

факторами вирулентности. Как и в случае с β -галактозидазой, общая пектазная активность у *ptsI*-мутанта практически не изменялась в присутствии глюкозы в отличие от таковой у клеток дикого типа (табл.4).

Дополнительной генетической характеристикой являлось картирование *ptsI*-мутации. Для определения локализации гена *ptsI* было проведено скрещивание штамма 169 с полиауксотрофным реципиентом 3766. Оказалось, что ген *ptsI* находится в районе 100-й мин генетической карты хромосомы *Erwinia chrysanthemi*. Такие же результаты были получены и при картировании мутации в клетках штамма ENA49/50.

Таким образом, нами были получены и частично охарактеризованы мутанты по общим компонентам ФТС и выявлена связь между нарушениями целостности компонентов этой системы и изменениями метаболизма у бактерий *Erwinia chrysanthemi*, в частности с продукцией внеклеточных пектолитических ферментов – одного из факторов вирулентности данного фитопатогенного микроорганизма.

1. Кордюм В.А., Неборачко Л.Н., Козыровская Н.А. Генетическая инженерия фитопатогенных бактерий. Киев, 1988.

2. Евтушенков А.Н. Дис.... докт. биол. наук. Мн., 1997.

3. Postma P.W., Lengeler J.W., Jacobson G.R. // *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. New York, 1996. Vol.1. P.1149.

4. Гершанович В.Н., Большакова Т.Н., Ерлагаева Р.С. и др. // Усп. совр. биол. 1987. Т.103. С.173.

5. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.

6. De Lorenzo V., Herrero M., Jakubzik U., Timmis K.N. // *J. Bacteriol.* 1990. Vol.172. P.6568.

7. Manayan R., Tenn G., Yee H.V. et al. // *J. Bacteriol.* 1988. Vol.170. P.1290.

8. Евтушенков А.Н., Даценко К.А., Литвинова Е.В. // Тез. докл. VII съезда Белорусского общества генетиков и селекционеров. Горки, 1997. С.100.

9. Даценко К.А., Евтушенков А.Н. Современные проблемы генетики и селекции: Тез. докл. Респ. конференции. Мн., 1995. С. 98.

10. Schoonejans E., Toussaint A. J. // *Bacteriol.* 1983. Vol.154. P.1489.

11. Reuse H. De., Huttner E., Danchin A. // *Gene.* 1984. Vol.32. P.31.

Поступила в редакцию 28.01.98.

УДК: 612.65.577.491:577.1

В.С.ЧУБАНОВ, М.В.ШОЛУХ

ТРАНСДУКЦИЯ ГОРМОНАЛЬНОГО СИГНАЛА ЧЕРЕЗ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗУ ПЕЧЕНИ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ ОДНОКРАТНОМУ ПРЕНАТАЛЬНОМУ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЮ

It was found that the one-fold (0,5 Gy) prenatal gamma-irradiations on the 9th and the 15th day of embryogenesis (at the beginning and the end of organogenesis, respectively) resulted in the different alterations of glucagon signalling through the receptor/ G_s -protein/adenylyl cyclase in adult rat liver. The prenatal irradiation on the 9th day enhanced the effect of GTP (the activator of G_s -protein) on the adenylyl cyclase activity. While the gamma-irradiation on the 15th day of embryo development increased the basal, GTP- and glucagon-stimulated adenylyl cyclase activity. The results suggest that the receptor/ G_s -protein/adenylyl cyclase coupling is more sensitive to low doses of gamma-irradiation performed at the end of organogenesis.

Введение

Внешнее гамма-облучение млекопитающих в относительно небольших дозах (0,1–0,6 Гр) в период эмбриогенеза характеризуется мощным тератогенным действием. У экспериментальных животных, подвергнутых внутриутробному облучению, отмечают увеличение количества врожденных пороков и опухолевых новообразований, аномальное соотношение массы органов, замедленное развитие и другие отклонения в постнатальном развитии организма [1–3]. Тератогенные эффекты проявляются наиболее выражено при облучении экспериментальных животных на стадии органогенеза [1–3]. Предполагается, что высокая радиочувствительность эмбриона определяется

интенсивной скоростью процессов дифференцировки, деления и миграции клеток [4].

В последние 10 лет интенсивно изучается вопрос о долговременных последствиях внутриутробного гамма-облучения. Так, обнаружено, что пренатальное облучение мышей и крыс в диапазоне доз 0,1–0,5 Гр вызывает через несколько месяцев постнатальной жизни животных изменения в поведенческих тестах, снижение способности к обучению, признаки преждевременного старения и другие эффекты [5–7]. Эти результаты хорошо согласуются с работами эпидемиологов по изучению последствий ядерной бомбардировки Хиросимы и Нагасаки и терапевтического облучения беременных женщин [8]. Обнаруженные долговременные последствия пренатального облучения млекопитающих требуют дальнейшего более детального изучения.

Способность клетки адекватно реагировать на поступающий к ней сигнал – важнейший показатель, широко используемый в изучении молекулярных механизмов появления и развития патофизиологических отклонений [9]. Среди сигнальных систем плазматической мембраны клетки наиболее изученным является каскад рецептор/ G_s -белок/аденилатциклаза [10]. Известно, что нарушения в передаче гормонального сигнала через аденилатциклазу вызывают широкий спектр патологий: от эндокринологических расстройств до опухолевой трансформации клетки [11].

С учетом сказанного цель данной работы – исследовать эффект однократного пренатального гамма-облучения (0,5 Гр) на разных стадиях органогенеза на функциональное взаимодействие рецептора глюкагона, G_s -белка и аденилатциклазы в плазматических мембранах печени половозрелых крыс.

Материал и методика

Работа выполнена на беспородных белых крысах массой 180–200 г., содержавшихся на стандартном рационе вивария Института радиобиологии Национальной академии наук Беларуси. Крысы-самки (F_0) 4-месячного возраста после спаривания и тестирования беременности подвергались внешнему гамма-облучению на установке ИГУР-1 (источник ^{137}Cs , мощность дозы 62 мГр/мин) на 9-е и 15-е сут эмбриогенеза (в начале и конце периода органогенеза). Общая поглощенная доза на каждое животное составила 0,5 Гр. Контрольная группа крыс находилась в идентичных условиях и подвергалась "ложному" гамма-облучению. Контрольная и экспериментальные группы самок состояли из 6 животных.

После рождения крысят (F_1) из разных пометов объединялись внутри одной экспериментальной группы самок. В эксперимент брали по 6 крыс-самцов из каждой группы через 180 дней после их рождения. Животных декапитуировали, печень быстро извлекали и промывали охлажденным 0,9%-ным NaCl. Плазматические мембраны печени выделяли по схеме, как описано в [12]. Содержание белка в мембранном препарате измеряли по [13].

Измерение активности аденилатциклазы выполняли с помощью радиоиммунологического определения количества цАМФ [14], синтезированного в ходе инкубации мембранного препарата печени. Ферментативную реакцию запускали добавлением 10 мкл (50 мкг белка) мембранного препарата к 40 мкл среды инкубации, содержащей (в конечном объеме) 25 мМ HEPES-NaOH: pH 7,5; 1 мМ ЭДТА; 5 мМ MgCl_2 ; 0,1 мМ изобутилметилксантин; 1 мМ АТФ; 5 мМ креатинфосфат; 80 МУ/мл креатинфосфокиназы. Инкубацию проводили при 37°C. В экспериментах по изучению активирующего действия глюкагона и ГТФ мембранный препарат инкубировали в среде, содержащей дополнительно 1 мкМ глюкагон или 0,1 мМ ГТФ. Ферментативную реакцию останавливали внесением пробирок в кипящую баню (3 мин при 98°C). Затем пробирки центрифугировали 5 мин при 1500 g и отбирали 40 мкл надосадочной жидкости для определения концентрации образовавшегося цАМФ.

Зависимость активности аденилатциклазы от времени инкубации анализировали методом нелинейной регрессии [15], используя Enzfitter-1.03 [16]. Достоверность отличий контрольных и экспериментальных данных проводили с помощью F-теста [15].

В работе использовали набор реактивов для радиоиммунологического определения цАМФ, разработанный на кафедре биохимии Белгосуниверситета (Минск); АТФ, цАМФ, ГТФ, глюкагон ("Sigma", США); изобутилметилксантин, креатинфосфат, креатинфосфаткиназу ("Serva", ФРГ).

Результаты и их обсуждение

В процессе передачи сигнала глюкагона через плазматическую мембрану печени осуществляется последовательное взаимодействие рецептора глюкагона с G_s -белком и G_s -белка с аденилатциклазой. Глюкагон, связываясь с рецептором, ускоряет замену ГДФ на ГТФ в активном центре гетеротримерного G_s -белка. G_s *ГТФ диссоциирует на $\beta\gamma$ - и ГТФ* α -субъединицы. Последняя активирует аденилатциклазу. Цикл завершается гидролизом ГТФ и ассоциацией ГДФ* α - и $\beta\gamma$ -субъединиц в исходный гетеротример [10]. Таким образом, в ответ на поступающий сигнал аденилатциклаза в несколько раз ускоряет синтез внутриклеточного цАМФ, регулируя процессы метаболизма, пролиферации и экспрессии генов гепатоцита [17].

Для понимания причин, приводящих к изменениям в сигнальном каскаде после гамма-облучения, в представленной работе определялась базальная активность аденилатциклазы (скорость образования цАМФ в отсутствие активаторов, действующих через G_s -белок или рецептор). Сопряжение аденилатциклазы с G_s -белком оценивали по активности фермента в присутствии активатора G_s -белка-ГТФ. Используя агонист (глюкагон), тестировали взаимодействие рецептора и G_s -белка.

На рис.1 приведена зависимость образования цАМФ от времени инкубации аденилатциклазы печени крыс в отсутствие активаторов и в присутствии 0,1 мМ ГТФ. Гамма-облучение на 9-е сут эмбриогенеза не вызывало достоверных изменений базальной активности аденилатциклазы. В то же время облучение животных в конце периода органогенеза (на 15-е сут) приводит к существенному увеличению базальной активности фермента ($P < 0,01$, F-тест). Скорость образования цАМФ в присутствии ГТФ после облучения на 9-е и 15-е сут эмбриогенеза оказалась выше контрольного уровня в 1,5 раза (см. рис.1).

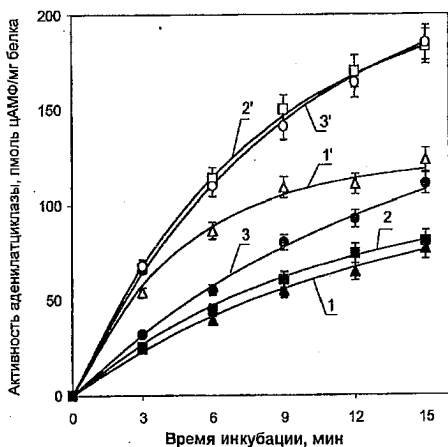


Рис.1. Влияние однократного пренатального гамма-облучения на зависимость активности аденилатциклазы от времени инкубации:

1,1' – контроль; 2,2' – облучение на 9-е сут; 3,3' – облучение на 15-е сут; черными точками обозначена базальная активность фермента, белыми точками – активность фермента в присутствии 0,1 мМ ГТФ

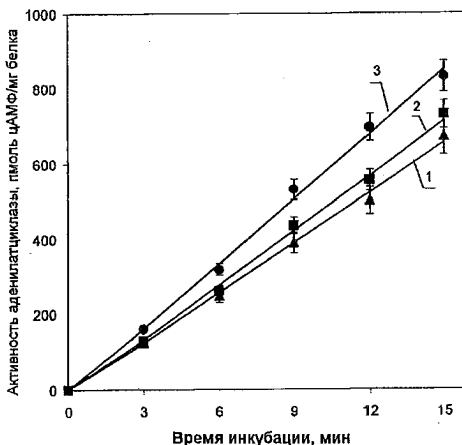


Рис.2. Влияние однократного пренатального гамма-облучения на зависимость активности аденилатциклазы от времени инкубации в присутствии глюкагона:

1 – контроль, 2 – облучение на 9-е сут, 3 – облучение на 15-е сут

Как показано на рис.2, динамика пострадиационного изменения глюкагон-активируемой активности аденилатциклазы совпала с таковой для базального уровня накопления цАМФ (см. рис.1). Активность глюкагон-активируемого фермента в плазматических мембранах печени крыс, подвергнутых гамма-облучению на 15-е сут их внутриутробного развития, была достоверно выше соответствующего контроля ($P < 0,05$, F-тест). В то же время облучение на 9-е сут не вызывало изменений в скорости образования цАМФ (см. рис.2).

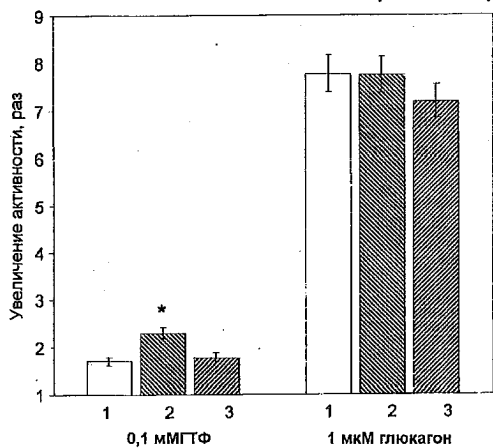


Рис.3. Эффект однократного пренатального гамма-облучения на активацию аденилатциклазы гуанозинтрифосфатом и глюкагоном:

1 — контроль, 2 — облучение на 9-е сут, 3 — облучение на 15-е сут
 За 1 принята удельная активность фермента в отсутствие активаторов,
 * — различия статистически достоверны при уровне значимости $P < 0,05$ (F-тест)

Поскольку функция каскада рецептор/ G_s -белок/аденилатциклаза — усиление гормонального сигнала, мы проанализировали активирующее действие ГТФ и глюкагона, приняв базальные активности фермента (пмоль цАМФ/мг белка/12 мин) за 1 (рис.3). Ответ аденилатциклазы на действие ГТФ у животных, облученных на 9-е сут пренатального развития, был в 1,4 раза выше относительно контрольной величины. Напротив, эффект глюкагона после облучения на 9-е сут достоверно не отличался от контроля. Пренатальное облучение на 15-е сут не изменяло способность ГТФ и глюкагона увеличивать базальную скорость образования цАМФ (см. рис.3).

Анализ полученного экспериментального материала позволяет заключить следующее. Во-первых, воздействие радиацией на 15-е сут эмбриогенеза вызывает пропорциональное увеличение базальной, ГТФ- и глюкагон-активируемой активности аденилатциклазы (см. рис.1,2). Обнаруженная корреляция дает основание предположить, что гамма-облучение вызывает увеличение экспрессии АЦ печени крыс. Это предположение согласуется с работами, в которых показано, что усиленная экспрессия аденилатциклазы приводит к пропорциональному увеличению скорости ферментативной реакции в присутствии и отсутствие активаторов [18]. Напротив, при изменении функционального состояния или уровня экспрессии рецептора, а также G_s -белка наблюдаются сдвиги в других параметрах работы сигнального каскада [18].

Во-вторых, в результате пренатального облучения на 9-е сут эмбриогенеза из тестируемых параметров зафиксировано лишь изменение ГТФ-стимулируемой активности аденилатциклазы (см. рис.1), что отражает способность G_s -белка сильнее стимулировать аденилатциклазу (см. рис.3). По-видимому, обнаруженные изменения во взаимодействии G_s -белка с аденилатциклазой не сказываются на работе сигнального каскада рецептор/ G_s -белок/аденилатциклаза в целом, так как в присутствии насыщающей концентрации глюкагона параметры сигнальной трансдукции возвращаются к контрольному уровню (см. рис.2,3).

Таким образом, в печени половозрелых крыс, подвергнутых однократному гамма-облучению в дозе 0,5 Гр на 9-е и 15-е сут эмбриогенеза, выявлены разнонаправленные изменения в трансдукции сигнала глюкагона через каскад рецептор/ G_s -белок/аденилатциклаза. После пренатального облучения на 9-е сут зафиксировано лишь повышение ответной реакции аденилатциклазы на ГТФ. Гамма-облучение на 15-е сут эмбриогенеза вызывало пропорциональное увеличение базальной, ГТФ- и глюкагон-стимулируемой удельной активности аденилатциклазы. Следовательно, изменения в функциональном взаимо-

действию белков каскада рецептор/ G_s -белок/аденилатциклаза проявляются наиболее выражено после однократного гамма-облучения (0,5 Гр) в конце периода органогенеза.

Работа была частично поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований.

1. Kiefer J. Biological Radiation Effects. New York, 1990.
2. Jensch R.P., Brent R.L. // Radiat. Res. 1988. Vol.116. P.416.
3. Jensch R.P., Brent R.L. // Teratology. 1988. Vol.38. P.431.
4. Michel C. // Experientia. 1989. Vol.45. №1. P.69.
5. Norton S., Kimler B.F., Mullenix P.J. // Neurotoxicol. Teratol. 1991. Vol.13. P.181.
6. Sienkiewicz Z.J., Haylock R.G., Saunders R.D. // Int. J. Radiat. Biol. 1994. Vol.65. P.611.
7. Devi P.U., Baskar R. // Int. J. Radiat. Biology. 1996. Vol.70. P.45.
8. Yoshimoto Y., Kato H., Schull W.J. // J. Radiat. Res. 1991. Vol.32. P.231.
9. Slotkin T.A., Lau C., Lappi S.E., Seidler F.J. // Biomarkers. 1996. Vol.1. P.115.
10. Sunahara R.K., Dessauer C.W., Gilman A.G. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1996. Vol.36. P.461.
11. Spiegel A.M. // Ann. Rev. Physiol. 1996. Vol.58 P.143.
12. Чубанов В.С., Порог Ю.И., Шолух М.В., Конопля Е.Ф. // Вопр. мед. химии. 1998. №2.
13. Peterson G.L. // Analyt. Biochem. 1977. Vol.83. P.346.
14. Steiner A.L., Parker C.W., Kipnis M. // J. Biol. Chem. 1972. Vol.83. P.1106.
15. Motulsky H.J., Ransnas L.A. // FASEB J. 1987. Vol.1. P.365.
16. Leatherbarrow R.J. // Enzfitter: a non-linear regression data analysis program for the IBM PC. Amsterdam, 1987.
17. Fazio M.A.D., Servillo G., Sassone-Corsi P. // FEBS Letters. 1997. Vol.410. P.22.
18. Milligan G. // Cell. Signalling. 1996. Vol.8. P.87.

Поступила в редакцию 16.02.98.

УДК 595.76:591.151

О.Ю.МИПЯШЕВИЧ

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЖУКОВ-ЛИСТОЕДОВ *CHRYSOMELA SALICETI* WSE. (Coleoptera, Chrysomelidae) И ИХ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

A morphometric feature variety of three *Chrysomela saliceti* populations from Minsk district were studied. In an investigated samples the phenomenon of the sex dimorphism was found, females were bigger than males. Middle size individuals were prevailed that indicates stability of the population. The comparison of variety coefficients of studied features shown their values in different populations do not significantly vary.

Изменчивость обеспечивает адаптацию популяций животных организмов к действию как постоянных, так и меняющихся в пространстве и времени факторов внешней среды. Благодаря этому происходит наиболее полное и эффективное использование популяциями пространственно-временной гетерогенности среды [1]. Одним из направлений изучения микроэволюционных процессов, протекающих в популяциях, является анализ фенотипической изменчивости признаков. Поскольку у насекомых размеры тела являются слабо варибельным признаком, жестко контролируемым естественным отбором [2], представляет интерес изучение изменчивости их морфометрических признаков в разных популяциях во временном аспекте.

Объектом исследования выбран жук-листоед *Chrysomela saliceti* Wse. — широко распространенный вредитель древесных пород. Поставив целью изучение фенотипического облика исследуемых популяций, мы решали следующие задачи: 1) изучение изменчивости морфометрических показателей жуков в различных популяциях и в разные годы; 2) сравнение коэффициентов вариации исследуемых признаков.