

<p>Zeszyty Naukowe Akademii Bydgoskiej im. Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy STUDIA PRZYRODNICZE Scientific Papers of Bydgoszcz University of Kazimierz Wielki NATURAL STUDIES (Zeszyty Nauk. AB, Stud. Przynr.)</p>	15	225-229	2001
--	----	---------	------

WPLYW WYBRANYCH KSENOBIOTYKÓW NA AKTYWNOŚĆ DEZAMINAZY ADENOZYNY (ADA1)

THE INFLUENCE OF SELECTED XENOBIOTICS ON ACTIVITY OF ADENOSINE DEAMINASE (ADA1)

Alina Grzanka¹, Rafał Stemplewski²

¹Institut Biologii i Ochrony Środowiska, Wyższa Szkoła Pedagogiczna, ul. Chodkiewicza 30,
85-064 Bydgoszcz

i Katedra Patomorfologii Klinicznej, Akademia Medyczna, ul. Curie-Skłodowskiej 9,
85-094 Bydgoszcz

²Katedra i Zakład Wychowania Fizycznego, Akademia Wychowania Fizycznego, ul. Królowej Jadwigi 27/39,
61-871 Poznań

ABSTRACT: In this study the influence of preservatives added to food on activity of adenosine deaminase (ADA1) was determined with HPLC method. The influence of following preservatives was estimated: benzoic acid (E 240), sodium benzoate (E 211), cochineal red (E 124), brilliant black (E 151), indigotin (E 132), quinoline yellow (E 104), orange yellow (E 110), orthophosphoric acid (E 338), sodium nitrate (E 251) and niphedipine.

SŁOWA KLUCZOWE: ksenobiotyki, dodatki funkcjonalne, dezaminaza adenozyiny.

KEY WORDS: xenobiotics, preservatives, adenosine deaminase

Wstęp

Przyczyną podjęcia badań były dane z piśmiennictwa dotyczące fizjologicznej roli adenozyiny jako czynnika wpływającego na zwiększenie przepływu krwi przez serce, a także przez mięśnie szkieletowe. Wywiera ona również wpływ na szereg procesów metabolicznych, między innymi działa antylipolitycznie. Jest także czynnikiem działającym przeciwzapalnie, a jej względny niedobór związany jest z zaburzeniami procesów immunologicznych (Daly i in. 1982, Sollevi i in.

1987, Collis 1989, Franco i Centells 1989). Kluczowym enzymem metabolizmu adenozyiny jest dezaminaza adenozyiny (ADA), przy udziale tego enzymu ulega ona bardzo szybko dezaminacji do inozyiny. Wyróżnia się trzy izoformy tego enzymu: ADA1, monomeryczne białko o masie cząsteczkowej około 35 kDa i wysokiej aktywności w krwinkach czerwonych, które biorą udział w transporcie i metabolizmie adenozyiny oraz jej metabolitów – inozyiny czy hipoksantyny. ADA1 + CP, o masie cząsteczkowej około 280 kDa, składającej się z dwóch cząsteczek; ADA i białka wiążącego-combining protein (CP). ADA2, izoenzym występujący spośród zbadanych komórek jedynie w monocytach i surowicy. Obniżona aktywność dezaminazy adenozyiny towarzyszy stanom alergicznym i schorzeniom układu oddechowego (Simonds i in. 1988). W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych dotyczących wpływu dodatków funkcjonalnych stosowanych w produktach spożywczych, które również zalicza się do ksenobiotyków, na aktywność dezaminazy adenozyiny, co skłoniło nas do podjęcia niniejszych badań. Wiadomo, że środki konserwujące spożywane są wraz z produktami spożywczymi powszechnie i to w ilościach relatywnie dużych, ponadto trzeba brać pod uwagę ich kumulację w organizmie. Większość z nich powtarza się w wielu produktach spożywczych, a znaczna ich część nie odpowiada wymaganiom jakościowym określonym dla każdego z nich, zgodnie z Polską Normą regulowaną Zarządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej Nr 233 z dnia 31 marca 1993 r. (Rutkowski i in. 1993). Biorąc pod uwagę powyższe zależności, celem podjętych badań było stwierdzenie wpływu wybranych związków używanych jako dodatki funkcjonalne w produktach spożywczych na aktywność dezaminazy adenozyiny (ADA1).

Materiał i metoda

Materiał stanowił hemolizat krwi pochodzącej od 25 ludzi zdrowych i osób z nadciśnieniem tętniczym pierwotnym o średniej wieku 45 lat. Przebadane dodatki funkcjonalne dodawane do produktów spożywczych to: kwas benzoowy (E 240), benzoian sodu (E 211), czerwień koszenilowa (E 124), czerń brylantowa (E 151), indygotyna (E 132), żółcień chinolinowa (E 104), żółcień pomarańczowa (E 110), kwas o-fosforowy (E 338), azotan sodu (E 251), ponadto jeden z leków hypotensyjnych: Nifedipine (Cordafen). Badano wpływ roztworów tych związków o stężeniu 10-krotnie większym od dopuszczalnego dziennego ich pobrania na oczyszczoną dezaminazę adenozyiny – ADA1; aminohydrolaza adenozyiny, E.C.3.5.4.4.

(Sigma No A 9876). Dawki dopuszczalnego dziennego pobrania poszczególnych związków podane są w książce Rutkowskiego pt. *Dodatki funkcjonalne do żywności*. Krew od chorych pobierano na heparynę, po odwirowaniu osocza i oddzieleniu warstwy leukocytów, krwinki przemywano trzy razy roztworem soli fizjologicznej w celu wypłukania osocza i krwinek białych. Przemyte krwinki hemolizowano izotonicznym buforem według Beutlera. Izolowany enzym lub hemolizat inkubowano w mieszaninie buforu TRIS 50 mM o pH 7, 4, 2 mM magnezu i 0.5 mM DTT przez 30 minut w temperaturze 37° C, wcześniej stosując 10 minutową preinkubację. Wartość kontrolną (100%) stanowiła aktywność enzymu oznaczana bez dodatku tych związków. Inkubację kończono przez dodanie mieszaniny inkubacyjnej do 1,2 M roztworu HClO₄, po schłodzeniu wirowano. Kwaśny nadsącz neutralizowano 1 M. K₂CO₃, po odwirowaniu próby analizowano na zawartość inozyliny metodą HPLC, stosując jako standard roztwór inozyliny. Badane związki, rozpuszczone w wodzie, dodawano w stężeniu 10-krotnie większym od dopuszczalnego dziennego ich pobrania. Wpływ na aktywność oceniano jako % tych prób w stosunku do 100% aktywności uzyskanej bez dodatku środków funkcjonalnych. Należało uwzględnić możliwą interferencję związków przy rozdiale chromatograficznym, stąd rozdział przeprowadzono przy długości fali 254 nm i 280 nm. Trzeba również zaznaczyć, że inkubację po wstępnej preinkubacji w układzie pierwszym: inhibitor (badany związek) i hemolizat rozpoczynano reakcje przez dodanie adenozyliny, po drugie: po wstępnej preinkubacji adenozyliny z badanymi związkami rozpoczynano reakcje przez dodanie enzymu (hemolizat). Wykonano po 3 równoległe próby.

Wyniki

Zarówno w przypadku badania wpływu wyżej wymienionych związków na aktywność enzymu w hemolizacie krwinek, jak i aktywność oczyszczonego enzymu nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych poza jednym związkiem – indygotyną (E 132). Indygotyna w przyjętych warunkach zwiększała aktywność dezaminazy adenozyliny (ADA1). Odchylenia uzyskanych aktywności dla pozostałych związków w odniesieniu do prób kontrolnych wynosiły około 10%. Natomiast odchylenie uzyskanej aktywności dla indygotyny wyniosło 30%.

W przypadku leku hypotensyjnego Nifedipine (Cordafen) badano wpływ dwóch stężeń terapeutycznych (30 mg, 60 mg) na aktywność dezaminazy adenozy (ADA1) krwinek czerwonych *in vitro* u osób zdrowych i pacjentów z nadciśnieniem i również nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w aktywności dezaminazy adenozy.

Omówienie wyników

Na samym wstępie trzeba stwierdzić, że uzyskane wyniki traktujemy jako pilotażowe i w przyszłości mamy zamiar przebadać znacznie większą ilość dodatków funkcjonalnych dodawanych do produktów spożywczych. Jak nam z dostępnej literatury wiadomo, nie przeprowadzono dotychczas podobnych badań. Dlatego podjęliśmy własne badania, aby sprawdzić, czy dozwolona substancja stosowana jako dodatek do środków spożywczych aktywuje bądź hamuje badany przez nas również w innych warunkach enzym. Biorąc pod uwagę wyniki prac z zakresu hamowania dezaminazy adenozy przez inne związki (Koch i in. 1992, Koch i in. 1991, Gryfantini 1992) wydało nam się celowe przebadanie substancji spożywanych przez nas w życiu codziennym w ilościach relatywnie dużych. Wybrane przez nas związki dodawane są do wielu produktów spożywczych, np. żółcień pomarańczowa (E 110), która jest barwnikiem azowym jest dodawana zarówno do wyrobów cukierniczych, pieczywa, deserów, jogurtów, sosów, lodów, konserw, cukierków, jak i napojów bezalkoholowych, podobnie zresztą jak żółcień chinolinowa (E 104), a więc możliwość kumulacji takich związków w naszych organizmach jest ogromna (Rutkowski i in. 1993). Na obecnym etapie badań trudno przewidzieć wpływ badanych przez nas substancji na ten istotny w związku z rolą adenozy enzym. Nie można również przewidzieć skutków ubocznych w przyszłości, w wyniku kumulowania się tych związków w organizmach. Wydaje się więc celowe dalsze prowadzenie badań z uwzględnieniem znacznie większej ilości dodatków funkcjonalnych, tym bardziej, że w piśmiennictwie nie znaleźliśmy opracowania dotyczącego tego zagadnienia.

Literatura

- Collis M.G. 1989: *The vasodilator role of adenosine*. Pharmacol. Ther., 41: 143-162.
- Daly J.W. 1982: *Adenosine receptors: Targets for future drugs*. J. Med. Chem., 25: 197-205.
- Franco R., Centelles J.J. 1989: *Adenosine deaminase as therapeutic agent*. Drug of Today, 25: 155-170.
- Grifantini M. 1992: *Inhibitors of adenosine deaminase*. Drug News Perspect., 5: 473-479.
- Koch H.P., Jager W., Groh U., Plank G. 1992: *In vitro inhibition of adenosine deaminase by flavonoids and related compounds. New insight into the mechanism of action of plant phenolics*. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., 14: 413-417.
- Koch H.P., Jager W., Hysek J., Korpert B. 1991: *Garlic and onion extracts: in vitro inhibition of adenosine deaminase*. Phytother. Res., 6: 50-52.
- Rutkowski A., Gwiazda S., Dąbrowski K. 1993: *Dodatki funkcjonalne do żywności*. Agro Food Technology, Katowice.
- Simmonds H.A., Fairbanks L.D., Morris G.S. 1988: *Altered erythrocyte nucleotide patterns are characteristic of inherited disorders of purine or pyrimidine metabolism*. Clin. Chim. Acta, 171: 197-201.
- Sollevi A., Torssell L., Owall A., Edlund A., Lagerkramser M. 1987: *Levels and cardiovascular effects of adenosine in humans*. In *Topics and Perspectives in Adenosine Research*, ed. By E. Gerlach and B.F. Becker. Springer, Heidelberg. 599-613.

Summary

The influence of some preservatives added to food on activity of adenosine deaminase (ADA1) was examined with HPLC method. Material was blood taken from healthy people and from patients with hypertension collected into heparin, centrifuged at 2000 x g and separated from leukocytes. The influence of following preservatives added to food was studied: benzoic acid (E 240), sodium benzoate (E 211), cochineal red (E124), brilliant black (E 151), indigotin (E 132), quinoline yellow (E 104), orange yellow (E 110), orthophosphoric acid (E 338), sodium nitrate (E 251) and niphedipine. There were not any influence of these preservatives on activity of adenosine deaminase, only indigotin (E 132) showed slight increase of activity of this enzyme.