

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1992

Том 38 выпуск 3

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoj khimii

ISSN 0042-8809

1992

Volume 38 issue 3

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

в структуре которого одновременно присутствуют ФАД и ПХХ в качестве кофакторов. Большинство ПХХ-содержащих ферментов в своей структуре содержит медь, что не отмечается в случае ЛО.

Можно заключить, что сравнительное исследование ЛО I и ЛО II обнаружило существенную разницу по ряду тестированных физико-химических характеристик (вторичная структура, аминокислотный и кофакторный состав).

Особый интерес представляет обнаруженное присутствие некоторого количества прочно связанного ПХХ в гомогенных образцах ЛО из *Trichoderma sp.*

По-видимому, именно разницей в физико-химических свойствах ЛО можно объяснить частично и отличия в биологической (а именно в противоопухолевой) активности этих двух ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т. Т., Хадуев С. Х., Трещалина Е. М. // Проблемы клинической энзимологии. — Ужгород, 1989. — С. 13—14.
2. Березов Т. Т., Хадуев С. Х., Веса В. С. и др. // Объединенный симпозиум биохимических о-в СССР—ГДР, 10-й: Тезисы докладов. — Ташкент, 1989. — С. 12.
3. Березов Т. Т., Хадуев С. Х., Глазкова Т. Ю. и др. // Всесоюзная конф. «Биохимия — медицине»: Тезисы докладов. — Л., 1988. — С. 36—37.
4. Березов Т. Т., Уманский В. Ю., Хадуев С. Х. и др. // Актуальные вопросы в биохимической и иммунологической диагностике злокачественных новообразований. — М., 1989. — С. 106—107.
5. Симонян А. Л., Бадалян И. Э., Хадуев С. Х. и др. Применение лизин- α -оксидазы в проточном ферментном анализаторе «Арфа» ВНИИ Атоминформ, 1989 // Препринт Ереванского физ. ин-та. — 1202(79)—89.
6. Хадуев С. Х., Лукашева Е. В., Смирнова И. П. и др. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 4. — С. 97—100.
7. Хадуев С. Х., Глазкова Т. Ю., Веса В. С. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1989. — № 10. — С. 476—477.
8. Хадуев С. Х., Лукашева Е. В., Смирнова И. П., Березов Т. Т. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 5. — С. 130—134.
9. Adachi O., Okamoto K., Shinagawa E. et al. // BioFactors. — 1988. — Vol. 1, N 3. — P. 251—254.
10. Amezawa M., Nonobe M., Shihagawa E. et al. // Analyt. Biochem. — 1985. — Vol. 151. — P. 263—267.
11. Berzov T. T., Khaduev S. Kh., Umansky V. Yu. // FEBS Meeting, 19-th Abstracts. — Rome, 1989. — TH232.
12. Goodwin T. W., Morton R. A. // Biochem. J. — 1946. — Vol. 40. — P. 628—632.
13. Khaduev S. Kh., Vesa V. S., Esaki N. et al. // Jap. Biochem. Soc. Biochemistry (Jap. Ed.). — 1989. — Vol. 61, N 9. — P. 806.
14. Kido T., Soda K. // Seikagaku. — 1984. — Vol. 56. — P. 952.
15. Salisburg S. A., Forrest H. S., Cruse B. T., Kennard O. // Nature. — 1979. — Vol. 280. — P. 843—844.
16. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S. // Analyt. Chem. — 1958. — Vol. 30. — P. 1190—1206.
17. Yee Hsing Chen, Jen Tsi Yong, Kue Hong Chan. // Biochemistry (Wash.) — 1974. — Vol. 13, N 16. — P. 3350—3359.

Поступила 09.06.91

COMPARATIVE STUDIES OF SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF L-LYSINE OXIDASE FROM *TRICHODERMA SP* AND *TRICHODERMA VIRIDE* Y244-2

S. Kh. Khaduev, V. S. Vesa, E. V. Lukashova, T. Oykawa, N. Esaki, K. Soda, O. Adachi, K. Yagi, T. T. Berzov

P. Lumumba People's Friendship University, Moscow, Institute of Applied Enzymology, Vilnius, Kyoto University, Yamaguchi University, Institute of Applied Biochemistry, Mitake, GIFU, Japan

Some physicochemical properties of L-lysine oxidase from two strains of *Trichoderma* were studied. Content of metals and cofactors (Se, Zn, Cu, Fe, Co, Mn, Mo), amino acid analysis, secondary structure were estimated. The enzyme molecule from *Trichoderma sp* was found to contain both FAD and PQQ cofactors.

М. Ф. Гулый, В. Н. Синицкий, Н. А. Стогний, В. В. Сушкова, Н. В. Силонова, Н. Ф. Шевцова, Н. Н. Касьянова

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ПЕЧЕНИ ПРИ МОРФИННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ РАЗЛИЧНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

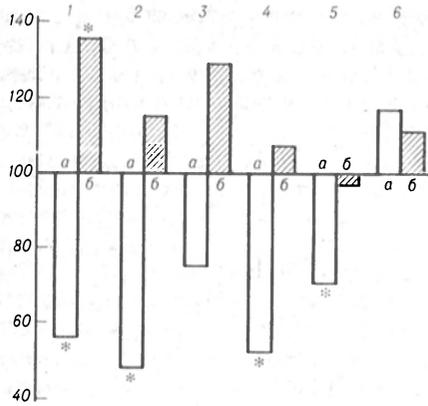
Морфинизм — болезненное пристрастие к употреблению морфина, являющегося алкалоидом опия. Небольшие дозы его вызывают эйфорию и возбуждение, а большие — депрессивное состояние [6]. Единой теории, объясняющей механизм развития физической зависимости, а также абстинентного синдрома, нет. Показано, что в развитии наркотической зависимости большое значение имеет изменение метаболизма белков, нуклеиновых кислот и биогенных аминов [14]. Так, при хроническом введении морфина крысам повышается синтез высокомолекулярных синаптических белков [9]. Введение морфина (130 мг/кг) в течение 4 сут приводит к тому, что синтез растворимых белков в стволе мозга крыс вначале тормозится, а затем усиливается [14]. Добавление же морфина к бесклеточной системе, выделенной из мозга контрольных и хронически получавших морфин мышей, не оказывало влияния на биосинтез белков, но полисомы из мозга мышей, получающих морфин, были более активны по сравнению с контрольными [10]. Предполагают, что морфин может связываться с факторами инициации, аминоацил-тРНК-синтетазами (АРС) или отдельными изоакцепторными тРНК. Эти процессы в печени, где в основном происходит превращение морфина, изучены мало [11].

Целью данной работы явилось изучение влияния морфина на биосинтез белка, а также на процессы гликолиза и цикла трикарбонных кислот как энергетических источников для метаболических процессов.

Методика. Исследования проведены на 48 белых крысах-самцах линии Вистар массой 160—190 г. Гидрохлорид морфина вводили подкожно животным (1-я группа) в течение 6 дней внутривентриально в виде 1% раствора из расчета 30 мг/кг массы тела; крысы 2-й группы получали морфин в течение 5 нед по схеме, разработанной ранее. Контрольным животным вводили равный объем физиологического раствора.

Содержание глюкозы в крови определяли о-толуидиновым методом, метаболиты гликолиза и цикла трикарбонных кислот — ферментативными методами [1]. Активность малат- и лактатдегидрогеназы в надосадочной жидкости гомогената печени (после центрифугирования при 105 000 g) определяли, как описано. Из печени животных выделяли суммарные тРНК, используя метод [7], препараты АРС (КФ 6.1.1) выделяли из надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования гомогената ткани (90 мин, 105 000 g) с последующей хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе [10]. Белок определяли по Лоури [13].

Для определения уровня аминоацилирования тРНК использовали инкубационную смесь (объем 0,25 мл), содержащую 50 мМ трис-НСl pH 7,5, 4 мМ АТФ, 20 мМ MgCl₂, 5 мМ KCl, 4 мМ дитиотреитол, 0,1—0,2 мМ отдель-



Содержание метаболитов гликолиза и цикла трикарбоновых кислот в печени животных с морфинной интоксикацией различной длительности.

По оси ординат — содержание метаболитов (в % по отношению к контролю, принятому за 100 %). А — введение морфина в течение 6 дней; Б — введение морфина в течение 5 нед. 1 — лактат; 2 — пируват; 3 — глутамат; 4 — малат; 5 — α -кетоглутарат; 6 — оксалоацетат. Звездочка — $p < 0,05$ по отношению к контролю.

ных ^{14}C -аминокислот, 100 мкг тРНК и 300 мкг белка суммарных АРС. Время инкубации 15 мин, температура 37°C . Прекращали реакцию, добавляя равный объем охлажденной 10 % трихлоруксусной кислоты. Контролем на сорбцию служили пробы со всеми компонентами, кроме тРНК, которую добавляли сразу после остановки реакции. Осадки отмывали, как описано [5]. Радиоактивность проб определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-30 («Intertechnique», Франция). Уровень аминоацилирования тРНК отдельными мечеными аминокислотами выражали в пикомолях акцентрированной аминокислоты на 1 мг тРНК, а общий уровень аминоацилирования тРНК смесью ^{14}C -аминокислот гидролизата белка хлореллы — в импульсах в 1 мин на 1 мг тРНК. В опытах использовали ^{14}C -аминокислоты («Chemarol», Чехо-Словакия): лейцин, валин, триптофан, фенилаланин, глицин, глутаминовую кислоту с удельной активностью 1,74; 7,4; 0,69; 1,14; 1,12, Гбк/мМ соответственно и смесь ^{14}C -аминокислот гидролизата белка хлореллы. Полученные результаты обработаны статистически [3].

Результаты и обсуждение. В I серии опытов морфин вводили в течение 6 дней. При этом в печени подопытных животных по сравнению с контрольными содержание лактата снижается на 45 %, пирувата — на 53 %, малата — на 50 % и α -кетоглутарата — на 32 %, что указывает на значительное угнетение гликолиза и окислительных процессов (см. рисунок). Подобные данные были получены другими авторами в опытах *in vitro* [2]. Известно, что пируват и малат в процессе метаболизма могут быть предшественниками щавелевоуксусной кислоты.

Влияние морфина на уровень аминоацилирования тРНК печени крыс (в пмоль акцентрированной ^{14}C -аминокислоты на 1 мг тРНК; $n=5$)

^{14}C -аминокислота	Контроль	Морфин
Лейцин	492±39	391±25*
Валин	1082±32	960±44*
Триптофан	2588±108	2246±190
Глутаминовая кислота	490±14	534±37
Фенилаланин	203±5	310±17*
Глицин	1742±192	2510±252*
Смесь ^{14}C -аминокислот гидролизата белка хлореллы, имп/мин/мг тРНК	760750±7790	574020±10750*

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В наших опытах соотношение пар пируват/оксалоацетат и малат/оксалоацетат при введении морфина снижается. У контрольных животных оно составляет 1,38 и 1,79, у подопытных — 0,55 и 0,76 соответственно.

Во II серии опытов морфин вводили длительно (в течение 5 нед). Отмечено снижение активности лактатдегидрогеназы в 1,5 раза: $3,58 \pm 0,31$ нмоль/мг белка в 1 мин у подопытных животных и $5,20 \pm 0,35$ нмоль/мг белка в 1 мин у контрольных, т. е. происходило накопление лактата в печени. Изменения активности малатдегидрогеназы не выявлено ($4,03 \pm 0,27$ нмоль/мг белка в 1 мин в опыте и $4,52 \pm 0,27$ нмоль/мг белка в 1 мин в контроле). Изменения содержания пирувата, глутамата, малата, α -кетоглутарата и оксалоацетата у подопытных животных в сравнении с контрольными также не обнаружено. Поскольку при кратковременном введении морфина указанные изменения имеют место, а при длительном отсутствуют, это, вероятно, может свидетельствовать о реализации компенсаторных возможностей организма животных.

При исследовании начального этапа биосинтеза белка в печени крыс показано, что кратковременное (в течение 6 дней) введение морфина вызывает угнетение общего уровня аминоацилирования тРНК смесью ^{14}C -аминокислот гидролизата белка на 24 % (см. таблицу). При сопоставлении уровня аминоацилирования тРНК отдельными мечеными аминокислотами выявлена неоднозначная картина: под действием морфина снижается уровень аминоацилирования тРНК валином и лейцином, практически не изменяется по сравнению с контролем аминоацилирование тРНК триптофаном и глутаминовой кислотой, в то же время несколько повышается аминоацилирование тРНК глицином и в значительной степени (на 25 %) — фенилаланином.

Необходимо подчеркнуть, что при введении морфина наблюдаются изменения процесса аминоацилирования тРНК, подобные тем, которые имеют место под действием этанола [5]. Поэтому не исключено, что существует определенная направленность в характере влияния этанола и морфина на начальный этап биосинтеза белка и наличие общих звеньев в механизме действия этанола и наркотических веществ на метаболические процессы в организме. Можно предположить, что именно эти общие звенья имеют непосредственное отношение к патогенезу наркотической зависимости.

ЛИТЕРАТУРА

- Асатиани В. С. Новые методы биохимической фотометрии. — М., 1965.
- Гегенава Г. П., Чистяков В. В. // Бюл. экспер. биол. — 1975. — № 10. — С. 77—79.
- Кокунин В. А. // Укр. биохим. журн. — 1975. — Т. 47, № 6. — С. 776—790.
- Мачука Г. Х., Ельская А. В., Коваленко М. И., Корнелюк А. И. — М., 1976.
- Сушкова В. В., Касьянова П. П., Васильева С. М., Гулый М. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 3. — С. 21—24.
- Сытинский И. А. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва. — 1976. — Т. 21, № 2. — С. 137—144.
- Brungaber E. F. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1962. — Vol. 8, N 1. — P. 1—3.

8. Castels T. R., Campbell S., Gouge H., Lee C. C. // *J. Pharmacol. exp. Ther.*— 1972.— Vol. 181.— P. 99—103.
9. Clouet D. H. // *Catecholamins and Behav.*— 1975.— Vol. 2.— P. 167—172.
10. Craves F. B., Loh H. H., Meyerhoff J. L. // *J. Neurochem.*— 1978.— Vol. 31, N 5.— P. 1309—1316.
11. Keller E., Zamechnic P. // *J. biol. Chem.*— 1956.— Vol. 221, N 1.— P. 45—59.
12. Kunisuke N., Yasuo O., Hideharu J. et al. // *Biochem. Pharmacol.*— 1986.— Vol. 35, N 20.— P. 3543—3548.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.*— 1951.— Vol. 193, N 1.— P. 265—275.
14. Rönnbäck L., Hasson E. // *Biochem. Pharmacol.*— 1986.— Vol. 35, N 21.— P. 3685—3692.

Поступила 07.02.91

SPECIFICITY OF METABOLIC IMPAIRMENTS IN LIVER TISSUE DURING MORPHINE INTOXICATION OF VARIOUS DURATION

M. F. Guly, V. N. Sinitsky, N. A. Stogny, V. V. Sushkova, N. V. Silonova, N. F. Shevtsova, N. N. Kas'yanova

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Administration of morphine into rats at a dose of 30 mg/kg within 6 days led to a decrease in total rate of tRNA aminoacylation in liver tissue. Content of lactate, pyruvate, malate and α -ketoglutarate was decreased within 6 days-long course of morphine administration, while content of lactate was only altered after 5 weeks of the intoxication. Adaptation reactions appear to be increased with time in long-term intoxication with morphine.

© Е. В. ЗУБАРЕВА, Р. И. СЕФЕРОВА, 1992

УДК 616-092:612.591]-07:616-008.939.15-092.9

Е. В. Зубарева, Р. И. Сеферова

ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА ТКАНЕЙ КРЫС ПРИ ГИПЕРТЕРМИИ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ

Институт физиологии и экспериментальной патологии аридной зоны АН Таджикистана, Ашхабад

Многообразные функции биологической мембраны и активность локализованных на ней ферментов, как в обычных, так и в экстремальных условиях, в первую очередь зависят от состояния ее липидного компонента [2, 3, 10, 14]. Существует мнение, что при экстремально высокой температуре прежде всего повреждается клеточная мембрана, липидный бислой которой чрезмерно разжижается, что вызывает потерю функциональной способности биомембраны, а в дальнейшем приводит к гибели клетки [1, 5, 9]. В связи с этим исследование липидного состава биомембран при гипертермии вызывает значительный интерес. Вместе с тем сведения о содержании и составе липидов мембран при действии на организм экстремально высокой температуры весьма ограничены.

Целью настоящего исследования явилось изучение липидного состава (фосфолипиды и холестерин) гомогенатов внутренних органов, мозга и скелетных мышц крыс при гипертермии разной степени.

Методика. Белых беспородных крыс массой 250—300 г перегревали в термокамере при 45 °С. Контролем служили интактные животные такой же массы. Экспериментальные животные были разделены на 3 группы: 1-я — перегревание до повышения ректальной температуры до 40—40,5 °С, 2-я — до 41—42 °С, 3-я — до теплого

го шока (ректальная температура повышалась до 43—45 °С). Липиды из тканей экстрагировали по методу Фолча. Разделение фосфолипидов на фракции проводили методом двухмерной тонкослойной хроматографии на силикагеле марки КСК в системе растворителей хлороформ — метанол — аммиак (81,2:31,2:6,0) и хлороформ — метанол — ацетон — ледяная уксусная кислота — вода (62,0:12,5:25,0:12,5:6,25) [8, 11]. Количество фосфолипидов определяли по содержанию общего липидного фосфора методом [13]. Содержание холестерина в липидном экстракте определяли по методу [7]. Пробы фотометрировали на спектрофотометре «Specol 11» при длине волны 550 нм. Математическую обработку результатов проводили на ЭВМ «Искра-226» по стандартным программам статистического анализа.

Результаты и обсуждение. Как видно из представленных результатов, только два фосфолипида обращают на себя внимание: фосфатидилинозит и сфингомиелин (табл. 1). Содержание фосфатидилинозита увеличивается во всех исследованных тканях, кроме почек, при первых двух степенях перегревания и не отличается от контрольного уровня при гипертермическом шоке. Сфингомиелин — единственный фосфолипид, количество которого возрастает во всех исследованных тканях при всех степенях перегревания. Изменение содержания других фосфолипидов наблюдается не всегда и не имеет четкой направленности. Так, количество фосфатидилсерина снижается у крыс, перегретых до 40—40,5 °С, только в сердце и скелетных мышцах. Содержание кардиолипина повышается в печени и мышцах крыс, перегретых до теплового шока.

Учитывая, что постоянные и однонаправленные изменения выявлены в содержании только двух фосфолипидов, можно предположить, что именно они играют какую-то роль в компенсации неблагоприятного воздействия гипертермии на клетку. Сфингомиелин — самый насыщенный фосфолипид, и увеличение его количества способствует повышению микровязкости мембран, в которые он входит [3]. Кроме того, было установлено, что сфингомиелин обладает высоким сродством к холестерину [12]. Таким образом, увеличение содержания сфингомиелина должно вызывать снижение жидкости мембраны за счет высокой насыщенности его жирнокислотного состава и выраженного сродства к холестерину. Снижение жидкости мембраны при гипертермии, как известно, — фактор положительный [10, 14]. Следовательно, сфингомиелин может рассматриваться как фосфолипид, предотвращающий чрезмерное разжижение мембран при экстремально высокой температуре.

Второй фосфолипид, содержание которого при гипертермии повышается почти во всех органах (кроме почек), — фосфатидилинозит — образуется в цикле инозитоловых липидов. Инозитоловый цикл необходим для нормального протекания целого ряда физиологических процессов: сокращения мускулатуры, открытия ионных каналов, фоторецепции у беспозвоночных и др. [4]. Имеются сведения об активации этого цикла при действии тепла [6]. В исследованиях на фибробластах хомячков было показано, что гипертермия вызывает увеличение уровня инозитоловых фосфатов, в том числе и фосфатидилинозита, коррелирующее с накоплением свободного кальция в клетке. Влияние тепла на накопление внутриклеточного кальция и инозитоловых фосфатов является