

ŠVINO KATIJONŲ IR ACETATO ANIJONŲ ĮTAKA Δ -AMINOLEVULINO RŪGŠTIES DEHIDRATAZĖS AKTYVUMUI ŽMOGAUS IR BANDOMŪJŲ GYVŪNŲ KRAUJYJE *IN VIVO* IR *IN VITRO*

Stanislovas Ryselis¹, Dalia Baranauskienė¹, Olegas Abdrachmanovas¹, Andrius Stepaniukas²

¹ Kauno medicinos universiteto Biomedicininių tyrimų institutas, Eivenių g. 7, 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. Šio darbo tikslas – ištirti taršos švinu ir acetatu įtaką žmogaus, pelių, šunų ir galvijų kraujo fermento δ -aminolevulino rūgšties dehidratazės (δ -ALRD) aktyvumui *in vivo* ir *in vitro*, tikrąsias švino mikrokonzentracijas kraujo šarminiam hidrolizate nustatant originaliu elektrotermografinės Zeemano efekto atominės absorbcinės spektrofotometrijos tiesioginiu būdu. Ištyrus patvirtinta, kad δ -ALRD aktyvumas *in vitro* švino katijonų veikiamas kinta analogiškai *in vivo*, pereidamas dviejų ekstremumų reikšmes: minimumo, esant nuo 0,1 $\mu\text{mol/l}$ iki 0,5 $\mu\text{mol/l}$, ir maksimumo, esant nuo 0,5 $\mu\text{mol/l}$ iki 2,5 $\mu\text{mol/l}$ švino ar acetato jonų koncentracijai kraujyje. Švinas, kai jo koncentracija didesnė kaip 29,0 $\mu\text{mol/l}$, visiškai inaktyvuoja δ -ALRD, o acetatas neveikia iki 8040,5 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos. Aiškinant δ -ALRD aktyvumo ekstremumų kilmę nustatyta, kad švino katijono veikiamas atsirandantis minimumas sudarė 7,5% pradinės fermento aktyvumo reikšmės, o acetato – 10,2%. Tai rodo pirmojo ekstremumo daugiau anijoninę acetato kilmę. Maksimumo analogiškos reikšmės: 14,18% švino ir 6,93% acetato atvejais rodo antrojo ekstremumo daugiau katijoninę švino kilmę. Tyrimai patvirtino, kad sunkiųjų metalų įtaka δ -ALRD aktyvumui visada turi būti siejama su ligandinių anijonų poveikiu. Iš *in vitro* kreivių, ekstrapoliacijos iki 0 $\mu\text{mol/l}$ Pb koncentracijos būdu pirmą kartą nustatytas pradinis orientacinis δ -ALRD aktyvumas kraujyje be švino. Pelių kraujyje jis yra 476,0 nmol/l·s, o žmogaus – 691,4 nmol/l·s.

Raktažodžiai: švinas, acetatas, kraujas, δ -aminolevulino rūgšties dehidratazė, aktyvumas, atominė absorbcinė spektrofotometrija.

INFLUENCE OF LEAD CATIONS AND ACETATE ANIONS ON ACTIVITY OF Δ -AMINOLEAVULINIC ACID DEHYDRATASE IN BLOOD OF HUMAN AND EXPERIMENTAL ANIMALS *IN VIVO* AND *IN VITRO*

Summary. The present study was design to investigate the influence of ions of lead and acetate on the activity of δ -aminoleavulinic acid dehydratase (δ -ALAD) in human, mice, canine and bovine blood *in vivo* and *in vitro*. The real threshold amounts of lead in haemolysed alkaline blood was determined by original direct electro thermal atomic absorption spectrophotometer method. Analysis revealed the same pattern of δ -ALAD activity upon lead influence *in vivo* and *in vitro*: the extremes of enzyme's minimum activity at 0.1 $\mu\text{mol/l}$ – 0.5 $\mu\text{mol/l}$ lead and acetate ions concentration while maximum activity at 0.5 $\mu\text{mol/l}$ – 2.5 $\mu\text{mol/l}$ of lead and acetate ions were established. The inhibition of δ -ALAD upon impact of lead ions at concentration >29.0 $\mu\text{mol/l}$ was established while the same effects of acetate ions merely at concentration of supra 8040.5 $\mu\text{mol/l}$ was observed. The enzyme's activity has been decreased upon impact of ions constituted the portion of initial enzyme activity, respectively 7.5% for lead ions and 10.2% for acetate anions. This probably reveals the acetate-anions based background of the first minimum-extreme. Therefore, the parallel maximum-extreme (respectively 14.8% for lead ions and 6.93% for acetate ions) values indicates the lead-cations based origin of extreme. The study confirmed that the influence of heavy metals on the activity of δ -ALAD always must be considered with the influence of ligandes anions. The calculated original approximate value of activity of δ -ALAD in blood was established to be 476.0 nmol/l·s for mice and 691.4 nmol/l·s for humans, while extrapolating a curve to the concentrations of lead had been approaching to zero *in vitro*.

Keywords: lead, acetate, blood, δ -aminoleavulinic acid dehydratase, activity, atomic absorption spectrophotometry.

Įvadas. Aplinką teršiantis nuodingasis sunkusis metalas švinas per dirvožemį patenka į augalus ir gyvūnus, o iš jų su maisto produktais, vandeniu ir dulkėmis – į žmogaus organizmą, kuriame kaupiasi pastoviojoje (kauluose, plaukuose) ir judriojoje (audiniuose, kraujyje ir kitose bioterpėse) vietose. Švinas pažeidžia žmogaus bei gyvūnų imuninę ir nervų sistemas, sukelia apsigimimus, anemiją, stipriai veikia kraujodarą: veikia kraujo fermento δ -aminolevulino rūgšties dehidratazės (δ -ALRD), kuri vykdo δ -aminolevulino rūgšties dviejų molekulių ciklizaciją į vieną monopirolinį porfobilinogeną hemo biosintezės grandies antroje pakopoje ir

iškreipia protoporfirino IX heterociklo susidarymo grandinę heme, aktyvumą.

Vertinant lėtinį apsinuodijimą švinu, tyrimui geriausiai tinka plaukai, o ūminį – kraujas. Ištirtas švino katijonų ir jo ligandinių acetato anijonų poveikis žmonių, pelių, šunų ir galvijų δ -ALRD aktyvumui kraujyje *in vivo* ir *in vitro*. Anijonų įtaka nevienareikšmė, mažai tirta, duomenų apie tai mokslinėje literatūroje nedaug.

Medžiagos ir metodai. Tikrasis švino kiekis nustatytas elektrotermografinė atominė absorbcinė spektrofotometrine (ETG ZAAS) sistema „Perkin-Elmer Zeeman / 3030“ iš šarminių kraujo tirpalų, taikant vieno indo

principą, kad būtų išvengta daugkartinės sąlyčio taršos (Ryselis, 2003). Iširta, kad analizei tinkamiausi ir patvarūs iki 2 mėnesių yra natrio hidroksido 0,0125 mol/l

tirpalu 10 kartų praskiesti kraujo hemolizatai. Taikytas tiesioginis priedų metodas lėtosios atomizacijos sąlygomis (lentelė).

Lentelė. Elektroterminės ETG AAS lėtosios atomizacijos sąlygos

| Programos etapas | Temperatūra, °C | Kėlimo laikas, s | Išlaikymas, s | Ar srovė, ml/min |
|------------------|-----------------|------------------|---------------|------------------|
| 1 | 90 | 5 | 60 | 300 |
| 2 | 100 | 5 | 40 | 300 |
| 3 | 500 | 10 | 20 | 300 |
| 4 | 2300 | 2 | 2 | 0* |
| 5 | 2650 | 1 | 7 | 300 |

* Signalo nuskaitymas 2,1 s, užlaikymas 1,8 s, bandinio tūris 20 µl dozuojamas į 20 µl modifikatorių 0,4% NH₄H₂PO₄ + 0,1% Mg(NO₃)₂, kalibracijai įpilant 5 µl 20 µg Pb/l standartinio tirpalo (firmos „Fluka“) į modifikatorių.

Tyrimuose *in vivo* 49 baltosioms laboratorinėms pelėms į pilvo ertmę buvo injekuota švino acetato Pb(CH₃COO)₂, kaip švino katijonų donoro, tirpalo tiek, kad būtų suleista 50 mg Pb/kg kūno masės (26 pelėms) ir 100 mg Pb/kg kūno masės (23 pelėms). Po 24 valandų tirta jų kraujo užterštumas švinu, kuris lygintas su kraujo užterštumu švinu kontrolinės 26 pelių grupės, neveiktos švino acetatu.

Tyrimuose *in vitro* į 0,2 ml ką tik paimtus žmogaus, pelės, šuns ar veršelio kraujo bandinius buvo įmaišyta po 0,04 ml įvairios koncentracijos švino acetato tirpalų taip, kad bandinių serijoje švino koncentracija keistųsi kas 0,04 µmol/l plačiu intervalu (nuo 0,04 µmol/l iki 80,40 µmol/l). Visuose kraujo bandiniuose per tris valandas buvo nustatyta tikroji švino koncentracija ETG ZAAS būdu ir lygiagrečiai δ-ALRD aktyvumas europiniu standartiniu A. Berlin ir K. Schaller metodu (Berlin, 1974). Tiriant acetato anijonų įtaką, į ką tik paimto šuns kraujo bandinius tokiu pat būdu ir kitimo žingsniu (kas 0,04 µmol/l), bet 100 kartų platesnėse ribose (nuo 0,04 µmol/l iki 8040,5 µmol/l), buvo įmaišyti natrio acetato CH₃COONa, kaip ligandinio švinui acetato anijono donoro, tirpalai. Juose natrio katijonai neveiklūs, nes jų, kaip sudėtinės elektrolitų dalies, kuri būtina normaliai organizmo veiklai, kraujyje yra daug.

Tyrimo duomenys ir jų aptarimas. Darbo tikslas buvo iširti ne tik švino katijonų, bet ir jų ligandinių acetato anijonų poveikį δ-ALRD aktyvumui, pakeičiant sudėtingus tyrimus *in vivo* paprastesniais tyrimais *in vitro*, juos tarpusavyje palyginti ir, pritaikius lėtą užterštumo švinu ir acetatu eigą kraujyje, nustatyti daugiataškes priklausomybes.

Bandymai *in vivo* parodė (1 pav., 2 kreivė), kad δ-ALRD aktyvumas, priklausomai nuo švino koncentracijos kraujyje, kinta pereidamas minimumą: kontrolinės grupės pelių, kurių kraujyje švino koncentracija 0,11 µmol/l, fermento aktyvumas buvo 179,89 nmol/l·s. Padidėjus švino koncentracijai iki 2,90 µmol/l (pelių grupė, kuriai suleista po 50 mg Pb/kg), fermento aktyvumas sumažėjo iki 3,16 nmol/l·s. Esant švino koncentracijai kraujyje 2,94 µmol/l (pelių grupė, kuriai suleista po 100 mg Pb/kg), fermento aktyvumas padidėjo iki 9,51 nmol/l·s.

In vitro kitimas buvo panašus: δ-ALRD aktyvumo minimumas 359,69 nmol/l·s gautas esant 0,52 µmol/l švino koncentracijai pelių kraujyje (1 pav., 3 kreivė) ir 561,01 nmol/l·s esant 0,24 µmol/l švino koncentracijai žmonių kraujyje (2 pav., 3 kreivė). Didėjant užterštumui

švinu, fermento aktyvumas tampa maksimalus: 389,15 nmol/l·s esant 2,27 µmol/l švino koncentracijai pelių kraujyje ir 639,80 nmol/l·s esant 0,72 µmol/l švino koncentracijai žmonių kraujyje. Toliau didinant švino koncentraciją, fermento aktyvumas mažėja. Pasiekus 28,96 µmol/l ir didesnę koncentraciją, fermento aktyvumas visiškai slopinamas iki 0,00 nmol/l·s. Panašus δ-ALRD aktyvumo kitimo pobūdis (2 pav., 1 kreivė) gautas ir į veršelių kraują suleidus tokias pat švino koncentracijas.

Priklausomybės *in vitro* kreivė pratęsta (ekstrapoliuota) iki 0,00 µmol/l švino koncentracijos kraujyje ir iš jos susikirtimo taško su ordinačių ašimi apskaičiuotas orientacinis pradinis δ-ALRD aktyvumas kraujyje be švino. Pelių jis buvo apie 476,00 nmol/l·s, o žmonių apie 691,43 nmol/l·s. Visais atvejais, į kraują patenkant švinui, δ-ALRD aktyvumas *in vivo* ir *in vitro* gautas mažesnis, negu visiškai nesant švino kraujyje.

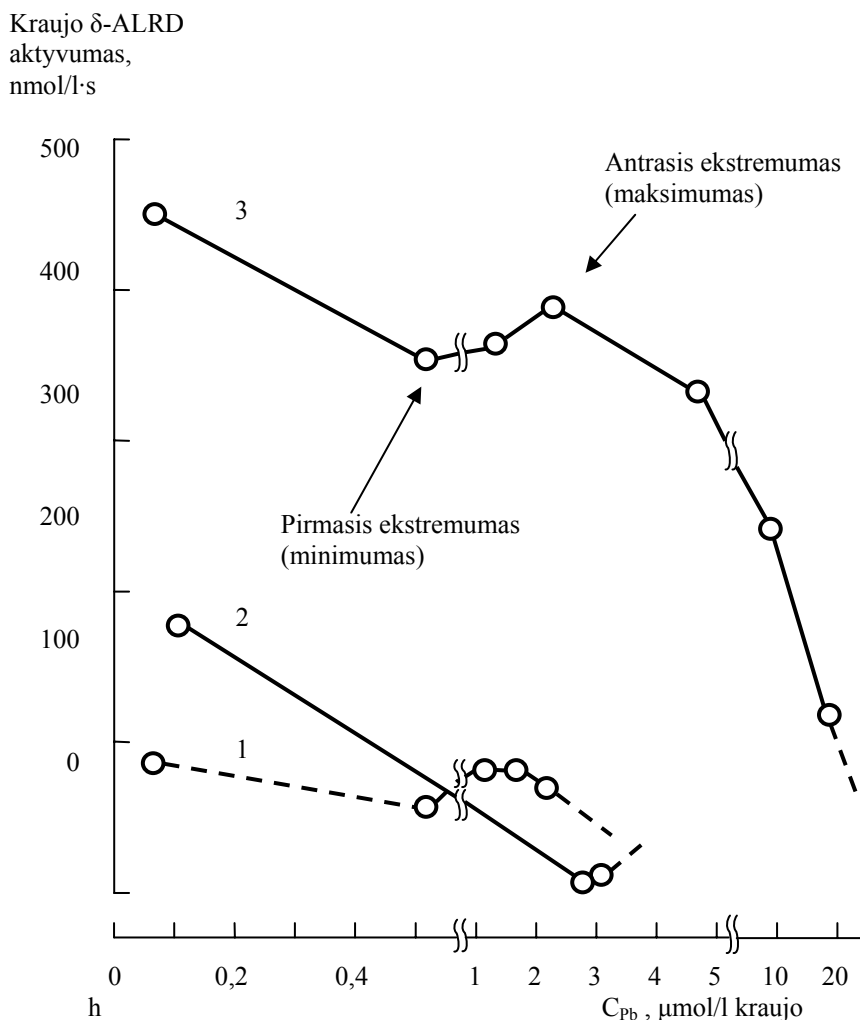
Siekiant detalizuoti gautą *in vitro* δ-ALRD aktyvumo ekstremumų vietą ir pobūdį, į kitokio tiriamojo gyvūno – šuns kraują pamažu didinant koncentraciją (kas 0,04 µmol/l) leistas švino acetatas (3 pav., 3 kreivė). Kintantis δ-ALRD aktyvumas didinant švino koncentraciją kraujyje buvo panašus į pelių ir žmonių: pradinis aktyvumas 128,00 nmol/l·s, kai švino koncentracija 0,11 µmol/l, sumažėja iki minimumo – 115,00 nmol/l·s (0,24 µmol/l), tada vėl padidėja iki maksimumo – 134,00 nmol/l·s (0,72 µmol/l). Toliau didinant švino koncentraciją šuns kraujyje nuo 4,14 µmol/l iki 24,25 µmol/l ir dar daugiau – iki 80,55 µmol/l, δ-ALRD aktyvumas mažėja atitinkamai nuo 122,00 nmol/l·s iki 11,50 nmol/l·s ir galiausiai tampa 0,00 nmol/l·s, t. y. fermentas galutinai inaktyvuojasi.

Abu δ-ALRD aktyvumo ekstremumai buvo pagrįsti specialiu tyrimu: į kito tiriamojo gyvūno, šuns, kraują pakartotinai taip pat lėtai (kas 0,04 µmol/l) buvo leidžiamas švino acetatas, didinant koncentraciją nuo 0,17 µmol/l iki 0,77 µmol/l (3 pav., 1 kreivė). Pradinis δ-ALRD aktyvumas 86,5 nmol/l·s sumažėjo iki 83,00 nmol/l·s, esant švino koncentracijai šuns kraujyje 0,25 µmol/l, ir vėl padidėjo iki 89,40 nmol/l·s, pasiekus švino koncentraciją 0,65 µmol/l. Toks pat kitimo pobūdis nustatytas tokiuose pat specialiuose tyrimuose su pelės (1 pav., 1 kreivė) ir žmogaus krauju (2 pav., 2 kreivė), patvirtina neabejotinai egzistuojant ekstremumus.

Norint įsitikinti, ar ligandinis švino acetate esantis acetato anijonas gali veikti ekstremumų kilmę, imtas trečio šuns kraujas ir į jį taip pat, kaip ir švino atveju,

pamažu didinant koncentraciją (kas 0,04 $\mu\text{mol/l}$) leistas natrio acetatas (3 pav., 2 kreivė). Palyginus 1, 2 ir 3 paveikslų kreives paaiškėjo, kad acetato anijonų įtaka fermentui galėjo pasireikšti visą bandymų eigą: acetato anijonai dideliu koncentracijos intervalu (nuo 0,04 $\mu\text{mol/l}$ iki 8040,50 $\mu\text{mol/l}$) nežymiai keitė δ -ALRD aktyvumą – nuo 98,70 nmol/l·s iki 99,70 nmol/l·s. Tačiau pradinis

δ -ALRD aktyvumo mažėjimas (minimumas), veikiamas acetato – nuo 98,70 nmol/l·s iki 89,60 nmol/l·s (9,22%) buvo panašus į mažėjimą, gautą veikiant švino acetatui – nuo 128,00 nmol/l·s iki 115,00 nmol/l·s (10,16%). Artimos šių dydžių procentinės reikšmės patvirtina δ -ALRD aktyvumo pirmojo ekstremumo galimą daugiau acetato anijoninę įtaką ir kilmę.



1 pav. Švino katijonų įtaka δ -ALRD aktyvumui kraujyje: 1 – *in vitro*, pelės, specialus tyrimas ekstremumams patvirtinti; 2 – *in vivo*, pelių (imtis $n=20$); 3 – *in vitro*, pelių (imtis $n=3$)

Atsiradus antrajam ekstremumui, švino veikiamas δ -ALRD aktyvumas padidėja nuo 115,00 nmol/l·s iki maksimumo – 134,00 nmol/l·s (16,52%). Šiam pokyčiui acetato įtaka mažesnė, nes atitinkamose jo koncentracijos ribose δ -ALRD aktyvumas padidėja tik nuo 89,6 nmol/l·s iki 95,1 nmol/l·s (6,14%). Tai rodo antrojo ekstremumo galimą daugiau švino katijoninę įtaką ir kilmę. Fermentas visiškai inaktyvuojamas, kai švino koncentracija šuns kraujyje pasiekia 24,25 $\mu\text{mol/l}$, o acetato veikiamas fermento aktyvumas išlieka beveik nepakitęs iki 8040,54 $\mu\text{mol/l}$ natrio acetato koncentracijos. Tai rodo visišką fermento inaktyvacijos švino katijoninę kilmę ir įtaką.

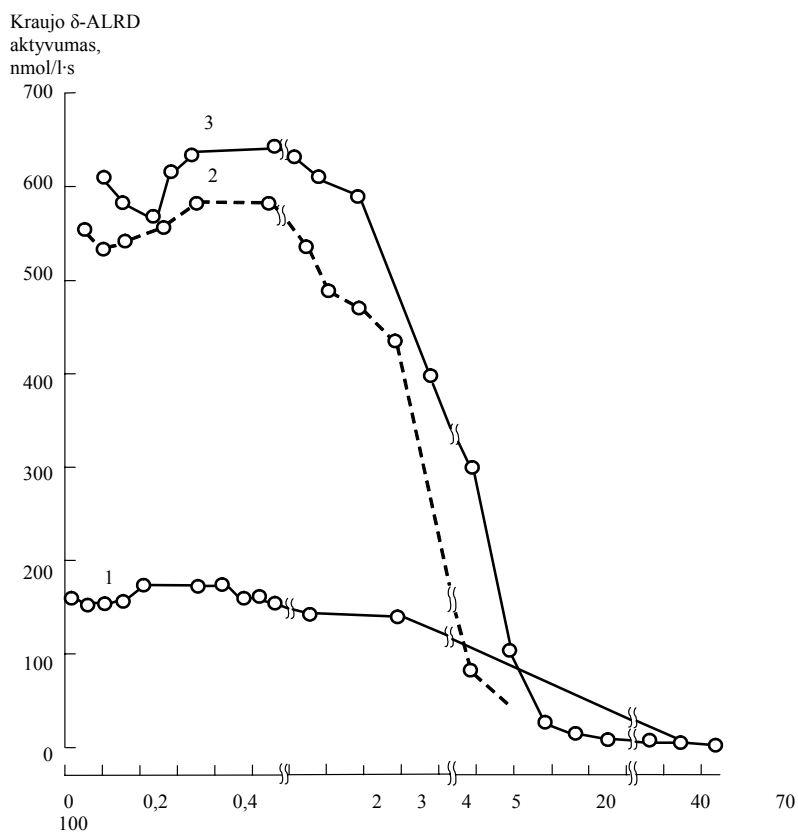
Tyrimai patvirtina, kad sunkiųjų metalų įtaka δ -ALRD aktyvumui kraujyje turi būti visada siejama su jų ligandinių anijonų poveikiu *in vitro* ir *in vivo*. To nedarant, sunkiųjų metalų įtakos aiškinimas nėra patikimas.

Išvados.

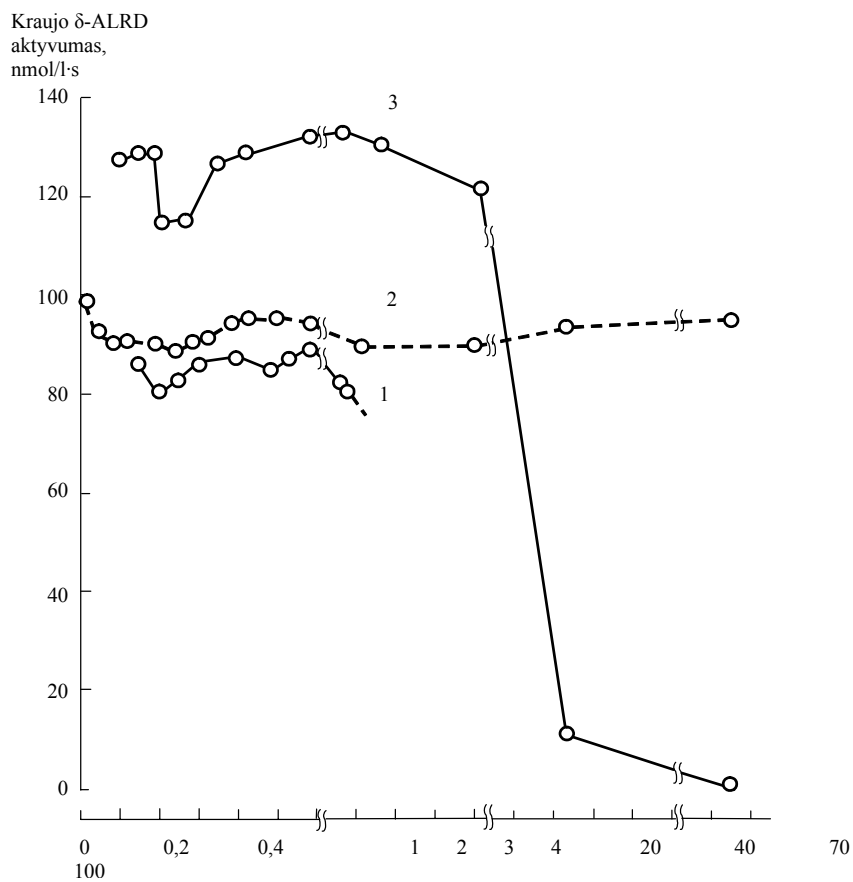
1. Švino mikrokoncentracijos patikimai nustatomos 10 kartų praskiestuose natrio hidroksido 0,0125 mol/l tirpalu kraujo hemolizatuose ETG ZAAS lėtosios atomizacijos sąlygomis su mišriu amonio-divandenilio ortofosfato ir magnio dinitrato modifikatoriumi.

2. δ -ALRD aktyvumas bandomųjų pelių kraujyje, suleidus švino katijonus, kinta analogiškai *in vivo* ir *in vitro*.

3. δ -ALRD aktyvumas *in vitro* žmonių, pelių, šunų ir galvijų kraujyje, pamažu leidžiant (kas 0,04 $\mu\text{mol/l}$) švino katijonus, kinta vienodai pereidamas du ekstremumus: minimumą, esant švino koncentracijai tiriamajame kraujyje nuo 0,1 $\mu\text{mol/l}$ iki 0,5 $\mu\text{mol/l}$, ir maksimumą – nuo 0,5 $\mu\text{mol/l}$ iki 2,5 $\mu\text{mol/l}$. Fermentas visiškai inaktyvuojamas, kai švino koncentracija kraujyje didesnė kaip 29,0 $\mu\text{mol/l}$.



2 pav. Švino katijonų įtaka δ -ALRD aktyvumui kraujyje: 1 – *in vitro*, veršelio; 2 – *in vitro*, žmonių, specialus tyrimas ekstremumams nustatyti; 3 – *in vitro*, žmonių



3 pav. Švino ir acetato jonų įtaka δ -ALRD aktyvumui šuns kraujyje: 1 – *in vitro*, švino katijonų įtaka, specialus tyrimas ekstremumams nustatyti; 2 – *in vitro*, acetato anijonų įtaka; 3 – *in vitro*, švino katijonų įtaka.

4. Švino katijonams ligandinio acetato anijonai *in vitro* analogiškose švinui koncentracijose sudaro panašius δ -ALRD aktyvumo ekstremumus: minimumą, esant nuo 0,1 $\mu\text{mol/l}$ iki 0,5 $\mu\text{mol/l}$, ir maksimumą, esant nuo 0,5 $\mu\text{mol/l}$ iki 2,5 $\mu\text{mol/l}$ acetato koncentracijai kraujyje. Fermentas nebuvo inaktyvuojamas net esant 8040,5 $\mu\text{mol/l}$ acetato koncentracijai kraujyje.

5. δ -ALRD aktyvumo priklausomybių *in vitro* nuo švino acetato ir natrio acetato koncentracijos kraujyje palyginimas patvirtina pirmojo ekstremumo – minimumo galimą daugiau acetato anijoninę, o antrojo – maksimumo, galimą daugiau švino katijoninę kilmę. Fermentas visiškai inaktyvuojamas veikiant švino katijonams, o acetato anijonai tam įtakos nedaro.

6. Sunkiųjų metalų įtaka δ -ALRD aktyvumui kraujyje visada turi būti siejama su jų ligandinių anijonų poveikiu *in vitro* ir *in vivo*.

Literatūra

1. Ryselis S., Baranauskienė D., Naginienė R., Abdrachmanovas O. Švino taršos nustatymas žmogaus kraujyje ir jos poveikio δ -aminolevulinio rūgšties dehidratazės aktyvumui tyrimo *in vitro* ir *in vivo* palyginimas. Neorganinių medžiagų chemija ir technologija. Konferencijos pranešimų medžiaga. Kaunas, Technologija. 2003. 75–76 p.

A. Berlin, K. H. Schaller. European standardized method for the determination of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. Z. Klin. Biochem. 1974, N 12. P. 389.