

Wnioski

1. Poziom kortyzolu w surowicy krwi jagniąt przed postępowaniem przedubojowym uzależniony jest od ich genotypu; najniższą koncentracją kortyzolu odznacza się krew jagniąt mieszańców po trykach berrichon du cher.

2. Obrót przedubojowy powoduje istotny, niezależny od pochodzenia genetycznego, wzrost poziomu kortyzolu w surowicy krwi jagniąt.

3. Bardziej wrażliwe na manipulacje przedubojowe są jagnięta mieszańce, mniej natomiast jagnięta czystej rasy; z grup mieszańców największą wrażliwością odznaczają się jagnięta po trykach berrichon du cher.

4. Dwugodzinny transport nie powoduje zakłóceń temperatury rektalnej u jagniąt.

Piśmiennictwo

1. Crookshank H. R., Elissalde M. H., White R. G., Clanton D. C., Smalley H. E.: J. Anim. Sci. 48, 430, 1979.
2. Dantzer R., Mormède P.: J. Anim. Sci. 57, 6, 1983.
3. Fordham D. R., Lincoln G. A., Ssewanyana E., Radway R. G.: Anim. Prod. 49, 103, 1989.
4. Grandin T.: J. Am. Vet. Med. Assoc. 204, 372, 1994.
5. Hargreaves A. L., Hutson G. D.: Appl. Anim. Behav. Sci. 26, 83, 1990.
6. Kent J. E., Molony V.: Res. Vet. Sci. 55, 246, 1993.
7. Mellor D. J., Murray L.: Res. Vet. Sci. 46, 392, 1989.
8. Minton J. E., Coppinger T. R., Ready P. G., Davis W. C., Blecha F.: J. Anim. Sci. 70, 1126, 1992.
9. Normy żywienia zwierząt gospodarskich. PWRiL, Warszawa 1985.
10. Parrot R. F., Misson B. H., De La Riva C. F.: Res. Vet. Sci. 56, 234, 1994.
11. Pierzchała K., Niezgoda J., Bobek S.: Zbl. Vet. Med. A. 32, 140, 1985.
12. Prost E.: Higiena mięsa. PWRiL, Warszawa 1985.
13. Rokicki E., Kolbuszewski T.: Higiena zwierząt. Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa, 1996.
14. Stupnicki R., Kokot F.: Metody radioimmunologiczne i radiokompetycyjne stosowane w klinice. PZWL, Warszawa, 1979.
15. Tarrant P. V., Kenny F. J., Harrington D., Murphy M.: Livest. Prod. Sci. 30, 223, 1992.

Adres autora: dr Janina Sowińska, ul. Kanta 26/29, 10-686 Olsztyn

JERZY TRUCHLIŃSKI, KAZIMIERZ PASTERNAK*

Wpływ rtęci na proces aktywacji aminokwasów w wątrobie szczurów

Zakład Biochemii Instytutu Żywienia Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR, ul. Akademicka 13, 20-033 Lublin

*Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego AM, ul. Lubartowska 85, 20-123 Lublin

Truchliński J., Pasternak K.

Summary

Influence of mercury on the activation of amino acids in rats liver

The purpose of this study was to determine differences in activity of aminoacyl-tRNA synthetases and bonding effectiveness of amino acids by tRNA in the livers of rats receiving mercury chloride in their drinking water. The experiments were conducted on Wistar rats divided into two groups. The first group received 100 mg/l doses of mercury (mercury chloride) in drinking water, the second was a control. After 6 weeks aminoacyl-tRNA synthetases and tRNA were obtained from the rat livers. The crude preparates of aminoacyl-tRNA synthetases were obtained by precipitation with ammonium supersulphate in the 40-70% range and tRNA was obtained by phenol extraction. The activity of aminoacyl-tRNA synthetases and bonding effectiveness of amino acids by tRNA were tested in vitro using incubation mixtures. The results showed that the activity of ten tested aminoacyl-tRNA synthetases was lower in livers of rats which received mercury chloride in drinking water than those in the control group. Moreover, the bonding effectiveness of amino acids by tRNA was lower in these rats' livers.

Pierwszym etapem biosyntezy białka jest proces aktywacji aminokwasów. Przebiega on przy udziale specyficznych enzymów, syntetaz aminoacylo-tRNA, które przy udziale ATP katalizują przyłączenie aminokwasu do tRNA. Aktywność syntetaz aminoacylo-tRNA syntetaz oraz zdolność wiązania aminokwasów przez tRNA mają bezpośredni wpływ na intensywność procesu aktywacji aminokwasów, a więc i biosyntezy biał-

ka. Intensywność tego procesu zmienia się w różnych stanach metabolicznych komórki (11, 12, 13). Metale ciężkie zmieniają metabolizm komórkowy (1, 14, 15). Działanie ich jest głównie związane z hamowaniem aktywności enzymów, blokowaniem reakcji chemicznych, wiązaniem z białkami, interakcją z innymi pierwiastkami, z rozrywaniem pewnych wiązań, czy nawet wpływem na replikację DNA (2, 9, 10, 17). Prze-

prorowadzone badania miały na celu określenie zmian aktywności syntetaz aminoacylo-tRNA oraz zmian zdolności wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby szczurów otrzymujących w wodzie pitnej rtęć w postaci chlorku rtęciowego.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na szczurach białych rasy Wistar. Podzielono je na grupy niezależnie od płci, po pięć zwierząt każda. Grupa pierwsza, badana, otrzymywała w wodzie do picia chlorek rtęci w ilości 100 mg/l (w przeliczeniu na rtęć). Druga grupa była kontrolną i dostawała do picia wodę destylowaną. Zwierzęta obu grup były karmione jednakowo karmą suchą LSM i pojone *ad libitum*. Doświadczenie prowadzono przez okres sześciu tygodni, a następnie zwierzęta usypiano ketaminą i pobierano wątrobę, z której otrzymywano preparaty enzymatyczne syntetaz aminoacylo-tRNA oraz preparowano tRNA. Badania aktywności syntetaz aminoacylo-tRNA oraz badania zdolności wiązania aminokwasów przez tRNA przeprowadzono przy zastosowaniu znakowanych radioaktywnie 10 aminokwasów. Były to: alanina, glicyna, lizyna, kwas asparaginowy, asparagina, leucyna, arginina, fenyloalanina, histydyna i treonina.

Otrzymywanie preparatów aminoacylo-tRNA syntetaz. Wątroby królików otrzymujących chlorek rtęciowy i kontrolnych homogenizowano w buforze o pH 7,4 zawierającym 0,1 M Tris-HCl, 0,35 M sacharozę, 0,06 M KCl, 0,01 M MgCl₂, 2,5 mM β-merkaptioetanol i poddawano wirowaniu w celu uzyskania cytosolu (4). Z kolei cytosol poddawano frakcjonowaniu na drodze wysalania siarczanem amonu. Z wysolonej frakcji białkowej w zakresie 40-70% nasycenia siarczanu amonu, po oddializowaniu soli, uzyskiwano surowe preparaty syntetaz aminoacylo-tRNA. W tak przygotowanych preparatach enzymatycznych oznaczano białko metodą Bradforda (3) i następnie używano do określania aktywności syntetaz aminoacylo-tRNA stosując tRNA z wątrób szczurów kontrolnych.

Preparaty enzymatyczne z wątroby szczurów kontrolnych służyły natomiast do badania zdolności wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby szczurów otrzymujących chlorek rtęciowy.

Preparatyka tRNA. Do preparatyki tRNA z wątroby szczurów badanych i kontrolnych stosowano tę samą metodę ekstrakcji fenolowej według Seina (16) i Zubay'a (19). Uzyskane preparaty tRNA oczyszczano na kolumnie DEAE 52 i poddawano deaminoacylacji według Denneya (5). Stężenie tRNA określano spektrofotometrycznie na podstawie absorbancji przy 260 nm. Badania aminoacylacji przeprowadzano *in vitro* stosując mieszaninę inkubacyjną o składzie 100 mM bufor Tris-HCl pH=7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10 mM ATP, 0,4 mM ditiotreitrol, 0,1 mM PMSF. Do tej podstawowej mieszaniny dodawano jeden z aminokwasów znakowanych ¹⁴C w ilości 18,5 kBq oraz preparat tRNA w ilości 2 ODU. Do prób inkubacyjnych dodawano preparat syntetaz aminoacylo-tRNA w ilości 50 µg białka enzymatycznego.

Następnie przeprowadzano inkubację w temperaturze 37°C przez 20 minut. Z mieszaniny inkubacyjnej pobiera-

no próby po 100 µl i наносzono na krążki bibuły Whatman 3 MM. Krążki po wysuszeniu płukano czterokrotnie zimnym 5% TCA, raz płynem Hokina (0,8 ml 10 M. NaOH + 60 ml lodowatego kwasu octowego + 95% etanol do objętości 1000 ml) i eterem. Po wysuszeniu krążków liczone radioaktywność w liczniku scyntylacyjnym firmy Beckman.

Aktywność badanych syntetaz aminoacylo-tRNA wyrażano w pikomolach związanego aminokwasu znakowanego ¹⁴C przez 1 µg białka.

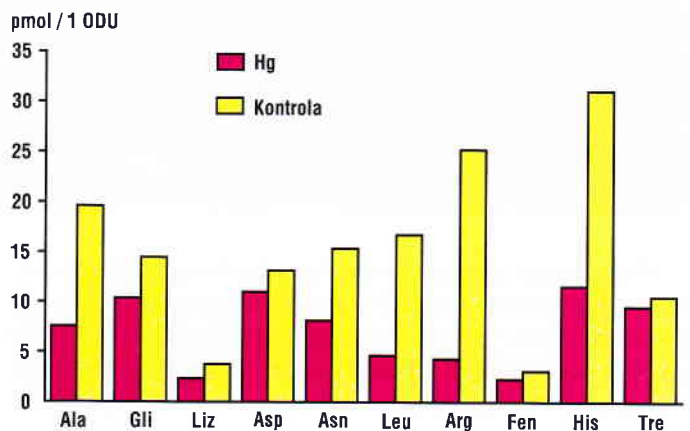
Zdolność wiązania poszczególnych aminokwasów przez badane tRNA wyrażano w pikomolach w przeliczeniu na 1 ODU tRNA.

Wyniki i omówienie

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono zmiany aktywności wszystkich badanych syntetaz aminoacylo-tRNA pochodzących z wątroby szczurów otrzymujących w wodzie pitnej dodatek chlorku rtęci (tab. 1).

Tab. 1. Wpływ rtęci na aktywność syntetaz aminoacylo-tRNA wątroby szczurów otrzymujących w wodzie pitnej chlorek rtęci i kontrolnych (n = 10; $\bar{x} \pm s$)

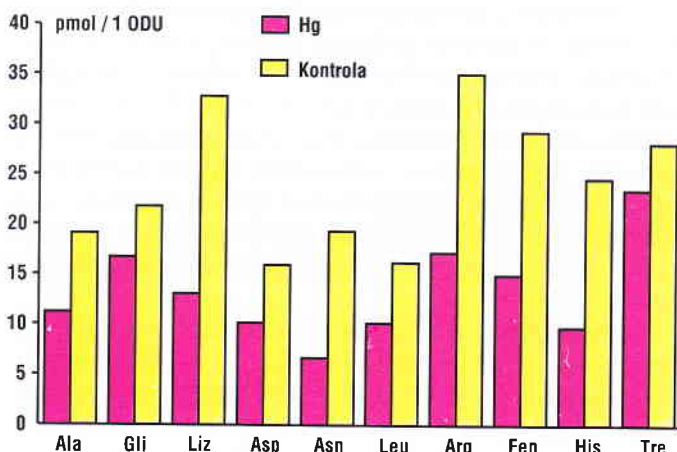
Aminokwasy	Aktywność aminoacylo-tRNA syntetaz (pmole/µg białka)	
	Hg	kontrola
Ala	7,52±1,82	19,57±3,86
Gli	10,37±1,65	14,45±2,31
Liz	2,32±0,51	3,76±1,14
Asp	10,98±2,40	13,14±3,11
Asn	8,11±2,03	15,35±2,90
Leu	4,62±1,80	16,75±3,45
Arg	4,29±1,55	25,25±4,92
Fen	2,29±0,46	3,09±0,95
His	11,55±2,25	31,08±6,71
Tre	9,51±2,12	10,50±2,15



Ryc. 1. Wpływ rtęci na aktywność syntetaz aminoacylo-tRNA wątroby szczura

Tab. 2. Wpływ rtęci na zdolność wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby szczura (n = 10; $\bar{x} \pm s$)

Aminokwasy	Wiązanie aminokwasów przez tRNA (pmole/1 ODU)	
	Hg	kontrola
Ala	11,20±2,05	19,12±3,14
Gli	16,72±2,45	21,79±5,21
Liz	13,06±3,16	32,77±5,92
Asp	10,14±2,25	15,96±2,05
Asn	6,67±1,01	19,33±2,56
Leu	10,16±1,56	16,22±1,94
Arg	17,23±2,35	35,02±6,16
Fen	14,98±2,70	29,28±5,47
His	9,73±1,15	24,62±4,82
Tre	23,48±4,52	28,13±5,11



Ryc. 2. Wpływ rtęci na zdolność wiązania aminokwasów przez tRNA

Wszystkie badane syntetazy aminoacylo-tRNA syntetaz wykazywały w grupie badanej niższą aktywność niż u zwierząt kontrolnych. Spadek aktywności był jednak zróżnicowany dla poszczególnych enzymów. Największy spadek aktywności stwierdzono w przypadku AlaRS, AsnRS, ArgRS i His (ryc. 1).

Zmiany aktywności syntetaz aminoacylo-tRNA związane są z koniecznością odpowiedzi organizmu na różne czynniki. Rtęć wywiera szkodliwe działanie na ustrój człowieka (1, 10, 14). Zmniejszenie aktywności syntetaz aminoacylo-tRNA pod wpływem rtęci będzie upośledzało jeden z elementów procesu aktywacji aminokwasów. Rtęć wpływa również na drugi z elementów tego procesu, a mianowicie tRNA i jego zdolność wiązania aminokwasów. Badania wykazały, że dodatek chlorku rtęciowego w pożywieniu powoduje zmniejszenie zdolności wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby szczura (tab. 2).

tRNA zwierząt otrzymujących chlorek rtęciowy wykazywał dla wszystkich stosowanych, znakowanych ^{14}C aminokwasów niższą zdolność wiązania niż tRNA zwierząt kontrolnych. Zmiana zdolności wiązania była najbardziej znaczna dla lizyny, asparaginy, argininy, fenyloalaniny i histydyny (ryc. 2).

Działanie rtęci podawanej z wodą pitną zmienia zarówno aktywność syntetaz aminoacylo-tRNA, jak i zdolność wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby szczura. Następuje obniżenie aktywności enzymów i zdolności wiązania dla wszystkich badanych aminokwasów. W efekcie będzie to powodowało zmniejszoną dostępność aminokwasów do procesu translacji i w następstwie pogarszało biosyntezę białka. Jak wiadomo negatywne działanie rtęci na organizm zwierzęcy związane może być z oddziaływaniem na grupy funkcyjne enzymów, blokowaniem przebiegu reakcji chemicznych czy działaniem niespecyficznym (2, 18). W enzymatycznym procesie aminoacylacji tRNA istnieje możliwość takich oddziaływań. W organizmie żywym należy brać pod uwagę także możliwość wzajemnych interakcji między metalami ciężkimi, które mogą nasilać swoje działanie, jak i interakcji między metalami ciężkimi a biopierwiastkami, które działają ochronnie (6, 7, 8).

Wnioski

1. Rtęć podawana w wodzie pitnej w postaci chlorku rtęciowego wpływa negatywnie zarówno na aktywność syntetaz aminoacylo-tRNA, jak i zdolność wiązania aminokwasów przez tRNA wątroby szczurów.
2. Rtęć powoduje zmniejszenie aktywności badanych syntetaz aminoacylo-tRNA oraz obniża zdolność wiązania aminokwasów przez tRNA.
3. Wpływ rtęci jest zróżnicowany dla poszczególnych syntetaz aminoacylo-tRNA, jak i badanych tRNA.

Piśmiennictwo

1. Bluhm R., Branch R. A.: *Int. Arch. Occup. Envir.* 68, 421, 1996.
2. Boot J. H.: *Cell Struct.* 21, 221, 1996.
3. Bradford M. M.: *Anal. Biochem.* 72, 248, 1976.
4. Chareziński M., Borkowski T.: *Arch. Biochem.* 207, 241, 1981.
5. Denney R. M.: *Arch. Biochem.* 183, 156, 1977.
6. Dobrzański Z., Kolacz R., Bodak E.: *Medycyna Wet.* 52, 763, 1996.
7. Durlach J.: *Magnez w praktyce klinicznej*. PZWL, Warszawa, 1991.
8. Grosicki A., Kowalski B.: *Acta Pol. Toxicol., Mat. VI Zjazdu Nauk. P. T. Toksykologicznego, Nałęczów*, 1996, s. 18.
9. Huang C. S., Narahashi T.: *Toxic. Appl. Pharm.* 140, 508, 1996.
10. Naarala J., Loikkanen J., Savolainen K.: *Neurosci. Res. Commun.* 19, 135, 1996.
11. Pamphlett R., Waley P.: *Acta Neuropath.* 92, 525, 1996.
12. Pasternak K., Borkowski T., Paluszkiwicz P., Karski J.: *56-th Congress Polish Ass. Surgeons, Lublin, Pamiętnik* 4, 1461, 1993.
13. Pasternak K., Szymonik-Lesiuk S., Brzuszkiewicz-Żarnowska H., Borkowski T.: *Acta Biochim. Pol.* 40, 193, 1993.
14. Pfister E., Bockelmann I., Ferl T.: *Int. Arch. Occup. Envir.* 69, 14, 1996.
15. Ratcliffe H. E., Swanson G. M., Fischer L. J.: *J. Toxic. Envir.* 49, 221, 1996.
16. Sein K. T., Becarevic A., Kanazir D.: *Anal. Biochem.* 28, 65, 1969.
17. Stec J.: *Acta Pol. Toxicol., Mat. VI Zjazdu Nauk. P. T. Toksykologicznego, Nałęczów*, 1996, s. 14.
18. Srivastava D., Fox D. A.: *Mineral and Metal Neurotoxicology*. CRC Press Inc., Boca Raton, 1997.
19. Zubay G.: *J. Mol. Biol.* 65, 375, 1972.

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