

Г. Т. АДУНЦ, Г. К. ПАРСАДАНЯН, Л. П. ТЕР-ТАТЕВОСЯН

## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАДМИЯ НА АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ БЕЛЫХ КРЫС В ХОДЕ ОНТОГЕНЕЗА

Исследования ряда авторов [1, 3, 4, 8—10] свидетельствуют о том, что активность щелочной фосфатазы в тканях животного зависит от таких факторов, как физиологическое состояние животного, его возраст, тип питания и пр., т. е. деятельность фермента может изменяться под действием определенных регуляторов.

Наши исследования показали, в частности, что между активностью щелочной фосфатазы и уровнем адреналина существует определенная связь [2, 3]. Адреналин, и в особенности его дериваты дегидроадреналин и адренохром, в несколько раз повышают активность щелочной фосфатазы. Однако этих данных было еще недостаточно для объяснения механизма активации фермента. В ходе дальнейшей работы выяснилось, что тиоловые реагенты—пара-хлормеркурибензоат (*p*-ХМБ) и монойодацетат—резко усиливают деятельность фермента, в то время как цистеин подавляет ее [3, 5]. Из полученных данных вытекает, что уровень ферментативной активности находится в прямой связи с наличием соединений, обладающих тиоловыми группами. Свободные SH-группы в реакционной среде подавляют активность фермента; этот эффект снимается тиоловыми реагентами.

Поскольку известно, что  $Cd^{+2}$  является парализатором тиоловых ферментов [6], связывающим SH-группы, мы задались целью изучить влияние этих ионов на активность щелочной фосфатазы белых крыс в раннем онтогенезе.

Изучалась активность щелочной фосфатазы тонкого кишечника и почек эмбрионов белых крыс на последней неделе беременности и у 1-, 10- и 21-дневных крысят. Для сравнения исследовалась активность щелочной фосфатазы в указанных органах взрослых и беременных крыс.

Активность щелочной фосфатазы определялась по методу Лоури и Лопеза [7]. Инкубация проводилась в медуналовом буфере рН 9,6, субстратом служил  $\beta$ -глицерфосфат натрия. Длительность инкубации составляла 15 мин при 37°C. Активность фермента выражали в мг отщепившегося неорганического фосфата на 1 г свежей ткани.

Отщепившийся неорганический фосфат сам по себе подвержен значительным изменениям в ходе онтогенеза. Так, определяемая активность фермента слизистой оболочки кишечника, будучи весьма высокой у эмбриона (рис. 1), оказывается гораздо ниже у новорожденных крысят. Затем она вновь начинает нарастать и в 20-дневном возрасте оказывает-

ся на уровне, даже несколько превосходящем таковой у зародыша. В почках выявляемая активность щелочной фосфатазы на ранних этапах онтогенеза вплоть до 10-го дня постэмбрионального развития не превышает 2 мг Р/г ткани. К 20-му дню этот показатель уже достигает 6 мг/г, а у взрослых крыс—19 мг/г.

При изучении влияния возрастающих концентраций ионов кадмия на активность щелочной фосфатазы слизистой кишечника было установ-

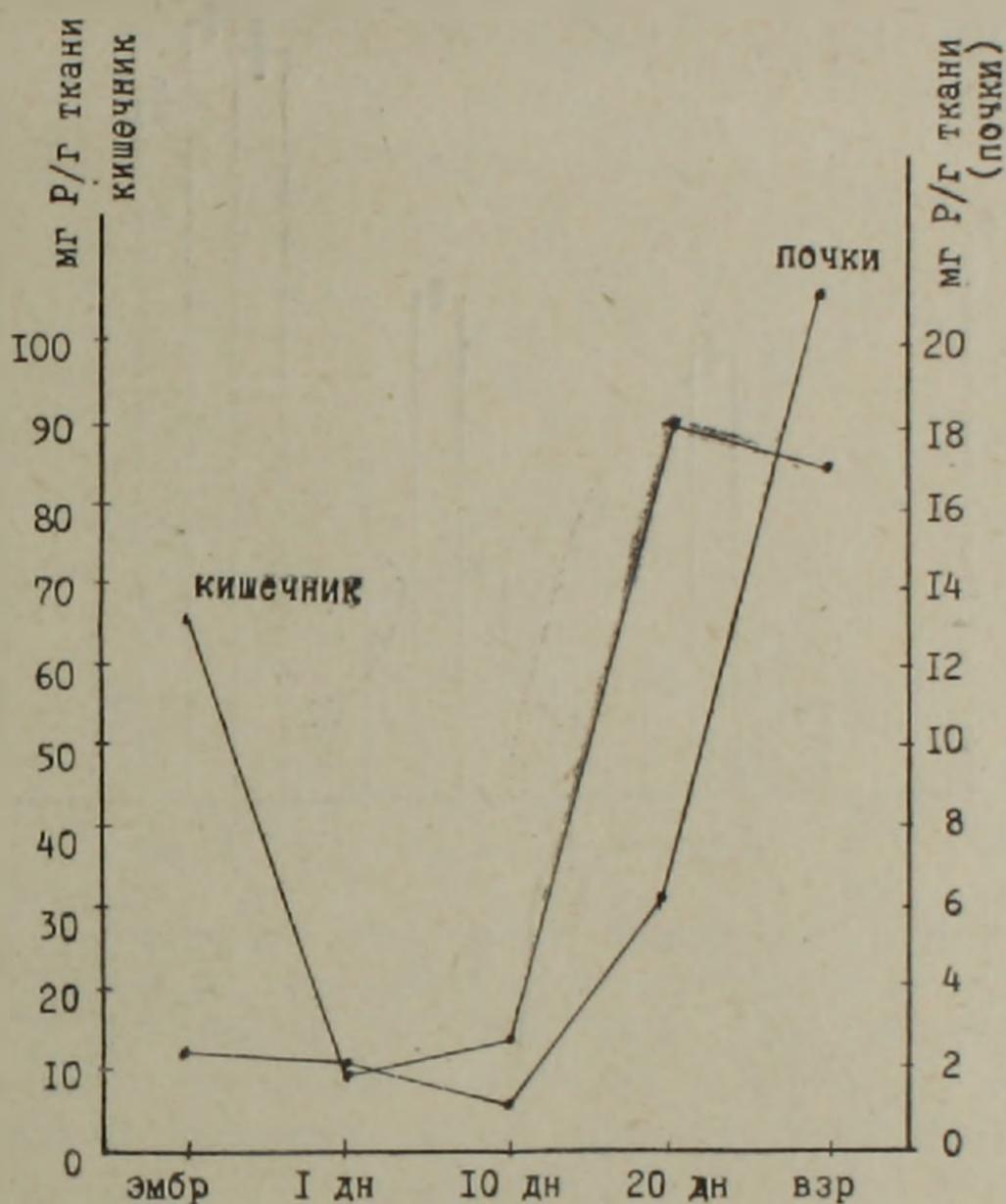


Рис. 1. Динамика активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки тонких кишок и почек в ходе онтогенеза белых крыс.

лено (рис. 2), что у эмбрионов фермент довольно резистентен к ионам этого металла в концентрациях до  $10^{-3}$  М, увеличение концентрации до  $10^{-2}$  М приводило к снижению активности фермента более чем в 3 раза. В то же время наблюдалась некоторая тенденция к повышению активности слабыми концентрациями ( $10^{-4}$  М)  $\text{Cd}^{+2}$ .

У новорожденных крысят концентрация ионов кадмия  $10^{-4}$  М, и особенно  $10^{-3}$  М, вызывает отчетливое повышение активности щелочной фосфатазы: в 5 раз по сравнению с контролем. Даже  $10^{-2}$  М Cd не снижает активности фермента.

Аналогичная картина наблюдалась и у 10-дневных крысят. Однако у трехнедельных, как и у взрослых животных, кадмий в концентрациях  $10^{-4}$  —  $10^{-3}$  М существенно не влияет на активность фермента и лишь ударные дозы— $10^{-2}$  М  $\text{CdCl}_2$  в среде—приводят к резкому подавлению ее.

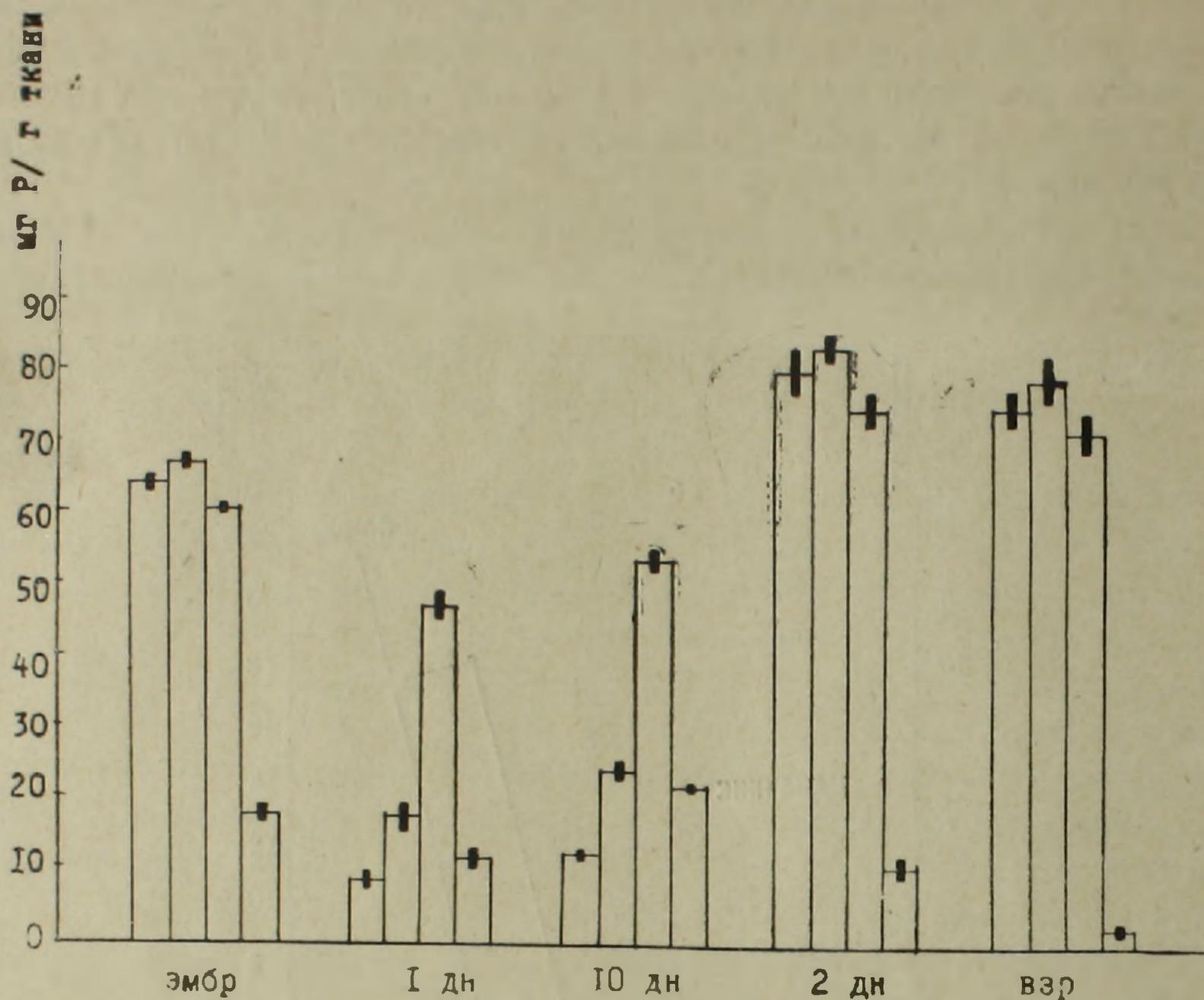


Рис. 2. Действие ионов кадмия на активность щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника в ходе онтогенеза. В каждой возрастной группе: I столбик—реакционная смесь без кадмия. II—IV столбики—в реакционной смеси имеется кадмий в концентрациях от  $10^{-4}$  до  $10^{-2}$  М соответственно. Черные столбики—среднее отклонение среднего арифметического.

Щелочная фосфатаза почек характеризуется примерно теми же свойствами (рис. 3), что и кишечная. У эмбрионов ее активность относительно невысока (2,3 мкг Р/г ткани) и неуклонно снижается при увеличении содержания ионов кадмия в среде. В итоге активность фермента при наличии в реакционной смеси кадмия в концентрации  $10^{-3}$  М оказывается равной лишь 0,26 мг Р/г ткани. У новорожденных крысят вплоть до 20-го дня послеутробного развития щелочная фосфатаза явно активизируется ионами кадмия в концентрациях  $10^{-4}$  и особенно  $10^{-3}$  М. У 20-дневных крысят еще наблюдается определенная тенденция к повышению активности фермента при добавке разведенного раствора  $\text{CdCl}_2$  ( $10^{-4}$  М), однако у взрослых животных та же концентрация не влияет, а более высокие концентрации ( $10^{-3}$  —  $10^{-2}$  М) значительно подавляют активность щелочной фосфатазы почек.

Поскольку при беременности имеют место определенные сдвиги в обмене веществ, было интересным проследить и за действием ионов кадмия на активность щелочной фосфатазы в условиях данного физиологического состояния организма.

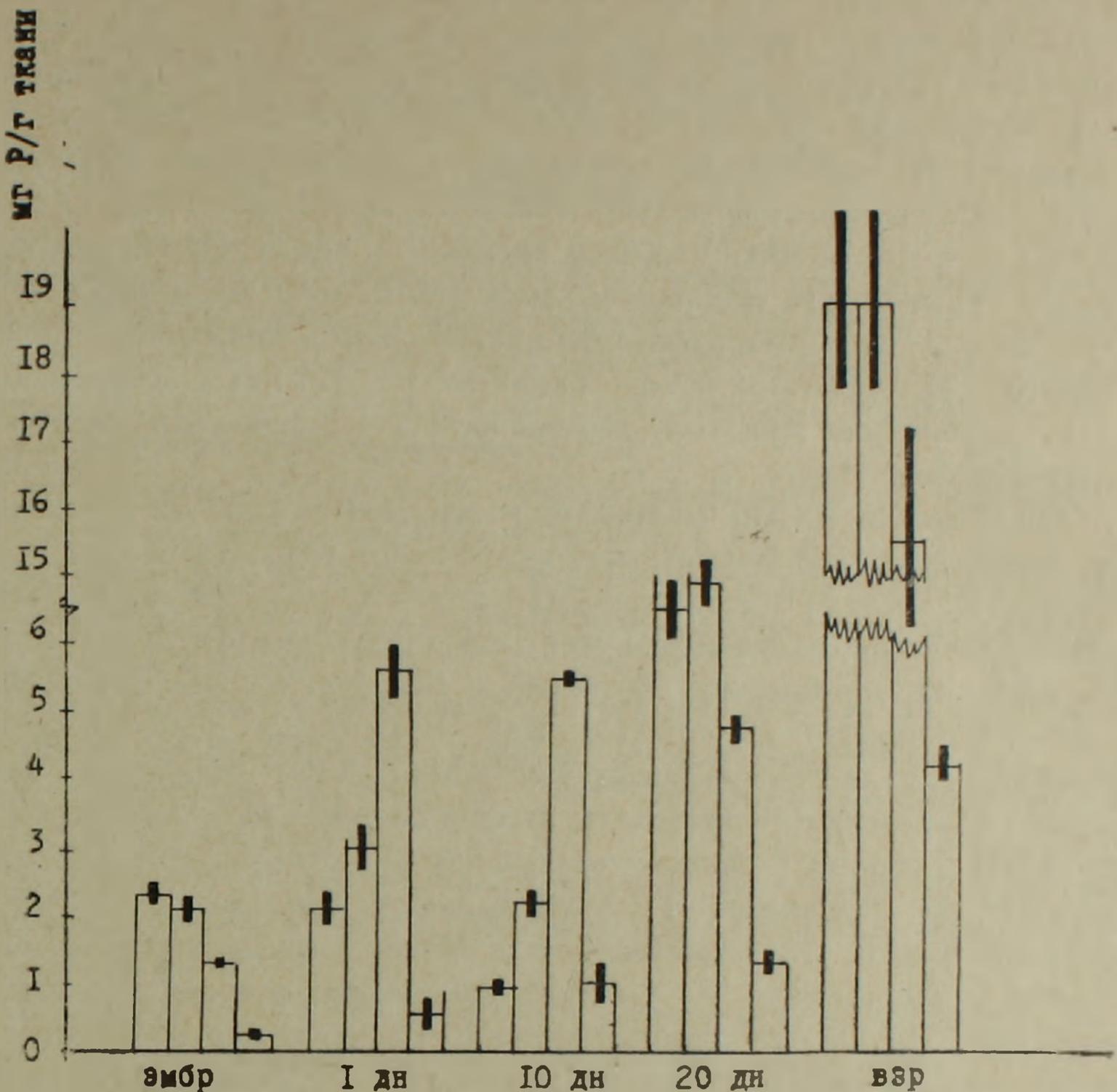


Рис. 3. Действие ионов кадмия на активность щелочной фосфатазы почек в ходе онтогенеза. Обозначения те же, что и на рис. 2.

Таблица 1

Влияние ионов кадмия на щелочную фосфатазу почек и кишечника в норме и при беременности у белых крыс

Ткань		Физиологическое состояние			
		Cd <sup>++</sup> в реакционной среде, М			
		0	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>
Слизистая оболочка кишечника	Норма	75,0	79,0	70,8	2,3
	M±	2,6	3,3	2,5	0,5
	Беременность	47,4	45,7	38,5	1,7
	M±	1,8	1,3	1,6	0,6
Почки	Норма	19,0	19,0	15,6	4,0
	M±	1,3	1,3	1,4	0,2
	Беременность	18,7	18,5	10,3	3,9
	M±	1,1	1,1	1,0	0,5

По данным, приведенным в табл. 1, можно заключить, что щелочная фосфатаза почек как беременных, так и контрольных животных в целом однозначно реагировала на повышение ионов кадмия в реакционной среде. Кроме того, абсолютная величина активности фермента при беременности также практически не отличается от контрольных величин. В то же время щелочная фосфатаза слизистой кишечника в норме проявляет более чем в 1,5 раза большую активность, чем в условиях беременности. Как и в почках, активность щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника нормальных и беременных крыс снижается в присутствии  $10^{-3}$  М  $\text{CdCl}_2$ . При концентрации же  $10^{-2}$  М как у небеременных, так и у беременных животных деятельность этого фермента почти полностью ингибируется.

Как известно, многими авторами утверждается наличие Zn в активном центре щелочной фосфатазы. Так, Симпсон и др. [11] показали, что щелочная фосфатаза *E. coli* содержит 4 атома Zn на молекулу фермента, причем одна пара стабилизирует структуру фермента, а вторая выполняет каталитическую функцию. Щелочная фосфатаза крыс также активизируется цинком [13]. Как нами было показано ранее, активный центр щелочной фосфатазы блокируется SH-соединениями, причем это, возможно, происходит за счет связывания цинка активного центра SH-группами тиоловых соединений [5]. Известно, что блокировка и удаление Zn, связанного с белками, может происходить за счет образования хелатных комплексов между меркаптогруппами комплексонов типа пенициллина и N-ацетилпенициллина и двухвалентными металлами (Hg, Cd, Zn), соединенными с молекулой белка [12]. Используемый нами кадмий, по-видимому, конкурируя с Zn активного центра фермента, связывает в той или иной степени меркаптосоединения, блокирующие активный центр щелочной фосфатазы.

В раннем онтогенезе (у 1—20-дневных крысят) в нормальных условиях часть ферментативной активности, по-видимому, замаскирована вследствие образования комплекса между меркаптосоединениями, играющими роль своеобразного регулятора активности и Zn активного центра фермента. У взрослых животных, вероятно, уже меньшая часть молекул фермента связана с комплексами, благодаря чему и кадмий в концентрациях  $10^{-4}$  —  $10^{-3}$  М не оказывает столь явного действия. Снижение активности фермента у всех возрастных групп при наличии в реакционной среде  $10^{-2}$  М  $\text{CdCl}_2$  говорит о том, что при столь высокой концентрации ионов металла, очевидно, имеют место неблагоприятные конформационные изменения структуры фермента, отражающиеся на уровне его активности. Выяснение природы меркаптосоединения, связывающего Zn активного центра щелочной фосфатазы, будет благоприятствовать выяснению механизма регуляции и саморегуляции активности щелочной фосфатазы высших животных в течение их индивидуального развития.

Գ. Թ. ԱԳՈՒՆՑ, Հ. Կ. ՓԱՐՍԱԳԱՆՅԱՆ, Լ. Պ. ՏԵՐ-ԹԱԳԵՎՈՍՅԱՆ

## Cd-ԻՈՆԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՀԻՄՆԱՅԻՆ ՖՈՍՓԱՏԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ ՕՆՏՈԳԵՆԵԶՈՒՄ

## Ա մ փ ո փ ու մ

Առնետների հյուսվածքների հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը նրանց զարգացման ընթացքում զգալի փոփոխության է ենթարկվում: Սաղմի և նորածին առնետների երիկամի հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը աննշան է: Սակայն օնտոգենեզի զարգացման ընթացքում ֆերմենտի ակտիվությունը աստիճանաբար բարձրանում է:

Սաղմի բարակ աղիքների ֆոսֆատազայի ակտիվությունն իր զարգացման վերջին շրջանում բարձր աստիճանի է հասնում:

Հետծննդյան շրջանում նկատվում է ֆերմենտի ակտիվության խիստ անկում, բայց 20 օրական և հասուն կենդանիների մոտ ֆերմենտի ակտիվությունը նորից բարձրանում է:

Բարակ աղիքների լորձաթաղանթի և երիկամների հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը հետծննդյան շրջանում զգալի բարձրանում է:

Cd-իոնի ազդեցության տակ ( $10^{-4}$ — $10^{-3}$  մոլ): Հասուն կենդանիների մոտ Cd-ի ազդեցությունը թույլ է:

Հղի կենդանիների աղիքներում հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը՝ նորմայի նկատմամբ ցածր է, իսկ երիկամներում հղի և ոչ հղի կենդանիների մոտ նույնն է:

Cd-ի ազդեցությունը հիմնային ֆոսֆատազայի վրա երկու հյուսվածքներում էլ հղի և կոնտրոլ կենդանիների մոտ միևնույնն է:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адунц Г. Т. Вопросы биохимии. 2, 1961.
2. Адунц Г. Т., Саркисян Л. В. Вопросы биохимии, 3, 115, 1963.
3. Адунц Г. Т. Изв. АН АрмССР (биолог. н.), 17, 6, 1964.
4. Адунц Г. Т., Саркисян Л. В. Изв. АН АрмССР (биолог. н.), 17, 10, 51, 1964.
5. Адунц Г. Т. Биологический журнал Армении, 19, 3, 30, 1966.
6. Торчинский Ю. М. Успехи современной биологии, 55, 2, 161, 1963.
7. Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
8. Marsh J. B., Drabkin D. L. J. Biol. Chem., 168, 1, 61, 1947.
9. Moog F. Develop Biol., 3, 153, 1961.
10. Moog F. Feder. Proc. 21, 51, 1962.
11. Simpson R. T., Vale B. L. Ann. N. Y. Acad. Sci. 166, 2, 670, 1969.
12. Smith T. Radioisotopes, 19, 1, 21, 1970.
13. Ygbal M. Enzymol. biol. clin. 11, 5, 412, 1970.