● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ دوم، شمارهٔ ۴، ص ۱۸۲-۱۷۷، ۱۳۷۴

مقالهٔ پژوهشی

اثر کروم و کادمیوم بر فعالیت ایزوآنزیم‌های آلکالن فسفاتاز با اوزان مولکولی سبک و سنگین در موش صحرایی

دکتر سیدعلی اصغر مشتاقی[1] و احمد سلطانی کوپائی[2]

خلاصه

هدف از انجام تحقیق حاضر مطالعه اثرات سمی کروم و کادمیوم بر فعالیت دو ایزوآنزیم سبک و سنگین آلکالن فسفاتاز می‌باشد که به صورت آزمایش‌های *in vivo* و *in vitro* صورت گرفته است. تجویز خوراکی و همچنین داخل صفاقی کلرور کادمیوم و کلرور کروم منجر به کاهش چشمگیر فعالیت الکالن فسفاتاز سرم موش‌های مورد آزمایش بمیزان ۲۱/۵ و ۲۵/۵ درصد شد. با استفاده از روش کروماتوگرافی از نوع ژل فیلتراسیون مشخص گردید که تزریق کلرورکادمیوم و کلرور کروم به ترتیب منجر به افزایش ایزوآنزیم سنگین به میزان ۱۳۸ و ۳۳۳ درصد و کاهش ایزوآنزیم سبک به میزان ۳۰ و ۴۰ درصد می‌گردد. آزمایش‌های *in vitro* نشان داد که کلرورکادمیوم و کلرورکروم هر دو منجر به کاهش فعالیت تام سرم شده و سبب مهار فعالیت آنزیم می‌گردند. فراکشته کردن آنزیم کاهش یافته، نشان داد که فعالیت دو ایزوآنزیم سبک و سنگین کم شده و مهار آنزیم توسط کادمیوم و کروم از نوع رقابتی است. تغییرات فعالیت ایزوآنزیم سنگین الکالن فسفاتاز در ارتباط با مسمومیت با کروم و کادمیوم در این تحقیق بحث شده است.

واژه‌های کلیدی : کروم، کادمیوم، ایزوآنزیم، الکالن فسفاتاز

مقدمه

بیش از ۶۰ سال از کشف فسفاتازها می‌گذرد و تاکنون مطالعات بسیاری در ارتباط با تغییرات غلظت این آنزیم‌ها در اختلالات مختلف پاتوفیزیولوژیکی صورت گرفته است. وجود ایزوآنزیم‌های اختصاصی از قبیل ایزوآنزیم روده‌ای،

۱ـ دانشیار گروه بیوشیمی بالینی ۲ـ فوق لیسانس بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی اصفهان

استخوانی و کبدی خود بر اهمیت این آنزیم می‌افزاید. همچنین از برخی ایزوآنزیم‌های این آنزیم نظیر ایزوآنزیم ریگان (Regan) در سرطان کولون (۱۷) و ایزوآنزیم ناگائو(Nagao) در شناسایی کارسینومای پرده جنب و پانکراس (۱۸) به عنوان شاخص غده سرطانی استفاده می‌شود.

افزایش فعالیت غیرطبیعی فرمی از الکالن فسفاتاز در ناراحتی‌های انسدادی کبد توسط تعدادی از پژوهشگران گزارش شده است. این فرم از آلکالن فسفاتاز که توسط روش‌های مختلف بیوشیمیایی جدا شده است دارای وزن مولکولی در حدود ۴۰۰ کیلودالتون بوده و الکالن فسفاتاز با وزن مولکولی سنگین یا high relative molecular weight (High-Mr) نامیده می‌شود (۸).

از طرفی اهمیت عناصر کمیاب بعلت تأثیر آنها بر روی متابولیسم طبیعی بافت‌ها مورد توجه دانشمندان این رشته قرار گرفته است و گزارش‌های متعددی حاکی از ضروری بودن بعضی از عناصر مانند آهن (۹)، نیکل (۱۶)، روی (۱۲)، کروم (۱۳) و مضربودن پاره‌ای از آنها نظیر کادمیوم (۱۴) و آلومینیوم (۱۵) جهت انجام واکنش‌های بیوشیمیایی برای انسان و حیوان وجود دارد. با توجه به گسترش تکنولوژی که موجب تغییرات قابل توجهی در محیط زیست و پوسته زمین گردیده است آلودگی آب و مواد غذایی با عناصر مختلف می‌تواند اثرات ناخوشایندی بر عملکرد دستگاه‌های مختلف بدن گذاشته و عوارض مختلفی را در این زمینه بوجود آورد. از طرفی تحقیقات گذشته نیز نشان داده است که فعالیت ایزوآنزیم الکالن فسفاتاز با وزن مولکولی سنگین در بیماران مبتلا به سرطان کبد (۱۰) و همچنین در هنگام مصرف استروئیدها (۱۱) افزایش می‌یابد که خودنشان دهندهٔ درگیر شدن کبد در این فرایند می‌باشد.

در این تحقیق اثرات کروم و کادمیوم بر فعالیت الکالن فسفاتاز تام سرم و همچنین تغییرات احتمالی ایزوآنزیم‌های با وزن مولکولی سبک و سنگین در موش صحرایی به صورت *in vivo* در مرحله اول مورد مطالعه قرار گرفته است. ضمناً تأثیر این عناصر بر K_m ایزوآنزیم‌های مذکور با استفاده از مطالعات سینتیکی به صورت *in vitro* نیز بررسی شده است.

مواد و روش پژوهش

جهت انجام این تحقیق کلیه مواد شیمیایی مورد نیاز از کارخانه سیگما (Sigma) کشور آلمان خریداری شده است.

در انجام آزمایش‌های *in vivo* از موش نر صحرایی (Wistar) با نام علمی Rattus norvegicous allivius استفاده گردید. حیوانات از انستیتوپاستور ایران خریداری و تحت شرایط استاندارد از نظر درجه حرارت و نور نگهداری گردیدند. اثر کادمیوم و کلر به دو روش تزریقی و خوراکی بررسی گردید.

در روش اول در سه گروه ۶ تایی کلرورکادمیوم و یا کلرورکروم محلول در سرم فیزیولوژی به صورت درون صفاقی به میزان ۱ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن حیوان به مدت ۶۰ روز و به حیوانات گروه شاهد سرم فیزیولوژی تزریق گردید. در روش دوم سه گروه ۵تایی موش صحرایی انتخاب و اثرات کادمیوم و کروم به صورت خوراکی بر فعالیت الکالن فسفاتاز تام سرم و ایزوآنزیم‌های با وزن مولکولی سبک و سنگین مورد مطالعه قرار گرفت. این گروه از موش‌ها تحت تجویز خوراکی کادمیوم و کروم به میزان ۱۰۰ppm روزانه به مدت ۶۰ روز قرار گرفتند. پس از اتمام دوره آزمایش موش‌ها توسط اتر بیهوش و حفره شکمی و قفسه صدری آنها باز شده و از قلب خون‌گیری بعمل آمد. سرم از لخته توسط سانتریفوژ جداگردید و پروتئین به روش لوری (۶) و الکالن فسفاتاز تام سرم به روش تغییر یافته بسی و همکاران (۳) اندازه‌گیری گردید. تعداد حیوانات در هر گروه آزمون و شاهد ۶ عدد بود. جهت انجام آزمایش‌های کروماتوگرافی یک میلی‌لیتر از سرم موش‌های گروه شاهد و یا آزمون با میزان پروتئین و الکالن فسفاتاز مشخص مورد استفاده قرار گرفت. سرم‌ها را بر روی ستون (۵۰×۹ سانتیمتر) حاوی Sephacry1-S300 برده و پس از جمع‌آوری فراکسیون‌های ۲ میلی‌لیتری توسط اضافه نمودن بافرتریس (۵۰ میلی‌مولار، pH=7.4) و با مشخصات (flow rate=10ml/h) فعالیت الکالن فسفاتاز و غلظت پروتئین هر یک از فراکسیون‌های جمع‌آوری شده اندازه‌گیری گردید و با گروه شاهد مقایسه شد. آزمایش‌های کروماتوگرافی در درجه حرارت آزمایشگاه صورت گرفت.

اثر عناصر کروم و کادمیوم بر فعالیت ایزوآنزیم‌های سبک و سنگین مطالعه و با استفاده از معادلات Lineweaver and Burk مقدار K_m آنها محاسبه گردید

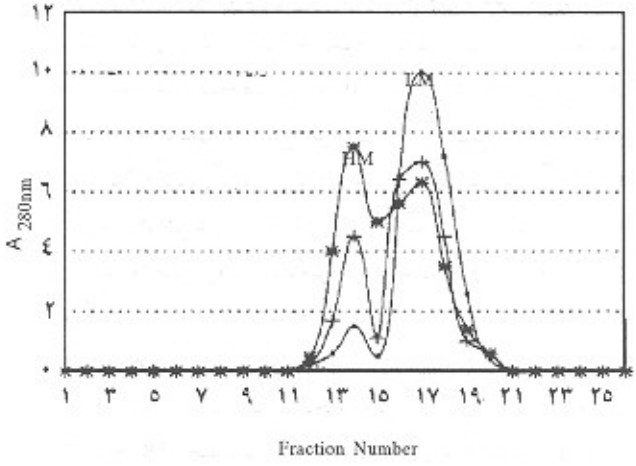
در تمام مراحل انجام این تحقیق از آب بدون یون (Deionized) جهت تهیه محلول‌های مختلف از قبیل سرم فیزیولوژی و محلول نمک‌های کلرورکادمیوم و کلرورکروم استفاده گردید. ظروف شیشه‌ای با محلول اسیدنیتریک ۵ درصد و پس از آن با آب مقطر و آب بدون یون شستشو شدند تا فاقد هر گونه آلودگی از نظر کادمیوم و یا کروم باشند.

نتایج

در گروه‌های خوراکی نتایج بدست آمده نشان داد که میزان الکالن فسفاتاز در سرم گروه کنترل ۱۰/۶±۷۳/۸ واحد بین‌المللی بر لیتر می‌باشد، در صورتی که گروه تحت تغذیه با کادمیوم و کروم دارای غلظت الکالن فسفاتاز تام سرم به ترتیب ۷/۲±۵۵/۱ و ۲/۷±۵۴/۲ می‌باشند که به ترتیب ۲۳ و ۲۷ درصد کاهش فعالیت را نشان می‌دهند. این گروه از موش‌ها تحت تجویز خوراکی کادمیوم و کروم به میزان ۱۰۰ppm روزانه بمدت ۶۰ روز قرار گرفتند.

در گروه تزریقی فعالیت الکالن فسفاتاز تام در گروه شاهد و تحت تزریق با کادمیوم و کروم به ترتیب ۱۰/۱±۷۰/۹، ۲/۷±۵۷/۲، ۲/۷±۵۴/۱ واحد بین‌المللی بود که نشان‌دهنده کاهش فعالیت الکالن فسفاتاز در گروه کادمیوم و کروم به ترتیب ۲۰ و ۲۴ درصد است.

در مرحله بعد سرم موش‌های تحت تزریق با کادمیوم و کروم که میزان پروتئین و الکالن فسفاتاز آنها مشخص گردیده بودند، بوسیله ژل فیلتراسیون، کروماتوگرافی گردیدند. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که فعالیت ایزوآنزیم با وزن مولکولی سنگین در اثر تزریق ۱ میلی‌گرم کلرور کادمیوم و یا کلرور کروم به میزان ۱۳۸ و ۳۳۳ درصد نسبت به شاهد افزایش و فعالیت ایزوآنزیم الکالن فسفاتاز با وزن مولکولی سبک در همین مدت به ترتیب به میزان ۳۰ و ۴۰ درصد کاهش یافته است (نمودار ۱).



● (سرم کنترل) ، + (کادمیوم) ، * (کروم)

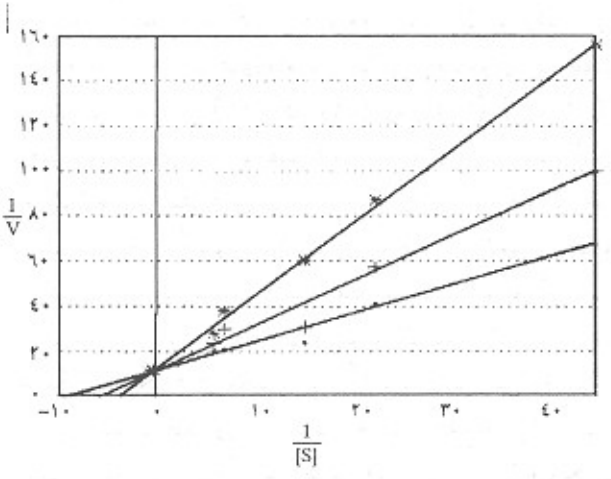
نمودار ۱ : *اثر کادمیوم و کروم بر فعالیت ایزوآنزیم‌های با اوزان مولکولی سنگین و سبک در موش‌های صحرایی*

آزمایش‌های *In vitro*

اثرات غلظت‌های مختلف کادمیوم و کروم بر فعالیت الکالن فسفاتاز تام سرم و همچنین ایزوآنزیم‌های با وزن مولکولی سنگین و سبک به طریق *in vitro* مطالعه و پس از آن K_m ظاهری در هر سه مورد تعیین گردید.

افزایش غلظت‌های میکروگرمی کادمیوم به لوله‌های آزمایش حاوی الکالن فسفاتاز سبب گردید که فعالیت آنزیم نسبت به کنترل بین ۲۴/۹-۱۷/۹ درصد کاهش یابد.

میزان K_m ظاهری مربوط به تأثیر کادمیوم و کروم هم غلظت با منیزیم بر محیط آزمایش ۰/۸، ۰/۴ و ۰/۲۵ میلی‌مولار بدست آمد که با توجه به افزایش K_m ظاهری و عدم تغییر V_{max} مشخص می‌گردد که مهار آنزیم توسط عناصر فوق مهار رقابتی می‌باشد (نمودار ۲).

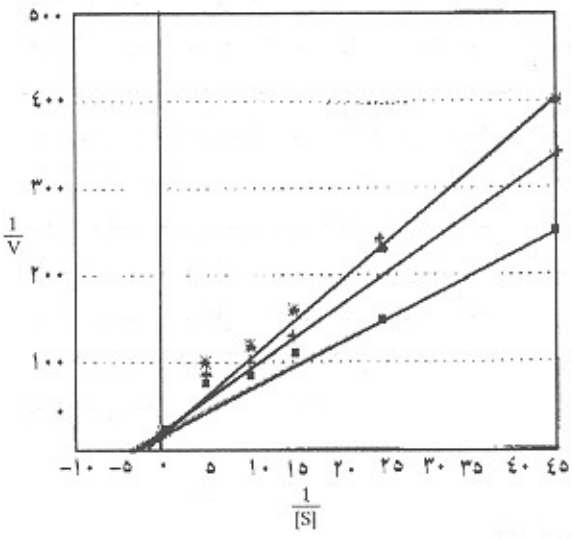


● (سرم کنترل) ، + (سرم + کادمیوم) ، * (سرم + کروم)

نمودار ۲ : *اثر کادمیوم و کروم بر K_m ظاهری الکالن فسفاتاز سرم موش صحرایی*

در مرحله بعد ایزوآنزیم‌های با وزن مولکولی سنگین و سبک به طریقه‌ای که گفته شد جدا گردیدند و تأثیر کروم و کادمیوم مجدداً بر فعالیت آنها محاسبه و K_m ظاهری و نوع مهارکنندگی آنها مشخص گردید.

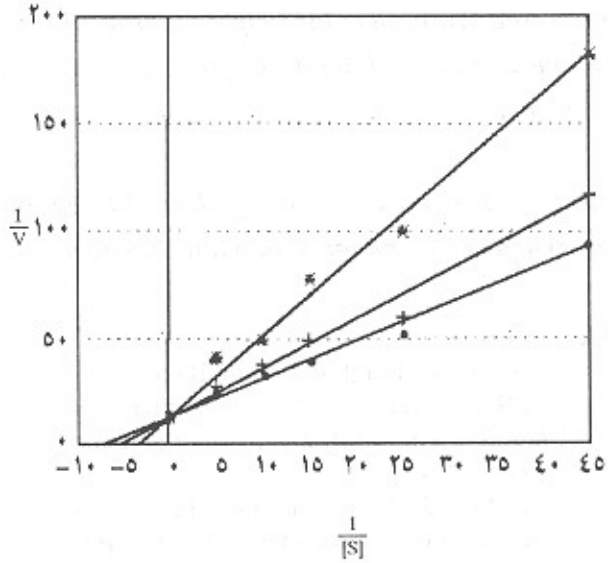
مقایسه K_m ظاهری آنزیم قبل و بعد از اثر کادمیوم و کروم روی ایزوآنزیم سنگین به ترتیب ۰/۱۳۳، ۰/۱۶۶ میلی مولار است که افزایش K_m ظاهری و عدم تغییر K_m ایزوآنزیم سبک وزن مبین مهار رقابتی آنزیم است (نمودار ۳).



●(سرم کنترل)، +(سرم+کادمیوم)، *(سرم+کروم)

نمودار ۳: اثر کادمیوم و کروم بر K_m ظاهری ایزوآنزیم High-Mr الکالن فسفاتاز سرم موش صحرایی *(in vitro)*

K_m ظاهری حاصل از دو عنصر فوق قبل و بعد از افزودن آنها به محیط واکنش حاوی ایزوآنزیم سبک به ترتیب ۰/۱۲۵، ۰/۱۶۶ و ۰/۲۵ میلی‌مولار است که نشان دهنده مهار رقابتی است (نمودار ٤).



● (سرم کنترل) ، + (سرم + کادمیوم) ، * (سرم + کروم)

نمودار ۴: اثر کادمیوم و کروم بر K_m ظاهری ایزوآنزیم Low-Mr الکالن فسفاتاز سرم موش صحرایی *(in vitro)*

بحث و نتیجه گیری

مسمومیت با عناصر کروم و کادمیوم در افراد می تواند منجر به بروز اختلالات مختلف پاتوفیزیولوژیکی گردد اگر چه کروم در غلظت‌های بسیار کم برای انجام واکنش‌های مختلف بیوشیمیایی خصوصاً در تحمل گلوکز اهمیت بخصوصی دارد ولی در غلظت‌های بالا می‌تواند در مراحل مختلف بیوشیمیایی همچون تداخل در متابولیسم آهن و یا انتقال به جریان خون از مایع دیالیز به داخل خون در بیماران همودیالیز (۱،۲) ایجاد عوارض مختلف نماید. کادمیوم عنصر سمی است و می تواند در بدن ایجاد عوارض مختلف، خصوصاً کلیوی (١٤) نماید.

علاوه بر عوارض فوق نتایج حاصل از این تحقیق نشان م .دهد تزریق درون صفاقی کروم و کادمیوم روزانه بمدت ٦٠ روز منجر به کاهش غلظت الکالن فسفاتاز تام سرم می‌گردد که خود می‌تواند بالقوه در متابولیسم بافت‌های مختلف تأثیر بگذارد.

همانگونه که قبلاً ذکر گردید فعالیت الکالن فسفاتاز تام سرم بستگی به فعالیت بافت‌های مختلف تولید کننده این آنزیم دارد که خصوصاً بافت استخوانی، کلیوی، روده‌ای و کبدی را می توان نام برد. کاهش در فعالیت الکالن فسفاتاز تام می‌تواند همراه با افزایش یکی از ایزوآنزیم‌ها و کاهش در ایزوآنزیم دیگرباشد که می‌توان با استفاده از روش‌های مختلف بیوشیمیایی آن را مشخص نمود.

مطالعات اخیر نشان داده است که در بیماری‌های مجاری صفراوی کبد غلظت ایزوآنزیم High-Mr الکالن فسفاتاز در سرم خون افزایش می‌یابد (۷). با استفاده از روش کروماتوگرافی در این تحقیق مشخص گردید که فعالیت این نوع ایزوآنزیم متعاقب تزریق داخل صفاقی کروم و یا کادمیوم نسبت به گروه شاهد، افزایش چشمگیری می‌نماید که خود مبین بروز اختلالات مجاری صفراوی در افرادی با افزایش غلظت کروم و یا کادمیوم می‌باشد.

مطالعات کوبایاشی Kobayashi و کیمورا Kimura (٥) نیز نشان داده است که تجویز خوراکی کادمیوم سبب کاهش فعالیت ایزوآنزیم‌های نوع استخوانی و روده‌ای الکالن فسفاتاز می‌شود، ولی آنان اشاره‌ای به بروز اختلالات صفراوی که باعث تغییر در فعالیت High-Mr الکالن فسفاتاز می‌گردد ننموده‌اند.

مطالعات Gettins و همکارانش (٤) نیز نشان داده است که ^{113}[Cd] می‌تواند در ساختمان الکالن فسفاتاز وارد شده و با عنصر روی که یک عنصر ضروری ساختمان الکالن فسفاتاز است تداخل نموده و منجر به کاهش فعالیت آنزیم الکالن فسفاتاز تام گردد که خود تأیید کننده نتایج حاصل از این تحقیق است.

بنظر می‌رسد گر چه کادمیوم و کروم از لحاظ بعضی از خواص شیمیایی با یکدیگر تفاوت دارند ولی چگونگی عمل آنها بر روی کاهش فعالیت الکالن فسفاتاز تام و سرم و افزایش غلظت High-Mr شباهت داشته باشد.

مطالعات سینیتیکی اثر کادمیوم و کروم بر فعالیت الکالن فسفاتاز تام سرم نشان می‌دهد که با توجه به افزایش K_m ظاهری متعاقب افزودن کادمیوم و کروم به محیط آزمایش و عدم تغییر V_{max} مهار آنزیم از نوع رقابتی باشد.

همچنین مطالعات *in vitro* تأثیر کادمیوم و کروم بر روی فعالیت هر یک از ایزوآنزیم‌های High-Mr و Low-Mr نشان می‌دهد که مهار آنزیم‌ها از نوع رقابتی است.

با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایش‌های *in vivo* و *in vitro* در این تحقیق می‌توان چنین استنباط کرد که عناصر کادمیوم و کروم می‌توانند تأثیر بسزایی بر کارکرد کبد گذاشته اختلالات مربوط به مجاری صفراوی را ایجاد نماید که نکته‌ای قابل توجه است. مخصوصاً در ارتباط با افرادی که در صنایع مختلف با این دو عنصر در غلظت‌های بالا سروکار دارند، این موضوع اهمیت دارد. در ارتباط با مکانیسم دقیق کاهش فعالیت ایزوآنزیم‌های مذکور بصورت *in vitro* در حضور کادمیوم و کروم لازم است تحقیقات بیشتری صورت گیرد تا مکانیسم دقیق آن روشن شود. تداخل و رقابت این عنصر با عنصر منیزیم که مورد لزوم برای فعالیت آنزیم الکالن فسفاتاز و ایزوآنزیم‌های مذکور می‌باشد را نباید از یاد برد.

Summary

The Effects of Chromium and Cadmium on the Activity of Alkaline Phosphatase Isoenzymes in Rats

AA. Moshtaghie, PhD[1]; and A. Soltani Koupaie, MS[2]

1. Associate Professor of Clinical Biochemistry 2. Clinical Biochemist Isfahan University of Medical Sciences and Health Services, Isfahan, Iran

The aim of this study was to investigate the toxic effects of chromium and cadmium on the activity of two isoenzymes of alkaline phosphatase in in vitro and in vivo experiments. Oral administration and peritoneal injection of $CdCl_2$ or $CrCl_3$ in rats reduced serum alkaline phosphatase by 21.5% and 25.5% respectively. At the same time high molecular weight alkaline phosphatase was elevated by 138% and 333%, and low molecular weight alkaline phosphatase was reduced by 30 or 40 percent. The in vitro experiments indicated that $CdCl_2$ or $CrCl_3$ lead to the reduction of activity of both isoenzymes of alkaline phosphatase.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 1995; 2(4): 177-182
Key Words: *Chromium, Cadmium, Isoenzyme, Alkaline phosphatase*

References

1. Ani M, Moshtaghie AA and Bazrafshan. M.R: Chromium interaction with iron metabolism in rat. *I.J. Medical* Science. 1990; 15: 43-45
2. Ani M and Moshtaghie AA. The effect of Chromium on Parameters related to iron metabolism. *Biol Trace Element Research* 1992; 32: 57-64.
3. Bessy OA, Lowry OH and brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five mililitre of serum. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
4. Gettins P and Coleman JE. ^{113}Cd N MR. Arsenate binding to Cd(II) alkaline phosphatase. *J Biol Chem* 1984; 259(8): 4987-4990
5. Kobeyashi S and Kimura M. Effect of orally administered Cadmium on alkaline phosphatase isoenzyme in rat tissue. *J Phaemacodyn* 1985; 8: 553-563
6. Lowry OH, Rosebrough NJ *et al.* Protein measurement with foline reagent. *J Biol*

Chem 1951; 193: 265-275
7. Maguire GA and Adnan H. An immuno-preciptation assay for high molecular weight alkaline phosphatase in human serum. *Ann Clin Biochem* 1989; 26(Pt 2): 151-157
8. Moreno J, Vera MC and Yorio MA. Method for determining high-Mr(Biliary) alkaline phosphatase in plasma. *Clin Chem* 1992; 38(2): 319-320.
9. Moshtaghie AA and Skillen AW. Study of the relationship between aluminium toxicity and hem synthesis. *I J Med Science* 1990; 15: 46-52.
10. Moshtaghie AA, Ani M and Soltani M. High Molecular Weight alkaline phosphatase as a tumor marker for liver cancer. *Clin Chem Enzyme Comms* 1995; 7: 9-16
11. Moshtaghie AA, Ani M and soltani M. Study of the effect of steroid hormones on serum high and low molecular weight alkaline phosphatase. *Indian J Pharmacology* 1995; 27: 152-155
12. Moshtaghie AA and Badii A. Comparative binding studies of zinc and iron to human serum transferrin. *I J Science Technology* 1996; 2.(In press).
13. Moshtaghie AA; Ani M and Bazrafshan MR. Comparative binding study of aluminium and chromium to human transferrin. Effect of iron. *Biological Trace Elem Research* 1992; 32: 39-46.
14. Moshtaghie AA; Raisi A and Goodarzi HA. Study of the effect of cadmium toxicity on serum proteins and its relation to proteinuria in rat. *JIAS* 1992; 4: 192-195.
15. Moshtaghie AA. Aluminium toxicity. A review in relation to chronic renal failure patients maintained on regular hemodialysis *Med J Islam Repub Iran* 1993; 7: 63-72.
16. Moshtaghie AA and Movahedian. A: The dual effects of Nickel on iron absorption by inverted gut Sac. *Clin Chem* 1992; 38: 1027-1027(abst).
17. Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzyme. *Clin Chem* 1982; 28: 2907-2916.
18. Nakayama T and Yoshida M. L-Leucine-Senstive heat stable alkaline phosphatase isoenzymes detected in a patient with pleurits carcinomatosa. *Clin Chem Acta* 1970; 30: 546-550.
19. Price P and Christopher P. Multiple forms of human serum alkaline phosphatase. Detections and quantitation. *Ann Clin Biochem* 1993; 30: 352-372.