

Bolesław Floriańczyk, Kazimierz Pasternak
Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie

AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZY IZOCYTRYNIANOWEJ U INTOKSYKOWANYCH MYSZY

WSTĘP

Badania nad aktywnością enzymów mają na celu wykazanie różnic w przebiegu procesów metabolicznych w stanie zdrowia i choroby. Dehydrogenaza izocytrynianowa (ICDH, EC 1.1.1.42) jest jednym z enzymów biorących udział w kluczowych przemianach metabolicznych komórki. Należy do enzymów indykatorowych, a jej aktywność w surowicy krwi jest markerem przepuszczalności błon komórkowych.

Celem pracy było oznaczenie aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej w surowicy krwi u myszy intoksykowanych morfiną, etanolem oraz morfiną i etanolem łącznie.

Do oznaczenia aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej zastosowano metodę kolorymetryczną wg Bella i Barona. Stwierdzono obniżoną, w porównaniu z grupą kontrolną, aktywność badanego enzymu we wszystkich grupach intoksykowanych zwierząt.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na myszach (25 - 35 g) podzielonych na 4 grupy. Pierwsza grupa zwierząt dostawała dootrzewnowo przez 5 dni 0,9 % chlorek sodowy i stanowiła kontrolę. Zwierzęta drugiej grupy otrzymywały dootrzewnowo morfinę (w pierwszym dniu - 15 mg/kg wagi ciała, w drugim dniu - 30 mg/kg, w trzecim dniu - 45 mg/kg, w czwartym dniu - 60 mg/kg i w piątym dniu - 50 mg/kg). Zwierzęta trzeciej grupy otrzymywały dootrzewnowo morfinę przez 5 dni w dawkach tak jak poprzednia grupa zwierząt oraz dożołądkowo etanol w dawce 2 g/kg w roztworze 20 %. Zwierzętom czwartej grupy przez 5 dni podawano dożołądkowo tylko etanol w dawce 2 g/kg w roztworze 20 %.

Po 5 dniach zwierzęta usypiano, pobierano krew i oddzielano surowicę celem oznaczenia aktywności enzymu. Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej oznaczano metodą Bella i Barona [3].

Uzyskane wyniki zebrano i przedstawiono w tabeli.

WYNIKI

Tabela nr 1 przedstawia aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej w surowicy krwi u intoksykowanych zwierząt w czterech grupach.

Jak wynika z przedstawionych danych doświadczalnych w grupie myszy kontrolnych aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej wahała się od 15,22 do 24,75 IU (wartość średnia: $20,84 \pm 2,66$).

TABELA 1

Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej w badanych grupach zwierząt: I - grupa kontrolna, II - grupa zwierząt otrzymująca morfinę, III - grupa zwierząt otrzymująca morfinę i etanol, IV - grupa zwierząt otrzymująca etanol

Grupa badanych zwierząt	Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej IU		
	od - do	$\bar{x} \pm SD$	poziom istotności
I	15,22 ± 24,75	20,84 ± 2,66	
II	15,35 ± 20,18	18,01 ± 1,94	p = 0,019
III	12,75 ± 18,42	15,16 ± 2,11	p = 0,002
IV	12,68 ± 22,20	17,61 ± 2,60	p = 0,019

\bar{x} - wartość średnia z dziesięciu oznaczeń

SD - odchylenie standardowe

W grupie zwierząt otrzymujących morfinę aktywność badanego enzymu była niższa w porównaniu z aktywnością tego enzymu w grupie kontrolnej i wynosiła od 15,35 do 20,18 IU (wartość średnia: $18,01 \pm 1,94$). Niższe aktywności badanego enzymu w porównaniu z grupą kontrolną odnotowano również w pozostałych dwóch grupach intoksykowanych zwierząt. I tak w grupie myszy otrzymujących morfinę i alkohol aktywność enzymu wahała się w granicach 12,75 - 18,42 IU (wartość średnia: $15,61 \pm 2,11$), a w grupie myszy otrzymujących tylko alkohol od 12,68 do 22,44 IU (wartość średnia: $17,61 \pm 2,68$).

Zastosowany w opracowaniu statystycznym wyników test Cochran-Coxa wykazał statystycznie istotne różnice między wartościami aktywności ICDH uzyskanymi w badanych grupach intoksykowanych zwierząt a grupą kontrolną.

DYSKUSJA

Dehydrogenaza izocytrynianowa jest enzymem szeroko rozpowszechnionym w świecie zwierzęcym [21, 22]. Enzym ten jest składnikiem cyklu kwasów trój-

karboksylowych (cykl Krebsa) - jednego z głównych szlaków metabolicznych komórki.

Aktywność ICDH w surowicy krwi była badana przez wielu autorów i stwierdzano zwiększoną aktywność tego enzymu w wielu procesach chorobowych, w tym również w chorobach nowotworowych [2, 4, 7, 9, 13, 15, 17, 18].

Badania nad ICDH prowadzone są od wielu lat. Najbardziej znane metody oznaczania aktywności tego enzymu to kolorymetryczne oznaczanie ilości powstałego produktu (ketoglutaranu) w reakcji z 2,4-dwunitrofenylohydrazyną [3] oraz spektrofotometryczne oznaczanie zredukowanego NADPH [14]. Znane są prace dotyczące oznaczania aktywności tego enzymu w tkankach takich jak wątroba [8], eryocyty [21], serce [22], jak i w surowicy krwi [3, 7, 8, 15], czy też w komórkach nowotworowych [4, 9].

W tej pracy do badania aktywności ICDH zastosowaliśmy metodę kolorymetryczną wg Bella i Barona [3].

W naszych badaniach, we wszystkich trzech grupach intoksykowanych zwierząt (grupy myszy otrzymujące: morfinę, morfinę i etanol oraz sam etanol) aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej w surowicy krwi była znacznie niższa w porównaniu z aktywnością tego enzymu w grupie kontrolnej. Wyniki wskazują na bardzo zróżnicowaną aktywność ICDH badanym materiale biologicznym w poszczególnych grupach zwierząt. Najniższe aktywności badanego enzymu uzyskano w grupie zwierząt otrzymujących morfinę i etanol, co może wskazywać na skojarzone działanie tych dwóch środków.

ICDH jest enzymem indykatorem i określanie aktywności tego enzymu jest znaczące przy ocenie stanu ogólnego metabolizmu ustroju i stopnia przepuszczalności błon komórkowych.

W literaturze wiele prac nawiązuje do zmiany metabolizmu ustroju pod wpływem środków narkotycznych. Z prowadzonych badań wynika, że stosowane środki takie jak alkohol, morfina powodują, między innymi, zmiany w metabolizmie amin biogennych oraz wpływają na wydzielanie i obwodowe działanie niektórych hormonów czy na gospodarkę mineralną ustroju i zawartość mikroelementów [1, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 18, 19, 20].

Szczególne interesującym jest zmiana zawartości mikroelementów w ustroju pod wpływem stosowanych narkotyków. Wiadomo, że mikroelementy wpływają na aktywność enzymów w ustroju. Zmieniona aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej może wynikać ze zmiany poziomu i rozmieszczenia mikroelementów.

Obniżenie aktywności ICDH w grupach zwierząt otrzymujących narkotyki świadczy o obniżeniu procesów spalań końcowych w komórkach.

Celowe są dalsze badania w celu określenia wpływu stosowanych środków narkotycznych na inne enzymy utleniania komórkowego oraz wyjaśnienia mechanizmu działania tych środków.

WNIOSKI

1. Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej w surowicy krwi jest niższa we wszystkich badanych grupach intoksykowanych zwierząt w porównaniu z aktywnością enzymu w grupie kontrolnej.

2. Zastosowane środki narkotyczne (morfina i etanol) obniżają aktywność metaboliczną komórek.

3. Morfina i etanol posiadają skojarzony efekt działania na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej.

Bolesław Floriańczyk, Kazimierz Pasternak
Isocitric dehydrogenase activity in intoxicated mice

Summary

Isocitric dehydrogenase (ICDH) is one of the enzymes that take part in key metabolic pathways in the cell. ICDH is an indicator enzyme and its activity in blood serum is a marker of cell membrane permeability.

The purpose of this experiment was to determine ICDH activity in blood serum of intoxicated mice. The animals under study were divided into four groups. The first was a control group, the second received morphine, the third - morphine and ethanol, while in the fourth group ethanol only was administered. ICDH activity was determined using the Bell and Baron colorimetric method. ICDH activity was found to be lower in intoxicated mice as compared to the control group.

Key words: isocitric dehydrogenase/intoxicated mice/morphine/ethanol

PIŚMIENNICTWO

1. Ahtee L., Attila M., Carlson K.R., Haikala.: *Changes in brain monoamine metabolism during withdrawal from chronic oral self-administration of morphine and in responses to a morphine challenge dose in the withdrawal state.* J. Pharmacol. Exp. Ther., 1989; 249, 343-349.
2. Banerjee S., Bhatt O.K.: *Histochemical studies on the distribution of certain dehydrogenases in squamous cell carcinoma of cheek.* Indian. J. Cancer, 1989, 26, 21-30.
3. Bell J.L., Baron D.N.: *A colorimetric method for determination of Isocitric Dehydrogenase.* Clin. Chim. Acta, 1960, 5, 740-747.
4. Board M., Humm S., Nevsholme E.A.: *Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and trikarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells.* Biochem. J. 1990, 265, 503-509.
5. Chmielewski M., Kaciuba A., Pasternak K., Floriańczyk B., Marzec Z.: *Ocena poziomów wybranych pierwiastków we krwi osób uzależnionych lekowo w okresie detoksykacji.* XXXVIII Zjazd Psychiatrów Polskich, Wrocław, Streszczenia prac.
6. Durlach J.: *Donnes nouvelles sur les mecanismes membranaires d'antagonisme entre le magnesium et l'alcool: implications physiologiques et therapeutiques.* Bull. Acad. Natle. Med., 1990, 174, 897-908.
7. Ellis G., Goldberg D.M., Spooner R.J. i wsp.: *Serum enzyme tests in diseases of the liver and biliary tree.* Amer. J. Clin. Pathol., 1979, 71, 557-563.

8. Ellis G., Goldberg D.M.: *An improved manual and semi-automatis assay for NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity, with a description of some kinetic properties of human liver and serum enzyme.* Clin. Biochem., 1971, 2, 175-185.
9. Floriańczyk B., Pasternak K., Grzybowska L., Pęszyński J.: *Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej (ICDH) w raku sutka.* Tyg. Lek. (praca w druku).
10. Hashiguchi Y., Molina P.E., Fan J., Lang C.H., Abumrad N.N.: *Central opiate modulation of growth hormone and insulin-like growth factor-I.* Brain Res. Bull., 1996, 40, 99-104.
11. Mannisto P.T., Borisenko S.A., Rauhala P., Tuominen R.K.: *Variation in tolerance to the antinoceptive, hormonal and thermal effects of morphine after a 5-day pre-treatment of male rats with increasing doses of morphine.* Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 1994, 349, 161-169.
12. Mullins P.G.M., Vink R.: *Chronic alcohol exposure decreases brain intracellular free magnesium concentration in rats.* Neurochemistry, 1995, 6, 1635-1636.
13. Moore M.A., Tsuda H., Ito N.: *Dehydrogenase histochemistry of N-ethyl-N-dihydroxyethyl-nitrosamine - induced focal liver lesions in the rat - increase in NADPH- generating capacity.* Carcinogenesis, 1986, 7, 339-342.
14. Nachlas M.M. i wsp.: *Colorimetric method for the measurement of isocitric dehydrogenase activity.* J. Lab. Clin. Med., 1963, 62, 148-158.
15. Okumura M., Spellberg M.: *Serum ICDH activity in the differential diagnosis of liver disease.* Gastroenterology, 1960, 39, 305-311.
16. Papierkowski A., Pasternak K., Floriańczyk B., Młynarczyk M.: *Stężenie magnezu w surowicy krwi narkotyzowanych myszy.* I Lubelska, Środowiskowa Konferencja Magnezologiczna, Lublin 1996, Materiały Konferencyjne.
17. Pasternak K., Floriańczyk B.: *Aktywność tkankowa dehydrogenazy izocytrynianowej (ICDH) w hipertyreozie u królików.* Med. Wet., 1995, 51, 164-165.
18. Pasternak K., Floriańczyk B., Chmielewski M., Kaciuba Z., Marzec Z.: *Stężenie niektórych pierwiastków w surowicy krwi narkomanów.* IV Ogólnopolskie Sympozjum Magnezologiczne, Lublin 1995, Pamiętnik Symp. str. 15.
19. Petroniau A., Barquete J.: *Acute effect of alcohol ingestion on the human serum concentrations of calcium and magnesium.* Int. Med. Res., 1991, 19, 410-413.
20. Rauhala P., Mannisto P.T., Tuominen R.: *Effect of chronic morphine treatment on thyrotropin and prolactin levels and acute hormone responses in the rat.* J. Pharmacol. Exp. Ther., 1988, 246, 649-654.
21. Seelig G.F., Colman R.F.: *Characterization of the physiochemical and catalytic properties of human heart NADP-dependent isocitrate dehydrogenase.* Arch. Biochem. Biophys., 1978, 188, (394-409).
22. Wang Y.M., Van Eye J.: *Human erythrocytic NADP- dependent isocitrate dehydrogenase.* Int. J. Biochem., 1977, 8, (795-799).