

KAZIMIERZ PASTERNAK

Efektywność wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby narkotyzowanych myszy

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie, ul. Lubartowska 85, 20-123 Lublin

Summary

The effectiveness of tRNA aminoacetylation from the livers of narcotized mice

The experiments were done on mice divided into three experimental and control groups. The test group of mice received morphine, ethanol or morphine plus ethanol. The control group received only 0.85% NaCl. tRNA was obtained by phenol extraction from the livers of tested and control mice. The quantity of often radioactive amino acids bound to tRNA was measured. Morphine and ethanol changed the quantity of amino acids bound to tRNA. It was different for an individual amino acid and for tested tRNAs.

Biosynteza białka jest jednym z najważniejszych procesów zachodzących w komórce, a jej pierwszym etapem jest aktywacja aminokwasów. Dopiero zaktywowane aminokwasy mogą być wykorzystane w procesie translacji. W stanach chorobowych zmienia się metabolizm komórki co wiąże się również ze zmianami w procesie syntezy czy degradacji białek. Zaburzenia mogą dotyczyć już etapu aktywacji aminokwasów, dlatego podjęto badania mające na celu określenie czy morfina i etanol wpływają na wielkość aminoacylacji tRNA.

Morfina należy do często stosowanych leków ze względu na swoje silne działanie przeciwbólowe. Stosowanie morfiny i innych narkotycznych leków ogranicza fakt, że mogą spowodować uzależnienie. Narkotyki i środki narkotyczne często kojarzone z alkoholem stosowane przez uzależnionych w coraz to większych dawkach prowadzą do wyniszczenia organizmu. Morfina i etanol wywierają różnorodne działanie na żywe organizmy (1, 5, 15, 17, 18, 21). Przeprowadzone obecnie badania miały na celu doświadczalne określenie wpływu morfiny i etanolu podawanych myszom na zdolność tRNA do aminoacylacji.

Materiał i metody

Materiałem do badań były białe myszy wagi 25-35 g poddawane działaniu morfiny, etanolu i obu tych środków łącznie. Zwierzęta podzielono na cztery grupy po 10 myszy każda. Grupa pierwsza otrzymywała dootrzewnowo morfinę przez okres pięciu dni w dawce I dzień 15 mg/kg, II dzień 30 mg/kg, III dzień 45 mg/kg, IV dzień 60 mg/kg i V dzień 50 mg/kg (12), druga dożołądkowo etanol w ilości 2 g/kg dziennie, trzecia otrzymywała morfinę i etanol w łącznej dawce dziennej. Grupa kontrolna myszy otrzymywała dootrzewnowo sól fizjologiczną. Doświadczenia prowadzono przez pięć dni, a następnie po dekapitacji myszy pobierano wątrobę i preparowano z nich tRNA metodą ekstrakcji fenolowej (20, 22). Preparat tRNA poddawano oczyszczaniu na kolumnie z celulozą DEAE-52 i

deaminoacylacji według Denneya (7). W ten sposób otrzymywano czyste preparaty tRNA, które oznaczano spektrofotometrycznie i używano do prób aminoacylacji. Preparat enzymatyczny aminoacylo-tRNA syntetaz konieczny do prób otrzymywano z wątroby królików metodą wysalania siarczanem amonu (2). Ilość białka w próbach oznaczano metodą Bradforda (3). Mieszankina inkubacyjna zawierała w końcowej objętości 150 µl 100 mM bufor Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM ATP, 10 mM KCl, 0,4 mM DTT (dithiothreitol), 0,1 mM PMSF (phenylmethylsulphonyl fluorid), 2 ODU tRNA, 50 µg białka enzymatycznego, 18,5 kBq znakowanego ¹⁴C aminokwasu. W kolejnych doświadczeniach stosowano tRNA uzyskane z wątroby badanych myszy zawsze wobec prób kontrolnych. Próby inkubowano w 37°C przez 20 min., a następnie nanoszono na krążki bibuły Whatman 3 MM. Krążki suszono, płukano czterokrotnie zimnym 5% TCA, raz płynem Hokina (0,8 ml 10 M NaOH, 62,8 ml lodowaty kwas octowy i 95% etanol do objętości 1000 ml) i raz eterem. Po wysuszeniu krążków mierzono radioaktywność w liczniku scyntylacyjnym firmy Beckman.

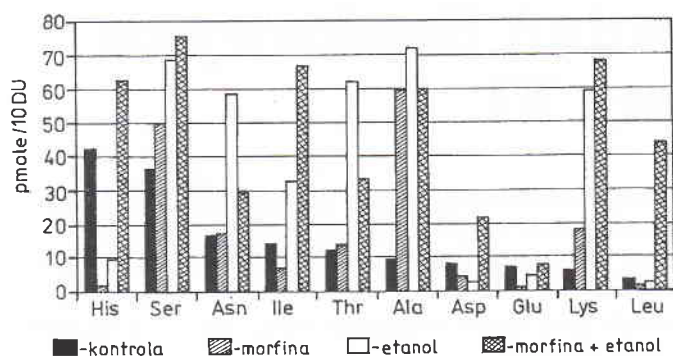
Wyniki i omówienie

Efektywność wiązania dziesięciu aminokwasów znakowanych ¹⁴C przez tRNA wątroby myszy narażonych na działanie morfiny, etanolu, morfiny i etanolu oraz kontrolnych przedstawia tabela 1.

Otrzymane wyniki są dość zróżnicowane zarówno dla poszczególnych aminokwasów, jak i tRNA. Wielkość wiązania aminokwasów przez tRNA myszy narażonych na działanie morfiny jest znacznie wyższa w porównaniu z kontrolą dla tRNA specyficznych dla alaniny, lizyny i seryny. tRNA wątroby myszy narażonych na działanie alkoholu wykazuje więk-

Tab. 1. Wielkość wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby myszy kontrolnych oraz poddanych działaniu morfiny, etanolu, morfiny i etanolu

Aminokwas	Wielkość wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby myszy: pmole /1 ODU			
	kontrola	morfina	etanol	morfina + etanol
Ala	9,5 ± 3	59,5 ± 9	72 ± 14	60 ± 8
Lys	6,2 ± 2	18,2 ± 4	59 ± 7	68 ± 9
Glu	7,0 ± 3	1,2 ± 0,6	4,9 ± 1	7,7 ± 2
Ile	14,1 ± 3	7,0 ± 2	33 ± 5	67 ± 14
Thr	12,2 ± 3	13,6 ± 3	62 ± 14	33 ± 6
Asn	16,6 ± 4	17,3 ± 4	58 ± 11	29 ± 6
Leu	3,6 ± 1	1,8 ± 0,5	2,5 ± 0,5	44 ± 7
Asp	8,1 ± 2	4,8 ± 1	2,9 ± 0,4	22 ± 4
His	42,3 ± 6	1,9 ± 0,6	9,8 ± 0,8	63 ± 8
Ser	36,5 ± 6	49,8 ± 9	68,5 ± 12	76 ± 12



Ryc. 1. Porównanie wielkości wiązania aminokwasów znakowanych ^{14}C przez tRNA wątroby myszy kontrolnych, poddanych działaniu morfiny, etanolu oraz morfiny i etanolu

szą zdolność wiązania takich aminokwasów jak alanina, lizyna, izoleucyna, asparagina, seryna. Natomiast tRNA myszy narażonych na działanie morfiny i etanolu w łącznej dawce dziennej wykazywał większą możliwość wiązania takich aminokwasów jak alanina, lizyna, izoleucyna, leucyna, histydyna i seryna. Należy zwrócić uwagę na to, że pewne aminokwasy powtarzają się jeżeli chodzi o zwiększoną możliwość wiązania ich przez tRNA. Działanie morfiny i etanolu na żywe organizmy jest dość znane (4, 6, 8, 10, 11). Wiadomo, że przy przewlekłym stosowaniu tych środków dochodzi do uzależnienia organizmu. Manifestuje się to złym samopoczuciem i zwiększonym zapotrzebowaniem na te środki. Związane jest to bezpośrednio z przestrojeniem metabolizmu komórkowego (13-16). Najczęściej obserwowane są skutki długotrwałego stosowania morfiny czy etanolu, które wiążą się z wyniszczeniem organizmu (19). W mechanizmie działania morfiny i etanolu na organizm muszą ulegać procesy składające się na całość procesu biosyntezy białek.

Porównanie wielkości wiązania aminokwasów przez badane tRNA przedstawia ryc. 1.

Efektywność aminoacylacji tRNA wątroby myszy narażonych na działanie etanolu oraz morfiny i etanolu łącznie jest znacznie wyższa dla tRNA specyficznych dla pewnych aminokwasów jak seryna, kwas asparaginowy, izoleucyna, treonina, alanina i lizyna. Trzeba zauważyć, że w przypadku narażenia myszy na działanie samej morfiny wielkość wiązania aminokwasów przez tRNA wzrasta bardzo nieznacznie. Dla pojedynczych aminokwasów jak histydyna, izoleucyna, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy i leucyna jest nawet niższa niż kontrolna.

Przeprowadzone badania wskazują, że pod wpływem morfiny, etanolu zachodzą zmiany w tRNA wątroby myszy. Doświadczalnie manifestują się one zmniejszoną dla jednych a zwiększoną dla innych aminokwasów możliwością połączenia ze specyficznymi dla nich tRNA. Sprawą dyskusyjną jest czy zmienia się ilość izoakceptorowych tRNA dla poszczególnych aminokwasów czy może istnieje jeszcze inna przyczyna zmniejszonej aminoacylacji tRNA. Badania nad izoakceptorowymi tRNA wątroby myszy poddawanych działaniu morfiny i etanolu będą prowadzone celem wyjaśnienia problemu zmiany efektywności wiązania aminokwasów.

Wnioski

1. Morfina, etanol oraz oba te środki stosowane jednocześnie zmieniają znacznie efektywność wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby myszy.

2. Efektywność wiązania aminokwasów zależy od badanego tRNA i jest różnicowana dla poszczególnych aminokwasów.

3. Zachodzące zmiany w możliwości przyłączania aminokwasów przez tRNA wątroby myszy narażonych na działanie morfiny i etanolu mogą mieć wpływ na wielkość i przebieg translacji.

Piśmiennictwo

1. Ahtee L., Attila M., Carlson K. R., Haikala H.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 249, 343, 1989.
2. Borkowski T., Chareziński M.: J. Neurochem. 18, 851, 1971.
3. Bradford M. H.: Anal. Biochem. 72, 248, 1976.
4. Chmielewski M., Kaciuba A., Pasternak K., Floriańczyk B., Marzec Z.: XXXVIII Zjazd Psych. Pol. Wrocław, Streszczenia prac. 21, 1995.
5. Collin E., Cesselin F.: Clin. Neuropharmacol. 14, 465, 1991.
6. Copeland R. L., Pradhan S. N.: Biog. Amines. 5, 43, 1988.
7. Denney R. M.: Arch. Biochem. Biophys. 183, 156, 1977.
8. Durlach J.: Bull. Acad. Natle. Med., 174, 7, 897, 1990.
9. Harris R. A., Loh H. H., Way E. L.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 195, 3, 488, 1975.
10. Hashiguchi Y., Molina P. E., Fan J., Lang C. H., Abumrad N. N.: Brain Res. Bull. 40, 2, 99, 1996.
11. Ling G. S. F., Paul D., Simantov R., Pasternak G. W.: Life Sci. 45, 1627, 1989.
12. Männistö P. T., Borisenko S. A., Rauhala P., Tuominen P., Tuominen R. K.: Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 349, 161, 1994.
13. Mullins P. G. M., Vink R.: Neurochemistry. 6, 12, 1635, 1995.
14. Papierkowski A., Pasternak K., Floriańczyk B., Młynarczyk M.: I Lub. Środ. Konf. Magnezol. Lublin, Mat. Konf. 17, 1996.
15. Pasternak G. W.: Cیلn. Neuropharmacol. 16, 1, 1993.
16. Pasternak K., Floriańczyk B., Chmielewski M., Kaciuba Z., Marzec Z.: IV Ogólnopolskie Symp. Magnezol. Lublin, Pamiętnik Symp. 15, 1995.
17. Petroniau A., Barquete J.: Int. Med. Res. 19, 5, 410, 1991.
18. Poling A., Lesage M., Roe D., Schaefer D.: Pharmacol. Biochem. Behav. 54, 2, 485, 1996.
19. Rauhala P., Männistö P. T., Tuominen R.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 246, 649, 1988.
20. Sein K. T., Becarevicz A., Kanazir D.: Anal. Biochem. 28, 65, 1969.
21. Williamschmely L., Grant K. A., Gatto G. J., Porrino L. J.: Pharmacol. Biochem. Behav. 54, 2, 415, 1996.
22. Zubay G.: J. Mol. Biol. 65, 375, 1972.

Adres autora: dr med. Kazimierz Pasternak, ul. Ponikwoda 34, 20-135 Lublin

DYE J. A., MORGAN K. T., NELTON D. L., TEPPER J. S., BURLESON G. R., COSTA D. L.: Zmiany w górnych drogach oddechowych noworodków szczurów zakażonych wirusem grypy zaadaptowanych do organizmu szczura. (Characterization of upper respiratory disease in rats following neonatal inoculation with a rat-adapted influenza virus). Vet. Pathol. 33, 43-54, 1996 (1)

Szczury w wieku 6 i 30 dni zakażono donosowo szczepem wirusa grypy zaadaptowanym do organizmu szczura (RAIV). Wycinki do badań histopatologicznych pobierano z górnego i dolnego odcinka dróg oddechowych 1, 3, 6 i 13 dnia po zakażeniu. Ponadto określono liczbę limfocytów i miano przeciwciał. Po pierwszym zakażeniu poziom surowiczych IgM i IgG1 wzrastał 6, 11 i 15 dnia po podaniu wirusa, przy czym IgG1 maksymalny poziom osiągała 15 dnia po zakażeniu. Zmiany patologiczne (złuszczenie się nabłonka, martwica nabłonka) pojawiały się w jamie nosowej już 1 dnia po zakażeniu i obejmowały przedni odcinek jamy nosowej i małżowiny nosowe. Następnie występowała martwica nabłonka, drobne erozje, ropne lub nieropne zapalenie śluzówki układu oddechowego. Trzeciego dnia po zakażeniu występowały ogniskowe lub rozlane zmiany zapalne. Zmiany chorobowe cofały się około 13 dnia po zakażeniu. Powtórne zakażenie w wieku 30 dnia nie indukowało silnych zmian chorobowych.