

УДК 577.151.042

КИСЛОВА О. В.

Київський національний університет технологій та дизайну

ВПЛИВ ЗАМІЩЕНОГО НІКОТИНАМІДУ ТА ЙОГО МОЖЛИВИХ МЕТАБОЛІТІВ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ОБМІНУ ЕТАНОЛУ

Мета. Дослідити дію *N*-феніл-*N*-(1-циклопропілетил)нікотинамід та можливих його метаболітів: гідрохлоридів *N*-(1-циклопропілетил)аміну та *N*-феніл-*N*-(1-циклопропілетил)аміну - на активність ферментів основного шляху метаболізму етанолу – алкогольдегідрогенази та альдегіддегідрогенази - в умовах *in vitro*, а також кінетичний характер їх взаємодії.

Методика. Дослідження проводили з використанням алкогольдегідрогенази та альдегіддегідрогенази субклітинних фракцій печінки щурів, які отримували методом диференціального центрифугування. Активність ферментів визначали спектрофотометричним методом. Кінетичний характер їх взаємодії з заміщеним нікотинамідом досліджували в діапазоні концентрацій 25-100 мкМ. Отримані результати обробляли за методом Лайнуївера-Берка.

Результати. Проведені дослідження показали, що *N*-феніл-*N*-(1-циклопропілетил)-нікотинамід зменшує швидкість зворотньої алкогольдегідрогеназної реакції відновлення ацетальдегіду до етанолу в присутності NADH на 46% з константою інгібування 53 мкМ. Активність розчинної альдегіддегідрогенази мітохондрій пригнічувалась на 50% з константою інгібування 108 мкМ. Кінетичний характер взаємодії заміщеного нікотинамідом з ферментами при насичуючих концентраціях кофакторів реакції NADH та NAD⁺ є достатньо складним. Значну роль в ферментативній активності можуть відігравати алостеричні ефекти. Можливі метаболіти дослідженої сполуки - гідрохлориди *N*-(1-циклопропілетил)аміну та *N*-феніл-*N*-(1-циклопропілетил)аміну - достовірно не змінювали активність ферментів обміну етанолу.

Наукова новизна. Виявлено новий інгібітор активності зворотньої алкогольдегідрогеназної реакції та розчинної мітохондріальної ізоферментної форми альдегіддегідрогенази, які змінюють метаболізм етанолу та призводять до накопичення ацетальдегіду в організмі.

Практична значимість. *N*-феніл-*N*-(1-циклопропілетил)нікотинамід може бути використаний як потенційний антиалкогольний препарат сенсibilізуючої дії.

Ключові слова: алкогольдегідрогеназа, альдегіддегідрогеназа, інгібітор, препарати сенсibilізуючої дії.

Вступ. Одним з методів лікування хронічного алкоголізму та протирецидивної терапії є застосування засобів сенсibilізуючої дії, які значно підвищують чутливість організму до спиртних напоїв. Основним шляхом метаболізму етанолу в організмі є його перетворення за участю алкогольдегідрогенази (АДГ, КФ 1.1.1.1), яка каталізує окиснення спиртів (пряма реакція) та відновлення альдегідів (зворотня реакція) в присутності кофакторів NAD⁺ та NADH відповідно. Подальше окиснення ацетальдегіду до оцтової кислоти з використанням кофактора реакції NAD⁺ відбувається за участю альдегіддегідрогенази (АльДГ, КФ 1.2.1.3) [1-3]. Саме на інгібуванні активності цього ферменту і накопиченні в організмі ацетальдегіду базується принцип дії препаратів сенсibilізуючої дії. В результаті ацетальдегідної інтоксикації виникають важкі порушення в функціонуванні організму (так звана дисульфірам-алкогольна реакція), що спонукає пацієнтів зменшувати або припиняти вживання спиртних напоїв [4,5].

До сенсibilізуючих препаратів належать дисульфірам, карбамід кальцію, метронідазол, фуразолідон. Аналогічну дисульфірам-алкогольну реакцію викликає копрін, виділений з грибів *Coprinopsis atramentarius* та ідентифікований як *N*-(1-гідроксциклопропіл)-

L-глутамін, активним метаболітом якого є аміноциклопропанол [4]. Проте тривалий прийом зазначених препаратів супроводжується високим ризиком розвитку серйозних ускладнень та смертельними випадками.

Тому перспективним напрямком лікувальної терапії є пошук нових ефективних лікувальних засобів, а також створення комбінованих препаратів, які виявляють більшу специфічність і нижчу токсичність [5]. Наприклад, препарат Лідевін містить крім дисульфіраму ще нікотинамід та аденін. Такий склад препарату забезпечує виражений вияв алкоголь-дисульфірамової реакції при малих дозах препарату і алкоголю, водночас зменшує токсичність дисульфіраму та ризик виникнення побічних ефектів, покращує результат лікування.

Постановка завдання. Дослідити дію N-феніл-N-(1-циклопропілетил)нікотинамід та можливих його метаболітів: гідрохлоридів N-(1-циклопропілетил)аміну та N-феніл-N-(1-циклопропілетил)аміну - на активність ферментів обміну етанолу та кінетичний характер їх взаємодії в умовах *in vitro*.

Матеріали та методи дослідження. Було використано наступні реактиви: натрій дезоксихолат, ротенон, NAD^+ та NADH ("Sigma", США); сироватковий альбумін людини ("Reanal", Угорщина); барвник кумасі діамантовий блакитний G-250 ("Serva", США). Інші реагенти були вітчизняного виробництва. Досліджувані сполуки були синтезовані в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

Субклітинні фракції печінки безпородних білих щурів отримували методом диференціального центрифугування при температурі 4°C. Концентрацію білка цитоплазматичної фракції визначали методом прямого спектрофотометрування [6], інших фракцій - за методом Бредфорда [7]. Швидкість прямої та зворотної АДГ-реакцій та активність різних ізоферментних форм АльДГ визначали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 340 нм і виражали в нмоль $\text{NADH}/(\text{мг білка} \cdot \text{хв})$ [8]. Реакційна суміш містила: 1) для АДГ: 0,1 М Na-фосфатний буфер ($\text{pH} = 7,3$), 0,040 М KCl, 500 мкг білку, для прямої реакції – 1 мМ NAD^+ та 1-5 мМ етанолу, для зворотної реакції – 0,5 мМ NADH та 0,25-1 мМ ацетальдегіда; 2) для АльДГ: 50 мМ Na-пірофосфатний буфер ($\text{pH} = 8,8$); 500 мкг білку; 0,5 мМ NAD^+ ; 0,0125-5 мМ ацетальдегіду, 1 мкМ ротенону для мітохондріальної фракції (інгібітор NADH -оксидази). Спектрофотометричні вимірювання проводили протягом 5 хв на приладі "Beckman DU-6" (США). N-феніл-N-(1-циклопропілетил)нікотинамід розчиняли в етанолі з об'ємною часткою 96%, а гідрохлориди - у воді.

Результати дослідження. N-феніл-N-(1-циклопропілетил)нікотинамід (I) містить циклопропільний залишок - активний компонент копріну з сімейства грибів Coprinopsis, що виявляє сенсibiliзуючу дію, а також залишок нікотинамід, який відіграє важливу роль в біохімічних процесах в організмі, входить до складу NAD^+ та NADH , необхідних для функціонування ферментів етанол-окиснюючої системи та здатен знижувати токсичний вплив препаратів [1,4]. Вплив заміщеного нікотинамід та його можливих метаболітів - гідрохлоридів N-(1-циклопропілетил)аміну (II) та N-феніл-N-(1-циклопропілетил)аміну (III)- на активність ферментів етанолокиснюючої системи наведено в таблиці.

**Вплив N-феніл-N-(1-циклопропілетил)нікотинамід (I),
N-(1-циклопропілетил)аміну (II) та N-феніл-N-(1-циклопропілетил)аміну (III)
на активність ферментів обміну етанолу (нмоль NADH/(мг білку·хв), $M \pm m$, $n=6$)**

Шифр сполук	Активність АДГ		Активність ізоферментних форм АльДГ		
	Пряма реакція	Зворотня реакція	Розчинна мітохондрій	Мембранна мітохондрій	Мембранна мікросом
Контроль	6,32±0,96	5,83±0,66	9,61±0,67	14,88±1,98	7,26±0,97
I	5,12±0,89	3,17±0,45*	4,83±0,81*	13,86±1,83	6,29±1,45
II	5,69±0,89	6,12±0,92	8,13±0,67	16,67±2,14	7,05±0,78
III	6,64±1,18	5,66±1,05	9,45±1,03	15,72±1,14	8,18±1,13

Проведені дослідження показали, що в умовах *in vitro* N-феніл-N-(1-циклопропілетил)-нікотинамід (I) пригнічував активність АДГ, яка каталізує зворотню реакцію відновлення ацетальдегіду до етанолу в присутності NADH, на 46%.

В печінці щурів АльДГ представлена трьома ізоферментними формами: розчинна мітохондріальна форма та мембранні форми мітохондрій і мікросом. Перша з них відіграє основну роль при окисненні ацетальдегіду в фізіологічних умовах, функціонування мембранозв'язаних форм відбувається в умовах хронічного алкоголізму [3]. Проведені дослідження показали, що циклопропілетилвмісний нікотинамід зменшував активність тільки розчинної АльДГ мітохондрій на 50%. Можливі метаболіти заміщеного нікотинамід - гідрохлориди N-(1-циклопропілетил)аміну (II) та N-феніл-N-(1-циклопропілетил)аміну (III) - достовірно не змінювали активність ферментів обміну етанолу. Таким чином, інгібуючу здатність виявляє N-феніл-N-(1-циклопропілетил)нікотинамід в цілому, тоді як коприн в умовах *in vitro* є неактивним, а його метаболіт 1-аміноциклопропанол в умовах *in vivo* інгібує розчинну АльДГ [4].

З точки зору ферментативної кінетики реакції, які каталізуються АДГ та АльДГ, є двохсубстратними (спирт (альдегід) та NAD^+ ($NADH$)) і відбуваються за впорядкованим Бі-Бі механізмом. Приєднання NAD^+ ($NADH$) призводить до зміни конформації ферменту і сприяє подальшому зв'язуванню спирту або альдегіду [9]. Інгібування швидкості зворотньої АДГ-реакції та розчинної АльДГ мітохондрій призводить до накопичення ацетальдегіду в організмі. N-феніл-N-(1-циклопропілетил)нікотинамід оборотно взаємодіє з обома ферментами, оскільки спостерігається стабілізація їх активності в процесі преінкубації. Вплив інгібітора на швидкість зворотньої АДГ-реакції визначали при насичуючій концентрації NADH і різних концентраціях ацетальдегіду (рис.1а).

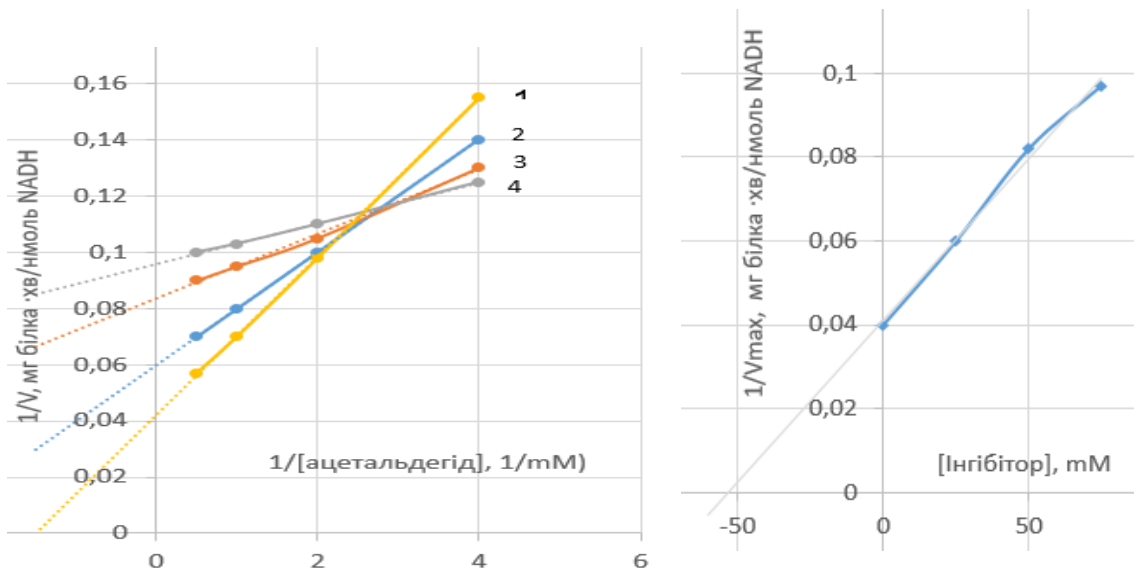


Рис.1. а) Залежність швидкості зворотної АДГ – реакції від концентрації ацетальдегіду в присутності N-феніл-N-(1-циклопропілети)нікотинаміду в концентраціях 0, 25, 50, 75 мкМ для прямих 1-4 відповідно при насичуючих концентраціях NADH; б) вторинний графік перетинів прямих 1-4 з віссю ординат в координатах Лайнуівера-Берка (рис.1а) від концентрації інгібітора

Отримані дані представляли в координатах подвійних обернених величин за методом Лайнуівера-Берка [9]. При низьких концентраціях ацетальдегіду амід виступає як активатор, а при зростанні концентрацій – як інгібітор. Такий складний характер інгібування переважно спостерігається для багатосубстратних реакцій. Приєднання інгібітора змінює конформацію молекули ферменту таким чином, що порушується взаємодія субстрату з активним центром ферменту та відбувається зниження швидкості ферментативної реакції. За даними вторинного графіку залежності перетинів прямих 1-4 з віссю ординат в координатах Лайнуівера-Берка від концентрації інгібітора константа інгібування становить 53 мкМ (рис. 1б).

Для розчинної АльДГ мітохондрій характер інгібування по відношенню до ацетальдегіду при насичуючих концентраціях NAD⁺ змінювався від безконкурентного (прямі 2,3 при концентрації амиду до 50 мкМ) до змішаного (пряма 4) (рис. 2а). При невисоких концентраціях інгібітор може зв'язуватись тільки з фермент-субстратним комплексом та дезактивувати його. При підвищенні концентрацій можлива взаємодія з алостеричними центрами ферменту, що робить його конфігурацію непридатною для ефективного каталізу.

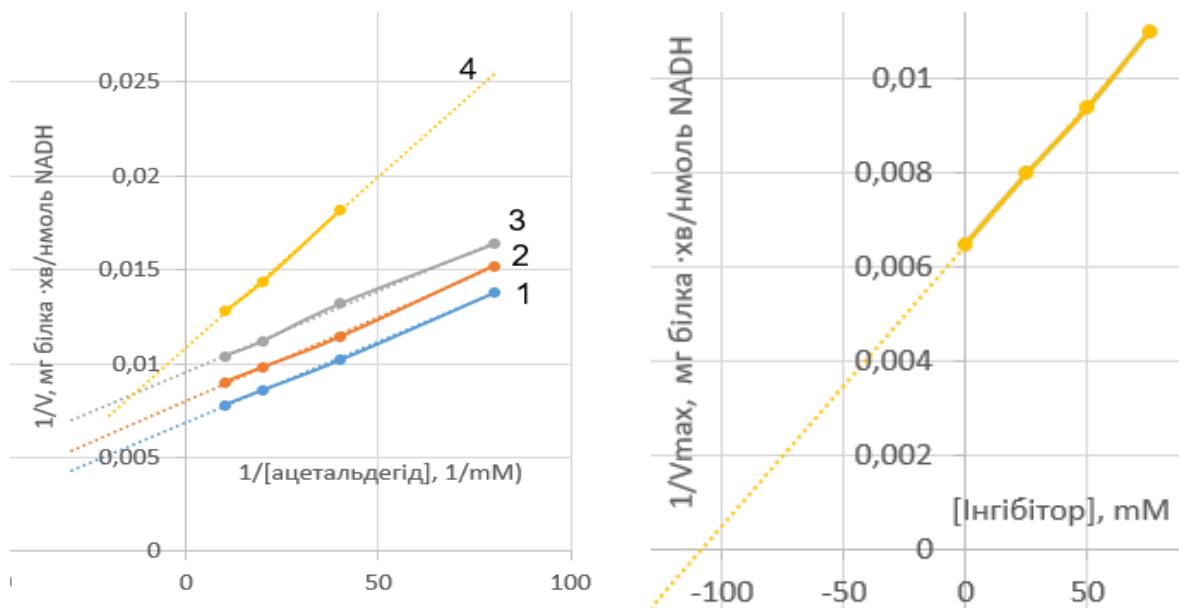


Рис.2. а) Залежність швидкості АльДГ реакції від концентрації ацетальдегіду в присутності N-феніл-N-(1-циклопропілетил)нікотинамід у концентраціях 0, 25, 50, 75 мкМ для прямих 1-4 відповідно при насичуючих концентраціях NAD⁺; б) Вторинний графік перетинів прямих 1-4 з віссю ординат в координатах Лайнуівера -Берка від концентрації інгібітора

За даними вторинного графіку залежності перетинів прямих 1-4 з віссю ординат в координатах Лайнуівера-Берка від концентрації інгібітора (рис. 2б) константа інгібування становить 108 мкМ.

Висновок. Проведені дослідження показали, що N-феніл-N-(1-циклопропілетил)нікотинамід здатен зменшувати швидкість зворотної АДГ-реакції відновлення ацетальдегіду в етанол у присутності NADH на 46%, а активність розчинної АльДГ мітохондрій на 50%. Його можливі метаболіти - гідрохлориди N-(1-циклопропілетил)аміну (II) та N-феніл-N-(1-циклопропілетил)аміну (III) - достовірно не змінювали активність ферментів обміну етанолу. Кінетичний характер взаємодії заміщеного нікотинамід з ферментами є достатньо складним, оскільки ферменти складаються з декількох субодиниць і значну роль в ферментативній активності можуть відігравати алостеричні ефекти. Необхідне подальше дослідження N-феніл-N-(1-циклопропілетил)нікотинамід у умовах «in vivo» на моделі хронічного алкоголізму для застосування в комплексній антиалкогольній терапії як можливого засобу сенсibiliзуючого типу.

Література

1. Jones A. Alcohol, its absorption, distribution, metabolism, and excretion in the body and pharmacokinetic calculations / A. Jones // *WIREs Forensic Sci.* – 2019. – P.1-26.
2. Jörnval H. Origin and evolution of medium chain alcohol dehydrogenases / H.Jörnval, J. Hedlund, T.Bergman, Y.Kallberg, E.Cederlund, B.Persson // *Chem. Biol. Interact.* – 2013. – 202. – P.91–96.
3. Plapp B. Contribution of liver alcohol dehydrogenase to metabolism of alcohols in rats / B.Plapp, K.Leidal, B.Murch, D.Green. *Chem. Biol.*

References

1. Jones A. (2019). Alcohol, its absorption, distribution, metabolism, and excretion in the body and pharmacokinetic calculations. *WIREs Forensic Sci.*, 1-26.
2. Jörnval H., Hedlund J., Bergman T., Kallberg Y., Cederlund E., Persson B. (2013). Origin and evolution of medium chain alcohol dehydrogenases. *Chem. Biol. Interact.*, 202, 91–96.
3. Plapp B., Leidal K., Murch B., Green D. (2015). Contribution of liver alcohol dehydrogenase to metabolism of alcohols in rats. *Chem.Biol.Interact.*,

Interact. – 2015. – 234. – P.85-95.

4. Koppaka V. Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application / V. Koppaka, D. Thompson, Y. Chen, M. Ellermann, C. Kyriacos // *Pharmacol. Rev.* – 2012. – 64(3). – P. 520–539.

5. Edenberg H. Genetics and Alcoholism / H. Edenberg, T. Foroud // *Nature Reviews Gastroenterol. & Hepatol.* – 2013. – P. 487-494.

6. 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, № 5. – P. 709-711.

7. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – 72. – P. 248-254.

8. Walker JRL. Spectrophotometric determination of enzyme activity: alcohol dehydrogenase (ADH) / JRL. Walker // *Biochem. Education.* – 1992. – Vol. 20, № 1. – P. 42-43.

9. Bhagavan N.V. *Medical Biochemistry* (fourth edition). Chapter 6 - Enzymes I: General Properties, Kinetics, and Inhibition. – Academic Press. 2002. – P. 85-108.

234, 85-95.

4. Koppaka V., Thompson D., Chen Y., Ellermann M., Kyriacos C. (2012). Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacol. Rev.*, 64(3), 520–539.

5. Edenberg H., Foroud T. (2013). Genetics and Alcoholism. *Nature Reviews Gastroenterol. & Hepatology*, 10(8), 487-494.

6. 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.

7. Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-54.

8. Walker JRL. (1992). Spectro-photometric determination of enzyme activity: alcohol dehydrogenase (ADH). *Biochemical Education*, 20 (1), 42-43.

9. Bhagavan N.V. (2002). *Medical Biochemistry* (fourth edition). Chapter 6 - Enzymes I: General Properties, Kinetics, and Inhibition. *Academic Press.*, 85-108.

KYSLOVA OLHA

Scopus Author ID: 22034723000;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0223-1860>;

kievkislova@gmail.com;

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

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕЩЕННОГО НИКОТИНАМИДА И ЕГО ВОЗМОЖНЫХ МЕТАБОЛИТОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА ЭТАНОЛА

КИСЛОВА О. В.

Киевский национальный университет технологий и дизайна

Цель. Исследовать действие N-фенил-N-(1-циклопропилэтил)никотинамида и возможных его метаболитов: гидрохлоридов N-(1-циклопропилэтил)амин и N-фенил-N-(1-циклопропилэтил)амин на активность ферментов основного пути метаболизма этанола в условиях *in vitro*, а также кинетический характер их взаимодействия.

Методика. Исследования проводились с использованием алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы субклеточных фракций печени крыс, полученных дифференциальным центрифугированием. Активность ферментов определяли спектрофотометрически. Кинетический характер их взаимодействия с замещенным никотинамидом проводили в диапазоне концентраций 25-100 мкм. Результаты исследований обрабатывали по методу Лайнуивера-Берка.

Результаты. Проведенные исследования показали, что N-фенил-N-(1-циклопропилэтил) - никотинамид уменьшал скорость обратной алкогольдегидрогеназной реакции восстановления

ацетальдегида в етанол в присутстві NADH на 46% с константой ингибирования 53 мкМ. Активность растворимой альдегиддегидрогеназы митохондрий подавлялась на 50% с константой ингибирования 108 мкМ. Кинетический характер взаимодействия замещенного никотинамида с ферментами при насыщающих концентрациях кофакторов реакции NADH и NAD⁺ достаточно сложный. Значительную роль в изменении ферментативной активности могут играть аллостерические эффекты. Возможные метаболиты соединения - гидрохлориды N-(1-циклопропилэтил)амин и N-фенил-N-(1-циклопропилэтил)амин - достоверно не влияли на активность ферментов обмена этанола.

Научная новизна. Обнаружен новый ингибитор активности обратной алкогольдегидрогеназной реакции и растворимой митохондриальной изоферментной формы альдегиддегидрогеназы, действие которого приводит к накоплению ацетальдегида в организме.

Практическая значимость. N-фенил-N-(1-циклопропилэтил)никотинамид может быть использован как потенциальный антиалкогольный препарат сенситизирующего действия.

Ключевые слова: алкогольдегидрогеназа, альдегиддегидрогеназа, ингибитор, препараты сенситизирующего действия.

EFFECT OF SUBSTITUTED NICOTINAMIDE AND ITS POSSIBLE METABOLITES ON THE ACTIVITY OF ETHANOL OXIDIZING ENZYMES

KYSLOVA O. V.

Kyiv National University of Technologies and Design

Purpose. To study the influence of N-phenyl-N-(1-cyclopropylethyl)nicotinamide and its possible metabolites: hydrochlorides of N-(1-cyclopropylethyl)amine and N-phenyl-N-(1-cyclopropylethyl)amine - on the activity of main ethanol oxidation enzymes in vitro and kinetic nature of their interaction.

Methodology. The studies were carried out using alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase of rat liver subcellular fractions, which were obtained by differential centrifugation. The enzyme activity was determined spectrophotometrically. The kinetic nature of alcohol dehydrogenase and isozyme form of aldehyde dehydrogenase interaction with substituted nicotinamide was investigated in the concentration range of 25-100 μM. The research results were processed by the Lineweaver-Burk method.

Findings. Studies have shown that N-phenyl-N-(1-cyclopropylethyl)nicotinamide is able to reduce the rate of the reverse alcohol dehydrogenase reaction of acetaldehyde reduction to ethanol in the presence of NADH by 46% with an inhibition constant 53 μM. The activity of soluble mitochondrial aldehyde dehydrogenase was suppressed by 50% with an inhibition constant 108 μM. The kinetic nature of the substituted nicotinamide interaction with enzymes at saturating concentrations of the reaction cofactors NADH and NAD⁺ is quite complex. Allosteric effects can play a significant role in enzymatic activity. Possible metabolites of the compound - hydrochlorides of N-(1-cyclopropylethyl)- and N-phenyl-N-(1-cyclopropylethyl)amine – didn't significantly influence on ethanol metabolism enzymes activity.

Originality. A new inhibitor of the rate of the reverse alcohol dehydrogenase reaction and the activity of soluble mitochondrial isozyme form of aldehyde dehydrogenase, which lead to the accumulation of acetaldehyde in the body, has been discovered.

Practical value. N-phenyl-N-(1-cyclopropylethyl)nicotinamide can be used as a potential antialcohol sensitizing drug after research in vivo.

Keywords: alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, inhibitor, sensitizing drugs.