

KATARZYNA DAWIDEK-PIETRYKA, JAROSŁAW DUDKA

WPLYW NIEKTÓRYCH INHIBITORÓW ADH NA AKTYWNOŚĆ
MIKROSOMALNEGO SYSTEMU UTLENIANIA ALKOHOLI *IN VITRO*

EFFECT OF SOME ADH INHIBITORS ON MICROSOMAL ALCOHOL OXIDIZING
SYSTEM ACTIVITY IN VITRO

Katedra i Zakład Toksykologii
Akademia Medyczna w Lublinie
20-093 Lublin, ul. Chodźki 7
Kierownik: prof. dr hab. E. Jagiełło-Wójtowicz

W pracy oceniano wpływ amidu kwasu izowalerianowego, acetylo-L-karnityny, błękitu metylenowego, cymetydyny, DMSO, EDTA, o-fenantrony, pirazolu, penicylaminy i teofiliny na aktywność mikrosomalnego systemu utleniania alkoholi. Badania przeprowadzono in vitro z enzymem pochodzącym z wątroby ludzkiej katalizującym reakcję utleniania metanolu.

WSTĘP

W badaniach przemian oksydacyjnych metanolu i jego toksycznego działania w komórkach organizmu ludzkiego zwracano dotychczas uwagę na skutki wynikające z utlenienia metanolu w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę alkoholową [19, 21]. Badania ostatnich lat wykazały, że etanol jak też metanol mogą być również utleniane do odpowiednich aldehydów przy istotnym udziale cytochromu P-450 (CYP) [E.C. 1.14.14.1] konkretnie jego form CYP 2E1 – 68% i CYP 1A1 – 32% [2]. CYP 2E1 i CYP 1A1 są głównymi składnikami mikrosomalnego systemu utleniającego etanol powszechnie znanego jako MEOS. Specyficzność substratową enzymu jak i mechanizm oparty na reakcji utleniania precyzyjniej określa termin: mikrosomalny system utleniający alkohole (MAOS) [4].

MAOS umiejscowiony jest w gładkiej siateczce śródplazmatycznej (SER), gdzie występuje wieloskładnikowy kompleks enzymatyczny – lipidowy określany mianem mikrosomalnych monooksygenaz, oksygenaz mieszanej funkcji lub hydroksylaz [7]. W składzie tego systemu obok CYP 2E1 i CYP 1A1 występują inne cytochromy P-450 oraz reduktaza cytochromu P-450 i fosfolipidy [9].

MAOS różni się od ADH nie tylko miejscem występowania w komórce, ale także rodzajem koenzymu (NADPH a nie NAD^+) oraz optimum pH tj. dla układu MAOS – 7,0, a dla ADH – 9,0 (22). Można stwierdzić, że MAOS odgrywa obok ADH istotną rolę w procesach oksydacji alkoholi u człowieka [13, 15]. Dotyczy to szczególnie osób nadużywających etanol, u których potwierdzono indukcję systemu mikrosomalnego utleniania, w wyniku proliferacji SER [14]. W takich przypadkach udział procentowy

MAOS w pierwszym etapie metabolizmu alkoholi znacząco wzrasta. Dane te były inspiracją do podjęcia tej pracy, której celem była ocena wpływu wybranych inhibitorów ADH na aktywność MAOS. Ponadto porównano działanie badanych inhibitorów ADH ze znanym inhibitorem MAOS jakim jest 4-metylopirazol (4-MP).

MATERIAŁ I METODYKA

Próbki wątroby ludzkiej pobierano do badań pomiędzy 24 a 48 godziną po śmierci i przechowywano w temp. -30°C maksymalnie do trzech tygodni. Materiał do badań pochodził od pacjentów po sekcji zwłok, którzy zginęli w wypadkach samochodowych, czy też w wyniku zawału serca.

Skrawki wątroby po przemyciu w soli fizjologicznej i zważeniu rozdrobniano, a następnie przenoszono do homogenizatora. Homogenizacja odbywała się w 4 objętościach izotonicznego roztworu KCl (0,15 mol/l), który minimalizuje absorbcję hemoglobiny na mikrosomach [17].

Po zhomogenizowaniu komórek wątrobowych mikrosomy zostały wyizolowane z procedurą przedstawioną przez *Amacher'a* i wsp. [1]. Homogenaty wątrobowe wirowano przy 10 000 g przez 20 min. w temp. 4°C , osad odrzucono, a supernatant wirowano dalej przy 100 000g przez 60 min. w temp. 4°C . Otrzymany osad mikrosomów natychmiast zamrożono i przechowywano w temperaturze -70°C , aż do chwili wykonania oznaczenia.

Aktywność enzymatyczną mierzono w oparciu o metodę *Asai* i wsp. [2] z niewielkimi modyfikacjami. Mikrosomy zawieszono w 0,15 mol/l KCl tak, że do badań pobierano ilość odpowiadającą 150 mg do 200 mg tkanki wątrobowej [15] i przenoszono do mieszaniny reakcyjnej zawierającej: bufor fosforanowy 100 mmol/l pH 7,4; 10 mmol/l NADPH; chlorek magnezu 5 mmol/l, metanol 0,05 mol/l lub 0,20 mol/l i odpowiedni inhibitor tj. acetylo-L-karnityna, amid kwasu izowalerianowego, błękit metylenowy, cymetydyna, DMSO, EDTA, o-fenantrolina, penicylamina, pirazol lub teofilina o stężeniu 1 mmol/l, 0,1 mmol/l lub 0,01 mmol/l.

Mieszaninę reakcyjną (5ml) preinkubowano 5 min. w 37°C po czym reakcję rozpoczynano przez dodanie frakcji mikrosomalnej. Czas inkubacji wynosił 60 min. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 30% kwasu trichlorooctowego. Odczynnikiem wywołującym barwę był odczynnik *Nash'a* [16].

Aktywność mikrosomalnego systemu utleniającego alkohole wyrażano w jednostkach międzynarodowych odpowiadających μmol formaldehydu powstałego w ciągu 1 sekundy podczas początkowej, prostoliniowej fazy reakcji.

Białko zostało oznaczone w homogenatach metodą biuretową [11].

W analizie statystycznej wyników zastosowano test *t-Studenta* dla dwóch średnich z małych i nie powiązanych prób o rozkładzie normalnym. Za istotne statystycznie przyjęto wartości na poziomie istotności od $p < 0,05$ do $p < 0,001$.

WYNIKI

Oceniając sprawność katalityczną każdego enzymu niezbędne jest wyznaczenie jego parametrów kinetycznych tj.: stałej *Michaelisa* (K_m) dla substratu czyli metanolu oraz maksymalnej szybkości reakcji (V_m). W tym celu zastosowano metodę graficzną wykorzystującą równanie *Lineweavera-Burka*. Wyniki zestawiono w tabeli I.

Wybrane do badań związki zostały zastosowane w stężeniach 0,01mmol/l, 0,10 mmol/l i 1,00 mmol/l oraz błękit metylenowy w stężeniach 0,01 mmol/l i 0,10 mmol/l. Na podstawie dostępnej literatury stwierdzono, że są to stężenia, które nie powinny powodować istotnego, szkodliwego działania na organizm człowieka. Wpływ tych związków na aktywność MAOS porównano z 4-metylopirazolem. Substratem enzymów

był metanol w dwóch różnych stężeniach 0,05 mol/l i 0,20 mol/l. Wyniki przedstawiono w procencie względnej szybkości reakcji w obecności inhibitora (aktywatora).

Reakcje katalizowane przez MAOS najskuteczniej zahamowane zostały przez EDTA (ryc. 2) i amid kwasu izowalerianowego (ryc. 1) w stężeniu 1,00 mmol/l wobec 0,20 mol/l metanolu, gdzie zaobserwowano spadek aktywności enzymu do odpowiednio 50,40 % i 57,40 % w porównaniu z próbą bez inhibitora – 100 % aktywności. Są to inhibitory o istotnie większej skuteczności hamowania MAOS niż 4-MP. Najmniejszą efektywność inhibicyjną wykazał 0,01 mmol/l pirazol.

Penicylamina, błękit metylenowy oraz acetylo-L-karnityna okazały się aktywatorami MAOS. Aktywność MAOS wzrasta w reakcji z 0,2 mol/l metanolem dla penicylaminy w stężeniu 1,00 mmol/l do 273,16 % (ryc. 4), a dla 0,10 mmol/l błękitu metylenowego do wartości 218,92 % (ryc. 4). Bardzo charakterystyczne jest zachowanie acetylo-L-karnityny i błękitu metylenowego, które przy wyższym stężeniu substratu aktywują enzym (ryc. 4), natomiast przy niższym stężeniu substratu wykazują działanie hamujące wobec MAOS (ryc. 3).

DYSKUSJA

Mikrosomalny system utleniający alkohole jako stosunkowo niedawno poznany układ enzymatyczny nie został jeszcze dokładnie scharakteryzowany. Z tego powodu niewiele jest informacji dotyczących wpływu różnych związków na ten system. Istotnym wydaje się fakt poznania wpływu na aktywność MAOS znanych inhibitorów ADH, które mogłyby być potencjalnymi lekami w zatruciach metanolem.

1-butanol jest pierwszym związkiem, którego wpływ na aktywność MAOS został udowodniony w badaniach *in vivo*. W 1988 r. *Kato* i wsp. [10] wykazali, że 1-butanol zahamował w 50% eliminację etanolu na szczepach ADH⁺ myszy. Natomiast zgodnie z wynikami badań *Kozhiemiakina* i wsp. [12], w których przedstawiono inhibicyjny wpływ 4-metylopirazolu, DMSO, amidu kwasu izowalerianowego oraz dioksydu aldehydu benzylooctowego na aktywność MAOS w reakcjach *in vitro* z etanolem jako substratem enzymów, najskuteczniejszym inhibitorem MAOS okazał się dioksym.

Na podstawie prezentowanych wyników badań można stwierdzić, że EDTA jest najskuteczniejszym inhibitorem MAOS w porównaniu z 4-MP. Spadek aktywności enzymu dla EDTA waha się w granicy 50%. Natomiast EDTA nie jest efektywnym inhibitorem ADH w porównaniu z 4-MP, który jest skuteczniejszy zgodnie z przeprowadzonymi wcześniej badaniami [6]. Amid kwasu izowalerianowego wykazuje większą skuteczność hamowania aktywności MAOS z metanolem jako substratem, w porównaniu do 4-MP. Działanie tego związku jest przeciwne w procesie utleniania etanolu [12]. Natomiast bardzo ważny, wykazany w porównaniu z innymi przebadanymi związkami, jest hamujący wpływ na MAOS o-fenantroliny w reakcji utleniania metanolu, ponieważ o-fenantrolina jest skutecznym inhibitorem ADH [5]. W badaniach nad hamowaniem przez karnitynę aktywności mikrosomalnego systemu utleniającego alkohole przeprowadzonych na szczurach z etanolem jako substratem enzymu wykazano, że acetylo-L-karnityna jest inhibitorem MAOS o niewielkiej skuteczności [18]. Natomiast w naszych badaniach w reakcjach utleniania metanolu katalizowanych przez MAOS acetylo-L-karnityna wykazała działanie aktywujące w przeciwieństwie do badań opublikowanych przez *Sachan'a* [18], gdzie acetylo-L-karnityna nie miała żadnego wpływu na przebieg

reakcji utleniania etanolu. Różnice te można tłumaczyć zastosowaniem innego substratu, a ponadto działanie acetylo-L-karnityny jest związane ze stosowanym jej stężeniem (18). Natomiast 4-MP nie wykazuje szczególnie efektywnego działania na aktywność MAOS, mimo, że skutecznie hamuje drugi enzym drogi metabolicznej metanolu – ADH [5]. Wiadomo już na podstawie licznych doniesień, że jest stosowany u ludzi jak odtrutka w zatruciach metanolem zamiennie do powszechnie podawanego etanolu [3, 8].

WNIOSKI

1. 4-Metylopirazol, związek, który odgrywa istotną rolę jako odtrutka w intoksykacji metanolem jest słabym inhibitorem MAOS.

2. EDTA we wszystkich badanych stężeniach okazał się najefektywniejszym inhibitorem enzymu.

3. Penicylamina, acetylo-L-karnityna i błękit metylenowy aktywują MAOS, dlatego sugeruje się wykluczenie ich z dalszych badań nad potencjalnymi odtrudkami w zatruciach metanolem u ludzi.

K. Dawidek-Pietryka, J. Dudka

EFFECT OF SOME ADH INHIBITORS ON MICROSOMAL ALCOHOL OXIDIZING SYSTEM ACTIVITY *IN VITRO*

Summary

The treatment of methanol intoxication usually focuses on prevention of methanol conversion to its toxic metabolites due to administration of ethanol or 4-methylpyrasole (4-MP). Nevertheless there is a need for new measures treatment of methanol intoxication. For this reason the influence of some alcohol dehydrogenase inhibitors on the activity of microsomal alcohol oxidising system (MAOS) with methanol as a substrate was assayed.

In the present study MAOS activity was measured spectrophotometrically *in vitro* at physiological pH 7.4 and 37°C, assaying the degree of methanol oxidation. The quantity of arising formaldehyde was measured according with the method of Nash. The source of enzyme was hepatic slices.

Our results have shown that MAOS activity was inhibited to different extents by: 4-MP, isovaleric amide, cimetidine, DMSO, EDTA, o-phenantrolin, pyrasole and thephylline at concentrations of 0,01 mmol/l, 0,10 mmol/l 1,00 mmol/l. And methylene blue, acetyl-L-carnityne and penicillamine increase MAOS activity in the process of methanol oxidation.

In summary, 4-MP which plays an important role as an antidote in methanol intoxication was not an effective MAOS inhibitor. EDTA was found to be a highly effective inhibitor at all investigated concentrations.

PIŚMIENICTWO

1. Amacher D.E., Beck R., Schomaker S.J., Kenny C. V.: Hepatic microsomal enzyme induction, β -oxidation and cell proliferation following administration of clofibrate, gemfibrozil or bezafibrate in the CD rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997, 142, 143–150.
2. Asai H., Imaoka S., Kuroki T., Monna T., Funae Y.: Microsomal ethanol oxidizing system activity by human hepatic cytochrome P450s. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 277, 2, 1004–1009.

3. *Baud F.J., Bismuth C., Garnier R., Galliot M., Astier A., Maistre G., Soffer M. J.*: 4-Methylpyrazole may be an alternative to ethanol therapy for ethylene glycol intoxication in man. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1986/1987, 124, 463–483.
4. *Coon M.J., Koop D.R.*: Alcohol – inducible cytochrome P-450 (P-450_{ALC}). *Arch. Toxicol.* 1987, 60, 1–3, 16–21.
5. *Dawidek-Pietryka K., Szczepaniak S., Dudka J., Mazur M.*: In vitro studies on human alcohol dehydrogenase inhibition in the process of methanol and ethylene glycol oxidation *Arch. Toxicol.* 1998, 72, 604–607.
6. *Dawidek-Pietryka K., Dudka J., Szczepaniak S.*: Inhibicja dehydrogenazy alkoholowej przez wybrane związki w reakcji z metanolem i glikolem etylenowym. *Bromat. Chem. Toksykol.* – w druku.
7. *Giermazik H., Lutz W., Giermazik M.*: Rola enzymu CYP2E1 w patogenezie zatruc glikolem etylenowym. *Biul. Wojsk. A M* 1993, 36, 65–71.
8. *Jacobsen D., Sebastian C. S., Barron S. K., Carriere E. W., Mc Martin K. E.*: Effects of 4-methylpyrazole, methanol/ethylene glycol antidote in healthy humans. *J. Emerg. Med.* 1990, 8, 455–461.
9. *Johansson I., Ekstrom G., Scholte B., Puzycki D., Jornvall H., Ingelman-Sundberg M.*: Ethanol-, fasting-, and acetone – inducible cytochromes P-450 in rat liver: Regulation and characteristics of enzymes belonging to the IIB and IIE gene subfamilies. *Biochemistry* 1988, 27, 1925–1934.
10. *Kato S., Alderman J., Lieber C.S.*: In vivo role of the microsomal ethanol – oxidising system in ethanol metabolism by deermice lacking alcohol dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* 1988, 37, 13, 2706–2708.
11. *Koj A.*: Badanie gospodarki białkowej; w: *Wybrane metody chemii klinicznej*, ed. A. Ostrowski, Warszawa 1968, 70.
12. *Kozhiemiakin L.A., Zielienin K.N., Bonitenko Iu.Iu., Ivanova L.I., Ershov A.Iu., Ziemlianoi A.V., Koroliuk M.A.*: Inhibitors of alcohol dehydrogenase and their effect on main enzymatic systems involved in oxidation of aliphatic alcohols. *Vopr. Med. Khim.* 1985, 31, 67–69.
13. *Lieber C.S.*: Microsomal ethanol-oxidizing system. *Enzyme.* 1987, 37, 45–56.
14. *Lieber C.S., DeCarli L.M.*: Ethanol oxidation by hepatic microsomes adaptive increase after ethanol feeding. *Science.* 1968, 162, 917–918.
15. *Lieber C.S., DeCarli L.M.*: Hepatic microsomal ethanol- oxidizing system. In vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J. Biol. Chem.* 1970, 245, 10, 2505–2512.
16. *Nash T.*: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *J. Biol. Chem.* 1953, 55, 416– 421.
17. *Osterloh J.D., Pond S.M., Grady S., Becker C.E.*: Serum formate concentrations in methanol intoxication as a criterion for hemodialysis. *Ann. Intern. Med.* 1986, 104, 200–203.
18. *Sachan D.S., Cha Y.S.*: Acetylcarnitine inhibits alcohol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 203, 3, 1496–1501.
19. *Skrzydłowska E.*: Metabolizm i toksyczne działanie metanolu. *Pol. Tyg. Lek.* 1993, 48, 18–19, 433–436.
20. *Takagi T., Alderman J., Gellert J., Lieber C.S.*: Assessment of the role of non-ADH ethanol oxidation *in vivo* and in hepatocytes from deermice. *Biochem. Pharmacol.* 1986, 35, 20, 3601–3606.
21. *Tephly T.R., Parks R.E., Mannering G.J.*: Methanol metabolism in the rat. 1964, 143, 292–300.
22. *Zorzano A., Herrera E.*: Differences in kinetic characteristics and in sensitivity to inhibitors between human and rat liver alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase. *Gen. Pharmac.* 1990, 21, 5, 697–702.