

можный суммарный вклад гликопротеиновых гормонов в определяемый уровень свободной АС в сыворотке крови 7 женщин с нефункционирующими опухолями гипофиза был крайне незначителен.

Таким образом, можно заключить, что наличие у этих больных в сыворотке крови иммунореактивной АС является истинным и не зависит от секреции гипофизом гликопротеиновых гормонов.

Выводы

1. Сконструирована радиоиммунологическая тест-система для количественного определения свободной АС гликопротеиновых гормонов в сыворотке крови человека с чувствительностью 0,15 нг/мл.

2. С помощью разработанной тест-системы установлено отсутствие прямой корреляции между уровнем свободной АС и содержанием гликопротеиновых гормонов в сыворотке крови у обследованных женщин с различным эндокринным статусом, что свидетельствует, с одной стороны, о специфичности тест-системы, а с другой — подтверждает возможность независимой секреции гипофизом свободной АС в кровь.

3. Базальное содержание свободной АС в сыворотке крови практически здоровых людей находится на низком уровне: у женщин в возрасте 17–30 лет оно составляет в среднем 0,9 нг/мл.

4. Выявлено повышение уровня секреции свободной АС в крови у значительной части больных с нефункционирующими опухолями гипофиза, что указывает на диагностическое значение определения свободной АС в качестве маркера этих опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Assadian H., Shimatsu A., Koshiyama H. et al. // Acta endocr. (Kbh.). — 1990. — Vol. 122. — P. 729–734.
2. Hartree A.S., Renwick A.G.C. // Biochem. J. — 1992. — Vol. 287. — P. 665–679.
3. Oppenheim D.S., Kana A.R., Sangha J.S., Klibanski A. // J. clin. Endocr. Metab. — 1990. — Vol. 70, N 4. — P. 859–864.
4. Papkoff H., Samy T.S.A. // Biochim. biophys. Acta. — 1967. — Vol. 147. — P. 175–177.
5. Persani L., Beck-Peccoz P., Medri G. et al. // Neuroendocrinology. — 1991. — Vol. 53. — P. 411–415.
6. Sairam M.R., Li C.H. // Canad. J. Biochem. — 1977. — Vol. 55. — P. 747–752.

Поступила 06.06.94

A.A.Bulatov, A.G.Kiselyova, T.V.Gorshkova, N.B.Akopova — IMMUNOANALYSIS OF FREE α -SUBUNITS OF GLYCOPROTEIN HORMONES IN HUMAN BLOOD SERUM AND ITS RELATIONSHIPS WITH THE PITUITARY GLYCOPROTEIN HORMONES

S u m m a r y. A radioimmunoassay test system has been designed for measurements of free α -subunit (AS) of glycoprotein hormones in human blood serum with a sensitivity of 0.15 ng/ml. This test system revealed the absence of a direct correlation between the levels of free AS and levels of glycoprotein hormones in the blood sera of women with various endocrine profile, this being indicative of the specificity of this test system, on the one hand, and, on the other, confirming the possibility of independent secretion by the pituitary of free AS into the blood. Basal blood serum level of free AS in normal subjects is low: 0.9 ng/ml in women aged 17 to 30. The level of free AS secretion in the blood of many patients with nonfunctioning tumors of the pituitary was found increased, this demonstrating the diagnostic significance of measuring free AS as a marker of such tumors.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.547.551.525.211.1.1.015.44:616.37-018.1] 07

В. Н. Бабичев, М. П. Савельева, М. И. Балаболкин

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЦЕПТОРОВ β -КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, СВЯЗЫВАЮЩИХ СУЛЬФАНИЛАМИДНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Лаборатория физиологии эндокринной системы (зав. — проф. В.Н.Бабичев) Института экспериментальной эндокринологии (дир. — акад. РАМН И.Г.Акмаев) Эндокринологического научного центра (дир. — акад. РАМН И.И. Дедов), Москва

Сульфаниламидные препараты, являясь сильными гипогликемическими веществами, широко используются в лечении диабета II типа. Подобно глюкозе сульфаниламиды вызывают изменения электрической активности в β -клетках островков поджелудочной железы, конвенгируя главным образом на уровне АТФ-зависимых K^+ -каналов, не исключается их действие и на различные другие типы Ca^{2+} -чувствительных каналов.

Вместе с тем в последнее время на мембране β -клеток обнаружены и идентифицированы высокоспецифические рецепторы для сульфаниламидных препаратов. Большие возможности сульфаниламидных препаратов второй генерации связываются с их возможностью запускать выделение инсулина в наномолярных концентрациях за счет высокой степени их родства и прочного лигандно-рецепторного взаимодействия с рецепторными образованиями.

Имеющиеся в литературе данные по оценке связывающих способностей сульфаниламидных пре-

паратов с β -клетками весьма ограничены [2, 12]. В связи с этим нами была проведена работа по анализу рецепторного связывания глибенкламида, гликлазида и глипизиды с β -клетками.

Материалы и методы

Работа проводилась на культивируемых β -клетках поджелудочной железы. Выделение и культивирование β -клеток проводилось по методу S.Misler и соавт. [9]. Островки β -клеток, полученные после переваривания коллагеназой мелко изрезанной поджелудочной железы самцов крыс линии Спрей Даули, высевались небольшими группами и подвергались инкубации с ферментом dispase [8]. Клетки, полученные таким путем, увеличивали секреторную активность инсулина в 3 раза в среде, содержащей 10 мМ глюкозы. В дальнейшем эти клетки размещались в чашки Петри и культивировались в среде, содержащей 10% инактивированной сыворотки телят, 0,5% пенициллина и 0,5% стрептомицина в смеси 5% CO_2 /95% воздуха, в течение 1–10 дней при 37°C. Культивируемые клетки переносились механическим путем в среду, содержащую 140 мМ N-метилгликамид,

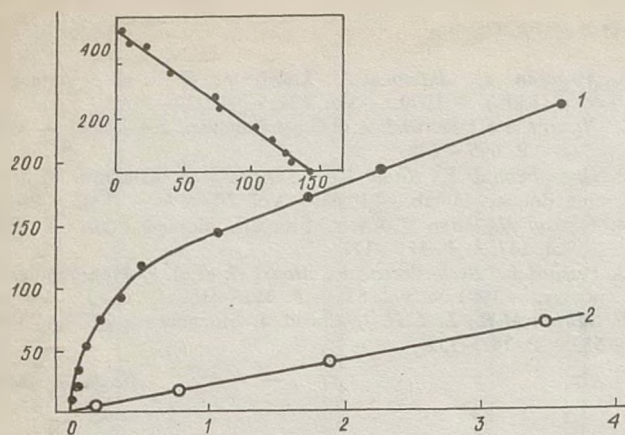


Рис. 1. Связывание ^3H -глибенкламида с микросомальной фракцией β -клеток в отсутствие (1) и в присутствии (2) 1 мкМ глибенкламида (А).

По оси ординат - концентрация связанного ^3H -глибенкламида (в фмолях на 1 мг белка); по оси абсцисс - концентрация свободного ^3H -глибенкламида (в нМ). Вверху график Скетчарда, подтверждающий связывание ^3H -глибенкламида. По оси ординат - отношение связанного ^3H -глибенкламида к свободному; по оси абсцисс - концентрация связанного ^3H -глибенкламида (в фмолях на 1 мг белка).

10 мМ КСl с добавлением буфера 20 мМ HEPES/NaOH при pH 7,5 и 37°C. Суспензию диссоциированных клеток использовали для определения связывания в среде, содержащей 140 мМ N-метилгликамида, 1,8 мМ Ca^{2+} , 0,8 мМ MgCl_2 , 10 мМ КСl в 20 мМ HEPES/трис-буфера при pH 7,5 и 4°C.

Использовали меченный ^3H глибенкламид со специфической радиоактивностью 26,4 Ки/ммоль. Для определения связывания суспензию β -клеток инкубировали при 4°C в растворе, содержащем ^3H -глибенкламид. Инкубация длилась 60 мин, после чего раствор фильтровался через фильтр jF/B (Whatman) с помощью вакуумного насоса. Фильтр промывали 100 мМ трис-HCl-буфером при pH 7,5 и -4°C. Неспецифическое связывание определяли с помощью добавления 1 мкМ немеченого глибенкламида.

Микросомальная фракция была получена из инкубированных β -клеток, промытых однократно на льду буфером, содержащим 0,3 М сахарозы, 40 мМ HEPES/NaOH, которые затем были пятикратно гомогенизированы. Суспензию из этих клеток осаждали в течение 10 с и центрифугировали при 70 000g в течение 25 мин. Готовая для работы микросомальная фракция получалась после осаждения буфером, содержащим 20 мМ HEPES/NaOH при pH 7,5. Определение связывания глибенкламида с микросомальной фракцией было аналогично таковому с суспензией β -клеток. Связывание H^3 -глибенкламида было пропорционально концентрации белка мембраны в пределах 0,2 и 1,2 мг/мл.

Результаты и их обсуждение

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что сульфаниламидные рецепторы были биохимически идентифицированы с помощью меченого ^3H глибенкламида. Глибенкламид проявил себя как сильный лиганд для выявления сульфаниламид-

ных рецепторов на β -клетках.

На рис. 1 и 2 представлены кривые, демонстрирующие связывание ^3H -глибенкламида с суспензией β -клеток, мембранами микросомальных фракций β -клеток, а также блокаду этого связывания некоторыми гипогликемическими препаратами сульфаниламидного ряда. Обращают на себя внимание высокие показатели специфического связывания, тогда как неспецифическое связывание составляло всего лишь 8% (см. рис. 1). Скетчардовские кривые специфического связывания свидетельствуют о высоком сродстве мест связывания с глибенкламидом ($K_d=0,3$ нМ), с максимальной связывающей способностью (B_{max}), равной 150 фмоль на 1 мг белка при 4°C. Специфическое связывание ^3H -глибенкламида с микросомальной фракцией β -клеток блокировалось высокими концентрациями немеченого глибенкламида, а также некоторыми другими сульфаниламидными препаратами. Наиболее активными из испытываемых нами гипогликемических препаратов, не считая глибенкламида, были глипизид и гликлазид.

Аналогичная последовательность по эффективности замещения ^3H -глибенкламида отмечена и в исследованиях авторов [12], которые использовали другие методы оценки действия гипогликемических препаратов. Применение иных препаратов, обладающих гипогликемическими свойствами, но не сульфаниламидного ряда, показало их неспособность влиять на связывание ^3H -глибенкламида с микросомами β -клеток. Это касается препарата под шифром HB699, который является фрагментом глибенкламида. Полученные ранее [1, 2] данные по анализу действия сульфаниламидных препаратов на K^+ -АТФ-чувствительные каналы β -клеток подтверждены в настоящей работе.

В работе на суспендированных клетках при анализе степени ингибции ^3H -глибенкламида использованными нами препаратами были получены аналогичные результаты. Эти вещества по степени активности располагались следующим образом: глибенкламид - глипизид - гликлазид.

Следует обратить также внимание на то, что связывание меченого глибенкламида интактными клетками было обратимо и, что очень важно, рецепторные места локализованы на стороне плазматической мембраны, число рецепторных мест составляло $\approx 5,120$ на клетку.

Хорошая корреляция между данными по анализу рецепторных мест, измеряемых с помощью ^3H -глибенкламида, и данными литературы по оценке возможности глибенкламида блокировать выход рубидия из β -клетки, который отражает состояние K^+ -АТФ-чувствительных каналов, свидетельствует о том,

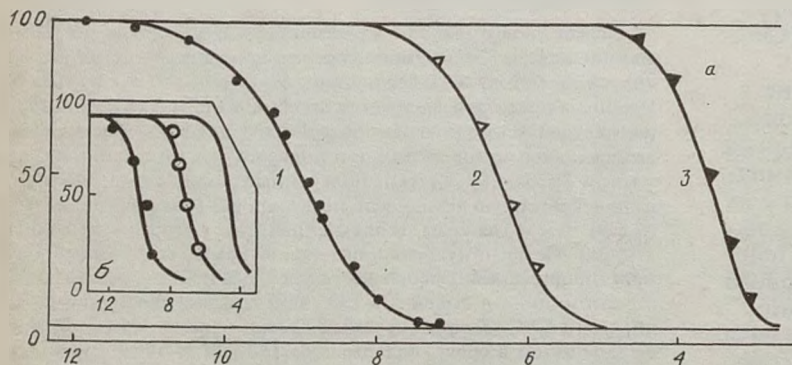


Рис. 2. Ингибирование гипогликемическими препаратами связывания ^3H -глибенкламида с микросомальной фракцией β -клеток (а) и суспензией β -клеток (б).

1 - глибенкламид, 2 - глипизид, 3 - гликлазид. По оси ординат - специфическое связывание ^3H -глибенкламида (в % от максимума); по оси абсцисс - $\log$ концентрации препаратов.

что сульфаниламидные рецепторы тесно связаны с K^+ -АТФ-чувствительными каналами [10, 11]. Нельзя исключить возможность использования 3H -глибенкламида при анализе молекулярных свойств K^+ -АТФ-чувствительных каналов не только на β -клетках поджелудочной железы, но и на сердечной и скелетных мышцах.

В настоящее время, когда молекулярные и клеточные механизмы выделения инсулина под влиянием сульфаниламидных препаратов в своей основе изучены, тем не менее дискутируется вопрос о том, что не являются ли сульфаниламидные рецепторы на β -клетках K^+ -АТФ-чувствительными каналами. Характер действия сульфаниламидных препаратов, а также глюкозы и ее метаболитов на K^+ -АТФ-чувствительные каналы позволяет предположить ведущую роль ионных каналов в передаче сигналов, которые несут эти вещества. В β -клетках насчитывается несколько типов ионных каналов: 3 вида калиевые, кальциевые и натриевые каналы, которые каждый по-своему вносят вклад в возбудимость клетки. Использование техники пэтч-кламп [7] в изучении функционального состояния различных ионных каналов, а также анализ степени прохождения сигнала через них подтверждают идею о том, что большая часть секретогенов инсулина, главным образом глюкоза и аминокислоты, должна метаболизироваться, чтобы вызвать выделение инсулина. Например, калиевые каналы закрываются под влиянием секретогенов инсулина, таких как глюкоза, манноза, глицеральдегид и лейцин [13, 14]. Добавление ингибиторов метаболизма, которые блокируют утилизацию отдельных субстратов, предотвращает ингибиторное действие на K^+ -каналы или вновь открывают K^+ -каналы, предварительно закрытые рядом секретогенов. K^+ -АТФ-чувствительные каналы блокируются сульфаниламидами в концентрациях, аналогичных тем, которые вызывают насыщение сульфаниламидных рецепторов. Сульфаниламидные препараты второй генерации, которые обладают большей активностью, чем секретогены инсулина, блокируют K^+ -АТФ-чувствительные каналы и запускают выделение инсулина с одновременным оттоком K^+ при низких наномолярных концентрациях.

Сопоставление данных о связывании сульфаниламидных препаратов с рецепторами β -клеток и показателями ингибирования K^+ -АТФ-чувствительных каналов, полученными с помощью различных методических подходов, с данными о механизме запуска секреции инсулина предполагает, что сульфаниламидные рецепторы являются K^+ -АТФ-чувствительными каналами. Такое предположение впервые было выдвинуто N. Sturgess и M. Ashford в 1985 г. [13].

Следует, однако, отметить, что секретогены из ряда сульфаниламидных препаратов, а также метаболиты глюкозы, блокируя K^+ -АТФ-чувствительные каналы, проявляют свое действие через различные локусы клетки. Если сульфаниламидные препараты действуют на внутреннюю сторону плазматической мембраны, то АТФ действует на цитоплазматическую поверхность мембраны [2]. Концепция рецептора как ионного канала не нова, так как показано, что Na^+ -канал в мышцах является никотин-ацетилхолиновым рецептором, а дигидропиридиновый рецептор — Ca^{2+} -каналом [2]. В обоих случаях специфические лиганды связываются с экстраклеточной частью канала [2].

Следует обратить внимание также на тот факт, что в механизме возникновения внутриклеточного сигнала значительная роль отводится АТФ и АДФ. Возможно, они выполняют двойную функцию — регулируют работу ионных каналов и являются донорами фосфата в реакции фосфорилирования [4, 15, 16]. Оба нуклеотида присутствуют в β -клетках в незначительных количествах. Так, концентрация АТФ в β -клетках составляет 3–5 мМ, необходимая же концентрация для блокады K^+ -каналов намного выше. АДФ меняет чувствительность каналов к АТФ. В связи с этим становится ясным факт снижения эффективности действия АТФ в проявлении ингибиторных свойств сульфаниламидных препаратов при блокаде K^+ -каналов. Глюкоза же очень быстро меняет отношение АТФ/АДФ в β -клетках в сторону его увеличения. Тем самым допускается идея о том, что энергетическое состояние β -клеток — определяющий фактор в механизме секреции инсулина, а также то, что сульфаниламидные препараты оказывают свое действие на те же места в клетке, что и глюкоза [5, 6].

Анализ собственных и литературных данных позволяет утверждать, что увеличение выделения инсулина под влиянием сульфаниламидов обеспечивается за счет связывания их с высокоспецифическими рецепторами на мембране плазмы клеток. Тесное взаимодействие рецепторов и сульфаниламидных препаратов, предотвращая выход K^+ и блокируя тем самым K^+ -АТФ-чувствительные каналы, запускает выделение инсулина. Кроме того, можно утверждать, что сульфаниламидные рецепторы β -клеток являются и ионными каналами, а точнее, K^+ -АТФ-чувствительными каналами.

Выводы

1. Обнаружены и охарактеризованы рецепторы сульфаниламидных препаратов (глибенкламида, глипизиды и гликлазида) на β -клетках поджелудочной железы.
2. Глибенкламид проявил себя наиболее активным из исследованных сульфаниламидных препаратов по показателю специфического связывания с рецепторами β -клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабичев В.Н., Игнатъев Н.С., Балаболкин М.И. // Пробл. эндокринол. — 1993. — № 5. — С. 43–46.
2. Boyd A. E. // Diabetes. — 1988. — Vol. 37. — P. 847–850.
3. Cook D., Ikeuchi M. // Ibid. — 1989. — Vol. 38. — P. 416–421.
4. Gaines K.L., Hamilton S., Boyd A.E. // J. biol. Chem. — 1988. — Vol. 263. — P. 2589–2592.
5. Gillis K.D., Gee W.M., Hammond A. et al. // J. Physiol. (Lond.) — 1989. — col. 257. — P. 1119–1127.
6. Grill V., Cerasi E. // J. clin. Invest. — 1978. — Vol. 61. — P. 1346–1354.
7. Hamill O.P., Marty A., Neher E. et al. // Pflüger's Arch. — 1981. — Bd 391. — S. 84–100.
8. McDaniel M.L., Colca J. R., Kotagal N., Lacy P.E. // Meth. Enzymol. — 1983. — Vol. 98. — P. 182–196.
9. Misler S., Falke L., Gillis K., McDaniel M.L. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1986. — Vol. 83. — P. 7119–7123.
10. Rosman P., Trube G. // Pflügers Arch. — 1984. — Bd 405. — S. 305–309.
11. Rossman P., Bergren P.O., Bokvist K., Efendic S. // New physiol. Sci. (NIPS). — 1990. — Vol. 5. — P. 143–147.
12. Schmid-Antomarchi H., Deweile J., Fosset M., Lazdunski M. // J. biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — P. 15840–15844.

13. Sturgess N.C., Ashford M.L.J. // Lancet. — 1985. — N 8453. — P. 474—475.
14. Trube G., Rorsman P., Ohno-Shasaku T. // Pflügers Arch. — 1986. — Bd 407. — S. 493—499.
15. Zuenkler B.J., Lenzen S., Manner K. et al. // Naunyn Schmiedesberg's Arch. Pharmacol. — 1988. — Bd 337. — S. 225—230.
16. Zuenkler B.J., Lins S., Ohno-Shasaku T. et al. // FEBS Lett. — 1988. — Vol. 239 — P. 241—244.

Поступила 08.06.94

V.N.Babichev, I.P.Savelyeva, M.I.Balabolkin — CHARACTERIZATION OF PANCREATIC B-CELL RECEPTORS BINDING SULFANILAMIDE DRUGS

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616. 432-008.6: 577.175.322]-02:546.41]-053 -092.9-07

В. Г. Селятицкая, Н. А. Пальчикова, С. В. Одинцов

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КРЫС, ПОЛУЧАВШИХ ПОВЫШЕННЫЕ КОЛИЧЕСТВА ЙОДА С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ

Лаборатория экспериментальной эндокринологии (зав. — канд. биол. наук В.Г.Селятицкая) Института общей патологии и экологии человека (дир. — акад. РАМН В.П.Казначеев) СО РАМН, Новосибирск

Дефицит йода в биосфере является причиной развития различных форм дисфункций щитовидной железы, одна из которых — эндемический зоб. Профилактические мероприятия, проводимые путем применения йодированной соли, резко снижают частоту проявления эндемического зоба, но имеют ряд сложностей [2]. В последние годы широкое распространение приобретает применение йодированного масла, после введения которого в первые недели экскреция йода с мочой резко повышается [3]. Эти данные, а также результаты длительного применения йодсодержащих фармакологических препаратов (амиодарона и др.) [8] ставят вопрос о функционировании щитовидной железы в условиях избыточного поступления этого микроэлемента в организм.

Особую актуальность в этом случае приобретают экспериментальные исследования по изучению чувствительности организма животных к различным концентрациям йода, однако подобного рода работы проводятся преимущественно за рубежом [14,15]. В настоящей работе изучали функциональное состояние щитовидной железы и коры надпочечников у крыс, получавших повышенные количества йода с питьевой водой.

Материалы и методы

Использовали крыс-самцов линии Вистар. Животных содержали в индивидуальных клетках на стандартном рационе вивария (30 г сухой массы корма в день, вода без ограничения).

Крыс разделили на 3 группы: 1-я, контрольная, группа — животные получали для питья водопроводную воду, остальным крысам в питьевую воду добавляли йодид калия из расчета 8 мг йода на 1 л воды (2-я группа) и 80 мг/л (3-я группа).

В 1 серии экспериментов животных декапитировали через 50 дней после начала эксперимента. Щитовидную железу гомогенизировали в 0,01 М фосфатном буфере рН 7,4; центрифугировали 20 мин при 2000g, в супернатантах определяли содержание тироксина (T_4), трийодтиронина (T_3) и тиреоглобулина (ТГ). Надпочечники гомогенизировали в 0,1 М фосфатном буфере рН

Summary. Analysis of pancreatic β -cell receptors binding the sulfanilamide drugs widely used in therapy of type II diabetes, such as glybenclamide, glibipizide, and glyclazide, showed that these drugs are characterized by excellent parameters of specific binding to these receptors. The receptors were tested for two parameters: number of bindings sites and dissociation constant. Glybenclamide was the most active of the drugs we tested, the other two agents being less active. Binding of these agents was reversible. The problem of identification of the examined receptors of sulfanilamides with K^+ -ATP-sensitive channels, similarly active conductors of the information transported by the sulfanilamide drugs in the mechanism of insulin secretion, is discussed.

7,4, центрифугировали 15 мин при 2000g, в супернатантах определяли содержание кортикостерона (В). В крови измеряли содержание T_4 , T_3 и В. При определении содержания гормонов использовали отечественные коммерческие наборы для радиоиммунологического анализа.

Во II серии экспериментов была введена дополнительная группа (4-я) животных, получавших питьевую воду с добавками йодида калия из расчета 800 мг на 1 л воды. В первые дни и через 12 нед после начала эксперимента у животных собирали суточную мочу, в которой определяли содержание йода и метаболитов йода. Животных забивали через 90 дней, измеряли те же параметры, что и в I серии экспериментов. Содержание йода в корме, в питьевой воде и моче крыс определяли кинетическим методом, в основу которого положена реакция восстановления четырехвалентного церия трехвалентным мышьяком, катализируемая неорганическим йодом (реакция Sandell — Kolthoff). На основе этого метода разработано несколько аналитических подходов, различающихся в основном способом подготовки проб к анализу на содержание йода [1]. Мы использовали подход, описанный в работе [5], в котором подобраны условия для озоления проб воды, кормов и т.д.

Результаты и их обсуждение

Определение содержания йода в корме, который получали животные всех групп, показало, что его поступление в сутки составило 2,4 мкг на животное. Содержание йода в водопроводной воде равнялось 5,12 нг/мл. Среднее потребление воды (около 10 мл в сутки) у животных всех групп не менялось в ходе эксперимента, отсюда потребление йода в сутки контрольными крысами составило около 2,45 мкг на животное. У животных экспериментальных групп поступление йода в организм определялось в основном добавками этого микроэлемента в питьевую воду и составило у крыс 2-й группы около 80 мкг, 3-й группы — 800 мкг и 4-й группы — 8000 мкг на животное в сутки. Экскреция неорганического йода с мочой у контрольных животных была $1,74 \pm 0,45$ мкг/сут, у животных 2-й группы — $46,09 \pm 7,22$ мкг/сут, 3-й группы — $424,94 \pm 95,03$ мкг/сут,