

SULFIDO, SELENIDO IR ŠVINO JONŲ POVEIKIS δ -AMINOLEVULINO RŪGŠTIES DEHIDRATAZĖS AKTYVUMUI BANDOMŲJŲ GYVŪNŲ KRAUJYJE *IN VITRO*

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

¹Kauno medicinos universiteto Biomedicininų tyrimų institutas, Eivenių g. 4, LT-50009 Kaunas;

tel. (8~37) 30 29 48;

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

Santrauka. *In vitro* ištirtas cheminių analogų sulfido (S^{2-}) ir selenido (Se^{2-}) apsauginis poveikis kraujodaros fermentui δ -aminolevulino rūgšties dehidratazei (δ -ALRD) dirbtine tarša katalitiniu nuodu (Pb^{2+}), pagrindiniu kriterijumi laikant spartaus δ -ALRD aktyvumo mažėjimo (inhibicijos šuolio) postūmį daugiataškėse δ -ALRD aktyvumo priklausomybėse. Šios priklausomybės parodė, kad *in vitro* sąlygomis didelės Se^{2-} koncentracijos fermento δ -ALRD aktyvumą slopina stipriau negu S^{2-} , nes Se^{2-} sukeltas inhibicijos šuolis įvyksta veikiant mažesnėms jono koncentracijoms. δ -ALRD inhibicijos katalitiniu nuodu (Pb^{2+}) šuolio postūmis priklauso nuo S^{2-} koncentracijos: nesant S^{2-} jonų kraujyje, Pb^{2+} šio fermento inhibiciją sukelia greičiau, negu esant veikliai nedidelei S^{2-} koncentracijai kraujyje. Net ir esant didelei S^{2-} koncentracijai δ -ALRD aktyvumas visiškai nenuslopinamas – S^{2-} jonai pasižymi apsauginiu veiklumu *in vitro*. Toks pat Se^{2-} priedas galvijų kraujyje veikia panašiai – sulėtina δ -ALRD aktyvumo slopinimą Pb^{2+} jonais. Se^{2-} jonai, taip pat kaip ir S^{2-} , pasižymi apsauginiu veiklumu *in vitro*. Lyginant S^{2-} ir Se^{2-} apsauginį poveikį nustatyta, kad esant gyvulių kraujyje Se^{2-} δ -ALRD aktyvumas, veikiamas Pb^{2+} jonų, mažėja lėčiau, negu kraujyje su S^{2-} . Nors abiem anijonams būdingos apsauginis veiklumas *in vitro*, Se^{2-} anijono apsauginis poveikis didesnis negu S^{2-} . Tyrimai parodė, kad jonų poveikį kraujo δ -ALRD aktyvumui galima numatyti, palyginti ir įvertinti *in vitro* sąlygomis pagal fermento inhibicijos šuolio postūmį (katalitinio nuodo koncentracijos dydį, atitinkantį fermento aktyvumo spartaus sumažėjimo šuolio puse) inhibicijos metu.

Raktažodžiai: sulfidas, selenidas, švinas, kraujas, δ -aminolevulino rūgšties dehidratazė, aktyvumas, *in vitro*.

INFLUENCE OF SULPHIDE, SELENIDE AND LEAD IONS ON THE ACTIVITY OF δ -AMINOLEAVULINIC ACID DEHYDRATASE IN BLOOD OF EXPERIMENTAL ANIMALS *IN VITRO*

Summary. In the present research the influence of chemical analogues – sulphide (S^{2-}) and selenide (Se^{2-}) ions - on the activity of δ -aminoleavulinic acid dehydratase (δ -ALAD) in bovine blood *in vitro* upon impact of lead ions (Pb^{2+}) was investigated. It was shown that high concentrations of Se^{2-} inhibited the activity of enzyme δ -ALAD *in vitro* in higher extent compared to equimolar concentrations of S^{2-} . The leap of enzyme activity inhibition occurred under the lower concentrations of Se^{2-} in comparison to S^{2-} . The shift of the leap of the inhibition of δ -ALAD activity under the impact of Pb^{2+} ions depended on the S^{2-} concentration as follows: Pb^{2+} ions inhibited the enzyme activity faster in the absence of S^{2-} if compared to the presence of low substantial active concentration of S^{2-} ions. The S^{2-} ions had the protective properties on the enzyme activity *in vitro* since the δ -ALAD activity was not inhibited completely even at high concentration of the S^{2-} ions. The addition of Se^{2-} ions to the bovine blood acted similarly to S^{2-} ions and slowed down the lead hazardous impact on the enzyme's activity. It showed that Se^{2-} ions as well as S^{2-} ions had protective properties *in vitro*. The comparison of protective properties revealed that the activity of δ -ALAD activity upon impact of lead ions decreased in less extent in the presence of Se^{2-} ions if compared to the presence of S^{2-} ions. Although both anions are characterized by the protective activity *in vitro*, the protective activity of Se^{2-} anions was higher than of S^{2-} .

The investigations showed that the effects of the ions on blood δ -ALAD activity can be foreseen, compared and evaluated *in vitro* according to the impulse of the leap of enzyme inhibition (concentration value of the catalytic poison, which corresponds to half-leap of the enzyme inhibition).

Keywords: sulphide, selenide, lead, blood, δ -aminoleavulinic acid dehydratase, activity, *in vitro*.

Įvadas. Gyvūnų kraujo fermentas δ -aminolevulino rūgšties dehidratazė (δ -ALRD) hemobiosintezės pradžioje katalizuoja dviejų δ -aminolevulino rūgšties molekulių kondensaciją į monopirola porfobilinogeno heterociklą (Sassa et al., 1989). δ -ALRD sudėtyje yra 28 sulfhidrilinės (-SH) grupės, todėl jos aktyvumas labai jautrus tiems cheminiams elementams, kurie stipriai sąveikauja su šiomis grupėmis. Tokie elementai yra sunkusis metalas švinas (Pb) ir nemetalai, cheminiai

analogai – telūras (Te), selenas (Se) ir siera (S). Pb jonai pakeičia δ -ALRD aktyviajame centre esančius cinko jonus ir inhibuoja fermentą, o Te ir Se junginiai oksiduoja -SH grupes, taip mažindami δ -ALRD aktyvumą. Be to, neorganiniai seleno junginiai organizme virsta RSSeSR tipo organiniais selenosulfidais (Julio et al., 2003). Taigi jei kraujyje yra šių elementų junginių, iškreipiama ir slopinama hemobiosintezė, ląstelėse kaupiasi δ -ALR, pasižyminti kenksmingu prooksidaciniu veikimu. Be to, mažas seleno kiekis gyvūnų racione sukelia vėžį, o per

didelis – apsinuodijimus (Navaro-Alarcon, Lopez-Martinez, 2000). Tačiau selenas, nesvarbu, kokios cheminės formos jo mikrokieki pasisavina organizmas, pasižymi ir apsauginiu poveikiu, kai apsinuodijama sunkiaisiais metalais. Sulfido jonų poveikis δ -ALRD aktyvumui literatūroje neaprašytas. Jis turėtų būti apsauginis, nes S^{2-} gali regeneruoti –SH grupes, dalyvauti susidarant RSSeSR ar veikti Pb inhibicines savybes. Redukcinėje organizmo aplinkoje Pb egzistuoja koordinuoto organiniais ligandais Pb^{2+} katijonų būsenos, o S, Se ir Te sulfido, selenido bei telūrido – anijonų būsenos, todėl tyrimams pasirinktas organinis švino junginys – švino acetatas $Pb(CH_3COO)_2$, kaip švino jonų donoras ir natrio sulfidas (Na_2S), bei kalio selenidas (K_2Se), kaip sulfido – S^{2-} bei selenido – Se^{2-} jonų donoriai.

Darbo tikslas. Mūsų darbuose buvo tirta švino katijonų ir acetato anijonų įtaka δ -aminolevulino rūgšties dehidratazės aktyvumui žmogaus ir bandomųjų gyvūnų kraujyje *in vivo* ir *in vitro* (Ryselis ir kt., 2004) bei seleno ir švino poveikis δ -ALRD aktyvumui galvijų kraujyje *in vitro* (Ryselis ir kt., 2004). Šio darbo tikslas buvo pratęsti ankstesnius tyrimus ir ištirti selenido anijono cheminio analogo – sulfido anijono palyginamąjį toksinį ir apsauginį poveikį δ -ALRD aktyvumui galvijų kraujyje natūralios ir dirbtinės taršos švinu fone šiais būdais: didinant S^{2-} koncentraciją kraujyje, kuriame natūraliai buvo nedidelė Pb^{2+} koncentracija, ir pakartojant šį tyrimą vietoj sulfido anijono naudojant Se^{2-} , taip pat didinant Pb^{2+} koncentraciją kraujyje, į kurią nebuvo įdėta sulfido arba selenido, ir pakartojant šiuos bandymus dirbtinai sudarius pastovią didesnę, bet veiklią S^{2-} ar Se^{2-} koncentraciją. Visais atvejais Pb^{2+} koncentracija buvo didinama tol, kol pasiekiamas δ -ALRD inhibicijos šuolis. Tyrimais buvo siekiama gauti nuoseklias daugiataškes priklausomybes, rodančias, kaip kinta δ -ALRD aktyvumas pamažu didinant jonų koncentraciją. Atlikti tokius bandymus gyvo organizmo sąlygomis (*in vivo*) neįmanoma, todėl tyrimai *in vivo* buvo pakeisti tyrimais *in vitro*, pagrindiniu palyginimo kriterijumi laikant δ -ALRD aktyvumo staigaus sumažėjimo inhibicijos metu (inhibicijos šuolio) postūmio priklausomybę nuo apsauginių arba toksiškųjų S^{2-} ar Se^{2-} koncentracijų poveikio natūralios ir dirbtinės kraujo taršos Pb^{2+} jonais fone. Inhibicijos šuolio padėtis buvo vertinama pagal jo pusės aukštį atitinkančią katalitinio nuodo (Pb^{2+}) koncentraciją ($I_{1/2}$), nes ji mažiau priklauso nuo fermento aktyvumo dydžio ir kraujo savybių, bet daugiau – nuo katalitinio nuodo prigimties, o svarbiausia – nuo poveikio jam.

Medžiagos ir metodai. Tyrimams naudotas 3 mėnesių Lietuvos juodmargių veislės veršelio iš Jungo venos ką tik paimtas kraujas. Bendras kraujo tūris – 20 ml, antikoaguliantas – heparinas. Į 0,2 ml tūrio kraujo bandinius įpilta nedaug tokio pat tūrio įvairios koncentracijos natrio sulfido, kalio selenido ir švino acetato tirpalų. Švino ir seleno koncentracija pagrindiniuose tirpaluose buvo analizuojama „Perkin-Elmer Zeeman/3030“ elektrotermografine atominė absorbcine spektrofotometriniu sistema taikant modifikuotą metodą (Ryselis ir kt., 2004). Pagrindinis

natrio sulfido tirpalas buvo paruoštas svorio metodu. δ -ALRD aktyvumas buvo nustatomas klasikine spektrofotometrija (Berlin, Schaller, 1974).

Statistinė duomenų analizė atlikta SPSS statistiniu paketu (SPSS Inc, 1995-2005). Koreliaciniai ryšiai tarp priklausomų kintamųjų įvertinti Pearsono koreliacinėmis matricomis. Koreliacijos buvo laikomos statistiškai patikimomis, jei $p \leq 0,05$. Skirtumo tarp lyginamų rodiklių patikimumas buvo apskaičiuojamas T testu. Skirtumas buvo laikomas patikimu, kai $p \leq 0,05$.

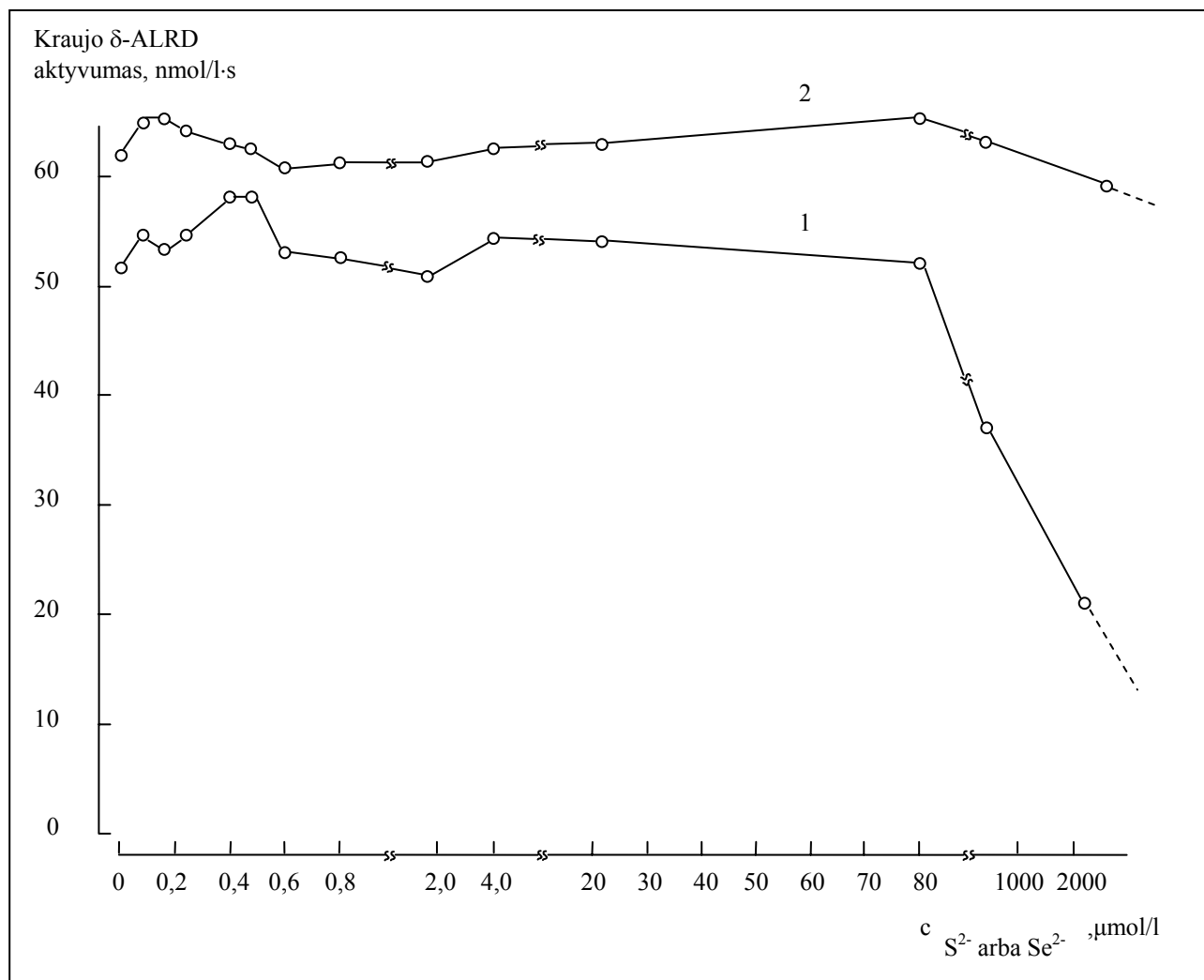
Tyrimų duomenys ir jų aptarimas. Tiriant, kaip grynai sulfido ir selenido anijonai veikia δ -ALRD aktyvumą, į dvi galvijų kraujo bandinių grupes, kuriose natūraliai buvo labai maža Pb^{2+} koncentracija, atitinkamai, 0,0016 $\mu\text{mol/l}$ sulfido atveju ir 0,0031 $\mu\text{mol/l}$ selenido atveju, pridėta natrio sulfido ir kalio selenido taip, kad S^{2-} ir Se^{2-} koncentracija kraujyje nuosekliai didėtų nuo 0 iki 2412,16 $\mu\text{mol/l}$.

Nustatant fermento aktyvumą pirmoje kraujo bandinių grupėje pastebėta, kad įdėjus nedidelį natrio sulfido kiekį, t. y. padidinus S^{2-} jonų koncentraciją nuo 0 iki 0,04 $\mu\text{mol/l}$, δ -ALRD aktyvumas staigiai padidėja nuo 61,88 nmol/l-s iki 64,62 nmol/l-s (1 pav., 2 kreivė).

Padidinus S^{2-} koncentraciją iki 0,36 $\mu\text{mol/l}$, stebimas fermento aktyvumo maksimumas (65,51 nmol/l-s), o esant dar didesnei S^{2-} koncentracijai (0,60 $\mu\text{mol/l}$), stebimas fermento aktyvumo minimumas (60,75 nmol/l-s). Šių ekstremumų prigimtis paaiškinta ankstesniuose mūsų darbuose (Ryselis ir kt., 2004). Didinant S^{2-} koncentraciją toliau, nuo 0,60 $\mu\text{mol/l}$ iki 402,03 $\mu\text{mol/l}$, δ -ALRD aktyvumas tolygiai didėja nuo 60,75 nmol/l-s iki 63,19 nmol/l-s . Dar didesnė S^{2-} koncentracija δ -ALRD aktyvumą greitai mažina. Esant S^{2-} koncentracijai 2412,16 $\mu\text{mol/l}$, δ -ALRD aktyvumas sumažėjo iki 58,90 nmol/l-s , tačiau pasiekti inhibicijos šuolio nepavyko.

Antroje bandinių grupėje įdėjus į kraują pradinį mažą Se^{2-} kiekį (padidinus koncentraciją nuo 0 iki 0,08 $\mu\text{mol/l}$), δ -ALRD aktyvumas taip pat staigiai padidėja nuo 51,75 nmol/l-s iki 54,47 nmol/l-s (1pav., 1 kreivė). Toliau didinant Se^{2-} koncentraciją iki 0,48 $\mu\text{mol/l}$, fermento aktyvumas pasiekė maksimumą (57,93 nmol/l-s), o esant Se^{2-} koncentracijai 1,61 $\mu\text{mol/l}$ – minimumą (50,80 nmol/l-s). Didinant Se^{2-} koncentraciją nuo 4,02 $\mu\text{mol/l}$ iki 80,41 $\mu\text{mol/l}$, δ -ALRD aktyvumas mažai kinta: sumažėja nuo 54,47 nmol/l-s iki 52,06 nmol/l-s . Dar daugiau padidinus Se^{2-} koncentraciją vyksta staigus fermento inaktyvavimas – inhibicijos šuolis. Esant selenido koncentracijai 402,03 $\mu\text{mol/l}$ ir 2412,16 $\mu\text{mol/l}$ Se^{2-} , δ -ALRD aktyvumas atitinkamai sumažėja iki 37,05 nmol/l-s ir 23,55 nmol/l-s .

Šios dvi priklausomybės leido parinkti tolimesniems tyrimams optimalią veiklią S^{2-} ir Se^{2-} 20,10 $\mu\text{mol/l}$ koncentraciją, nedarančią poveikio δ -ALRD aktyvumui. Abu bandymai *in vitro* parodė, kad Se^{2-} poveikis δ -ALRD aktyvumui yra didesnis ($R = -0,908$; $p = 0,0001$) negu S^{2-} ($R = -0,529$; $p = 0,014$), nes Se^{2-} anijono sukeltas fermento inhibicijos šuolis įvyksta veikiant mažesnėms šio jono, kaip katalitinio nuodo, koncentracijoms.



1 pav. Anijonų įtaka δ -ALRD aktyvumui galvijų kraujyje *in vitro*: 1 – selenido (Se^{2-}) esant natūraliai Pb^{2+} koncentracijai 0,0031 $\mu\text{mol/l}$; 2 – sulfido (S^{2-}) esant natūraliai Pb^{2+} koncentracijai 0,0016 $\mu\text{mol/l}$

Tiriant sulfido anijono apsauginį poveikį δ -ALRD aktyvumui kraujyje dirbtinės taršos švinu poveikio fone *in vitro* būdu, pagrindiniu kriterijumi buvo laikoma fermento aktyvumo staigaus sumažėjimo inhibicijos metu (inhibicijos pusės šuolio – $I_{1/2}$) postūmio priklausomybė nuo S^{2-} jonų priedo.

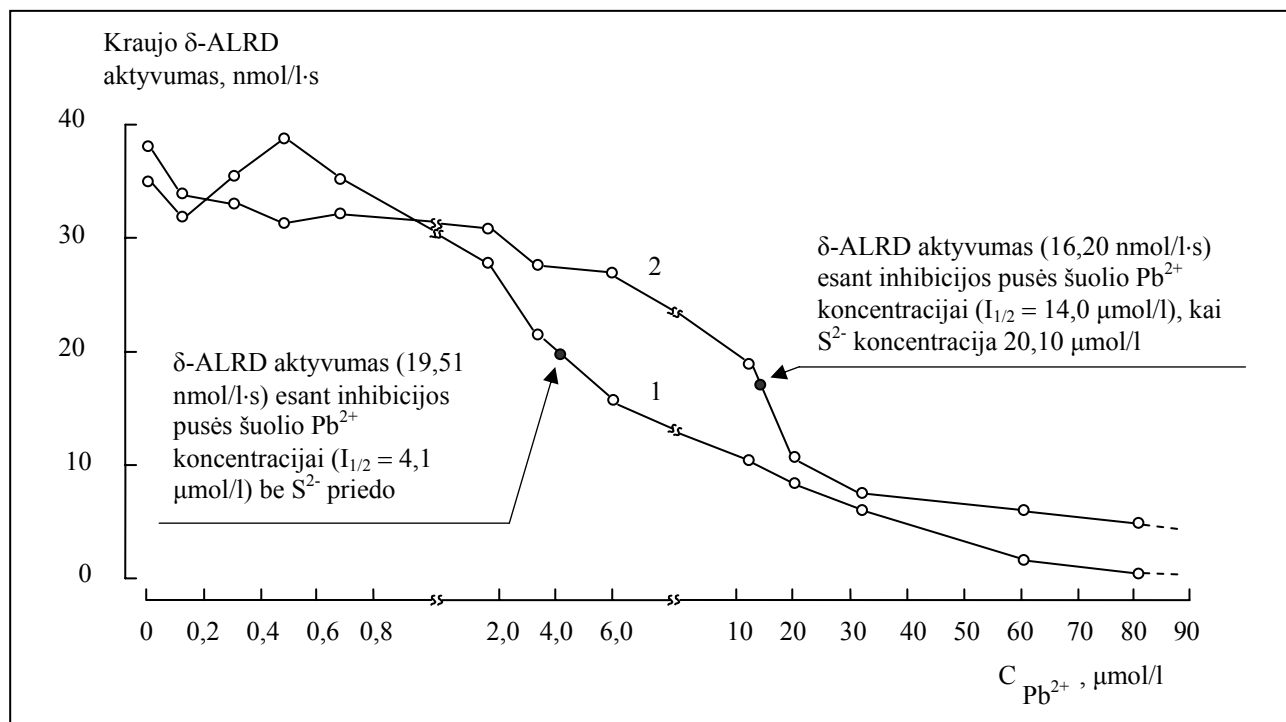
Į dvi galvijų kraujo lygiagrečių bandinių grupes, kurių vienoje sulfido priedo nedėta, o kitoje sudaryta 20,10 $\mu\text{mol/l}$ sulfido jonų koncentracija ir kuriose pradinė švino koncentracija buvo labai maža (apie 0,001 $\mu\text{mol/l}$), pridėta švino acetato tiek, kad švino jonų koncentracija kraujyje didėtų nuo pradinės iki 80,41 $\mu\text{mol/l}$ ir pereitų inhibicijos šuolio vertę. Lygiagrečiai nustatant abiejų grupių bandinių δ -ALRD aktyvumą pastebėta, kad bandiniuose be S^{2-} priedo padidinus Pb^{2+} koncentraciją kraujyje nuo 0,001 $\mu\text{mol/l}$ iki 0,68 $\mu\text{mol/l}$, pradinis fermento aktyvumas (35,17 nmol/l-s) kinta pereidamas du ekstremumus – minimumą (32,16 nmol/l-s, esant Pb^{2+} koncentracijai 0,12 $\mu\text{mol/l}$) ir maksimumą (39,01 nmol/l-s, esant Pb^{2+} koncentracijai 0,48 $\mu\text{mol/l}$) (2 pav., 1 kreivė).

Toliau didinant švino koncentraciją kraujyje, fermento

aktyvumas sparčiai mažėja – vyksta inhibicijos šuolis, o esant Pb^{2+} koncentracijai 80,41 $\mu\text{mol/l}$, fermento aktyvumas tik 0,20 nmol/l-s. Grafiškai apskaičiuota fermento inhibicijos pusės šuolio Pb^{2+} koncentracija ($I_{1/2}$) buvo 4,10 $\mu\text{mol/l}$. Fermento aktyvumas esant šiai koncentracijai – 19,51 nmol/l-s. Antroje bandinių grupėje su pastovia 20,10 $\mu\text{mol/l}$ S^{2-} koncentracija pradinis fermento aktyvumas 35,17 nmol/l-s, veikiamas sulfido jonų, padidėja iki 38,24 nmol/l-s. Didinant Pb^{2+} koncentraciją kraujyje nuo 0,001 $\mu\text{mol/l}$ iki 0,48 $\mu\text{mol/l}$, fermento aktyvumas sumažėja iki 31,39 nmol/l-s. Padidinus Pb^{2+} koncentraciją iki 0,68 $\mu\text{mol/l}$, fermento aktyvumas padidėja nežymiai (32,40 nmol/l-s). Toliau didinant Pb^{2+} koncentraciją, δ -ALRD aktyvumas vėl mažėja – esant Pb^{2+} koncentracijai 1,61 $\mu\text{mol/l}$, aktyvumas – 30,89 nmol/l-s. Šių ekstremumų – minimumo (31,39 nmol/l-s) ir maksimumo (32,40 nmol/l-s) – kilmė analogiška anksčiau aprašytai (Ryselis ir kt., 2004). Esant Pb^{2+} koncentracijai kraujyje didesnei už 1,61 $\mu\text{mol/l}$, δ -ALRD aktyvumas greitai mažėja – vyksta inhibicijos šuolis ir, pasiekus Pb^{2+} koncentraciją 80,41 $\mu\text{mol/l}$, fermento aktyvumas siekia tik 4,95 nmol/l-s.

Grafiškai rasta $I_{1/2}$, atitinkanti δ -ALRD aktyvumo inhibicijos pusės šuolio Pb^{2+} koncentraciją, buvo 14,00

$\mu\text{mol/l}$. Fermento aktyvumas esant šiai koncentracijai – 16,20 nmol/l·s.



2 pav. Pb^{2+} priedų įtaka δ -ALRD aktyvumui galvijų kraujyje *in vitro*: 1 – be sulfido (S^{2-}) priedų; 2 – su 20,10 $\mu\text{mol/l}$ sulfido (S^{2-}) koncentracija

Tirtose dviejose priklausomybėse δ -ALRD inhibicijos švinu šuolio postūmis akivaizdžiai priklauso nuo S^{2-} jonų koncentracijos: kai sulfido jonų nėra, mažesnė švino katijonų koncentracija ($I_{1/2} = 4,10 \mu\text{mol/l}$) sukelia fermento inhibiciją ($R = -0,698$; $p = 0,0001$), kai yra 20,10 $\mu\text{mol/l}$ S^{2-} priedas, fermentas slopinamas lėčiau ($I_{1/2} = 14,00 \mu\text{mol/l}$) ($R = -0,698$; $p = 0,003$). Be to, esamomis sąlygomis visiškai δ -ALRD inhibicija neįvyksta – sulfido jonai pasižymi apsauginiu poveikiu *in vitro*.

Tokiu pat būdu tiriant selenido anijono apsauginį poveikį δ -ALRD aktyvumui dviejose lygiagrečiose galvijų kraujo bandinių grupėse, kuriose buvo natūrali 0,28 $\mu\text{mol/l}$ Pb^{2+} koncentracija, į vieną selenido priedo neįdėta, o kitoje sudaryta 20,10 $\mu\text{mol/l}$ selenido jonų koncentracija, pridėta švino acetato tiek, kad Pb^{2+} koncentracija kraujyje kistų nuo esamos iki 80,41 $\mu\text{mol/l}$ ir būtų pasiektas fermento inhibicijos šuolis. Didinant bandiniuose be Se^{2-} priedo bendrąją Pb^{2+} koncentraciją kraujyje nuo 0,28 $\mu\text{mol/l}$ iki 1,89 $\mu\text{mol/l}$, pradinis fermento aktyvumas (115,12 nmol/l·s) mažėja pereidamas du neįžymius ekstremumus – minimumą (104,16 nmol/l·s), esant 0,40 $\mu\text{mol/l}$ Pb^{2+} koncentracijai, ir maksimumą (105,92 nmol/l·s), esant 0,68 $\mu\text{mol/l}$ Pb^{2+} koncentracijai (3 pav., 1 kreivė).

Toliau didinant bendrąją švino koncentraciją kraujyje, fermento aktyvumas greitai mažėja – vyksta inhibicijos šuolis, ir pasiekus 80,69 $\mu\text{mol/l}$, δ -ALRD aktyvumas visiškai slopinamas iki 1,76 nmol/l·s. Grafiškai rasta

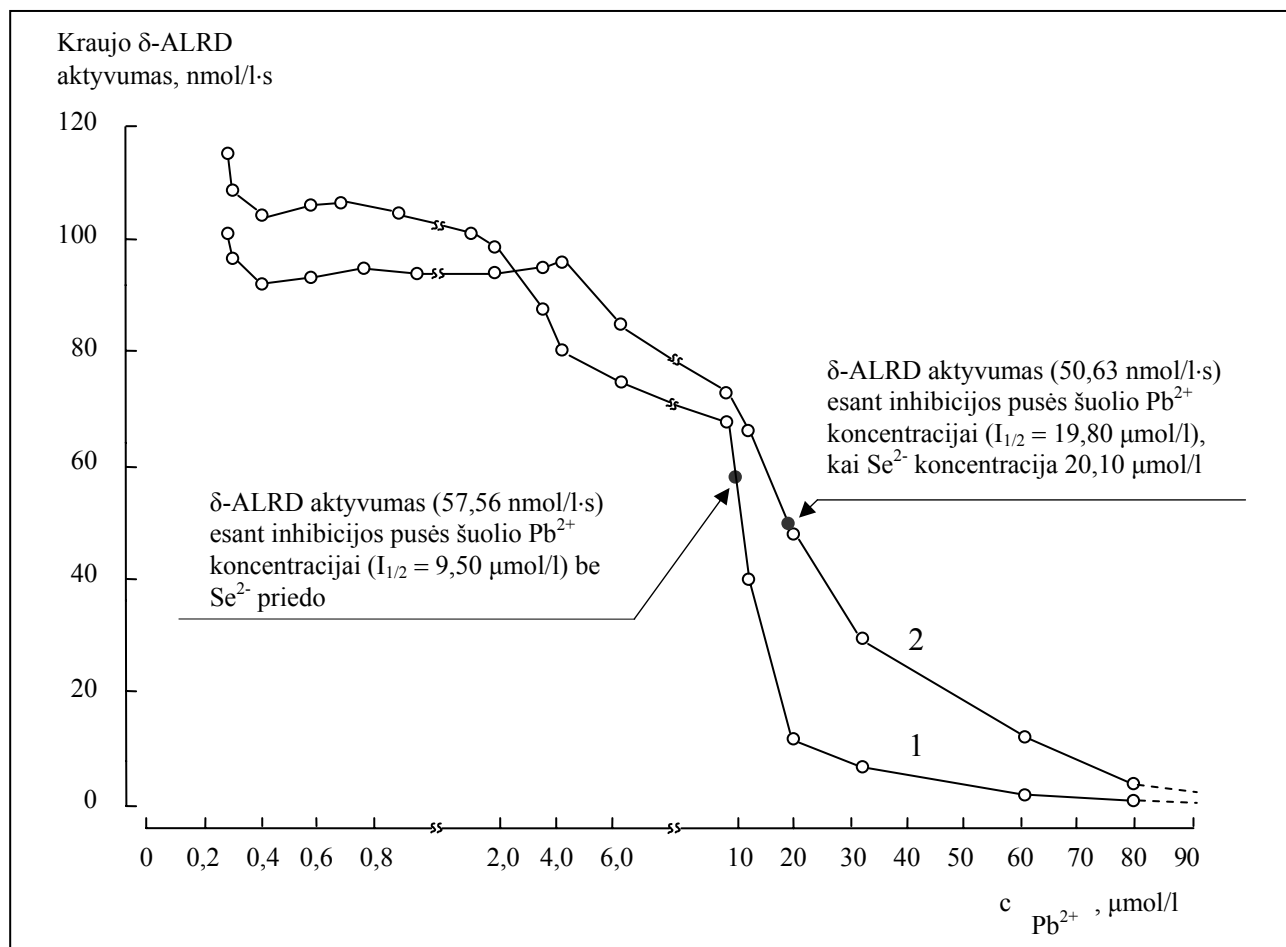
inhibicijos pusės šuolio Pb^{2+} jonų koncentracija ($I_{1/2}$) buvo 9,50 $\mu\text{mol/l}$, esant fermento aktyvumui 57,56 nmol/l·s. Kitoje grupėje kraujo bandinių, kuriuose buvo sudaryta pastovi 20,10 $\mu\text{mol/l}$ Se^{2-} jonų koncentracija, padidinus Pb^{2+} koncentraciją nuo 0,28 $\mu\text{mol/l}$ iki 4,30 $\mu\text{mol/l}$, pradinis fermento aktyvumas 101,25 nmol/l·s taip pat mažėja, pereidamas du neįžymius ekstremumus – minimumą (92,28 nmol/l·s, esant 0,40 $\mu\text{mol/l}$ Pb^{2+} koncentracijai) ir maksimumą (96,03 nmol/l·s, esant 4,30 $\mu\text{mol/l}$ Pb^{2+} koncentracijai) (3 pav., 2 kreivė). Šių ekstremumų kilmė tokia pati, kaip sulfido atveju (Ryselis ir kt., 2004). Dar daugiau didinant bendrąją Pb^{2+} koncentraciją vyksta inhibicijos šuolis, ir δ -ALRD aktyvumas sumažėja iki 3,68 nmol/l·s, esant Pb^{2+} koncentracijai 80,69 $\mu\text{mol/l}$. Grafiškai nustatyta $I_{1/2}$ buvo 19,80 $\mu\text{mol/l}$, esant fermento aktyvumui 50,63 nmol/l·s.

Dviejų bandinių grupių tyrimas parodė, kad, kaip ir S^{2-} atveju, δ -ALRD inhibicijos švinu šuolio postūmis priklauso nuo Se^{2-} jonų priedo kraujyje. Be Se^{2-} priedo švino katijonai greičiau apnuodija fermentą ($I_{1/2} = 9,50 \text{ nmol/l·s}$; $R = -0,624$; $p = 0,003$), negu 20,10 $\mu\text{mol/l}$ Se^{2-} koncentracija. Šiuo atveju fermentas slopinamas mažiau ($I_{1/2} = 19,80 \text{ nmol/l·s}$; $R = -0,478$; $p = 0,002$). Vadinasi, selenido jonams, kaip ir sulfido jonams, taip pat būdingas apsauginis poveikis *in vitro*. Tačiau kyla klausimas, kuris jonas yra veiklesnis?

Norėdami palyginti S^{2-} ir Se^{2-} apsauginį poveikį δ -ALRD aktyvumui dviem galvijų kraujo bandinių grupėms, kuriose buvo labai maža natūrali švino

koncentracija (apie 0,001 $\mu\text{mol/l}$), pridėjome tiek pat – po 20,10 $\mu\text{mol/l}$ – druskų tirpalų: i pirmąją – Na_2S , i antrąją – K_2Se . I abiejų grupių bandinius dėjome švino acetato priedo, didindami Pb^{2+} jonų koncentraciją nuo natūralios iki 80,41 $\mu\text{mol/l}$, kad pasiektume inhibicijos

šulį ir jo pabaigą, ir matavome δ -ALRD aktyvumą. I Na^+ ir K^+ jonų poveikį neatsižvelgėme, nes kraujyje jų labai daug palyginti su dedamais mikromoliniais kiekiais, todėl ir įtakos δ -ALRD aktyvumui jie daryti negalėjo.



3 pav. Pb^{2+} koncentracijos įtaka δ -ALRD aktyvumui galvijų kraujyje *in vitro*: 1 – be selenido (Se^{2-}) priedo; 2 – su 20,10 $\mu\text{mol/l}$ selenido (Se^{2-}) koncentracija

Bandiniuose su S^{2-} priedu, didinant Pb^{2+} koncentraciją kraujyje nuo 0,001 $\mu\text{mol/l}$ iki 1,61 $\mu\text{mol/l}$, pradinis fermento aktyvumas (53,11 nmol/l·s) mažėja pereidamas mažą maksimumą (53,67 nmol/l·s, esant 0,02 $\mu\text{mol/l}$ Pb^{2+} koncentracijai) (4 pav., 1 kreivė).

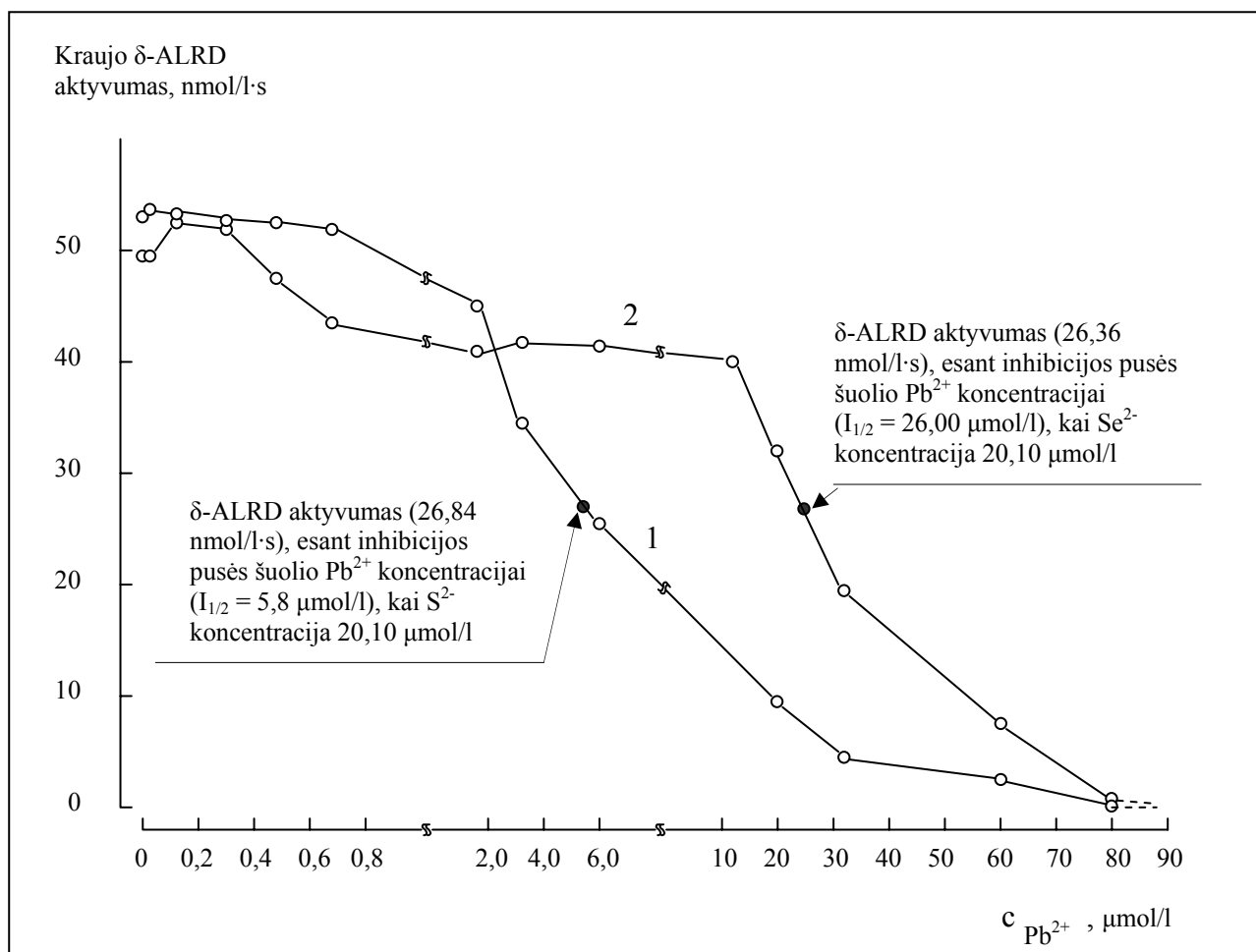
Toliau didinant švino koncentraciją kraujyje, δ -ALRD aktyvumas sparčiai mažėja, vyksta fermento inhibicija. Esant Pb^{2+} koncentracijai 80,41 $\mu\text{mol/l}$, fermento aktyvumas lieka tik 0,71 nmol/l·s. Grafiškai rasta δ -ALRD inhibicijos pusės šuolio Pb^{2+} koncentracija $I_{1/2}$ buvo lygi 5,80 $\mu\text{mol/l}$. Kitoje kraujo bandinių grupėje, su Se^{2-} priedu, didinant Pb^{2+} koncentraciją nuo 0,001 $\mu\text{mol/l}$ iki 12,06 $\mu\text{mol/l}$, pradinis fermento aktyvumas (49,23 nmol/l·s) mažėja pereidamas du ekstremumus – maksimumą (52,71 nmol/l·s, esant 0,12 $\mu\text{mol/l}$ Pb^{2+} koncentracijai) ir nežymų minimumą (40,88 nmol/l·s, esant 1,61 $\mu\text{mol/l}$ Pb^{2+} koncentracijai) (4 pav., 2 kreivė). Šie ekstremumai pasireiškia dėl bendrų kraujo savybių *in vitro* sąlygomis, nes jie beveik nepriklauso nuo jonų

prigimties (Ryselis ir kt., 2004). δ -ALRD inhibicijos šuolis vyksta pasiekus 12,06 $\mu\text{mol/l}$ Pb^{2+} koncentraciją ir baigiasi beveik visiškai nuslopinus fermento aktyvumą nuo 40,72 nmol/l·s iki 0,24 nmol/l·s, esant 80,41 $\mu\text{mol/l}$ Pb^{2+} koncentracijai. Grafiškai rasta $I_{1/2}$ buvo lygi 26,00 $\mu\text{mol/l}$ Pb^{2+} , esant inhibicijos pusės šuolio fermento aktyvumui 26,36 nmol/l·s.

Šios dvi priklausomybės leidžia palyginti selenido ir sulfido apsauginį poveikį kraujo δ -ALRD aktyvumui *in vitro*: fermento inhibicijos švino jonais šuolio postūmis didesnis idėjus i kraują Se^{2-} ($I_{1/2} = 26,00 \mu\text{mol/l}$ Pb^{2+}) ir mažesnis idėjus S^{2-} ($I_{1/2} = 5,80 \mu\text{mol/l}$ Pb^{2+}). Taigi fermentas švino jonais nuodijamas mažiau, kai kraujyje yra selenido, o ne sulfido. Ženklesnį apsauginį selenidų poveikį įrodo ir mažiau glaudus tarpusavyo ryšys tarp švino jonų koncentracijos ir fermento aktyvumo kraujo bandinyje su selenidu ($R = -0,777$; $p = 0,0001$) negu tie patys rodikliai kraujo bandinyje su sulfidu ($R = -0,795$; $p = 0,0001$). Taigi selenido anijono apsauginis poveikis

didesnis negu sulfido, nors abu anijonai ir pasižymi apsauginiu veiklumu *in vitro*. Tai patvirtina ir glaudus šių rodiklių koreliacinis ryšys ($R = -0,795$; $p = 0,0001$) bei

statistiškai patikimo skirtumo tarp abiejuose kraujo bandiniuose nustatyto fermento kiekio nebuvimas ($t = -1,087$; $p = 0,294$).



4 pav. Pb^{2+} priedų įtaka δ -ALRD aktyvumui galvijų kraujyje *in vitro*: 1 – su sulfido (S^{2-}) 20,10 $\mu\text{mol/l}$ koncentracija; 2 – su selenido (Se^{2-}) 20,10 $\mu\text{mol/l}$ koncentracija

Išvados.

1. *In vitro* sąlygomis didelių Se^{2-} anijono koncentracijų poveikis galvijų kraujo fermentui δ -ALRD yra nuodingesnis negu S^{2-} , nes Se^{2-} anijono sukeltas inhibicijos šuolis įvyksta veikiant mažesnėms šio jono, kaip katalitinio nuodo, koncentracijoms negu S^{2-} .

2. δ -ALRD inhibicijos švino katijonais šuolio postūmis daugiataškėje δ -ALRD aktyvumo priklausomybėje nuo Pb^{2+} koncentracijos priklauso nuo S^{2-} jonų priedo – kai jo nėra, Pb^{2+} katijonai greičiau sukelia šio fermento inhibiciją, negu esant veikliam S^{2-} priedui galvijų kraujyje. Šiuo atveju δ -ALRD visiškai neinhibuojamas – sulfido jonai pasižymi apsauginiu poveikiu *in vitro*.

3. δ -ALRD inhibicijos švino katijonais šuolio postūmis daugiataškėje šio fermento aktyvumo priklausomybėje nuo Pb^{2+} koncentracijos priklauso ir nuo Se^{2-} jonų priedo: kai jo nėra, Pb^{2+} katijonai greičiau sukelia fermento inhibiciją, kai Se^{2-} priedo galvijų kraujyje yra, selenido jonai pasižymi apsauginiu poveikiu *in vitro*.

4. δ -ALRD inhibicijos švino katijonais šuolio postūmis daugiataškėje δ -ALRD aktyvumo priklausomybėje nuo Pb^{2+} koncentracijos didesnis pridėjus į kraują Se^{2-} ir mažesnis su S^{2-} . Fermentas Pb^{2+} jonais nuodijamas mažiau, kai kraujyje yra Se^{2-} , o ne S^{2-} . Selenido anijono apsauginis poveikis didesnis už sulfido, nors abiem anijonams būdingas apsauginis veiklumas *in vitro*.

5. Jonų įtaką kraujo δ -ALRD aktyvumui galima numatyti, palyginti ir įvertinti *in vitro* sąlygomis pagal fermento inhibicijos šuolio postūmį (katalitinio nuodo koncentracijos dydį, atitinkantį fermento aktyvumo spartaus sumažėjimo šuolio pusę inhibicijos metu).

Literatūra

1. S. Sassa, H. Fujita and A. Kappas. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: A. Kotyk, J. Skoda, V. Paces and V. Kostka. Highlights of modern biochemistry. Utrecht, 1989. Vol. 1. P. 329.
2. Julio C. M., Skares M. Sc., Vanderlei Folmer M. Sc. and Joao B. T. Rocha. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzyme in mice. Toxicology Letters. 2003. N. 139.

Issue 1. P. 55.

3. Navarro-Alarcon M., Lopes-Martnez M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with diferent diseases. *Sci Total Environ.* 2000. N. 249. P. 347.

4. S. Ryselis, D. Baranauskienė, O. Abdrachmanovas, A. Stepaniukas. 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.

5. Berlin A., Schaller K. H. European standardised method for the determination of delta-aminoleavulinic acid dehydrataze activity in blood. *Z. Klin. Chem. Biochem.* 1974, N. 12. P. 389.

6. S. Ryselis, D. Baranauskienė, O. Abdrachmanovas, A. Stepaniukas, K. Šerėnas. Seleno ir švino įtaka kraujo δ-aminolevulino rūgšties dehidratazės aktyvumui *in vitro*. *Veterinarija ir zootechnika.* 2004. T 28(50). P. 18.