

EFFECT OF NEUTRAL POLYMERS ON THE ACTIVITY
OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE IN THE MICE LIVER
MITOCHONDRIA WITH ENDOTOXIN ADMINISTRATION

Summary

It is shown that neutral polymers administered intraperitoneally to intact animals considerably affect glutamate dehydrogenase activity in the liver cell mitochondria as well as in the supernatant. Of the tested polymers, only polyvinyl methylacetamide and dextran inhibit a decrease in the level of mitochondrial enzyme activity which develops with administration of endotoxin. Polyvinyl pyrrolidone with molecular weight of 100 kDa, polyvinyl methylacetamide, dextran and polyvinyl caprolactam prevent an increase of glutamate dehydrogenase activity in the supernatant in case of endotoxin administration to animals. It is possibly a result of the effect of the mitochondrial structure stabilization by the above polymers. A physiological effect of polyvinyl pyrrolidone revealed as an effect on the activity level of mitochondrial glutamate dehydrogenase and in the supernatant after endotoxin administration to animals, depends on the molecular weight of the polymer.

Medical Institute, Volgograd.

1. Лебедев Н. И., Плахова Л. П. Значение серовара сальмонелл и биологических свойств возбудителей в эпидемическом процессе сальмонеллезов // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.— 1986.— № 8.— С. 24—28.
2. Маракуша Б. И., Петровская В. Т., Волковой К. И. Получение и характеристика биологических и генетических свойств устойчивых к неамину мутантов *Salmonella typhimurium* и *Salmonella dublin*, перспективных для создания вакцины // Там же.— 1986.— № 10.— С. 3—8.
3. Натанзон Л. В. Влияние бактериального эндотоксина на дыхательную функцию митохондрий // Укр. биохим. журн.— 1988.— 60, № 4.— С. 91—95.
4. Натанзон Л. В., Каплиев В. И. Изменение ультраструктуры митохондрий печени под действием бактериального эндотоксина // Тр. Волгоградского мед. ин-та.— 1988.— 41, вып. 3.— С. 113—117.
5. Платэ Н. А., Васильев А. Е. Физиологически активные полимеры.— М., Химия, 1986.— С. 11—15.
6. Kirsh Yu. E., Soos T. A., Karaputadze T. M. // Eur. Polym. J.— 1983.— 19, N 7.— P. 639—645.
7. Westphal V. O., Luderits O., Bister F. Über die Extraction von Bacterien mit Phenol 3 / Wasser // Zeitschrift für Naturforschung.— 1952.— 7b, N 3.— S. 148—155.
8. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях.— Л., 1962.— С. 180.
9. Кондрашева М. Н., Григоренко Е. В. Проявление стресса на уровне митохондрий, их стимуляция гормонами и регуляция гидроаэрономии // Журн. общ. биологии.— 1985.— № 4.— С. 516—525.
10. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie // Z. Klin. Chem. und Klin. Biochem.— 1972.— 10, N 4.— S. 182—192.
11. Cornal A., Bardawill C. G., David M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction // J. Biol. Chem.— 1949.— 177, N 2.— P. 751—766.
12. Виноградов А. Д., Лейкин Ю. Н., Липская Т. Ю. Биохимия митохондрий. Биоэнергетика. Руководство к практическим занятиям.— М.: Изд-во МГУ, 1977.— С. 64.
13. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.— Л.: Медицина, 1973.— С. 21—25, 90.

Волгоградский мед. ин-т

Получено 22.06.90

УДК 577.115.4

© Н. М. ГУЛА, О. О. МЕЛЬНИК, М. В. ВИСОЦЬКИЙ,
Д. І. БАЛКОВ, Г. Л. ВОЛКОВ, Н. М. ГОВСЕВА

РОЗПОДІЛ $[1-^{14}\text{C}]N$ -ПАЛЬМИТОІЛЕТАНОЛАМІНУ
ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТІВ У СУБКЛІТИННИХ ФРАКЦІЯХ
НЕЙРОБЛАСТОМИ C1300 N18

Изучали распределение в динамике $[1-^{14}\text{C}]N$ -пальмитолэтанолamina в субклеточных фракциях нейробластомы C1300 N18. Показано отличие динамики распределения метки в разных субклеточных

фракціях. В цитоплазмі рівень метки через 15 мин інкубації досягав величини, яка залишалася постійною до кінця експерименту. В мікросомальній фракції метка накопичувалася з часом і становилася максимальною в кінці експерименту. В плазматическій мембрані найбільше кількість метки виявлено через 15 мин, після чого кількість її зменшувалася. При цьому збільшувалося кількість вільних жирних кислот, яке з часом починало падати паралельно збільшенню кількості естерифікованих жирних кислот. Значительне кількість метки жирних кислот визначалося вже через 15 мин в складі ди- та тригліцеридів цитозоля і мікросомальної фракції.

У серці собак з експериментальним інфарктом на початку 80-х років було ідентифіковано новий етаноламіновий фосфоліпід N-ацилфосфатидилетаноламін [1]. Показано, що цей фосфоліпід гідролізується фосфоліпазою типу D з утворенням N-ацилетаноламінів [2]. Було вивчено його попередники та метаболіти, шляхи біосинтезу та деградації в тканинах [3—5].

Добуті результати свідчили про те, що виявлений фосфоліпід та продукти його гідролізу є незначними ліпідними компонентами багатьох біологічних мембран [6]. З'ясувалося також, що етаноламід олеїнової та пальмітинової кислот мають високу фізіологічну активність [7].

Нами в клітинах нейробластоми також були виявлені ці незначні ліпіди [8], до того ж продемонстровано вплив N-ацилетаноламінів на транспорт катіонів [9]. Додавання N-ацилетаноламінів до культурального середовища до кінцевої концентрації $5 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-7}$ М призводило до змін транспорту одно- та двовалентних катіонів через плазматичні мембрани клітин нейробластоми.

Результати, отримані в нашій лабораторії, та дані інших авторів [10, 11] дозволяють вважати, що фізіологічний ефект N-ацилетаноламінів реалізується саме на плазматичних мембранах клітин. У зв'язку з цим було важливо з'ясувати, яким чином цей ліпід розподіляється у субклітинних фракціях.

В даній роботі наведено результати вивчення розподілу в динаміці $[1-^{14}\text{C}]$ N-пальмітоїлетаноламіну в субклітинних фракціях нейробластоми C1300 N18.

Матеріали та методи

Для синтезу $[1-^{14}\text{C}]$ N-пальмітоїлетаноламіну використовували $[1-^{14}\text{C}]$ пальмітинову кислоту (20 МБк, питома активність 5 ГБк/л), яку активували в суміші n-бутанолу та хлористого ацетилю в співвідношенні 5:1 за обсягом, по чому витримували впродовж години на киплячій водяній бані. Після цього до проб додавали етаноламін і лишали у киплячій бані ще на дві години.

$[1-^{14}\text{C}]$ N-пальмітоїлетаноламін виділяли із суміші методом мікротонкошарової хроматографії на силікагелі у системі гексан — диетиловий ефір — ацетон — льодова оцтова кислота — 30:40:20:1, збираючи зону проти відповідного стандарту.

Для експерименту брали диференційовані клітини нейробластоми із 20 флаконів Кареля діаметром 10 см. Диференціювання викликали додаванням до культурального середовища 5'-бромдезоксиридину до кінцевої концентрації $5 \cdot 10^{-4}$ М. До кожного флакону додавали 1×10^{-5} $[1-^{14}\text{C}]$ N-пальмітоїлетаноламіну. Через певні відтинки часу, що їх позначено на малюнку, клітини нейробластоми тричі промивали середовищем Ігла по 3 мл, після того знімали розчином версену. Затим клітини переносили у 10 мл 10 мМ натрій-фосфатного буферу, який містив 0,5 мМ MgCl_2 , 0,02 %-ний азид натрію та ДНК-азу (5 мкг на 1 л). Клітини в буферному розчині піддавали дії ультразвуку протягом трьох хвилин на дезінтеграторі ULTRASON (Франція) при 22 кГц

і по цьому центрифугували 15 хв при 3000 обертів на 1 хв. Надосадові фракції відбирали, а до осаду додавали буфер і знову опромінювали та центрифугували за тих само умов. Надосадові фракції об'єднували і наносили 15 мл на градієнт фіколу (Ficoll 400, Швеція) з густиною 1,035, 1,065, 1,075 г/см³ і центрифугували 1 год при 90 000 g, унаслідок чого фракція цитозольних білків розташовувалася зверху, плазматичні мембрани на межі густини 1,035 та 1,065, мікосомальна фракція на денці пробірки. У всіх фракціях визначали обсяг, кількість білку та загальну радіоактивність.

Для виявлення мітки [1-¹⁴C]N-пальмітоїлетаноламіну та продуктів його перетворення проводили екстракцію ліпідів кожної субклітинної фракції за методом Блайя—Дайера. Для цього до міркової центрифугової пробірки відбирали 0,8 мл субклітинної фракції, додавали 2 мл метанолу та 1 мл хлороформу, гомогенізували у шклянному гомогенізаторі й лишали на 30 хв. Потім додавали хлороформ та фізіологічний розчин, і ще раз гомогенізували та центрифугували. Нижній шар відбирали, проводили повторну екстракцію за тих же умов і об'єднували отримані екстракти. По випаровуванні їх на роторовому випаровувачі додавали 100 мкл бензолу, 50 мкл наносили на платівку із силікагелем та розганяли у системі для нейтральних ліпідів (гексан—ефір—льодова оцтова кислота—85:15:1) за присутності належних стандартів. Зони, що відповідали стандартним, збирали до сцинтиляційних шклянок і вимірювали радіоактивність проб в ЖС-8 на сцинтиляційному лічильнику DELTA 300 (США). Визначали відсотковий вміст ліпідів відносно до загальної радіоактивності.

Для визначення вмісту N-пальмітоїлетаноламіну та фосфоліпідів наносили на платівку 50 мкл екстракту і розганяли у системі гексан—диетиловий ефір—ацетон—льодова оцтова кислота—30:40:20:1 за присутності стандарту. Фосфоліпіди за цих умов залишаються на старті. Радіоактивність визначали як і в попередньому випадку, і розраховували відсоток вмісту мітки у фракціях ліпідів.

Білок визначали за Лоурі, потім розраховували вміст білку у фракціях [12].

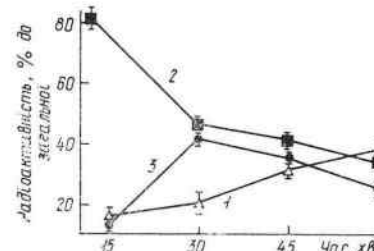
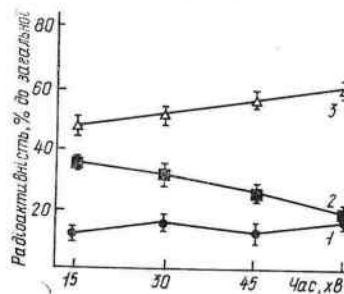
Результати і обговорення

На мал. 1 наведено результати розподілу мітки у плазматичній мембрані, цитозольній та мікосомній фракціях клітин. Динаміка розподілу мітки у субклітинних фракціях, як бачимо, різна. У цитоплазмі рівень мітки по 15 хв інкубації сягав величини, яка лишалася постійною до скінчення експерименту. В плазматичних мембранах найбільша кількість мітки виявлялася по 15 хв, а потім починала зменшуватися і за 1 год практично доходила рівня мітки в цитоплазмі. У мікосомальній фракції мітка з часом накопичувалася й ставала максимальною наприкінці експерименту. Ми не визначали розподілу мітки на перші хвилини інкубації клітин через те, що біологічна активність сполуки виявлялася лише опісля 15—20 хв інкубації. Вочевидь, що у перші хвилини мітка насамперед мусила накопичуватися у плазматичній мембрані, затим проникати у цитозоль, а потім в елементи, що увіходять до мікосомної фракції клітин. При цьому, оскільки для N-ацилетаноламінів відомі ферментативні системи, що розщеплюють їх, можна було очікувати відщеплення жирних кислот, які можуть підлягати подальшим перетворенням.

Динаміку розподілу мітки між N-ацилетаноламінами, жирними кислотами та їхніми ефірами наведено на мал. 2. Бачимо, що максимальна кількість мітки N-пальмітоїлетаноламіну, як і очікувалося, накопичувалася у плазматичній мембрані вже на перші хвилини, бо за 15 хв ми спостерігали початок її зменшення. При цьому кількість вільних жирних кислот збільшується, а потім починає спадати паралельно до збільшення кількості етерифікованих жирних кислот. Значна кількість мітки жирних кислот виявляється вже через 15 хв у складі ди-

та тригліцеридів цитозолу та мікросомної фракції (дані не наводяться). Це пояснюється тим, що жирні кислоти не накопичуються у вільному вигляді, а безпосередньо перетворюються або включаються у інші ліпіди й мобілізуються залежно від потреб. З даних літератури відомо, що тригліцериди є своєрідним депо жирних кислот [13], звідки вони легко відщеплюються та зуживаються у тих чи інших процесах або як такі, або по деяких додаткових перетвореннях.

Як показано нами в попередній роботі [14], понад половини ендогенного N-ацилфосфатидилетаноламіну клітини знаходиться в плаз-



Мал. 1. Розподіл [1-¹⁴C]N-пальмітоїлетаноламіну у субклітинних фракціях нейробластоми — цитозолі (1), плазматичних мембранах (2), мікросомах (3).

Мал. 2. Розподіл [1-¹⁴C]N-пальмітоїлетаноламіну та продуктів його метаболізму у плазматичній мембрані. 1 — естерифіковані жирні кислоти, 2 — [1-¹⁴C]N-пальмітоїлетаноламін, 3 — жирні кислоти.

матичних мембранах. Там же виявляється практично весь утворюваний із нього клітинний N-ацилетаноламін. Результати ж даної роботи свідчать про те, що мітка з екзогенного N-ацилетаноламіну швидко включається у плазматичну мембрану клітин нейробластоми C1300 N18, звідки досить легко переходить у інші субклітинні фракції. При цьому її знаходимо не тільки у складі самого N-ацилетаноламіну, але й у продуктах його перетворення, що свідчить про наявність у клітинах нейробластоми систем метаболізму цього ліпиду. Кількість ендогенного ліпиду в клітині дуже незначна. Результати даного дослідження (з використанням екзогенного міченого N-пальмітоїлетаноламіну) дають уявлення про його розподіл у субклітинних фракціях клітин нейробластоми.

N. M. Gulaya, A. A. Melnik, M. V. Vysotskyj, D. I. Balkov, G. L. Volkov, N. N. Govseeva

DISTRIBUTION OF [1-¹⁴C]N-PALMITOYL ETHANOLAMINE AND ITS METABOLITES IN SUBCELLULAR FRACTIONS OF NEUROBLASTOMA C 1300 N18

Summary

Distribution in dynamics of [1-¹⁴C]N-palmitoyl ethanolamine in the subcellular fractions of neuroblastoma C1300 N18 has been studied. It is shown that distribution dynamics of the label is different depending on subcellular fractions. The level of the label in cytoplasm 15 min after incubation reaches the value which remains constant till the end of the experiment. In the microsomal fraction the label is accumulated with time and becomes maximum at the end of the experiment. The highest amount of the label in the plasma membrane has been found 15 min later and then its amount falls. Parallel with this the amount of free fatty acids grows and then begins to fall simultaneously with an increase of the amount of esterified fatty acids. A considerable amount of the label of fatty acids has been determined 15 min later in the composition of di- and triglycerides of cytosole and microsomal fraction.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kyiv
Institute of Marine Biology, Far-East Region,
Academy of Sciences, USSR, Vladivostok

1. *Epps D. E., Natarajan V., Schmid P. C., Schmid H. H. O.* Accumulation of N-acylethanolamine glycerophospholipids in infarcted myocardium // *Biochim. et biophys. acta.*—1980.— **618**.— N 3.— P. 420—430.
2. *Schmid P. C., Reddy P. V., Natarajan V., Schmid H. H. O.* Metabolism of N-acylethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type // *J. Biol. Chem.*—1983.— N 19 P. 9302—9306.
3. *Natarajan V., Schmid P. C., Reddy P. V., Schmid H. H. O.* Catabolism of N-acylethanolamine phospholipids by dog brain preparations // *J. Neurochem.*—1984.— **42**.— N 6.— P. 1613—1619.
4. *Natarajan V., Schmid P. C., Reddy P. V., Schmid H. H. O.* N-acylethanolamine phospholipids metabolism in normal and ischemic rat brain // *Biochim. et biophys. acta.*—1986.— **878**.— N 1.— P. 32—41.
5. *Reddy P. V., Schmid P. C., Natarajan V.* Properties of canine myocardial phosphatidylethanolamine N-acyltransferase // *Biochim. et biophys. acta.*—1984.— **795**.— N 1.— P. 130—136.
6. *Epps D. E., Schmid P. C., Natarajan V., Schmid H. H. O.* N-acylethanolamine accumulation in infarcted myocardium // *Biochim. and Biophys. Res. Commun.*—1979.— **90**, N 2.— P. 628—633.
7. *Parinandi N. L., Schmid H. H. O.* Effects of long-chain N-acylethanolamines on lipid peroxidation in cardiac mitochondria // *FEBS Lett.*—1988.— **237**, N 1, 2.— P. 49—52.
8. *Гулая Н. М., Васюковский В. Е., Высоцкий М. В. и др.* Обнаружение N-ацилэтаноламиновых фосфолипидов в клетках нейробластомы C1300 // *Укр. биохим. журн.*—1988.— **60**, № 5.— С. 58—63.
9. *Мельник А. А., Говсева Н. Н., Волков Г. Л., Гулая Н. М.* Влияние миристоил-, пальмитоил-, стеароилэтаноламинов на проницаемость мембраны клеток нейробластомы C1300 N18 для одновалентных катионов // *Докл. АН УССР.*—1989.— № 5.— С. 72—75.
10. *Schmid P. C., Zuzarte-Augustin M. L., Schmid H. H. O.* Properties of rat liver N-acylethanolamine amidohydrolase // *J. Biol. Chem.*—1985.— **260**, N 26.— P. 14145—14149.
11. *Epps D. E., Mandell F., Collins I., Schwartz A.* Stimulation and inhibition of sarcoplasmic reticulum (SR) Ca pump activity by N-acylethanolamin, a lipid specifically associated with myocardial-infarction // *Fed. Proc.*—1981.— **40**, N 6.— P. 1624.
12. *Волков Г. Л.* Быстрое одновременное выделение микросом и плазматических мембран клеток нейробластомы C1300 N18 // *Укр. биохим. журн.*—1989.— **61**, № 5.— С. 71—77.
13. *Cook H. W., Spence M. W.* Triacylglycerol as a precursor in phospholipid biosynthesis in cultured neuroblastoma cells: studies with labeled glucose, fatty acid and triacylglycerol // *Can. J. Biochem. and Cell Biol.*—1985.— **63**.— N 9.— P. 919—926.
14. *Gulaya N. M., Volkov G. L., Klimashevsky V. M., Govseva N. N. and Melnik A. A.* Changes in lipid composition of neuroblastoma C1300 N18 cell during differentiation // *Neuroscience.*—1989.— **30**.— N 1.— P. 153—164.

Ин-т біохімії ім. О. В. Палладіна АН УРСР, Київ;
 Ін-т біології моря ДСВ АН СРСР, Владивосток

Одержано 09.08.90