значение перекисного окисления липидов в патологии молодняка / Г.Н. Крыжановский // Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* – 2002. № 3. – С. 2 – 195.  
Кузьмич, Р.Г. *Перекисное окисление липидов и система антиоксидантной защиты организма животных / Р.Г. Кузьмич, Д.И. Бобрик, А.В. Саватеев.* – Витебск: УО ВГАВМ, 2003. – 64 с.  
6. Осинская В.О. *Исследования обмена адреналина и норадреналина в тканях животного организма.* // *Биохимия* – 1977. - № 3 - с.537-539.  
7. Паршин, П.А. *Клинико – морфологическая характеристика гастроэнтеритов поросят / П.А. Паршин, С.А. Сулейманов // Материалы международной научно – практической конференции, посвящённой 25 - летию Смоленского сельскохозяйственного института.* Смоленск, 1999. – 306 с.  
8. *Перекисное окисление липидов и эндогенная интоксикация у животных, значение в патогенезе внутренних болезней животных, пути коррекции.* / С.С. Абрамов [и др.]; под общ. ред. С.С. Абрамова. Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – 208 с.  
9. Проценко В.А., Шпак С.И. *Протекторное свойство ингибиторов ферментов протеолиза в клеточных системах при шоке // Нарушение механизмов регуляции и их коррекция: Тез. докл. IV Всес. съезда патофизиол., Кишинев, 3-6 окт., 1989, т. 2. - М., 1989. - С. 781.*

Статья поступила 29.09.2010г.

УДК 615.837.3

### ДЕЙСТВИЕ КИСЛОРОДНЫХ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ НА ПИРИДОКСАЛЬ-5-ФОСФАТ И ЕГО КОМПЛЕКСЫ С АМИНОКИСЛОТАМИ

Соколовская С.Н.,

УО«Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

Игнатенко В.А.

УО«Гомельский государственный медуниверситет»

г. Гомель, Республика Беларусь

*Пиридоксаль-5-фосфат является низкомолекулярным антиоксидантом плазмы крови. При взаимодействии со свободными радикалами, генерируемыми в ультразвуковом поле, витамин окисляется до дипиридила и пиридоксильной кислоты. Образование основания Шиффа с аминокислотами и альбумином замедляли его окисление. Имидазол, напротив, ускорял окисление пиридоксаль-5-фосфата под действием свободных радикалов.*

*Pyridoxal-5-phosphate is a low-molecular antioxidant of plasma of blood. At interaction with the free radicals generated in an ultrasonic field, vitamin is oxidized to dipiridil and piridoxil acids. Formation of the basis of Shiffa with amino acids and albumin slowed down its oxidation. The imidazole, on the contrary, accelerated oxidation of piridoksal-5-phosphate under the influence of free radicals.*

**Введение.** Увеличение ионизирующего излучения в условиях после аварии на ЧАЭС и воздействие техногенного излучения на организм человека и животного делают актуальным изучения влияние свободных радикалов на биологические объекты, так как механизм косвенного действия ионизирующего излучения на живые организмы заключается во взаимодействии свободных радикалов воды или растворителя с биологическими молекулами.

Физико-химические эффекты ультразвука (УЗ) обусловлены возникновением в водной среде кавитационных полостей, в которых происходит диссоциация паров воды на ОН и Н радикалы и целый ряд других свободно-радикальных соединений [1]. Именно поэтому УЗ можно использовать как модель для изучения взаимодействия свободных радикалов (СР) с биологическими молекулами.

В антиоксидантную систему плазмы крови кроме белков (трансферрин, альбумин, церуллоплазмин, глобулины и другие) входят также низкомолекулярные соединения: глутатион, витамин С, токоферолы, билирубин, мочевины и другие соединения [2,3,4]. К этим соединениям относятся также и витамины, в их числе и витамины В<sub>6</sub> и его коферментная форма пиридоксаль-5-фосфат (PLP) [2,3,5].

PLP избирательно взаимодействует как со свободными аминокислотами и аминами, так и с аминокислотами и сульфгидрильными группами белков. Из-за наличия электроно-акцепторной пиридиновой группы подвижность водорода формильной группы PLP очень высока и она может взаимодействовать со многими соединениями, в том числе и активными формами кислорода. Поэтому нами была исследована некоферментная функция PLP в качестве ловушки кислородных свободных радикалов.

Пиридоксаль-5-фосфат является коферментом для многих ферментов, катализирующих превращения аминокислот и аминов [6]. Помимо своей функции кофермента, PLP выступает в роли специфического ингибитора ряда ферментов [6]. PLP избирательно взаимодействует с аминокислотами и аминами, аминокислотами и

сульфгидрильными группами белков, в том числе с мембранными белками, например, белком полосы 3 мембраны эритроцитов [6,7]. Последнее вызывает изменение транспорта аминов в эритроцитах. Связывание с белками крови PLP часто вызывает существенные изменения конформации белков, что сопровождается модификацией их функцией, например, транспортной. PLP эффективно уменьшает сродство  $O_2$  к гемоглобину [7,8].

В данном сообщении рассматривается возможная некоферментная функция PLP как ловушки кислородных свободных радикалов.

**Материал и методы исследования.** PLP (Германия) использовали в концентрациях  $10^{-5}$  -  $10^{-4}$  М. Этиловый спирт квалификации «хч» (концентрированный до 1 М). Аминокислоты и имидазол (Reanal, Венгрия) применяли в концентрациях до  $10^{-2}$  М.

Окисление водных растворов PLP проводили в атмосфере воздуха в УЗ-поле, создаваемом генератором ультразвука УТП-1, частота 880 кГц, интенсивность в пределах 0,2-2,0 Вт/см<sup>2</sup>. Сосуд с озвучиваемым раствором помещали на поверхность цилиндрической кварцевой пластинки толщиной 0,33 см и диаметром 3 см, плотно встроенной в полный металлический цилиндр с двойными стенками, между которыми циркулировала вода, с температурой 25° С (термостат).

Кинетику превращения PLP в УЗ-поле контролировали спектрофотометрически по убыли поглощения в области 400 нм. Кинетику образования фосфопиридоксильной кислоты в смеси продуктов регистрировали флуоресцентным методом ( $\lambda_{\text{возб.}}$  320 нм,  $\lambda_{\text{фл.}}$  420 нм). Образование дипиридила измеряли с помощью 2,4-динитрофенилгидразина. Образование ацилдипиридила контролировали методом кругового дихроизма, так этот продукт содержит ассиметричный атом углерода. Продукты превращения PLP в ультразвуковом поле разделяли хроматографически на бумаге в системе растворителей этанол- вода- уксусная кислота. В данных условиях наблюдали образование в заметных количествах трех продуктов один из которых обладал интенсивной флуоресценцией. По спектрам поглощения ( $\lambda_{\text{макс}}$  325 нм и  $\lambda_{\text{флуор. макс.}} = 420\text{ нм.}$ ) можно идентифицировать это соединение как 5-фосфо-4-пиридоксильную кислоту.

Тиазолидин-фосфат получали, смешивали в нейтральной среде PLP ( $2 \cdot 10^{-4}$  М) с 5-10 кратным полярным избытком цистеина. Образование цистеиновой кислоты, после воздействия ультразвука на водные растворы тиазолидина регистрировали с помощью анализатора аминокислот. В качестве эталонного соединения использовали цистеиновую кислоту (Reanal Венгрия).

Основания Шиффа PLP ( $2 \cdot 10^{-4}$  М) с аминокислотами в нейтральной водной среде получали добавлением соответствующей аминокислоты в 10-20 кратном молярном избытке по отношению к концентрации кофермента. В этих условиях достигается практически полное включение PLP в состав комплекса с аминокислотами.

**Результаты исследований.** Свободные радикалы, генерируемые в УЗ -поле, действуя на водные растворы PLP, снижают поглощение света в области 400 нм и вызывают увеличение поглощения раствора в области 320-330 нм (рис.1). В начальные промежутки для спектров поглощения наблюдали изобестическую точку на длине волны 323 нм.

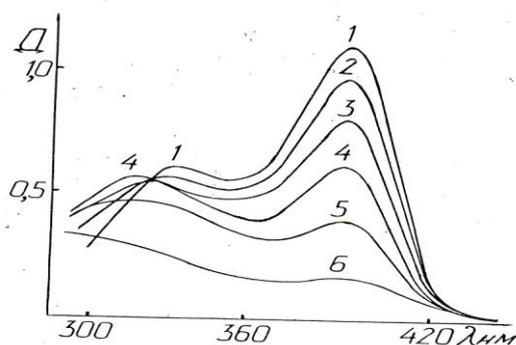


Рис 1. Изменение спектров поглощения PLP при действии УЗ, генерируемых в УЗ - поле. Время сонолиза 10 мин – кривая 2; 20 мин – кривая 3; 40 мин. – кривая 4; 60 мин.- кривая 5; 90 мин – кривая 6. Кривая 1 – исходный спектр поглощения PLP, концентрация витамина в начальный момент времени  $2 \times 10^{-4}$  м, рН водных растворов 6,8.

Параллельно с увеличением поглощения при 320-330 нм наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции, характеризующей максимум при 420-425 нм (рис.2). Это связано с появлением в растворе пиридоксильной кислоты, которая обладает в нейтральной среде интенсивной флуоресценцией с максимум при 420 нм.

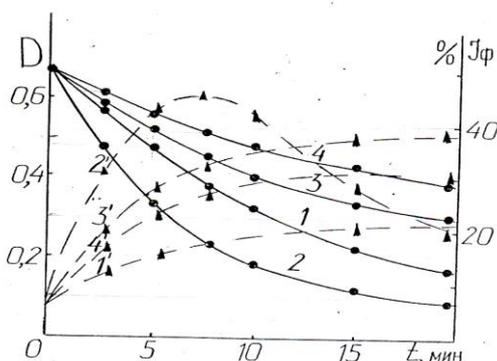
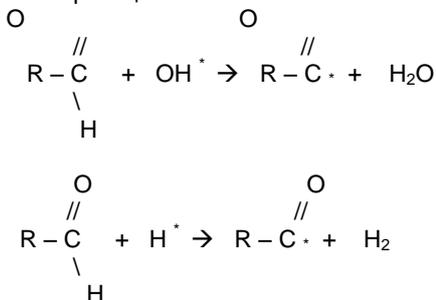


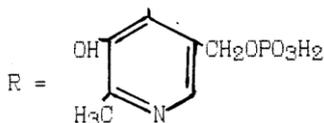
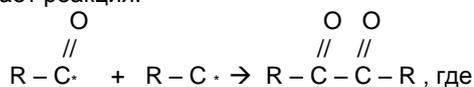
Рис 2. Изменение оптической плотности водных растворов PLP (концентрация  $10^{-4}$  м) на длине волны 390 нм при сонолизе (1-4) и возрастание интенсивности флуоресценции ( $I_{\phi}$ ) пиридоксильной кислоты на длине волны 425 нм (1'-4'): кривые 1 и 1' - в атмосфере воздуха; кривые 2 и 2' - в атмосфере кислорода; кривые 3 и 3' - в атмосфере азота; кривые 4 и 4' - в 1М водно-спиртовом растворе. pH растворов 6,8.

Идентификацию продуктов, полученных при сонолизе водных растворов PLP, проводили методом бумажной хроматографии, сравнивая их с продуктами, полученными при облучении водных растворов PLP УФ светом, которые были подробно описаны Морозовым Ю.В.[6]. При воздействии УФ света на PLP продуктами фотореакции являются фотодимеры PLP. Сравнение спектральных характеристик продуктов, полученных при воздействии УФ-излучения и УЗ на водные растворы PLP, свидетельствует о близости спектральных параметров полученных продуктов. Эти же данные подтверждены результатами экспериментов по хроматографии на бумаге облученных растворов PLP.

Поэтому продукт, поглощающий в области 320-360 нм, представляет собой димер, возникающий в ходе свободно-радикальных реакций:



Затем протекает реакция:



Скорость окисления PLP в пиридоксиковую кислоту замедляется при добавлении в раствор алифатических радикалов, и возрастает с увеличением значения pH среды (рис.3).

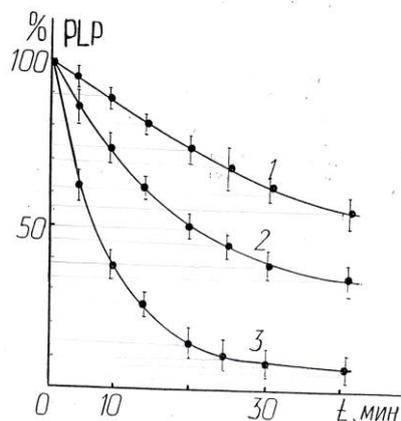
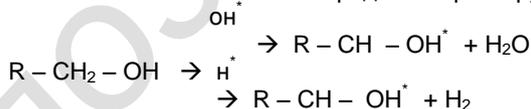


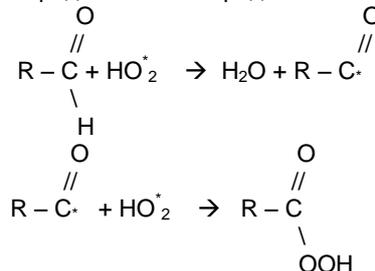
Рис 3. Кинетика окисления PLP при сонолизе в зависимости от pH водных растворов кофермента: pH 3,0 – кривая 1; pH 6,8 – кривая 2; pH 11,4 – кривая 3; исходная концентрация PLP-10<sup>-4</sup>м.

Защитный эффект спиртов свидетельствует о том, что разрушение молекулы PLP в УЗ-поле сопровождается деструкцией пиридинового цикла, главным образом, за счет гидроксильных радикалов. При высоких концентрациях спиртов, пиридиновое кольцо PLP не претерпевает существенных изменений, так как образовавшиеся в УЗ-поле H<sup>•</sup> и OH<sup>•</sup> радикалы реагируют со спиртом, давая органические радикалы:

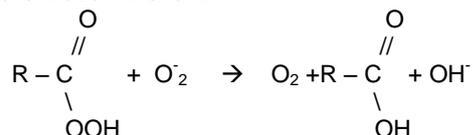


Об участии O<sub>2</sub> в реакциях окисления PLP свидетельствует снижение выхода пиридоксиковой кислоты при добавлении супероксиддисмутазы и каталазы. Супероксиддисмутаза ускоряет образование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> из молекулы O<sub>2</sub>, а каталаза разрушает образовавшийся пероксид водорода до H<sub>2</sub>O и O<sub>2</sub>.

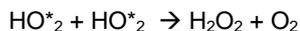
Пероксирадикал HO<sub>2</sub><sup>•</sup> реагируют с пиридоксиковыми радикалами с образованием перекисных соединений:



Перекисные соединения взаимодействуют с  $O_2$  с образованием высокорекреакционных гидроксила воды и пиридоксильной кислоты:



Далее протекают реакции спонтанной дисмутации пероксирадикалов с образованием пероксида водорода:



Аминокислоты оказывают защитный эффект, снижая скорость окисления PLP в пиридоксильную кислоту (рис. 4). Аминокислоты, взаимодействуя с  $H^\bullet$  и  $OH^\bullet$ -радикалами, являются ловушками СР. Как известно, для алифатических аминокислот, взаимодействующих с  $H^\bullet$ - и  $OH^\bullet$ -радикалами, в качестве реакционного центра выступает  $\alpha$ -углерод.

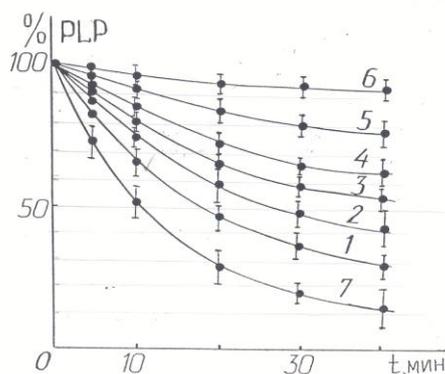


Рис 4. Количество окисленного PLP при сонолизе водных растворов кофермента (кривая 1) и в смеси с аминокислотами: аланином – кривая 2; глицином – кривая 3; гистидином – кривая 4; лизином – кривая 5; цистеином – кривая 6; имидазолом – кривая 7. Концентрация аминокислот –  $5 \times 10^{-3}$  м, исходная концентрация PLP  $10^{-4}$  М. pH водных растворов 6,8.

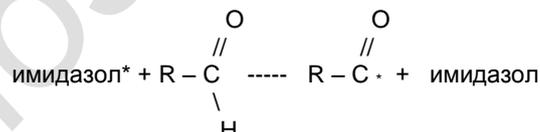
Особенно сильным эффектом по защите PLP обладает L-цистеин, образующий с коферментом циклическое соединение тиазолидин, который имеет максимум спектра поглощения при 325 нм. Тиазолидин получали при смешивании PLP с L-цистеином, находящимся по отношению к PLP в 10-кратном избытке. При воздействии СР на смесь тиазолидина с цистеином наблюдается вначале окисление свободного цистеина в цистин и цистеиновую кислоту [9]. Затем происходила диссоциация тиазолидина с образованием свободного PLP и L-цистеина.

Образование основания Шиффа (ОШ) PLP с аминокислотами снижает реакционную способность водорода альдиминной связи при взаимодействии с  $H^\bullet$  и  $OH^\bullet$ -радикалами. Образование ОШ PLP с аминокислотами защищает PLP от разрушения его СР, вследствие как близкого расположения молекулы аминокислоты в составе комплекса, так и вследствие снижения реакционной способности атома углерода в положении 4 кофермента.

Имидазол, напротив, усиливает окисление PLP в пиридоксильную кислоту и дипиридил (см. рис. 4). Мы предполагаем, что возникший под действием УЗ свободный радикал имидазола эффективно захватывает электрон с альдиминной связи ОШ и ускоряет окисление PLP. Действительно, известно, что имидазол с высокой эффективностью взаимодействует с  $H^\bullet$  и  $OH^\bullet$ -радикалами и при высоких его концентрациях наблюдается полный перехват  $H^\bullet$  и  $OH^\bullet$ -радикалов по схеме:



Радикалы имидазола, вероятно, взаимодействуют с PLP с образованием фосфопиридоксильного радикала:



Фосфопиридоксильный радикал претерпевает превращение с образованием, в основном, дипиридила и небольших количеств пиридоксильной кислоты.

PLP активно взаимодействует с аминокислотами и сывороточным альбумином с образованием ОШ. И поэтому модельные эксперименты, результаты которых приведены выше, можно в полной мере отнести и к случаю взаимодействия PLP с альбумином. В этом случае также происходит защита молекулы PLP от превращений под действием СР.

**Заключение.** Полученные результаты позволяют заключить, что под действием свободных радикалов в присутствии  $O_2$  в водно-спиртовых растворах PLP эффективно протекает реакция окисления витамина в дипиридил и пиридоксильную кислоту. Образование оснований Шиффа PLP с аминокислотами и сывороточным альбумином повышает электроноакцепторную способность атома углерода в положении 4 молекулы витамина и затрудняет окисление его до пиридоксильной кислоты. Присутствующие в растворе свободные аминокислоты

выступают в роли ловушек свободных радикалов. Имидазол, напротив ускоряет окисление PLP в дипиридил и пиридоксильную кислоту.

**Литература.** 1. Эльпинер И.Е. Биофизика ультразвука. – М.: Наука, 1983. – 383 С. 2. Дубинина Е.Е. Антиоксидантная система плазмы крови // Укр. Биохим. Ж.-1992.-Т.64,№4.- с. 12-19. 3. X. M., Karter D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin// Nature.-1992.-Jul. 16, N 6383.- P. 209-215. 4. Арчаков А.И., Мохосоев И.Н. Модификация белков активным кислородом и их распад //Биохимия.- 1999.- Т. 54,№54- С.179-183. 5. Kosak – Toker N., Ayribas D., Vysal M. Species difference in plasma antioxidant activity// Comp. Biochem. Physiol. C.-1993.-Vol. 104, #3.-P.387-390 6. Морозов Ю.А., Бажулина Н.П. Электронное строение, спектороскопия и реакционная способность молекул. – Н.: Наука, 1989.-288 с. 7. Игнатенко В.А. Механизмы действия ультразвука на белки крови и эритроциты: Диссертация канд. биол. Наук.-Минск, 1992.-150 с. 8. Солодунов А.А., Степура И.Н. Механизм взаимодействия пиридоксаль-5-фосфат с сывороточным альбумином человека // Укр.биохим. журн.-1989.-Т.2-С.123-129. 9. Степура И.И., Соколовская С.Н., Солодунов А.А. Окисление глутатиона и цистеина под действием радикалов генерируемых ультразвуком // Биофизика – 1995.- Т. 40, N 6.- С. 1155-1164.

Статья поступила 29.11.2010 г.

УДК 636.2:612.015

## БИОХИМИЧЕСКИЕ СИНДРОМЫ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ

Соболева Ю.Г., Холод В.М.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

*Проведено исследование основных гепатоспецифических биохимических синдромов при жировой дистрофии печени и фасциозе. Наилучшие диагностические результаты эти синдромы имеют при жировой дистрофии печени, а наиболее пригодным для дифференциальной диагностики был синдром недостаточности синтетических процессов. При диспепсии телят наиболее информативным был синдром холестаза из-за высокой концентрации общего билирубина в сыворотке крови. Исследование синдрома цитолиза, холестаза и синтетической недостаточности позволяют контролировать функциональное состояние печени в ходе стельности.*

*The research of major hepatospecific biochemical syndromes under the lipid dystrophy of liver and fasciolosis has been studied. These syndromes have the best diagnostic results under the lipid dystrophy of liver, and the most useful for the differential diagnostics was the syndrome of synthetic processes deficiency. In calves with dyspepsia the most informative was the syndrome of cholestasis because of the high concentration of total bilirubin in the blood serum. The researches the syndrome of cytolysis, cholestasis and synthetic deficiency allow to control the functional condition of liver during the pregnancy.*

**Введение.** В диагностике заболеваний печени используются анамнестические и клинические данные, результаты инструментальных (УЗИ) и биологических (биопсия) методов. В то же время, на ранних стадиях заболевания, оценку характера поражения гепатоцитов нельзя провести без использования данных лабораторных исследований, главным образом биохимических.

Основными патолого-биохимическими синдромами, на которых основывается лабораторная диагностика заболеваний печени, являются три: цитолиза, холестаза и недостаточности синтетических процессов в гепатоцитах. Наиболее диагностически важным элементом всех этих синдромов является определение ферментов. Распределение ферментов в субклеточных структурах позволяет определить характер и степень поражения гепатоцитов. В цитоплазме находятся аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ); в митохондриях – малатдегидрогеназа (МДГ) и глутаматдегидрогеназа (ГлДГ), а также митохондриальный изофермент АСТ (м-АСТ). В эндоплазматическом ретикулуме располагаются ферменты детоксикации (монооксигеназы), амилазы, ферменты конъюгирования билирубина. В рибосомах шероховатого ретикулума локализованы холинэстеразы (ХЭ) и церулоплазмин, а в эндотелии желчных протоков – щелочная фосфатаза (ЩФ), лейцинаминопептидаза (ЛАП) и гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП).

Синдром цитолиза обусловлен нарушением целостности протоплазматических мембран гепатоцитов и их органелл (митохондрий, лизосом, рибосом, эндоплазматического ретикулума и др.) в результате чего развивается гиперферментемия.

В силу анатомических особенностей печени выраженная гиперферментемия цитозольных ферментов развивается сразу после повреждения протоплазматической мембраны гепатоцитов и быстро достигает высокого уровня. Высокая активность АСТ и АЛТ является ранним тестом безжелтушного гепатита. Вовлечение в патологический процесс митохондрий сопровождается повышением в крови МДГ и ГлДГ.

Достаточно широкое распространение в биохимической диагностике заболеваний печени получила бивариабельная оценка изменений активности ферментов. При этом сопоставляется степень повышения активности ферментов, имеющих разную локализацию и отражающих различные стороны метаболической активности гепатоцитов. В этом плане часто используется коэффициент де Ритиса (отношение АСТ/АЛТ) или коэффициент ГлДГ/АЛТ для оценки явлений цитолиза.

Холестаз, в основе которого лежит нарушение процессов выработки желчи и желчевыведения, увеличение проницаемости стенки желчевыводящих канальцев, дисфункция микроворсинок эпителия желчных ходов, обеспечивающих ток желчи, сопровождается выходом в желчь и кровь щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы. Это структурно близкие ферменты, расположенные в мембранах эпителия желчевыводящих путей. Показателем холестаза является также увеличение в крови желчного пигмента билирубина.

Синдром недостаточности синтетических процессов в печени отражают такие показатели как содержание альбумина, холестерина и активность холинэстеразы в сыворотке крови. Содержание альбумина в сыворотке