

SULFATO, CHLORIDO, CINKO IR KADMIO JONŲ POVEIKIS 5-AMINOLEVULINO RŪGŠTIES DEHIDRATAZĖS AKTYVUMUI BANDOMŲJŲ GYVŪNŲ KRAUJYJE *in vitro*

Stanislovas Ryselis¹, Dalė Baranauskienė¹, Olegas Abdrachmanovas¹, Rima Naginienė¹,
Andrius Stepaniukas², Loreta Šernienė²

¹*Kauno medicinos universiteto Biomedicininų tyrimų institutas, Eivenių g. 4, LT-50009 Kaunas; tel. 8~37 30 29 48*

²*Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas; tel. 8~37 36 22 57*

Santrauka. *In vitro* sąlygomis ištirtas cinko jonų (Zn^{2+}) priedų apsauginis poveikis kraujo fermento 5-aminolevulino rūgšties dehidratazės (5-ALRD) aktyvumui, veikiant katalitinio nuodo kadmio katijonais (Cd^{2+}) ir ligandiniais sulfato (SO_4^{2-}) bei chlorido (Cl^-) anijonais. Pagrindiniu poveikio požymiu buvo laikomas 5-ALRD inhibicijos pusės šuolio (IC_{50})^{*} postūmis daugiataškėse fermento aktyvumo priklausomybėse nuo priedų jonų koncentracijos. Esant mažoms koncentracijoms (iki 160,81 $\mu mol/l$) visi šie jonai nežymiai aktyvuoja 5-ALRD, bet Cd^{2+} aktyvuoja fermentą daugiau negu Zn^{2+} , ir ši aktyvumą daugiau skatina ligandiniai kadmiui Cl^- , negu ligandiniai cinkui SO_4^{2-} anijonai. Patys SO_4^{2-} ir Cl^- anijonai 5-ALRD inhibicijos nesukelia. Esant didelėms katijonų koncentracijoms Cd^{2+} sukeltas inhibicijos šuolis įvyksta anksčiau, negu Zn^{2+} ($IC_{50} Cd^{2+} < IC_{50} Zn^{2+}$), todėl šiomis sąlygomis Cd^{2+} yra stiprus, o Zn^{2+} – silpnas katalitinis nuodas *in vitro*. 5-ALRD inhibicijos katalitiniu nuodu (Cd^{2+}) šuolio postūmis ir IC_{50} didėja didinant Zn^{2+} priedo koncentraciją kraujyje: nesant Zn^{2+} jonų priedo kraujyje, Cd^{2+} fermento inhibiciją sukelia greičiau, negu esant veikliai, 20,10 $\mu mol/l$ didesnei už gamtinę (38,42 $\mu mol/l$) Zn^{2+} jonų koncentracijai. Esant Zn^{2+} jonų koncentracijai kraujyje 40,20 $\mu mol/l$ didesnei už gamtinę, kadmio jonų sukelta fermento inhibicija vyksta esant dar didesnei pastarųjų koncentracijai. Tačiau Zn^{2+} apsauginis poveikis nedidelis. Padidinus šių jonų priedų koncentraciją nuo 0 iki 40,20 $\mu mol/l$, kadmio jonų koncentracija, sukianti inhibicijos pusės šuolį, padidėja tik 5,56 proc. Vadinasi, nedideli Zn^{2+} jonų priedai pasižymi mažu apsauginiu veiklumu *in vitro* ir beveik neapsaugo 5-ALRD aktyvumo nuo Cd^{2+} poveikio. Tyrimai taip pat parodė, kad Zn^{2+} , Cd^{2+} , SO_4^{2-} ir Cl^- jonų poveikį kraujo 5-ALRD aktyvumui galima numatyti, palyginti ir įvertinti *in vitro* sąlygomis pagal inhibicijos šuolio ir IC_{50} postūmį daugiataškėse priklausomybėse „fermento aktyvumas – jonų priedų koncentracija“.

^{*} IC_{50} – concentration causing half-maximal inhibition (Goering and Fowler, 1987). Ankstesniuose mūsų darbuose (Ryselis ir kt., 2004; Ryselis ir kt., 2006) IC_{50} buvo žymima $I_{1/2}$.

Raktažodžiai: sulfatas, chloridas, cinkas, kadmio, kraujas, 5-aminolevulino rūgšties dehidratazė, aktyvumas, *in vitro*.

INFLUENCE OF SULPHATE CHLORIDE ZINC AND CADMIUM IONS ON THE ACTIVITY OF 5-AMINOLEAVULINIC ACID DEHYDRATASE IN BLOOD OF EXPERIMENTAL ANIMALS *in vitro*

Stanislovas Ryselis¹, Dalė Baranauskienė¹, Olegas Abdrachmanovas¹, Rima Naginienė¹,
Andrius Stepaniukas², Loreta Šernienė²

¹*Biomedical Research Centre, Kaunas Medical University, Eivenių g. 4, LT-50009 Kaunas, Lithuania. tel. +370 37 30 29 48*

²*Lithuania Veterinary Academy, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania. tel. +370 37 36 22 57*

Summary. In the present research the influence of zinc ions (Zn^{2+}) on the activity of 5-aminoleavulinic acid dehydratase (5-ALAD) in blood *in vitro* upon impact of cadmium (Cd^{2+}), sulphate (SO_4^{2-}) and chloride (Cl^-) ions was investigated. The obtained curves of the consecutive multidot dependences and Cd^{2+} concentrations causing half-maximal inhibition (IC_{50})^{*} showed that Cd^{2+} inhibited the activity of enzyme 5-ALAD *in vitro* in higher extent compared to equimolar concentrations of Zn^{2+} . In comparison to Zn^{2+} the leap of enzymes activity inhibition and IC_{50} occurred under the lower concentrations of Cd^{2+} . Reduced concentrations of SO_4^{2-} and Cl^- increased the 5-ALAD activity penetrating its maximums, while high concentrations of SO_4^{2-} and Cl^- decreased the activity of enzyme, but not inhibited the enzymes activity. The shift of the leap and IC_{50} of the inhibition of 5-ALAD activity under the impact of Cd^{2+} ions inhibited the enzyme later in presence of Zn^{2+} additions and lower compared to natural concentration of Zn^{2+} . Although Zn^{2+} ions are characterized by the low protective activity *in vitro*. The investigations showed that the effects of SO_4^{2-} , Cl^- , Zn^{2+} and Cd^{2+} ions on blood 5-ALAD activity can be predicted, compared and evaluated *in vitro* according to the impulse of the leap of enzyme inhibition (concentration value of the catalytic poison, which cause half-maximal inhibition – IC_{50}).

Key words: sulphate, chloride, zinc, cadmium, blood, 5-aminoleavulinic acid dehydratase, activity, *in vitro*.

Įvadas. Sunkusis metalas kadmis (Cd), patekęs į aplinką, dėl cheminio aktyvumo ir padidinto judrumo įvairiose gamtinėse terpėse lengvai iš dirvožemio patenka į augalus ir gyvūnų organizmą, o iš jų su maisto produktais (kava, šokoladu, juodąja ir žaliaja arbata, saulėgrąžomis, riešutais, konservuota mėsa), vandeniu, cigarečių dūmais – į žmogaus organizmą, kur daugiausia jo kaupiasi metalotioneinuose, esančiuose inkstų žievėje, mažiau – kepenyse ir plaukuose (autorių tyrimai). Jis sukelia nepiktybines kvėpavimo organų ligas (Uleckienė, 2002), inkstų, kiaušidžių, sėklidžių, prostatos vėžį (Beyersman, 1994; Grey, 2001; IARC Monographs, 1993). Tačiau pagrindinė Cd nuodingumo savybė – neigiama įtaka ląstelių metalofermentinėms sistemoms, ypač turinčioms –SH grupes, kurių aktyviuosiuose centruose kadmio pakeičia varis (Cu), kalcis (Ca), cinkas (Zn) ir kitus metalus (Peraza et al., 1998). Toks fermentas yra 5-aminolevulino rūgšties dehidratazė (5-ALRD), kuri katalizuoja dviejų 5-aminolevulino rūgšties molekulių kondensaciją į monopirolo porfobilinogeno heterociklus, o šie toliau virsta hemo. 5-ALRD subvienete yra 28 –SH grupės ir 8 Zn^{2+} jonai, iš kurių 4 – aktyvūs (Warren et al., 1998). Cd^{2+} jonai turėtų inhibuoti 5-ALRD pakeisdami joje esantį aktyvųjį Zn ir, reaguodami su –SH grupėmis, iškreipti hemo biosintezę. Zn^{2+} jonai – atvirkščiai, turėtų apsaugoti 5-ALRD, atstatyti aktyvųjį Zn ir hemo biosintezę. Čia galimas ir jų ligandinių chlorido (Cl⁻) ir sulfato (SO_4^{2-}) anijonų poveikis. Visų šių jonų poveikis 5-ALRD aktyvumui kraujyje *in vitro* sąlygomis literatūroje neaprašytas. Organizmo aplinkoje Cd ir Zn egzistuoja koordinuoto organiniais ligandais Cd^{2+} ir Zn^{2+} katijonų būsenos, todėl tyrimams parinkti $CdCl_2$, kaip Cd^{2+} , $ZnSO_4$, kaip Zn^{2+} , NaCl, kaip Cl⁻, ir Na_2SO_4 , kaip SO_4^{2-} , jonų donorai.

Darbo tikslas. Anksčiau tyrėme švino ir acetato jonų įtaką 5-ALRD aktyvumui žmogaus ir įvairių bandomųjų gyvūnų (pelių, šunų, galvijų) kraujyje *in vitro* ir *in vivo* (Ryselis ir kt., 2004), seleno ir švino poveikį 5-ALRD aktyvumui galvijų kraujyje *in vitro* (Ryselis ir kt., 2004) bei sulfido, selenido ir švino jonų poveikį 5-ALRD aktyvumui veršelio kraujyje (Ryselis ir kt., 2006). Šio darbo tikslas buvo pratęsti ankstesnius tyrimus ir ištirti cinko katijono įvairių koncentracijų toksinį bei apsauginį poveikį 5-ALRD aktyvumui bandomųjų pelių kraujyje natūralaus ir dirbtinai sukeltos katalitinio nuodijimo kadmio fone plačiose ribose iki visiškos fermento inhibicijos ir dar toliau *in vitro* sąlygomis, nes tokių tyrimų gyvame organizme *in vivo* atlikti neįmanoma iš esmės – pasiekęs fermento inhibiciją organizmas būtų miręs, ir tolesnis tyrimas vyktų *in vitro* sąlygomis. Be to, *in vivo* tyrimai gali būti esant tik labai nedidelei metalų koncentracijai.

Medžiagos ir tyrimo metodai. Tyrimams naudotas kava tik dekapituotų laboratorinių baltųjų pelių kraujas, į kurį pridėta 5 proc. tūrio antikoagulianto – heparino. Pagrindiniai tirpalai pagaminti svorio būdu dukart distiliuotame vandenyje, kuriame metalų jonų analitiškai nerasta, tirpinant $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (markės „chemiškai grynas“), $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$ (markės „grynas analizei“), Na_2SO_4 (markės „chemiškai grynas“), NaCl (markės „chemiškai grynas“) druskas. Į 0,2 cm³ tūrio kraujo bandinius buvo pilama nedaug – 0,04 cm³ įvairios koncentracijos šių druskų

tirpalų, pagamintų skiedžiant pagrindinius jų tirpalus. Bandydams naudoti išimtinai minisorbciniai plastmasiniai mėgintuvėliai, pagaminti iš medicininių vienkartinio naudojimo 5 cm³ tūrio švirkštų, du kartus praplauti beme-tale kava tik distiliuota 2,4 mol/l koncentracijos nitrato rūgštimi (HNO_3) ir kaskart – dar 5 kartus dvidistiliuotu vandeni. Cd ir Zn koncentracija tirpaluose, kraujyje ir vandenyje buvo analizuojama „Perkin Elmer Zeeman/3030“ elektrotermografine atominės absorbcijos spektrofotometrijos sistema taikant modifikuotą metodą (Ryselis ir kt., 2004). 5-ALRD aktyvumas kraujyje buvo nustatomas klasikine spektrofotometrija (Berlin, Schaller, 1974) trijuose mėginiuose.

Sudarytos nuoseklios daugiataškės priklausomybės, rodančios, kaip 5-ALRD aktyvumas keičiasi priklausomai nuo jonų koncentracijos pokyčių, vykdomų mažu žingsniu plačiose ribose. Visais atvejais koncentracija buvo didinama tol, kol buvo pasiektas fermento inhibicijos šuolis. Pagrindiniu palyginimo kriterijumi buvo 5-ALRD aktyvumo staigaus sumažėjimo inhibicijos metu (inhibicijos šuolio) postūmio priklausomybė nuo apsauginės Zn^{2+} ar toksiškos Cd^{2+} , SO_4^{2-} , Cl⁻ koncentracijos poveikio natūralios ir dirbtinės taršos šiais jonais fone. Inhibicijos šuolio padėtis buvo vertinama pagal jo pusės aukštį atitinkančią katalitinio nuodo (Cd^{2+}) koncentraciją (IC_{50}), nes ji mažiau priklauso nuo fermento aktyvumo ir kraujo savybių, bet daugiau nuo katalitinio nuodo prigimties, o svarbiausia – nuo poveikio jam. Tyrimai buvo atlikti penkiomis metodinėmis kryptimis:

1) didinant Zn^{2+} koncentraciją kraujyje, kuriame natūraliai buvo nedidelė gamtinės kilmės Cd^{2+} ir Zn^{2+} koncentracija, tam, kad nustatytume optimalią veikliąją Zn^{2+} koncentraciją, nesukeliančią fermento inhibicijos;

2) pakartojant šį tyrimą vietoje Zn^{2+} priedų naudoti Cl⁻ bei SO_4^{2-} tam, kad įvertintume galimą jų pašalinį poveikį fermento aktyvumo mažėjimui;

3) pakartojant pirmąjį tyrimą, vietoje Zn^{2+} didinant katalitinio nuodo Cd^{2+} koncentraciją tam, kad nustatytume fermento inhibicijos šuolio padėtį bei pusės šuolio koncentraciją (IC_{50}), esant gamtinės kilmės Zn^{2+} koncentracijai kraujyje;

4) pakartojant pastarąjį tyrimą dirbtinai sudarius pastovią didesnę, bet veiklią Zn^{2+} koncentraciją kraujyje tam, kad palygintume fermento inhibicijos šuolio ir IC_{50} postūmį, t. y. įvertintume apsauginį Zn poveikį 5-ALRD aktyvumui;

5) pakartojant šį tyrimą du kartus padidinus Zn^{2+} koncentracijos priedą kraujyje tam, kad įvertintume jos įtaką inhibicijos šuoliui bei IC_{50} .

Statistinė duomenų analizė atlikta SPSS statistiniu paketu (SPSS Inc, 1995–2005). Koreliaciniai ryšiai tarp priklausomų kintamųjų įvertinti Pearsono koreliacinėmis matricomis. Koreliacija buvo laikoma statistiškai patikima, jei $p \leq 0,05$. Skirtumo tarp lyginamųjų rodiklių patikimumas buvo apskaičiuotas T testu. Skirtumas buvo laikomas patikimu, kai $p \leq 0,05$.

Tyrimų duomenys ir jų aptarimas. Tiriant, kaip cinko ir kadmio katijonai veikia 5-ALRD aktyvumą, į dvi kava tik dekapituotų laboratorinių pelių kraujo grupes dėta cinko sulfato (1 grupė) ir kadmio sulfato (2 grupė) taip,

kad Zn^{2+} ir Cd^{2+} priedų koncentracija nuosekliai didėtų, iki sukels fermento inhibiciją. Cinko atveju ji didinta nuo 0 iki 80405,40 $\mu\text{mol/l}$, o kadmio – nuo 0 iki 16081,08 $\mu\text{mol/l}$.

Nustatant fermento aktyvumą pirmoje kraujo tyrinių grupėje pastebėta, kad įdėjus nedidelį cinko sulfato kiekį, t. y. padidinus Zn^{2+} jonų priedo koncentraciją nuo 0 iki 16,08 $\mu\text{mol/l}$, 5-ALRD aktyvumas beveik nekinta (1 lentelė).

Didinant cinko priedo koncentraciją iki 160,81 $\mu\text{mol/l}$, fermento aktyvumas nuosekliai didėja ($p < 0,001$) ir pasie-

kia maksimumą (277,23 $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$) esant Zn^{2+} priedo koncentracijai 241,22 $\mu\text{mol/l}$. Didinant Zn^{2+} priedo koncentraciją toliau iki 8040,54 $\mu\text{mol/l}$, 5-ALRD aktyvumas tolygiai mažėja iki 257,75 $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$, bet lieka statistiškai patikimai ($p < 0,0001$) didesnis už pradinį (243,69 $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$). Vadinasi, nedidelis cinko priedo kiekis kraujyje nežymiai aktyvuoja šį fermentą *in vitro* sąlygomis. Fermento aktyvumo maksimumo prigimtis paaiškinta anksčiauose mūsų darbuose (Ryselis ir kt., 2004).

1 lentelė. Cinko katijonų (Zn^{2+}) priedų įtaka 5-ALRD aktyvumui kraujyje *in vitro*

Zn^{2+} koncentracija, $\mu\text{mol/l}$	5-ALRD aktyvumas, $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$	Zn^{2+} koncentracija, $\mu\text{mol/l}$	5-ALRD aktyvumas, $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$
0	243,69	402,03	271,39
8,04	240,80	804,03	264,51
16,08	242,60	2412,16	259,51
40,20	248,62	8040,54	257,75
80,41	257,28	40202,70	175,28
160,81	262,08	80405,40	33,94
241,22	277,23		

Dar labiau didinant Zn^{2+} priedų koncentraciją vyksta staigus fermento inaktyvavimas – inhibicijos šuolis. Didėjant Zn^{2+} priedo koncentracijai nuo 40202,70 $\mu\text{mol/l}$ iki 80405,40 $\mu\text{mol/l}$, 5-ALRD aktyvumas sumažėja nuo 175,28 $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$ iki 33,94 $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$ ($p < 0,05$). Vadinasi, nedidelė cinko priedo koncentracija teigiamai veikia fermento aktyvumą, tačiau didelis cinko kiekis pasižymi inhibicinėmis savybėmis ir veikia kaip katalitinis nuodas. Grafiniu būdu apskaičiuota inhibicijos pusės

šulio Zn^{2+} priedo koncentracija IC_{50} buvo labai didelė – apie 53000 $\mu\text{mol/l}$. Ji rodo, kad cinkas *in vitro* sąlygomis yra silpnas katalitinis nuodas.

2-oje tyrinių grupėje įdėjus į kraują pradinį nedidelį kadmio dichlorido kiekį (padidinus Cd^{2+} jonų koncentraciją nuo 0 iki 24,12 $\mu\text{mol/l}$), 5-ALRD aktyvumas staigiai padidėja nuo 303,55 $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$ iki 377,28 $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$ ($p < 0,001$; 2 lentelė).

2 lentelė. Kadmio katijonų (Cd^{2+}) priedų įtaka 5-ALRD aktyvumui kraujyje *in vitro*

Cd^{2+} koncentracija, $\mu\text{mol/l}$	5-ALRD aktyvumas, $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$	Cd^{2+} koncentracija, $\mu\text{mol/l}$	5-ALRD aktyvumas, $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$
0	303,55	804,05	233,34
8,04	347,55	1608,11	97,98
24,12	377,28	2412,16	41,39
80,41	439,95	4020,27	6,26
160,81	412,59	16081,08	1,80
402,03	348,83		

Didinant kadmio priedo koncentraciją iki 80,41 $\mu\text{mol/l}$, fermento aktyvumas nuosekliai didėja ir pasiekia maksimumą (439,95 $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$). Didinant Cd^{2+} priedo koncentraciją toliau iki 160,81 $\mu\text{mol/l}$, 5-ALRD aktyvumas tolygiai sumažėja iki 412,59 $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$, bet lieka daug didesnis už pradinį (303,55 $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$; $p < 0,001$), priešingai nei cinko atveju. Vadinasi, nedidelis kiekis kadmio kraujyje ženkliai aktyvuoja šį fermentą *in vitro* sąlygomis, ir kadmio aktyvuojantis poveikis yra stipresnis ($p < 0,001$), negu jo cheminio analogo – cinko.

Dar daugiau didinant Cd^{2+} priedų koncentraciją vyksta staigus fermento inaktyvavimas – inhibicijos šuolis. Jis prasideda daug anksčiau nei cinko atveju. Didėjant Cd^{2+} koncentracijai nuo 402,03 $\mu\text{mol/l}$ iki 4020,27 $\mu\text{mol/l}$, 5-

ALRD aktyvumas sumažėja atitinkamai nuo 348,83 $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$ iki 6,26 $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$, o esant Cd^{2+} koncentracijai 16081,08 $\mu\text{mol/l}$, fermento aktyvumas lieka tik 1,80 $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$. Vadinasi, kadmio *in vitro* sąlygomis yra žymiai stipresnis 5-ALRD katalitinis nuodas negu cinkas: grafiniu būdu apskaičiuota inhibicijos pusės šulio Cd^{2+} priedo koncentracija IC_{50} buvo apie 900 $\mu\text{mol/l}$, t. y. beveik 60 kartų mažesnė negu cinko $IC_{50} = 53000 \mu\text{mol/l}$. Abu tyrimai *in vitro* parodė, kad Cd^{2+} poveikis 5-ALRD aktyvumui yra didesnis negu Zn^{2+} ($p < 0,001$) esant ir mažoms, ir didelėms katijonų koncentracijoms.

Norint įsitikinti, kaip šių dviejų priklausomybių pobūdį ir inhibicijos šuolius veikia ligandiniai chlorido (Cl^-) ar sulfato (SO_4^{2-}) anijonai, patenkantys į kraują kartu su

CdCl₂ ar ZnSO₄ tirpalais, į bandomųjų gyvūnų kraują taip pat, kaip cinko ar kadmio atveju, pamažu didinant koncentraciją dėtas natrio chloridas (NaCl), kaip Cl⁻ jonų donoras (3-ioji tyrimų grupė), bei natrio sulfatas (Na₂SO₄), kaip SO₄²⁻ anijonų donoras (4-oji tyrimų grupė).

Palyginus duomenis paaiškėjo, kad abiejų šių anijonų įtaka 5-ALRD aktyvumui galėjo pasireikšti visų bandymų eigoje ir sukelti fermento aktyvumo ekstremumus, kurie

atsirasdavo ir ankstesnių tyrimų metu (Ryselis ir kt., 2004; Ryselis ir kt., 2006). Mažos chlorido anijonų koncentracijos (nuo 0,00 iki 8040,54 μmol/l) didino 5-ALRD aktyvumą nuo 35,40 nmol/l·s iki 41,26 nmol/l·s (p<0,01), atsirandant aktyvumo maksimumui 47,35 nmol/l·s ties 52,26 μmol/l ir minimumui 40,28 nmol/l·s ties 402,02 μmol/l Cl⁻ anijonų koncentracija (3 lentelė).

3 lentelė. Mažos koncentracijos ligandinių chlorido (Cl⁻) ir sulfato (SO₄²⁻) anijonų priedų įtaka 5-ALRD aktyvumui kraujyje *in vitro*

Cl ⁻ koncentracija, μmol/l	5-ALRD aktyvumas, nmol/l·s	(SO ₄ ²⁻) koncentracija, μmol/l	5-ALRD aktyvumas, nmol/l·s
0	35,40	0	161,05
4,02	38,27	4,02	180,30
24,12	39,66	14,07	187,42
52,26	47,35	24,12	194,54
402,02	40,28	52,26	193,17
2412,16	40,86	80,41	191,79
8040,56	41,26	402,03	185,92
		2412,16	195,00
		8040,54	175,63

Maksimalus NaCl sukeltas fermento suaktyvėjimas buvo 33,75 proc. didesnis už pradinį aktyvumą ir artimas CdCl₂ sukeltam aktyvumo maksimumui (439,95 nmol/l·s ties 80,41 μmol/l Cd²⁺) (2 lentelė), kuris pradinį aktyvumą viršijo 44,93 proc. Vadinasi, fermentą aktyvinantį kadmio poveikį *in vitro* galėjo skatinti ir jo ligandinis chlorido anijonas, tačiau inhibicijos jis nesukėlė, nes didinant Cl⁻ koncentraciją iki 8040,54 μmol/l inhibicijos slenkščio nepasiekta – chlorido anijonas nėra katalitinis nuodas *in vitro*. 5-ALRD inhibicija visais tirtais atvejais prasidėdavo ties 80,41 μmol/l ir baigdavosi esant 4020,27 μmol/l Cd²⁺ katijonų koncentracijai (5 lentelė).

Mažos sulfato anijonų koncentracijos – nuo 0,00 iki 8040,54 μmol/l – veikė panašiai, kaip ir chlorido anijonai, – didino 5-ALRD aktyvumą nuo 161,05 nmol/l·s iki 175,63 nmol/l·s (p<0,01) (3 lentelė). Vidutinis Na₂SO₄ sukeltas fermento aktyvinimas 187,97 nmol/l·s buvo 16,72 proc. didesnis už pradinį (161,05 nmol/l·s, p=0,01) ir nebuvo artimas (p<0,001) ZnSO₄ sukeltam 5-ALRD vidutiniam aktyvumo padidėjimui nuo 243,69 nmol/l·s iki

258,28 nmol/l·s (5,99 proc.). Vadinasi, fermento aktyvumą didinantį cinko poveikį mažai skatino jo ligandinis SO₄²⁻ anijonas. Kitaip nei chlorido anijonas, mažos sulfato anijonų koncentracijos galėjo veikti arba sukelti dalinę 5-ALRD inhibiciją, nes padidėjus SO₄²⁻ koncentracijai iki 8040,54 μmol/l, fermento aktyvumas sparčiai sumažėjo iki 175,63 nmol/l·s (p<0,01). Toks pat fermento aktyvumo mažėjimas įvyko ir cinko priedams kraujyje viršijus 8040,54 μmol/l koncentraciją (1 lentelė). Sulfato anijonas *in vitro* sąlygomis pasižymi stipresnėmis 5-ALRD katalitinio nuodo savybėmis negu chlorido anijonas. Tą patvirtina ir ligandinių anijonų didelės koncentracijos priedų įtaka 5-ALRD aktyvumui lygiagrečiuose kraujo tyrimuose: pradinis fermento aktyvumas (513,86 nmol/l·s) sparčiau mažėjo didinant SO₄²⁻ anijonų koncentraciją: jai esant 80405,40 μmol/l fermento aktyvumas buvo 484,62 nmol/l·s, o esant tokiai pačiai Cl⁻ anijono koncentracijai – 498,35 nmol/l·s (p<0,0001).

4 lentelė. Didelės koncentracijos ligandinių chlorido (Cl⁻) ir sulfato (SO₄²⁻) anijonų priedų įtaka 5-ALRD aktyvumui *in vitro*

Cl ⁻ koncentracija, μmol/l	5-ALRD aktyvumas, nmol/l·s	(SO ₄ ²⁻) koncentracija, μmol/l	5-ALRD aktyvumas, nmol/l·s
0	513,86	0	513,86
24121,62	511,61	24121,62	492,96
40202,70	503,75	40202,70	488,86
80405,40	498,35	80405,40	484,62

Abiem atvejais visiškai fermento inhibicija nevyksta. SO₄²⁻ ir Cl⁻ anijonai nesukelia fermento inhibicijos. Kadangi su Na₂SO₄ ir NaCl didelės koncentracijos priedais į

kraują patenka ir daug Na⁺ jonų, galima daryti išvadą, kad ir jie nesukelia 5-ALRD inhibicijos.

Šie abu tyrimai *in vitro* parodė, kad SO₄²⁻ poveikis 5-

ALRD aktyvumui yra didesnis negu Cl^- esant tiek mažoms ($p < 0,01$), tiek ir didelėms jų koncentracijoms. Į natrio katijonų, patenkančių į kraują su NaCl ar Na_2SO_4 priedais, įtaką neatsižvelgėme, nes kraujyje jų labai daug palyginti su dedamais mikromoliniais kiekiais, todėl ir įtakos 5-ALRD aktyvumui jie daryti negalėjo.

Šios šešios priklausomybių grupės (1, 2, 3 ir 4 lentelė) tolimesniems tyrimams leido parinkti optimalias veikliąsias ZnSO_4 priedų koncentracijas, – 20,10 $\mu\text{mol/l}$ ir 40,20 $\mu\text{mol/l}$ – nedarančias poveikio 5-ALRD inhibicijos šuoliui, bet artimas gamtinei Zn^{2+} koncentracijai tirtame kraujyje – 38,42 $\mu\text{mol/l}$ (įvertinus tyrimų skiedimą, pridedant 20 proc. tūrio priedų tirpalų). Jos leido parinkti ir katalitinio nuodo Cd^{2+} būtinąjį priedų koncentracijos ruožą nuo 0,00 iki 4020,28 $\mu\text{mol/l}$, kuris apimtų fermento inhibicijos šuolį, sukeliama Cd^{2+} jonų, bet ne Zn^{2+} , SO_4^{2-} ar Cl^- jonų.

Toliau tiriant cinko katijono apsauginį poveikį 5-ALRD aktyvumui kraujyje dirbtinės taršos kadmiu poveikio fone *in vitro* būdu, pagrindiniu kriterijumi buvo laikoma kadmio sukulto kraujo fermento aktyvumo staigaus sumažėjimo inhibicijos metu (inhibicijos pusės šuolio – IC_{50}) postūmio priklausomybė nuo Zn^{2+} jonų priedo.

Į tris kraujo grupes (gamtinė cinko koncentracija 38,42 $\mu\text{mol/l}$), kurių vienoje cinko priedo nedėta (6-oji

tyrimų grupė), antroje sudaryta 20,10 $\mu\text{mol/l}$ didesnė už gamtinę cinko jonų koncentracija (7-oji tyrimų grupė) ir trečioje – dukart didesnė – 40,20 $\mu\text{mol/l}$ cinko jonų priedų koncentracija (8-oji tyrimų grupė), kuriose gamtinė kadmio koncentracija buvo labai maža (apie 0,001 $\mu\text{mol/l}$), dėta kadmio chlorido tiek, kad kadmio jonų koncentracija kraujyje didėtų nuo pradinės iki 40202,70 $\mu\text{mol/l}$ ir pereinamųjų inhibicijos šuolį bei pasiektų kiek galima pilnesnę fermento inhibiciją.

Nustačius šių trijų tyrimų grupių 5-ALRD aktyvumą pastebėta, kad tiek tyrimuose be Zn^{2+} priedo, tiek esant Zn^{2+} priedui, padidinus Cd^{2+} koncentraciją kraujyje nuo 0,001 $\mu\text{mol/l}$ iki 80,41 $\mu\text{mol/l}$, pradinis fermento aktyvumas nežymiai kinta pereinamas tris ekstremumus – maksimumą, esant Cd^{2+} koncentracijai 0,6 $\mu\text{mol/l}$ –1,61 $\mu\text{mol/l}$, minimumą, esant Cd^{2+} koncentracijai 4,02 $\mu\text{mol/l}$ ir ryškų maksimumą, esant Cd^{2+} koncentracijai 80,41 $\mu\text{mol/l}$ (5 lentelė). Šie ekstremumai pasireiškia dėl bendrų kraujo savybių kaip biocheminis atsakas, *in vitro* sąlygomis didinant pašalinių jonų koncentraciją, nes mažai priklauso nuo jonų prigimties (Ryselis ir kt., 2004; Ryselis ir kt., 2006).

5 lentelė. Cd^{2+} priedų įtaka 5-ALRD aktyvumui kraujyje *in vitro* esant pastoviai 20,10 $\mu\text{mol/l}$, 40,20 $\mu\text{mol/l}$ Zn^{2+} priedo pastoviai koncentracijai ir be Zn^{2+} priedo

Cd^{2+} koncentracija, $\mu\text{mol/l}$	5-ALRD aktyvumas, $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$ be Zn^{2+} priedo	5-ALRD aktyvumas, $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$ su 20,10 $\mu\text{mol/l}$ Zn^{2+} priedu	5-ALRD aktyvumas, $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$ su 40,20 $\mu\text{mol/l}$ Zn^{2+} priedu
0	303,55		
0,20	344,27	85,60	285,86
0,60	354,91		301,91
1,61	345,55	86,7	308,59
4,02	229,77		284,28
8,04	347,55	84,50	291,09
24,12	377,28		299,72
80,41	439,95	96,40	
160,81	412,59		340,38
402,03	348,83	76,90	310,90
804,05	233,34		207,45
1608,11	97,98	20,00	84,12
2412,10	41,39		36,71
4020,27	6,26	2,40	5,89
16081,08	1,90	2,49	3,59
40202,70		2,49	3,59

Toliau didinant kadmio koncentraciją kraujyje, visuose tyrimuose fermento aktyvumas sparčiai mažėjo – vyko inhibicijos šuolis, o esant Cd^{2+} koncentracijai 40202,70 $\mu\text{mol/l}$ fermento aktyvumas tebuvo tik 2,49 $\text{nmol/l}\cdot\text{s}$.

Grafiškai apskaičiuota fermento inhibicijos pusės šuolio koncentracija IC_{50} buvo: be Zn^{2+} priedų $\text{IC}_{50} = 900$ $\mu\text{mol/l}$ Cd^{2+} , su 20,10 $\mu\text{mol/l}$ Zn^{2+} priedu $\text{IC}_{50} = 970$ $\mu\text{mol/l}$, o esant 40,10 $\mu\text{mol/l}$ Zn^{2+} priedui $\text{IC}_{50} = 1020$ $\mu\text{mol/l}$ Cd^{2+} .

Šios trys priklausomybės ir rastos IC_{50} reikšmės lei-

džia įvertinti cinko katijonų apsauginį poveikį kraujo 5-ALRD aktyvumui *in vitro* ir šio poveikio priklausomybę nuo protektorius Zn^{2+} koncentracijos katalitinio nuodijimo kadmiu fone.

Dviejose lygiagrečiose to paties kraujo tyrimų grupėse (5 lentelė) 5-ALRD aktyvumas visų Cd^{2+} koncentracijų įdėjus Zn^{2+} priedo 40,20 $\mu\text{mol/l}$ gaunamas mažesnis, negu nepridėjus Zn^{2+} . Vadinasi, ir pasižymintis protektorinėmis savybėmis, bet pašalinis Zn^{2+} katijonų priedas visoje bandymo eigoje *in vitro* sąlygomis slopina 5-ALRD, nors

pradinį aktyvumą ir padidina.

Tas dar kartą patvirtina, kad šis reiškinys kyla iš bendrųjų kraujo savybių. Jis galėjo veikti inhibicijos šuolio padėtį ir sumažinti IC₅₀.

6 lentelė. Zn²⁺ priedų ryšys su kraujo 5-ALRD inhibicijos pusės šuolį sukeliančia katalitinio nuodo Cd²⁺ koncentracija IC₅₀ *in vitro*

Zn ²⁺ priedo koncentracija, μmol/l	0	20,10	40,20
Cd ²⁺ koncentracija IC ₅₀ , μmol/l	900	970	1020

Akivaizdu, kad kraujo 5-ALRD inhibicijos kadmiu šuolio postūmis priklauso nuo Zn²⁺ jonų priedo koncentracijos *in vitro*: kai cinko jonų priedo nėra, mažesnė kadmio katijonų koncentracija sukelia fermento inhibiciją (IC₅₀ = 900 μmol/l). Padidinus kraujyje Zn²⁺ koncentraciją 20,10 μmol/l, fermentas slopinamas lėčiau (IC₅₀ = 970 μmol/l; p=0,04), o padidinus Zn²⁺ koncentraciją 40,20 μmol/l, fermentas slopinamas dar lėčiau (IC₅₀ = 1020 μmol/l). Vadinas, cinko katijonų priedai pasižymi apsauginiu poveikiu nuo fermentą nuodijančių kadmio jonų *in vitro*, nors šis apsauginis poveikis yra silpnas: padidinus Zn²⁺ koncentraciją kraujyje 200 proc., inhibicijos pusės šuolio koncentracija padidėja tik 5,56 proc. (p=0,664). Galima daryti išvadą, kad besaikis cinko jonų koncentracijos didinimas vis mažiau apsaugotų 5-ALRD nuo inhibicijos kadmiu. Zn²⁺ jonų koncentracijai pasiekus asimptotinę IC₅₀ didėjimo ribą, per didelė Zn²⁺ koncentracija sukeltų 5-ALRD inhibiciją (1 lentelė). Taigi galima teigti, kad cinkas, kraujo fermento 5-ALRD aktyvumą veikiant kadmiu, beveik neapsaugo, matyt, todėl, kad silpniau jungiasi su organiniais ligandais negu kadmio, ir šis cinkas išstumia iš fermentų aktyviųjų centrų, iškreipia jų veiklą.

Išvados:

1. *In vitro* sąlygomis nedidelis kiekis Zn²⁺ katijonų priedo nežymiai aktyvuoja kraujo fermentą 5-ALRD.

2. Didelis Zn²⁺ katijonų priedas pasižymi inhibicinėmis savybėmis; veikia kaip katalitiniai nuodai ir sukelia kraujo 5-ALRD inhibiciją.

3. 5-ALRD inhibicijos cinko jonų priedais šuolis daugiataškėje 5-ALRD aktyvumo priklausomybėje nuo Zn²⁺ priedų koncentracijos atsiranda, kai šių priedų koncentracija didelė – cinkas *in vitro* sąlygomis yra silpnas katalitinis nuodas.

4. *In vitro* sąlygomis nedidelė kadmio katijonų priedo koncentracija ženkliai aktyvuoja kraujo fermentą 5-ALRD.

5. Aktyvuojantis kadmio poveikis kraujo fermentui 5-ALRD *in vitro* yra stipresnis negu jo cheminio analogo – cinko.

6. Didelė Cd²⁺ katijonų priedų koncentracija turi inhibicinių savybių, veikia kaip katalitiniai nuodai ir sukelia kraujo 5-ALRD inhibiciją.

7. 5-ALRD inhibicijos Cd²⁺ jonų priedais šuolis daugiataškėje 5-ALRD priklausomybėje nuo Cd²⁺ priedų koncentracijos atsiranda esant daug mažesnėms šių priedų koncentracijoms nei cinko – kadmio *in vitro* sąlygomis yra daug stipresnis katalitinis nuodas negu cinkas.

Tirtose visose trijose priklausomybėse fermento inhibicijos kadmio jonais šuolio postūmis didėja sudarius kraujyje didesnę Zn²⁺ jonų koncentraciją.

8. *In vitro* sąlygomis kraujo 5-ALRD fermentą aktyvuojantį nedidelės koncentracijos kadmio jonų priedų poveikį gali skatinti ir jo ligandiniai chlorido anijonai, patenkantys į kraują su kadmio chloridu – kadmio jonų donoru.

9. Mažos koncentracijos chlorido anijonas *in vitro* nėra katalitinis nuodas, nes nesukelia kraujo 5-ALRD inhibicijos šuolio daugiataškėje 5-ALRD aktyvumo priklausomybėje nuo didelės Cl⁻ priedų koncentracijos.

10. *In vitro* sąlygomis kraujo 5-ALRD fermentą aktyvuojantį cinko katijonų priedų poveikį nedidelėmis koncentracijomis mažai skatina jo ligandiniai sulfato anijonai, patenkantys į kraują su cinko sulfatu – cinko jonų donoru.

11. Sulfato anijonas *in vitro* gali stipriau nei Cl⁻ veikti kraujo fermento 5-ALRD aktyvumą: daugiataškėje priklausomybėje 5-ALRD aktyvumas sparčiau sumažėja esant didelėms sulfato anijonų priedų koncentracijoms negu Cl⁻.

12. Didelės koncentracijos sulfato anijonas *in vitro* sąlygomis pasižymi stipresnėmis kraujo fermento 5-ALRD katalitinio nuodo savybėmis negu chlorido anijonas.

13. Didelės koncentracijos Na⁺ katijono priedai kraujyje *in vitro* nesukelia 5-ALRD inhibicijos.

14. *In vitro* sąlygomis kraujo fermento 5-ALRD inhibicijos kadmio jonais šuolio postūmis daugiataškėje priklausomybėje nežymiai didėja didėjant cinko jonų priedo koncentracijai: cinko katijonų priedai pasižymi silpnu apsauginiu veikimu nuo fermentą nuodijančių kadmio jonų. Cinkas nuo šio poveikio beveik neapsaugo, matyt, todėl, kad silpniau jungiasi su organiniais ligandais fermento aktyviajame centre negu kadmio.

15. Cinko jonų priedų koncentracijos didinimas vis mažiau apsaugotų kraujo fermentą 5-ALRD nuo inhibicijos kadmiu *in vitro*, nes per didelis Zn²⁺ jonų priedas pats sukeltų fermento inhibiciją.

Literatūra

- Berlin A., Schaller K. H. European standardised method for the determination of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. Z. Klin. Chem. Biochem. 1974. N 12. P. 389.
- Beyersmann D. Interactions in metal carcinogenicity. Toxicology Letters. 1994. N 72. P. 333.
- Goering P. L. and Fowler B. A. Metal constitution on metallo-thiocin influences inhibition of δ-aminolevulinic acid dehydratase (porphobilinogen synthase) by lead. Biochem. J. 1987. N 245. P. 339.
- Gray M., Fowles J., Weinstein P. Dietary and occupation risk

- factors for prostate disease in different ethnic groups. In: Abstracts of the IXth International Congress of Toxicology, Brisbane, Australia, July 8–12, 2001. 1.
5. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France, 1993. T. 58. P. 119.
 6. Peraza M. A., Ayala – Fierro F., Barber D. S., Casaez E., Rael L. T. Effects of micronutrients on metal toxicity. Environmental Health Perspectives. 1998. N 106 (1). P. 203.
 7. Ryselis S., Baranauskienė D., Abdrachmanovas O., Stepaniukas A. Švino katijonų ir acetato anijonų įtaka δ-aminolevulino rūgšties dehidratazės aktyvumui žmogaus ir bandomųjų gyvūnų kraujyje *in vivo* ir *in vitro*. Veterinarija ir zootechnika. 2004. T 27 (49). P. 24.
 8. Ryselis S., Baranauskienė D., Abdrachmanovas O., Stepaniukas A., Šerėnas K. Seleno ir švino įtaka kraujo δ-aminolevulino rūgšties dehidratazės aktyvumui ir *in vitro*. Veterinarija ir zootechnika. 2004. T 28 (50). P. 18.
 9. Ryselis S., Baranauskienė D., Abdrachmanovas O., Stepaniukas A., Šernienė L. Sulfido, selenido ir švino jonų poveikis δ-aminolevulino rūgšties dehidratazės aktyvumui bandomųjų gyvūnų kraujyje *in vivo* ir *in vitro*. Veterinarija ir zootechnika. 2006. T 33 (55). P. 69.
 10. Uleckienė S., Zabulytė D. Kadmio aplinkoje ir jo sukeliama patologija. Visuomenės sveikata. 2002. Nr.3 (18). P. 47.
 11. Warren M. J., Cooper J. B., Wood S.P. and Shoolingin – Jordan P. M. Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolevulinic acid dehydratase. Trends Biochem. Sci. (TIBS Reviews). 1998.

Gauta 2007 05 05