

JAROSŁAW DUDKA¹, FRANCISZEK BURDAN², BARBARA MADEJ³, EDYTA TOKARSKA⁴,
ROBERT KLEPACZ¹, ELŻBIETA KOROBOWICZ¹

AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZY MLECZANOWEJ LUDZKICH ERYTROCYTÓW W OBECNOŚCI WYBRANYCH INHIBITORÓW DEHYDROGENAZY ALKOHOLOWEJ

HUMAN ERYTHROCYTE LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY CHANGES IN THE PRESENCE OF SOME ALCOHOL DEHYDROGENASE INHIBITORS

¹Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej AM w Lublinie
20-950 Lublin, ul. Jaczewskiego 8
Kierownik: *prof. dr hab. E. Korobowicz*
e-mail: *avel123@wp.pl*

²Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej Człowieka AM w Lublinie
Samodzielna Pracownia Teratologii Doświadczalnej
Kierownik: *prof. dr hab. Z. Wójtowicz*

³Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej Człowieka AM w Lublinie
Kierownik: *prof. dr hab. Z. Wójtowicz*

⁴Katedra i Zakład Ortopedii Szczękowej AM w Lublinie
Kierownik: *prof. dr hab. A. Komorowska*

W pracy oceniono wpływ cymetydyny, EDTA, 4-metylopirazolu oraz etanolu i metanolu na aktywność dehydrogenazy mleczanowej. Badania przeprowadzono in vitro z enzymem otrzymanym z erytrocytów ludzkich.

WSTĘP

Zatrucia metanolem i glikolem etylenowym występują stosunkowo rzadko, jednak przebieg zatrucia i rokowania są z reguły bardzo poważne. Główną przyczyną trudności terapeutycznych jest utajony okres objawów klinicznych, który zwykle trwa 12-24 godz. [1]. W tym czasie alkohole są metabolizowane do odpowiednich aldehydów, a następnie kwasów będących bezpośrednią przyczyną kwasicy metabolicznej. Podczas utleniania alkoholi za pomocą dehydrogenazy alkoholowej (ADH; E.C. 1.1.1.1) a w dalszej kolejności aldehydów przy udziale dehydrogenazy aldehydowej (E.C. 1.2.1.3) podnosi się stosunek NADH_2/NAD , który powoduje nasilenie przemiany pirogronianu do mlecza. Przemiana ta katalizowana jest przez dehydrogenazę mleczanową (LDH; E.C. 1.1.1.27) [11]. Podwyższony

poziom mleczanów obserwowany w ciężkich zatruciach [3, 6, 7, 10, 17] może dodatkowo nasilać istniejącą już kwasicę.

Kierunek reakcji katalizowanej przez LDH jest zależny od stosunku NADH_2/NAD i może przebiegać zarówno od pirogronianu do mleczanu jak i odwrotnie. W warunkach istniejących w komórce preferowaną przemianą jest redukcja pirogronianu do mleczanu. Stała szybkości reakcji, obliczana według wzoru $DE_0' = (0.059/n)\log K$, gdzie E_0' oznacza różnicę potencjałów połówkowych redox; n - ilość przenoszonych elektronów, jest równa 20 000. Oznacza to, że redukcja pirogronianu do mleczanu przebiega praktycznie do wyczerpania pirogronianu [9].

Główne kierunki terapii w omawianych zatruciach obejmują alkalizację za pomocą diwęglanu sodu oraz podawanie etanolu – konkurencyjnego inhibitora ADH, w celu zablokowania przemiany metanolu lub glikolu do bardziej toksycznych metabolitów kwasowych. W bardzo ciężkich przypadkach stosuje się dodatkowo dializę. Od kilku lat jako antidotum w zatruciach metanolem stosuje preparaty 4-metylopirazolu (4MP), który podobnie jak etanol jest inhibitorem pierwszego etapu utleniania alkoholi [1].

Celem pracy była ocena działania wybranych inhibitorów ADH na aktywność LDH w erytrocytach ludzkich. Terapeutyk, który posiadałby zarówno zdolność hamowania ADH jak i LDH mógłby skuteczniej zapobiegać powstawaniu kwasicy u pacjentów narażonych na metanol. W tym celu przebadano inhibitory ADH zarówno te, które są stosowane już w klinikach jak i te będące w fazie badań doświadczalnych (cymetydyna, EDTA). Dodatkowo w tym aspekcie został przebadany metanol będący substratem ADH.

MATERIAŁ I METODY

Krew do badań pobierano na czczo od 15 pacjentów ambulatoryjnych, mężczyzn w wieku 30-45 lat (mediana 39), u których podstawowy profil cholesterolowy (cholesterol całkowity, triglicerydy), próby wątrobowe (AspAT, AlAT) oraz próby nerkowe (kreatynina, mocznik) nie wykroczyły poza zakres wartości referencyjnych. Wszystkie parametry biochemiczne oznaczone zostały za pomocą odczynników firmy Cormay przy użyciu aparatu Express plus firmy Bayer. Krew od pacjentów pobierano z żyły łokciowej do heparynizowanych probówek i wirowano (3 000 obr./min) przez 10 minut. Następnie usuwano osocze oraz trombocyty i krwinki białe. Pozostałe erytrocyty przemywano dwukrotnie podwójną ilością soli fizjologicznej. Po każdorazowym wirowaniu (3 000 obr./min/10min) odrzucano górną warstwę zanieczyszczoną krwinkami białymi i płytkami krwi. Ściśle odmierzoną objętość krwinek czerwonych (1ml) hemolizowano z 9ml wody redestylowanej, stale wytrząsając. W celu pozbycia się zrzębu krwinkowego hemolizat wirowano przez 20 min (15 000 obr./min). Po wstępnym oznaczeniu aktywności dehydrogenazy mleczanowej za pomocą gotowego zestawu firmy Cormay, LDH-kit, supernatant do dalszych badań rozcieńczono jeszcze 10-krotnie za pomocą 0,9% NaCl.

Zastosowana procedura oznaczenia LDH wykorzystuje optymalizowaną metodę kinetyczną Niemieckiego Towarzystwa Chemii Klinicznej [13]. Zgodnie z tą procedurą, oznaczano spektrofotometrycznie spadek absorbancji podczas redukcji pirogronianu do mleczanu w temp. 37°C i pH 7,5 przy $\lambda=340\text{nm}$.

Mieszanina reakcyjna (całkowita objętość 0,2 ml) zawierała 50mM buforu fosforanowego (pH 7,5), 0,6mM pirogronianu i roztwór wodny testowanych związków. Cymetydyna (Przedsiębiorstwo Zaopatrzenia Farmaceutycznego Cefarm - Lublin), EDTA (sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego) i 4metylopirazol (Sigma-Aldrich) były dodawane w takiej ilości, aby końcowe stężenie w środowisku reakcji wynosiło 0,01; 0,10 i 1,00 mM. Natomiast metanol (Merck) i etanol (POCH) w środowisku reakcji został użyty w stężeniach 12,50; 25,00 i 50,00mM, ponieważ wartości stężeń

alkoholi we krwi, spotykane u pacjentów są znacznie wyższe niż stężenia terapeutyczne wcześniej wymienionych związków [12]. W próbach kontrolnych w miejsce roztworu poszczególnych związków dodawano taką samą objętość 0.9% NaCl. W dalszej kolejności dodawano 0.003ml supernatantu zawierającego badany enzym. Po 5 min. inkubacji w temp 37°C reakcja była inicjowana za pomocą 0,25mM zredukowanego NAD. Aktywność enzymu wyrażano w IU/l rozcieńczonego hemolizatu.

Otrzymane wyniki opracowano za pomocą programu STATISTICA 5.0. Rozkład normalny w grupach przebadano za pomocą testu *Shapiro-Wilksa*. Statystyczne istotności pomiędzy grupami oceniano stosując test *t-Studenta*. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p < 0,05$ i $p < 0,01$.

WYNIKI

Badania aktywności LDH w rozcieńczonych hemolizatach wykonano początkowo w materiale pochodzącym od 15 pacjentów. Po odrzuceniu 4 próbek w ze skrajnym wartościami aktywności LDH, dalsze badania zostały przeprowadzone na 11 próbkach.

Tabela I. Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (IU/l) w rozcieńczonych hemolizatach ludzkich w obecności cymetydyny (CM), EDTA, 4-metylopirazolu (4MP) oraz etanolu i metanolu
Lactate dehydrogenase activity (IU/l) in diluted supernatant of human hemolysates with cimetidine (CM), EDTA, 4- methylpyrazole (4MP), ethanol and methanol

	Stężenie (mM)	M ± SD	Min	Max	Mediana	Δ%	p
Kontrola		384,09±38,83	328	452	385		
CM	0,01	360,64±49,11	290	463	356	-6,10	0,2284
	0,1	329,91±55,91	259	436	327	-14,11	0,0157*
	1,00	329,18±50,35	268	427	329	-14,29	0,0096**
EDTA	0,01	358,00±54,83	305	463	329	-6,79	0,2125
	0,1	330,73±54,69	223	421	335	-13,89	0,0157*
	1,00	331,73±43,07	227	417	324	-13,63	0,0071**
4MP	0,01	373,09±64,44	310	462	367	-2,86	0,5227
	0,1	388,09±43,62	317	351	392	+1,04	0,8226
	1,00	369,82±40,45	297	443	327	-3,71	0,5363
Etanol	12,50	400,09±47,23	341	438	409	+4,16	0,2948
	25,00	395,36±49,46	333	488	391	+2,93	0,5588
	50,00	401,18±30,42	343	516	387	+4,45	0,3650
Metanol	12,50	385,54±	337	428	396	+0,38	0,9206
	25,00	387,09±	336	453	393	-0,78	0,8572
	50,00	389,91±	338	467	374	+1,51	0,7341

Wyniki są średnimi arytmetycznymi (M) z 11 oznaczeń ± odchylenie standardowe (SD)

$\Delta\% = (M_{\text{próbki}} \times 100\% / M_{\text{kontrola}}) - 100$; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ vs. kontrola

W tabeli I przedstawiono aktywność LDH w hemolizatach ludzkich erytrocytów zarówno dla różnych stężeń przebadanych związków jak i dla tych samych hemolizatów bez dodatku żadnej dodatkowej substancji (kontrola z 0,9% NaCl). Zaobserwowano spadek aktywności LDH dla wszystkich przebadanych stężeń cymetydyny i EDTA. Hamowanie aktywności nasilało się wraz ze wzrostem stężenia tak, że w środowisku 0,10mM cymetydyny i EDTA różnice te były statystycznie istotne ($p < 0,05$), a przy stężeniu 1,00mM obydwu związków, istotność różnic była bardziej znamienna ($p < 0,01$). Etanol nieznacznie podwyższał aktywność LDH, ale zmiany te nie były istotne statystycznie. Nie zauważono żadnych istotnych zmian LDH w obecności 4MP oraz metanolu.

DYSKUSJA

Cymetydyna jako odwracalny kompetycyjny antagonist receptoru H_2 jest szeroko stosowana w schorzeniach gastrycznych. Niektóre badania sugerują również, że cymetydyna podwyższa stężenia alkoholu etylowego u pacjentów [8]. W innych badaniach udowodniono również, że lek ten hamuje aktywność dehydrogenazy alkoholowej obecnej w wątrobie i przewodzie pokarmowym [5, 14]. Nasze badania wykazały, że cymetydyna w stężeniach 0,01 i 0,10mM może hamować aktywność erytrocytarnej LDH, odpowiednio o 14,11 i 14,29%. Podobny efekt obserwowaliśmy w analogicznych badaniach przeprowadzonych w ludzkiej surowicy krwi [6]. Ponieważ hamowanie LDH przebiega przy stężeniach cymetydyny, w których obserwowano również hamowanie aktywności wątrobowej ADH [5], można przypuszczać, że jej obecność ograniczy powstawanie mleczanu w komórce narażonej na metanol lub glikol etylenowy.

Jony Zn^{2+} odgrywają bardzo istotną rolę w sprawności katalitycznej zarówno ADH jak i LDH [2, 9], dlatego czynniki chelatujące, takie jak EDTA powinny hamować aktywność takich enzymów. Nasze badania potwierdzają tę hipotezę. Podobnie jak cymetydyna, 0,10mM i 1,00mM EDTA hamował o ponad 13% aktywność LDH w badanych hemolizatach. Wcześniejsze nasze badania [4] wykazały również, że EDTA hamuje aktywność ludzkiej, wątrobowej ADH w zakresie wszystkich przebadanych stężeń (0,01; 0,10; 1,00mM), co więcej efekt ten był bardziej nasilony niż ten obserwowany dla LDH, w prezentowanej pracy.

4-Metylopirazol został zalegalizowany przez FDA USA jako skuteczny i relatywnie mało toksyczny inhibitor w terapii zatruc glikolem etylenowym (1997 r.) jak i metanolem (2000 r.). Może być on niezastąpiony zwłaszcza u osób z przeciwwskazaniem do terapii etanolem i/lub hemodializą. Związek ten przejawia właściwości hamujące nie tylko w stosunku do ADH, ale również do izoenzymu cytochromu P-450 (CYP2E1), który również bierze udział w utlenianiu alkoholi u ludzi. W naszym eksperymencie nie zaobserwowaliśmy zmian aktywności LDH pod wpływem 4MP. Przeciwnie, *Sarkola* [15] obserwował istotną korelację pomiędzy działaniem 4MP i poziomem mleczanu indukowanym przez alkohol w surowicy ludzkiej. Przyczyny obserwowanych różnic mogą mieć wieloczynnikowe podłoże, jednak największe znaczenie może mieć tu charakter prowadzonych badań – stężenie mleczanu w osoczu jest wypadkową syntezy i metabolizmu w różnych tkankach, a sam poziom mleczanu nie odzwierciedla w bezpośredni sposób aktywności LDH oznaczanej w osoczu.

Zarówno etanol jak i metanol są substratami dla ADH. Jednak w naszym doświadczeniu, ani jeden ani drugi nie wpływał na dynamikę redukcji pirogronianu do mleczanu przy udziale LDH. Możemy zatem przypuszczać, że obydwa przebadane alkohole nie wpływają w sposób bezpośredni na aktywność LDH oznaczanego w erytrocytach ludzkich.

WNIOSKI

1. Z przebadanych związków najsilniejszymi inhibitorami LDH okazały się cymetydyna oraz EDTA.

2. Zarówno 4-metylopirazol, etanol jak i metanol nie wykazywały bezpośredniego wpływu na redukcję pirogronianu do mleczanu.

J. Dudka, F. Burdan, B. Madej, R. Klepacz, E. Tokarska,
E. Korobowicz

HUMAN ERYTHROCYTE LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY CHANGES IN THE PRESENCE OF SOME ALCOHOL DEHYDROGENASE INHIBITORS

Summary

The aim of the study was to evaluate the effect of alcohol dehydrogenase (ADH; E.C. 1.1.1.1) inhibitors and substrates: cimetidine, 4-methylpyrazole (4MP), EDTA, ethanol and methanol on lactate dehydrogenase (LDH; E.C. 1.1.1.27) activity. The activity of LDH was spectrophotometrically determined in in-vitro prepared diluted hemolysates obtained from human erythrocytes with mentioned compounds at the concentrations 0.01, 0.1, 1.0 mM of cimetidine, EDTA, 4MP and 12.5, 25.0, 50.0 mM of ethanol and methanol. The reaction was conducted at 37°C in pH 7.5 and changes of optical density was measured at $\lambda=340\text{nm}$. LDH activity was significantly inhibited by 0.10 mM ($p<0.05$) and 1.0mM ($p<0.01$) of cimetidine and EDTA. There were no observed any significant changes vs. control in LDH activity when 4MP, ethanol or methanol was added to environment of reaction.

PIŚMIENNICTWO

1. *Barceloux D.G., Bond G.R., Krenzelok E.P., Cooper H., Vale J.A.*: American Academy of Clinical Toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2002, 40, 415-446.
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. *Cytryn E., Futeral B.*: Lactate accumulation in methanol poisoning. *Lancet.* 1983, 2, 56-59.
4. *Dawidek-Pietryka K., Dudka J., Szczepaniak S.*: Inhibition alcohol dehydrogenase by selected compounds in methanol end ethylene glycol transformation. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2000, 33, 155-160.
5. *Dawidek-Pietryka K., Szczepaniak S., Dudka J., Mazur M.*: In vitro studies of human alcohol dehydrogenase inhibition in the process of methanol and ethylene glycol oxidation. *Arch. Toxicol.* 1998, 72, 604-607.
6. *Dudka J., Dawidek-Pietryka K., Burdan F., Klepacz R., Korobowicz E.*: Lactate dehydrogenase activity changes in the presence of some alcohol dehydrogenase inhibitors. *Advances in Medical Science – w druku.*
7. *Eder A.F., McGrath C.M., Dowdy Y.G., et al.*: Ethylene glycol poisoning: toxicokinetic and analytical factors affecting laboratory diagnosis. *Clin. Chem.* 1998, 44, 168-177.
8. *Holdcroft C.*: Cimetidine and ranitidine affect blood-alcohol levels. *Nutr. Pract.* 1992, 17, 80-84.
9. *Kafarski P., Lejczak B.*: *Chemia Bioorganiczna*. PWN, Warszawa 1994.
10. *Lecky F.E., Little R.A., Maycock P.F., et al.*: Effect of alcohol on the lactate/pyruvate ratio of recently injured adults. *Crit. Care Med.* 2002, 30, 981-985.
11. *Liber C.*: The metabolism of alcohol. *Sci. Am.* 1976, 234, 25-38.

12. *Lushine K.A, Harris C.R, Holger J.S.*: Methanol ingestion: prevention of toxic sequelae after massive ingestion. *J. Emerg. Med.* 2003, 24, 433-436.
13. *Pesce A.J., Kaplan L.A.*: *Method in Clinical Chemistry Mosby Year Book*, St. Lois, 1987, 903-910.
14. *Pozzato G., Stebel M., Lunazzi G., Moretti., Franzin F.*: Influence of acid secretion blockers on gastric and hepatic alcohol dehydrogenase in rat. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1992, 52, 747-752.
15. *Sarkola T., Iles M.R., Kohlenberg-Mueller K., Eriksson C.J.*: Ethanol, acetaldehyde, acetate, and lactate levels after alcohol intake in white men and women: effect of 4-methylpyrazole. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2002, 26, 239-245.
16. *Shahangian S., Ash K.O.*: Formic and lactic acidosis in a fatal case of methanol intoxication. *Clin. Chem.* 1986, 32, 395-397.
17. *Smith S.R., Smith S.J., Buckley B.M.*: Combined formate and lactate acidosis in methanol poisoning. *Lancet.* 1981, 8258,1295-1296.

Otrzymano: 2004.02.09