© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.379-008.64-092.9-02:615.31:547.495.2]-07

В. Н. Бабичев, Н. С. Игнатьев, М. И. Балаболкин

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АТФ-ЗАВИСИМЫХ K^+-КАНАЛОВ β-КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА И ИХ РЕАКЦИЯ НА ВВЕДЕНИЕ СУЛЬФОНИЛМОЧЕВИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Общепринятым является факт, что секреция инсулина из β-клеток поджелудочной железы, стимулируемая глюкозой и продуктами ее метаболизма, определяется состоянием АТФ-зависимых K^+-регулируемых каналов [2-4, 6, 7]. Эти каналы обладают свойством блокироваться гипогликемическими сульфаниламидными препаратами, которые используются для лечения диабета II типа (инсулиннезависимого). Каналы представляют собой класс мембранных белков, специализирующихся на высокоскоростном транспорте ионов. В данном случае речь идет о том, что по мере увеличения концентрации глюкозы в плазме одновременно происходит процесс деполяризации клеточной мембраны β-клеток за счет притока Ca^{2+} и его накопления в цитозольной фракции, что и приводит к запуску секреции инсулина. Предполагают, что инсулиннезависимый диабет есть результат нарушений работы АТФ-зависимых K^+-регулируемых каналов.

Задачей настоящего исследования было оценить состояние K^+-АТФ-регулируемых каналов β-клеток поджелудочной железы и охарактеризовать их реакцию в ответ на введение сульфаниламидных препаратов в условиях их частичного поражения под влиянием различных доз стрептозотоцина. Эту работу стало возможным провести только с внедрением техники регистрации активности отдельных каналов с помощью метода "пэтч-кламп", позволяющего точечно фиксировать потенциал на мембране в условиях регистрации от целой клетки [5-11].

Материалы и методы

Работа проводилась на культивируемых островковых клетках поджелудочной железы самцов беспородных крыс. Выделение и культивирование β-клеток проводилось по ранее описанному методу S. Misler и соавт. [8]. Клетки высевали на 35-миллиметровые пластиковые чашки Петри со средой RPMI и выдерживали минимум 24 ч при 37°С в атмосфере с 5% CO_2 в целях прикрепления их ко дну. Перед началом электрофизиологических исследований в культуральную среду добавляли стрептозотоцин в различных концентрациях (1, 2, 5 мМ), растворенный в цитратном буфере. Этот препарат подавали в камеру с помощью локальной микроперфузии. Время воздействия 30 мин. Затем клетки отмывали. В инкубационной среде до и после введения стрептозотоцина определяли концентрацию инсулина, что и было показателем степени поражения β-клеток. Для проведения электрофизиологических измерений 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). Стеклянные микропипетки заполняли изотоническим раствором, имитирующим состав цитоплазмы: 140 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 3 мМЕ GTA, 0,5 мкМ $CaCl_2$, 2 мМ $MgCl_2$ (pH 7,4). Пипетки имели сопротивление около 5 МОм и были подсоединены к усилителю EPC-5 ("List Electronic", Германия).

В эксперименте использовали только одиночные клетки. Интеграционные токи регистрировали с помощью усилителя, имеющего цепи компенсации емкостных переходных процессов. Ионные токи регистрировали на запоминающем осциллографе и магнитографе. В ходе опыта подсчитывали среднее число каналов, открытых в фиксированной части клеточной мембраны. Анализ кинетических процессов проводили, начиная с момента регистрации, когда был активен только один канал [5]. После этого составляли гистограммы, которые отражали суммарный эффект действия того или иного препарата на функционирование отдельно анализируемого ионного канала. Идентификация АТФ-зависимых K^+-каналов проводилась с помощью избирательной блокады других Na^+- и Ca^{2+}-каналов тетродотоксином и хлоридом кадмия соответственно. Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Исследуемые сульфаниламидные препараты — гликлазид, глибенкламид и глипизид — добавляли непосредственно во внеклеточный раствор. Всего было проанализировано 87 клеток, потенциал покоя которых в среднем составлял 61,2 ± 2 мВ.

Результаты и их обсуждение

Электрофизиологическая оценка состояния АТФ-чувствительных K^+-каналов β-клеток, функционально ослабленных под влиянием стрептозотоцина. В первой серии исследований нами была проведена идентификация K^+-АТФ-чувствительных каналов к глюкозе в фиксированных мембранах клеток. Каналы интактных клеток характеризовались устойчивой величиной потенциала покоя, который находился в пределах 60-62 мВ. Популяция этих каналов закрывалась через 2-5 мин после начала перфузии клеток раствором, содержащим 5-10 мМ глюкозы. Закрытие 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 больших вариаций по величине потенциала покоя и максимальная их величина была в пределах +100 мВ.

Аналогичные исследования, проведенные на клетках, предварительно перфузируемых различными дозами стрептозотоцина, показали сниженную их функциональную активность. Электрофизиологически это выражалось в снижении величины потенциала покоя на 10-25 мВ в зависимости от степени поражения. Наиболее демонстративными были изменения исследованных

Влияние глюкозы, глибенкламида, гликлазида и глипизида на некоторые электрофизиологические показатели K^+-АТФ-зависимых каналов интактных (I) и функционально ослабленных (II) под воздействием стрептозотоцина (2 мМ) β-клеток

Показатель	Глюкоза					Глибенкламид			Гликлазид		Глипизид	
	0	3 мМ	0	3,2 мМ	отмывание	0	10 мМ	отмывание	0	10 мМ	0	10 мМ
Средняя продолжительность разряда (пачки), мс:												
I	212	16,4	43	13,0	164	320	105	280	345	139	270	117
II	181	14,3	37,2	11,8	160	304	83	258	310	120	244	82
Средняя продолжительность интервала между пачками, мс:												
I	29,1	221	78,0	520	60,0	30,8	860	160	46,0	570	353	713
II	23,2	192	54,0	470	38,2	25,8	618	98	34,5	480	29,4	670
Время открытия, мс:												
I	1,90	1,50	1,60	1,50	1,60	1,80	1,55	1,60	1,88	1,63	1,75	1,45
II	1,81	1,19	0,98	1,34	1,70	1,54	1,32	1,41	1,68	1,43	1,42	1,23
Средняя продолжительность интервала в разряде, мс:												
I	0,47	0,40	0,45	0,41	0,44	0,46	0,42	0,39	0,50	0,50	0,45	0,40
II	0,35	0,29	0,31	0,30	0,36	0,38	0,39	0,34	0,42	0,40	0,43	0,38

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 (контроль 2-5 мин). Это приводило к увеличению 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.

Функциональная оценка состояния АТФ-чувствительных K^+-каналов β-клеток, частично пораженных под воздействием сульфонилмочевинных препаратов. В таблице представлены полученные нами результаты исследований по анализу ряда электрофизиологических показателей состояния K^+-АТФ-зависимых каналов интактных и функционально ослабленных β-клеток после аппликации глюкозы, глибенкламида, гликлазида и глипизида. Наиболее типичной реакцией исследуемых каналов в этих экспериментальных условиях было их полное закрытие под влиянием испытуемых препаратов. Однако в отличие от интактных клеток, когда концентрация применяемых препаратов для достижения эффекта колебалась от 1 до 20 мМ, для функционально ослабленных β-клеток необходимы были дозировки, превышающие вышеуказанные в 2,5-3 раза. Процесс закрытия канала наступает значительно медленнее, чем в норме, достигает устойчивого состояния в течение 40-50 с и длится до 14-15 мин. Отмывание клеток приводит к восстановлению активности этих каналов до исходного уровня, хотя этот процесс идет также весьма инерционно.

Сравнительный анализ действия тестируемых сульфонилмочевинных препаратов на функционально ослабленные клетки, как и в случае с интактными клетками, показал, что глибенкламид является наиболее активным препаратом по способности стимулировать секрецию инсулина. Это наглядно проявлялось в более быстрых темпах закрытия каналов и начале возникновения спайковой активности по сравнению с действием гликлазида и глипизида. Блокада же АТФ-зависимых K^+-каналов, приводя к деполяризации клеточной мембраны и возникновению потенциала действия, способствует вхождению ионов кальция внутрь клетки и совместно со свободным кальцием в цитозоле достигает необходимого уровня для активации экзоцитоза секреторных гранул инсулина.

В своих предыдущих исследованиях [1] на интактных β-клетках нами было показано, что анализируемые препараты оказывают специфическое действие на характер биоэлектрической активности АТФ-зависимых K^+-каналов, точнее, на временной характер ее распределения. Как правило, активность анализируемых каналов проявляется пачковыми разрядами стандартной амплитуды, чередующимися с паузами длительностью несколько секунд. Структура биоэлектрической активности АТФ-зависимых K^+-каналов β-клеток со сниженной активностью практически не менялась. Добавление любого из исследуемых препаратов вызывало сокращение длительности разрядов с одновременным увеличением интервала между пачками, такой же эффект наблюдался и после добавления глюкозы.

Детальный анализ динамики протекающих в ионном канале процессов, таких, как средняя продолжительность разрядов, время открытия канала, средняя продолжительность закрытия канала в пачковом разряде, средняя продолжительность интервала в разряде, как наиболее типичных и информативных показателей при оценке действия сульфаниламидных препаратов продемонстрировал, что все анализируемые показатели снижены по абсолютной величине, что свидетельствует о снижении функциональной активности каналов в наших экспериментальных условиях. Так, обработка β-клеток стрепозотоцином в дозе 2 мМ приводила к снижению средней продолжительности разряда на 14% от исходной, а интервал между пачками уменьшался на 29%. Продолжительность времени открытия снижалась на 5%, а средняя продолжительность интервала в разряде — на 25%. Эти данные свидетельствуют о том, что β-клетки в наших экспериментальных условиях сохраняют свою функциональную активность. Об этом также свидетельствуют данные ответной реакции пораженных β-клеток

на введение глюкозы. Например, добавление 3,2 мМ глюкозы сокращает время открытия канала на 9% от исходного, средняя продолжительность интервала в разряде уменьшается на 8%. Средняя продолжительность разряда сокращалась в 3 раза, а интервал между пачками увеличивался в 8 раз. Все это свидетельствует в пользу 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 были получены нами в опытах с аппликацией сульфаниламидных препаратов. Применение 10 мМ глибенкламида на β-клетки, частично пораженные стрептозотоцином, вызывало снижение вероятности открытия канала на 25-27%, время открытия уменьшалось на 13-14%, средняя продолжительность разряда сокращалась в 3,5 раза, продолжительность межимпульсных интервалов увеличивалась в 25 раз. Подобные результаты были отмечены нами и при применении гликлазида и глипизида.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что АТФ-зависимые K^+-каналы β-клеток, подвергнутых воздействию стрептозотоцина, сохраняют в основном свои функциональные свойства и способны адекватно реагировать на специфические раздражители, какими являются глюкоза и сульфаниламидные препараты. Следует обратить внимание на факт более медленного закрытия АТФ-зависимых K^+-каналов и удлинения тем самым латентного периода секреции инсулина, начиная от момента воздействия глюкозы или сульфонилмочевинных препаратов до момента экзоцитоза кванта инсулина. Процесс приобретает более инерционный характер. В этом случае нельзя исключить нарушения внутриклеточного метаболизма β-клеток, способного привести и к нарушениям их структуры. Хорошо известно, что добавление АТФ в культуру клеток очень быстро приводит к восстановлению активности K^+-АТФ-чувствительных каналов, которые являются стратегически важной точкой в реализации эффекта сульфонилмочевинных препаратов в цепи стимул — секреция. Эти каналы являются ответственными за проявление прямого фармакологического действия на процессы электрогенеза, приводящие к секреции инсулина β-клетками. Весьма серьезным фактом, отмеченным нами, является то, что как глюкоза, так и сульфаниламидные препараты оказывают обратимое влияние на функционирование каналов. Наблюдавшиеся нами эффекты восстанавливались после отмывания препарата.

Вопрос, поставленный нами в изучении особенностей функционирования ионных каналов в β-клетках, частично ослабленных под влиянием стрептозотоцина, весьма актуален для специалистов-диабетологов при выборе препарата для терапии конкретного больного диабетом II типа.

Выводы

1. АТФ-зависимые K^+-каналы β-клеток поджелудочной железы, функционально ослабленных под влиянием стрептозотоцина, проявляют специфическую реакцию под действием глюкозы и сульфаниламидных препаратов, направленную на инициацию секреции инсулина. В этих экспериментальных условиях процесс закрытия АТФ-зависимых K^+-каналов, характерный для начала процесса экзоцитоза инсулина, осуществляется значительно медленнее, чем у интактных β-клеток, что приводит к увеличению латентного периода секреции инсулина.

2. Глибенкламид проявляет наиболее активно свои секретогенные свойства на функционально ослабленных β-клетках по сравнению с глипизидом и гликлазидом.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабичев В. Н., Игнатьев Н. С., Балаболкин М. Н.* // Пробл. эндокринол. — 1993. — Т. 39, № 5. — С. 43-46.
2. *Boyd A. E.* // Diabetes. — 1988. — Vol. 37. — P. 847-450.
3. *Cook D., Ikeuchi M.* // Ibid. — 1989. — Vol. 38. — P. 416-421.
4. *Dunne M. J., Illot F. C., Peterson O. H.* // J. Membr. Biol. — 1987. — Vol. 99. — P. 215-224.
5. *Gillis K. D., Gee W. M., Hammond A.* et al. // Amer. J. Physiol. — 1989. — Vol. 257. — P. 1119-1127.
6. *Henguin J. C., Meissner H. P.* // Biochem. Pharmacol. — 1982. — Vol. 31. — P. 1407-1415.
7. *Loubatieres A.* The Diabetic Pancreas / Eds B. W. Wolk, E. Wellman. — London, 1977. — P. 489-515.
8. *Misler S., Falke L., Gillis K.* et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1986. — Vol. 83. — P. 7119-7123.
9. *Rorsman P., Trube G.* // Potassium Channels: Structure, Classification aqnd Therapeutic Potential / Ed. N. S. Cook. — Chichester, 1990. — P. 96-116.
10. *Rossman P., Berggren P. O., Bokvist K., Efendic S.* // News in physiol. Sci. — 1990. — Vol. 5. — P. 143-147.
11. *Tabcharani J. A.,. Misler S.* // Biochim. biophys. Acta. — 1989. — Vol. 982. — P. 62-72.

Поступила 16.02.95

V. N. Babichev, N. S. Ignatyev, M. I. Balabolkin — FUNCTIONAL ACTIVITY OF ATP-DEPENDENT K^+ CHANNELS OF PANCREATIC B CELLS IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS AND THEIR REACTION TO SULFONYLUREA AGENTS

Summary. Analysis of the status of ATP-dependent K^+ channels of pancreatic B cells functionally attenuated under the effect of streptozotocin and simultaneous assessment of their reaction to sulfonylamide agents glybenclamide, glipizid, and glyclazid showed highly specific response of the tested ionic channels under the effect of both glucose and sulfonylurea agents. Analysis of the time course of electrophysiological processes coursing in them showed appreciable changes in the time of the channel closing, which led to deceleration of insulin secretion starting from the moment of exposure to glucose or sulfonylurea agents till exocytosis of insulin quantum. Glybenclamide proved to be the most active of the tested agents as regards their secretogenic properties.