

## НАРУШЕНИЕ ПЕРЕДАЧИ ИНГИБИРУЮЩЕГО АДЕНИЛАТИКЛАЗУ ГОРМОНАЛЬНОГО СИГНАЛА В МИОКАРДЕ И МОЗГЕ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ II ТИПА

**© А. О. Шпаков, Л. А. Кузнецова, С. А. Плеснева, М. Н. Перецева**

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: alex\_shpakov@list.ru*

В настоящее время как нами, так и другими авторами получены убедительные свидетельства в пользу того, что нарушения в гормональных сигнальных системах являются одной из главных причин развития патологических изменений и осложнений при диабете. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе этих нарушений, остаются практически неизученными, в особенности при инсулиновозависимом диабете II типа. С использованием неонатальной стрептозотоциновой модели диабета II типа, продолжительность развития которого составляла 80 и 180 сут, были исследованы изменения функциональной активности компонентов регулируемой гормонами аденилаткиназой (АЦ) сигнальной системы в миокарде и стриатуме мозга диабетических крыс в сравнении с контрольными животными. Показано, что при диабете в значительной степени нарушается процесс передачи ингибирующего активность АЦ гормонального сигнала, осуществляемый через G<sub>i</sub>-белки. Это выражается в снижении ингибирующего влияния гормонов на активность АЦ и ослаблении стимуляции ими ГТФ-связывающей активности G-белков. В случае норадреналина (миокард) полностью подавляется негативный путь регуляции АЦ-системы при сохранении стимулирующего пути. Увеличение продолжительности развития диабета с 80 до 180 сут приводит к некоторому ослаблению передачи гормональных сигналов, осуществляемых через G<sub>i</sub>-белки. Стимулирующие эффекты биогенных аминов и релаксина на активность АЦ и ГТФ-связывание в миокарде и мозге диабетических крыс сравнительно слабо меняются как при 80-, так и при 180-суточном диабете. Таким образом, при экспериментальном диабете II типа в основном наблюдаются нарушения в сопряженных с G<sub>i</sub>-белками сигнальных каскадах, через которые гормоны осуществляют ингибирование активности АЦ.

**Ключевые слова:** аденилаткиназа, аденилаткиназная сигнальная система, G-белок, диабет, миокард, мозг, релаксин, соматостатин.

**Принятые сокращения:** AP — адренергический receptor, АЦ — аденилаткиназа, АЦ-система — аденилаткиназная сигнальная система, СТЦ — стрептозотоцин, G<sub>s</sub>- и G<sub>i</sub>-белки — гетеротримерные G-белки стимулирующего и ингибирующего типов.

Одной из главных причин патологических изменений и осложнений, которые возникают при сахарном диабете, являются нарушения, возникающие в гормональных сигнальных каскадах. Выявление молекулярных механизмов, лежащих в основе этих нарушений, является одной из актуальных задач современной молекулярной и клинической эндокринологии, поскольку позволяет найти новые подходы к лечению диабета, ориентированные на коррекцию его первопричин, лежащих в сфере функционирования гормональных сигнальных систем.

Ранее нами было показано, что при экспериментальном стрептозотоциновом (СТЦ) диабете I типа, который является инсулиновозависимой формой заболевания, в значительной степени снижается функциональная активность основных компонентов аденилаткиназной сигнальной системы (АЦ-системы) — гетеротримерных G-белков и фермента аденилаткиназы (АЦ) — и нарушается сопряжение между ними (Шпаков и др., 2005а, 2005б; Kuznetsova et al., 2005). В тканях крыс, страдающих диабетом I типа, выявлено снижение чувствитель-

ности компонентов АЦ-системы к негормональным агентам (гуаниновым нуклеотидам, фториду натрия и форсколину) и обнаружены нарушения в сигнальных каскадах, включающих в себя G-белки стимулирующего (G<sub>s</sub>) и ингибирующего (G<sub>i</sub>) типов, через которые осуществляется передача гормональных сигналов, регулирующих активность АЦ. Изменения чувствительности АЦ-системы к гормональным и негормональным регуляторам выявляются на фоне значительного повышения базальной активности АЦ и некоторого снижения базального уровня ГТФ-связывания у крыс с СТЦ-диабетом I типа.

Другие авторы обнаружили, что при диабете I типа в миокарде и гладких мышцах сосудов снижается экспрессия α-субъединиц G<sub>iα</sub>-белков (преимущественно Gα<sub>i2</sub> и Gα<sub>i3</sub>) при сохранении практически неизменной экспрессии G<sub>s</sub>-белка (Wichelhaus et al., 1994; Gando et al., 1997; Matsuda et al., 1999; Hashim et al., 2002, 2004, 2006). Наряду с этим в миокарде диабетических крыс в сравнении с контролем меняется соотношение подтипов β-адренергических рецепторов (β-AP), являющееся следствием

снижения экспрессии  $\beta_1$ -АР и повышения экспрессии  $\beta_2$ - и  $\beta_3$ -АР (Matsuda et al., 1999; Dincer et al., 2001). При СТЦ-диабете I типа также наблюдается снижение экспрессии и функциональной активности АЦ 5-го и 6-го типов (Matsumoto et al., 2005).

В то же время сведения об изменениях в гормональных системах при инсулиновозависимом диабете II типа, который гораздо чаще встречается в сравнении с диабетом I типа и представляет серьезную социальную проблему, немногочисленны и противоречивы. Так, ряд авторов обнаружили, что при инсулиновозависимом диабете (как экспериментальном, так и диабете II типа человека) снижаются экспрессия и функциональная активность различных изоформ G<sub>i</sub>-белков (Hadjiconstantinou et al., 1988; Livingstone et al., 1991; Palmer et al., 1992; Caro et al., 1994). У пациентов, страдающих диабетом II типа, выявлены мутации в гене, кодирующем G $\beta_3$ -субъединице, которая в большей степени ассоциирована с G $\alpha_i$ -субъединицами и, таким образом, влияет на функциональную активность сопряженных с G<sub>i</sub>-белками сигнальных каскадов (Fernandez-Real et al., 2003). При этом совершенно не изучены экспериментальные модели диабета II типа, в том числе избранная нами неонатальная модель СТЦ-диабета II типа крыс, разработанная и внедренная в практику экспериментальной медицины сравнительно недавно (Hemmings, Spafford, 2000).

Цель настоящего исследования состояла в выявлении нарушений процесса передачи стимулирующих и ингибирующих гормональных сигналов через АЦ-систему в миокарде и стриатуме мозга крыс с экспериментальным диабетом II типа (неонатальная СТЦ-модель), продолжительность развития которого составляла 80 и 180 сут. Было изучено влияние на компоненты АЦ-системы (фермент АЦ и гетеротримерные G-белки) биогенных аминов (адреналина и серотонина) и их аналогов (изопротеренола и бромкриптина), пептидных гормонов (релаксина и соматостатина), а также негормонального регулятора АЦ мастопарана — пептидного токсина из яда насекомых.

## Материал и методика

Использовали неонатальную СТЦ-модель инсулиновозависимого диабета II типа (Hemmings, Spafford, 2000). Новорожденным 1—2-суточным крысятам-самцам линии Wistar вводили СТЦ (Sigma, США) в дозе 80 мг на 1 кг массы тела животного, что приводило к развитию у них диабета II типа. Животных забивали через 80 или 180 сут после введения СТЦ. Фракции плазматических мембран сердечной мышцы крыс были выделены по методу Кидваи и соавторов (Kidwai et al., 1973), фракции синаптосомальных мембран стриатума мозга крысы — по методу Хайос (Hajos, 1975). Для получения каждой фракции использовали по 5—6 контрольных крыс (масса 220±15 г,  $n = 22$ ) или крыс с диабетом, продолжительность которого составляла 80 (масса 265 ± 25 г,  $n = 19$ ) или 180 (масса 345 ± 30 г,  $n = 18$ ) сут.

Определение ГТФ-связывающей активности G-белков проводили по известному методу (Panchenko et al., 1987; McIntire et al., 2001) с нашими модификациями (Шпаков и др., 2004). Время инкубации фракций плазматических мембран с  $\beta$ ,  $\gamma$ -имидо-[8-<sup>3</sup>H]-гуанозин-5'-трифосфатом ([8-<sup>3</sup>H]GppNPr) составляло 10 мин. Специфическую ГТФ-связывающую активность гетеротример-

ных G-белков определяли как разность между связыванием меченого [8-<sup>3</sup>H]GppNPr в пробе в отсутствие ГТФ и таковым в присутствии 10 мМ ГТФ.

Определение активности АЦ проводили по методу Саломона и соавторов (Salomon et al., 1974) с нашими модификациями (Plesneva et al., 2001). Инкубацию мембранных фракций в реакционной смеси проводили при 37 °C в течение 10 мин. Активность АЦ оценивали по количеству образовавшегося в результате ферментативной реакции цАМФ, который определяли методом колоночной хроматографии на окиси алюминия.

Для проведения экспериментов использовали следующие химические реагенты: креатинфосфат, креатинфосфоркиназу из мышц кролика (НФ 2.7.3.2), имидазол, соматостатин, норадреналин, серотонин, изопротеренол, бромкриптин, мастопаран из *Polistes jadwagae*, АТФ, цАМФ, ГТФ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -имидогуанозин-5'-трифосфат (GppNPr), Tris-OH, луброл РХ, ЭДТА, ДТТ и БСА (Sigma, США). Релаксин-2 свиньи был любезно предоставлен проф. О. Д. Шервудом (O. D. Sherwood; США). Для колоночной хроматографии использовали нейтральную окись алюминия II по Брокману (Sigma, США), для определения ГТФ-связывающей активности G-белков — нитроцеллюлозные фильтры, тип НА, 0.45 мкм (Millipore, США). Для радиоизотопных экспериментов использовали [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]АТФ (1.11 ТБк/ммоль) и [8-<sup>3</sup>H]GppNPr (185 ГБк/ммоль) (Amersham, Англия).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы ANOVA. Каждый эксперимент был выполнен трехкратно. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего из нескольких независимых экспериментов. Различия между контрольными пробами и пробами, подвергнутыми воздействию гормонов и негормональных агентов, оценивали как достоверные при  $P < 0.05$ .

## Результаты

Базальная активность АЦ в миокарде крыс с экспериментальным СТЦ-диабетом II типа, продолжительность развития которого составляла 80 и 180 сут, была 19.9 ± 1.7 и 20.9 ± 3.1 пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка (в миокарде контрольных животных — 16.1 ± 0.7 пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка). В стриатуме мозга значения базальной активности фермента при 80- и 180-суточном диабете составляли 68.3 ± 4.0 и 71.5 ± 6.2 (в контроле 74.2 ± 4.0). Стимулирующие АЦ эффекты дитерпена форсколина ( $10^{-5}$  М), который непосредственно действует на каталитический сайт фермента, в тканях диабетических и контрольных крыс не различались. В миокарде крыс с 80- и 180-суточным диабетом эти эффекты составляли 289 и 297 %, в миокарде контрольных животных — 316 %. В стриатуме мозга крыс с 80- и 180-суточным диабетом форсколин стимулировал АЦ на 210 и 191 %, в контроле — на 208 %. Полученные нами данные указывают на то, что при СТЦ-диабете II типа заметных изменений каталитической функции АЦ в миокарде и мозге не наблюдается.

Пептидный гормон соматостатин ( $10^{-9}$ — $10^{-5}$  М) и D<sub>2</sub>-агонист бромкриптина ( $10^{-7}$ — $10^{-4}$  М) дозозависимо ингибировали стимулированную форсколином активность АЦ в миокарде (соматостатин) и стриатуме мозга (соматостатин и бромкриптина) как контрольных, так и диабетических крыс (рис. 1). Однако в тканях диабетиче-

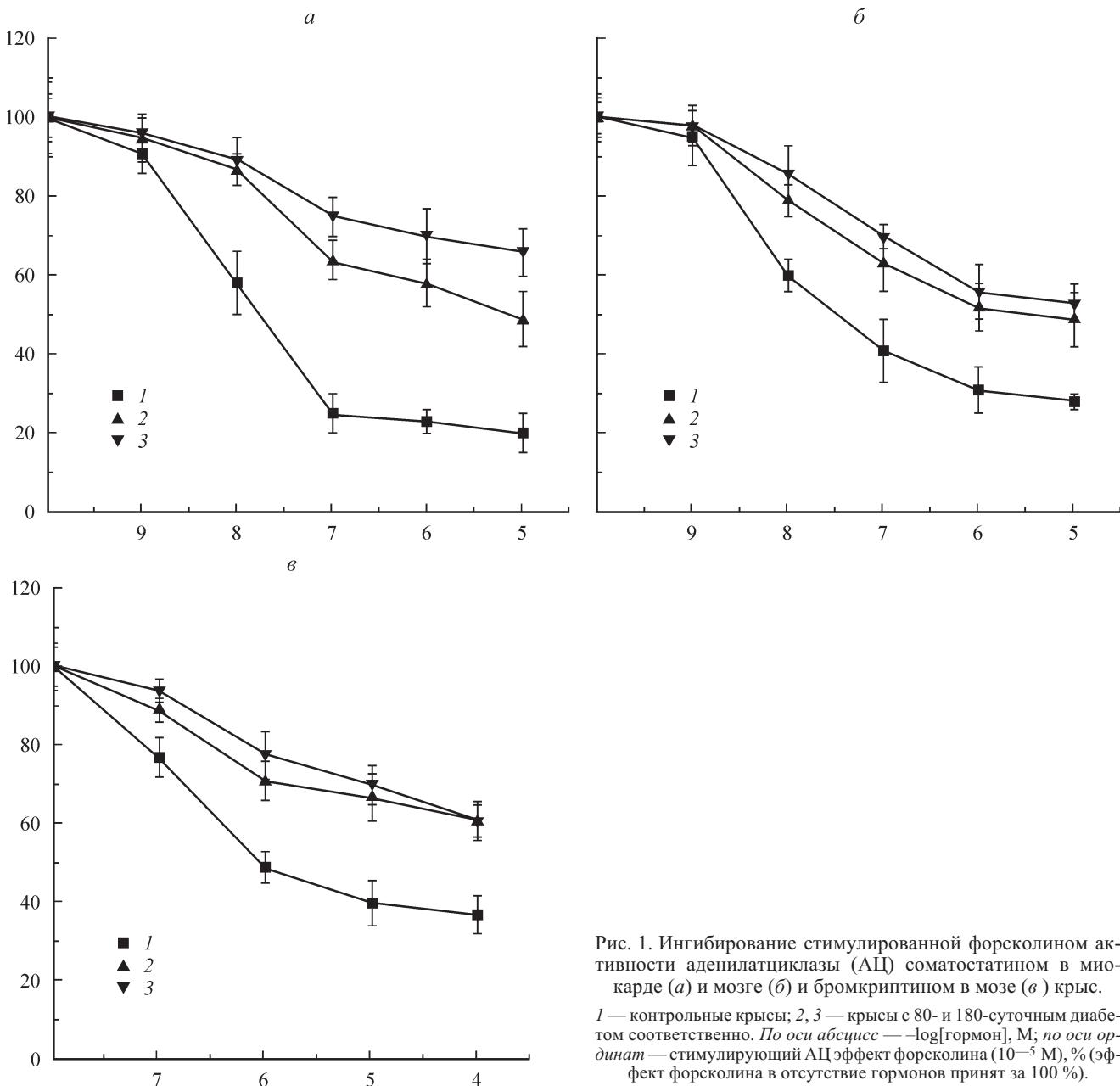


Рис. 1. Ингибирование стимулированной форсколином активности аденилаткиназы (АЦ) соматостатином в миокарде (а) и мозге (б) и бромкриптином в мозге (в) крыс.

1 — контрольные крысы; 2, 3 — крысы с 80- и 180-суточным диабетом соответственно. По оси абсцисс —  $-\log[\text{гормон}] \text{ M}$ ; по оси ординат — стимулирующий АЦ эффект форсколина ( $10^{-5} \text{ M}$ ), % (эффект форсколина в отсутствие гормонов принят за 100 %).

ских крыс ингибирующий эффект всех исследованных нами гормонов был в значительной степени ослаблен в сравнении с контролем и животными, причем наиболее отчетливо различие между эффектами гормонов при диабете и в контроле было выражено в миокарде. Увеличение продолжительности развития СТЦ-диабета с 80 до 180 сут приводило к ослаблению ингибирующего АЦ эффекта соматостатина в миокарде, но слабо влияло на ингибирующие АЦ эффекты гормонов в стриатуме.

В миокарде диабетических крыс снижение стимулирующих АЦ эффектов пептидного гормона релаксина и АР агонистов изопротеренола и норадреналина в сравнении с контролем было не столь значительным, как в случае ингибирующих АЦ эффектов гормонов (рис. 2). Так, стимулирующие АЦ эффекты изопротеренола и норадреналина, взятых в концентрации  $10^{-5} \text{ M}$ , при диабете составляли 67—69 и 80—81 % от таковых в контроле, причем продолжительность развития СТЦ-диабета заметно

не влияла на эти показатели. В стриатуме мозга диабетических животных стимулирующие АЦ эффекты релаксина и серотонина практически не менялись.

Поскольку норадреналин в миокарде способен не только стимулировать, но и ингибировать АЦ через  $\alpha_2$ -АР и G<sub>i</sub>-белок, было изучено его влияние на стимулированную форсколином активность фермента. Обнаружено, что при диабете норадреналин в концентрациях  $10^{-6}$  и  $10^{-5} \text{ M}$  практически не влияет на стимулированную форсколином активность АЦ (данные не представлены), в то время как в контроле он снижает ее на 16 и 21 % соответственно.

Базальный уровень ГТФ-связывания был незначительно снижен только в миокарде крыс с диабетом, продолжительность развития которого составляла 180 сут (см. таблицу). В то же время при диабете наблюдалось значительное ослабление стимулирующих ГТФ-связывающие эффектов соматостатина и бромкриптина, действую-

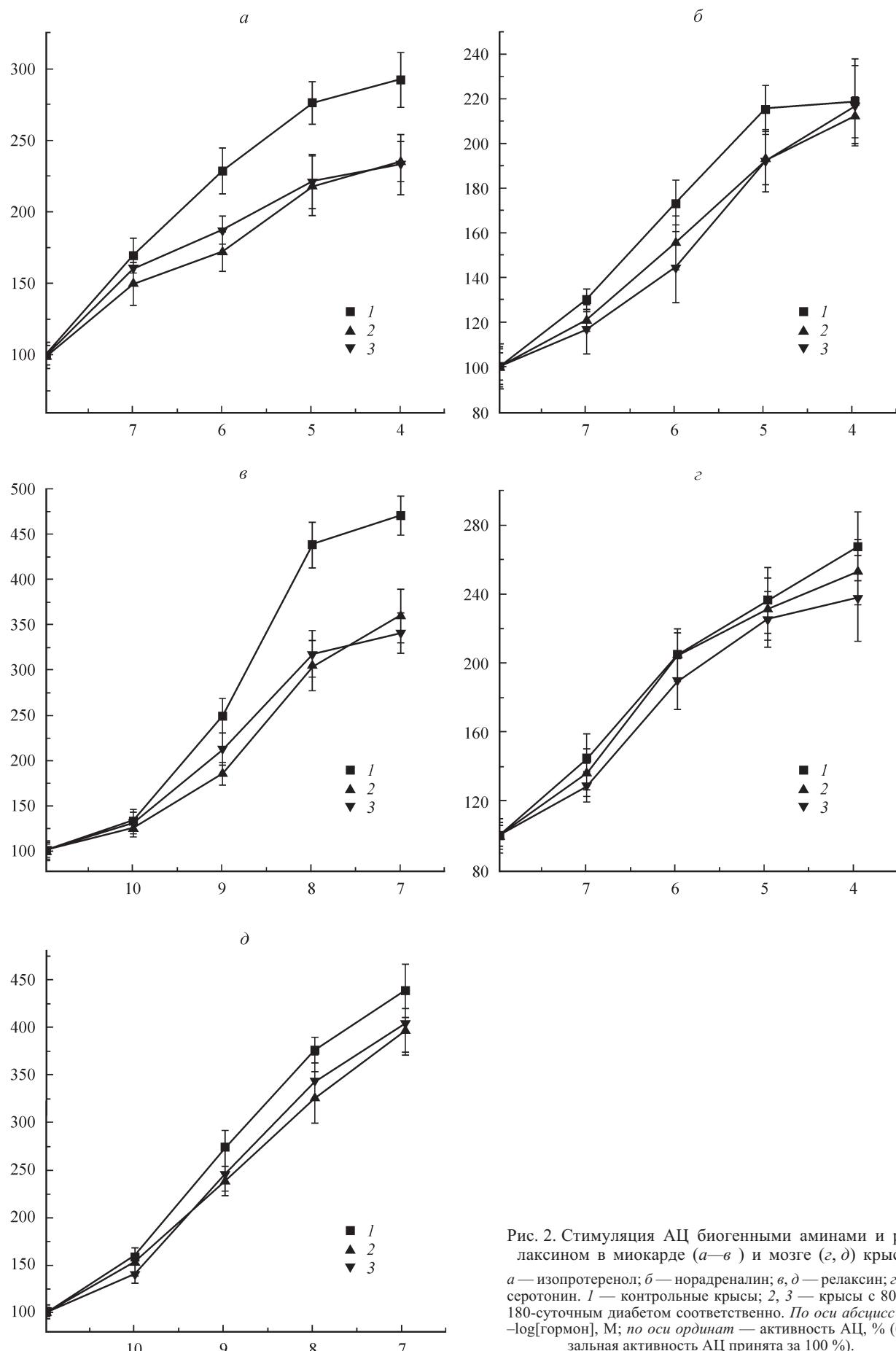


Рис. 2. Стимуляция АЦ биогенными аминами и релаксином в миокарде (*a*—*e*) и мозге (*c*, *d*) крыс.  
*a* — изопротеренол; *b* — норадреналин; *c*, *d* — релаксин; *e* — серотонин. 1 — контрольные крысы; 2, 3 — крысы с 80- и 180-суточным диабетом соответственно. По оси абсцисс —  $-\log[\text{гормон}], \text{M}$ ; по оси ординат — активность АЦ, % (базальная активность АЦ принята за 100 %).

**Влияние гормонов на ГТФ-связывающую активность в миокарде и стриатуме мозга крыс с 80- и 180-суточным СТЦ-диабетом II типа в сравнении с контрольными животными**

Гормон	ГТФ-связывание, пмоль [8- <sup>3</sup> H]GppNHp на 1 мг мембранных белков, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$		
	контроль ( $n = 6$ )	80-суточный диабет ( $n = 5$ )	180-суточный диабет ( $n = 5$ )
<b>Миокард</b>			
Без гормона	2.4 ± 0.1	2.1 ± 0.2	1.9 ± 0.1
Соматостатин, $10^{-7}$ М	8.6 ± 0.4 (+258) [100]	4.7 ± 0.3 (+124) [42]	4.0 ± 0.3 (+111) [34]
Изопротеренол, $10^{-5}$ М	5.3 ± 0.2 (+121) [100]	4.4 ± 0.3 (+110) [79]	4.1 ± 0.5 (+116) [76]
Норадреналин, $10^{-5}$ М	6.0 ± 0.4 (+150) [100]	4.1 ± 0.4 (+95) [56]	3.8 ± 0.1 (+100) [53]
Релаксин, $10^{-8}$ М	7.4 ± 0.6 (+208) [100]	5.7 ± 0.3 (+171) [72]	5.6 ± 0.5 (+195) [74]
<b>Стриатум мозга</b>			
Без гормона	6.9 ± 0.4	5.8 ± 0.4	6.2 ± 0.3
Соматостатин, $10^{-7}$ М	16.7 ± 0.6 (+142) [100]	11.8 ± 0.7 (+103) [61]	12.0 ± 0.9 (+94) [59]
Бромкриптидин, $10^{-5}$ М	18.5 ± 1.3 (+168) [100]	12.4 ± 0.8 (+114) [57]	12.1 ± 1.0 (+95) [51]
Серотонин, $10^{-5}$ М	17.3 ± 1.6 (+151) [100]	15.2 ± 1.1 (+162) [90]	15.3 ± 0.9 (+147) [88]
Релаксин, $10^{-8}$ М	21.8 ± 1.9 (+216) [100]	19.4 ± 1.2 (+234) [91]	20.1 ± 1.2 (+224) [93]

Примечание. В круглых скобках приведены значения стимулирующих эффектов гормонов на ГТФ-связывание (в %) по отношению к его базальному уровню. В квадратных скобках приведены значения стимулирующих эффектов гормонов на ГТФ-связывание в тканях диабетических крыс (в %) по отношению к таковым в тканях контрольных животных, принятых за 100 %.

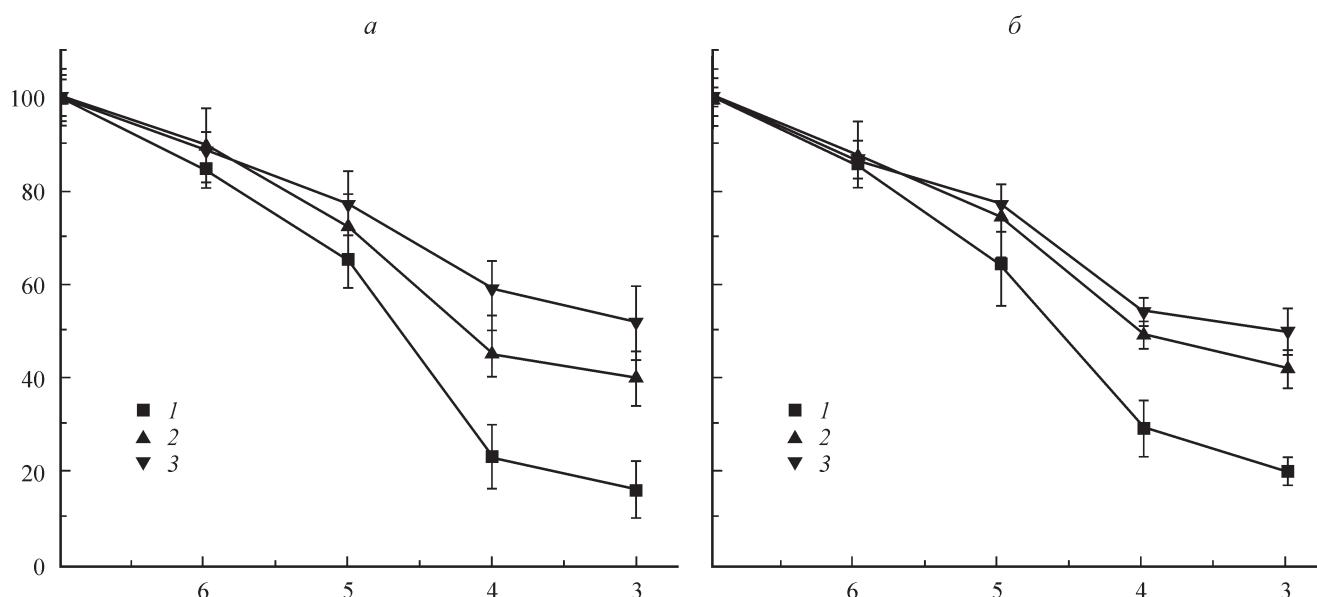


Рис. 3. Ингибиция стимулированной форсколином активности АЦ мастопараном в миокарде (а) и мозге (б) крыс. 1 — контрольные крысы; 2, 3 — крысы с 80- и 180-суточным диабетом соответственно. По оси абсцисс —  $-\log[\text{мастопаран}], \text{М}$ ; по оси ординат — стимулирующий АЦ эффект форсколина (10 $^{-5}$  М), % (эффект форсколина в отсутствие мастопарана принят за 100 %).

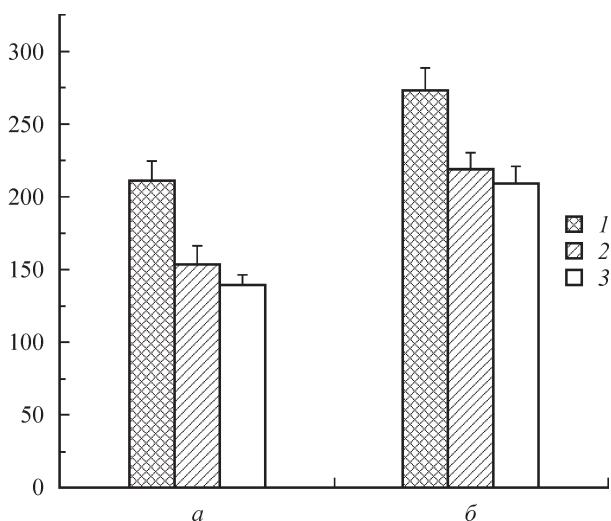


Рис. 4. Снижение стимулирующего эффекта мастопарана ( $10^{-4}$  М) на ГТФ-связывание в миокарде (a) и мозге (b) диабетических крыс.

1 — контрольные крысы; 2, 3 — крысы с 80- и 180-суточным диабетом соответственно. По вертикали — ГТФ-связывание, % (базальный уровень ГТФ-связывания принят за 100 %).

щих на АЦ через  $G_i$ -белки, а также норадреналина, который способен активировать как  $G_s$ -, так  $G_i$ -белки. В миокарде диабетических животных также наблюдалось незначительное по величине снижение стимулирующих ГТФ-связывание эффектов релаксина и изопротеренола, действующих через  $G_s$ -белки. В мозге изменений в стимуляции ГТФ-связывания релаксином и серотонином, активирующих  $G_s$ -белки, выявлено не было.

Для выявления того, на каком этапе передачи ингибирующего АЦ гормонального сигнала возникают нарушения при диабете, было изучено влияние мастопарана, пептидного токсина из яда осы *Polistes jadwagae*, на стимулированную форсколином АЦ-активность и ГТФ-связывание в тканях контрольных и диабетических животных. Mastoparan по не зависимому от рецептора механизму селективно активирует  $G_i$ -белки и ингибирует активность АЦ. Показано, что в миокарде и мозге контрольных крыс мастопаран в концентрации  $10^{-5}$ — $10^{-3}$  М ингибирует активность АЦ намного эффективнее, чем при диабете (рис. 3). Увеличение продолжительности СТЦ-диабета вызывало некоторое ослабление ингибирующего влияния мастопарана на активность фермента, подобно тому как это наблюдалось в случае гормонов, действующих через  $G_i$ -белки. В значительной степени при диабете снижается способность мастопарана стимулировать ГТФ-связывающую активность  $G_i$ -белков, причем изменения в наибольшей степени выражены в миокарде (рис. 4). Эти данные указывают на то, что нарушения в сопряженных с  $G_i$ -белками сигнальных путях при диабете возникают не на уровне рецептора, а на уровне  $G_i$ -белка и его сопряжения с рецептором.

## Обсуждение

Совокупность полученных нами данных свидетельствует о том, что при экспериментальном СТЦ-диабете II типа крыс (неонатальная модель) в наибольшей степени нарушаются функции  $G_i$ -белков, что приводит к

ослаблению регуляторного влияния на активность АЦ гормонов, действие которых реализуется через  $G_i$ -белки ингибирующего типа. Это выражается в заметном ослаблении ингибирующего влияния соматостатина и бромкриптина, которые активируют рецепторы, функционально сопряженные с  $G_i$ -белками (Nielsen et al., 1996; Missale et al., 1998; Schreff et al., 2000), на стимулированную форсколином активность АЦ, а также стимулирующего влияния этих гормонов на ГТФ-связывающую активность  $G_i$ -белков в миокарде и мозге диабетических животных в сравнении с контрольными животными. В свою очередь регуляторные эффекты гормонов, стимуляторов АЦ, влияние которых на функциональную активность фермента реализуется через  $G_s$ -белки, при диабете снижаются в меньшей степени.

Обнаружено, что в миокарде диабетических животных изменения чувствительности АЦ к действию гормонов выражены более отчетливо, чем в мозге, что свидетельствует о тканеспецифичности нарушений АЦ-системы при диабете. Последнее хорошо иллюстрируется тем, что в мозге диабетических и контрольных крыс в отличие от миокарда выявляются лишь незначительные различия в величинах стимулирующих АЦ эффектов серотонина и релаксина, осуществляющих свое действие через  $G_s$ -белки. Наряду с этим показано, что снижение чувствительности АЦ-системы к гормонам при диабете практически не зависит от химической природы гормона, а следовательно, от типа активируемого им рецептора. Это видно как на примере регуляторных эффектов пептидного гормона соматостатина и природного агониста  $D_2$ -дофаминовых рецепторов бромкриптина, действующих через  $G_i$ -белки, в стриатуме мозга, так и на примере регуляторных эффектов пептидного гормона релаксина и  $\beta$ -АР — агониста изопротеренола, действующих через  $G_s$ -белки, в сердечной мышце (рис. 1, 2).

Из общего ряда выбивается норадреналин, неспецифический агонист АР, который обладает способностью активировать не только  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -АР, сопряженные с  $G_s$ -белками, но и  $\alpha_2$ -АР, который функционально сопряжен с  $G_i$ -белками. Его действие может реализовываться также через  $\beta_3$ -АР, который в миокарде сопряжен с АЦ в основном через  $G_i$ -белки ингибирующего типа (Gauthier et al., 1996). Нами показано, что в условиях экспериментального СТЦ-диабета II типа блокируется ингибирующий путь регуляции АЦ, о чем свидетельствует отсутствие ингибирования норадреналином стимулированной форсколином активности АЦ. Этим, как мы полагаем, объясняется тот факт, что при диабете стимулирующий АЦ эффект норадреналина практически не меняется, в то время как стимуляция гормоном ГТФ-связывания заметно снижается (рис. 2; см. таблицу).

Нарушения в АЦ-системе при СТЦ-диабете II типа наблюдаются на уровне  $G_i$ -белков, а не на уровне рецептора. В пользу этого свидетельствуют следующие данные. Во-первых, как отмечалось выше, нами не выявлено существенных различий в снижении регуляторных эффектов гормонов, различающихся по своей химической природе и связывающихся с различными типами рецепторов, на функциональную активность компонентов АЦ-системы при диабете. Во-вторых, регуляторные эффекты мастопарана, который селективно активирует  $G_i$ -белки по не зависимому от рецептора механизму, в тканях диабетических крыс ослабляются в той же степени, как и эффекты гормонов. В основе стимулирующего влияния мастопарана на ГТФ-связывающую активность

$G_i$ -белков, что в конечном итоге ведет к ингибиции активности АЦ, лежит способность этого поликатионного пептидного токсина взаимодействовать с С-концевым сайтом  $G_{\alpha}$ -субъединицы, который несет отрицательный заряд (Higashijima et al., 1990; Breitweg-Lehmann et al., 2002; Шпаков, Перцева, 2006). Таким образом, мастопаран мимикрирует влияние активированного гормоном рецептора на ГТФ-связывающую активность  $G$ -белков. При этом цитоплазматические петли рецептора взаимодействуют с молекулой  $G_{\alpha}$ -субъединицы по механизму, сходному с таковым мастопарана.

С высокой долей вероятности можно утверждать, что причиной обнаруженных нами нарушений передачи гормонального сигнала через сопряженные с  $G_i$ -белками сигнальные каскады при экспериментальном СТЦ-диабете II типа является снижение экспрессии  $G_i$ -белков.

В случае инсулинзависимого диабета I типа это было отчетливо продемонстрировано сразу несколькими группами авторов. Данные о том, что при экспериментальном диабете I типа наблюдается снижение в печени экспрессии  $G$ -белков ингибирующего типа, были получены еще 20 лет назад (Gawler et al., 1987). Позднее было выявлено снижение экспрессии  $G_{\alpha_{i0}}$ -субъединиц в миокарде и гладких мышцах сосудов (Wichelhaus et al., 1994; Gando et al., 1997; Matsuda et al., 1999; Hattori et al., 2000; Hashim et al., 2002, 2004, 2006). Поскольку лечение инсулином приводит к восстановлению экспрессии  $G_{\alpha_i}$ -субъединиц, был сделан вывод о том, что именно инсулиновая недостаточность является причиной избирательного подавления их экспрессии (Matsuda et al., 2000).

В случае инсулиновозависимого диабета II типа также обнаружено снижение экспрессии  $G_{\alpha_i}$ -субъединиц, а также  $G_{\beta_3}$ -субъединицы, сопряженной с  $G_{\alpha_i}$  в составе  $G_i$ -белка (Hadjiconstantinou et al., 1988; Livingstone et al., 1991; Palmer et al., 1992; Caro et al., 1994; Fernandez-Real et al., 2003). В пользу важной роли  $G_i$ -белков в патогенезе диабета II типа свидетельствует то, что нокаут гена, кодирующего  $G_{\alpha_{i2}}$ -субъединицу, вызывает состояние, сходное с этой формой диабета (Moxham, Malbon, 1996). Обнаружено также, что экспрессия мутантной, постоянно активной формы  $G_{\alpha_{i2}}$ -субъединицы ( $\text{Gln}^{205} \rightarrow \text{Leu}$ ) в скелетных мышцах, печени и жировой ткани в значительной степени повышает толерантность трансгенных мышей к повышению уровня глюкозы (Chen et al., 1997) и вызывает транслокацию чувствительного к инсулину глюкозного транспортера GLUT4 к плазматической мембране (Song et al., 2001). Важность  $G_{\alpha_{i2}}$ -субъединицы для предотвращения инсулиновой резистентности связана как с ее участием в передаче инсулинового сигнала в клетку через сопряженные с  $G_i$ -белками сигнальные пути, так и с перекрестным взаимодействием (cross-talk) регулируемых инсулином сигнальных каскадов с сигнальными системами, в которые вовлечена  $G_{\alpha_{i2}}$ -субъединица (Malbon, 2004).

Как нами показано, сигнальные каскады, сопряженные с  $G_s$ -белками, при СТЦ-диабете II типа не подвергаются столь значительным изменениям, как каскады, сопряженные с  $G_i$ -белками. Это согласуется с отсутствием заметных изменений экспрессии  $G_s$ -белков при различных формах диабета и состояниях, сопровождающихся инсулиновой резистентностью. Так, уровень экспрессии  $G_s$ -белков при диабете I типа практически не изменен (Wichelhaus et al., 1994; Gando et al., 1997; Hashim et al., 2002), а при диабете II типа лишь незначительно отлича-

ется от такового в контроле (Bushfield et al., 1990; Begin-Heick, 1994; Caro et al., 1994).

Необходимо отметить, что все изменения гормональной чувствительности при диабете II типа нельзя связывать только с гетеротримерными  $G$ -белками, поскольку при этой форме диабета нарушаются функции и других компонентов сигнальных каскадов, сопряженных с  $G$ -белками (Livingstone et al., 1991; Kowluru et al., 1992; Richardson et al., 2004). Однако результаты наших исследований и данные других авторов свидетельствуют о том, что именно  $G$ -белки играют центральную роль в этих изменениях.

Исследование влияния увеличения продолжительности развития СТЦ-диабета с 80 до 180 сут на гормональную чувствительность АЦ-системы показало, что в случае гормонов, действующих через  $G_i$ -белки, нарушения в этой системе нарастают (наиболее отчетливо в миокарде), в то время как в случае гормонов, действующих через  $G_s$ -белки, заметных изменений выявлено не было. Это указывает на то, что нарушения в передаче гормональных сигналов возникают уже на ранних стадиях развития экспериментального СТЦ-диабета II типа и в дальнейшем прогрессируют лишь в случае сигнальных каскадов, сопряженных с  $G_i$ -белками.

Таким образом, нами показано, что в условиях экспериментального СТЦ-диабета II типа в наибольшей степени подавляются эффекты гормонов, ингибиторов АЦ, осуществляемые ими через  $G$ -белки ингибирующего типа, в то время как эффекты гормонов, активаторов АЦ, снижаются незначительно. Эти данные свидетельствуют о том, что основные нарушения в тканях диабетических животных возникают в АЦ-сигнальных каскадах, сопряженных с  $G_i$ -белками, в то время как сигнальные каскады, сопряженные с  $G_s$ -белками, сохраняют при СТЦ-диабете II типа свою функциональную активность. Выявлена тканевая специфичность изменений гормональной чувствительности АЦ-системы при диабете II типа, заключающаяся в более выраженной ее снижении в миокарде в сравнении с таковым в стрiatуме мозга диабетических крыс.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48809-а).

## Список литературы

Шпаков А. О., Гурьянов И. А., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Корольков В. И., Перцева М. Н., Власов Г. П. 2004. Использование С-концевых пептидов  $\alpha$ -субъединиц  $G$ -белков для исследования их функционального сопряжения с рецепторами биогенных аминов в тканях крыс и моллюсков. Биол. мембрany. 21 (6) : 441—450.

Шпаков А. О., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Гурьянов И. А., Перцева М. Н. 2005а. Молекулярные причины изменения чувствительности аденилатциклазной сигнальной системы сердечной мышцы к биогенным аминам при экспериментальном стрептозотоциновом диабете. Цитология. 47 (6) : 540—548.

Шпаков А. О., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2005б. Молекулярные механизмы изменения чувствительности аденилатциклазной сигнальной системы к биогенным аминам при стрептозотоциновом диабете. Бюл. эксперим. биол. мед. 140 (9) : 286—290.

Шпаков А. О., Перцева М. Н. 2006. Молекулярные механизмы действия мастопарана на  $G$ -белки в тканях позвоночных

- и беспозвоночных животных. Бюл. эксперим. биол. мед. 141 (3) : 273—277.
- Begin-Heick N. 1994. Liver  $\beta$ -adrenergic receptors, G proteins, and adenylyl cyclase activity in obesity-diabetes syndromes. Amer. J. Physiol. 266 : 1664—1672.
- Breitweg-Lehmann E., Czupalla C., Storm R., Kudlacek O., Schunack W., Freissmuth M., Nurnberg B. 2002. Activation and inhibition of G protein by lipoamines. Mol. Pharmacol. 61 : 628—636.
- Bushfield M., Griffiths S. L., Murphy G. J., Pyne N. J., Knowler J. T., Milligan G., Parker P. J., Mollner S., Houslay M. D. 1990. Diabetes-induced alterations in the expression, functioning and phosphorylation state of the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein G<sub>i</sub> $\alpha$ -2 in hepatocytes. Biochem. J. 271 : 365—372.
- Caro J. F., Raju M. S., Caro M., Lynch C. J., Poulos J., Exton J. H., Thakkar J. K. 1994. Guanine nucleotide binding proteins in liver from obese humans with and without type II diabetes: evidence for altered «cross-talk» between the insulin receptor and G<sub>i</sub> proteins. J. Cell. Biochem. 54 : 309—319.
- Chen J. F., Guo J. H., Moxham C. M., Wang H. Y., Malbon C. C. 1997. Conditional, tissue-specific expression of Q205L G<sub>a</sub> $\alpha$ 2 in vivo mimics insulin action. J. Mol. Med. 75 : 283—289.
- Dincer D. U., Bidasee K. R., Guner S., Tay A., Ozcelikay T., Altan V. M. 2001. The effect of diabetes on expression of  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - and  $\beta_3$ -adrenoceptors in rat hearts. Diabetes. 50 : 455—461.
- Fernandez-Real J. M., Penarroja G., Richart C., Castro A., Vendrell J., Broch M., Lopez-Bermejo A., Ricart W. 2003. G protein in  $\beta_3$  gene variant, vascular function, and insulin sensitivity in type 2 diabetes. Hypertension. 41 : 124—129.
- Gando S., Hattori Y., Akaishi Y., Nishihira J., Kanno M. 1997. Impaired contractile response to beta adrenoreceptor stimulation in diabetic rat hearts: alterations in beta adrenoreceptors—G protein—adenylyl cyclase system and phospholamban phosphorylation. J. Pharmacol. Exp. Ther. 282 : 475—484.
- Gauthier C., Tavernier G., Charpentier F., Langin D., Le Marrec H. 1996. Functional  $\beta_3$ -AR in the human heart. J. Clin. Invest. 98 : 556—562.
- Gawler D., Milligan G., Spiegel A. M., Unson C. H., Houslay M. D. 1987. Abolition of the expression of the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein G<sub>i</sub> activity in diabetes. Nature. 327 : 229—232.
- Hadjiconstantinou M., Qu Z. K., Moroi-Fetters S. E., Neff N. H. 1988. Apparent loss of G<sub>i</sub> protein activity in the diabetic retina. Eur. J. Pharmacol. 149 : 193—194.
- Hajos F. 1974. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. Brain Res. 93 : 485—489.
- Hashim S., Li Y., Anand-Srivastava M. B. 2006. G-protein-linked cell signaling and cardiovascular functions in diabetes/hyperglycemia. Cell. Biochem. Biophys. 44 : 51—64.
- Hashim S., Li Y., Nagakura A., Takeo S., Anand-Srivastava M. B. 2004. Modulation of G-protein expression and adenylyl cyclase signaling by high glucose in vascular smooth muscle. Cardiovasc. Res. 63 : 709—718.
- Hashim S., Li Y. Y., Wang R., Anand-Srivastava M. B. 2002. Streptozotocin-induced diabetes impairs G-protein linked signal transduction in vascular smooth muscle. Mol. Cell. Biochem. 240 : 57—65.
- Hattori Y., Matsuda N., Sato A., Watanuki S., Tomioka H., Kawasaki H., Kanno M. 2000. Predominant contribution of the G protein-mediated mechanism to NaF-induced vascular contractions in diabetic rats: association with an increased level of expression. J. Pharmacol. Exp. Ther. 292 : 761—768.
- Hemmings S. J., Spafford D. 2000. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the Fischer 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors. Int. J. Biochem. Cell Biol. 32 : 905—919.
- Higashijima T., Burnier J., Ross E. M. 1990. Regulation of G<sub>i</sub> and G<sub>o</sub> by mastoparan, related amphiphilic peptides and hydrophobic amines. L. Biol. Chem. 265 : 14 176—14 186.
- Kidwai A. M., Radcliffe A. M., Lee E. V., Daniel E. E. 1973. Isolation and properties of skeletal muscle membrane. Biochim. biophys. acta. 289 : 593—607.
- Kowluru A., Kowluru R. A., Yamaraki A. 1992. Functional alterations of G-proteins in diabetic rat retina: a possible explanation for the early visual abnormalities in diabetes mellitus. Diabetologia. 35 : 624—631.
- Kuznetsova L., Plesneva S., Shpakov A., Pertseva M. 2005. Functional defects in insulin and relaxin adenylyl cyclase signaling systems in myometrium of pregnant women with type I diabetes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1041 : 446—448.
- Livingstone C., McLellan A. R., McGregor M., Wilson A., Connel J. M. C., Small M., Milligan G., Paterson K. R., Houslay M. D. 1991. Altered G-protein expression and adenylyl cyclase activity in platelets of non-insulin-dependent (NIDDM) male subjects. Biochim. biophys. acta. 1096 : 127—133.
- Malbon C. C. 2004. Insulin signalling: putting the «G» in protein-protein interactions. Biochem. J. 380 : 11—12.
- Matsuda N., Hattori Y., Gando S., Akaishi Y., Kemnotsu O., Kanno M. 1999. Diabetes-induced down-regulation of  $\beta_1$ -AR mRNA expression in rat heart. Biochem. Pharmacol. 58 : 881—885.
- Matsumoto T., Wakabayashi K., Kobayashi T., Kamata K. 2005. Functional changes in adenylyl cyclases and associated in relaxation response in mesenteric arteries from diabetic rats. Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 289 : 2234—2243.
- McIntire W. E., Mac Cleery G., Garrison J. C. 2001. The G protein  $\beta$  subunit is a determinant in the coupling of G<sub>s</sub> to the  $\beta_1$ -adrenergic and A2a adenosine receptors. J. Biol. Chem. 276 : 15 801—15 809.
- Missale C., Nash S. R., Robinson S. W., Jaber M., Caron M. G. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. Physiol. Rev. 78 : 198—225.
- Moxham C. M., Malbon C. C. 1996. Insulin action impaired by deficiency of the G-protein subunit G<sub>i</sub> $\alpha$ 2. Nature. 379 : 840—844.
- Nielsen M. D., Chan G. C. K., Poser S. W., Storm D. R. 1996. Differential regulation of type I and type VIII Ca<sup>2+</sup>-stimulated adenylyl cyclases by G<sub>i</sub>-coupled receptors *in vivo*. J. Biol. Chem. 271 : 33 308—33 316.
- Palmer T. M., Taberner P. V., Houslay M. D. 1992. Alterations in G-protein expression, G<sub>i</sub> function and stimulatory receptor-mediated regulation of adipocyte adenylyl cyclase in a model of insulin-resistant diabetes with obesity. Cell. Signal. 4 : 365—377.
- Panchenko M. P., Hoffenberg S. I., Tkachuk V. A. 1987. Purification and some properties of GTP-binding proteins from pig heart plasma membranes. Biochim. biophys. acta. 46 : 452—455.
- Plesneva S. A., Shpakov A. O., Kuznetsova L. A., Pertseva M. N. 2001. A dual role of protein kinase C in insulin signal transduction via adenylyl cyclase signaling system in muscle tissues of vertebrates. Biochem. Pharmacol. 61 : 1277—1291.
- Richardson M. R., Kilts J. D., Kwatra M. M. 2004. Increased expression of G<sub>i</sub>-coupled muscarinic acetylcholine receptor and G<sub>i</sub> in atrium of elderly diabetic subjects. Diabetes. 53 : 2392—2396.
- Salomon Y., Londos C., Rodbell M. A. 1974. Highly sensitive adenylyl cyclase assay. Anal. Biochem. 58 : 541—548.
- Schreff M., Schulz S., Handel M., Keilhoff G., Braun H., Pereira G., Klutzny M., Schmidt H., Wolf G., Hollt V. 2000. Distribution, targeting, and internalization of the sst4 somatostatin receptor in rat brain. J. Neurosci. 20 : 3785—3797.
- Song X., Zheng X., Malbon C. C., Wang H. 2001. G<sub>i</sub> $\alpha$ 2 enhances *in vivo* activation of and insulin signaling to GLUT4. J. Biol. Chem. 276 : 34 651—34 658.
- Wichelhaus A., Russ M., Petersen S., Eckel J. 1994. G protein expression and adenylyl cyclase regulation in ventricular cardiomyocytes from STZ-diabetic rats. Amer. J. Physiol. 267 : 548—555.

THE DISTURBANCE OF THE TRANSDUCTION OF ADENYLYL CYCLASE INHIBITING  
HORMONAL SIGNAL IN MYOCARDIUM  
AND BRAIN OF RATS WITH EXPERIMENTAL TYPE II DIABETES

*A. O. Shpakov, L. A. Kuznetsova, S. A. Plesneva, M. N. Pertseva*

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg;  
e-mail: alex\_shpakov@list.ru

At present, the data obtained by us and other authors give evidence that disturbances in hormonal signaling systems are the main causes of development of pathological changes and complications under the diabetes. However, the molecular mechanisms of these disturbances remain obscure, especially in the case of insulin-independent type II diabetes. Using neonatal streptozotocin model of 80- and 180-days type II diabetes the changes in functional activity of hormone-regulated adenylyl cyclase (AC) signaling systems components in the myocardium and the brain striatum of diabetic rats in comparison with the control animals were found. The transduction of AC inhibitory hormonal signal mediated through  $G_i$  proteins was shown to be disturbed under diabetes. This was manifested in both the decrease of hormone inhibitory effect on AC activity and weakening of hormone stimulation of G-protein GTP-binding activity. In the case of noradrenaline (myocardium) the inhibitory pathway of AC regulation by the hormone was vanished and the stimulation pathway, in contrary, was protected. Prolongation of diabetes from 80 up to 180 days led to some weakening of  $G_i$ -protein-mediated hormonal signal transduction. Stimulating effect of biogenic amines and relaxin on the AC activity and GTP-binding in the myocardium and brain of diabetic rats were weakly changed in the case of both 80- and 180-days diabetes. To sum up, the experimental type II diabetes caused disturbances mainly in  $G_i$ -coupled signaling cascades participating in hormone inhibition of AC activity.

**Key words:** adenylyl cyclase, adenylyl cyclase signaling system, G-protein, diabetes, myocardium, brain, relaxin, somatostatin.