

KATARZYNA DAWIDEK-PIETRYKA, JAROSŁAW DUDKA, EWA JAGIEŁŁO-WÓJTOWICZ

AKTYWNOŚĆ KATALAZY PO ZASTOSOWANIU  
WYBRANYCH INHIBITORÓW ADH I MEOS, BADANIA *IN VITRO*  
W HOMOGENATACH WĄTROBY SZCZURÓW

THE ACTIVITY OF CATALASE AFTER ADMINISTRATION OF SOME ADH  
AND MEOS INHIBITORS, *IN VITRO* INVESTIGATION  
IN RAT LIVER HOMOGENATES

Katedra i Zakład Toksykologii  
Akademia Medyczna w Lublinie  
20-093 Lublin, ul. Chodźki 8  
Kierownik: prof. dr hab. E. Jagiełło-Wójtowicz

*Prezentowana praca jest kontynuacją badań nad wpływem wybranych inhibitorów ADH i MEOS na pierwszy etap biotransformacji metanolu. Stosowano: 3-amino-1,2,4-triazol, cymetydynę, EDTA, 1,10-fenantrolinę i 4-metylopirazol w reakcji utleniania metanolu w stężeniach 0,05 i 0,10 mol/l. Oceniano ich wpływ na aktywność katalazy w homogenatach wątroby szczurów.*

WSTĘP

Utlennianie metanolu do formaldehydu zachodzi w 80 – 90% w wątrobie. Istnieją trzy dobrze poznane układy enzymatyczne odpowiedzialne za ten etap biotransformacji alkoholu metylowego. Są to: dehydrogenaza alkoholowa (ADH), mikrosomalny system utleniający alkohole związany z cytochromem P-450 (MEOS) oraz katalaza [3, 15]. Istotą terapii w zatruciach metanolem jest hamowanie utleniania alkoholu w celu ograniczenia powstawania toksycznych metabolitów [9].

Dane z piśmiennictwa [1, 20] wskazują, że główną rolę w utlenianiu alkoholi odgrywa ADH. Wiadomo również, że w przypadku wysokich stężeń alkoholu we krwi, znaczący udział w utlenianiu alkoholi ma także system MEOS. Szczególnie widoczne jest to u alkoholików [10]. *Tephly* i wsp. [17] podają, że w procesie utleniania metanolu wiodącą rolę odgrywa katalaza, a nie ADH. Przeciwnie, na podstawie najnowszych wyników badań inni autorzy stoją na stanowisku, że pierwszy etap biotransformacji metanolu przebiega podobnie jak dla etanolu [7]. Niemniej jednak prowadząc badania odnośnie pierwszego etapu biotransformacji metanolu istotną wydaje się konieczność oceny aktywności wszystkich z trzech enzymów tj. ADH, MEOS i katalazy.

Przedstawione badania dotyczą wpływu pięciu wybranych inhibitorów ADH i MEOS na aktywność katalazy w homogenatach wątroby szczurów. Wyniki porównano z 3-amino-1,2,4-triazolem (aminotriazol).

## MATERIAŁ I METODYKA

Szczury, samce rasy *Wistar* o masie ciała 200 – 220 g, dekapitowano i pobierano wątrobę do badań enzymatycznych. Materiał przechowywano w temp.  $-30^{\circ}\text{C}$  do czasu oznaczeń biochemicznych.

Aktywność katalazy oznaczano metodą spektrofotometryczną wg *Handler'a* i *Thurman'a* [8]. Rozmrożone skrawki wątroby po przemyciu i osuszeniu homogenizowano z 4-krotną ilością sukrozy o stężeniu 0,25 mol/l w czasie 3 min. Gotowe homogenaty wirowano 20 min. przy 3,5 tys. obr./min. Supernatanty były ponownie wirowane 20 min. przy 15 tys. obr./min. Po zakończeniu wirowania odrzucano supernatant. Osad, w którym znajdowała się frakcja mitochondrialno-peroksymalna zawierająca katalazę dwukrotnie przemycano roztworem KCl (0,15 mol/l; pH 7,4) i 10-krotnie rozcieńczano tym samym roztworem KCl.

Utlenianie metanolu przez katalazę z frakcji mitochondrialno – peroksymalnej oceniano spektrofotometrycznie mierząc ilość tworzącego się formaldehydu wg metody *Nash'a* [12]. Mieszanina reakcyjna zawierała: bufor fosforanowy 100 mmol/l o pH 7,4, glukozę 10 mmol/l, frakcję enzymatyczną (0,1 ml) oraz metanol w stężeniu 0,10 lub 0,05 mol/l i odpowiedni związek badany w granicach stężeń od 0,01 do 1,00 mmol/l. Reakcję rozpoczynano przez dodanie 10 U oksydazy glukozowej. Po 3 min., reakcję zatrzymywano dodając 0,1 ml 40% kwasu trichlorooctowego.

Do oceny sprawności katalitycznej każdego enzymu niezbędne było 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*. Pozwoliło to wyeliminować z badań atypowe enzymy. Aktywność katalazy uzyskanej z wątroby szczura wyznaczano w przedziale stężeń metanolu 0,035 – 0,2 mol/l.

Następnie oceniano aktywność katalazy po zastosowaniu związków: cymetydyny, EDTA, 1,10-fenantroliny i 4-metylopirazolu wszystkie w stężeniach  $10^{-3}$  mol/l,  $2 \times 10^{-4}$  mol/l,  $10^{-4}$  mol/l,  $2 \times 10^{-5}$  mol/l,  $10^{-5}$  mol/l. Substratem enzymu był metanol w stężeniach 0,05 mol/l i 0,10 mol/l. Wyniki hamowania aktywności katalazy przez w/w związki porównano ze znanym inhibitorem enzymu tj. aminotriazolem w stężeniach analogicznych.

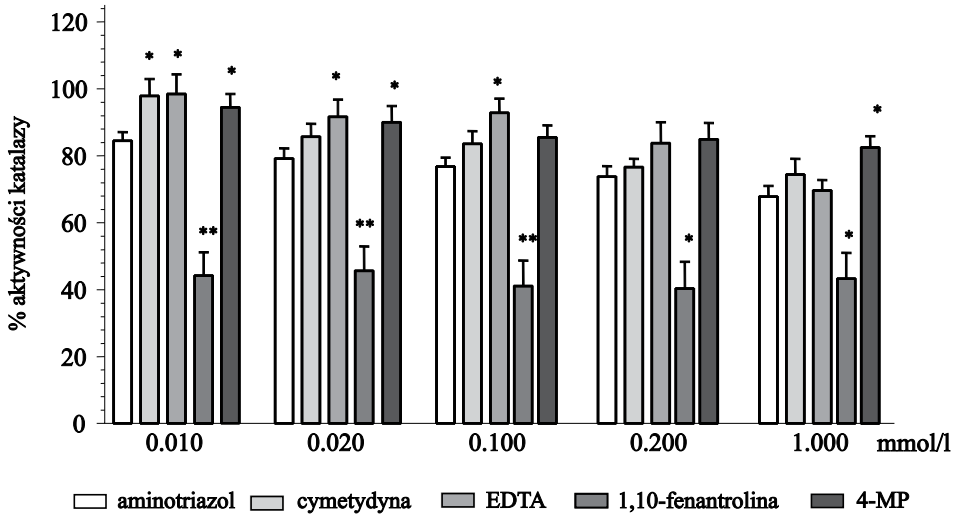
W celu wyjaśnienia charakteru hamowania enzymu przez dany związek wyznaczone zostały stałe inhibicji ( $K_i$ ) oraz określono typ inhibicji. Posłużyła do tego graficzna metoda *Dixona*. Przy stałym stężeniu substratu (metanolu) należało oznaczyć szybkość reakcji  $V_i$  przy różnych stężeniach inhibitora. Oznaczając szybkość  $V_i$  przy dwóch stężeniach substratu czyli metanolu 0,05 i 0,10 mol/l wykreślono dwie krzywe zależności  $1/V_i$  od  $[I]$  i wyznaczono wartość  $K_i$  z punktu przecięcia krzywych dla każdego z badanych związków. Na podstawie zupełnie odmiennego charakteru otrzymanych wykresów wyróżniamy dwa typy inhibitorów: kompetycyjny i niekompetycyjny [19].

Ocenę statystyczną wyników przeprowadzono w oparciu o test *t-Studenta*. Za istotne statystycznie wyniki uznano  $p < 0,05$  i  $p < 0,001$ .

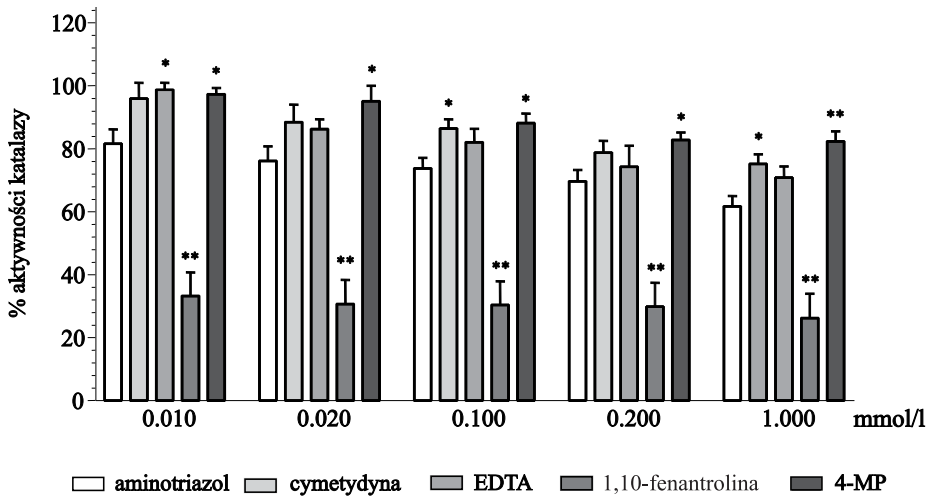
## WYNIKI

W badaniach wstępnych oceniano sprawność katalityczną katalazy wyznaczając parametry kinetyczne tj.:  $K_M$  oraz  $V_m$  dla metanolu, które wynoszą odpowiednio  $27,25 \pm 4,55$  mmol/l oraz  $30,5 \pm 3,20$   $\eta$ Kat/l.

Z ryc. 1 i 2 wynika, że inhibitorami katalazy w homogenatach wątroby szczurów, w reakcji utleniania metanolu w stężeniach 0,05 i 0,10 mol/l były wszystkie badane związki. Skuteczniej niż aminotriazol reakcję utleniania hamowała 1,10-fenantrolina. Największy spadek aktywności katalazy zaobserwowano w obecności tego związku w stężeniu 1 mmol/l, względna szybkość reakcji wynosiła ok. 26% przy stężeniu metanolu 0,10 mol/l (ryc. 2). Działanie hamujące aktywność katalazy, w homogenatach wątroby szczurów, przez pozostałe badane związki było słabsze aniżeli aminotriazolu. Cymetydyna, 4-metylopirazol i EDTA znacznie słabiej hamowały katalazę, względna szybkość reakcji wahała się w granicach od 60% do 100%.

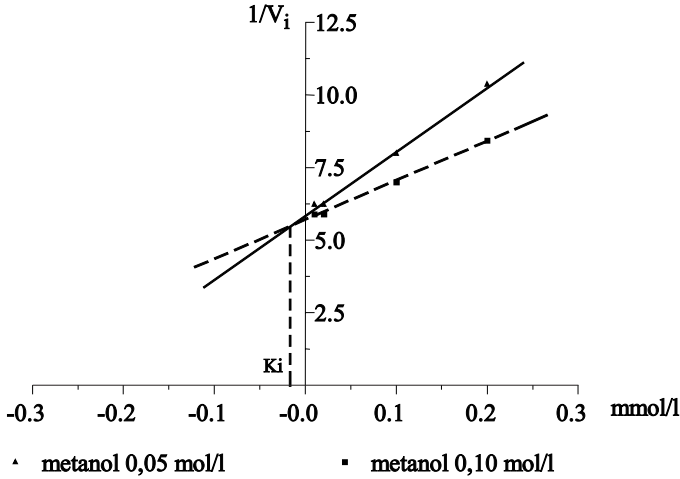


Ryc. 1. Wpływ wybranych inhibitorów ADH i MEOS na aktywność katalazy w obecności metanolu w stężeniu 0,05 mol/l. Aktywność enzymu bez inhibitora wynosi 100% (n=7-8 próbek). \*,\*\* – porównanie z aminotriazolem \*p < 0,05 i \*\*p < 0,001  
 The influence of some ADH and MEOS inhibitors on catalase activity with methanol of 0.05 mol/l concentration. The activity of enzyme without inhibitor is 100% (n=7-8 samples). \*,\*\* – the comparison with aminotriazole \*p < 0,05 i \*\*p < 0,001



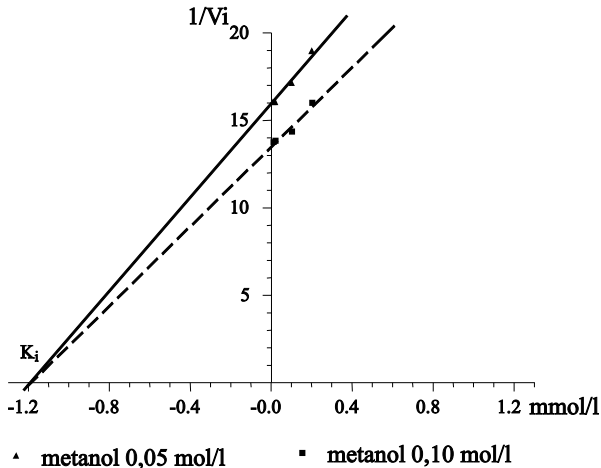
Ryc. 2. Wpływ wybranych inhibitorów ADH i MEOS na aktywność katalazy w obecności metanolu o stężeniu 0,10 mol/l. Aktywność enzymu bez inhibitora wynosi 100% (n=7-8 próbek). \*,\*\* – porównanie z aminotriazolem dla \*p < 0,05 i \*\*p < 0,001  
 The influence of some ADH and MEOS inhibitors on catalase activity with methanol of 0.10 mol/l concentration. The activity of enzyme without inhibitor is 100% (n=7-8 samples). \*,\*\* – the comparison with aminotriazole \*p < 0,05 i \*\*p < 0,001

Kolejne ryc. 3–7 ilustrują sposób wyznaczania, metodą *Dixona*, stałej inhibicji i typu hamowania dla badanych związków tj.: aminotriazolu, cymetydyny, EDTA, 1,10-fenantroliny oraz 4-metylopirazolu w losowo wybranej próbce homogenatu z wątroby szczura. Na pod-



Ryc. 3. Wpływ 3-amino-1,2,4-triazolu na aktywność katalazy homogenatów wątroby szczura w obecności metanolu w stężeniach 0,05 i 0,10 mol/l jako substratu. Wyznaczanie stałej inhibicji ( $K_i$ ) za pomocą graficznej metody *Dixona*

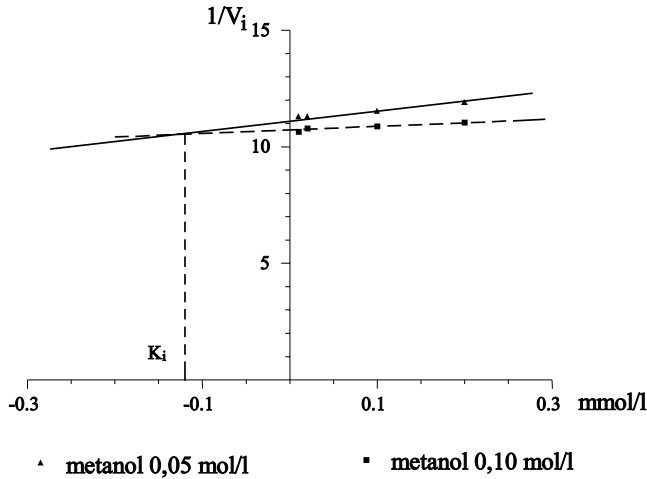
The influence of 3-amino-1,2,4-triazole on rat liver catalase activity with 0.05 and 0.10 mol/l of methanol as a substrate. Drawing the inhibition constant ( $K_i$ ) with *Dixon* plots



Ryc. 4. Wpływ cymetydyny na aktywność katalazy homogenatów wątroby szczura w obecności metanolu w stężeniach 0,05 i 0,10 mol/l jako substratu. Wyznaczanie stałej inhibicji ( $K_i$ ) za pomocą graficznej metody *Dixona*

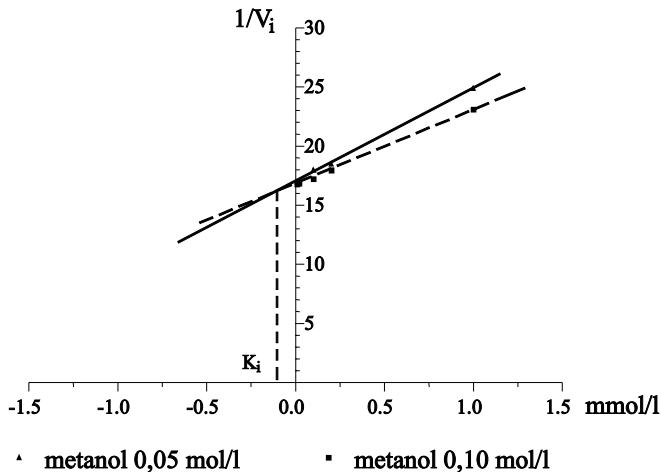
The influence of cimetidine on rat liver catalase activity with 0.05 and 0.10 mol/l of methanol as a substrate. Drawing the inhibition constant ( $K_i$ ) with *Dixon* plots

stawie podobnych wykresów wyznaczono średnie wartości stałej inhibicji dla prób badanych ( $n = 6 - 8$ ) i porównano je ze stałą hamowania dla aminotriazolu. Stałe inhibicji dla poszczególnych związków przedstawiono w tabeli I, jest to wartość bezwzględna  $K_i$  odczytana z wykresów.



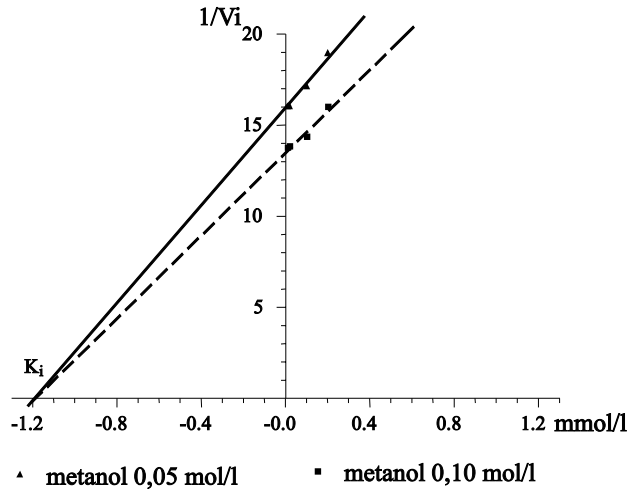
Ryc. 5. Wpływ EDTA na aktywność katalazy homogenatów wątroby szczura w obecności metanolu w stężeniach 0,05 i 0,10 mol/l jako substratu. Wyznaczanie stałej inhibicji ( $K_i$ ) za pomocą graficznej metody *Dixona*

The influence of EDTA on rat liver catalase activity with 0.05 and 0.10 mol/l of methanol as a substrate. Drawing the inhibition constant ( $K_i$ ) with *Dixon* plots



Ryc. 6. Wpływ 1,10-fenantroliny na aktywność katalazy homogenatów wątroby szczura w obecności metanolu w stężeniach 0,05 i 0,10 mol/l jako substratu. Wyznaczanie stałej inhibicji ( $K_i$ ) za pomocą graficznej metody *Dixona*

The influence of 1,10-phenantroline on rat liver catalase activity with 0.05 and 0.10 mol/l of methanol as a substrate. Drawing the inhibition constant ( $K_i$ ) with *Dixon* plots



Ryc. 7. Wpływ 4-metylopirazolu na aktywność katalazy homogenatów wątroby szczura w obecności metanolu w stężeniach 0,05 i 0,10 mol/l jako substratu. Wyznaczanie stałej inhibicji ( $K_i$ ) za pomocą graficznej metody *Dixona*

The influence of 4-methylpyrazole on rat liver catalase activity with 0.05 and 0.10 mol/l of methanol as a substrate. Drawing the inhibition constant ( $K_i$ ) with *Dixon* plots

Tabela I. Wpływ wybranych substancji chemicznych na aktywność katalazy w reakcji utleniania metanolu w homogenatach wątroby szczurów. Średnie wartości stałych inhibicji wyznaczono graficzną metodą *Dixona*, a wyniki porównano z uzyskanymi dla 3-amino-1,2,4-triazolu

The influence of some compounds on catalase activity in the oxidation of methanol in rats liver homogenates. Means inhibition constants plotted by *Dixon* and compared with 3-amino-1,2,4-triazole

Badany związek	Stała inhibicji $K_i$ (mmol/l) $\bar{X} \pm \text{SEM}$
3-amino-1,2,4-triazol	0,024 $\pm$ 0,006
cymetydyna	1,23 $\pm$ 0,063*
EDTA	0,114 $\pm$ 0,010**
1,10-fenantrolina	0,122 $\pm$ 0,010**
4-metylopirazol	0,062 $\pm$ 0,009*

\*  $p < 0,01$  i \*\*  $p < 0,001$  w porównaniu z 3-amino-1,2,4-triazolem

Jak wynika z ryc. 4 cymetydyna wykazywała inny charakter hamowania niż pozostałe związki. Punkt przecięcia krzywych, na podstawie którego wyznaczamy wartość  $K_i$  znajduje się na osi Y, co wskazuje na niekompetycyjny typ hamowania katalazy. Pozostałe związki były inhibitorami kompetycyjnymi.

## DYSKUSJA

Prezentowana praca jest kontynuacją wcześniejszych badań [4–6] nad wpływem wybranych związków na pierwszy etap biotransformacji metanolu. Wiadomo, że cymetydyna, EDTA, 1,10-fenantrolina i 4-metylopirazol są znanymi i skutecznymi inhibitorami dehydrogenazy alkoholowej i mikrosomalnego systemu utleniania alkoholi [6, 14, 16]. Natomiast 3-amino-1,2,4-triazol to modelowy inhibitor katalazy [17].

Na podstawie przeprowadzonych w pracy badań wykazano, że średnia wartość  $K_M$  dla katalazy, w homogenatach z wątroby szczurów, wynosi 27,25 mmol/l dla metanolu jako substratu enzymu. Z literatury wiadomo, że średnia wartość  $K_M$  w homogenatach z wątroby ludzkiej wynosi: dla ADH to 53,6 mmol/l, a dla MEOS 6,7 mmol/l [4,6]. Można więc sądzić, że metanol wykazuje największe powinowactwo do MEOS oraz większe powinowactwo do katalazy niż, do ADH co jest zgodne z wynikami badań innych autorów [17]. Natomiast czynnikiem ograniczającym wydajność utleniania metanolu przez MEOS jest szybkość reakcji, dlatego nie potwierdzono istotnej roli tego procesu w pierwszym etapie biotransformacji metanolu.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że aminotriazol hamował enzym przy stężeniu 1 mmol/l zmniejszając aktywność katalazy do ok. 61% i 68% odpowiednio dla stężeń metanolu 0,10 i 0,05 mol/l. Aminotriazol jest kompetycyjnym inhibitorem katalazy konkurującym o miejsce aktywne enzymu z nadtlenkiem wodoru ( $H_2O_2$ ). Spostrzeżenia nasze są zgodne z badaniami *Manning'a i Parks'a* [11] którzy stwierdzili, że aminotriazol podany dootrzewnowo (*i.p.*) w dawce 3 mg/kg szczurom hamuje w ok. 95% aktywność katalazy i w 70% utlenianie metanolu w homogenatach wątrobowych. Także w badaniach *in vitro* wykazali, że system generujący  $H_2O_2$  jest czynnikiem ograniczającym ten proces. Ci sami autorzy zauważyli, że w przypadku, gdy zostanie użyty czynnik generujący  $H_2O_2$ , aminotriazol jest mniej skuteczny jako inhibitor katalazy.

Badania wykazały, że cymetydyna jest mało skutecznym inhibitorem katalazy w homogenatach z wątroby szczurów. Podobną skuteczność tego inhibitora obserwowano w odniesieniu do MEOS w homogenatach z wątroby człowieka [6]. Jedynie ludzka wątrobowa dehydrogenaza alkoholowa jest enzymem, do którego cymetydyna wykazywała duże powinowactwo [5]. Takie różnokierunkowe działanie zmniejsza potencjalne zastosowanie cymetydyny jako odtrutki w zatruciach metanolem.

EDTA okazał się, zgodnie z oczekiwaniami, związkiem hamującym aktywność katalazy jednak stopień inhibicji tego enzymu jest niewielki. Zarówno własne badania [6] jak też innych autorów [18] potwierdzają skuteczność EDTA jako inhibitora ADH i MEOS. Co więcej, EDTA wykazuje właściwości hamowania dehydrogenazy metanolowej pochodzenia bakteryjnego, a widoczny efekt można zaobserwować dopiero przy wysokim stężeniu inhibitora od 15 mmol/l [2].

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że 1,10-fenantrolina hamowała najsilniej aktywność katalazy w homogenatach wątroby szczurów w obecności metanolu jako substratu. Wcześniejsze badania wykazały, że związek w stężeniu 3,33 mmol/l hamował aktywność ADH w skrawkach wątroby człowieka, wywołując spadek aktywności enzymu do 24% [5]. Należy również zaznaczyć, że 1,10-fenantrolina była skutecznym inhibitorem układu MEOS w reakcji utleniania metanolu [6].

W naszych badaniach stwierdzono, że spośród pięciu badanych związków 4-metylopirazol wykazuje największe powinowactwo do centrum aktywnego katalazy w porównaniu z aminotriazolem. Wartość  $K_i$  dla 4-metylopirazolu wynosi  $62 \pm 9$   $\mu$ mol/l (tab. I). Pomimo tak

wysokiego powinowactwa do centrum aktywnego katalazy 4-metylopirazol nie jest skutecznym inhibitorem enzymu. Znajduje to potwierdzenie w badaniach innych autorów [10].

#### WNIOSKI

Wszystkie przebadane związki tj.: 3-amino-1,2,4-triazol, 4-metylopirazol, cymetydyna, EDTA i 1,10-fenantrolina hamowały aktywność katalazy w homogenatach wątroby szczura, w reakcji utleniania metanolu:

1. 1,10-Fenantrolina, spośród wybranych związków, wykazuje największą skuteczność hamowania aktywności katalazy *in vitro*.

2. 4-Metylopirazol charakteryzuje się największym powinowactwem do enzymu w porównaniu z aminotriazolem.

3. Aminotriazol, EDTA, 1,10-fenantrolina i 4-metylopirazol są kompetycyjnymi inhibitorami katalazy, natomiast cymetydyna jest inhibitorem niekompetycyjnym.

K. Dawidek-Pietryka, J. Dudka, E. Jagiełło-Wójtowicz

#### THE ACTIVITY OF RAT LIVER CATALASE AFTER APPLICATION OF SOME ADH AND MEOS INHIBITORS, *IN VITRO* INVESTIGATION IN RAT LIVER HOMOGENATES

##### Summary

In the first pass methanol biotransformation three enzymatic systems: alcohol dehydrogenase (ADH), microsomal alcohol oxidising system (MEOS) linked with cytochrome P-450 and catalase are involved. Because of the toxicity of methanol, which is directly caused by its toxic metabolites, the major task in clinical toxicology is to inhibit each of these enzymes to protect human life.

The aim of this investigation was to check the influence of some effective inhibitors of ADH and MEOS: 4-methylpyrazole, cimetidine, EDTA and 1,10-phenantroline on the activity of catalase with methanol as a substrate and the comparison with 3-amino-1,2,4-triazole

Catalase activity in rat hepatic homogenates was measured spectrophotometrically *in vitro* at physiological pH 7.4 and temp. 37 °C, assaying the degree of methanol oxidation according to *Handler and Thurman*. The quantity of arising formaldehyde was measured according with the method of *Nash*.

Our results have shown that catalase activity was inhibited to different extents by all investigated compounds at concentrations of  $10^{-3}$  mol/l,  $2 \times 10^{-4}$  mol/l,  $10^{-4}$  mol/l,  $2 \times 10^{-5}$  mol/l,  $10^{-5}$  mol/l. 1,10-Phenantroline was found to be a highly effective inhibitor in comparison with aminotriazole. 4-Methylpyrazole, EDTA, 1,10-phenantroline and aminotriazole are catalase competitive inhibitors and cimetidine is non-competitive inhibitor. 4-Methylpyrazole has shown higher affinity to the enzyme than aminotriazole.

#### PIŚMIENNICTWO

1. *Bogdanik T.*: Kontrowersje i trudności związane z ostrymi zatruciami alkoholem metylowym i glikolem etylenowym. Stud. Mat. Mon. IMP Łódź 1983, 2, 36–45.
2. *Chan H.T.C., Anthony C.*: The mechanism of inhibition by EDTA and EGTA of methanol oxidation by methylotrophic bacteria. FEMS Microb. Lett. 1992, 96, 231–234.
3. *Cook R.J., Champion K.M., Giometti C.S.*: Methanol toxicity and formate oxidation in NEUT2 mice. Arch. Biochem. Bioph. 2001, 393, 192–198.
4. *Dawidek-Pietryka K., Szczepaniak S., Dudka J.*: *In vitro* studies of human alcohol dehydrogenase inhibition in the process of methanol and ethylene glycol oxidation. Arch. Toxicol. 1998, 72, 604–607.



5. Dawidek-Pietryka K., Dudka J., Szczepaniak S.: Inhibicja dehydrogenazy alkoholowej przez wybrane związki w reakcji z metanolem i glikolem etylenowym. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2000, 33, 155–160.
6. Dawidek-Pietryka K., Dudka J.: Wpływ niektórych inhibitorów ADH na aktywność mikrosomalnego systemu utleniania alkoholi *in vitro*. *Roczn. PZH* 2001, 52, 4, 337–345.
7. Haffner H.T., Besserer K., Graw M., Voges S.: Methanol elimination in non-alcoholics: inter- and intraindividual variation. *For. Sci. Internat.* 1997, 86, 69–76.
8. Handler J.A., Thurman R.G.: Redox interactions between catalase and alcohol dehydrogenase pathways of ethanol metabolism in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 3, 1510–1515.
9. Lanigan S.: Final report on the safety assessment of methyl alcohol. *Int. J. Toxicol.* 2001, 20, Suppl. 1, 57–85.
10. Lieber C.S.: Microsomal ethanol-oxidizing system. *Enzyme* 1987, 37, 45–56.
11. Mannering G.J., Parks R.E. Jr.: Inhibition of methanol metabolism with 3-amino-1,2,4-triazole. *Science* 1957, 126, 1241–1242.
12. Nash T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of *Hantzsch* reaction. *J. Biol. Chem.* 1953, 55, 416–421.
13. Pamies R.J., Sugar D., Rives L.A., Herold A.H.: Methanol intoxication. *Postgr. Med.* 1993, 93, 183–194.
14. Rotzinger S.S., Smith B.B., Amit Z.Z.: Catalase inhibition attenuates the acquisition of ethanol and saccharin-quinine consumption in laboratory rats. *Behav. Pharmacol.* 1994, 5, 202–209.
15. Skrzydlewska E.: Metabolizm i toksyczne działanie metanolu. *Pol. Tyg. Lek.* 1993, 48, 433–436.
16. Stone C.L., Hunley T.D., Peggs C.F., Kedishvili N.Y., Davis G.J., Thomasson H.R., Li T.K., Bosron W.F.: Cimetidine inhibition of human gastric and liver alcohol dehydrogenase isoenzymes: identification of inhibitor complex by kinetic and molecular modelling. *Biochemistry* 1995, 35, 4008–4014.
17. Tephly T.R., Watkins W.D., Goodman J.I.: The biochemical toxicology of methanol; in: *Assays in toxicology*, ed. Hayes W.J., Academic Press. New York and London, 1974, 5, 149–177.
18. von Wartburg J.P., Pepenberg J., Aebi H.: An atypical human alcohol dehydrogenase. *Can. J. Biochem.* 1965, 43, 889–893.
19. Zgirski A., Gondko R.: *Obliczenia biochemiczne*. PWN, Warszawa, 1998.
20. Zima T., Fialova L., Mestek O., Janebova M., Crkovska J., Malbohan I., Stipek S., Mikulikova L., Popov P.: Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J. Biomed. Sci.* 2001, 8, 59–70.

Otrzymano: 2003.03.24