

**Z warsztatów badawczych i doświadczeń klinicznych**

**Kazimierz Pasternak**

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie

## **WPŁYW INTOKSYKACJI MORFINĄ NA EFEKTYWNOŚĆ PROCESU AMINOACYLACJI tRNA WĄTROBY MYSZY**

### **WSTĘP**

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. Badania procesu aminoacylacji wykazują, że może zmieniać się zarówno zdolność wiązania aminokwasów przez tRNA, jak i aktywność aminoacylo-tRNA syntetaz (aaRS) [12, 13, 14]. Wielkość aminoacylacji zależy, oprócz dostępności ATP, od zdolności tRNA do wiązania aminokwasów oraz aktywności aaRS. Działanie morfiny na organizmy żywe jest dość zróżnicowane [5,8,9,10,11]. W celu przeanalizowania wpływu dużych dawek morfiny na proces aminoacylacji określono zdolność wiązania aminokwasów przez tRNA i aktywność aaRS wątroby myszy intoksykowanych morfiną i kontrolnych.

### **MATERIAŁ I METODY**

Materiałem do badań były białe myszy wagi 25-35 g. Zwierzęta podzielono na dwie 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 [10], Grupa druga, kontrolna myszy otrzymywała dootrzewnowo sól fizjologiczną. Doświadczenia

prowadzano przez pięć dni, a następnie po dekapitacji myszy pobierano wątroby i preparowano z nich tRNA metodą ekstrakcji fenolowej [17,18]. Preparat tRNA poddawano oczyszczaniu na kolumnie z celulozą DEAE-52 i deaminoacylacji według Denneya [6]. W ten sposób otrzymywano czyste preparaty tRNA, które oznaczano spektrofotometrycznie i używano do prób aminoacylacji. Preparat enzymatyczny aaRS konieczny do prób otrzymywano z wątroby królików metodą wysalania siarczanem amonu [2]. Ilość białka w próbach oznaczano metodą Bradforda [3]. Przy określaniu zdolności wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby intoksykowanych myszy używano preparatów aaRS z wątroby królika. Podobnie określając aktywność aaRS wątroby intoksykowanych myszy stosowano preparaty tRNA z wątroby królika. Mieszanina inkubacyjna zawierała w końcowej objętości 150 (1 100 mM bufor Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 <sup>14</sup>C aminokwasu. W kolejnych doświadczeniach stosowano tRNA uzyskane z wątrób badanych myszy zawsze wobec prób kontrolnych. Próby inkubowano w 37°C przez 20 min., a następnie наносono na krążki bibuły Whatman 3MM. 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. Zdolność wiązania aminokwasów przez tRNA określano w pmol/1ODU, natomiast aktywność aaRS określano w pmol/µg białka enzymatycznego.

Wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu testu Cochran-Coxa przyjmując poziom ufności p=0,05 jako znamieny.

## WYNIKI

Wartości liczbowe zdolności wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby myszy intoksykowanych morfiną i kontrolnych przedstawia tabela 1.

Zdolność wiązania tRNA była zróżnicowana dla poszczególnych aminokwasów, jednak zawsze niższa w przypadku tRNA wątroby myszy intoksykowanych morfiną (ryc. 1).

Różnice w zdolności wiązania aminokwasów przez tRNA intoksykowanych myszy i kontrolnych były statystycznie znamienne

Aktywność badanych dziesięciu aaRS była niższa w przypadku myszy intoksykowanych morfiną niż aktywność aaRS myszy kontrolnych (tab. 2).

Spadek aktywności aaRS wątroby myszy narażonych na działanie morfiny dotyczył wszystkich aaRS jednak w różnym stopniu (ryc. 2).

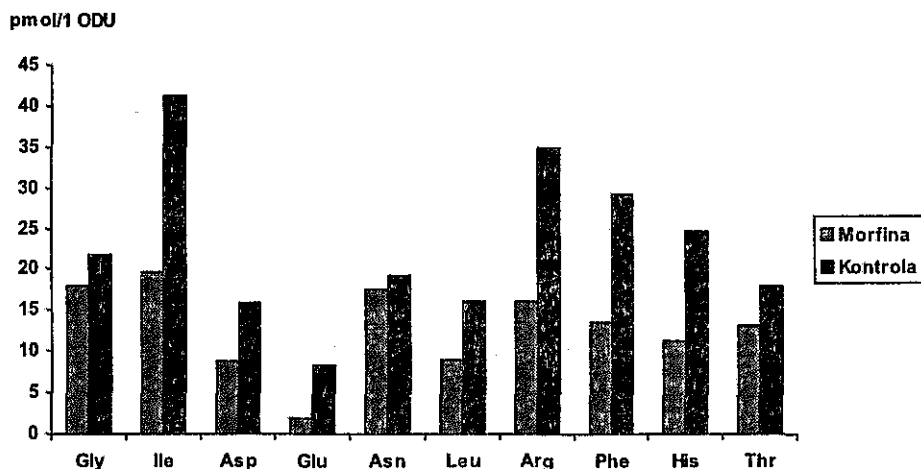
Przeprowadzona analiza wykazała, że różnice aktywności badanych aaRS wątroby intoksykowanych morfiną myszy i kontrolnych były w większości statystycznie znamienne. Brak statystycznej różnicy wykazano jedynie w przypadku aminoacylotRNA syntetazy fenyloalanylowej i treonylowej.

**TABELA 1**  
**Zdolność wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby**  
**myszy otrzymujących morfinę**

Aminokwas	Wielkość wiązania aminokwasów przez tRNA pmol/1 ODU	
	Morfina $\bar{x} \pm SD$	Kontrola $\bar{x} \pm SD$
Gly	18,00±4,30	21,79±4,94
Ile	19,68±3,95	41,29±6,76
Asp	8,70±1,82	15,96±2,54
Glu	1,88±0,51	8,35±1,43
Asn	17,64±3,23	19,33±3,54
Leu	8,99±1,96	16,22±3,84
Arg	16,06±3,55	35,02±6,21
Phe	13,57±3,14	29,28±3,55
His	11,37±2,34	24,62±3,72
Thr	13,25±4,58	18,13±4,11

$\bar{x}$  – średnia z dziesięciu zwierząt  
 SD – odchylenie standardowe

**RYCINA 1**  
**Zdolność wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby myszy intoksykowanej morfiną**

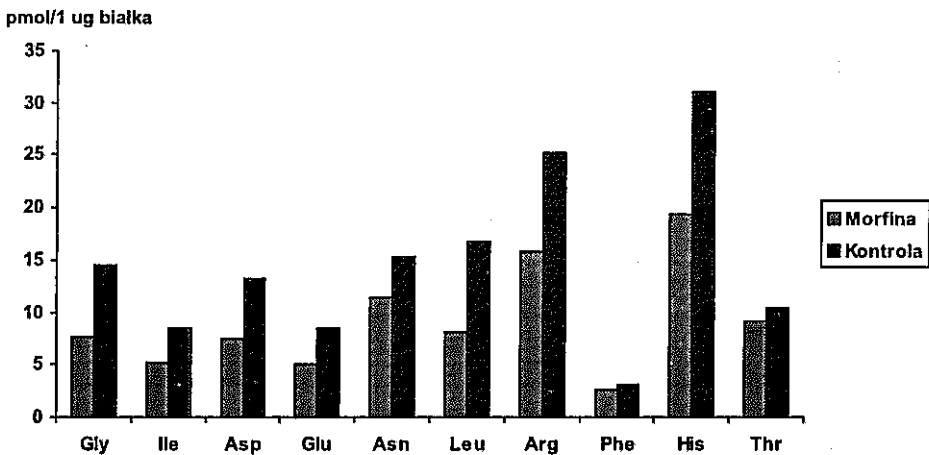


**TABELA 2**  
**Aktywność aaRS wątroby myszy otrzymujących morfinę**

aaRS	Aktywność aaRS pmol/ 1 µg białka	
	Morfina $\bar{x} \pm SD$	Kontrola $\bar{x} \pm SD$
Gly-	7,64±1,82	14,45±3,05
Ile-	5,18±1,58	8,44±1,90
Asp-	7,49±1,95	13,14±2,65
Glu-	5,12±1,90	8,48±1,95
Asn-	11,45±2,52	15,35±3,20
Leu-	8,17±2,15	16,75±3,82
Arg-	15,87±5,18	25,25±4,56
Phe-	2,61±0,56	3,09±0,90
His-	19,45±3,17	31,08±4,95
Thr-	9,18±2,28	10,50±2,19

$\bar{x}$  – średnia z dziesięciu zwierząt  
SD – odchylenie standardowe

**RYCINA 2**  
**Aktywność aaRS wątroby myszy intoksykowanych morfiną**



## DYSKUSJA

Znane są efekty działania narkotyków na organizm człowieka. Stosowanie tych związków w leczeniu wiąże się głównie z ich silnym działaniem przeciwbólowym. Morfina jest jednym z dość często stosowanych narkotyków, a jej działanie na organizmy żywe jest dość znane [4, 7, 9, 10]. Przy przewlekłym stosowaniu morfiny dochodzi do uzależnienia organizmu człowieka. Manifestuje się to złym samopoczuciem i zwiększonym zapotrzebowaniem na morfinę, co związane jest to bezpośrednio z przestrojeniem metabolizmu komórkowego [11]. Długotrwałe stosowanie morfiny czy innych środków narkotycznych prowadzi do wyniszczenia organizmu [1, 4, 15, 16]. Mechanizm działania morfiny wiąże się ze zmianami procesów metabolicznych organizmu. W gospodarce białkowej dochodzi jednak nie tylko do stymulacji katabolizmu, ale również do zaburzenia procesu biosyntezy białek. Przeprowadzone badania wskazują, że pod wpływem morfiny zachodzą zmiany zdolności akceptorowej tRNA wątroby myszy. Ulega również zmianom aktywność aaRS. Doświadczalnie manifestuje się to zmniejszoną możliwością połączenia badanych aminokwasów ze specyficznymi dla nich tRNA. Sprawą dyskusyjną jest czy zmienia się ilość izoakceptorowych tRNA dla poszczególnych aminokwasów, czy może ma tu wpływ zmniejszona aktywność enzymatyczna aaRS. Wydaje się, że oba te czynniki wpływają na zmniejszoną aminoacylację, co w następstwie powoduje zmniejszoną dostępność aminokwasów do procesu translacji. Wyniszczenie następujące w wyniku nadużywania narkotyków przez narkomanów może wiązać się nie tylko z niedostatecznym zwykle odżywianiem, nasilonym katabolizmem, ale również z zaburzonym procesem aktywacji aminokwasów i związaną z tym zmniejszoną biosyntezą białka.

## WNIOSKI

1. Morfina wpływa na proces biosyntezy białka już na etapie aktywacji aminokwasów.
2. Morfina zmniejsza zdolność wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby intoksykowanych myszy.
3. Działanie morfiny na komórkę wątrobową myszy powoduje obniżenie aktywności enzymatycznej badanych aminoacylo-tRNA syntetaz.

Kazimierz Pasternak

### **The influence of morphine intoxication on tRNA aminoacylation effectiveness in the mouse liver**

### **Summary**

The experiments were conducted on white mice divided into tested and control groups. In the tested group morphine was administered intraperitoneally for five days, while the control group received intraperitoneally 0,9% NaCl only. tRNA was obtained from livers of tested and control mice by phenol extraction. Aminoacyl-

tRNA synthetases were obtained from livers of intoxicated mice by means of fractionation with ammonium sulphate. The obtained tRNA and aminoacyl-tRNA synthetases were used to test aminoacylation. Aminoacyl-tRNA synthetases used in the aminoacylation tests to establish the effectiveness of binding amino-acids by tRNA of intoxicated mice were obtained from healthy rabbit livers. Similarly, rabbit livers were the source of tRNA used in aminoacylation tests to establish the activity of aminoacyl-tRNA synthetases of intoxicated mice. Quantity of ten radioactive amino-acids bound to tRNA was measured. The results suggest that morphine decreases tRNA aminoacylation effectiveness by reducing the effectiveness of binding amino-acids by tRNA, as well as by decreasing activity of aminoacyl-tRNA synthetases. The effect of morphine was different for particular amino-acids.

**Key words:** morphine / intoxicated mice / tRNA aminoacylation / aminoacyl-tRNA synthetases

## PIŚMIENNICTWO

1. Ahtee L., Attila M., Carlson K.R., Haikala H.: *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. Borkowski T., Chareziński M.: *Activity of aminoacyl-transfer synthetases in the brain mitochondria.* J. Neurochem., 1971, 18, 851-857.
3. Bradford M.H.: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal. Biochem., 1976, 72, 248-254.
4. Collin E., Cesselin F.: *Neurobiological mechanisms of opioid tolerance and dependence.* Clin. Neuropharmacol., 1991, 14, 465-488.
5. Copeland R.L., Pradhan S.N.: *Effect of morphine on central neurotransmitters in the rat.* Biog. Amines, 1988, 5, 43-51.
6. Denney R.M.: *Detection and purification of rapidly sedimenting forms of aminoacyl-transfer ribonucleic acid synthetases from human placenta.* Arch. Biochem. Biophys., 1977, 183, 156-167.
7. Harris R.A., Loh H.H., Way E.L.: *Effects of divalent cations, cation chelators and ionophore on morphine analgesia and tolerance.* J. Pharmacol. Exp. Ther., 1975, 195, 3, 488-498.
8. 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, 2, 99-104.
9. Ling G.S.F., Paul D., Simantov R., Pasternak G.W.: *Differential development of acute tolerance to analgesia, respiratory depression, gastrointestinal transit and hormone release in a morphine infusion model.* Life Sci., 1989, 45, 1627-1636.
10. Mänttinen (P.T., Borisenko S.A., Rauhalä P., Tuomainen P., Tuominen R.K.: *Variation in tolerance to the antinociceptive, 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.

## Wpływ intoksykacji morfiną na efektywność procesu aminoacylacji tRNA wątroby myszy

11. Pasternak G.W.: *Pharmacological mechanisms of opioid analgesics*. Clin. Neuropharmacol., 1993, 16, 1-18.
12. Pasternak K.: *Activity of aminoacyl-tRNA synthetase in myelogenesis and leukemia*. Appl. Biol. Commun., 1991, 1/3, 143-151.
13. Pasternak K., Szymonik-Lesiuk S., Brzuszkiewicz-Żarnowska H., Borkowski T.: *Activity of aminoacyl-tRNA synthetases in experimental hyperthyroidism in muscle tissues of the rabbit*. Acta Biochim. Pol., 1994, 41, 1, 35-38.
14. Pasternak K., Borkowski T., Pałuszkiewicz P., Karski J.: *Efektywność wiązania aminokwasów przez tRNA w raku żołądka*. 56 Zjazd Chirurgów Polskich, Lublin 1993. Pamiętnik, 1993, 4, 1461-1465.
15. Poling A., Lesage M., Roe D., Schaefer D.: *Acute and chronic effects of morphine in pigeons responding under a progressive-ratio schedule of food delivery*. Pharmacol. Biochem. Behav., 1996, 54, 2, 485-490.
16. Rauhala P., Munnist (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.
17. Sein K.T., Becarevicz A., Kanazir D.: *A simple modified method for the extraction of rat liver tRNA*. Anal. Biochem., 1969, 28, 65-69.
18. Zubay G.: *The isolation and fractionation of soluble ribonucleic acid*. J. Mol. Biol., 1972, 65, 375-378.