

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

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЦЕПТОРОВ β -КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, СВЯЗЫВАЮЩИХ СУЛЬФАНИЛАМИДНЫЕ ПРЕПАРАТЫ, ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

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

Идентификация высокоспецифических рецепторов для сульфаниламидных препаратов на мембране β -клеток [4, 14] наряду с наличием АТФ-зависимых K^+ -каналов, а также других каналов, в том числе и Ca^{2+} -чувствительных [12, 13], позволила исследователям расшифровать молекулярные основы механизма действия сульфаниламидных препаратов различной генерации, обладающих сильными гипогликемическими свойствами. В основе этих механизмов лежат высокая степень сродства и прочное лигандно-рецепторное взаимодействие этих препаратов с пептидными образованиями, расположенными на мембране β -клеток и дающими возможность стимулировать выделение инсулина.

Приведенные выше данные относятся к характеристике функционально-интактных β -клеток, в то время как клиницисты применяют сульфаниламидные препараты для лечения больных диабетом II типа, т. е. инсулиннезависимого, с частично пораженными β -клетками. Приоритетность данной работы состоит в том, что проведена оценка рецепторных свойств β -клеток, функционально ослабленных под влиянием различных доз стрептозотоцина. Аналогичных работ встретить в литературе нам не удалось.

Материалы и методы

Работа проведена на культивируемых β -клетках поджелудочной железы. Выделение и культивирование β -клеток осуществляли по методу [11]. Островки β -клеток, полученных после переваривания коллагеназой мелко изрезанной поджелудочной железы крыс-самцов линии Спрей Даули, высевали небольшими группами и инкубировали с ферментом dispase [10]. Клетки, полученные таким путем, увеличивали свою секреторную активность в 3 раза в среде, содержащей 10 мМ глюкозы. В дальнейшем эти клетки помещали в чашки Петри и культивировали 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 переносили механическим путем в среду, содержащую 140 мМ N-метилгликамида, 10 мМ KCl с добавлением 20 мМ буфера HEPES/NaOH (pH 7,5), при 37°C. Суспензию диссоциированных клеток использовали для определения связывания, применяя 140 мМ N-метилгликамида, 1,8 мМ Ca^{2+} , 0,8 мМ $MgCl_2$, 2,1 мМ KCl в 20 мМ HEPES-трис-буфере при pH 7,5 и 4°C.

В работе использовали 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 фильтровали через фильтр ватмановской бумаги JF/V с помощью вакуумного насоса. Фильтр промывали 100 мМ трис-HCl-буфером при pH 7,5 и 4°C. Неспецифическое связывание определяли с помощью 1 мкМ немеченого глибенкламида.

Связывание 3H -глибенкламида с микросомами

Микросомальную фракцию получали из инкубированных β -клеток, промытых однократно на льду буфером, содержащим 0,3 М сахарозы, 40 мМ HEPES/NaOH, которые затем были 5-кратно гомогенизированы. Суспензию из этих клеток осаждали в течение 10 с и центрифугировали при 70 000 г в

течение 25 мин. Готовую для работы микросомальную фракцию получали после осаждения буфером, содержащим 20 мМ HEPES/NaOH, при pH 7,5. Дальнейшая методика определения связывания микросомальной фракции с 3H -глибенкламидом была аналогична таковой для β -клеток. Связывание 3H -глибенкламида было пропорционально концентрации белка мембраны в пределах 0,2–1,2 мг/мл. Опыты повторяли дважды.

Частичное поражение β -клеток в экспериментах достигалось добавлением в культивируемую среду стрептозотоцина в различных концентрациях (1, 2 и 5 ммоль), растворенного в цитратном буфере. Этот препарат добавляли в чашку Петри с помощью локальной перфузии. Время воздействия составляло 30 мин, после чего проводили отмывание и дальнейшую инкубацию. В инкубате до и после воздействия стрептозотоцина определяли концентрацию инсулина, что и было показателем степени поражения β -клеток.

Результаты и их обсуждение

Предварительно проведенные нами исследования на интактных β -клетках поджелудочной железы показали высокую способность специфического связывания 3H -глибенкламида как с суспензией β -клеток, так и с мембранными микросомальными фракциями β -клеток, а также блокаду этого связывания рядом гипогликемических препаратов сульфаниламидного ряда [2]. Неспецифическое связывание составляло лишь 8% от общего связывания. В настоящем исследовании оригинальным является тот факт, что условия проведения эксперимента на функционально ослабленных β -клетках моделируют диабет II типа, для лечения которого в клинике весьма широко используются сульфаниламидные препараты.

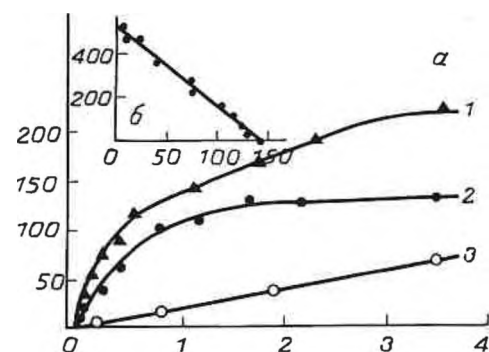


Рис. 1. Связывание 3H -глибенкламида с микросомальной фракцией β -клеток, функционально ослабленных под действием стрептозотоцина.

а — связывание 3H -глибенкламида. По оси абсцисс — концентрация свободного 3H -глибенкламида (в нМ); по оси ординат — концентрация связанного 3H -глибенкламида (в фмоль на 1 мг белка). 1 — общее связывание (в отсутствие немеченого глибенкламида); 2 — неспецифическое связывание (в присутствии немеченого глибенкламида); 3 — специфическое связывание; 6 — график Скетчарда для специфического связывания 3H -глибенкламида. По оси абсцисс — концентрация связанного 3H -глибенкламида (в фмоль на 1 мг белка); по оси ординат — отношение специфически связанного 3H -глибенкламида к свободному.

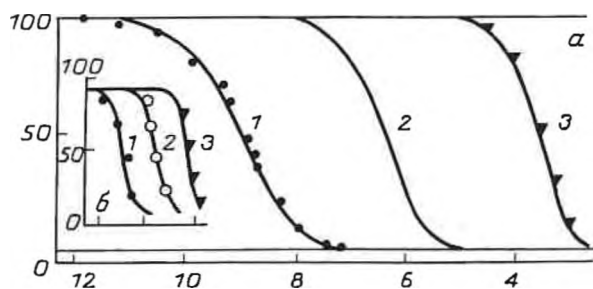


Рис. 2. Ингибирование гипогликемическими препаратами связывания ^3H -глибенкламида с микросомальной фракцией β -клеток (а) и суспензией β -клеток (б), функционально ослабленных под влиянием стрептозотоцина.

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

На рис. 1 и 2 представлены кривые, демонстрирующие связывание ^3H -глибенкламида с суспензией β -клеток и с мембранами микросомальной фракции ослабленных β -клеток, а также блокаду этого связывания некоторыми гипогликемическими препаратами сульфаниламидного ряда. Скэтчардовские кривые специфического связывания представляют собой вариант высокого сродства мест связывания с константой диссоциации ($K_d = 0,3 \text{ нМ}$), а максимальная связывающая способность, хотя и была достаточно высока (110—115 фмоль/мг белка при 4°C), оказалась значительно ниже, чем у интактных клеток. Специфическое связывание ^3H -глибенкламида с микросомальной фракцией β -клеток блокировалось значительно меньшими концентрациями немеченого глибенкламида, а также некоторыми другими сульфаниламидными препаратами (глипизид и гликлазид), чем это наблюдалось на интактных клетках. Применение в качестве контроля других препаратов, дающих гипогликемический эффект, но не относящихся к сульфаниламидам, показало их неспособность влиять на связывание ^3H -глибенкламида с микросомами β -клеток.

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

Следует обратить внимание на то, что связывание меченого глибенкламида пораженными клетками было обратимо, и, что очень важно, рецепторные места были локализованы на стороне плазматической мембраны и число их составляло $5,12 \pm 0,5$ на клетку.

Анализ полученных нами данных свидетельствует о том, что связывающие свойства β -клеток, функционально ослабленных под влиянием стрептозотоцина, при применении сульфаниламидных препаратов не изменяются. Возможно, что в наших экспериментальных условиях имеет место скорее снижение числа β -клеток, нежели такие специфические их свойства, как связывание с сульфаниламидными препаратами. Это требует доказательства другими методами, хотя в предыдущих наших исследованиях, касающихся элек-

трофизиологических оценок ионных каналов функционально-ослабленных β -клеток, имело место изменение их свойств под влиянием стрептозотоцина [1, 3]. В связи с этим представляет интерес обсудить вопрос о том, не являются ли сульфаниламидные рецепторы на β -клетках K^+ -АТФ-чувствительными каналами. Это предположение было впервые выдвинуто N. Sturgess и M. Ashford в 1985 г. [15]. Сопоставление данных о связывании сульфаниламидных препаратов с рецепторами β -клеток и показателями ингибирования K^+ -АТФ-чувствительных каналов, полученных с помощью различных методических приемов, с данными о механизме запуска секреции инсулина предполагает, что сульфаниламидные рецепторы являются K^+ -АТФ-чувствительными каналами. 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 — на цитоплазматическую поверхность мембраны [4]. 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 [4]. В обоих случаях специфические лиганды связываются с экстраклеточной частью канала [4, 9]. Специалисты обращают также внимание на тот факт, что в механизме возникновения внутриклеточного сигнала значительная роль отводится АТФ и АДФ [5, 16]. По-видимому, они выполняют двойную роль — регулируют работу ионных каналов и являются донорами фосфата в реакциях фосфорилирования [6, 17, 18]. Оба нуклеотида присутствуют в β -клетках в незначительных количествах: 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 очень быстро меняет отношение АТФ/АДФ в β -клетках в сторону его увеличения. Допускается мысль о том, что энергетическое состояние β -клеток является главным фактором в механизме секреции инсулина, а также то, что сульфаниламидные препараты оказывают действие на те же места в клетке, что и глюкоза [7, 8].

Собственные наблюдения и данные литературы позволяют утверждать, что увеличение выделения инсулина под влиянием сульфаниламидов обеспечивается за счет связывания их с высокоспецифическими рецепторами на мембране плазмы клеток. Состояние рецепторного аппарата, обеспечивающего взаимодействие сульфаниламидных препаратов и мембран β -клеток, функционально ослабленных под влиянием стрептозотоцина, существенно не отличается от рецепторного аппарата интактных β -клеток. Тесное взаимодействие рецепторов и сульфаниламидных пре-

паратов, предотвращая выход K^+ и блокируя тем самым K^+ -АТФ-чувствительные каналы, запускает выделение инсулина. Отсутствие принципиальных изменений в показателях, характеризующих связывающие свойства сульфаниламидных препаратов с мембранами пораженных β -клеток с одновременным изменением электрофизиологических параметров K^+ -АТФ-чувствительных каналов, позволяет высказать предположение об отсутствии идентичности между сульфаниламидными рецепторами β -клеток и ионными каналами.

Выводы

1. Выявлены и охарактеризованы рецепторы сульфаниламидных препаратов (глибенкламида, глипизид, гликлазида) на β -клетках, функционально ослабленных под влиянием стрептозотцина.

2. Связывающие свойства микросомальной фракции β -клеток и суспензии β -клеток, подвергнутых воздействию стрептозотцина, существенно не отличаются от таковых интактных β -клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабичев В. Н., Игнатъев Н. С., Балаболкин М. И. // Пробл. эндокринол. — 1993. — № 5. — С. 43—46.
2. Бабичев В. Н., Савельева М. П., Балаболкин М. И. // Там же. — 1994. — № 6. — С. 47—49.
3. Бабичев В. Н., Игнатъев Н. С., Балаболкин М. И. // Там же. — 1995. — № 5. — С. 28—30.
4. Boyd A. E. // Diabetes. — 1988. — Vol. 37. — P. 847—850.
5. Cook D., Ikeuchi M. // Ibid. — 1989. — Vol. 28. — P. 416—421.
6. Gaines K. L., Hamilton S., Boyd A. E. // J. biol. Chem. — 1988. — Vol. 263. — P. 2589—2592.

7. Gillis K. D., Gee W. M., Hammond A. et al. // J. Physiol. — 1989. — Vol. 257. — P. 1119—1127.
8. Grill V., Gerasi E. // J. clin. Invest. — 1978. — Vol. 61. — P. 1346—1354.
9. Hamill O. P., Marty A., Neher E. et al. // Pflüger's Arch. — 1981. — Bd 391. — S. 84—100.
10. Mc Daniel M. L., Colca J. R., Kotagal N., Lacy P. E. // Meth. Enzymol. — 1983. — Vol. 98. — P. 182—196.
11. Misler S., Falke L., Gillis K., Mc Daniel M. L. // Proc. natl. Acad. Sci. USA. — 1986. — Vol. 83. — P. 7119—7123.
12. Rosman P., Trube G. // Pflüger's Arch. — 1984. — Bd 405. — S. 305—309.
13. Rosman P., Bergren P. O., Bokvist K., Efendic S. // New physiol. Sci. — 1990. — Vol. 5. — P. 143—147.
14. Schmid-Antomarchi H., Deweile J., Fosset M., Lazdunski M. // J. biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — P. 15840—15844.
15. Sturgess N. C., Ashford M. L. J. // Lancet. — 1985. — N 8453. — P. 474—475.
16. Trube G., Rosman P., Ohno-Shasaku T. // Pflüger's Arch. — 1986. — Bd 407. — S. 493—499.
17. Zuenkler B. J., Lenzen S., Manner K. et al. // Arch. Pharmacol. — 1988. — Vol. 337. — P. 225—230.
18. Zuenkler B. J., Lins S., Ohno-Shasaku T. et al. // FEBS Lett. — 1988. — Vol. 239. — P. 241—244.

Поступила 22.03.96

V. N. Babichev, I. P. Savelyeva, M. I. Balabolkin — CHARACTERIZATION OF PANCREATIC β -CELL RECEPTORS BINDING SULFANILAMIDES UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

Summary. The receptor properties of pancreatic β -cells functionally attenuated under the effect of streptozotocin during therapy with sulfanilamides widely used in diabetes mellitus (glibenclamide, glipiside, and gliclaside) were studied. These drugs were shown to be characterized by high capacity to specifically bind to receptors, which virtually do not differ from those of intact β -cells. The receptors were characterized by two parameters: number of binding sites and dissociation constant. Glibenclamide has demonstrated high binding capacity. Binding of these agents was reversible. The authors do not identify the studied receptors of sulfanilamides with the K^+ -ATP channels which are also known as the active conductors of the information carried by sulfanilamides in the mechanism of insulin secretion.