

Из кафедры органической и биологической химии с основами
физиологической химии

Зав. кафедрой профессор, доктор Ф. Я. БЕРЕНШТЕЙН

ВЛИЯНИЕ КОБАЛЬТА НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ КРОВИ ЖИВОТНЫХ

Ассистент М. М. КИЧИНА

Учение о ферментах составляет центральный раздел современной биохимии. Создателем истинной биохимии и физиологии ферментов является И. П. Павлов. Автор изучал природу ферментов в условиях живого организма, в их связи с окружающей средой.

Ферменты, как биокатализаторы, участвуют в процессах обмена веществ, и, следовательно, играют важнейшую роль в жизни растений и животных.

Исходя из той важной роли, которая принадлежит микроэлементам в регуляции ферментативных процессов, изучение влияния кобальта на активность некоторых ферментов, представляет несомненный интерес. Это тем более важно в связи с тем, что кобальт характеризуется большой биологической активностью. Этот элемент необходим для роста и развития некоторых микроорганизмов, низших растений, а также играет положительную роль в повышении урожайности сельскохозяйственных культур и продуктивности животноводства.

Согласно данным Пейве и Берзиня эндемическое заболевание сельскохозяйственных животных (так называемая лизуха или сухотка), наблюдаемое в некоторых районах Латвии, связано с недостатком кобальта в почвах, а следовательно, и в растениях. Берзинь установил, что заболевшие животные быстро излечиваются при добавлении к корму хлористого кобальта. Автор рекомендует добавлять ежедневно к рациону крупного рогатого скота 10—40 мг хлористого кобальта, к рациону овец — 1,5—5 мг соли. В результате лечения вес животных, количество гемоглобина и эритроцитов в крови быстро восстанавливаются.

Аналогичное явление было изучено Ковальским в Щербаковском районе Ярославской области. Согласно исследованиям Ковальского и Чебаевской, кобальт способствует выздоровлению заболевших овец, при прибавлении 2—3 мг хлористого кобальта к корму животного.

Авторы установили, что в результате подкормок кобальтом привес опытных маток превышал привес контрольной группы на 100%, наблюдалось также увеличение количества гемоглобина, эритроцитов в крови, а в мышцах, печени, легких, щитовидной железе и других тканях обнаружено значительное накопление этого элемента.

Согласно данным Лемеш, в условиях Белоруссии подкормка поросят солями кобальта дает увеличение привеса на 10—45%. Подкожное введение солей кобальта курам ведет к возрастанию способности птиц к откорму и увеличению степени использования корма (Беренштейн, Тищенко, Шкляр).

Беренштейн и Школьник установили, что подкожные инъекции кроликам солей кобальта в небольших дозах ведут к уменьшению количества глюкозы, большие дозы, наоборот, увеличивают содержание глюкозы в крови.

Как утверждают Беренштейн и Шифрина, введение кроликам солей кобальта в дозе, соответствующей 1—2 мг чистого металла, значительно повышает гликолитическую активность крови; амилитическая же активность крови, как правило, понижается.

Беренштейн и Либенштейн показали, что подкожные инъекции солей кобальта собакам способствуют значительному уменьшению неорганического фосфора в крови, что, видимо, связано с усиленным образованием гексофосфорных эфиров и повышением гликолитической активности крови.

Ряд авторов изучали влияние кобальта на азотистый обмен в организме животных.

Всяких установила, что кобальт благоприятно влияет на ассимиляцию белковых веществ у овец.

Согласно данным Лемеш, прибавка кобальта к основному рациону ведет к повышенному накоплению азота в организме поросят. О положительном влиянии кобальта на белковый обмен свидетельствуют и данные Малайшкайте, которая установила, что подкормка хлористым кобальтом повышает усвоение азота у гусей и молодняка на 8—9%.

Соли кобальта уменьшают выделение с мочой витамина С и способствуют увеличению содержания тиамин в организме свиней (Беренштейн и Лемеш). Повидимому, действие солей кобальта на белковый обмен связано, по крайней мере, частично с угнетением кобальтом функции щитовидной железы (Шаркевич).

Итак, приведенный материал в значительной мере свидетельствует о роли кобальта в обмене веществ, что обусловлено его влиянием на ферментативные процессы.

Так, известно, что кобальт является активатором целого ряда ферментов таких как: пирофосфатаза, аргиназа, β — глицерофосфатаза, глицил-глицинпептидаза, дегидраза пировиноградной кислоты, сукциндегидраза, фосфоглюкомутаза, кишечная и костная фосфатаза, вместе с тем кобальт инактивирует уреазу (А. Р. Войнар).

По Беренштейну малые дозы кобальта повышают активность каталазы крови.

Согласно данным Хили, Чжэн, Сы-чжу, Мак-Эрлой (Healy, Cheng Sze Chum, Mc Erloy) при недостатке железа у *Neurospora* токсические концентрации кобальта подавляют активность каталазы, пероксидазы, сукцинодегидразы, дегидразы изолимонной кислоты, цитохромоксидазы, в то время, как активность дегидразы глюкозо-6-фосфата и редуктазы нитритов усиливается. Соли кобальта активируют действие карбоксипептидазы (Саито).

Наши исследования были направлены на изучение влияния сульфата кобальта на активность некоторых ферментов в крови собак и кроликов.

Мы изучали влияние кобальта на активность щелочной фосфатазы, холинэстеразы и карбоангидразы крови в опытах *in vivo* и *in vitro*.

В литературе, имевшейся в нашем распоряжении, мы не обнаружили почти никаких данных о влиянии кобальта на активность выше названных ферментов.

Мы встретили только данные Слесаревой, установившей, что при подкормке кроликов 20 γ кобальта *pro kilo* раз в сутки, активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови не изменяется.

Определение активности щелочной фосфатазы мы проводили методом Боданского. Активность холинэстеразы определяли по методу Правдич-Неминской.

Для определения активности карбоангидразы пользовались методикой профессора Б. А. Рашкована. Этот метод основан на определении количества CO_2 , выделившегося при разложении бикарбоната натрия 0,025 мл крови, смешанной с цитратно-фосфатной буферной смесью за 10 сек. (опыт). Определяют также количество CO_2 , выделившегося при тех же условиях, без добавки крови (контроль). Объемы газов приводят к нормальным условиям, а затем вычисляют коэффициент активности карбоангидразы.

Для этой цели от количества миллилитров CO_2 опыта вычитают количество миллилитров CO_2 контроля, и разницу делят на контроль.

Переходим к изложению результатов наших опытов по вопросу о влиянии кобальта на активность вышеуказанных ферментов *in vivo*.

Эти опыты проведены нами на 25-ти кроликах и 28-ми собаках. На каждом животном было поставлено по 5—8 опытов с интервалами между опытами в 10—15 дней. Кобальт в виде сернокислой соли вводили животным подкожно в дозах, соответствующих 0,05 мг, 0,5 мг, 1 мг, 2 мг, 5 мг чистого металла на килограмм веса. Исследование крови проводили натощак до введения микроэлемента и через 1, 2, 3 часа, а при определении активности щелочной фосфатазы у собак — также и через 4 часа после введения.

Следует отметить, что доза кобальта в 5 мг *pro kilo* у большинства собак вызывала интоксикацию. Через 5—15 минут после инъекции соли у животных начиналась рвота, дефекация, мочеотделение. Собаки довольно длительное время после введения (около часа) обнаруживали признаки беспокойства.

В таблицах №№ 1—6 мы приводим результаты некоторых опытов по вопросу об изменении активности щелочной фосфатазы, холинэстеразы и карбоангидразы в крови собак и кроликов.

Таблица № 1

Влияние сульфата кобальта на активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови собак

Активность фермента выражена в миллиграммах неорганического фосфора, отщепившегося 100 мл. сыворотки в течение 1 часа при температуре 37°C (единицы Боданского)

№№ опытов	Норма	Время после инъекции				Доза введенного CoSO_4 в расчете на чистый металл
		1 ч.	2 ч.	3 ч.	4 ч.	
114	4,31	3,83	2,87	4,79	3,83	Введено под кожу 0,05 мг кобальта <i>pro kilo</i>
115	7,18	6,70	3,83	7,66	5,75	
121	2,38	0,96	2,87	1,92	2,41	
90	4,31	1,43	2,70	0,96	2,88	Введено под кожу 0,5 мг кобальта <i>pro kilo</i>
92	4,78	2,40	1,90	4,31	4,31	
144	2,39	1,91	2,88	0,95	2,87	
99	1,92	1,91	2,40	1,68	1,92	Введено под кожу 1 мг кобальта <i>pro kilo</i>
126	5,57	1,86	2,87	3,83	1,86	
127	4,30	1,86	3,83	2,82	2,87	
128	2,87	1,91	1,91	2,87	3,60	
132	5,26	3,83	0,96	0,95	0,95	Введено под кожу 2 мг кобальта <i>pro kilo</i>
133	3,83	3,78	0,96	0,72	0,96	
136	1,91	0,95	0,48	0,95	—	

Продолжение таблицы № 1

№№ опытов	Норма	Время после инъекции				Доза введенного CoSO_4 в расчете на чистый металл
		1 ч.	2 ч.	3 ч.	4 ч.	
139	1,92	0,95	1,92	0,48	0	Введено под кожу 5 мг кобальта pro kilo
140	1,43	0,97	0,95	0,48	0	
142	4,55	1,62	2,87	0,49	1,44	

Таблица № 2

Влияние сульфата кобальта на активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови кроликов

Активность фермента выражена в миллиграммах неорганического фосфора, отщепившегося 100 мл. сыворотки в течение 1 часа при температуре 37°C (единицы Боданского)

№№ опытов	Норма	Время после инъекции			Доза введенного CoSO_4 в расчете на чистый металл
		1 ч.	2 ч.	3 ч.	
108	4,31	1,92	1,44	1,91	Введено под кожу 0,05 мг кобальта pro kilo
109	5,75	1,91	1,91	1,91	
110	2,87	1,01	1,92	0,95	
94	4,79	1,91	2,40	0,96	Введено под кожу 0,5 мг кобальта pro kilo
122	3,35	1,91	1,91	2,88	
135	8,34		0,96	1,43	
145	2,87	0,96	1,92	0,96	
98	2,40	0,96	1,45	2,39	Введено под кожу 1 мг кобальта pro kilo
102	6,70	4,79	4,79	4,78	
104	4,79	3,83	3,83	4,79	
111	6,70	—	1,92	1,91	Введено под кожу 2 мг кобальта pro kilo
112	6,70	3,83	2,88	1,92	
113	6,70	4,78	1,92	1,91	
117	7,66	1,92	3,35	2,87	
129	5,26	4,79	3,83	3,35	Введено под кожу 5 мг кобальта pro kilo
130	3,35	2,87	1,91	1,91	
131	6,21	5,74	2,38	3,83	

Таблица № 3

Влияние сульфата кобальта на активность холинэстеразы в сыворотке крови собак

Активность фермента выражена в % разрушенного ацетилхолинхлорида в течение 30 минут при температуре 38°C

№№ опытов	Норма	Время после инъекции			Доза введенного CoSO_4 в расчете на чистый металл
		1 час	2 часа	3 часа	
26	29,12	12,46	15,92	25,84	Введено под кожу 0,05 мг кобальта pro kilo
28	21,29	19,56	17,10	22,11	
37	16,01	12,01	13,92	10,73	

Продолжение таблицы № 3

№№ опытов	Норма	Время после инъекции			Доза введенного CoSO_4 в расчете на чистый металл
		1 ч.	2 ч.	3 ч.	
55	22,75	19,74	14,56	21,84	Введено под кожу 0,5 мг кобальта про kilo
51	38,22	38,22	14,29	29,39	
52	38,22	22,76	21,38	24,57	
60	16,38	14,38	15,10	14,74	Введено под кожу 1 мг кобальта про kilo
68	27,12	22,75	24,48	23,20	
77	26,99	21,84	20,20	20,84	
73	33,21	20,56	29,85	30,94	Введено под кожу 2 мг кобальта про kilo
80	24,75	23,75	20,0	24,75	
82	30,03	28,39	20,11	27,75	
30	29,12	25,84	28,48	25,73	Введено под кожу 5 мг кобальта про kilo
86	34,12	30,76	30,48	32,76	
88	40,90	34,58	37,85	40,90	

Таблица № 4

Влияние сульфата кобальта на активность коэнзимстеразы в сыворотке крови кроликов

Активность фермента выражена в процентах разрушенного ацетилацхолинэстеразы в течение 30 минут при температуре 38°C

№№ опытов	Норма	Время после инъекции			Доза введенного CoSO_4 в расчете на чистый металл
		1 ч.	2 ч.	3 ч.	
44	13,74	8,55	12,65	10,55	Введено под кожу 0,05 мг кобальта про kilo
45	13,01	10,28	9,10	14,01	
170	8,82	4,09	3,91	1,91	
53	13,38	13,92	—	8,19	Введено под кожу 0,5 мг кобальта про kilo
57	8,46	7,82	5,64	8,0	
83	8,82	7,82	7,64	7,28	
64	14,56	11,83	14,10	14,47	Введено под кожу 1 мг кобальта про kilo
84	11,55	11,28	7,28	10,55	
173	8,19	7,19	4,28	7,28	
174	10,92	5,46	5,28	5,46	
24	24,11	16,01	18,56	14,65	Введено под кожу 2 мг кобальта про kilo
31	17,01	13,01	7,28	8,28	
65	8,92	6,73	2,54	5,46	
66	10,83	7,28	4,55	6,37	Введено под кожу 5 мг кобальта про kilo
175	13,56	10,74	12,46	8,46	
177	12,46	5,37	9,10	10,74	
179	11,0	10,74	7,28	5,55	
180	10,55	10,92	3,37	10,92	
182	14,74	12,28	11,19	—	

Таблица № 5

Влияние сульфата кобальта на активность карбоангидразы крови собак
(коэффициент активности карбоангидразы)

№№ опытов	Норма	Время после инъекции			Доза введенного CoSO_4 в расчете на чистый металл
		1 ч.	2 ч.	3 ч.	
33	1,70	1,60	1,78	1,70	Введено под кожу 0,05 мг кобальта про kilo
39	1,77	1,58	1,70	1,70	
41	1,59	1,39	1,64	1,59	
43	1,58	1,44	1,71	1,44	
47	1,44	1,44	1,46	1,38	Введено под кожу 0,5 мг кобальта про kilo
155	1,55	1,50	1,53	1,41	
156	1,64	1,50	1,41	1,64	
158	1,33	1,10	1,30	1,37	
1	1,65	1,24	1,31	1,41	Введено под кожу 1 мг кобальта про kilo
2	1,04	1,0	1,04	1,45	
147	1,77	1,77	1,68	1,77	
9	1,96	2,0	1,76	1,80	Введено под кожу 2 мг кобальта про kilo
69	1,64	1,78	1,60	1,60	
149	1,86	1,83	1,53	1,83	
151	1,86	1,86	1,89	1,69	
13	1,55	1,57	1,70	1,63	Введено под кожу 5 мг кобальта про kilo
17	1,0	1,26	1,26	1,15	
20	1,44	1,41	1,40	1,51	
163	1,39	1,36	1,39	1,50	

Таблица № 6

Влияние сульфата кобальта на активность карбоангидразы крови кроликов
(коэффициент активности карбоангидразы)

№№ опытов	Норма	Время после инъекции			Доза введенного CoSO_4 в расчете на чистый металл
		1 ч.	2 ч.	3 ч.	
160	1,52	1,56	1,56	1,64	Введено под кожу 0,05 мг кобальта про kilo
161	1,52	1,56	1,64	1,56	
167	1,40	1,37	1,50	1,37	
6	1,90	1,81	2,29	1,84	Введено под кожу 0,5 мг кобальта про kilo
8	1,64	1,62	1,75	1,51	
18	1,33	1,52	1,33	1,33	
11	1,70	1,77	2,0	1,73	Введено под кожу 1 мг кобальта про kilo
50	1,56	1,54	1,56	1,54	
51	1,45	1,45	1,60	1,45	

№№ опытов	Норма	Время после инъекции			Доза введенного CoSO_4 в расчете на чистый металл
		1 ч.	2 ч.	3 ч.	
23	1,38	1,54	1,57	1,57	Введено под кожу 2 мг кобальта pro kilo
58	1,80	1,73	1,76	1,76	
59	1,78	1,80	1,82	1,82	
76	1,96	2,0	2,1	1,70	Введено под кожу 5 мг кобальта pro kilo
153	1,73	1,64	1,90	1,70	
164	1,50	1,42	1,50	1,52	
183	1,42	1,42	1,40	1,52	

Приведенные в таблицах №№ 1—6 материалы позволяют сделать следующие заключения:

1. Активность щелочной фосфатазы у собак при норме, выраженная в единицах Боданского, колебалась в пределах 1,92—7,18, а у кроликов — от 2,87 до 8,34. Следовательно, у кроликов фосфатаза сыворотки при норме обладает несколько большей активностью, чем у собак.

Следует отметить, что результаты наших исследований в отношении активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови собак и кроликов при норме совпали с данными, представленными у Балаховского.

2. В сыворотке крови нормальных животных содержание холинэстеразы может колебаться в широких пределах: у собак минимум холинэстеразной активности равнялся 16,01, а максимум — 40,9 (в % разложенного ацетилхолина), а у кроликов минимум был 6,82, а максимум — 24,11.

Следовательно, холинэстеразная активность сыворотки крови собак значительно выше, чем таковая у кроликов. Такая же закономерность была выявлена исследованиями Д. Л. Певзнер. Числовые же данные активности холинэстеразы в сыворотке крови собак и кроликов в основном совпали с данными Правдич-Неминской.

3. Коэффициент активности карбоангидразы у кроликов колеблется от 1,33 до 1,96, у собак — от 1,0 до 1,96.

В преобладающем большинстве опытов у кроликов и у собак коэффициент активности карбоангидразы колеблется от 1,4 до 1,9.

4. Подкожные инъекции сульфата кобальта в дозах, соответствующих от 0,05 до 5 мг кобальта pro kilo, сильно угнетают активность щелочной фосфатазы сыворотки крови собак и кроликов.

5. Подкожные инъекции сульфата кобальта в дозах, соответствующих от 0,05 до 5 мг кобальта pro kilo, угнетают активность холинэстеразы сыворотки крови собак и кроликов.

6. Подкожные инъекции сульфата кобальта собакам и кроликам в некоторых опытах вызывают слабое активирование карбоангидразы крови, в других, наоборот, наблюдается слабое угнетение фермента или отсутствие какого-либо эффекта. Все примененные нами дозы кобальта очень слабо активируют карбоангидразу крови кроликов.

На основании этого следует сделать заключение, что подкожные инъекции сульфата кобальта не влияют сколько-нибудь значительно на активность карбоангидразы крови собак и кроликов.

Перейдем к описанию влияния сульфата кобальта на активность щелочной фосфатазы, холинэстеразы и карбоангидразы крови *in vitro*.

Таблица № 7

Влияние сульфата кобальта на активность щелочной фосфатазы, холинэстеразы и карбоангидразы в крови собак и кроликов *in vitro* (в процентах к исходному количеству)

Вид животного	Наименование фермента	К-во опытов	Без добавле-ния сульф. кобальта	Количество добавленного кобальта на 100 мл раствора														
				50 мг	20 мг	10 мг	5 мг	2,5 мг	1 мг	5,10 ⁻² мг	2,5-10 ⁻² мг	10 ⁻² мг	5,10 ⁻³ мг	2,5,10 ⁻³ мг	10 ⁻³ мг	5,10 ⁻⁴ мг	2,5-10 ⁻⁴ мг	10 ⁻⁴ мг
Собака	щелочная фосфатаза	6	100	—	90,4	93,0	80,7	75,6	68,0	60,6	70,9	96,0	80,0	70,9	58,7	47,5	48,0	50,6
Кролик	.	6	100	—	61,0	65,2	60,0	53,0	41,7	25,0	100	79,0	75,7	60,0	60,0	58,8	62,7	68,8
Собака	холинэстераза	3	100	0	42,7	66,86	75,0	85,7	89,8	85,2	84,5	93,0	96,6	92,1	94,0	—	87,7	92,0
Кролик	.	3	100	13	47,3	70,8	58,0	80,3	72,3	75,7	80,3	80,3	89,0	99,0	93,0	91,0	93,0	93,0
Собака	карбоангидраза	4	100	92,6	91,8	86,9	84,4	95,0	100	87,7	95,0	101,0	101,0	100	104	104,0	101,0	102
Кролик	.	4	100	93,2	97,7	94,3	107,0	108	100	104,0	93,0	108,0	98,0	103	101	100	98,0	100

Для выяснения этого вопроса мы сравнивали активность вышеуказанных ферментов без добавления и с добавлением различных концентраций кобальта.

За недостатком места мы не будем приводить весь экспериментальный материал, а поместим лишь средние данные активности ферментов после добавления кобальта по сравнению с их активностью при отсутствии указанного микроэлемента.

Результат влияния сульфата кобальта на активность вышеуказанных ферментов *in vitro* представлен в таблице № 7.

На основании данных опытов, представленных в таблице № 7, можно сделать следующие выводы:

1. Сульфат кобальта *in vitro* угнетает щелочную фосфатазу и холинэстеразу сыворотки крови собак и кроликов. Особенно сильно угнетающее действие кобальта выражено для холинэстеразы при концентрации 50 и 20 мг металла на 100 мл раствора.

2. Сульфат кобальта *in vitro* не проявляет значительного действия на карбоангидразу крови собак и кроликов.

В Ы В О Д Ы

1. При подкожном введении кроликам и собакам сульфата кобальта наблюдается понижение активности щелочной фосфатазы и холинэстеразы в сыворотке крови.

2. Подкожное введение сульфата кобальта в дозах 0,05 мг, 0,5 мг, 1 мг, 2 мг и 5 мг чистого металла *pro kilo*, не изменяет активность карбоангидразы.

3. Добавление сульфата кобальта в дозах, соответствующих от 50 мг до 10^{-3} мг чистого металла в 100 мл раствора *in vitro* вызывает угнетение активности холинэстеразы в сыворотке крови.

4. Добавление сульфата кобальта от 20 мг до 10^{-3} мг чистого металла в 100 мл раствора *in vitro* угнетает активность щелочной фосфатазы сыворотки крови собак и кроликов.

5. Сульфат кобальта не оказывает определенного влияния на карбоангидразу крови собак и кроликов.