

Дифференцированная чувствительность β - клеточных и экстрапанкреатических АТФ - зависимых К - каналов к гликлазиду

F.M. Gribble, F.M. Ashcroft

University Laboratory of Physiology, Oxford, UK

Препараты сульфанилмочевины, которые используются в лечении сахарного диабета 2 типа, стимулируют секрецию инсулина β -клетками, ингибируя АТФ-зависимые К-каналы (КАТФ-каналы). КАТФ-каналы найдены в других тканях, включая мышечные волокна сердца, поперечнополосатые и гладкомышечные волокна, а также нейроны, где они связаны с метаболическим состоянием клетки и ее электрической активностью. В β -клетках КАТФ-каналы регулируют мембранный потенциал, их активность зависит от клеточного метаболизма. Закрывание КАТФ-каналов в ответ на поступление глюкозы приводит к деполяризации клеточной мембраны; вслед за этим открываются Ca^{2+} каналы; Ca входит внутрь клетки, вызывая высвобождение инсулина [1].

КАТФ-канал представляет собой восьмимерный (4+4) комплекс, состоящий из субъединиц двух типов: частица, формирующая поры, Kir6.2 и регулируемый рецептор к препаратам сульфанилмочевины (SUR), который обеспечивает канал высокоаффинной чувствительностью к производному сульфанилмочевины [2-4]. Были идентифицированы два SUR-гена, один из которых кодирует β -клеточную изоформу рецептора (SUR1), другой — изоформы рецептора сердечной мышцы (SUR2A) и гладкомышечных волокон (SUR2B) [2,5,6]. Этим объясняется дифференцированная тканевая селективность к препаратам сульфанилмочевины. Толбутамид обладает высоким сродством и блокирует КАТФ-каналы в β -клетках, но оказывает незначительный эффект на сердечные каналы; глибенкламид обладает меньшей тканевой специфичностью, блокируя как β -клеточные, так и сердечные КАТФ-каналы [7,8]. В этой работе исследуется селективность гликлазида.

Материалы и методы

ДНК мышей (Kir6.2), (Genbank D50581; [3]), крыс (SUR1) (Genbank L40624; [2]), (SUR2A), (Genbank D83598; [5]), (SUR2B) (Genbank D86038; [6]) были клонированы в pBf векторе. Стволовая форма Kir6.2 (Kir6.2rC36), в которой отсутствовали 36 аминокислот со стороны С-окончания и которая формирует функциональные каналы в отсутствие SUR, приготовлена по S.Tucker с соавт. [4]. Матричные РНК приготовлены *in vitro* при помощи транскрипционного набора (Ambion, Austin, Tex., USA).

Ооциты набраны при помощи минилапаротомии из женской особи XENOPUS LAEVIS, анестезированной раствором MS222 (2 г/л на воде). Незрелые ооциты на V-VI стадии инкубировались в течение 60 мин. в растворе коллагеназы — 1,0 мг/мл (Sigma, тип V, Pool, UK) и затем дефолликулировались вручную. В ооциты

вводили либо 1 нг матричной РНК Kir6.2rC36, либо смесь из 0,1 нг матричной РНК Kir6.2 и 2 нг матричной РНК, кодирующей один из типов SUR. Конечный уровень инъекций составил 50 нл/ооцит. Изолированные ооциты помещали в раствор Барта и исследовали в течение 1-4 дней после инъекции [9].

Пипетки изготовлены из боросиликатного стекла и при наполнении раствором имели сопротивление 250-500 кОм. Макроскопический ток записывали с больших участков наружно-внутренней мембраны с потенциалом, поддерживаемым на уровне 0 мВ и при температуре 20-24 °C [9]. Изменение электрического потенциала вызывали повторяющимся 3-вольтным перепадом тока от -110 мВ до +100 мВ и записывали при помощи усилителя EPC7 (List Elektronik, Darmstadt, Germany).

Гликлазид был приготовлен как 0,1 ммоль/л КОН. Сразу после добавления препарата измеряли рН внутриклеточного раствора. Конечная концентрация $[\text{K}^+]$ после добавления гликлазида была равна 140 ммоль/л. Участки мембраны через определенные интервалы на протяжении эксперимента погружали в раствор Mg АТФ в концентрации 1 ммоль/л для восстановления потенциала в каналах.

Снижение проводимости вычисляли при проведении линии между проводимостью с электрическим потенциалом при -20 мВ и потенциалом при -100 мВ; рассчитано среднее значение пяти последовательных изменений потенциалов в каждом растворе. Данные представлены как среднее значение ± 1 SEM.

Кривая зависимости от дозы препарата рассчитывалась по формуле [9]:

$$G = x \cdot y, \quad (1)$$

где G — проводимость при действии гликлазида, G_c — проводимость в контрольном растворе,

x — термин, описывающий участок с высоким сродством, y — термин, описывающий участок с низким сродством.

$$x = L + \frac{1}{(1 + ([\text{Glic}]/K_{i1})^{h1})} \quad (2)$$

$$y = \frac{1}{(1 + ([\text{Glic}]/K_{i2})^{h2})}, \quad (3)$$

где $[\text{Glic}]$ — концентрация гликлазида; K_{i1} , K_{i2} — концентрация гликлазида, при которой ингибирование участков с высоким и низким сродством соответственно достигают значения, равного половине от максимального; $h1$, $h2$ — значения коэффициента Хилла для участков с высоким и низким сродством соответственно; L — проводимость, регистрируемая после того, как участки с высоким и низким сродством полностью заняты. В том случае, если имелся лишь один из двух участков, использовалась усеченная формула — $G/G_c = x$.

Результаты

Изменение электрического потенциала записывалось с участка наружно-внутренней мембраны ооцитов XENOPUS, на которых были экспрессированы комплексы Kir6.2 совместно с SUR1, или с SUR2A, или с SUR2B; во всех случаях изменения потенциалов во внутриклеточном пространстве были небольшими и значительно возрастали, когда исследуемый участок погружали в свободный от нуклеотидов раствор. Это соответствует мнению, что K_{ATP} -каналы блокируются в интактных ооцитах цитоплазматическими нуклеотидами. Гликлазид, наносимый на внутриклеточную поверхность мембраны в концентрации 10 мкмоль/л, блокировал потоки на Kir6.2-SUR1 в $61 \pm 4\%$ случаев ($n=8$), но оказывал небольшой эффект на потоки Kir6.2-SUR2A ($6 \pm 3\%$, $n=6$) и Kir6.2-SUR2B ($8 \pm 2\%$, $n=5$) (рис. 1, А1). Толбутамид ингибирует β -клеточные K_{ATP} -каналы на участке высокого сродства, расположенном на SUR1, и участке низкого сродства Kir6.2 [9]. Участок высокого сродства имеет концентрацию K_i , равную приблизительно 2 мкмоль/л, а когда полностью насыщается толбутидом (100 мкмоль/л), амплитуда потока снижается на 50%. Поток Kir6.2-SUR2A ингибируется толбутидом только на участке низкого сродства [8]. Мы изучали взаимосвязь между концентрацией гликлазида и K_{ATP} течением в каналах Kir6.2-SUR1 и Kir6.2-SUR2A (рис. 1, Б1). Точно так же, как и толбутамид, гликлазид ингибирует поток в Kir6.2-SUR1 на участке высокого сродства и на участке низкого сродства в концентрации K_{i1} 50 ± 7 нмоль/л ($n=8$) и $3,0 \pm 0,6$ ммоль/л ($n=4$) соответственно. Напротив, поток на Kir6.2-SUR2A ингибировался гликлазидом только на участке низкого сродства в концентрации K_{i2} $0,8 \pm 0,1$ ммоль/л ($n=5$).

Низкоаффинное ингибирование препаратами сульфанилмочевины комплексов Kir6.2-SUR1 и Kir6.2-SUR2A уже отмечалось на примере толбутида. Этот участок не относится к рецептору сульфанилмочевины, так как он обнаруживается и тогда, когда субъединица Kir6.2 (Kir6.2 Δ C36) экспрессируется в отсутствии SUR [8,9]. Для того чтобы определить, насколько низкоаффинная часть для гликлазида независима от SUR, мы исследовали эффект препарата на каналы Kir6.2 Δ C36. Гликлазид блокировал поток на Kir6.2 Δ C36 с низким сродством в концентрации K_i $2,7 \pm 0,3$ ммоль/л ($n=5$). Эти результаты позволяют предположить, что участок низкого сродства к гликлазиду находится непосредственно на Kir6.2 (рис. 1, Б2).

Установлено, что гликлазид блокирует K_{ATP} -каналы β -клеток (обладавая высоким сродством к ним), но не блокирует такие же каналы, расположенные в сердечной и гладкомышечной тканях. Участок высокого сродства к препаратам сульфо-

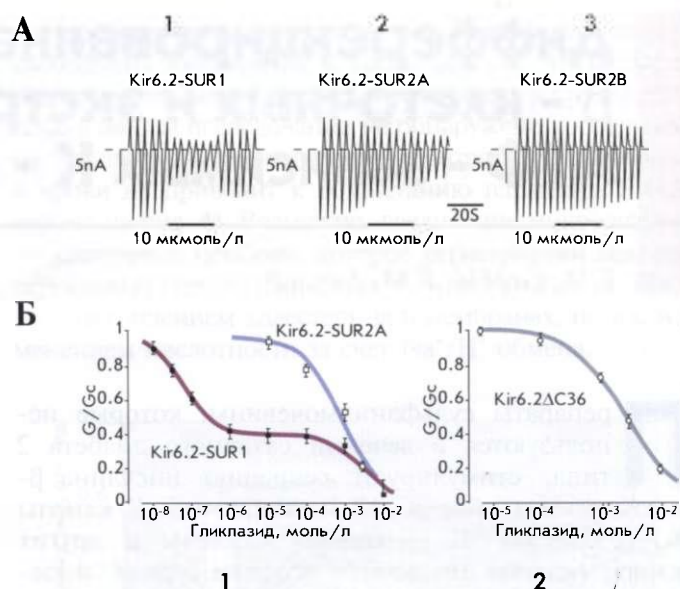


Рис. 1. Ингибирование гликлазидом K_{ATP} -потоков.

А. Запись изменения электрического потенциала на участке мембраны в ответ на перепад напряжения от -100 мВ до +100 мВ в экспрессированных на ооцитах комплексах Kir6.2-SUR1, Kir6.2-SUR2A и Kir6.2-SUR2B. Гликлазид (10 мкмоль/л), наносился в момент, указанный на рисунке вертикальным штрихом.

Б. Зависимость потоков на Kir6.2-SUR1 и Kir6.2-SUR2A (i), а также на Kir6.2 Δ C36 (ii) от дозы гликлазида. Электрическая проводимость при действии гликлазида (G) определялась как отношение к ее средней амплитуде в момент отсутствия препарата (G_0). Точка на графике отображает среднее значение, вертикальные штрихи — отклонение ± 1 . Данные, полученные на Kir6.2-SUR1 ($n=4-8$), обработаны по формуле для двух типов участков (формула 1): $K_{i1}=51$ нмоль/л, $h_1=1,0$, $K_{i2}=3,1$ ммоль/л, $h_2=1$, $L=0,40$. Данные, полученные на Kir6.2-SUR2A, рассчитывались по формуле для одного участка (формула 4): $K_{i1}=0,8$ ммоль/л, $h_1=0,9$, $L=0$. По той же формуле (формула 4) рассчитывались данные с комплекса Kir6.2 Δ C36 ($n=5$): $K_{i1}=2,7$ ммоль/л, $h_1=1,0$, $L=0$.

нилмочевины, расположенный на субъединице SUR1, примерно в 40 раз более чувствителен к гликлазиду, чем к толбутиду. Участок низкого сродства к данным препаратам обнаружен при исследовании электрического потенциала на Kir6.2-SUR1, Kir6.2-SUR2A и Kir6.2 Δ C36 и, вероятно, расположен на субъединице Kir6.2.

Изменение электрического потенциала в β -клеточных и кардиальных K_{ATP} -каналах в ответ на гликлазид сходно с обнаруженным ранее действием толбутида, который блокирует Kir6.2-SUR1 в участке высокого сродства и участке низкого сродства к препаратам сульфанилмочевины. Таким образом, принципиальная разница между двумя лекарственными препаратами заключается в большей чувстви-

тельности высокоаффинного участка на субъединице SUR1 к гликлазиду ($K_i \sim 50$ нмоль/л), чем к толбутамиду ($K_i \sim 2$ мкмоль/л). Так как единственным структурным отличием между этими двумя препаратами является наличие в молекуле гликлазида двойного азотного кольца (рис. 2), вероятно, именно эта группа вовлечена в процесс высокоаффинного связывания с SUR1.

Глибенкламид (рис. 2) демонстрирует высокоаффинное связывание с SUR1 ($K_i \sim 4$ нмоль/л; [2,8]), однако его ингибирующий эффект на K_{ATP} -поток отличается по двум параметрам от наблюдаемого при действии гликлазида. Во-первых, блокирование Kir6.2-SUR1 потоков при действии глибенкламида более необратимо, в то время как действие гликлазида быстро прекращается. Во-вторых, глибенкламид, но не гликлазид, блокирует кардиальный тип K_{ATP} -каналов с высоким сродством. Мы предположили ранее, что именно несulfонилмочевинная часть глибенкламида является причиной эффекта, оказываемого на кардиальные K_{ATP} -каналы, а также причиной необратимости воздействия на β -клеточные K_{ATP} -каналы. В данном исследовании мы предполагаем, что кольцо сульфанилмочевинного

окончания глибенкламида может содействовать высокой аффинности препарата.

Гликлазид и толбутамид блокируют потоки в Kir6.2AC36 в одинаковой концентрации Kir (2 ммоль/л и 3 ммоль/л соответственно), что позволяет предположить, что участок с низким сродством на Kir6.2 не чувствителен к структурным различиям препаратов. Полученные результаты позволяют предположить, что гликлазид в концентрации 1-25 мкмоль/л [10] будет селективно блокировать β -клеточные K_{ATP} -каналы и оказывать незначительное воздействие на кардиальные и гладкомышечные K_{ATP} -каналы.

Клиническое значение экстрапанкреатического действия препаратов сульфанилмочевинны остается спорным, с тех пор как их преимущества и отрицательные стороны были описаны в литературе. При учете возможных побочных эффектов сульфанилмочевинных препаратов очевидным становится тот факт, что они не могут рассматриваться как однородная группа, так как только некоторые из них воздействуют на экстрапанкреатические K_{ATP} . Понимание тканевой специфичности отдельных препаратов сульфанилмочевинны является решающим шагом в планировании дальнейших исследований в этой области.

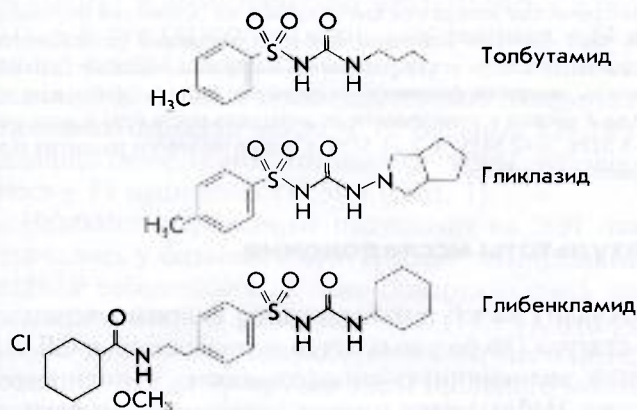


Рис. 2. Структурные формулы препаратов.

Литература

1. Ashcroft F.M., Rosmar P. (1989). *Prog. Biophys Mol Biol* 54: 87 - 143.
2. Aguilar-Bryan L., Nikols C.G., Wechsler S.W. et al. (1995). *Science* 268: 423 - 425.
3. Sakura H., Ammala C., Smith P.A., Gribble F.M., Ashcroft F.M. (1995). *FEBS Lett* 377: 338 - 344.
4. Tucker S.J., Gribble F.M., Zhao C., Trapp S., Ashcroft F.M. (1997). *Nature* 387: 179 - 183.
5. Inagaki N., Gonoi T., Clement J.P. et al. (1996). *Neuron* 16: 1011 - 1017.
6. Isomoto S., Kondo C., Yamada M. et al. (1996). *J Biol Chem* 271: 24321 - 24325.
7. Venkatesh N., Lamp S.T., Weiss J.N. (1991). *Circ. Res.* 69: 623 - 637.
8. Gribble F.M., Tucker S.J., Seino S., Ashcroft F.M. (1998). *Diabetes* 47: 1412 - 1418.
9. Gribble F.M., Tucker S.J., Ashcroft F.M. (1997). *J Physiol* 504.1: 35 - 45.
10. Palmer K.J., Brodgen R. (1993). *Drugs* 46: 92 - 125.