

## ВЛИЯНИЕ ВНУТРИУТРОБНОГО ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС.

В.С.ЧУБАНОВ<sup>1</sup>, Ю.И.РОГОВ<sup>2</sup>, М.В.ШОЛУХ<sup>1</sup>, Е.Ф.КОНОПЛЯ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра биохимии, Биологический факультет, Белорусский государственный университет, пр. Ф. Скорины, 4, Минск 220050, Беларусь. Телефон: 172-771-834.

Факс: 172-207-465. Эл. почта: biochem@bsu.unibel.by

<sup>2</sup>Институт Радиобиологии АН Беларуси, ул. Жодинская, 2, Минск 220600, Беларусь.

Исследовано действие пролонгированного гамма-облучения *in utero* (0,5 Гр) на функциональные свойства аденилатциклазы печени половозрелых крыс. Обнаружено, что гамма-облучение вызывает увеличение базальной и ГТФ-стимулируемой активности аденилатциклазы. Напротив, скорость образования цАМФ в присутствии глюкагона после облучения была ниже контрольного уровня. Анализ полученных кинетических параметров активации аденилатциклазы глюкагоном и ГТФ дает основание предположить, что пролонгированное гамма-облучение вызывает снижение скорости гидролиза ГТФ в активном центре  $\alpha$ -субъединицы  $G_s$ -белка и снижает способность комплекса рецептор-глюкагон ускорять замену ГДФ на ГТФ в  $G_s$ -белке.

**Ключевые слова:** аденилатциклаза, рецептор глюкагона, G-белок, печень, *in utero* гамма-облучение.

**ВВЕДЕНИЕ.** Как известно [1-4], внешнее гамма-облучение в относительно небольших дозах (0,2 - 0,4 Гр) в период эмбриогенеза вызывает отклонения в постнатальном развитии организма. Отмечается замедленное развитие, аномальное соотношение массы органов, увеличение количества врожденных пороков и др. [1-4]. Эти эффекты гамма-облучения *in utero* достаточно интенсивно исследуются на морфологическом и гистохимическом уровне [1-5]. Функционально-биохимические параметры тканей взрослого организма, подвергнутого гамма-облучению в пренатальный период развития, изучены меньше.

Важнейший критерий, используемый для исследования механизмов, лежащих в основе многих патологий - способность клетки адекватно реагировать на поступающий к ней сигнал. Трансдукция гормонального сигнала через плазматическую мембрану наиболее полно изучена на аденилатциклазной системе, состоящей из рецептора гормона (R),  $G_s$ -белка ( $G_s$ ) и фермента аденилатциклазы (АЦ) [6,7]. В ответ на поступающий сигнал, АЦ ускоряет синтез внутриклеточного цАМФ, регулируя процессы метаболизма, пролиферации, дифференцировки, экспрессии генов [6-8]. Известно, что нарушения в передаче гормонального сигнала через систему цАМФ вызывают широкий спектр патологий, от эндокринологических расстройств, до опухолевой трансформации клетки [9-11].

Целью работы явилось изучение эффектов пролонгированного пренатального гамма-облучения в дозе 0,5 Гр на функциональное взаимодействие белков аденилатциклазной системы печени половозрелых крыс.

**МЕТОДИКА.** *Условия гамма-облучения.* Белые беспородные крысы-самки ( $F_0$ ) 4-х месячного возраста средней массой 200 г после спаривания и тестирования беременности находились в условии внешнего гамма-облучения на установке ГАММА-РИД (источник  $^{137}\text{Cs}$ , мощность дозы 0,1 мГр/час) в течение всего срока беременности (19 суток). Общая поглощенная доза на каждое животное составила 0,5 Гр. Контрольная группа крыс находилась в идентичных условиях и подвергалась "ложному" гамма-облучению. В эксперимент брали животных-самцов ( $F_1$ ) через 6 месяцев после рождения. Контрольная и экспериментальная группы состояли из 6 животных.

*Выделение плазматических мембран печени.* Животных декапитировали, печень быстро извлекали и промывали охлажденным 0,9 % NaCl. Все дальнейшие операции проводили при 0-4 °C. Навеску ткани в 1 г измельчали ножницами и гомогенизировали 1 мин в 9 мл среды выделения, используя стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком. Среда выделения содержала 25 мМ Трис-HCl (pH 7,5 при 0 °C), 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, бычий сывороточный альбумин (1 мг/мл). Гомогенат центрифугировали 10 мин при 300 g на рефрижераторной центрифуге MPW-360 (Польша). Надосадочную жидкость отбирали и центрифугировали 15 мин при 1500 g. Затем, надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок суспендировали в 9 мл среды выделения и повторно центрифугировали в тех же условиях. Полученный осадок суспендировали и разводили в среде хранения до концентрации белка 30-35 мг/мл. Состав среды хранения: 25 мМ Трис-HCl (pH 7,5 при 0 °C), 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, 1 мг/мл бычий сывороточный альбумин, 7 % глицерин. Препараты плазматических мембран контрольных и экспериментальных животных разливали на аликвоты и хранили в жидком азоте.

*Определение активности аденилатциклазы.* Аденилатциклазную реакцию запускали добавлением 10 мкл (10 мкг белка) мембранного препарата к 40 мкл среды инкубации, содержащей 25 мМ Hepes-NaOH (pH 7,5 при 37 °C); 1 мМ ЭДТА; 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 1 мМ изобутилметилксантин; 1 мМ АТФ; 5 мМ креатинфосфат; 5 Ед./пробу креатинфосфокиназы. Инкубацию проводили при 37 °C. Реакцию останавливали внесением пробирок на 3 мин в кипящую водяную баню. В экспериментах по изучению кинетики действия ГТФ и глюкагона мембранный препарат инкубировали 10 мин в среде, содержащей от  $10^{-11}$  до  $10^{-6}$  М глюкагона или от  $10^{-8}$  до  $10^{-4}$  М ГТФ. Образовавшийся цАМФ определяли радиоиммунологическим методом (РИА метод) [12].

*Анализ данных* проводили методом нелинейной регрессии [13] используя программу Enzfitter-1.03 [14] по уравнению [15]:

$$V_a = V_{\min} + (V_{\max} - V_{\min}) \times A / (EC_{50} + A)$$

где  $V_a$  - удельная активность АЦ (пмоль цАМФ/мин/мг белка);  $V_{\min}$  - активность фермента в отсутствие активатора (агониста);  $V_{\max}$  - активность фермента в присутствии насыщающей концентрации активатора;  $A$  - концентрация активатора;  $EC_{50}$  - концентрация агониста, вызывающая полумаксимальную активацию фермента. Достоверность отличий контрольных и экспериментальных данных и кинетических параметров активации АЦ проводили с помощью F-теста [13-16].

*Другие аналитические методы.* Содержание белка в мембранном препарате определяли по [17]. Точную концентрацию раствора  $\text{MgCl}_2$  тестировали титрованием с эриохромом черным Т [18].

*Реактивы.* В работе использовали РИА набор для определения цАМФ, разработанный на кафедре биохимии Белгосуниверситета; АТФ, цАМФ, ГТФ, глюкагон ("Sigma", США); дитиотреитол, изобутилметилксантин, креатинфосфат, креатинфосфаткиназа ("Serva", ФРГ).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** На первом этапе исследований мы тестировали функциональное взаимодействие белков каскада  $R/G_s/АЦ$ , оценивая способность ГТФ и глюкагона стимулировать активность АЦ, действующих на фермент через  $G_s$  и рецептор глюкагона соответственно. Зависимость образования цАМФ от времени инкубации аденилатциклазы печени крыс в присутствии и отсутствие активаторов. Гамма-облучение *in utero* вызывало увеличение базальной и ГТФ-стимулируемой активности фермента. Напротив, скорость образования цАМФ в присутствии глюкагона после облучения оказалась ниже контрольного уровня. Таким образом, можно предположить, что в результате пренатального гамма-облучения изменялась эффективность взаимодействия  $R$  с  $G_s$  и  $G_s$  с АЦ.

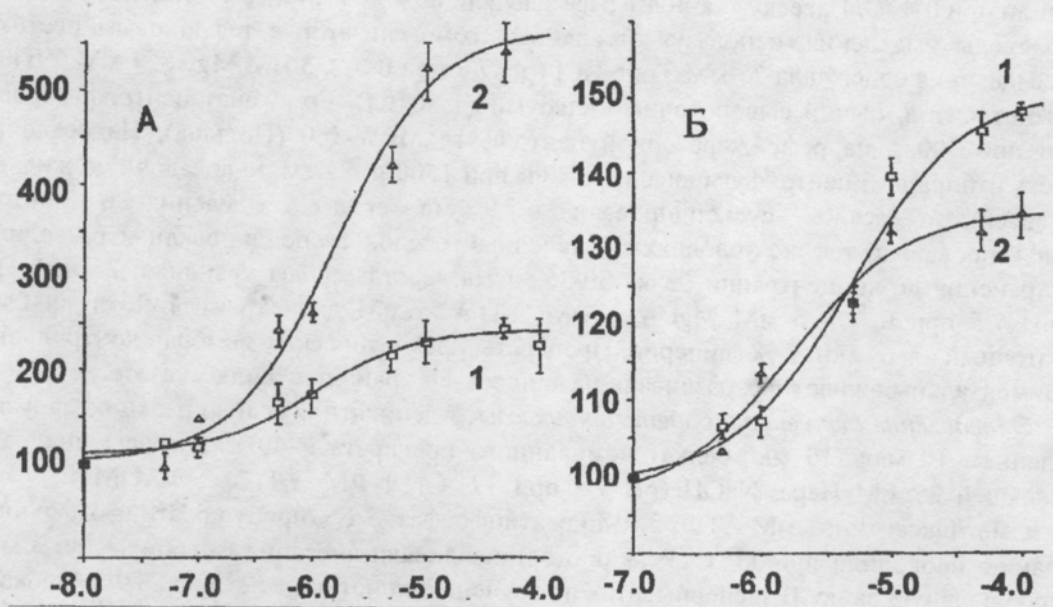


Рисунок 1.

Влияние пренатального гамма-облучения на зависимость активности аденилатциклазы печени крыс от концентрации ГТФ. Активность фермента определялась в отсутствие (А) или в присутствии (Б)  $10^{-6} \text{ M}$  глюкагона; за 100% принята скорость образования цАМФ в отсутствие ГТФ ( $V_{\min}$ , см. Табл. ). 1 - контроль; 2 - облучение. По оси ординат - %; по оси абсцисс -  $-\lg[\text{глюкагон}], \text{M}$ .

Для выяснения причин, вызывающих обнаруженные эффекты гамма-облучения, были определены кинетические параметры активации АЦ глюкагоном и ГТФ. На рисунке приведены результаты эксперимента по активации АЦ в зависимости от концентрации ГТФ. Базальная активность АЦ плазматических мембран контрольных и облученных животных стимулировалась гуаниловым нуклеотидом ( $10^{-4} \text{ M}$ ) в 2,2 и 5,5 раза, соответственно (рис. 1А). В то же время, концентрация ГТФ, вызывающая полумаксимальную активацию АЦ ( $EC_{50}$ ), достоверно не изменялась. При внесении в инкубационную среду насыщающей концентрации глюкагона ( $10^{-6} \text{ M}$ ), выявлена иная динамика (рис. 1Б). Ответ АЦ на действие ГТФ в контроле был на 15% выше, а значение  $EC_{50}$  для активатора в результате внутриутробного облучения животных снижалось в 2,7 раза (табл.).

Пренатальное гамма-облучение вызвало существенное снижение стимулирующего действия глюкагона. В присутствии насыщающей концентрации ГТФ ( $10^{-4} \text{ M}$ ) этот эффект гамма-облучения был более выражен (рис. 1Б): глюкагон ( $10^{-6} \text{ M}$ ) увеличивал активность АЦ в контрольной группе в 4,3 раза, а после воздействия - в 2,7 раза. В то же время,



достоверные изменения в значениях  $EC_{50}$  были обнаружены только в присутствии ГТФ (табл.):  $EC_{50}$  активации глюкагоном фермента у облученных животных была более чем в 2 раза ниже контрольной величины.

Таблица. Влияние пренатального гамма-облучения на кинетические параметры активации аденилатциклазы печени крыс глюкагоном и ГТФ.

Контроль				Облучение		
*Активатор	$V_{min}$ , пмоль цАМФ/мин/ мг белка	$V_{max}$ , пмоль цАМФ/мин/ мг белка	$EC_{50}$ , мкМ (нМ)	$V_{min}$ , пмоль цАМФ/мин/ мг белка	$V_{max}$ , пмоль цАМФ/мин/ мг белка	$EC_{50}$ , мкМоль (нмоль)
ГТФ	4,0±0,5	8,67±0,44	0,79±0,33	3,42±0,69	17,4±0,9**	1,08±0,30
ГТФ (+10 <sup>-4</sup> М глюкагон)	85,9±2,4	125,6±7,3	4,71±1,10	78,0±2,1*	114,6±3,5*	1,72±0,44**
Глюкагон	8,07±1,24	48,4±1,0	1,45±0,26	10,8±1,1*	43,9±1,2**	2,18±0,33
Глюкагон (+10 <sup>-4</sup> М ГТФ)	19,7±1,1	73,4±1,3	3,96±0,66	23,9±0,7*	67,2±1,2*	1,89±0,30**

Примечание. Величины кинетических констант являются средним значением 3-х определений ( $\bar{x} \pm S_x$ ).

$EC_{50}$  для ГТФ и глюкагона выражены в мкМ и нМ, соответственно;

\* Различия статистически достоверны при уровне значимости  $P < 0,05$  по отношению к контролю;

\*\* Различия статистически достоверны при уровне значимости  $P < 0,01$  по отношению к контролю.

Для анализа полученных данных важно отметить, что количество G-белков в плазматических мембранах более чем на порядок превышает количество R, и в сотни раз - АЦ [18-21]. Увеличенная экспрессия рецептора не приводит к изменению эффекта агониста, а лишь снижает значение  $EC_{50}$  [18-21]. Повышение или снижение количества  $G_s$  в мембране не модифицирует ответ фермента на активаторы [18-21]. Напротив, усиленная экспрессия АЦ приводит к увеличению эффектов гормона, ГТФ и его аналогов, но без изменений в  $EC_{50}$  [18].

Взаимодействие компонентов аденилатциклазной системы является сложным, многоступенчатым процессом. Оккупация глюкагоном рецептора приводит к увеличению сродства последнего к  $G_s$ \*ГДФ и образованию комплекса R- $G_s$ \*ГДФ. В таком положении сродство  $G_s$  к ГДФ уменьшается и ГДФ замещается на ГТФ. В результате, комплекс R- $G_s$ \*ГТФ распадается, гетеротример  $(\alpha, \beta, \gamma)G_s$ \*ГТФ диссоциирует на  $\alpha$ \*ГТФ- и  $\beta, \gamma$ -субъединицы.  $\alpha$ \*ГТФ активирует АЦ. В процессе взаимодействия  $\alpha$ \*ГТФ с АЦ происходит гидролиз ГТФ до ГДФ,  $\alpha$ \*ГДФ-субъединица высвобождает АЦ и ассоциирует в исходный комплекс  $(\alpha, \beta, \gamma)G_s$ . Лимитирующая стадия в ГТФ-азном цикле  $G_s$ -белка - замена ГДФ на ГТФ [6].

Принимая во внимание вышеизложенное, можно предположить, что, во-первых, пролонгированное гамма-облучение вызывает снижение скорости гидролиза ГТФ в активном центре  $\alpha$ -субъединицы  $G_s$ -белка. Это приводит к увеличению базальной активности фермента (рис.) и ответа фермента на действие ГТФ, но без изменения сродства системы к нуклеотиду ( $EC_{50}$ ) (табл., рис.) Во-вторых, после облучения снижается способность комплекса  $R^*$ глюкагон ускорять замену ГДФ на ГТФ в  $G_s$ . В результате, снижается эффект глюкагона (табл.), а в присутствии насыщающей концентрации ГТФ (соотношение  $\alpha^*ГДФ/\alpha^*ГТФ$  смещается в сторону  $\alpha^*ГТФ$ ) также выявляется уменьшение  $EC_{50}$  агониста (табл.). Нельзя также исключить наличие и других пострadiaционных изменений, модифицирующих трансдукцию гормонального сигнала.

Таким образом, обнаруженные сдвиги в трансдукции сигнала через аденилатциклазу печени крыс, облученных *in utero*, вероятно связаны с изменениями в ГТФ-азном цикле  $G_s$ -белка.

Данная работа была частично поддержана Международной Соросовской Программой образования в области точных наук (ISSEP) и Белорусским Республиканским Фондом Фундаментальных Исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kiefer J. (1990) Biological Radiation Effects.- Springer-Verlag. New York. 444.
2. Devi P.U., Baskar R. (1996) Int. J. Radiat. Biology. **70**. 45-52.
3. Jensh R.P., Brent R.L. (1987) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **184**. 256-263.
4. Fushiki S., Matsushita K., Yoshioka H., Schull W.J. (1996) Int. J. Radiat. Biol. **70**. 53-605.
5. Амвросьев А.П., Рогов Ю.И., Дорохина Р.И., Павленко В.С. (1993). Радиационная биология. Радиоэкология. **33** 623-625.
6. Sunahara R.K., Dessauer C.W., Gilman A. G. (1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **36**. 461-480.
7. Ткачук (1983) Введение в молекулярную эндокринологию.- МГУ, М..
8. Roger P.P., Reuse S., Maenhaut C., Dumont J. E. (1995) Vitamines and Hormones. **51**. 59-187.
9. Buscher M., Rahmsdorf, Litfin M., Karin M., Herrlich P. (1988) Oncogene. **3**. 301-311.
10. Chang J.Y., Korolev V.V., J.Z. Wang (1996) Neuroscience Letters. **206**. 181-184.
11. Spiegel A.M. (1995) Annu. Rev. Physiol. **58**. 143-170.
12. Steiner A.L., Parker C.W., Kipnis M. (1972) J. Biol. Chem. **83**. 1106-1113..
13. Motulsky H.J., Ransnas L.A. (1987) FASEB J. **1**. 365-374.
14. Leatherbarrow R.J. (1987) Enzfitter: a Non-Linear Regression Data Analysis Program for the IBM PC. Elsevier Science Publisher BV. Amsterdam,. 140
15. Leff P., Prentice D.J., Giles H., Martin G.R., Wood J. (1990) J. Pharmac. Methods. **23**. 225-237
16. Munson P.J., Rodbard D. (1980) Analyt. Biochem. **107**. 220-239.
17. Peterson G.L. (1977) Analyt. Biochem. **83**. 346-356.

18. Привил P. (1960) Комплексоны в химическом анализе.- М. "Мир".
19. MacEwan D. J., Kim G.-D., Milligan G. (1996) Biochem. J., **318**, 1033-1039.
20. Milligan G. (1996) Cell. Signalling., **8**, 87-95.
21. Mullaney I., Carr I.C., Milligan G. (1996) FEBS Letters. **397**. 325-330.

# **EFFECTS OF PRENATAL GAMMA-IRRADIATION ON THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF RAT LIVER ADENYLYL CYCLASE.**

<sup>1</sup>V.S.CHUBANOV, <sup>2</sup>U.I.ROGOV, <sup>1</sup>M.V.SHOLUKH, <sup>2</sup>E.F.KONOPLYA

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, School of Biology, Belarus State University, F. Skaryna Av.,  
4, Minsk 220050, Belarus. Tel.: 172-771-834. Fax: 172-207-465.  
E-mail: [biochem@bio.bsu.unibel.by](mailto:biochem@bio.bsu.unibel.by)

<sup>2</sup>Institute of Radiobiology, Belarussian Academy of Sciences, Zhodinskaya 2, 220600  
Minsk, Belarus,

In the present work the effects of long-term prenatal gamma-irradiation (0.5 Gy) on the glucagon signalling through adenylyl cyclase have been investigated. *In utero* gamma-irradiation resulted in the increase of basal and GTP-stimulated adenylyl cyclase activity, whereas, the adenylyl cyclase response to glucagon was essentially reduced. The comparison of kinetic constants estimated from dose-response data for GTP and glucagon suggests that prenatal chronic irradiation prompted (i) the decrease in rate of GTP hydrolysis on G<sub>s</sub>-protein; (ii) the reduction of glucagon potency to accelerate the exchange GDP for GTP on G<sub>s</sub>-protein.

**Key words:** adenylyl cyclase, receptor, glucagon, G<sub>s</sub>-protein, liver, *in utero* gamma-irradiation