

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1997

УДК 612.345.08

В. Н. Бабичев, Н. С. Игнатъев, М. И. Балаболкин, К. К. Пивницкий

ГЕПОКСИЛИНЫ — АКТИВАТОРЫ АТФ-ЗАВИСЫХ K^+ -КАНАЛОВ β -КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИЭндокринологический научный центр (дир. — акад. РАМН¹ И. И. Дедов), Москва

Работа посвящена анализу состояния АТФ-зависимых K^+ -каналов β -клеток поджелудочной железы, функционально-ослабленных под влиянием стрептозотцина, и оценке их реакции на гепоксиллин HxB_3 . Авторы показали наличие высокоспецифичных ответных реакций со стороны исследуемых ионных каналов под влиянием глюкозы и гепоксиллина HxB_3 . Анализ динамики электрофизиологических процессов, протекающих в них, показал наличие существенных изменений в каналах, которые касались времени их закрытия, что приводило к более замедленной секреции инсулина начиная с момента воздействия глюкозы и гепоксиллина и до момента экзоцитоза кванта инсулина. В этих экспериментальных условиях гепоксиллин был

более активным в плане секретогенных свойств, чем глюкоза.

ATP-dependent K^+ channels of pancreatic β -cells functionally attenuated by streptozotocin and their reaction to hepoxylin HxB_3 are analyzed. Highly specific response of the above ionic channels to glucose and HxB_3 hepoxylin was observed. Analysis of the time course of electrophysiological processes in the channels showed appreciable changes in the time of their closure, which resulted in a slower secretion of insulin starting from the moment of glucose and hepoxylin exposure and till the moment of exocytosis of insulin quantum. Under experimental conditions hepoxylin was a more potent inductor of secretion than glucose.

Секреция инсулина из β -клеток поджелудочной железы, специфическим стимулятором которой являются глюкоза и продукты ее метаболизма, определяется состоянием АТФ-зависимых K^+ -каналов [1, 2, 4, 5, 7]. Глюкоза вызывает деполаризацию клеточной мембраны β -клеток за счет притока Ca^{2+} и его накопления в цитозольной фракции, вызывая тем самым запуск секреции инсулина. Аналогичным образом действуют и сульфаниламидные препараты, широко используемые в лечебной практике диабета II типа (инсулиннезависимого) [9, 10, 14–16].

Обнаружение нового класса соединений — гепоксилинов, являющихся продуктами метаболических превращений арахидоновой кислоты в островках Лангерганса, а также их способности к стимуляции секреции инсулина вызвало интерес у специалистов-эндокринологов с точки зрения их применения в клинической практике при лечении инсулиннезависимого диабета [6, 12, 13]. Однако в литературе практически отсутствуют данные, расширяющие механизм действия гепоксилинов.

Целью нашего исследования было оценить состояние АТФ-зависимых K^+ -каналов β -клеток поджелудочной железы и охарактеризовать их реакцию в ответ на введение гепоксиллина HxB_3 на интактных клетках и на клетках, частично пораженных под влиянием различных доз стрептозотцина.

Основным методом исследования в нашей работе был метод "пэтч-кламп", позволяющий

оценивать активность отдельных каналов в условиях регистрации от целой клетки [8, 11].

Материалы и методы

Работа проведена на культуре островковых клеток поджелудочной железы крыс. Выделение и культивирование клеток проводили по ранее описанному методу S. Mislser и соавт. [11]. Клетки высевали на 35-миллиметровые пластиковые чашки Петри со средой RPMI и выдерживали минимум 24 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 с целью прикрепления их ко дну. Перед началом электрофизиологических исследований в культуральную среду добавляли стрептозотцин в различных концентрациях (1, 2, 5 ммоль), растворенный в цитратном буфере. Этот препарат подавали в камеру с помощью локальной микроперфузии. Время воздействия составляло 30 мин, после чего проводили отмывание и дальнейшую инкубацию. В инкубате до и после воздействия стрептозотцина определяли концентрацию инсулина, что и было показателем степени поражения β -клеток. Для проведения электрофизиологических анализов культуральную среду меняли на изотонический раствор, который содержал 140 мМ NaCl, 1 мМ $CaCl_2$, 2 мМ $MgCl_2$, 2,8 мМ KCl, 10 мМ HEPES pH 7,4. Стеклопипетки заполняли изотоническим раствором, имитирующим состав цитоплазмы: 140 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 3 мМ MEGTA, 0,5 мМ $CaCl_2$, 2 мМ $MgCl_2$ pH 7,4. Пипетки имели сопротивление около 5 МОм и подсоединялись к усилителю EPC-5 ("LIST Electronic", ФРГ). В эксперименте использовали только одиночные клетки. Интеграционные токи регистрировали с помощью усилителя, имеющего цепи компенсации емкостных переходных процессов. Ионные токи регистрировали на

¹ Авторы благодарят канд. хим. наук Л. Л. Васильеву за предоставленный препарат гепоксиллин HxB_3 .

запоминающем осциллографе и магнитографе. В ходе опыта подсчитывали среднее число каналов, открытых в фиксированной части клеточной мембраны. Анализ кинетических процессов проводили с момента регистрации, когда был активен только 1 канал [8, 9]. После этого составляли гистограммы, которые отражали суммарный эффект действия того или иного препарата на функционирование отдельно анализируемого ионного канала. Идентификацию АТФ-зависимых K^+ -каналов проводили с помощью избирательной блокады других каналов Na^+ и Ca^{2+} тетрадоксидом и хлоридом кадмия. Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Исследуемый препарат — гепоксиллин — добавляли непосредственно во внеклеточный раствор. Всего было проанализировано 56 клеток, потенциал покоя которых в среднем составлял $59,8 \pm 1,7$ мВ.

Результаты и их обсуждение

1. Электрофизиологическая оценка состояния АТФ-чувствительных K^+ -каналов β -клеток, функционально ослабленных под влиянием стрептозотоцина.

В I серии исследований нами была проведена идентификация АТФ-чувствительных K^+ -каналов к глюкозе в фиксированных мембранах клеток. Каналы интактных клеток характеризовались устойчивой величиной потенциала покоя, который колебался в пределах 60—62 мВ. Популяция этих каналов закрывалась через 2—5 мин после начала перфузии клеток раствором, содержащим 5—10 мМ глюкозы. Закрывание каналов сопровождалось началом спайковой активности клеток, открывались же они вновь через 2—5 мин после отмывания глюкозы, и это повторное открытие совпадало с исчезновением спайковой активности. Каналы не проявляли значительных вариаций по своей величине потенциала покоя, максимальная величина которого была в пределах +100 мВ.

Аналогичные исследования на β -клетках, предварительно перфузируемых различными дозами стрептозотоцина, показали сниженную функцио-

нальную активность. Электрофизиологически это выражалось в снижении величины потенциала покоя на 10—25 мВ в зависимости от степени поражения. Наиболее демонстративными были изменения исследованных нами показателей после перфузии 2 мМ стрептозотоцина. Период закрытия каналов после воздействия на эти клетки раствора, содержащего 5—10 мМ глюкозы, задерживался и составлял 5—7 мин (в контроле 2—5 мин). Это приводило к удлинению латентного периода возникновения спайковой активности. Аналогичную картину наблюдали и после отмывания глюкозы: необходимо было 6—7 мин, чтобы вновь произошло открытие каналов и исчезла спайковая активность.

2. Функциональная оценка состояния АТФ-чувствительных K^+ -каналов β -клеток, частично пораженных стрептозотоцином, под воздействием гепоксиллина HxV_3

В таблице представлены полученные результаты исследований по анализу ряда электрофизиологических показателей состояния АТФ-зависимых K^+ -каналов интактных и функционально-ослабленных стрептозотоцином β -клеток после аппликации глюкозы и гепоксиллина. Наиболее типичной реакцией исследуемых каналов в этих экспериментальных условиях было их полное закрытие под влиянием испытуемых веществ. Однако в отличие от интактных клеток для достижения аналогичного эффекта необходимы были дозы в 2,5—3 раза выше. Процесс закрытия канала происходит значительно медленнее, чем в норме, достигая устойчивого состояния в течение 35—55 с, и длится такой эффект до 12—14 мин. Отмывание культуры восстанавливало активность этих каналов до исходного уровня, однако этот процесс шел очень инерционно.

Сравнительный анализ действия глюкозы и гепоксиллина показал, что гепоксиллин в концентрации 10 мМ способен стимулировать секрецию инсулина. Это подтверждается данными, свидетельствующими о более быстрых темпах закрытия каналов, и началом возникновения спайковой активности. Эти показатели обычно отражают депо-

Влияние глюкозы и гепоксиллина HxV_3 на некоторые электрофизиологические показатели АТФ-зависимых K^+ -каналов интактных β -клеток, а также β -клеток, функционально-ослабленных под воздействием стрептозотоцина (2 мМ)

Показатель	Глюкоза					Гепоксиллин HxV_3		
	0	3 мМ	0	3,2 мМ	отмывание	0	10 мМ	отмывание
Средняя продолжительность разряда (пачки), мс:								
интактные β -клетки	212	16,4	43	13,0	164	320	105	280
пораженные β -клетки	181	14,3	37,2	11,8	160	304	83	258
Средняя продолжительность интервала между пачками, мс:								
интактные β -клетки	29,1	221	78,0	520	60,0	30,8	860	160
пораженные β -клетки	23,2	192	54,0	470	38,2	24,9	610	104
Время открытия, мс:								
интактные β -клетки	1,90	1,50	1,60	1,50	1,60	1,78	1,51	1,59
пораженные β -клетки	1,80	1,17	0,95	1,32	1,69	1,50	1,31	1,40
Средняя продолжительность интервала в разряде, мс:								
интактные β -клетки	0,45	0,40	0,45	0,41	0,44	0,45	0,42	0,39
пораженные β -клетки	0,34	0,29	0,31	0,35	0,36	0,39	0,40	0,35

ляризацию клеточной мембраны и возникновение потенциала действия, вслед за которым происходит вход ионов кальция внутрь клетки; совместно со свободным кальцием в цитозоле они достигают необходимого уровня для активации экзоцитоза секреторных гранул инсулина.

В предыдущих исследованиях [1, 2] по расшифровке механизма действия сульфаниламидных препаратов как на интактных, так и на функционально-ослабленных β -клетках показано, что эти препараты оказывают специфическое действие на характер биоэлектрической активности АТФ-зависимых K^+ -каналов, точнее, на временный характер ее распределения. Обычно активность анализируемых нами каналов проявляется пачковыми разрядами стандартной амплитуды, чередующимися с паузами длительностью несколько секунд. Структура биоэлектрической активности АТФ-зависимых K^+ -каналов β -клеток со сниженной активностью не менялась. Добавление гепоксилена вызывало сокращение длительности разрядов с одновременным увеличением интервала между пачками. Аналогичный эффект наблюдали и после добавления глюкозы.

Детальный анализ динамики протекающих в ионном канале процессов, таких как средняя продолжительность закрытия канала в пачковом разряде, средняя продолжительность интервала в разряде, как наиболее типичных и информативных показателей при оценке действия стрептозотина, показал следующие результаты (см. таблицу). Добавление стрептозотина в дозе 2 мМ приводит к снижению средней продолжительности разряда на 15% от исходной, а продолжительность интервала между пачками сокращается на 29%. Снижаются продолжительность времени открытия на 4,5%, а также средняя продолжительность интервала в разряде на 25%. Эти данные свидетельствуют о том, что β -клетки в наших экспериментальных условиях, несмотря на снижение используемых нами электрофизиологических показателей, сохраняют свою функциональную активность. Об этом также свидетельствуют данные ответной реакции пораженных β -клеток на введение глюкозы. Так, добавление 3,2 мМ глюкозы сокращает время открытия канала на 8,8% от исходного, а средняя продолжительность интервала в разряде уменьшается на 8%. Средняя продолжительность разряда сокращается в 3 раза, а интервал между пачками увеличивается в 8 раз. Это свидетельствует о специфической ответной реакции функционально-ослабленных β -клеток на введение глюкозы, наиболее четко проявляющейся в сниженной способности каналов к открытию за счет сокращения длительности разрядов и увеличения продолжительности интервала между ними.

Аналогичные результаты получены нами в опытах с аппликацией гепоксилена. Добавление 10 мМ гепоксилена к β -клетке, частично пораженной стрептозотином, вызывало снижение показателей возможности открытия канала на 25–28%, время открытия уменьшалось на 13–15%, средняя продолжительность разряда сокращалась в 3,5 раза, а продолжительность межимпульсных интервалов увеличивалась в 2,5 раза.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что АТФ-зависимые K^+ -каналы β -клеток после воздействия стрептозотина сохраняют в основном свои функциональные свойства и способны адекватно реагировать на специфические раздражители, какими являются глюкоза и гепоксиллин. Следует обратить внимание на факт более медленного закрытия АТФ-зависимых K^+ -каналов и тем самым увеличения латентного периода секреции инсулина начиная с момента воздействия глюкозы и гепоксилена до экзоцитоза кванта инсулина. Процесс приобретает более инерционный характер. В этом случае нельзя исключить нарушения внутриклеточного метаболизма β -клеток, способных привести и к нарушениям их структуры. Хорошо известно, что добавление АТФ в культуру клеток быстро восстанавливает активность АТФ-чувствительных K^+ -каналов, которые являются стратегически важной точкой в реализации эффекта гепоксилена в системе стимул — секреция.

Вышеприведенные данные подтверждают также результаты, полученные В. П. Федотовым и соавт. [3], которые на изолированных культивируемых клетках аденогипофиза, островков Лангерганса и гепатоцитах крыс исследовали влияние эпимеров гепоксилена HxV_3 на секрецию пролактина, инсулина и альбумина соответственно. Показано, что оба эписома HxV_3 стимулируют секрецию инсулина в культуре островковых клеток и накопление иммунореактивного альбумина в среде культивируемых гепатоцитов. Отмечено ингибирующее действие HxV_3 в отношении пролактина. Инсулинотропное действие HxV_3 осуществляется при физиологических концентрациях глюкозы, а также в среде, не содержащей глюкозы, что может служить доказательством прямого действия гепоксиленов на секрецию инсулина, а ионные каналы являются ответственными за проявление прямого фармакологического действия на процессы электрогенеза, приводящие к секреции инсулина β -клетками. Весьма серьезным показателем, отмеченным нами, является то, что как глюкоза, так и гепоксиллин HxV_3 оказывают обратимое влияние на функционирование каналов. Наблюдаемые нами эффекты снимались после отмывания активного начала.

Вопрос, поставленный нами в изучении особенностей функционирования ионных каналов в β -клетках, частично ослабленных под влиянием стрептозотина, весьма актуален для специалистов-диабетологов при выборе препаратов для терапии конкретного больного диабетом II типа. Еще более актуальным следует считать вопрос о возможном использовании препаратов гепоксилена в чистом виде или в сочетании с введением глюкозы или сульфаниламидных препаратов для лечения больных диабетом II типа. Наши поисковые исследования в этом отношении создают благоприятный фон для серьезных клинических испытаний эффекта действия гепоксиленов.

Выводы

1. АТФ-зависимые K^+ -каналы β -клеток поджелудочной железы (как интактных, так и функцио-

нально-ослабленных под влиянием стрептозотацина) проявляют специфическую реакцию под действием глюкозы и гепоксисилина HxV_3 .

2. Гепоксисилин HxV_3 обладает свойством прямого влияния на функцию инсулинсекретирующих клеток через АТФ-зависимые K^+ -каналы β -клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабичев В. Н., Игнатъев Н. С., Балаболкин М. И. // Пробл. эндокринол. — 1993. — № 5. — С. 43–46.
2. Бабичев В. Н., Игнатъев Н. С., Балаболкин М. И. // Там же. — 1995. — № 5. — С. 28–30.
3. Федотов В. П., Садовникова Н. В., Гудовников В. И. и др. // Актуальные проблемы эндокринологии. — М., 1996. — С. 26.
4. Boyd A. E. // Diabetes. — 1988. — Vol. 37. — P. 847–850.
5. Cook D., Ikeuchi M. // Ibid. — 1989. — Vol. 38. — P. 416–421.
6. Dho S., Grinstein S., Corey E. J. et al. // Biochem. J. — 1990. — Vol. 266. — P. 63–68.

7. Dunne M. J., Jllot F. C., Peterson O. J. // Membr. Biol. — 1987. — Vol. 99. — P. 215–224.
8. Gillis K. D., Gee W. M., Hammond A. et al. // Amer. J. Physiol. — 1989. — Vol. 257. — P. 1118–1127.
9. Henguin J. C., Meissner H. P. // Biochem. Pharmacol. — 1982. — Vol. 31. — P. 1407–1415.
10. Loubatieres A. // The Diabetic Pancreas/Eds B. W. Wolk, E. Wellman. — London, 1977. — P. 489–515.
11. Misler S., Falke L., Gillis K. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1986. — Vol. 83. — P. 7119–7123.
12. Pace-Asciak C. R., Martin J. M. // Prostagland. Leucotr. Med. — 1984. — Vol. 16. — P. 173–180.
13. Pace-Asciak C. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1994. — Vol. 1215. — P. 1–8.
14. Rossman P., Trube G. Potassium Channels: Structure, Classification and Therapeutic Potential./Ed. N. S. Cook. — Chichester, 1990. — P. 96–116.
15. Rossman P., Berggren P. O., Bokvist K., Efendic S. News physiol. Sci. — 1990. — Vol. 5. — P. 143–147.
16. Tabcharami J. A., Misler S. // Biochim. biophys. Acta. — 1989. — Vol. 982. — P. 62–72.

Поступила 05.12.96

© Н. П. ГОНЧАРОВ, В. Ю. БУТНЕВ, 1997

УДК 612.43:577.175.829].08

Н. П. Гончаров, В. Ю. Бутнев

ФУНКЦИЯ СИСТЕМ ГИПОФИЗ—ГОНАДЫ, ГИПОФИЗ—КОРА НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ МНОГОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ ГОНАДОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ-ГОРМОНА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Лаборатория биохимической эндокринологии и гормонального анализа (руководитель — проф. Н. П. Гончаров) Эндокринологического научного центра (дир. — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва; Приматологический центр, Сухуми

Изучено влияние многократного введения гонадотропин-релизинг-гормона (люлиберина, ЛГ-РГ) на функциональную активность систем гипофиз—гонады, гипофиз—кора надпочечников у неполовозрелых самцов павианов гамадрилов разного возраста. В крови обезьян на фоне 6-кратного (через день) введения ЛГ-РГ радиоиммунологическими методами было определено содержание тестостерона, дигидротестостерона, кортизола, 11-дезоксикортизола и лютеинизирующего гормона. Установлено снижение стимулирующего влияния люлиберина (при его повторном введении) на уровень лютеинизирующего гормона у самцов павианов гамадрилов в возрасте 1 года. При этом сопутствующее повышение уровня тестостерона не обнаруживало тенденции к снижению стимулирующего влияния ЛГ-РГ. Введение ЛГ-РГ не изменяло содержания кортизола в крови животных в возрасте 2 лет, но приводило к повышению его уровня у обезьян в возрасте 1 года. Повторное введение ЛГ-РГ неполовозрелым самцам павианов гамадрилов приводило к изменению надпочечникового стероидогенеза, что выражалось в снижении содержания в крови

кортикостерона, 11-дезоксикортизола и дигидротестостерона.

The effect of repeated injections of gonadotropin releasing factor (LH-RF) on the functional activity of the pituitary-gonadal and pituitary-adrenal systems of young *Papio hamadrias* of different age was investigated. Blood levels of testosterone, dihydrotestosterone, hydrocortisone, 11-deoxycortisone, and luteinizing hormone were radioimmunoassayed in monkeys over the course of LH-RF injections (six injections every other day). The stimulating effect of the factor on the level of luteinizing hormone decreased after its repeated injections to male monkeys aged under 1 year. The simultaneous increase of testosterone level did not tend to decrease the stimulating effect of LH-RF. Injections of LH-RF did not change the level of hydrocortisone in animals aged 2 years and increased it in monkeys aged 1 year. Repeated injections of LH-RF to young male *Papio hamadrias* changed the adrenal steroidogenesis, which manifested by a decrease in the blood levels of corticosterone, 11-deoxycortisone, and dihydrotestosterone.

Одним из актуальных направлений исследований современной биологии и медицины является эндокринология развития. Это обусловлено как важной ролью эндокринной системы в регуляции и координации различных процессов жизнедеятельности организма, так и постоянным увеличением числа патологий, ассоциированных с нарушением нормального процесса формирования эндокринных функций на ранних стадиях постнатального онтогенеза [5, 7, 9].

В последнее время в клинической эндокринологии широкая распространение получила гона-

дотропин-релизинг-гормон (люлиберин, ЛГ-РГ) и его многочисленные аналоги. Как диагностический препарат ЛГ-РГ применяется в исследовании гонадотропной функции гипофиза и локализации уровня поражения в системе гипоталамус—гипофиз—гонады [4, 10, 12]. Эти препараты используют для коррекции процесса полового созревания и лечения гипогонадотропного гипогонадизма [6, 15, 17, 19].

При использовании ЛГ-РГ и его аналогов в качестве лечебных препаратов особое значение приобретает способ их введения. Установлено, что