

ВЛИЯНИЕ СУЛЬФАНИЛАМИДОВ ВТОРОЙ ГЕНЕРАЦИИ НА АКТИВНОСТЬ АТФ-ЗАВИСИМЫХ K^+ -КАНАЛОВ β -КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Лаборатория физиологии эндокринной системы Эндокринологического научного центра РАМН, Москва

Работа посвящена анализу активности АТФ-зависимых K^+ -каналов интактных β -клеток поджелудочной железы, а также функционально ослабленных β -клеток под влиянием стрептозотцина с одновременной оценкой их реакции на сульфаниламидные препараты: глибенкламид, глипизид и гликлазид. Показано наличие специфических ответных реакций исследуемых ионных каналов под действием как глюкозы, так и сульфаниламидных препаратов. Анализ динамики электрофизиологических процессов в каналах показал наличие существенных изменений: уменьшение длительности разряда и удлинение интервала между разрядами, что приводит к более замедленному процессу секреции инсулина, начиная с момента воздействия глюкозы или сульфаниламидных препаратов до момента экзотозитоза кванта инсулина. В экспериментальных условиях наиболее активным из исследуемых нами препаратов в плане их секретогенных свойств был глибенкламид.

The activity of ATP-dependent K^+ channels of intact pancreatic β -cells and functionally weak β -cells after streptozotocin treatment is analyzed and the reaction of these channels to sulfonyl drugs (glybenclamide, glyipiside, and glyclazide) is evaluated. The ionic channels specifically reacted to glucose and sulfonyl drugs. Analysis of the time course of electrophysiological processes in the channels showed a shorter duration of a discharge and a longer interval between discharges, which decelerated insulin secretion starting from the moment of glucose or sulfonyl treatment till exocytosis of insulin quantum. Glybenclamide was the most effective of the tested drugs as regards secretory activity under experimental conditions.

Согласно современным представлениям, процесс секреции инсулина тесно связан с электрической активностью мембраны β -клеток поджелудочной железы [1—3, 15]. Механизм, с помощью которого происходит стимуляция освобождения инсулина, включает в себя метаболизм глюкозы в β -клетках, увеличение внутриклеточной концентрации АТФ и снижение калиевой проводимости за счет инактивации АТФ-зависимых калиевых каналов. Возникающая в результате деполяризация мембраны приводит к возникновению потенциалов действия. Вход ионов кальция внутрь β -клетки во время спайков вместе с выделением его из внутриклеточного депо приводит к увеличению концентрации свободного кальция в цитозоле до уровня, необходимого для активации экзотозитоза секреторных гранул [16]. Ввиду особой важной пусковой роли электрических процессов на мембране в сопряжении стимула и секреции функциональный дефект любого из каналов может приводить к нарушению секреторной реакции β -клетки, и многие исследователи склонны считать, что инсулиннезависимый диабет (ИНСД) является результатом нарушения работы АТФ-зависимых K^+ -каналов [4, 5, 10, 17, 21].

Целью настоящего исследования явилось изучение взаимосвязи электрофизиологических процессов, происходящих на мембране клетки под влиянием сульфаниламидных препаратов второй генерации, и стимулирующего действия этих секретогенов на выделение инсулина. Нами изучена активность АТФ-зависимых K^+ -каналов интактных β -клеток поджелудочной железы и β -клеток, частично пораженных различными дозами стрептозотцина, который избирательно связывается с β -клетками и постепенно снижает их способность секретировать инсулин. Также охарактеризована реакция β -клеток в ответ на введение сульфаниламидных препаратов второго поколения, которые являются более активными секретогенами инсулина и в настоящее время широко применяются в клинике [9, 12, 14].

Материалы и методы

Работа проведена на культуре островковых клеток поджелудочной железы. Выделение и культивирование β -клеток проводили по методу S. Moller [15]. 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 для прикрепления их ко дну. Перед началом электрофизиологических исследований в культуральную среду добавляли растворенный в цитратном буфере стрептозотцин в концентрациях 1, 2 и 5 мМ. Этот препарат, обладающий свойством специфически связываться с рецепторами на мембране β -клеток вплоть до их разрушения, подавали в камеру с помощью локальной микроперфузии. Затем клетки отмывали. В инкубационной среде до и после введения стрептозотцина определяли концентрацию инсулина, что и являлось показателем функциональных изменений способности β -клеток секретировать инсулин. Содержание иммунореактивного инсулина (ИРИ) в среде определяли с помощью наборов КИТ ("Cea-Ire-Sorin").

В работе использовали метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp) для регистрации токов от целой клетки и от фрагмента наружной поверхности клетки (конфигурация cell-attached). При проведении электрофизиологических исследований 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 раствором следующего состава: 140 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 3 мМ EGTA, 0,5 мМ $CaCl_2$, 2 мМ $MgCl_2$ (pH 7,4). Пипетки имели сопротивление около 5 МОм. Использовали усилитель EPC-5 ("List Electronic", Германия). При регистрации токов через одиночные каналы потенциал в пипетке поддерживали на уровне 0 мВ. Ионные токи регистрировали на запоминающем осциллографе и магнитографе с дальнейшей обработкой на компьютере. Анализ кинетики проводили только для тех участков записи, где был активен только 1 АТФ-зависимый K^+ -канал. Ток канала фильтровали при частоте 3 кГц и регистрировали с частотой сэмпа 20 000 точек/с в течение 3—5 мин.

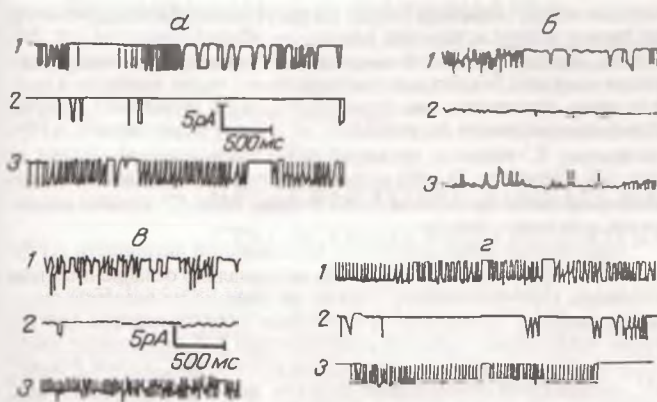
Полученные данные использовали для построения гистограмм открытого и закрытого состояний. Гистограммы открытого состояния хорошо аппроксимировались одной экспонентой и отражали время открытого состояния канала внутри пачки, тогда как гистограммы закрытого состояния описывались суммой нескольких экспонент. Мы считали, что меньшее время отражает время закрытого состояния внутри пачки, а большее время — время закрытого состояния между пачками. Длительность пачки в наших экспериментах определяли как сумму событий, разделенных закрытыми состояниями короче 3 мс. По этим данным определяли время жизни пачки.

Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Испытуемое вещество подавали в камеру с помощью локальной микроперфузии, используя пневматический микроинъектор. Кончик микропипетки располагался в 50 мкм от клетки. Сульфаниламидные препараты — глибенкламид, гликлазид и глипизид — были предоставлены фирмами "Servier", "Boehringer Mannheim", "Farmitalia Carlo Erba".

Было проанализировано 87 клеток, потенциал покоя которых в среднем составлял $61,2 \pm 2$ мВ.

Результаты и их обсуждение

Исследования, проведенные на интактных β -клетках поджелудочной железы, показали, что аппликация глюкозы, глибенкламида, гликлазида и глипизид в концентрации от 1 до 20 мМ, что соответствует терапевтическому уровню, вызывает существенное уменьшение активности АТФ-зависимых K^+ -каналов (см. рисунок и таблицу). Уменьшение активности канала наступает очень быстро, достигая устойчивого состояния в течение 30 с, и сохраняется в течение всего времени аппликации вещества (см. рисунок). После отмывания активность каналов быстро восстанавливается до исходного уровня. Следует отметить более мед-



Оригинальная запись работы одиночного АТФ-чувствительного K^+ -канала β -клеток поджелудочной железы.

а: 1 — в изотоническом растворе; 2 — влияние глюкозы в концентрации 3 мМ; 3 — отмывание глюкозы; б: 1 — в изотоническом растворе; 2 — добавление глибенкламида в концентрации 20 мМ; 3 — отмывание глибенкламида; в: 1 — в изотоническом растворе; 2 — добавление гликлазида в концентрации 20 мМ; 3 — отмывание гликлазида; г: 1 — в изотоническом растворе; 2 — добавление глипизида в концентрации 20 мМ; 3 — отмывание глипизида.

ленное начало действия глибенкламида на снижение активности одиночных каналов, а также более медленное восстановление ее после отмывания препарата, что в итоге обеспечивает более сильное влияние его как гипогликемического препарата по сравнению с глипизидом или гликлазидом. Обращает на себя внимание также тот факт, что проводимость отдельных каналов не изменялась под влиянием применяемых нами веществ. При добавлении любого из анализируемых нами препаратов величина потенциала покоя снижалась на 10–25 мВ, что способствовало возникновению потенциала действия. Проведенный нами сравнительный анализ эффекта глюкозы и сульфаниламидов показал их сходное влияние на активность АТФ-зависимых K^+ -каналов. В наших исследованиях было показано специфическое действие сульфаниламидных препаратов на характер активности АТФ-зависимых K^+ -каналов, а именно на временной характер ее распределения. Обычно активность этих каналов проявляется пачечными разрядами стандартной амплитуды, чередующимися с паузами, которые длятся несколько секунд. Добавление любого из исследуемых препаратов вызывало уменьшение длительности пачки одновременно с увеличением интервала между пачками (см. таблицу). Аналогичный эффект наблюдали и после добавления глюкозы. Сравнительный анализ действия глюкозы, глибенкламида, гликлазида и глипизида на кинетику АТФ-зависимых K^+ -каналов показал, что время жизни пачки снижалось ($p < 0,01$), время закрытого состояния каналов многократно увеличивалось ($p < 0,01$), время открытого состояния канала в пачковом разряде снижалось ($p < 0,05$), время закрытого состояния внутри пачки уменьшалось по сравнению с исходным ($p < 0,05$) (см. таблицу).

Показано, что добавление 3 мМ глюкозы (доза, наиболее часто встречающаяся в эксперименте) сокращает время жизни пачки более чем в 15 раз по сравнению с исходным, тогда как время закрытого состояния каналов увеличивалось на 76%, время открытого состояния внутри пачки сокращалось на 12%, а время закрытого состояния внутри пачки снижалось на 8%. Эти данные свидетельствуют о том, что уменьшение активности канала при действии глюкозы связано с сокращением длительности разрядов и увеличением продолжительности паузы между ними.

Аналогичные результаты были получены нами при введении глибенкламида, гликлазида и глипизида с небольшими вариациями. Из литературы известно, что вышеперечисленные препараты не влияют на другие каналы, обнаруженные в β -клетках [13, 19]. Применяемые нами препараты не вызывали значительных изменений кинетики, характеризующей работу канала в пачке, но увеличивали время между разрядами в несколько раз.

В свете полученных данных возникает вопрос об особенностях функционирования ионных каналов в β -клетках, полученных из островковой ткани животных с различной степенью повреждения поджелудочной железы и, следовательно, с разным количеством секретируемого инсулина. В нашей работе в культуре интактных островковых клеток концентрация инсулина в среде составляла $75 \pm 5,7$ мкЕД/мл, под влиянием глюкозы в концентрации 3 мМ уровень инсулина увеличился до $130 \pm 8,9$ мкЕД/мл, что свидетельствовало о функциональной активности этих клеток. Добавле-

ние стрептозотоцина в культуральную среду в концентрации 2 мМ снижало уровень инсулина до $27 \pm 3,1$ мкЕД/мл через 30 мин.

Исследования, проведенные на ослабленных β -клетках, показали, что АТФ-чувствительные K^+ -каналы этих клеток проявляли очень низкую функциональную активность.

Величина потенциала покоя оказалась сниженной на 10–25 мВ, и это снижение определялось степенью поражения β -клеток. Время закрытого состояния после воздействия на эти клетки глюкозы в концентрации 3 мМ увеличивалось и составляло 5–10 мин (в контроле эта величина составляла 2–5 мин). Удлинялся латентный период возникновения спайковой активности. Аналогичную картину наблюдали и после отмывания глюкозы — необходимо было 6–7 мин, чтобы вновь произошло открытие каналов и исчезла спайковая активность. В условиях воздействия глюкозы, глибенкламида, гликлазида и глипизида наиболее типичной реакцией исследуемых каналов было их полное закрытие. Однако в отличие от интактных клеток, когда концентрация применяемых препаратов для достижения эффекта колебалась от 1 до 20 мМ, для функционально ослабленных β -клеток необходимо было увеличить дозы препаратов в 2,5–3 раза. Уменьшение активности канала наступало значительно медленнее, чем в норме, достигая устойчивого состояния в течение 40–45 с, и длилось 14–15 мин. Отмывание клеток приводило к восстановлению активности этих каналов до исходного уровня, хотя этот процесс шел весьма инерционно.

Сравнительный анализ действия испытываемых нами сульфаниламидных препаратов на функционально ослабленные β -клетки, как и в случае с интактными β -клетками, показал, что глибенкламид является наиболее активным препаратом в плане стимуляции секреции инсулина. Наглядным подтверждением этого факта было более быстрое закрытие каналов, появление спайковой активности после воздействия глибенкламида по сравнению с действием гликлазида или глипизида.

Кинетические характеристики активности АТФ-зависимых K^+ -каналов функционально ослабленных β -клеток обычно не изменялись. Однако такие показатели, как время жизни пачки, время закрытого состояния между пачками, время открытого состояния внутри пачки, время закрытого состояния канала внутри пачки, при оценке действия сульфаниламидных препаратов были снижены по абсолютным величинам. Это свидетельствует о том, что в наших экспериментальных условиях ослабленные β -клетки, сохраняя свою специфическую ответную реакцию как на введение глюкозы, так и на аппликацию сульфаниламидных препаратов, тем не менее характеризуются более медленным закрытием АТФ-зависимых K^+ -каналов, а отмеченное удлинение латентного периода секреции инсулина — о том, что процесс приобретает более инерционный характер. Возможно, имеет место нарушение внутреннего метаболизма β -клеток, который является ответственным за проявление прямого фармакологического действия на процессы электрогенеза, приводящего к секреции инсулина β -клетками. Следует отметить также тот факт, что мы в своих исследованиях не показали прямое влияние стрептозотоцина на активность исследуемых нами ионных каналов. Это интересный момент в исследованиях, и мы планируем провести его изучение.

Известно, что добавление АТФ в культуру клеток очень быстро приводит к восстановлению активности АТФ-зависимых K^+ -каналов, которые являются стратегически важной точкой в реализации эффекта сульфаниламидных препаратов в цепи стимул—секреция [6, 7]. Эти каналы являются ответственными за проявление прямого фармакологического действия на процессы электрогенеза, приводящего к секреции инсулина β -клетками.

Исследование прямого действия ряда широко используемых в клинике гипогликемических сульфаниламидных препаратов на активность метаболически регулируемых АТФ-зависимых K^+ -ионных каналов плазматической мембраны β -клеток поджелудочной железы интактных животных показало, что действие глибенкламида, гликлазида и глипизида является специфическим и направлено главным образом на закрытие АТФ-зависимых K^+ -каналов. Эти результаты вносят свой вклад в изучение механизма действия сульфаниламидных препаратов, которые применяются при лечении диабета типа 2 [10, 13]. Особый интерес представляют собой данные литературы о том, что ни один из исследуемых сульфаниламидных препаратов не влияет на одиночные АТФ-независимые K^+ -каналы, которые также обнаружены в β -островковой ткани поджелудочной железы [11]. Таким образом, АТФ-зависимые K^+ -каналы являются стратегически важной точкой в реализации цепи стимул—секреция. Эти каналы ответственны за проявление прямого фармакологического действия на процессы электрогенеза, а также секрецию инсулина β -клетками. Наши данные вносят определенную ясность в вопрос о том, что секретогенный эффект сульфаниламидных пре-

Влияние глюкозы и сульфаниламидных препаратов на электрофизиологические показатели АТФ-зависимых K⁺-каналов интактных (I) и функционально ослабленных β-клеток под действием стрептозоцина (2 мМ, II)

Электрофизиологические показатели, мс	Серия опытов	Глюкоза			Глибенкламид			Гликламид			Глипизид		
		отмывание			отмывание			отмывание			отмывание		
		0	3 мМ	10 мМ	0	10 мМ	20 мМ	0	10 мМ	20 мМ	0	10 мМ	20 мМ
1	I	212 ± 19,1	16,4 ± 3,2	164,0 ± 12,0	320 ± 23,1	105,0 ± 9,2	280,0 ± 23,1	345,0 ± 27,1	139,0 ± 8,9	230,0 ± 13,2	270,0 ± 14,7	117,0 ± 6,9	235,0 ± 13,4
	II	181,0 ± 9,3	14,3 ± 0,9	160,0 ± 7,3	304,0 ± 17,4	83 ± 0,7	258,0 ± 12,7	310,0 ± 16,8	120,0 ± 6,8	218,0 ± 10,5	244,0 ± 11,8	82,0 ± 5,9	219,0 ± 11,8
2	I	29,1 ± 1,9	221,0 ± 15,9	60,0 ± 3,4	30,8 ± 2,0	860,0 ± 77,9	160,0 ± 14,7	46,0 ± 3,9	570,0 ± 60,1	53,5 ± 3,1	35,3 ± 2,4	713,0 ± 67,9	47,9 ± 3,1
	II	23,2 ± 1,6	192,0 ± 14,0	38,2 ± 2,3	25,8 ± 1,8	618,0 ± 59,7	98 ± 6,9	34,5 ± 2,7	480,0 ± 33,0	41,3 ± 2,6	29,4 ± 1,9	670,0 ± 60,2	38,9 ± 2,2
3	I	1,90 ± 0,17	1,50 ± 0,13	1,60 ± 0,22	1,80 ± 0,17	1,55 ± 0,06	1,60 ± 0,2	1,88 ± 0,18	1,63 ± 0,06	1,79 ± 0,11	1,75 ± 0,15	1,45 ± 0,09	1,63 ± 0,11
	II	1,81 ± 0,17	1,19 ± 0,11	1,70 ± 0,13	1,54 ± 0,06	1,32 ± 0,05	1,41 ± 0,02	1,68 ± 0,07	1,43 ± 0,06	1,72 ± 0,08	1,42 ± 0,11	1,23 ± 0,06	1,49 ± 0,08
4	I	0,48 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,44 ± 0,04	0,46 ± 0,2	0,42 ± 0,01	0,39 ± 0,04	0,56 ± 0,03	0,49 ± 0,02	0,48 ± 0,05	0,45 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,42 ± 0,02
	II	0,35 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,39 ± 0,03	0,34 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,43 ± 0,03	0,38 ± 0,01	0,42 ± 0,04

Примечание. В графе "Электрофизиологические показатели" обозначены: I — среднее время пачки (burst); 2 — среднее время закрытого состояния; 3 — время открытого состояния внутри пачки; 4 — среднее время закрытого состояния внутри пачки; p — интактные клетки, p₁ — функционально ослабленные клетки; n = 11 (число исследованных клеток).

паратов нельзя объяснить только их гипогликемическим действием на уровне печени вследствие изменения обмена гликогена [18, 20]. Идея о ведущей роли АТФ-зависимых K⁺-каналов в процессе секреции инсулина β-клетками подтверждается также данными о том, что такие препараты, как гидрохлортиазид и фуросемид, будучи сульфаниламидными диуретиками, не влияют на активность АТФ-зависимых K⁺-каналов, проявляя гипергликемический эффект in vivo [15]. Обращает на себя внимание и тот факт, что действие исследуемых нами препаратов на АТФ-зависимые K⁺-каналы аналогично действию глюкозы.

Полученные нами результаты исследований активности АТФ-зависимых K⁺-каналов β-клеток, функционально ослабленных под влиянием стрептозоцина, а также их реакция на введение сульфаниламидных препаратов представляют особый интерес для терапии конкретного больного диабетом типа 2. Наши данные являются оригинальными и подтверждены работой К. Cosgrove и соавт. [8], проведенной аналогичным образом, но на β-клетках, которые получены от больных диабетом типа 2, погибших от сердечной недостаточности. Авторы показали, что только 27% островковых клеток у больных людей имели АТФ-зависимые K⁺-каналы в отличие от здоровых лиц, у которых эти каналы выявлены во всех β-клетках. Более того, даже те клетки, которые имели АТФ-зависимые K⁺-каналы, не проявляли ответной реакции на введение нуклеотидов и толбутамида — стимуляторов секреции инсулина.

Изучая вопрос о точке приложения действия гипогликемических сульфаниламидных препаратов в сопоставлении с аналогичными эффектами некоторых нуклеотидов типа АТФ или АДФ, важно решить ряд вопросов, касающихся наличия мест связывания на уровне ионных каналов, их качественной и количественной оценки. Представляется интересным также изучение корреляционной зависимости между динамикой снижения количества инсулина, секретируемого β-клетками, и изменением электрофизиологических характеристик состояния активности АТФ-зависимых K⁺-каналов в динамике, что и будет предметом наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабичев В. Н., Игнатъев Н. С., Балаболкин М. И. // Пробл. эндокринол. — 1993. — Т. 39, № 5. — С. 43–46.
2. Бабичев В. Н., Игнатъев Н. С., Балаболкин М. И. // Там же. — 1995. — Т. 41, № 5. — С. 28–30.
3. Мартынова Е. Р., Серебряков В. Н., Ольшанская А. А. и др. // Биол. мембраны. — 1993. — Т. 10, № 5. — С. 509–518.
4. Ammal C., Cosgrove K., James R. F. L. et al. // Diabetologia. — 1997. — Vol. 40. — Suppl. 1. — P. A.6. — N 13.
5. Ashcroft F. M. // Annu. Rev. Neurosci. — 1988. — Vol. 11. — P. 97–118.
6. Cook N. S. // N. I. P. S. — 1988. — Vol. 9. — P. 21–28.
7. Cook D., Ikeuchi M. // Diabetes. — 1989. — Vol. 38. — P. 416–421.
8. Cosgrove K. E., Chapman J. C., Shepherd R. M. et al. // Diabetologia. — 1999. — Vol. 42. — Suppl. 1. — P. 65.
9. De Fronzo R. A., Goodman A. M. // N. Engl. J. Med. — 1995. — Vol. 333, N 9. — P. 541–549.
10. Dunnt M. J., Illot M. C., Petersen O. H. // J. Membr. Biol. — 1987. — Vol. 99. — P. 215–224.
11. Findlay J., Dunnt M. J., Petersen O. H. // Ibid. — 1986. — Vol. 83. — P. 169–175.
12. Gillis K. D., Gee W. M., Hammond A. et al. // Am. J. Physiol. — 1989. — Vol. 257. — P. 1119–1127.
13. Henguin J. C., Meissner H. P. // Biochem. Pharmacol. — 1982. — Vol. 31. — P. 1407–1415.
14. Loubatieres A. // The Diabetic Pancreas / Eds B. W. Wolr, K. E. Wellmann. — London, 1997. — P. 489–515.
15. Misler S., Falke L. C., Gillis K., McDaniel M. L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1986. — Vol. 83. — P. 7119–7123.
16. Petersen O. H., Findlay J. // Physiol. Rev. — 1987. — Vol. 67. — P. 1054–1116.
17. Restenbeck I., Dickel C., Winkel M., Grimmsmann T. // Diabetologia. — 1999. — Vol. 42. — Suppl. 1. — P. 130.
18. Rorsman P., Berggren P. O., Bokvist K., Efendie S. // News Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc. — 1990. — Vol. 5. — P. 143–147.
19. Schmid-Autarch H., de Weille J., Fosset M., Lazdunski M. // J. Biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — P. 15840–15844.
20. Tabcharani J. A., Misler S. // Biochim. Biophys. Acta. — 1989. — Vol. 982. — P. 62–72.
21. Westerlund J., Orsater H., Palm F. et al. // Diabetologia. — 1997. — Vol. 40. — Suppl. 1. — P. A.100. — N 389.

Поступила 21.09.01