

О.Г. ЧЕРЕДНИЧЕНКО

## ИНДУКЦИЯ БЕЛКОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА

(Институт общей генетики и цитологии МОН РК)

*При изучении формирования адаптивного ответа под воздействием малых доз радиации и теплового шока *in vitro* проведено электрофоретическое разделение белков плазмы крови, в результате чего показано, что при этом образуются новые белковые зоны и увеличивается экспрессия некоторых белков, присутствующих в контрольной плазме. Анализ электрофореграмм в ПАГ различной концентрации позволил идентифицировать 7 г-индуцированных полипептидов, при этом их молекулярные массы лежат в пределах 162–195 Кд. Сравнительный анализ белков, индуцируемых воздействием г-радиацией и гипертермией в малых дозах, показал наличие продуктов, общих для радиационного и теплового воздействий, специфичных только для радиационного и только для теплового воздействия.*

*Таким образом, «перемещающийся фактор» адаптивного ответа, по-видимому, является совокупностью нескольких белков, выделяемых клеткой в ответ на адаптирующее воздействие малыми дозами мутагенных факторов.*

К настоящему времени на разных объектах не только получены доказательства индукции адаптивного ответа в разных типах клеток и при различных сочетаниях ионизирующих облучений, но и сделаны, попытки проследить механизм формирования адаптивного ответа в плане изучения последовательных процессов на пути его реализации.

Ряд экспериментов с клетками млекопитающих указывает на то, что физиологические ответы при воздействии мутагенов могут индуцироваться ДНК повреждениями [1]. Так, при УФ-облучении фибробластов человека усиливаются координационная продукция новых мРНКаз [2,3] и синтез 8 белков, идентифицированных в целом как основные стресс-ответные гены [2,4,5].

В ранее проведенных экспериментах нами показана возможность передачи состояния защищенности от облученных клеток к необлученным за счет индукции первыми «фактора» адаптивного ответа. Предполагается, что, он, по крайней мере, отчасти представлен так называемыми стресс-белками. В связи с этим целью нашего исследования было выявление продуктов реакций, запускаемых в клетке малыми дозами радиации, белкового происхождения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Образцы периферической крови от здоровых доноров (г. Алматы) отбирали в стерильных условиях из локтевой вены в гепаринизированные флаконы.*

*Радиационное воздействие ( $\gamma$ -излучение).* Цельную кровь в стеклянных флаконах облучали  $\gamma$ -квантами на линейном электронном ускорителе (ЭЛУ-2) с номинальной энергией ускоренных электронов 2 МэВ с мощностью доз 0,01 Гр – 50 сГр/мин и 2 Гр – 100 сГр/мин.

*Физическое воздействие (температура).* В качестве адаптирующего фактора применяли температурную обработку, т.е. цельную донорскую кровь прогревали 10 мин при температуре 42°C [6].

*Электрофорез белков в полиакриламидном геле.* Для фракционирования белков использовали систему Лэммли [7]. Соотношение бис-акриламид/акриламид равнялось 1/35. Концентрации использованных ПАГ составляли 7,5, 12,5%. Пробы, содержащие, 2% SDS и 5% мер-

каптоэтанола, инкубировали 3 мин на кипящей водяной бане. После проведения электрофореза в течение 18–20 ч при силе тока 8–10 мА пластины гелей фиксировали и окрашивали Кумасси R-250 на изопропиловом спирте [8].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ранее проведенных экспериментах нами показано, что при воздействии малых доз мутагенных факторов формируется адаптивный ответ. Однако до сих пор остаются неясными некоторые этапы в ряду событий от индукции адаптивного ответа до его реализации. Предполагается, что, по крайней мере, в некоторых случаях в этот процесс вовлекаются так называемые стресс-белки. В связи с этим для выявления продуктов реакций, запускаемых в клетке малыми дозами радиации белкового происхождения, мы предприняли попытку разделения белков плазмы крови с целью уловить разницу в белковом составе между контрольной плазмой, т.е. плазмой, выделенной из крови, не подвергавшейся каким-либо воздействиям, и плазмой, выделенной из цельной крови, облученной малой дозой радиации или подвергавшейся температурной обработке.

Плазма крови содержит сложную смесь большого числа различных белков. Наиболее широко для этой цели применяется электрофорез, позволяющий получить качественную и количественную информацию о составе белков в образцах плазмы крови.

Для первичной характеристики препаратов плазмы, выделенных из крови, подвергшейся воздействию облучения в адаптирующей дозе 0,05 Гр, и контрольной, т.е. не подвергавшейся каким-либо воздействиям, было проведено электрофоретическое разделение белков в 12,5% ПАГ (рис. 1).

Как видно из представленной электрофорограммы, обнаружено некоторое различие по белковому составу между исследуемыми препаратами, а именно под воздействием малых доз радиации *in vitro* образуются новые белковые зоны или усиливается экспрессия присутствующих в контрольной плазме белков.

Однако проведенный электрофоретический анализ крови, подвергшейся радиационной обработке в адаптирующей дозе, от разных

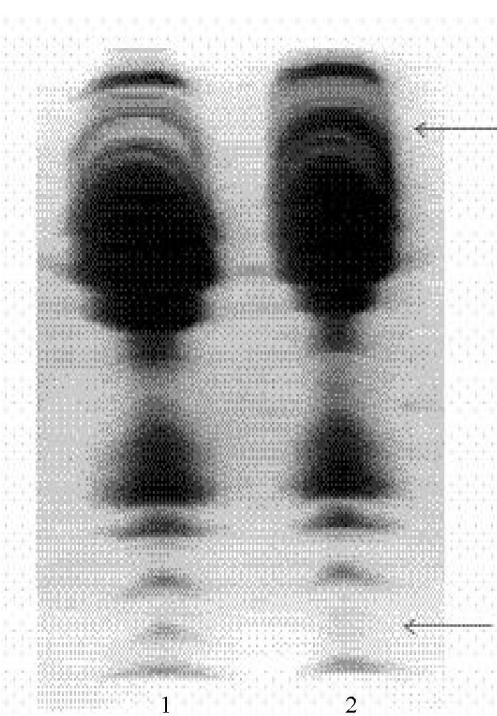


Рис. 1. Электрофоретический спектр белков плазмы человека при изучении радиоадаптивного ответа: 1 – плазма, выделенная из цельной крови, подвергшейся радиационному воздействию в адаптирующейся дозе 0,05 ГР; 2 – контрольная плазма

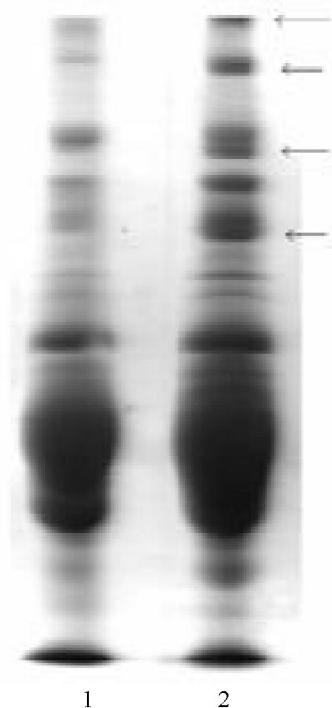


Рис. 2. Электрофоретический спектр белков плазмы человека при изучении теплового шока: 1 – контрольная плазма; 2 – плазма, выделенная из цельной крови, подвергшаяся тепловому воздействию 10 мин при 42 °C

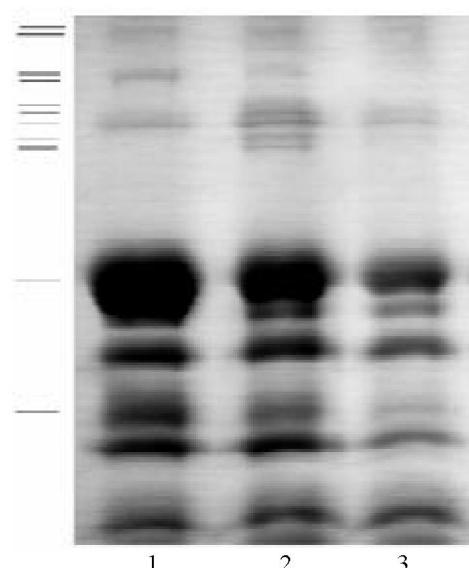


Рис. 3. Фрагмент электрофореграммы, демонстрирующий индукцию новых полипептидов: 1 – плазма, выделенная из цельной крови, подвергшаяся тепловому воздействию 15 мин при 42°C; 2 – плазма, выделенная из цельной крови, подвергшейся радиационному воздействию в адаптирующейся дозе 0,05 ГР; 3 – контрольная плазма

доноров показал, что не во всех образцах выявляется экспрессия радиационно-индуцированных белков. Полученные результаты согласуются с нашими цитогенетическими данными о том, что не все индивидуумы способны формировать адаптивный ответ, а также подтверждают предположение о гетерогенности популяции по способности к формированию адаптивного ответа [9, 10]. Объяснить их, вероятно, можно наличием определенных нарушений, возможно, генетических, влияющих на проявление реакций адаптивного ответа, например, снижением репаративной способности, подавлением синтеза необходимых белков и т.д.

При анализе результатов, полученных нами, и при исследовании белков плазмы, выделенной из цельной крови, подвергшейся тепловому воздействию (15 мин 42°C) в 7,5% ПАГ (рис. 2), также выявлены формирование новых белковых зон и усиление экспрессии белков, обнаруживаемых в контрольной плазме.

Как видно из предыдущих электрофорограмм, индуцируемые белки расположены в верхней зоне трека и находятся в 7,5% ПАГ, поэтому более полные данные мы получили в геле именно этой

концентрации при обработке проб 2% SDS и 5% меркаптоэтанолом (рис. 3).

Как следует из рис. 3, в образцах плазмы, выделенных из цельной крови, подвергавшейся тепловому шоку и радиационному воздействию в адаптирующейся дозе, формируются белки, не обнаруживаемые в контрольной плазме. При этом индуцируемые белки можно разделить на три группы: специфичные только для радиационного воздействия, специфичные только для теплового шока и общие при обоих воздействиях, кроме того, обнаруживаются белки, экспрессия которых увеличивалась под воздействием ионизирующего излучения и теплового шока.

Для определения молекулярных масс индуцированных белков мы использовали в качестве маркера белки вируса гриппа ВПЧ (A/FPV) с известными молекулярными весами (определенными ранее в нашей лаборатории). На основании полученных результатов по миграции белков вируса гриппа A/FPV нами была построена калибровочная кривая зависимости IgM (десятичный логарифм молекулярной массы белка) от пройденного ими расстояния в геле (Rf) [11].

Исходя из данных построенного графика мы определили, что молекулярные массы индуцированных белков примерно составляют: белки общие для радиационного и теплового воздействия 195; 182; 180,9; 179,9 Кд; специфичные только для радиационного воздействия 171,8; 164,1; 162,2 Кд; и только для теплового воздействия 192,7 Кд.

Полученные нами результаты по обнаружению формирования новых белковых структур вполне согласуются с данными по идентификации и характеристике плейотропических белков экспрессируемого ответа, которые активируются при X-облучении в клетках человеческой меланомы [12]. D.A. Boothman et. al. [12] обнаружили, что X-облучение вызывает экспрессию 8 полипептидов. При этом молекулярные массы этих белков, как и в нашем случае, лежат в пределах 126–275 Кд.

Таким образом, перемещающийся фактор адаптивного ответа, индуцируемый малыми дозами радиации и температуры, вероятно, представляет собой совокупность обнаруженных белков.

Биологические эффекты, наблюдавшиеся в области малых доз различных генотоксикантов,

являются результатом сложной цепи событий, реализующихся посредством ферментативных механизмов, обеспечивающих устойчивость живых систем и возможность их адаптации к изменяющимся условиям внешней среды.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Rossman T.G. and Klein C.B. Mammalian SOS system: a case of misplaced analogies // Cancer Invest. 3: 175-187. 1985.
2. Kartasova T., Ponec M., and van de Putte P. Induction of proteins and mRNAs after UV irradiation of human epidermal keratinocytes. Exp. Cell Res. 174: 421-423. 1988.
3. Fornace A. J., Jr. Alamo I., Jr. and Hollander M. C. DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8800-8804, 1988.
4. Schorpp M., Mallick U., Rahmsdorf H. J., and Herrlich P. UV-induced extracellular factor from human fibroblasts communicates the UV response to nonirradiated cells. Cell, 37: 861-868, 1984.
5. Angel P., Imagawa M., Chiu R., Stein B., Imbra R. J., Raamsdorf X. J., Jonat C., Herrlich P., and Karin M. Phorbalester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated transacting factor. Cell, 49: 729-739, 1987.
6. Губицкая Е.Г., Синельщикова Т.А. Гипертермия повышает reparативный синтез ДНК, индуцированный 4-нитрохинолин-1-оксидом, в фибробластах человека // Тез. докл. секции "Человек и биосфера". Киев, 1988. С.107.
7. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 277. P. 680-685.
8. Гааль Э., Медьеши Г., Верещаки Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. С. 3-120.
9. Sancaranarayanan K., Duyh A.V., Loos M.J., Natarajan A.T. Adaptive response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes of X-rays // Mutat. Res. 1989. V. 211. P. 7-12.
10. Kondrashova T., Ivanova T.I. Do quiescent peripheral lymphocytes repair radiation-induced chromosome damage ??// Radiat.Res. 2000. V.153/ N1 P.122-124.
11. Остертман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультра-центрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. С. 212-367.
12. Boothman D.A., Bourvard I., Hughes E.N. Identification and characterization of X-ray-induced proteins in human cells // Cancer Res. 1989 N49. P.2871-2878.

## Резюме

Радиацияның аз мөлшері мен *in vitro* жылу шогының есепінен түзілетін бейімделу жауапты зерттеу барысында қан плазмасындағы ақуызды бөліп алу электро-форездік әдіспен жүргізілді, нәтижесінде ақуыздың жаңа аймақтары түзіліп және бақылау плазмасындағы кейбір ақуыздардың экспрессиясы үлкейтіндігі көрсетілді. Әртүрлі концентрациядағы ПАГ электрофореграммасының анализі 7 г-инду-

цияланған полипептидтерге жіктелетін көрсетті, бұл жерде олардың молекулалық салмақтары 162-195 kDa аралығында болады.  $\gamma$ -радиация және аз мөлперлі гипертермия әсерінен индукияланатын ақуыздардың салыстырмалы анализі радиацияға және жылу әсерлеріне тән өнімнің бар екенін; жалпы радиацияға және жылу әсерлеріне тән және спецификалық тек радиация мен тек жылу әсерлері үшін екенін көрсетті. Сонымен, бейімделу жауаптың «қошпелі факторы» аз мөлшердегі мутагендік факторлардың бейімделу әсерінен клеткадан болінетін бірнеше ақуыздардың қауымдастыры болып табылады.

### Summary

The in vitro study of forming by low doses radiation and heat shock adaptive response carry out by electrophoretic separation of blood plasma proteins. Experimental results

demonstrated that in vitro exposure to low doses of radiation and hyperthermia on peripheral blood lymphocytes new protein zones are formed. And it was revealed that expression of some proteins presented in control blood samples is increased. Analysis of PAAG electrophoregramms of different concentrations allowed identifying 7  $\gamma$ -induced polypeptides with molecular weight between 162-195 kDa. Comparative analysis of proteins induced by  $\gamma$ -radiation and hyperthermia demonstrated the presence of proteins common for radiation and heat influences and specific ones only to radiation and high temperature exposures. Thus we suggest that adaptive response “transmission factor”, probably, is an association of several proteins released from cells in response to the adaptive influence of mutagenic factors.