**АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДОВ ИНСУЛИНОВОГО СУПЕРСЕМЕЙСТВА У ПОЗВОНОЧНЫХ И БЕСПОЗВОНОЧНЫХ**

**Автореферат**

**диссертации на соискание ученой степени**

**доктора биологических наук**

**Санкт-Петербург 2007**

**Актуальность проблемы**

Изучение гормональных сигнальных систем, участвующих в регуляции жизненно важных для организма клеточных процессов, является одной из актуальных проблем современной молекулярной эндокринологии и биохимии. К числу систем, осуществляющих реализацию регуляторного действия веществ гормональной и негормональной природы, относится аденилатциклазная сигнальная система (АЦС), которая представлена в клетке сложным трансмембранным комплексом, состоящим, по крайней мере, из трех молекулярных блоков. Необходимыми компонентами АЦС являются: рецепторы, способные воспринимать внеклеточные сигналы, гетеротримерные ГТФ-связывающие белки (G-белки) стимулирующего (Gs) или ингибирующего (Gi) типа, состоящие из трех субъединиц – α, β, γ и обеспечивающие сопряжение между рецептором и третьим компонентом системы - ферментом аденилатциклазой (АЦ), катализирующей образование универсального внутриклеточного посредника – циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). При его участии осуществляется реализация целого ряда регуляторных эффектов в клетке (пролиферация, дифференцировка, апоптоз, синтез белка и др.).

К настоящему времени в литературе накоплен значительный объем данных, свидетельствующих об участии АЦС и цАМФ в трансдукции сигналов группы гормонов не пептидной природы (серотонин, адреналин, норадреналин и др.), осуществляющих свой эффект на клетку через рецепторы серпантинного типа, семь раз пронизывающие мембрану. В рамках настоящего исследования мы предприняли попытку выяснить возможность участия АЦС в реализации действия пептидов инсулинового суперсемейства, обладающих рецепторами тирозинкиназного типа, один раз пронизывающими мембрану клетки. До исследований, проведенных нами, участие системы АЦС-цАМФ в реализации действия гормонов инсулиновой природы практически отрицалось. В литературе имелись лишь отдельные сведения о влиянии инсулина, бомбиксина, релаксина на активность АЦ (Pertseva et al., 2003; Patel, 2004). Несмотря на успехи, достигнутые за последние десятилетия в изучении молекулярных механизмов действия инсулина и инсулиноподобных пептидов, многие аспекты плейотропного действия этого гормона и родственных ему пептидов до сих пор остаются невыясненными (Pertseva et al., 2003; Телкова, 2005). В связи с этим изучение ранее неизвестных молекулярных механизмов действия пептидов инсулинового суперсемейства, насчитывающего в настоящее время около 50 представителей, относится к числу актуальных проблем современной эндокринологии. Согласно современным представлениям, инсулин и родственные ему пептиды играют ключевую роль в регуляции ряда клеточных процессов – клеточный рост, апоптоз, метаболизм. Эти пептиды имеют общее эволюционное происхождение, так как возникли в ходе эволюции из общего анцестрального гена в результате дупликации и последующей дивергенции образовавшихся генетических линий, сохранив при этом структурное и функциональное сходство (Murray-Rust et al., 1992; Chan et al., 1992).

К изучению участия АЦС в реализации действия гормонов и ростовых факторов инсулиновой природы лаборатория приступила в начале 90-х годов. Отправной точкой послужили данные, впервые полученные нами, о способности инсулина и родственных пептидов активировать ГТФ-зависимым образом АЦ в мышечных тканях млекопитающих и моллюсков (Plesneva et al., 1994). Мы использовали эволюционный подход, предложенный Л.А. Орбели (1958) применительно к эволюционной биохимии, который включал исследования в филогенезе, онтогенезе и при патологии. Было изучено: 1) влияние на АЦС инсулина, инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1) позвоночных и инсулиноподобного пептида (ИПП) беспозвоночных (моллюск *Anodonta cygnea*; 2) влияние на АЦС пептидов в тканях-мишенях животных разного филогенетического уровня (позвоночные – крысы, птицы и беспозвоночные – моллюски); 3) действие пептидов инсулинового суперсемейства на АЦС в онтогенезе (в тканях куриных эмбрионов разного возраста и у цыплят); 4) действие пептидов инсулинового суперсемейства на АЦС при экспериментальном диабете у позвоночных и беспозвоночных.

**Цель работы.** Доказать участие аденилатциклазной сигнальной системы в реализации регуляторных эффектов инсулина, ИФР-1, ИПП моллюска в клетке и расшифровать структурно-функциональную организацию АЦ сигнального механизма их действия в тканях позвоночных и беспозвоночных, а также установить роль АЦ сигнального механизма в регуляции фундаментальных клеточных процессов – клеточный рост, апоптоз.

**Задачи исследования**

1. Исследовать действие инсулина, ИФР-1 и ИПП, выделенного из висцеральных органов моллюска *Anodonta cygnea* (Русаков и др., 1991), на АЦС в мышечных тканях позвоночных и беспозвоночных. Охарактеризовать зависимость эффекта от времени и концентрации исследуемых пептидов, а также от присутствия гуаниновых нуклеотидов для подтверждения вовлеченности в АЦ сигнальный механизм гетеротримерных G-белков.

2. Исследовать структурно-функциональную организацию АЦ сигнального механизма, опосредующего эффекты пептидов инсулинового суперсемейства у позвоночных и беспозвоночных и выяснить последовательность этапов передачи регуляторных сигналов этих пептидов на АЦС.С этой целью: а) установить тип рецепторов и G-белков, вовлеченных в АЦ сигнальный механизм действия пептидов, используя ингибиторы рецепторных тирозинкиназ и метод АДФ-рибозилирования бактериальными токсинами; б) выявить участие фосфатидилинозитол-3 киназы (ФИ-3-К), используя специфичный ингибитор вортманнин; в) идентифицировать изоформу протеинкиназы «С» (ПКС); используя ингибиторы ПКС и моноклональные антитела к изоформам ПКС.

3. Исследовать участие АЦ сигнального механизма действия инсулина и ИФР-1 в регуляции процессов клеточного роста и апоптоза, исходя из гипотезы о важной роли цАМФ в регуляции фундаментальных процессов в клетке (Перцева, 2000).

4. Исследовать функциональные нарушения в АЦ сигнальном механизме действия пептидов инсулинового суперсемейства при эндокринной патологии – сахарный диабет 1-го и 2-го типов.

**Научная новизна**

Впервые обнаружено стимулирующее действие инсулина, ИФР-1 и ИПП моллюска *A.cygnea* на активность АЦ. Показано участие рецепторной тирозинкиназы и установлена вовлеченность G-белков (Gi) и (Gs) типа в реализацию активирующего действия этих пептидов на АЦ. Впервые показано, что в проявлении АЦ стимулирующих эффектов инсулина и ИФР-1 участвуют ФИ-3-К и изоформы ПКС - ПКСζ и возможно ПКСε.

В мышечных тканях позвоночных и беспозвоночных животных обнаружен ранее неизвестный АЦ сигнальный механизм действия инсулина и ИФР-1 и установлена его структурно-функциональная организация, представленная в клетке следующей сигнальной цепью: рецептор тирозинкиназного типа ⇒ Gi-белок (βγ-димер) ⇒ ФИ-3-К ⇒ ПКСζ (позвоночные) или ПКСε (беспозвоночные) ⇒ Gs-белок ⇒ АЦ ⇒ цАМФ ⇒ протеинкиназа «А» (ПКА) ⇒ эффекторные системы. Этот механизм отличается по числу сигнальных блоков от известного АЦ сигнального механизма действия гормонов, обладающих рецепторами серпантинного типа, представленного в клетке следующей цепью: рецептор серпантинного типа ⇒ G-белок (Gi или Gs) ⇒ АЦ ⇒ цАМФ ⇒ ПКА ⇒ эффекторные системы.

Следует отметить, что действие пептидов инсулиновой природы на АЦ в мышечной ткани моллюска осуществляется через АЦ сигнальный механизм, сходный с таковым позвоночных, но имеющий на пострецепторных этапах трансдукции гормонального сигнала отличие на уровне ПКС. Исходя из результатов нашего исследования, в АЦ сигнальном механизме действия пептидов инсулинового суперсемейства у позвоночных принимает участие ПКСζ, а у беспозвоночных (моллюски), как предполагается, – ПКСε.

Экспериментально подтверждена, выдвинутая нами гипотеза, о важной роли АЦ-цАМФ в реализации регуляторного действия инсулина и ИФР-1 на фундаментальные процессы в клетке. Показано участие АЦ-цАМФ системы в способности ИФР-1 и инсулина стимулировать клеточный рост и ингибировать апоптоз в культурах фибробластоподобных клеток.

Обнаружены нарушения в АЦ сигнальном механизме действия инсулина при патологии (сахарный диабет 1-го и 2-го типов).

**Теоретическое и практическое значение работы**

Теоретическое и практическое значение работы определяется важной ролью инсулина и других пептидов инсулинового суперсемейства в организме высших и низших животных. Обнаружение новых сигнальных механизмов действия пептидов этой группы, в частности инсулина и ИФР-1, расширяет современные представления о спектре сигнальных систем, участвующих в регуляторном действии пептидов инсулинового суперсемейства.

Применение эволюционного подхода (изучение ряда эволюционно-родственных пептидов и использование представителей позвоночных и беспозвоночных) позволило выявить консервативность обнаруженного АЦ сигнального механизма действия пептидов инсулиновой природы.

Данные, полученные на беспозвоночных, могут быть полезны для понимания сигнальных механизмов действия пептидов инсулинового суперсемейства у позвоночных и для разработки моделей эндокринной патологии у человека (сахарный диабет) в рамках нового направления - «эволюционная биомедицина» (Перцева, 2006).

Полученные данные о молекулярных механизмах действия инсулина и ИФР-1 имеют фундаментальное значение и могут применяться при чтении курса лекций в университетах и медицинских ВУЗах как в России, так и за рубежом.

Результаты исследования имеют важное практическое значение в плане выявления молекулярных основ этиологии и патогенеза сахарного диабета, а также в создании новых подходов для диагностики этого заболевания. Обнаруженный нами АЦ сигнальный механизм действия инсулина, может служить основой для разработки биохимического теста, позволяющего проводить диагностику нарушения отдельных звеньев в молекулярном механизме действия инсулина.

**Положения, выносимые на защиту**

1. Впервые установлено, что пептиды инсулинового суперсемейства (инсулин, ИФР-1 и ИПП моллюска *Anodonta cygnea*) ГТФ-зависимым образом активируют АЦ в тканях позвоночных (млекопитающие, птицы) и беспозвоночных (моллюски) животных.

2. Реализация АЦ активирующего действия пептидов инсулиновой природы осуществляется через обнаруженный нами АЦ сигнальный механизм, включающий следующую сигнальную цепь: рецептор-тирозинкиназа ⇒ Gi-белок (βγ-димер) ⇒ ФИ-3-К ⇒ ПКСζ ⇒ Gs-белок ⇒ АЦ.

3. С участием АЦ сигнального механизма, генерирующего цАМФ, осуществляется регуляторное действие пептидов инсулиновой природы на фундаментальные клеточные процессы - стимулируется клеточный рост и ингибируется апоптоз.

4. При эндокринной патологии (сахарном диабете 1-го и 2-го типов) нарушается функционирование АЦ сигнального механизма действия гормонов инсулиновой природы в основном на уровне Gs-белка и его сопряжения с АЦ.

5. Сходство структурно-функциональной организации АЦ сигнального механизма действия пептидов инсулинового суперсемейства у позвоночных и беспозвоночных животных свидетельствует об его эволюционной консервативности.

**Апробация работы**

Основные результаты и положения работы были представлены и доложены на следующих конференциях и съездах: 17-я, 19-я, 20-я, 21-я Конференции Европейского Общества Эндокринологов (Кордова, Испания, 1994; Нидерланды, 1998; Фаро, Португалия, 2000; Бонн, Германия, 2002); 4-й Симпозиум по нейробиологии моллюсков (Амстердам, Нидерланды, 1994); Симпозиум по инсулину, ИФР-1 и инсулиноподобным пептидам (Испания, Барселона, 1997); XXXIII Международный конгресс физиологов (Санкт-Петербург, 1997); 2-й съезд Биохимического Общества РАН (Москва, 1997); XVII съезд физиологов России (Ростов-на-Дону, 1998); конференция “Рецепция и внутриклеточная сигнализация” (Пущино, 1998); Съезд Биохимического общества Университета Глазго (Глазго, Великобритания, 1999); 18-ый Международный конгресс биохимиков и молекулярных биологов (Бирмингем, Англия, 2000); 3-я и 4-я Международные конференция по релаксину и родственным пептидам (Брум, Австралия, 2000; Виоминг, США, 2004); XVIII Съезд Физиологического Общества имени И.П. Павлова, Казань, 2001); XI, XII и XIII Международные совещания по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 1996; 2001; 2006); Международная Европейская конференция (Люксембург, 2002); Вторая конференция “Эндокринная регуляция физиологических функций в норме и патологии”, посвященная 80-летию со дня рождения М.Г. Колпакова. (Новосибирск. Октябрь, 2002); 1-й съезд Общества Клеточных Биологов (Санкт-Петербург, 2003); Физиологический съезд (Екатеринбург, 2004); 1-й Съезд физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 2005);

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 75 работ, в том числе 36 статей в рецензируемых отечественных и международных изданиях.

**Личный вклад** **автора** – Экспериментальные данные получены лично автором или при его непосредственном участии.

**Структура и объем диссертации.**Диссертация изложена на 259страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов,изложения результатов их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 285 источников. Работа иллюстрирована 43рисунками и 35 таблицами.

**Основное содержание работы**

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования служили: 1) представители позвоночных - крысы *Ratus norvegicus* линии *Wistar;* 2) куры породы русская белая «*Леггорн*»; 3) представители беспозвоночных - пресноводный двустворчатый моллюск *Anodonta cygnea*; 4) культура клеток миобластов куриных эмбрионов; 5) фибробластоподобная культура клеток линии Swiss 3T3; 6) культура клеток, трансформированная из нормальных фибробластов линии Е1А+сНа-ras (клетки, впадающие в апоптоз) и E1A+E1B (клетки, не впадающие в апоптоз).

**Методы.** В работе использован широкий спектр физиологических, биохимических и фармакологических методов:

- выделение фракций плазматических мембран мышечной ткани позвоночных и беспозвоночных животных с использованием метода дифференциального центрифугирования (Kidwai et. al., 1973 с нашими модификациями);

- выделение частично очищенных мембранных фракций культуры клеток миобластов куриных эмбрионов, фибробластоподобных клеток линии Swiss 3T3, E1A+cHa-ras, E1A+E1B (Плеснёва и др., 1999; 2003);

- выделение фракции, содержащей примембранную форму цАМФ-ФДЭ (Houslay, 1985).

- определение активности АЦ с использованием радиоактивного субстрата АЦ реакции - [α32P]АТФ (Salomon et al., 1974 с некоторыми модификациями);

- определение активности цАМФ-ФДЭ, с использованием радиоактивного субстрата [3H]цАМФ (Ткачук и др., 1978);

- АДФ-рибозилирование гетеротримерных G-белков холерным и коклюшным токсинами (Pertseva et al., 1992);

- электрофорез в ПААГ

- иммуноблотинг с использованием моноклональных антител для идентификации изоформы ПКСζ;

- определение ростстимулирующей активности действия инсулина, ИФР-1, ЭФР и цАМФ по включению [14C] тимидина в ДНК культуры клеток Swiss3T3 (Баркан и др. 1992; Плеснёва и др., 1997; 1999);

- использование модели апоптоза на трансформированных клетках, полученных из нормальных эмбриональных фибробластов введением пары комплементирующих онкогенов E1A+cHa-ras, обладающих высокой проапототической чувствительностью к удалению ростовых факторов (Bulavin et.al., 1999) и ее характеристика (Плеснёва и др., 2003);

- оценка антиапоптотического действия инсулина, ИФР-1 и цАМФ с использованием метода клоногенной выживаемости культуры клеток E1A+cHa-ras **(**Плеснёва и др., 2003);

- определение активности ферментов углеводного метаболизма – гликогенсинтетазы и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Кузнецова, 1998; Кузнецова и др., 2004);

- определения содержания белков методом Лоури;

- создания моделей экспериментального диабета 1-го и 2-го типов у позвоночных (Ping et al., 1999 с нашими модификациями) и диабетоподобного состояния у беспозвоночных (Плеснева и др., 2006; Кузнецова и др., 2007) с использованием стрептозотоцина.

- статистические методы обработки данных по программам (Statgraph и Anova).

**Результаты исследования и их обсуждение**

В работе представлены экспериментальные доказательства активирующего действия инсулина, ИФР-1 и ИПП на АЦ, установлена структурно-функциональная организация АЦ сигнального механизма в клетке и его роль в регуляции пептидами инсулиновой природы клеточного роста и апоптоза.

**Основные этапы работы состояли в исследовании:**

- действия пептидов инсулиновой природы на активность АЦ при разном времени и разной концентрации *in vitro* и *in vivo;*

- участия примембранной цАМФ-ФДЭ в функционировании АЦ сигнального механизма действия инсулиноподобных пептидов;

- звеньев АЦ сигнального механизма (от рецептора до эффекторных систем);

- роли АЦ сигнального механизма, как в регуляции клеточных процессов, так и его функционального применения в условиях патологии;

**Влияние *in vitro* инсулина, ИФР-1 и ИПП на активность АЦ в тканях позвоночных и беспозвоночных и в культурах клеток в разные временные сроки**

Проведено исследование *in vitro* динамики во времени АЦ активирующего эффекта инсулина, ИФР-1 и ИПП моллюска при концентрации пептидов 10-8М и для сравнения эпидермального ростового фактора (ЭФР), пептида не инсулиновой природы, обладающего рецептором тирозинкиназного типа (Никольский и др., 1987). Показано, что в мембранной фракции скелетных мышц крыс наибольшее выраженное активирующее действие исследованных пептидов на АЦ проявляется через 2.5 мин. Активирующий АЦ эффект инсулина составляет +236%. Эффект менее выражен при действии ИФР-1 (+201%), ЭФР (+186%) и ИПП моллюска +124% (Рис. 1; Таблица 1).

Рис. 1. Концентрация пептидов – 10-8М Активация АЦ пептидами (в%) по сравнению с базальной активностью фермента, принятой за 100%, приведена в тексте. Различия достоверны (*р<0.05*)

Таблица 1.Динамика во времени действия ИФР-1 на активность АЦ в мембранной фракции скелетных мышц крыс

|  |  |
| --- | --- |
| Воздействия | Активность АЦ (пкмоль цАМФ/мин/мг белка) |
| 2.5 мин | 5 мин | 10 мин |
| Без ИФР-1 | 71.2±4.8(100%) | 85.11±3.3(100%) | 101.20±9.24(100%) |
| + ИФР-1 | 214.31±12.1(301%) | 136.16±5.2(160%) | 96.14±4.6(95%) |

Примечание: В скобках - базальная активность АЦ (без воздействий), принятая за 100% и активность АЦ (в%) при действии ИФР-1

В мембранной фракции культуры куриных миобластов показано (рис. 2), что стимулирующий АЦ эффект инсулина через 2.5 мин составляет +256%, по сравнению с базальной активностью, принятой за 100% и имеет сходство с данными, полученными на мембранной фракции скелетных мышц крыс (+236%) (рис. 1).

В тканях моллюска *A.cygnea*, ИПП, выделенный из висцеральных органов этого моллюска, оказывает наиболее выраженное активирующее действие на АЦ (+422%), по сравнению с ЭФР (+221%), ИФР-1 (+169%) и инсулином (+133%) (Рис. 3; Таблица 2). Следует отметить, что активирующий АЦ эффект исследуемых пептидов в наибольшей степени проявляется через 2,5 мин, через 5 мин снижается, а через 10 минут практически отсутствует (Таблица 2; Рис. 3).

Рис. 2. Концентрация инсулина 10-8М. Различия достоверны (*р<0.05*)

Таблица 2.Динамика во времени действия ИФР-1 на активность АЦ в мембранной фракции гладких мышц моллюска

|  |  |
| --- | --- |
| Воздействия | Активность АЦ (пкмоль цАМФ/мин/мг белка) |
| 2.5 мин | 5 мин | 10 мин |
| Без ИФР-1 | 110.21±10.8(100%) | 125.31±9.3(100%) | 106.04±6.6(100%) |
| + ИФР-1 | 259.92±11.4(269%) | 229.31±5.2(183%) | 103.81±5.8(98%) |

Примечание – как в таблице 1.

Таким образом, в мембранных фракциях, выделенных из мышечных тканей исследуемых животных и культуры клеток куриных миобластов, наблюдается закономерность проявления эффекта пептидов в зависимости от времени действия. Инсулин, ИФР-1, ИПП и ЭФР оказывают активирующее действие на АЦ в течение 2,5 и 5 мин с максимальным эффектом через 2.5 мин. АЦ активирующий эффект исследуемых пептидов видоспецифичен. В скелетных мышцах крыс ряд эффективности пептидов по их влиянию на АЦ имеет следующий порядок: инсулин > ИФР-1 > ЭФР > ИПП, а в мышечных тканях моллюска - ИПП > ЭФР > ИФР-1 > инсулин.

Рис. 3. Концентрация пептидов – 10-8 М Активация АЦ пептидами (в %) по сравнению с базальной активностью фермента, принятой за 100%, приведена в тексте. Различия достоверны (*р<0.05*)

**Влияние *in vivo* разных доз инсулина на активность АЦ в тканях позвоночных и беспозвоночных в разные временные сроки**

Обнаружив в опытах *in vitro* стимулирующее влияние пептидов инсулинового суперсемейства на активность АЦ, мы исследовали влияние инсулина, основного представителя инсулинового суперсемейства, на активность АЦ в разных дозах и при разном времени действия в условиях *in vivo*. Эксперименты проведены на фракциях мышечных мембран крыс, куриных эмбрионов и моллюсков после введения инсулина (внутрибрюшинно или внутрижелточно) в дозах 0.05 нг/г-10 нг/г веса тела (вес крысы или куриного эмбриона, вес моллюска без раковины). Доза, вводимого *in vivo* инсулина рассчитывалась с учетом концентрации инсулина, используемой в опытах *in vitro.* Основанием для выбора дозы служили данные литературы и результаты наших опытов *in vitro*. Было показано, что в скелетных мышцах крыс стимулирующий АЦ эффект инсулина (+222%) выявляется через 5 мин после введения гормона (1 нг/г), а через 15 мин он снижается почти в три раза (67%) (Рис. 4). При более высокой дозе инсулина (10 нг/г), стимулирующий АЦ эффект гормона через 5 мин выражен слабее (+124%), а через 15 мин отсутствовал.

Рис. 4. Активация АЦ пептидами (в %) по сравнению с базальной активностью АЦ, принятой за 100%, приведена в тексте. Различия достоверны (*р<0.05*)

В экспериментах *in vivo* в мембранных фракциях мышц куриных эмбрионов разного возраста обнаружен АЦ активирующий эффект инсулина. У 10-дневных куриных эмбрионов он выявлялся уже через 5 мин, более четко выражен через 15 мин, а через 30 мин не проявлялся (рис. 5).

Рис. 5. Различия достоверны (*р<0.05)*

У 17-дневных куриных эмбрионов выявлено дозозависимое активирующее действие инсулина на активность АЦ через 5 минут (Рис. 6), которое ослабевает через 15 и 30 мин после введения гормона.

Рис. 6. Различия достоверны (*р<0.05*)

При введении моллюскам инсулина (0.5 нг/г и 5.0 нг/г) активность АЦ возрастала через 5 мин после введения гормона на +49% и +381%, соответственно, по сравнению с контролем, принятым за 100%. Через 20 мин влияние гормона (0.5 нг/г) на активность АЦ снижается (+22%) и практически исчезает (+6%) через 40 мин (Рис. 7). При введении инсулина (5 нг/г) моллюскам АЦ стимулирующий эффект гормона через 20 мин составлял +110%, а через 40 мин +50% (рис. 7).

Рис. 7. Светлые столбики - базальная активность АЦ. Заштрихованные столбики - инсулин-стимулированная активность АЦ при разных дозах гормона. Различия достоверны (*р<0.05*)

Из полученных нами данных следует, что отчетливое влияние инсулина на активность АЦ в мышечных мембранах моллюска (Рис. 7) выявляется при более высокой дозе инсулина, чем у млекопитающих и птиц. Это можно объяснить тем, что у моллюска *A.cygnea* рецепторы к инсулину не обнаружены (Лейбуш, Чистякова, 2003), а эффект инсулина может реализовываться через ИФР-1 - подобные рецепторы или рецепторы ИПП моллюска, которые способны опосредовать активирующее влияние инсулина на АЦ (Шпаков и др., 2005).

Следует отметить, что проявление АЦ стимулирующего влияния инсулина и инсулиноподобных пептидов во времени имеет сходство в опытах *in vitro* и *in vivo.* АЦ активирующий эффект пептидов отчетливо выявляется при коротких сроках влияния пептида (2,5 и 5 мин) при физиологических концентрациях (10-9-10-8М), с увеличением времени действия эффект пептидов ослабевает или отсутствует.

**АЦ активирующий эффект инсулина, ИФР-1 и ИПП при разных концентрациях в условиях *in vitro***

Установив оптимальное время действия пептидов инсулинового суперсемейства, при котором происходит активация АЦС (2.5 мин), необходимо было выявить при каких концентрациях АЦ стимулирующий эффект пептидов наиболее выражен. В разных тканях стимулирующий эффект пептидов инсулиновой природы осуществляется через специфичные рецепторы, отличающиеся по сродству к пептиду в гомологичных и негомологичных пептиду тканях.

Проведено исследование влияния инсулина, ИФР-1, ИПП моллюска и ЭФР в течение 2.5 мин при разных концентрациях (10-12-10-6М) в мембранных фракциях крыс, кур, моллюсков, а также во фракции, выделенной из культуры клеток куриных миобластов.

В мембранной фракции скелетных мышц крыс стимулирующий АЦ эффект инсулина, ИФР-1, ИПП обнаруживается при концентрациях - 10-11-10-7М (Рис. 8). Наиболее выраженный АЦ стимулирующий эффект составляет: для инсулина +250% при 10-8М; для ИФР-1 +91% при 10-9М; для ИПП +111% при 10-8М; для ЭФР +190% при 10-10М. (Рис. 8).

Можно отметить, что в диапазоне концентраций 10-10-10-7М наиболее четко выражен активирующий АЦ эффект инсулина, эффекты других исследованных пептидов инсулиновой природы проявлялись слабее. АЦ стимулирующий эффект ЭФР проявлялся при более низких концентрациях (10-11-10-10М).

Рис. 8. Базальная активность АЦ принята за 100%. Время действия пептидов 2.5 мин

Таблица 3.Влияние *in vitro* разных концентраций инсулина на активность АЦ во фракциях мышечных мембран куриных эмбрионов разного возраста и цыплят

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Объекты (возраст) | 10-сутЭмбрионы | 13-сут Эмбрионы | 16-сут Эмбрионы | Цыплята 3-сут |
| Воздействия | Активность АЦ (пмоль цАМФ/мин/мг белка) В скобках – Активность АЦ (в%) в присутствии инсулина, по отношению к базальной активности, принятой за 100%. |
| Без Инсулина | 14.02±1.10(100%) | 3.90±0.45(100%)  | 2.01±0.09(100%)  | 8.52±0.41(100%)  |
| +инсулин10-11 М | 16.34±1.35(117%) | 4.21±0.34(108%) | 4.81±0.46(239%) | 10.11±0.55(119%) |
| + инсулин10-10 М | 39.14±1.93(279%) | 10.33±0.89(265%) | 5.28±0.30(263%) | 11.24±0.48(132%) |
| + инсулин10-9 М | 48.25±2.21(344%) | 15.92±1.24(408%) | 10.24±0.62(509%) | 14.54±0.82(171%) |
| + инсулин10-8 М | 19.87±1.44(142%) | 9.84±0.56(252%) | 9.92±0.47(494%) | 19.55±1.13(238%) |
| + инсулин10-7 М | 17.13±0.98(122%) | 4.93±0.45(126%) | 7.51±0.33(374%) | 22.21±1.37(261%) |
| + инсулин10-6 М | 17.90±1.12(128%) | 5.12±0.21(131%) | 1.95±0.22(97%) | 24.39±1.62(286%) |

Изучение АЦ стимулирующего эффекта пептидов инсулинового суперсемейства и ЭФР в онтогенезе позволило выявить следующие факты. Наиболее выраженный АЦ активирующий эффект инсулина (10-11М-10-6М обнаруживается у куриных эмбрионов (10, 13, 16 суток) и цыплят (3 суток) при концентрации гормона 10-9М, и составляет у 10-суточных эмбрионов +244%, у 13-суточных +308%, у 16-суточных +409% (Таблица 3), а у 3-х суточных цыплят (+186%) при более высокой концентрации 10-6М, что может быть связано с переходом эмбрионов в постэмбриональный период, когда процессы роста и дифференцировки заканчиваются.

Проведенные нами исследования действия инсулина и ИФР-1 на активность АЦ в мембранной фракции, выделенной из культуры клеток куриных миобластов (4-й день развития) показали, что наибольший АЦ стимулирующий эффект инсулина (+352%) выявляется при концентрации 10-9М, а ИФР-1 (+289%) при концентрации 10-10М (данные в диссертации).

В мембранной фракции мышц моллюска АЦ стимулирующий эффект инсулина, ИФР-1, ИПП и ЭФР выявляется при концентрациях - 10-11-10-8М (Рис. 9). Инсулин и ИФР-1 оказывают наиболее выраженное стимулирующее действие на активность АЦ при концентрации 10-8М (+63% и +54%, соответственно), а ИПП и ЭФР при 10-9М (+415% и +223%, соответственно).

Таким образом, определен диапазон концентраций, при которых проявляется АЦ активирующий эффект исследуемых пептидов. Следует отметить видоспецифичность действия пептидов. Действие ИПП, выделенного из висцеральных ганглиев моллюска *A.cygnea,* является более эффективным в ткани моллюска и менее эффективным в тканях позвоночных.

Рис. 9. Базальная активность АЦ принята за 100%. Время действия пептидов – 2.5 мин.

**Участие ц-АМФ-зависимой ФДЭ в механизме действия пептидов инсулинового суперсемейства**

Уровень цАМФ в клетке зависит не только от АЦ – фермента, осуществляющего его синтез, но и от фосфодиэстеразы (ФДЭ) - фермента, обеспечивающего его деградацию. Исследована динамика во времени активности примембранной формы цАМФ-ФДЭ во фракции скелетных мышц кур. Эта изоформа ФДЭ локализована на внутренней стороне мембраны и способна активироваться инсулином (Houslay, 1985). Нами показано, что активность примембранной цАМФ-ФДЭ не изменяется через 2.5 и 5.0 мин после действия инсулина, увеличивается на +115% через 10 мин и на +179% через 20 мин, по сравнению с базальной активностью фермента, принятой за 100% (Таблица 4).

Таблица 4.Влияниеинсулина (10-8М) на активность примембранной цАМФ-ФДЭ в скелетных мышц кур в зависимости от времени

|  |  |
| --- | --- |
| Воздействия | Активность цАМФ-ФДЭ (нмоль АМФ/мин/мг белка) |
| 2.5 мин | 5.0 мин | 10.0 мин | 20.0 мин |
| Без инсулина | 3.37±0.5(100%) | 3.70±0.33(100%) | 3.56±0.61(100%) | 3.21±0.28(100%) |
| + инсулин  | 3.06±0.21(91%) | 4.07±0.18(110%) | 7.65±0.23(215%) | 8.95±0.44(279%) |

Примечание: в скобках представлена активность цАМФ-ФДЭ (в%) в присутствии инсулина и базальная активность фермента, принятая за 100%

При исследовании действия разных концентраций инсулина (10-9М-10-7М) обнаружено, что наиболее выраженное действие гормона (+115%) на активность цАМФ-ФДЭ выявляется через 10 мин при концентрации 10-8М (данные в диссертации).

Соотношение активности систем АЦ-цАМФ и цАМФ-ФДЭ в реализации действия инсулина на клетку является важным моментом в понимании внутриклеточных механизмов функционирования пептидов инсулиновой природы.

При активации АЦ гормонами скорость синтеза цАМФ начинает превышать скорость его деградации. Повышение уровня цАМФ приводит к активации мишени его действия - ПКА. Сродство ПКА к цАМФ в 100-1000 раз больше, чем у ФДЭ. При усилении синтеза цАМФ происходит сначала насыщение цАМФ-регуляторных центров ПКА, и лишь затем гидролиз цАМФ с участием ФДЭ.

Исходя из представленных нами данных, активирующие эффекты инсулина на АЦ и цАМФ-ФДЭ четко разделены во времени. АЦ активирующий эффект инсулина проявляется через 2.5 и 5 мин и отсутствует через 10 мин. Между тем, цАМФ-ФДЭ активируется инсулином только через 10 минут инкубации с гормоном. Таким образом, активация цАМФ-ФДЭ наступает лишь тогда, когда цАМФ как вторичный посредник выполнит свою функцию, достигнет порогового уровня и осуществит свое активирующее действие на ПКА, а затем и на эффекторные системы (Ткачук, 1983), что согласуется с нашими данными о действии инсулина на активность АЦ и цАМФ-ФДЭ и данными литературы.

В связи с этим основное внимание будет уделено исследованию АЦС, участвующей в осуществлении регуляторного действия пептидов инсулинового суперсемейства на клеточные процессы.

**Использование антиинсулиновой сыворотки для доказательства специфичности АЦ стимулирующего эффекта инсулина**

Для доказательства АЦ стимулирующего действие инсулина, а не других пептидных гормонов, не относящихся к гормонам инсулинового суперсемейства, была использована анти-инсулиновая сыворотка (АИС), выработанная в лаборатории на инсулин млекопитающих, которая нейтрализует действие инсулина и, как установлено нами подавляет стимулирующее действие инсулина на АЦ. При добавлении нормальной сыворотки (без инсулина) к фракции скелетных мышц крыс и гладких мышц моллюска, активирующий АЦ эффект инсулина составляет +68% у крыс и +41% у моллюсков. При использовании АИС стимулирующий АЦ эффект инсулина отсутствует у крыс (+7%) и моллюсков (-5%) (Табл. 5).

Полученные данные свидетельствуют о том, что обнаруженное нами активирующее действие инсулина на АЦ в мышечных тканях исследуемых объектов осуществляется именно инсулином и является специфичным при действии этого гормона.

Таблица 5. Нейтрализация АЦ стимулирующего эффекта инсулина в мембранных фракциях скелетных мышц крыс и гладких мышц моллюска в присутствии антиинсулиновой сыворотки

|  |  |
| --- | --- |
| Воздействия | Активность АЦ (пкмоль цАМФ/мин/мг белка) |
| Нормальная сыворотка | Анти-инсулиновая сыворотка |
| Гладкие мышцы моллюска Anodonta cygnea |
| Без инсулина  | 111.18±6.13 (100%) | 148.29±4.31 (100%) |
| Инсулин 10-8М  | 156.76±8.54\* (141%) | 158.67±8.16 (107%) |
| Скелетные мышцы крысы |
| Без инсулина  | 97.34±4.58 (100%) | 115.82±6.49 (100%) |
| Инсулин 10-8М  | 163.49±6.17\* (168%) | 110.03±7.12 (95%) |

Примечание: приведены данные из трех независимых экспериментов, повторенных три раза. Значения представлены в виде среднего арифметического с учетом ошибки среднего. Различия достоверны (р*< 0.05 (\*).* В скобках – активность АЦ в %. Базальная активность принята за 100%.

Следующая часть работы посвящена расшифровке структурно-функциональной организации механизма АЦ активирующего действия инсулина и ИФР-1.

В этой части работы мы поэтапно исследовали звенья, которые могут быть вовлечены в реализацию действия инсулиноподобных пептидов, начиная от рецептора и заканчивая эффекторными системами, которые являются конечным звеном реализации сигнала.

**Участие рецептора тирозинкиназного типа в реализации АЦ стимулирующего эффекта пептидов инсулинового суперсемейства**

Для доказательства участия рецептора тирозинкиназного типа, характерного для пептидов инсулинового суперсемейства в реализации АЦ стимулирующего эффекта пептидов инсулиновой природы, использовали селективные ингибиторы рецепторных тирозинкиназ – тирфостин 47 и генистеин, которые блокируют тирозинкиназную функцию рецептора инсулина и других пептидов инсулиновой природы. Ингибиторы инкубировали с пробами в течение 15 мин после чего в пробу добавляли пептиды (время действия 2.5 мин) при концентрации, вызывающей максимальный АЦ стимулирующий эффект. Влияние этих ингибиторов на активирующие АЦ эффекты инсулина, ИФР-1, ЭФР и для сравнения на эффект изопротеренола (в случае позвоночных) и серотонина (в случае беспозвоночных), которые также действуют активирующим образом на АЦ, но через рецептор серпантинного типа, изучали *in vitro* во фракции мембранных препаратов мышечной ткани крыс, культуры куриных миобластов, моллюсков.

У крыс в присутствии тирфостина 47 (1.25-5.0 мкМ) активирующий АЦ эффект пептидов снижался при действии инсулина до 50%, при ИФР-1 до 65%, при ЭФР до 50% по отношению к максимальному эффекту пептидов, принятому за 100% (Рис. 10). В присутствии генистеина (1.25-5.0 мкМ) снижение АЦ стимулирующих эффектов всех используемых пептидов у крыс было более выражено. Эффект инсулина снижался до 40%, эффект ИФР-1 до 10%, эффект ЭФР – до 18% (рис. 11). В тоже время у крыс стимулирующий эффект изопротеренола на АЦ (10-6М) практически не изменялся в присутствии тирфостина 47 и генистеина (0.5-20.0 мкМ).

В культуре клеток 4-х суточных куриных миобластов тирфостин 47 (Рис. 12) и генистеин (данные представлены в диссертации) ингибировали АЦ активирующий эффект инсулина до 43% и 38%, соответственно. Однако, активирующее действие изопротеренола на АЦ в присутствии ингибиторов тирозинкиназ (тирфостина 47 и генистеина) не изменялось (*р < 0.05*). Это свидетельствует о том, что классические рецепторы серпантинного типа не участвуют в механизме действия пептидов инсулиновой природы.

Рис. 10. По оси ординат - снижение стимулирующего эффекта пептидов и изопротеренола на АЦ (принятого за 100%) в присутствии тирфостина 47

Рис. 11. По оси ординат - снижение стимулирующего эффекта пептидов и изопротеренола на АЦ (принятого за 100%) в присутствии генистеина

Рис. 12. По оси ординат - снижение стимулирующего эффекта инсулина и изопротеренола на АЦ (принятого за 100%) в присутствии тирфостина 47

Рис. 13. По оси ординат - снижение стимулирующего эффекта пептидов и серотонина на АЦ (принятого за 100%)

Рис. 14. По оси абсцисс – концентрация генистеина в мкМ; по оси ординат - снижение АЦ стимулирующего эффекта пептидов и серотонина (принятого за 100%) в присутствии генистеина

У моллюсков наиболее выраженное снижение АЦ стимулирующего эффекта пептидов наблюдалось в присутствии тирфостина 47 (2.5 мкМ). Эффект инсулина уменьшался до 20%, эффект ЭФР до 30-35%. (Рис. 13). В присутствии генистеина АЦ стимулирующий эффект пептидов снижался до 25% в случае инсулина (1.25 мкМ генистеин), и до 50-75% в случае ЭФР (5 мкМ генистеин) (рис. 14).

Необходимо подчеркнуть, что у моллюсков *A.cygnea* активность АЦ увеличивается не в присутствии изопротеренола, а в присутствии серотонина, реализующего свое действие также через рецепторы серпантинного типа (Pertseva et al., 1992). Исследование действия ингибиторов тирозинкиназ - тирфостина 47 и генистеина (0.5-20.0 мкМ) на стимулирующий АЦ эффект серотонина в мембранной фракции мышечных тканей моллюсков не выявило изменений в действии этого биогенного амина на активность АЦ.

Таким образом, в мембранной фракции крыс, моллюсков и культуры клеток куриных миобластов стимулирующее влияние исследуемых пептидов на АЦ снижалось в присутствии тирфостина 47 и генистеина в диапазоне концентраций - 1.25, 2.5, 5.0, 10, 20 мкМ во всех исследуемых объектах (Рис. 10-14).

Стимулирующее действие изопротеренола (крысы, куры) или серотонина (моллюски) на АЦ, реализуемое через рецепторы серпантинного типа не изменялись в присутствии тирфостина 47 или генистеина в исследуемых объектах (см. Рис. 10-14).

Можно заключить, что в мышечной ткани млекопитающих (крысы), птиц (куры), культуре клеток куриных миобластов и в мышцах моллюсков активирующее действие инсулина, ИФР-1, ЭФР на АЦ осуществляется с участием рецепторов тирозинкиназного типа, специфичных для действия этих пептидов. (Pertseva et al., 1996; Plesneva et al., 2003**)**.

**Участие G-белков в реализации АЦ стимулирующего эффекта инсулина**

Для доказательства участия G-белков в действии инсулина на активность АЦ был применен широко распространенный подход, в котором используется набор гуаниновых нуклеотидов, способных в разной степени либо стимулировать ГТФ-азную активность G-белков в присутствии ГТФ и его аналогов - ГТФγS, ГИДФ и тем самым активировать АЦ, либо ингибировать ГТФ-азную активность G-белка в присутствии ГДФβS.

Было исследовано влияние ГТФ и ряда его негидролизуемых аналогов на активность АЦ в присутствии и отсутствии гормона (Табл. 6).

Таблица 6.Влияние гуаниновых нуклеотидов в отсутствии и присутствии инсулина на активность АЦ во фракции мышечных мембран крысы и моллюска

|  |  |
| --- | --- |
| Воздействия | Животные |
| Крыса  | Моллюск |
| Активность АЦ (%)  |
| Контроль  | 100±1.01% | 100±1.3% |
| Инсулин (10-8М) | 222±1.3%(+122%) | 186±1.8%(+86%) |
| ГТФγS (10-5М) | 242±1.4%(+142%) | 470±9.4%(+370%)  |
| ГИДФ (10-5М) | 236±1.8%(+136%)  | 269±4.9%(+169%) |
| ГТФ (10-5М) | 135±1.05%(+35%) | 163±5.1%(+63%) |
| ГДФβS (10-5М) | 95±1.2%(-5%) | 92±2.4%(-8%) |
| Инсулин + ГТФγS | 473±2.5%(+373%)[109%] | 726±20.3% (+626%)[170%] |
| Инсулин + ГИДФ | 399±8.2%(+299%)[41%] | 441±12.3%(+341%)[86%] |
| Инсулин + ГТФ | 277±10.1%(+177%)[20%] | 279±8.4% (+179%)[30%] |
| Инсулин + ГДФβS | 102±5.4%(+2%)[-17%] | 105±4.3%(+5%)[-86%]  |

Примечание: в круглых скобках – активирующий АЦ эффект используемых агентов в% по отношению к базальной активности, принятой за 100%. В квадратных скобках – потенцирование эффекта гормона в присутствии гуаниновых нуклеотидов в %.

Согласно представленным данным, ГТФγS, ГИДФ, ГТФ стимулируют активность АЦ в мышечных мембранах крыс и моллюсков. При совместном действии инсулина и гуаниновых нуклеотидов происходит усиление (потенцирование) эффекта гормона по сравнению с аддитивным эффектом гормона и гуаниновых нуклеотидов, действующих раздельно - в присутствии ГТФγS, ГИДФ и ГТФ на +109%, +41% и +20% у крыс и на +170%, 86% и 30% у моллюсков (табл. 6). ГДФβS же напротив снижает АЦ стимулирующий эффект инсулина как в мышцах крыс, так и моллюсков.

Потенцирование эффекта инсулина в присутствии ГТФγS, ГИДФ, ГТФ и отсутствие потенцирующего эффекта в присутствии ГДФβS свидетельствует о вовлеченности Gs-белков в АЦ сигнальный механизм действия пептидов инсулинового суперсемейства.

Таблица 7. Влияние коклюшного и холерного токсинов на базальную, инсулин- и ИФР1-стимулируемую активность АЦ в скелетных мышцах крысы и моллюска *A.cygnea*

|  |  |
| --- | --- |
|  | Активность АЦ (пкмоль цАМФ/мин/мг белка) |
| Воздействия | Скелетные мышцы крысы | Гладкие мышцы моллюска |
|  | Без КТ | +КТ | Без КТ | +КТ |
| Без пептидов | 39.7±3.4 | 48.5±2.0 | 63.2±4.1 | 69.1±9,6 |
|  | (100%) | (100%) | (100%) | (100%) |
| Инсулин | 67.9±3.6 | 48.2±2.7 | 200.5±14.4 | 74.2±7.6 |
| 10-9М | (171%) | (99%) | (317%) | (108%) |
| ИФР-1 | 57.4±2.1 | 43.1±1.6 | 139.2±12.4 | 76.8±7.3 |
| 10-9М | (145%) | (89%) | (220%) | (111%) |
|  | Без ХТ | +ХТ | Без ХТ | +ХТ |
| Без пептидов | 39.6±2.6 | 79.7±2.7 | 47.4±3.0 | 94.3±5.6 |
|  | (100%) | (100%) | (100%) | (100%) |
| Инсулин | 69.3±2.8 | 105.8±7.4 | 151.7±9.8 | 134.0±7.5 |
| 10-9М | (175%) | (133%) | (320%) | (142%) |
| ИФР-1 | 56.7±4.2 | 106.2±6.5 | 100.0±5.4 | 122.6±8.8 |
| 10-9М | (143%) | (133%) | (210%) | (130%) |

Примечание: В скобках – активность АЦ в%. Активность АЦ без пептидов принята за 100%.

Для выяснения типов G белков, вовлеченных в АЦ сигнальный механизм действия инсулина и ИФР-1 были использованы бактериальные токсины (коклюшный и холерный), которые модифицируют α-субъединицы Gi и Gs белков.

Коклюшный токсин вызывает АДФ-рибозилирование αi-субъединицы Gi белка, что ведет к потере его функциональной активности (Milligan, 1988; Reisine, 1990). Известно, что βγ-димер Gi белка обладает собственной регуляторной способностью и может стимулировать активность ФИ-3-К. Обработка мышечных мембран крысы и моллюска коклюшным токсином приводила к блокированию АЦ стимулирующего эффекта, как инсулина, так и ИФР-1 (таблица 7), что можно объяснить нарушением диссоциации гетеротримерного Gi белка на αi-субъединицу и βγ димер в условиях действия коклюшного токсина.

Таким образом, коклюшный токсин, предотвращая индуцируемую инсулином или ИФР-l стимуляцию активности ФИ-3-К, реализуемую через βγ-зависимый механизм, тормозит активацию АЦ.

Влияние холерного токсина на мембраны приводит к блокаде ГТФ-азной активности αs-субъединицы и тем самым переводит её в перманентно активированное состояние. В связи с этим обработка мембран холерным токсином может повлечь за собой стимулирование каталитической активности АЦ и наряду с этим ослабление регуляторных эффектов гормонов, действие которых на АЦ осуществляется через Gs белок (Milligan, 1988; Reisine, 1990). Обработка фракции мышечных мембран крысы и моллюска холерным токсином приводит к 2х-кратному увеличению базальной активности АЦ и снижению стимулирующего эффекта инсулина и ИФР-1 на активность фермента (таблица 7), что полностью согласуются со сведениями литературы и указывает на вовлеченность Gs белка в активацию АЦ с участием инсулина или ИФР-1.

Таким образом, совокупность данных, полученных с использованием коклюшного и холерного токсинов, указывает на участие как Gi, так и Gs белков в АЦ сигнальном механизме действия инсулина и ИФР-l.

**Участие фосфатидилинозитол-3 киназы в реализации АЦ стимулирующего эффекта инсулина и ИФР-1**

Для выяснения участия ФИ-3-К в АЦ сигнальном механизме действия пептидов инсулинового суперсемейства (инсулина и ИФР-1) был использован специфический ингибитор этого фермента - вортманнин. Инкубация мышечных мембран крысы и моллюска с вортманнином (10-9–10-7М) несколько снижает базальную активность АЦ (таблица 8). В отсутствии ингибитора инсулин и ИФР-1 отчетливо стимулируют активность АЦ. Между тем, АЦ стимулирующий эффект инсулина и ИФР-1 снижается в зависимости от концентрации ингибитора (10-9–10-7М). Ингибирующее действие вортманнина было наиболее выражено при концентрации 10-7М (таблица 8). Установленные факты свидетельствуют об участии ФИ-3-К в АЦ сигнальном механизме действия инсулина и ИФР-1 в мышечных тканях изучаемых объектов.

Таблица 8. Влияние вортманнина (10–9М–10–7М) на стимуляцию ИФР-1 (10–8М) и инсулином (10–8 М) активности АЦ в мембранной фракции скелетных мышцах крыс и гладких мышц моллюска *Anodonta cygnea*

|  |
| --- |
| Активность АЦ (пкмоль цАМФ/мин/мг белка) |
| объекты |  | Крысы |  |  | Моллюски |  |
| воздействия | без пептида | ИФР-l | инсулин | без пептида | ИФР-l | инсулин |
| без ворманнина | 21±1.6 | 38.2±1.0\* | 41.4±2.3\* | 17.8±1.0 | 41.1±2.6\* | 24.5±1.0\* |
| +вортманнин10–9М | 17.9±2.0 | 9.4±1.3 | 9.7±1.4 | 15.8±2.0 | 14.6±1.3 | 14.2±0.4 |
| +вортманнин10–8М | 16.5±2.3 | 8.6±1.3 | 8.4±1.3 | 14.6±2.3 | 13.9±0.8 | 11.6±1.0 |
| +вортманнин10–7М | 13.2±1.9 | 6.3±0.9 | 6.8±0.8 | 14.3±0.9 | 13.8±1.8 | 7.4±0.5 |

Примечание: значения активности АЦ в присутствии пептидов, достоверно отличающиеся от активности фермента в отсутствии пептидов (*р<0.05*), отмечены звездочкой.

Для проверки гормоноспецифичности ингибирующего действия вортманнина на АЦ стимулирующие эффекты инсулина и ИФР-1 были использованы изопротеренол и серотонин, гормоны неродственные пептидам инсулиновой природы и реализующие действие через рецептор серпантинного типа, не связанный с ФИ-3-К сигнальной системой. Результаты этих опытов показали отсутствие влияния вортманнина на катехоламинчувствительную АЦ сигнальную систему (данные приведены в диссертации). Этот факт указывает на участие ФИ-3-К в, обнаруженным нами, АЦ сигнальном механизме действия инсулина и ИФР-1.

**Участие протеинкиназы С в АЦ сигнальном механизме действия пептидов инсулинового суперсемейства**

Для доказательства участия ПКС в АЦ сигнальном механизме действия пептидов инсулиновой природы использовали селективный блокатор ПКС – кальфостин (Yoing et al., 2005). В отсутствии кальфостина АЦ активирующий эффект инсулина и ИФР-1 составлял +101% и +73% у крыс, и +78% и +86% у моллюсков соответственно, по отношению к базальной АЦ, принятой за 100%. Как обнаружено нами, кальфостин (10-10–10-8М) блокировал АЦ стимулирующие эффекты инсулина и ИФР-1 в мембранных фракциях мышц крысы и моллюска. Наиболее выраженный ингибирующий эффект кальфостина обнаруживается при концентрации 10-8М. В присутствии кальфостина (10-8М) АЦ стимулирующий эффект инсулина и ИФР-1 снижался на 46% и 32% у крыс, и на 47% и 50% у моллюсков, соответственно, по отношению к максимальному АЦ стимулирующему эффекту пептидов, принятому за 100% (данные в диссертации).

Для идентификации изоформы ПКС, участвующей в АЦ сигнальном механизме действия пептидов инсулиновой природы использовали моноклональные антитела к ПКСζ, которая по данным литературы является одним из участников реализации сигналов инсулиновой природы.

Таблица 9. Влияние антител к ПКСζ на АЦ активирующий эффект ИФР-1 (10-8М) и инсулина (10-8М) в мышечных мембранах крысы и моллюска *A.cygnea*

|  |  |
| --- | --- |
|  |  Активность АЦ ( |
| Объекты |  | Крысы |  |  | Моллюски |  |
| Воздейтсвия | Без пептида | ИФР-1 | Инсулин | Без пептида | ИФР-1 | инсулин |
| без антител | 100±4.4 | 253±17 | 247±24 | 100±12 | 307±24 | 255±18 |
| АТ 1:1000 | 104±9.5 | 102±14 | 108±16 | 166±25 | 251±21 | 254±12 |
| АТ 1:100 | 98±8.2 | 95±12 | 103±5 | 163±18 | 327±27 | 237±20 |
| АТ 1:10 | 94±6.8 | 68±3.6 | 88±8 | 145±5 | 403±33 | 238±25 |

Активность АЦ выражена в % к контрольным величинам, принятым за 100%.

Антитела к ПКСζ почти полностью блокировали АЦ стимулирующий эффект инсулина и ИФР-1 в мышечных мембранах крыс (таблица 9). Таким образом, использование моноклональных антител к ПКСζ показало, что эта изоформа фермента вовлечена в стимулирующее действие инсулина и ИФР-1 на АЦ в скелетных мышцах крыс. Между тем, в гладких мышцах моллюска эти антитела не оказывали блокирующего действия на АЦ стимулирующий эффект инсулина и ИФР-1. Мышцы моллюска обладают иным набором ПКС (Sossin et а1., 1996) и в АЦ стимулирующем действии этих пептидов инсулинового суперсемейства, по-видимому, участвует другая изоформа ПКС, близкая по своим свойствам к ПКСε из мозга позвоночных.

Таким образом, настоящее исследование привело к обнаружению и расшифровке ранее неизвестного АЦ сигнального механизма действия инсулина, ИФР-1 и ИПП моллюска в мышечных тканях позвоночных и беспозвоночных животных. Этот механизм имеет принципиально сходную структурно-функциональную организацию в случае инсулин- ИФР-1- и ИПП-компетентных АЦ сигнальных систем. Он может быть представлен в клетке шестикомпонентным сигнальным каскадом: рецептор-тирозинкиназа ⇒ Gi-белок (βγ-димер) ⇒ фосфатидилинозитол-3-киназа ⇒ протеинкиназа Сζ ⇒ Gs-белок ⇒ аденилатциклаза. АЦ является генератором внутриклеточного посредника – цАМФ, который способен через активацию цАМФ-зависимой протеинкиназы “A” передавать гормональный сигнал к различным эффекторным системам.

В плане изучения функциональной роли, обнаруженного нами, АЦ сигнального механизма, генерирующего цАМФ, было исследовано его участие в реализации регуляторного действия пептидов инсулиновой природы на такие фундаментальные клеточные процессы, как клеточный рост и апоптоз.

**Участие АЦ сигнального механизма в митогенном действии пептидов инсулиновой природы**

Для изучения митогенного действия пептидов инсулинового суперсемейства мы использовали фибробластоподобную культуру клеток Swiss 3T3, любезно предоставленную нам из банка культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Проведена функциональная характеристика АЦ системы в культуре Swiss3T3 клеток. Установлено, что АЦ система в культуре этих клеток

Таблица 10.Функциональные свойства АЦС культуры Swiss3T3 клеток

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Воздействия | Активность АЦ(пкмоль цАМФ/мин/мг белка) | Стимулирующий АЦ эффект в % |
| Базальная | 30.59±1.41 | 100% (базальная) |
| NaF 10-2 М | 178.91±4.15 | 585% (+485%) |
| форсколин 10-5 М | 99.26±3.21 | 324% (+224%)  |
| ГИДФ 10-6 М | 111.20±3.48 | 364% (+264%) |
| ГТФ 10-5 М  | 82.98±2.92 | 271% (+171%) |
| ЭФР 10-9 М  | 168.31±4.75 | 550% (+450%)  |
| ИФР-1 10-9 М  | 102.14±3.34 | 334% (+224%)  |
| Инсулин 10-9 М | 74.89±2.11 | 245% (+145%) |

В скобках – активирующий АЦ эффект агентов гормональной и негормональной природы (в%), по отношению к базальной активности АЦ, принятой за 100%, стимулируется классическими негормональными активаторами АЦ - NaF, форсколином, ГИДФ, ГТФ, а также инсулином, ИФР-1 и ЭФР (таблица 10).

Проведенные нами исследования показали, что в культуре Swiss 3T3присутствует АЦС с функциональными свойствами, близкими к АЦС других клеток и тканей позвоночных, которая способна к восприятию внеклеточных сигналов различной природы.

Оценив функциональные свойства АЦ сигнальной системы культуры Swiss3T3 клеток, была исследована способность инсулина, ИФР-1 и ЭФР индуцировать в культуре клеток Swiss3T3 митогенный эффект, оцениваемый по включению [14C]-тимидина в ДНК (Рис. 15-1). Показано, что инсулин (1000 нг/мл), ИФР 1 (50 нг/мл) и ЭФР (10 нг/мл) стимулировали синтез ДНК (прирост от 100% до 250%).

Исследуемые пептиды в тех же концентрациях оказывали стимулирующее влияние (2,5 мин) на активность АЦ. (Рис. 15-2). Для подтверждения участия цАМФ в реализации митогенного эффекта был использован его дибутириловый аналог цАМФ, обладающий способностью проникать в клетку. Этот аналог, взятый при низких концентрациях (10-12-10-9 М), вызывал четкий митогенный эффект, по величине даже превосходящий аналогичный эффект ЭФР и ИФР-1. Эффект оценивали по включению [14C]-тимидина в ДНК (Рис. 15-3).

Представленные экспериментальные данные подтверждают нашу гипотезу (Перцева, 2000) об участии АЦ сигнального механизма действия пептидов инсулинового суперсемейства и, продуцируемого им цАМФ, в реализации митогенных процессов.

**Участие аденилатциклазного сигнального механизм в антиапоптотическом действии инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1**

Нами подобрана модель апоптоза, включающая клеточные линии, с разной степенью устойчивости к условиям, вызывающим незапрограммированную гибель клеток (апоптоз). В экспериментах использовали культуру клеток E1A+cHa-ras, обладающую высокой проапоптотической чувствительностью к удалению ростовых факторов и действию ДНК-повреждающих агентов («впадают в апоптоз») (Bulavin et al., 1999) и культуру клеток Е1А+Е1В с высокой устойчивостью как к действию ДНК повреждающих агентов, так и к удалению ростовых факторов из среды («не впадают в апоптоз»). В клеточных культурах была охарактеризована чувствительность АЦС к действию инсулина и ИФР-1 (Таблица 11).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки культуры линий Е1А+сНа-ras и Е1А+Е1В способны отвечать на действие инсулина и ИФР-1 (10-8М) активацией АЦ, что указывает на наличие в них рецепторов инсулина и ИФР-1, а также АЦС, чувствительной к этим пептидам. Клетки сохраняют чувствительность АЦС к инсулину и ИФР-1 как в среде с 10% сывороткой, так и в среде с 0.5% сывороткой.

Согласно данным литературы пептиды инсулинового суперсемейства – инсулин и ИФР-1, а также цАМФ, образующийся в результате активации АЦ, способны оказывать антиапоптотическое действие на клетки. Показано, что инсулин (10-7М), ИФР-1 (10-8М) и дибутирил-цАМФ (10-9М) оказывают ингибирующее влияние на апоптоз, вызванный удалением ростовых факторов сыворотки, в культуре клеток E1A+cHa-ras (Плеснева, 2003). Оценка антиапоптотического эффекта инсулина, ИФР-1 и дибутирил-цАМФ проводилась на клетках культуры E1A+cHa-ras с использованием метода клоногенной выживаемости, который относится к числу наиболее чувствительных способов тестирования антиапоптотического действия агентов. Обнаружено, что культивирование

Таблица 11.Влияние инсулина и ИФР-1 на активность АЦ в грубой мембранной фракции культур клеток E1A+cHa-ras и E1A+E1B

|  |  |
| --- | --- |
| Условия | Активность АЦ (пмоль цАМФ/мин/мг белка) |
| In vitro | E1A+cHa-ras (клетки, впадающие в апоптоз) | Е1А+Е1В(клетки, не впадающие в апоптоз) |
| Контроль | Инсулин | ИФР-1 | Контроль | Инсулин | ИФР-1 |
| Среда + 10% сыворотка  | 33.9±3.4(100) | 48.1±2.1(142) | 56.4±1.3(166) | 4.9±0.5(100) | 14.3±1.2(292) | 17.6±1(359) |
| Среда + 0.5% сыворотка (апоптоз) | 95,9±3,4(100) | 137,0±9,0(143) | 181,6±8,2(189) | 26.7±0.5(100) | 61.4±1.2(230) | 86.3±2.1(323) |
| In vivo | E1A+cHa-ras (клетки, впадающие в апоптоз) | Е1А+Е1В (клетки, не впадающие в апоптоз) |
| Контроль | Инсулин | ИФР-1 | Контроль | Инсулин | ИФР-1 |
| Среда +10%сыворотка  | 4.1±0.29(100) | 6.0±0.9(146) | 12.2±0.5(297) | 5.2±0.3(100) | 8.5±1.0(163) | 11.4±1.3(219) |
| Среда + 0.5%сыворотка (апоптоз) | 11.0±1.2(100) | 17.2±1.2(156) | 24.8±2.2(225) | 5.8±0.6(100) | 10.0±0.7(172) | 13.6±0.6(234) |

Примечание. В опытах *in vitro* гормоны (10-8М) добавляли прямо в пробу, содержащую грубую мембранную фракцию клеток, для определения активности АЦ. Время инкубации 2.5 мин. В опытах *in vivo* инсулин (10-7М) и ИФР-1 (10-8М) добавляли к культурам клеток, время инкубации 5 мин. Цифры в скобках - эффект гормонов в процентах к контролю, принятому за 100%. Апоптоз индуцировали удалением ростовых факторов сыворотки из среды.

Трансформантов на среде без ростовых факторов уменьшает число живых клеток, способных дать потомство в клональном посеве минимум в 2 раза, по сравнению с клетками, культивируемыми в нормальных условиях (среда+10% сыворотки).

Показано, что только 43% культуры клеток «выживают» в условиях, когда клетки впадают в апоптоз (среда +0.5% сыворотки) по сравнению с контролем (среда+10% сыворотка, принято за 100%). В экспериментах, когда в среду с 0,5% сывороткой был добавлен инсулин, ИФР-1 или дибутирил-цАМФ в указанных выше концентрациях, способность клеток давать жизнеспособное потомство восстанавливалась до значений, составляющих около 70% (для инсулина: 77%, для ИФР-1: 67%, для дибутирил цАМФ: 66% по сравнению с контролем, принятым за 100%).

Таким образом, эксперименты показали способность инсулина и ИФР-1 через, обнаруженный нами, АЦ сигнальный механизм и продуцируемый им цАМФ, оказывать митогенное и антиапоптотическое действие в клеточных культурах.

Исследования подтверждают участие АЦ сигнального механизма в реализации антиапоптотического действия пептидов инсулинового ряда - инсулина и ИФР-1.

**Функциональное состояние АЦ сигнального механизма действия инсулина при сахарном диабете**

На основе концепции молекулярных дефектов в гормональных сигнальных системах как ключевых причин эндокринных заболеваний (Перцева, 2004) исследовано функционирование АЦ сигнального механизма при экспериментальном стрептозотоциновом сахарном диабете 1-го и 2-го типа у позвоночных (крысы) и диабетоподобном состоянии у беспозвоночных (моллюски).

Диабет вызывали однократным введением *(i.p.)* стрептозотоцина (80 нг/г веса животного). На 30-сут стрептозотоцинового диабета обнаружена гипергликемия в крови крыс, в 4,2 раза превышающая уровень глюкозы у контрольных крыс. Впервые выявлено увеличение уровня глюкозы в гемолимфе моллюсков (в 2,5 раза) на 2-е и 4-е сутки развития диабетоподобного состояния. Обнаружено при диабете снижение АЦ-стимулирующего эффекта инсулина и его потенцирования гуаниновыми нуклеотидами у крыс и у моллюсков.

Инсулин независимый диабет (2-го типа) вызывали введением новорожденным крысятам (1-2 сут) однократно стрептозотоцина (80 нг/г веса животного). При этом типе диабета также возникают нарушения в АЦ сигнальном механизме действия инсулина. АЦ стимулирующий эффект инсулина и потенцирование не проявляется.

На основании полученных данных выявлены функциональные дефекты в АЦ сигнальном механизме действия инсулина при диабете, в мышцах крыс и моллюсков, затрагивающие дистальные звенья АЦ сигнального механизма на уровне каталитического компонента – АЦ, Gs-белка и его сопряжения с АЦ.

**Заключение**

Настоящее исследование привело к обнаружению и расшифровке ранее неизвестного АЦ сигнального механизма действия инсулина, ИФР-1 и ИПП моллюска в мышечных тканях позвоночных и беспозвоночных животных. Эти оригинальные данные расширяют современные представления о круге сигнальных путей действия пептидов инсулинового суперсемейства и способствуют формированию нового позитивного взгляда на вовлеченность АЦ сигнального механизма в действие гормонов и ростовых факторов инсулиновой природы, осуществляемого через рецепторы тирозинкиназного типа. До наших исследований в литературе существовала точка зрения об участии АЦ сигнального механизма только в действии гормонов, обладающих рецепторами серпантинного типа.

Важными представляются доказательства, полученные в работе, о распространенности обнаруженного АЦ сигнального механизма действия изученных пептидов в тканях как позвоночных, так и беспозвоночных животных. Установлена принципиально сходная структурно-функциональная организация инсулин-, ИФР-1- и ИПП-компетентной АЦ сигнальных систем. На современном этапе наших исследований она представлена в клетке шестикомпонентным сигнальным каскадом: рецептор-тирозинкиназа ⇒ Gi-белок (βγ-димер) ⇒ фосфатидилинозитол-3-киназа ⇒ протеинкиназа Сζ ⇒ Gs-белок ⇒ аденилатциклаза. АЦ сигнальный механизм охватывает стадии от рецептора тирозинкиназного типа до фермента – АЦ, являющейся генератором вторичного внутриклеточного посредника – цАМФ. Образовавшийся цАМФ способен через активацию цАМФ-зависимой протеинкиназы “A” передавать гормональный сигнал к различным эффекторным системам.

Открытый нами АЦ сигнальный механизм действия пептидов инсулиновой природы по своей структурно-функциональной организации наряду со сходством, обладает и существенными отличиями от известных до сих пор гормональных АЦ сигнальных систем. Эти отличия сводятся:

- во-первых, к участию в одном АЦ сигнальном механизме сразу дух типов гетеротримерных G-белков (Gs и Gi), которые обычно вовлечены в разные сигнальные системы;

- во-вторых, к взаимодействию рецепторов тирозинкиназного типа, специфичных для гормонов инсулиновой группы с Gi-белком, выступающим в качестве донора βγ субъединиц, а не αi-субъединицы как во многих других сигнальных системах.

- в-третьих, к большему числу, составляющих его блоков (шесть компонентов, во всяком случае) по сравнению с трехкомпонентным АЦ сигнальным механизмом действия биогенных аминов (рецептор серпантинного типа ⇒ Gs или Gi-белок ⇒ АЦ);

За период, прошедший со времени обнаружения нами АЦ сигнального механизма действия пептидов инсулинового суперсемейства (Plesneva et.al., 1994; Kuznetsova et al., 1999; Plesneva et al., 2001) в литературе появились данные, касающиеся отдельных его сигнальных блоков, подтверждающие установленную нами структурно-функциональную организацию этого АЦ сигнального механизма. Так показано, что рецепторы инсулина и ИФР-1 функционально сопряжены с Gi-белком (Kuemmerle, Murthy, 2001; Dupont et al., 2003; Kreuzer et al., 2004). Также установлено участие ФИ-3-К и ПКСζ и связь их с продукцией цАМФ в ряде сигнальных путей действия пептидов инсулинового суперсемейства (Dessauer, Nguyen, 2005; Nguyen, Dessauer, 2005).

В плане изучения спектра функций, обнаруженного нами АЦ сигнального механизма, генерирующего цАМФ, установлено его участие в реализации регуляторного действия пептидов инсулиновой природы на такие фундаментальные клеточные процессы, как клеточный рост (стимуляция) (Плеснева и др. 1999) и апоптоз (ингибирование) (Плеснева и др., 2003), способствующие в итоге выживанию клетки.

Таким образом, выдвинутая нами гипотеза (Перцева, 2001) о важной роли АЦ сигнального механизма в реализации регуляторного действия инсулина и ИФР-1 на жизненно-важные клеточные процессы – клеточный рост, апоптоз нашла подтверждение в наших исследованиях (Плеснева и др., 1999; Плеснева и др., 2003).

Основываясь на эволюционном подходе Л.А. Орбели ко всем изучаемым явлениям (Орбели, 1958) мы использовали комплекс методов эволюционной физиологии применительно к изучению биохимических систем организма. Исследование включало несколько аспектов: а) изучение трех эволюционно родственных пептидов инсулинового суперсемейства – инсулина и ИФР-1 позвоночных, а также ИПП беспозвоночных (моллюска Anodonta cygnea); б) изучение действия этих пептидов на АЦС в тканях-мишенях животных разного филогенетического уровня (позвоночные – млекопитающие и птицы; а также беспозвоночные – моллюск Anodonta cygnea); в) часть исследований (птицы) проведена в онтогенезе; г) исследованы АЦ сигнальные механизмы действия пептидов инсулинового суперсемейства и выявлены функциональные нарушения в них при патологии – сахарном диабете.

В плане развиваемой в лаборатории концепции (Перцева, Шпаков, 2004) молекулярных дефектов в гормональных сигнальных системах как ключевых причин эндокринных заболеваний проведено исследование функциональных нарушений в АЦ сигнальном механизме действия инсулина и ИФР-1, возникающих при сахарном диабете. Впервые обнаружены дефекты в этом сигнальном механизме на уровне каталитического компонента – АЦ, Gs-белка и его сопряжения с АЦ, а также ослабление регуляторных метаболических эффектов гормона у крыс с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом 1-го и 2-го типов.

Использование эволюционного подхода позволило выявить не только существование АЦ сигнального механизма действия ряда пептидов инсулинового суперсемейства у позвоночных и беспозвоночных, но и обнаружить принципиальное сходство в его структурно-функциональной организации, свидетельствующее об эволюционной консервативности этой сигнальной системы

**Выводы**

1. В мышечных тканях представителей позвоночных (крысы) и беспозвоночных (моллюски) животных обнаружена чувствительная к влиянию пептидов инсулиноподобного суперсемейства АЦС. Инсулин, ИФР-1 и ИПП моллюска оказывают ГТФ-зависимое активирующее действие на АЦ. АДФ-рибозилирование бактериальными токсинами позволило выявить участие G-белков как ингибирующего (Gi-белок), так и стимулирующего (Gs-белок) типов в АЦ сигнальном механизме действия изученных пептидов.

2. Установлено участие рецепторов тирозинкиназного типа, в активирующем действии инсулина, ИФР-1 и ИПП моллюска на АЦС, ведущем к образованию внутриклеточного посредника – цАМФ. Показано, что селективные ингибиторы рецепторных тирозинкиназ – тирфостин 47 и генистеин, блокируют активирующее действие исследуемых пептидов на АЦ в мышцах позвоночных и беспозвоночных.

3. Выявлено участие фосфатидилинозитол-3 киназы в АЦ сигнальном механизме действия пептидов инсулинового суперсемейства, на что указывает блокирование активирующего влияния пептидов инсулиновой природы на АЦ в присутствии специфического ингибитор ФИ-3-К – вортманнина.

4. Установлено участие протеинкиназы ПКСζ идентифицированной с помощью моноклональных антител в реализации АЦ стимулирующего действия пептидов инсулинового суперсемейства в мышечных тканях позвоночных.

5. На основе совокупности полученных данных, сделан вывод о существовании в клетках позвоночных, ранее неизвестного АЦ сигнального механизма действия инсулина и ИФР 1, включающего сигнальную цепь: рецептор-тирозинкиназа ⇒ Gi-белок(βγ) ⇒ фосфатидилинозитол-3-киназа ⇒ ПКСζ ⇒ Gs-белок ⇒ аденилатциклаза. Сходный механизм обнаружен в мышцах моллюска Anodonta cygnea, отличающийся только изоформой ПКС.

6. Экспериментально подтверждена гипотеза о важной роли АЦ сигнального механизма в реализации регуляторного действия инсулина и ИФР-1 на фундаментальные клеточные процессы. Показана их способность стимулировать клеточный рост (в культуре клеток Swiss3T3) и ингибировать апоптоз (в культуре клеток Е1А+сНа-ras).

7. Обнаружение АЦ сигнального механизма действия пептидов инсулинового суперсемейства природы в тканях-мишенях у представителей как позвоночных, так и беспозвоночных животных, а также сходство в его структурно-функциональной организации указывает на консервативность этого сигнального механизма в эволюции.

8. При эндокринной патологии (сахарном диабете 1-го и 2-го типов) у человека, а также у экспериментальных животных (позвоночных и беспозвоночных) при стрептозотоциновой модели диабета обнаружены функциональные нарушения в АЦ сигнальном механизме действия инсулина и ИФР-1, локализованные в основном на уровне G-белка и его сопряжения с АЦ.

**Публикации по теме диссертации**

**1.** Pertseva M.N.,Kuznetsova L.A., **Plesneva S.A.,** Grishin A.V.,Panchenko V.P. β-agonist-induced inhibitory-guanine-nucleotide regulatory protein coupling to adenylate in mollusk *Anodonta cygnea* foot muscle sarcolemma // Eur. J. Biochem. Pharmacol. 1992. V. 210. P. 279-286.

**2.** Перцева М.Н., **Плеснева С.А.,** Шпаков А.О., Русаков Ю.И., Кузнецова Л.А. Новые данные, свидетельствующие об участии аденилатциклазной системы в механизме действия инсулина и родственных пептидов // Доклады Академии наук. 1995. T. 342. №3. C. 410-412.

**3.** Pertseva M.N., **Plesneva S.A.,** Shpakov A.O., Rusakov Yu.I., Kuznetsova L.A. Involvement of adenylyl cyclase signalling system in the action of insulin and mollusc insulin-like peptide // Comp. Biochem. Physiol. 1995. V. 112. P. 689-695.

**4.** Перцева М.Н., Шпаков А.О., **Плеснева С.А.** Современные достижения в изучении сигнальных механизмов действия инсулина и родственных ему пептидов // Журн. эвол. биохим. физиол. 1996. T. 32. №3. C. 318-340.

**5.** Pertseva M.N., **Plesneva S.A.,** Kuznetsova L.A., Shpakov A.O., Derkach K.V. On the tyrosine kinase mechanism of the novel effect of insulin and insulin-like growth factor-I: Stimulation of adenylyl cyclase system in muscle tissues // Biochem. Pharmacol. 1996. V. 52. №12. P. 1867–1874.

**6. Плеснева С.А.,** Баркан Р.С., Решетникова Г.Ф., Кузнецова Л.А., Перцева М.Н. Аденилатциклазный сигнальный механизм в митогенном действии инсулина, инсулиноподобного и эпидермального факторов роста // Доклады Академии наук, 1999. Т. 368. №6. С. 833-838.

**7.** Kuznetsova L., **Plesneva S.,** DerjabinaN., Omeljaniuk E., Pertseva M.N. On the mechanism of relaxin action: the involvement of adenylyl cyclase signalling system // Regulatory Peptides. 1999. V. 80. P. 33-39.

**8. Плеснева С.А.,** Кузнецова Л.А., Омельянюк Е.В., Шпаков А.О., Перцева М.Н. Аденилатциклазный сигнальный механизм действия релаксина // Журн. эвол. биохим. физиол. 2000. T. 36. №6. C. 562-568.

**9.** Кузнецова Л.А., **Плеснева С.А.** Влияние биогенных аминов и полипептидных гормонов на активность протеинкиназы А и аденилатциклазы в мышцах моллюска Anodonta cygnea // Журн. эвол. биохим. физиол. 2001. Т. 37. №5.С. 395-400.

**10. Plesneva S.A.,** Shpakov A.O., Kuznetsova L.A., Pertseva M.N. A dual role of protein kinase "C" in insulin signal transduction via adenylyl cyclase signaling system in muscle tissues of vertebrates and invertebrates // Biochem. Pharmacol. 2001. V. 61. №10. P. 1277–1291.

**11. Плеснева С.А.,** Шпаков А.О., Кузнецова Л.А., Перцева М.Н. Роль протеинкиназы С в регуляции процесса трансдукции инсулинового сигнала через аденилатциклазный сигнальный механизм // Российский Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2001. T 87. №8. C. 1106–1117.

**12.** Шпаков А.О., **Плеснева С.А.,** Кузнецова Л.А., Перцева М.Н. Исследование функциональной организации нового – аденилатциклазного сигнального механизма действия инсулина // Биохимия. 2002. T. 67. №3. C. 403-412.

**13.** Pertseva M.N., Shpakov A.O., **Plesneva S.A.,** Kuznetsova L.A. A novel view on the mechanisms of action of insulin and other insulin superfamily peptides: involvement of adenylyl cyclase signaling system // Comp. Biochem. Physiol. 2003. V. 134. №1. P. 11-36.

**14.** Шпаков А.О., Гурьянов И.А., Власова Е.Н., Корольков В.И., Кузнецова Л.А., **Плеснева С.А.,** Власов Г.П., Перцева М.Н. Ингибирование синтетическими катионными пептидами стимулирующего влияния гормонов на функциональную активность аденилатциклазной сигнальной системы // Доклады Академии наук. 2003. T. 389. №1. C. 127-130.

**15.** Шпаков А.О., **Плеснева С.А.,** Кузнецова Л.А., Леонтьева Е.А. Инсулинрегулируемая аденилатциклазная сигнальная система в клеточной культуре фибробластов мыши линии L // Журн. эвол. биохим. физиол. 2003. T. 39. №5. C. 438-444.

**16. Плеснева С.А.,** Поспелова Т.В., Кузнецова Л.А., Быкова Т.В., Шпаков А.О., Перцева М.Н. Новая инсулинкомпетентная аденилатциклазная сигнальная система как возможный механизм антиапоптотического действия инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 // Доклады Академии наук. 2003. T. 393. №4. C. 551-553.

**17.** Kuznetsova L., Shpakov A., Rusakov Yu., **Plesneva S.,** Bondareva V., Pertseva M.Comparative study of biological activity of insulin of lower vertebrates in the novel adenylyl cyclase test-system // Regulatory Peptides. 2003. V. 116. №1-3. P. 81-86.

**18.** Кузнецова Л.А., **Плеснева С.А.,** Шпаков А.О., Шарова Т.С. Стимулирующее влияние инсулина и эпидермального фактора роста на активность протеинкиназы А, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и гликогенсинтетазы в скелетных мышцах кур в эмбриогенезе // Журн. эвол. биохим. физиол.. 2004. T. 40. №4. C. 325-333.

**19.** Кузнецова Л.А., **Плеснева С.А.,** Шпаков А.О., Бондарева В.М., Перцева М.Н. Инсулинрегулируемая аденилатциклазная сигнальная система скелетных мышц крысы в условиях введения инсулина *in vivo* и при инсулиновой недостаточности, вызванной стрептозотоциновым диабетом // Журн. эвол. биохим. физиол. 2004. T. 40. №4. C. 334-343.

**20.** Шпаков А.О., Шипилов В.Н., Кузнецова Л.А., Бондарева В.М., **Плеснева С.А.,** Перцева М.Н. Реактивность аденилатциклазной сигнальной системы нервных ганглиев моллюска *Anodonta cygnea* к серотонину и адренергическим агонистам // Нейрохимия. 2004. T. 21. №3. C. 190-197.

**21.** Шпаков А.О., Кузнецова Л.А., **Плеснева С.А.,** Перцева М.Н. О вовлеченности фосфатидилинозитол-3-киназы и протеинкиназы Сζ в аденилатциклазный сигнальный механизм действия релаксина в мышечных тканях крыс и моллюсков // Бюл. экспер. биол. мед. 2004. T. 138. №10. C. 420-423.

**22.** Шпаков А.О., Гурьянов И.А., Кузнецова Л.А., **Плеснева С.А.,** Корольков В.И., Перцева М.Н., Власов Г.П. Использование С-концевых пептидов α-субъединиц G-белков для исследования их функционального сопряжения с рецепторами биогенных аминов в тканях крыс и моллюсков // Биол. мембраны. 2004. T. 21. №6. C. 441-450.

**23.** Шпаков А.О., Шипилов В.Н., Бондарева В.М., Кузнецова Л.А., **Плеснева С.А.,** Русаков Ю.И., Перцева М.Н. Регуляторное действие родственных инсулину нейропептидов моллюска *Anodonta cygnea* на функциональную активность аденилатциклазной сигнальной системы // Нейрохимия. 2005. T. 22. №1. C. 28-37.

**24.** Шпаков А.О., Шипилов В.Н., Гурьянов И.А., Кузнецова Л.А., Бондарева В.М., **Плеснева С.А.,** Перцева М.Н. Молекулярные механизмы регуляторного действия биогенных аминов на функциональную активность аденилатциклазной сигнальной системы в нервных ганглиях моллюска *Anodonta cygnea* // Доклады Академии наук. 2005. T. 401. №6. C. 829-832.

**25.** Шпаков А.О., Кузнецова Л.А., **Плеснева С.А.,** Гурьянов И.А., Перцева М.Н. Молекулярные причины изменения чувствительности аденилатциклазной сигнальной системы сердечной мышцы к биогенным аминам при экспериментальном стрептозотоциновом диабете // Цитология. 2005. T. 47. №6. C. 540-548.

**26.** Шпаков А.О., Кузнецова Л.А., **Плеснева С.А.,** Перцева М.Н. Молекулярные механизмы изменения чувствительности аденилатциклазной сигнальной системы к биогенным аминам при стрептозотоциновом диабете // Бюл. экспер. биол. мед. 2005. Т. 140. №9. С. 286-290.