

УДК 577.151.042

КИСЛОВА О. В.

Київський національний університет технологій та дизайну

ІНГІБУВАННЯ АМІДАМИ ЗАМІЩЕНИХ БЕНЗОЙНИХ КИСЛОТ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОЇ АЛКОГОЛЬДЕГІДРОГЕНАЗИ НЕЧІНКИ ЩУРІВ

Мета. Дослідити вплив амідів заміщених бензойних кислот на активність NAD^+ -залежної алкогольдегідрогенази в умовах *in vitro*, з'ясувати зв'язок між структурою сполук та їх впливом на швидкість ферментативної реакції, а також кінетику взаємодії ефективних інгібіторів з ферментом та механізм інгібування.

Методика. Дослідження проводили з використанням цитоплазматичної алкогольдегідрогенази печінки щурів, яку отримували методом диференціального центрифугування. Активність фермента визначали спектрофотометричним методом. Для вивчення кінетичного характеру взаємодії ферменту з інгібіторами використовували розчини амідів заміщених бензойних кислот в диметилацетаміді в концентраціях 12,5-100 мкМ. Отримані дані представляли в координатах подвійних обернених величин за методами Lineweaver-Burk та Yoshino-Murakami.

Результати. Досліджені аміди заміщених бензойних кислот є інгібіторами цитоплазматичної алкогольдегідрогенази. Серед досліджених сполук найбільш ефективно пригнічує активність фермента 2,4-дихлор-5-метилбензамід (на 60%). Він виявляє змішаний характер інгібування по відношенню до етанолу при насичуючих концентраціях NAD^+ . Поглиблене вивчення даного процесу показало, що при низьких концентраціях етанолу (до 2 мМ) амід знижує активність ферменту за неконкурентним типом з константою інгібування 35 мкМ. При збільшенні концентрації спирту характер інгібування змінюється на безконкурентний.

Наукова новизна. Серед амідів заміщених бензойних кислот виявлено ефективний інгібітор активності алкогольдегідрогенази - 2,4-дихлор-5-метилбензамід.

Практична значимість. Інгібітор активності алкогольдегідрогенази 2,4-дихлор-5-метилбензамід може бути використаний як потенційний антидот при отруєннях токсичними спиртами для запобігання утворенню більш токсичних продуктів їх біотрансформації.

Ключові слова: аміди заміщених бензойних кислот, антидот, алкогольдегідрогеназа, інгібітор, активність фермента.

Вступ. Біотрансформація токсичних спиртів (метанолу, хлоретанолу, бутандіолу, аллілового спирту, етиленгліколю та його ефірів та ін.) відбувається за участю цитоплазматичної алкогольдегідрогенази (АДГ, ЕС 1.1.1.1), яка каталізує перетворення спиртів в альдегіди з використанням кофактора NAD^+ . Подальше окиснення альдегідів з утворенням відповідних кислот каталізує альдегіддегідрогеназа (АльДГ). Альтернативні системи метаболізму спиртів (мікросомальна етанолокиснююча система (МЕОС), каталазноксантиноксдазна) не відіграють суттєвої ролі в біотрансформації зазначених спиртів в умовах важких інтоксикацій ними [1,2].

Ефективними засобами антидотної терапії гострих отруєнь спиртами є інгібітори АДГ, які запобігають утворенню високотоксичних альдегідів та сприяють виведенню отруйних спиртів в незмінному вигляді. Нині відома значна кількість сполук, здатних пригнічувати активність АДГ. Це похідні піразолів, амідів, сульфоксидів, оксимів. Дія ряду інгібіторів обумовлена блокадою каталітично активного цинку, що входить до складу активного центра фермента, інших - зв'язуванням тіолових груп [3].

Сучасні методи антидотної терапії отруєнь спиртами, які метаболізують в організмі з утворенням токсичних альдегідів, поєднують застосування інгібіторів АДГ (4-метилпіразолу, амиду ізовалеріанової кислоти, бензаміду) та введення етанолу, який має високу

спорідненість до АДГ. Це призводить до зменшення утворення метаболітів і сприяє виведенню токсичних спиртів з організму в незміненому вигляді [1]. Якщо токсичність спиртів обумовлена їх кислотними метаболітами, підвищення ефективності антидотної терапії може бути досягнуто поєднанням інгібіторів АДГ та АльДГ [3]. Тому перспективним напрямком є пошук нових ефективних інгібіторів активності ферментів окиснення спирів, які виявляють більшу специфічність і нижчу токсичність.

Постановка завдання. Дослідити в умовах *in vitro* вплив амідів заміщених бензойних кислот на активність NAD^+ -залежної АДГ та кінетику їх взаємодії, механізм інгібування, з'ясувати зв'язок між хімічною будовою сполук та її впливом на швидкість протікання ферментативної реакції.

Матеріали та методи дослідження. Для роботи були використані наступні реактиви: NAD^+ («Sigma», США), сироватковий альбумін людини («Reanal», Угорщина). Інші реагенти були вітчизняного виробництва. Досліджувані аміді заміщених бензойних кислот були синтезовані в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

Цитоплазматичну фракцію печінки безпородних білих щурів отримували методом диференціального центрифугування при 105000 g та температурі 4°C. Концентрацію білка визначали методом прямого спектрофотометрування та розраховували за формулою $C(\text{мг/мл}) = 1,46E_{280} - 0,74E_{260}$ [4]. Швидкість прямої АДГ-реакції визначали спектрофотометричним методом на приладі "Beckman DU-6" (США) при довжині хвилі 340 нм і виражали в нмоль $\text{NADH}/(\text{мг білка} \cdot \text{хв})$ [5]. Реакційна суміш містила 0,1 М Na -фосфатний буфер ($\text{pH} = 7,3$); 0,040 М KCl ; 500 мкг білка; 0,5 мМ NAD^+ ; 1-5 мМ етанолу. Для вивчення кінетики взаємодії ферменту з інгібітором в аналізовану суміш вносили розчини речовин в концентраціях 12,5-100 мкМ і преінкубували протягом 5 хв. Реакцію починали додаванням субстрату.

Результати дослідження. Перспективним напрямком удосконалення антидотної терапії при інтоксикаціях токсичними спиртами є використання специфічних інгібіторів АДГ, зокрема амідів бензойних кислот. В роботі було досліджено вплив ряду амідів заміщених бензойних кислот на активність NAD^+ -залежної цитоплазматичної АДГ печінки щурів: 2- та 4-хлорбензамід, 2,4-дихлорбензамід, 2,4-дихлор-5-метилбензамід (рис.1).

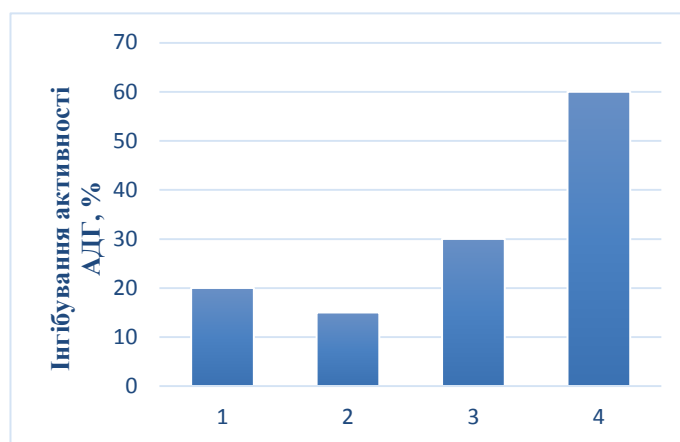


Рис.1. Інгібування активності АДГ амідми заміщених бензойних кислот в концентрації 100 мкМ: 1) 2-хлорбензамід, 2) 4-хлорбензамід, 3) 2,4-дихлорбензамід, 4) 2,4-дихлор-5-метилбензамід

Проведені дослідження показали, що монозаміщені бензаміди пригнічували швидкість реакції тільки на 15-20%, наявність двох залишків хлору в структурі сполук підвищувало ступінь інгібування активності ферменту до 30%. Введення додаткової метильної групи в молекулу 2,4-дихлор-5-метилбензаміду збільшувало цей ефект до 60%. Загалом можна стверджувати, що електронні фактори суттєво не впливають на здатність досліджуваних сполук інгібувати активність ферменту. Електронна густина бензольного ядра незначно зменшується при введенні залишків хлору в орто- та пара- положення, тоді як наявність метильної групи в мета-положенні призводить до незначного збільшення електронної густини. Можливо, більш вагомим для стабілізації третинних комплексів є вплив гідрофобних факторів.

Подальші дослідження проводили з використанням 2,4-дихлор-5-метилбензаміду. Ця сполука оборотно взаємодіє з ферментом, оскільки спостерігається стабілізація активності АДГ в процесі преінкубації з інгібітором в стані рівноваги. З точки зору ферментативної кінетики реакція окиснення спиртів, яка каталізується АДГ, є двохсубстратною (спирт і NAD^+) і відбувається за впорядкованим Бі-Бі механізмом. Приєднання NAD^+ призводить до зміни конформації ферменту і сприяє подальшому зв'язуванню спирту [6].

Вплив 2,4-дихлор-5-метилбензаміду на швидкість ферментативної реакції визначали при постійній концентрації NAD^+ і різних концентраціях етанолу. Отримані дані представляли в координатах подвійних обернених величин за методом *Lineweaver-Burk* [7]. Інгібування швидкості АДГ-реакції різними концентраціями сполуки при зміні концентрації етанолу виявило змішаний характер (рис.2).

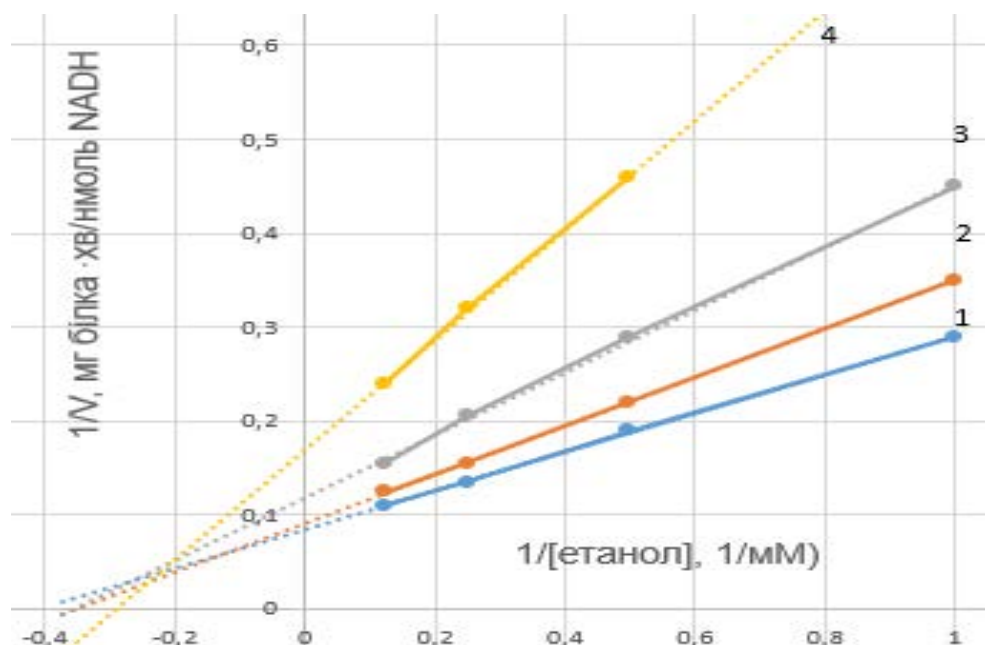


Рис.2. Залежність швидкості АДГ реакції від концентрації етанолу в присутності 2,4-дихлор-5-метилбензаміду в концентраціях 0, 25, 50, 75 мкМ для прямих 1-4 відповідно при насичуючих концентраціях NAD^+

Для безпосереднього визначення константи інгібування та поглибленого аналізу механізму взаємодії ферменту з інгібітором використали графічний метод Yoshino та Murakami [8] (рис.3). Графіки залежності $(V-v)/v$ від концентрації інгібітора при низьких

значеннях концентрації спирту 1 мМ та 2 мМ виявляють неконкурентний характер з уявною константою інгібування 35 мкМ (прямі 1 та 2 на рис.3).

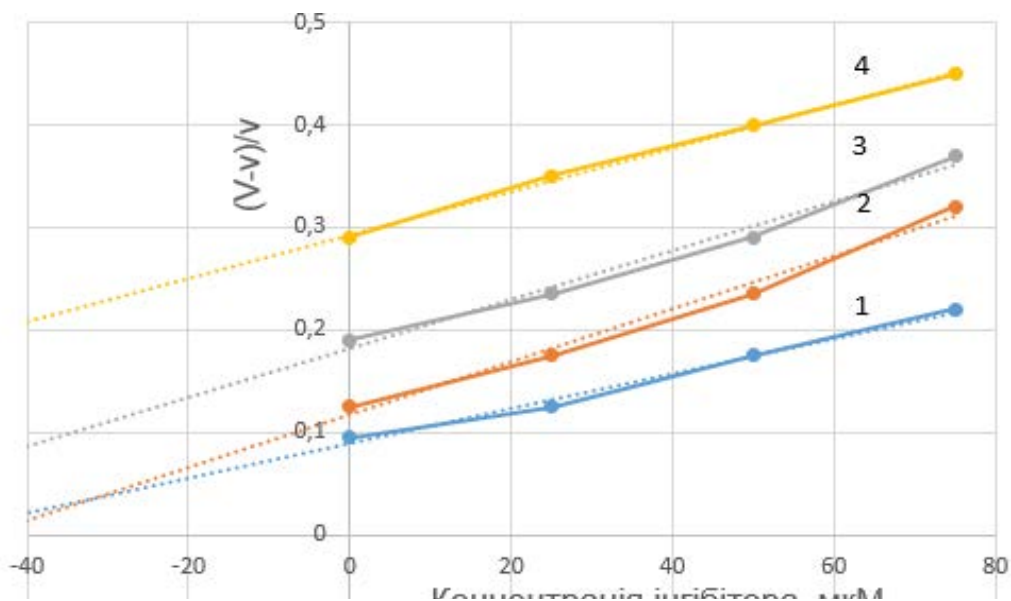


Рис. 3. Залежність швидкості АДГ реакції від концентрації 2,4-дихлор-5-метилбензаміду при концентраціях етанолу 1, 2, 4, 8 мМ для прямих 1-4 відповідно при насичуючих концентраціях NAD^+

При неконкурентному інгібуванні ферментативної реакції інгібітор взаємодіє з ферментом на ділянці, яка не є активним центром. Він може зв'язуватися або з ферментом, або з фермент-субстратним комплексом, утворюючи неактивний комплекс.

Приєднання неконкурентного інгібітора змінює конформацію молекули ферменту таким чином, що порушується взаємодія субстрату з активним центром ферменту. При підвищенні концентрації спирту характер інгібування змінюється на безконкурентний (прямі 3 та 4 на рис.3): інгібітор зв'язується в активному центрі з фермент-субстратним комплексом. Збільшення концентрації субстрату призводить до зростання концентрації фермент-субстратного комплексу, а також посилює зв'язування інгібітора з ним [9].

Висновок. Проведені дослідження показали, що введення кількох замісників в ароматичне кільце амідів підвищує їх інгібуючу здатність та обумовлює більш складний характер взаємодії амідів заміщених бензойних кислот з цитоплазматичною АДГ. Серед досліджених сполук ефективним оборотним інгібітором АДГ є 2,4-дихлор-5-метилбензамід, який в умовах *in vitro* пригнічує активність фермента на 60%. Він виявляє змішаний характер інгібування по відношенню до спирту при насичуючих концентраціях NAD^+ . При низьких концентраціях етанолу (до 2 мМ) амід знижує активність ферменту за неконкурентним типом з константою інгібування 35 мкМ. При збільшенні концентрації спирту характер інгібування змінюється на безконкурентний. Необхідне подальше глибоке дослідження 2,4-дихлор-5-метилбензаміду в умовах *in vivo* як перспективного засобу фармакотерапії для застосування в комплексній терапії гострих отруєнь спиртами.

Література

1. Lee S. Oxidation of methanol, ethylene glycol, and isopropanol with human alcohol dehydrogenases and the inhibition by ethanol and 4-methylpyrazole / S.Lee, H.Shih, Y.Chi et al. // *Chem.-Biol. Interactions* – 2011. – Vol.191, 1-3. – P.26-31.
2. Dawidek-Pietryka K. Effect of some ADH inhibitors on microsomal alcohol oxidizing system activity in vitro / K.Dawidek-Pietryka, J.Dudka // *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* – 2001. –Vol.52(4). – P.337-345.
3. Marraffa J. Antidotes for Toxicological Emergencies / J.Marraffa, V.Cohen, M.Howland // *Am. J. Health Syst. Pharm.* – 2012. – Vol.69(3). – P.199-212.
4. Okutucu B. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration / B.Okutucu, A.Dincer, O.Habib, F.Zihnioglu // *J. Of Biochem. And Biophys. Methods.* – 2007.–Vol. 70, Issue 5.– P. 709-711.
5. Walker JRL. Spectrophotometric determination of enzyme activity: alcohol dehydrogenase (ADH) / JRL.Walker // *Biochemical Education.* – 1992. – Vol. 20, Issue 1.– P. 42-43.
6. Aslan H. Phenolic compounds: The inhibition effect on polyol pathway enzymes / H.Aslan, Ş.Beydemir // *Chemico-Biological Interactions.* – 2017. – Vol.266. – P. 47-55.
7. N. Bhagavan, C.-E. Ha. Essentials of medical biochemistry. – 2011. – P. 47-58.
8. Yoshino M. A graphical method for determining inhibition constants / M.Yoshino, K. Murakami// *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* – 2009. – Vol. 24(6). – P.1288–1290.
9. Piapp B. Uncompetitive Inhibitors of Alcohol Dehydrogenases / B.Piapp, V.Chadha, K.Leidal et al. // *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism.* – 1999. – P. 295-303.

References

1. Lee S., Shih H., Chi Y. et al. (2011). Oxidation of methanol, ethylene glycol, and isopropanol with human alcohol dehydrogenases and the inhibition by ethanol and 4-methylpyrazole. *Chem.-Biol. Interactions*, 191, 1-3, 26-31.
2. Dawidek-Pietryka K., Dudka J. (2001). Effect of some ADH inhibitors on microsomal alcohol oxidizing system activity in vitro. *Rocz.Panstw.Zakl.Hig.*, 52(4), 337-345.
3. Marraffa J., Cohen V., Howland M. (2012). Antidotes for Toxicological Emergencies. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 69(3), 199-212.
4. Okutucu B., Dincer A., Habib O., Zihnioglu F. (2007). Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *J. of Biochem. and Biophys. Methods*, 70(5), 709-711.
5. Walker JRL. (1992). Spectro-photometric determination of enzyme activity: alcohol dehydrogenase (ADH). *Biochemical Education*, 20 (1), 42-43.
6. Aslan H., Beydemir S. (2017). Phenolic compounds: The inhibition effect on polyol pathway enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, 266; 47-55.
7. Bhagavan N., Ha C.-E. (2011). Essentials of medical biochemistry. 47-58.
8. Yoshino M., Murakami K. (2009). A graphical method for determining inhibition constants. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(6), 1288–1290.
9. Piapp B., Chadha V., Leidal K. et al. (1999). Uncompetitive Inhibitors of Alcohol Dehydrogenases. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, 7, 295-303.

KISLOVA OLGA

ORCID: orcid.org/0000-0002-0223-1860

Department of Chemistry and Electrochemical Energy
Kyiv National University of Technologies and Design

ИНГИБИРОВАНИЕ АМИДАМИ ЗАМЕЩЕННЫХ БЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС КИСЛОВА О. В.

Киевский национальный университет технологий и дизайна

Цель. Исследовать влияние амидов замещенных бензойных кислот на активность NAD^{+} -зависимой алкогольдегидрогеназы в условиях *in vitro*, установить зависимость между структурой

соединений и их влиянием на скорость ферментативной реакции, а также кинетический характер взаимодействия эффективных ингибиторов с ферментом.

Методика. Исследования проводились с использованием цитоплазматической алкогольдегидрогеназы печени крыс, которую получали методом дифференциального центрифугирования. Активность фермента определяли спектрофотометрическим методом. Для изучения кинетического характера взаимодействия фермента с ингибиторами использовали растворы амидов замещенных бензойных кислот в концентрациях 12,5-100 мкМ. Полученные данные представляли в координатах двойных обратных величин по методам Lineweaver-Burk и Yoshino - Murakami.

Результаты. Исследованные амиды замещенных бензойных кислот являются ингибиторами цитоплазматической алкогольдегидрогеназы. Наиболее эффективно (до 60%) подавляет активность фермента 2,4-дихлор-5-метилбензамид. Он проявляет смешанный характер ингибирования по отношению к этанолу при насыщающих концентрациях NAD^+ . Углубленное изучение данного процесса показало, что при низких концентрациях этанола (до 2 мМ) амид снижает активность фермента по неконкурентному типу с константой ингибирования 35 мкМ. При увеличении концентрации спирта характер ингибирования становится бесконкурентным.

Научная новизна. Среди исследованных бензамидов обнаружен эффективный ингибитор активности NAD^+ -зависимой АДГ - 2,4 дихлор-5-метилбензамид.

Практическая значимость. Выявлен эффективный ингибитор алкогольдегидрогеназы, который может применяться как потенциальный антидот при отравлениях токсическими спиртами и продуктами их биотрансформации.

Ключевые слова: амиды замещенных бензойных кислот, антидот, алкогольдегидрогеназа, ингибитор, активность фермента.

INHIBITION THE RAT CYTOPLASMATIC ALCOHOL DEHYDROGENASE BY SUBSTITUTED BENZOIC ACID AMIDES OF RATS' LIVER KYSLOVA O. V.

Kyiv National University of Technologies and Design

Purpose. The main purpose of this work was to investigate the influence of substituted benzoic acid amides on the activity of NAD^+ -dependent alcohol dehydrogenase in vitro, to study the kinetic nature of the effective inhibitors interaction with the enzyme, to establish the relationship between the chemical structure of compounds and their influence on the rate of the enzymatic reaction.

Methodology. The studies were carried out using rat liver cytoplasmic alcohol dehydrogenase, which was obtained by differential centrifugation. The enzyme activity was determined by spectrophotometric method. To study the kinetic nature of the enzyme interaction with inhibitors, solutions of substituted benzoic acid amides at concentrations of 12.5-100 μM were used. The obtained data were presented in double reciprocal coordinates using the Lineweaver-Burk and Yoshino-Murakami methods.

Findings. An effective reversible inhibitor of cytoplasmic ADH was revealed among the studied substituted benzoic acid amides. 2,4-dichloro-5-methylbenzamide inhibited the enzyme activity up to 60%. It exhibited a mixed character of inhibition in relation to ethanol at saturating concentrations of NAD^+ . An in-depth study of this process showed that the amide inhibited the enzyme activity in a non-competitive type at low ethanol concentrations (up to 2 mM) with an inhibition constant of 35 μM . When the alcohol concentration was increased, the character of inhibition became uncompetitive.

Originality. The kinetic type of the interaction between the NAD^+ -dependent alcohol dehydrogenase and the new inhibitor of its activity was investigated.

Practical value. The new ADH inhibitor has been identified. It can be used as a potential antidote for poisoning with toxic alcohols and their biotransformation products.

Keywords: amides of substituted benzoic acids, antidote, alcohol dehydrogenase, inhibitor, enzyme activity.