

На правах рукописи

КРЕМЕНО Светлана Владимировна

**ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И РЕГУЛЯЦИИ
Ca²⁺- АКТИВИРУЕМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ЭРИТРОЦИТОВ
У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА В СОЧЕТАНИИ С
АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ**

14.00.16 - патологическая физиология

03.00.13 - физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

ТОМСК – 2004

Работа выполнена в ГОУВПО “Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России” и ГУ НИИ кардиологии Томского научного центра Сибирского отделения РАМН

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корр. РАМН, Заслуженный
деятель науки РФ

Новицкий Вячеслав Викторович

доктор биологических наук, профессор

Петрова Ирина Викторовна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук

Степовая Елена Алексеевна

доктор биологических наук, профессор

Плеханов Геннадий Федорович

Ведущая организация:

Новосибирская государственная медицинская академия

Защита состоится «___» _____ 2004 г. в ___ час. на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г.Томск, Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, г.Томск, проспект Ленина, 107).

Автореферат разослан «___» _____ 2004 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы:

В настоящее время во всем мире наблюдается высокая распространенность заболеваний и метаболических нарушений, объединенных развитием состояния инсулинорезистентности [Reaven G.M., 1988; Baron A.D., Steinberg H.O., 1997; Kaplan N.M., 1989; Krauss R.M., 1998; Крапов Р.С., Дудко В.А., 1998; Алмазов В.А. и соавт., 1999]. К ним относят сахарный диабет 2 типа, артериальную гипертензию, ожирение, дислипидемию. Комплекс таких нарушений сопровождается изменениями со стороны многих органов и систем, в том числе наблюдается высокая частота атеросклеротических поражений сосудов сердца, периферических и церебральных сосудов, а также нарушений микроциркуляторного русла [Kaplan N.M., 1989; Panza J.A. et al., 1990; Денисенко Т.В., 1990; Deedwania P.C., 1998; Watts G.F., Playford D.A., 1998; Алмазов В.А. и соавт., 1999; Балаболкин М.И. и соавт., 2000; Reaven G.M., 2002]. Сердечно-сосудистые нарушения являются основной причиной высокой инвалидизации и смертности больных с синдромом инсулинорезистентности (метаболическим синдромом) и, в частности, больных сахарным диабетом 2 типа и артериальной гипертензией [Bierman E.L., 1992; Древаль А.В., 1995; Dart A.M., Jaye P.F., 1999; De Vriese A.S. et al., 2000].

В патогенезе сердечно-сосудистых осложнений сахарного диабета 2 типа немаловажную роль играют нарушения структуры и функции эритроцитов [McMillan D.E. et al., 1978; Schwartz R.S. et al., 1991; Alster Y. et al., 1998; Turchetti V. et al., 1998; Symeonidis A. et al., 2001]. Кроме того, эритроциты периферической крови традиционно служат моделью для оценки глубины повреждения мембран при патологическом процессе, протекающем в организме [Черницкий Е.А., Воробей А.В., 1981]. Нарушения структурно-функционального состояния мембраны эритроцитов могут рассматриваться как одно из звеньев патогенеза ряда заболеваний и, в частности, патогенеза сахарного диабета 2 типа и артериальной гипертензии.

Одним из важнейших нарушений при сахарном диабете является снижение деформируемости эритроцитов [McMillan D.E. et al., 1978; Fujita J. et al., 1996; Miossec P. et al., 1999], что часто связывают с повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция [Fujita J. et al., 1996]. В изменении деформируемости эритроцитов определенную роль играют Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы ($\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналы) этих клеток. Так, показано, что Ca^{2+} -индуцируемое снижение деформируемости эритроцитов устраняется при выравнивании градиента ионов калия [Dodson R.A. et al., 1987]. Данные о функционировании Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов при СД 2 типа и артериальной гипертензии немногочисленны.

Эритроциты способны изменять свой объем при отклонениях осмотического равновесия и газового состава плазмы крови [Gibson J.S. et al., 2000]. Изменение объема эритроцитов сопровождается структурными перестройками белков мембранного каркаса этих клеток [Черницкий Е.А., Воробей А.В., 1981, Hansen J.C. et al., 1996], что отражается на активности ионтранспортных систем клеток. Известно, что увеличение объема и сжатие эритроцитов человека приводит к подавлению опосредованной белками мембранного каркаса Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости [Орлов С.Н., Петрова И.В. и соавт., 1992]. При СД 2 типа вследствие гипергликемии

происходит усиление процессов гликозилирования белков мембранного каркаса эритроцитов, таких как спектрин, анкирин, белок полосы 4.2 [Schwartz R.S. et al., 1991], что в свою очередь может оказывать влияние на функционирование Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов.

Кроме того, имеются единичные сведения о регуляции $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов со стороны редокс-агентов (HS-глутатиона, НАДН и НАДФН) [Alvarez J. et al., 1984]. Однако механизмы управления калиевой проводимости редокс-агентами по-прежнему остаются неизученными. У больных сахарным диабетом 2 типа и артериальной гипертензией отмечается нарушение метаболизма редокс-агентов [Baynes J.W., 1991; De Mattia G. et al., 1998; Ланкин В.З., 2000], что может модифицировать работу Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов.

Цель исследования:

Изучить механизмы регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией.

Задачи исследования:

1. Установить характеристики калиевой проводимости мембраны эритроцитов, индуцированной кальциевым ионофором A23187 и редокс-агентами (искусственная электронно-донорная система аскорбат-феназинметосульфат), у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией.
2. Установить влияние осмолярности среды инкубации клеток на A23187- и редокс-индуцированную калиевую проницаемость мембраны эритроцитов у здоровых доноров и у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией.
3. Выяснить роль белков мембранного каркаса эритроцитов в регуляции Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости эритроцитов у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией.
4. Изучить влияние инсулина на калиевую проницаемость мембраны эритроцитов у здоровых доноров и у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией.
5. Изучить влияние антимицина А и модификаторов SH-групп на калиевую проницаемость мембраны эритроцитов здоровых доноров.

Научная новизна:

Впервые изучены характеристики Ca^{2+} -зависимой калиевой проводимости мембраны эритроцитов, индуцированной кальциевым ионофором A23187 и электронно-донорной системой аскорбат-феназинметосульфат, у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией.

Установлено, что в механизме реализации аскорбат-феназинметосульфат (редокс-) - индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов присутствует Ca^{2+} -зависимая и Ca^{2+} -независимая компонента.

Впервые показано, что у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией A23187- и редокс- индуцированная калиевая проницаемость мембраны эритроцитов не зависит от осмолярности среды инкубации эритроцитов. В то же время у здоровых доноров наблюдаются разнонаправленные изменения A23187- и редокс- индуцированной калиевой

проницаемости мембраны эритроцитов при увеличении объема и сжатии клеток.

Впервые установлено, что спектрин принимает участие в регуляции Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией.

Впервые показано, что инсулин снижает Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов у здоровых доноров и не оказывает эффекта на калиевую проницаемость мембраны эритроцитов у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией.

Впервые показано, что блокирование сульфгидрильных групп с помощью N-этилмалеимида приводит к подавлению A23187-индуцированной гиперполяризации мембраны эритроцитов здоровых доноров, а восстановление SH-групп с помощью 1,4-дитиозеритритола – к подавлению редокс-индуцированной гиперполяризации.

Научно-практическая значимость:

Результаты исследования носят фундаментальный характер и являются необходимыми для понимания механизмов нарушения функционирования эритроцитов при сахарном диабете 2 типа и артериальной гипертензии.

Кроме того, полученные результаты расширяют существующие представления о регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов в норме, что может быть использовано для раскрытия механизмов нарушения функционирования ионтранспортных систем эритроцитов при сахарном диабете 2 типа, артериальной гипертензии и других заболеваниях. Результаты работы могут быть также использованы для выяснения мембранотропных эффектов лекарственных препаратов, применяемых в клинике.

Областями применения полученных данных являются патологическая физиология, физиология и биофизика. Основные положения работы используются в курсе лекций и на практических занятиях, проводимых на кафедрах патологической физиологии и нормальной физиологии, а также на кафедре биофизики и функциональной диагностики ГОУВПО “Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России”.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией отмечается снижение Ca^{2+} -индуцированной калиевой проницаемости мембраны эритроцитов.
2. Калиевая проницаемость мембраны эритроцитов управляется двумя способами – Ca^{2+} -опосредованным путем и редокс-зависимым способом. Увеличение объема и сжатие эритроцитов здоровых доноров сопровождается разнонаправленными изменениями A23187- и редокс-индуцированной калиевой проницаемости мембраны этих клеток.
3. У больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией нарушена объем-зависимая регуляция Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов, связанная с белками мембранного каркаса.
4. Инсулин не оказывает влияния на Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией, но снижает ее у здоровых доноров.

Апробация работы:

Основные положения диссертационной работы доложены на 3 и 4 международных конгрессах молодых ученых и специалистов “Науки о человеке” (Томск, 2002-2003); 2 научной конференции “Актуальные вопросы биотехнологии” (Москва, 2001); VI международной конференции “Биоантиоксидант” (Москва, 2002); региональной научно-практической конференции “Сахарный диабет и сердечно-сосудистая патология” (Томск, 2002); на биохимическом научном заседании “Stress, signaling and control” (UK, London, 2003); на совместных заседаниях кафедр патофизиологии и биофизики и функциональной диагностики ГОУВПО “СибГМУ Минздрава России” (2002, 2003).

Публикации:

По теме диссертации опубликовано 12 работ, из которых 2 в центральной печати.

Объем и структура диссертации:

Диссертация изложена на 120 печатных страницах, содержит 1 таблицу, 21 рисунок. Состоит из введения, 3 глав: “Обзор литературы”, “Материал и методы”, “Результаты исследования и их обсуждение”, заключения, выводов и указателя литературы, включающего 266 источников, из них 66 отечественных и 200 зарубежных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе выполнения данной работы было обследовано 88 человек. Группу больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией составили 40 человек в возрасте от 36 до 62 лет (22 мужчины и 18 женщин). Клинический диагноз верифицировали с помощью клинико-лабораторных методов исследования на базе отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца (руководитель - академик РАМН Р.С. Карпов) НИИ кардиологии Томского научного центра Сибирского отделения РАМН. В контрольную группу вошли 48 практически здоровых добровольцев в возрасте от 32 до 57 лет (27 мужчин и 21 женщина). Лабораторный этап работы проводился на базе клинико-диагностической лаборатории НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН (руководитель – с.н.с., к.м.н. Т.Е. Сулова).

Клинико-лабораторная характеристика обследованных больных представлена в табл.1. Из всех обследованных пациентов у 11 человек сахарный диабет 2 типа был ассоциирован с артериальной гипертензией и с ишемической болезнью сердца. У всех больных отмечались дислипидемия и избыточная масса тела. Уровень показателей липидного обмена и глюкозы в сыворотке крови, а также уровень гликозилированного гемоглобина оценивали с помощью стандартных наборов "Bioson" (Германия). Коррекцию гипергликемии проводили диетическими мероприятиями, пероральными сахароснижающими средствами (препараты сульфонилмочевины второй генерации, бигуаниды). Все исследования проводили не менее чем через 4 недели после отмены предшествующей гипотензивной терапии.

Контрольную группу составили здоровые трудоспособные добровольцы, не страдающие сахарным диабетом, ожирением, с нормальным артериальным давлением, без сосудистых и эндокринных заболеваний в анамнезе.

Эритроциты получали из гепаринизированной венозной крови (25ед/мл

Таблица 1.

**Клинико-лабораторная характеристика больных сахарным диабетом
2 типа в сочетании с артериальной гипертензией и здоровых доноров**

Показатель	Значение показателя	
	Больные СД 2 типа	Здоровые доноры
Длительность диабета, года	11±3	Не выявлено
Длительность артериальной гипертензии, года	9±2	Не выявлено
Длительность ИБС, года	4±1	Не выявлено
Систолическое артериальное давление, мм.рт.ст.	146±9,80 *	121±10,60
Диастолическое артериальное давление, мм.рт.ст.	91±2,34 *	88±1,98
Индекс массы тела, кг/м ²	32,63±1,79 *	24±0,94
Гликозилированный гемоглобин A _{1c} , % от общего гемоглобина	8,71±0,39 *	6,21±0,32
Глюкоза (базальный уровень), ммоль/л	6,89±0,56 *	4,29±0,15
Глюкоза (постпрандиальный уровень), ммоль/л	9,50±0,72 *	4,40±0,13
Общий холестерол, ммоль/л	6,09±0,21	5,76±0,19
Холестерол ЛПНП, ммоль/л	3,81±0,17 *	3,39±0,15
Холестерол ЛПВП, ммоль/л	1,02±0,06 *	1,34±0,12
Триацилглицеролы, ммоль/л	2,84±0,30 *	1,42±0,17

Примечание: * - достоверность различий $p < 0,05$

крови), забираемой стандартным способом утром, натощак.

В работе были использованы следующие растворы:

1. Среда отмывания эритроцитов: 5мМ Na-фосфатный буфер в 150 мМ NaCl.

2. Среда инкубации эритроцитов: изоосмотическая среда 320 мосм: 150 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1мМ MgCl₂, 10 мМ глюкоза.

Все растворы готовились на деионизированной воде.

В ряде экспериментов изменение осмолярности среды инкубации эритроцитов объема эритроцитов от 220 до 520 мосм осуществлялось за счет уменьшения концентрации NaCl в среде инкубации либо добавления соответствующих концентраций сахарозы к изоосмотическому раствору, что сопровождалось изменением объема эритроцитов.

Использованные реактивы: NaOH, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂, глюкоза, сахароза, аскорбат ("Реахим", Россия); ФМС (феназинметосульфат); С1-ССР (карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон), R24571 (кальмидозолиум), 1,4-дитиозэритритол (ДТЭ) ("Calbiochem", США); A23187, цитохалазин D, инсулин бычий, ЭГТА (этиленгликоль-бис (2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N' -тетрауксусная кислота), глибенкламид, клотримазол, ("Sigma", США); тритон X100 ("Merck", Германия); ТЭА (тетраэтиламмоний), антимицин А, оуабаин, N-этилмалеимид (NEM) ("Serva", Германия).

Растворы A23187, С1-ССР, антимицина А, R24571 готовились на этиловом спирте, растворы цитохалазина D, глибенкламида, оуабаина, N-этилмалеимида, 1,4-дитиозэритритола – на диметилсульфоксиде ("Serva", Германия). Конечная концентрация растворителя в среде инкубации эритроцитов не превышала 0,5% и не оказывала влияния на активность Ca²⁺-активируемых K⁺-каналов. Все остальные растворы готовили на основе деионизированной воды.

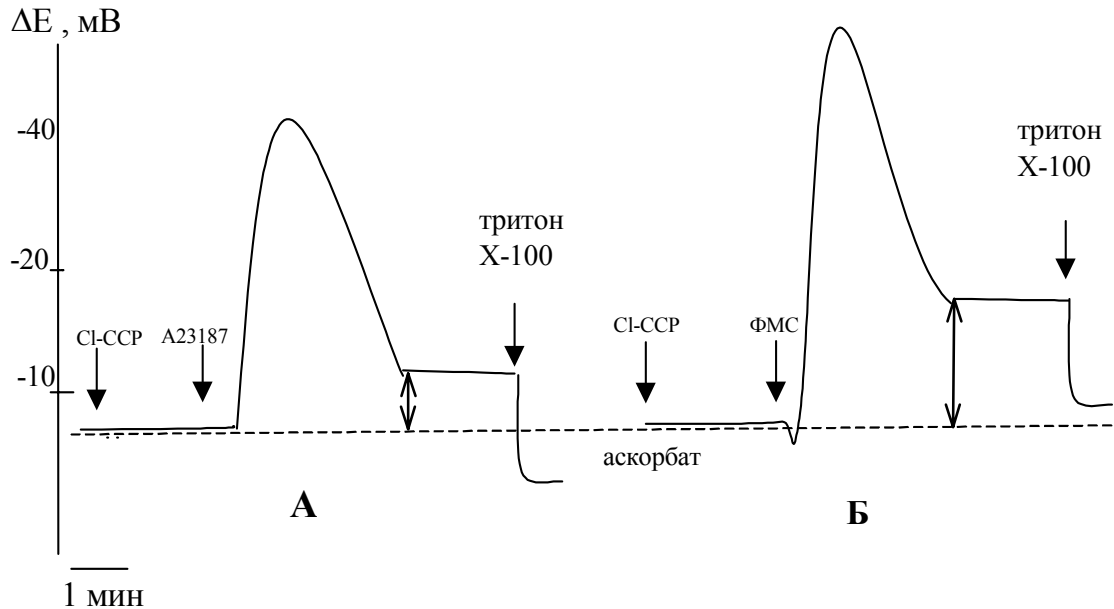


Рис. 1. Гиперполяризационный ответ эритроцитов, индуцированный кальциевым ионофором A23187 (А) и редокс-системой - электронно-донорной системой аскорбат-феназинметосульфат (ФМС) (Б).

Для регистрации изменений мембранного потенциала эритроцитов в ответ на увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция использовался метод, предложенный P.S. Low (1979) и С.Н. Орловым, И.В. Петровой и соавт. (1992) и основанный на том, что в присутствии протонифорараспределение протонов зависит от мембранного потенциала E_m как $E_m = RT/F (pH_i - pH_0)$, где pH_i и pH_0 - значения рН цитоплазмы и среды инкубации, соответственно. При низкой буферной емкости среды инкубации (в наших условиях она была примерно в 100 раз меньше буферной емкости цитоплазмы) изменениями pH_i можно было пренебречь, а его квазистационарный уровень определялся при гемолизе клеток в присутствии детергента. Для определения внутриклеточного рН в конце всех опытов в суспензию эритроцитов вносили тритон X-100 до конечной концентрации 0,2%.

Регистрацию рН проводили с помощью комбинированного рН-чувствительного электрода "НН 1332" ("HANNA Instruments") и рН-метра "ТУР N517" (Польша).

Для получения **A23187- индуцированного гиперполяризационного ответа** (ГО) эритроцитов (рис.1, А) к 4,75 мл изотонической среды, содержащей 10 мкМ $CaCl_2$, добавляли 0,25 мл упакованных эритроцитов. Через 5 мин инкубации при $37^{\circ}C$ и постоянном перемешивании добавляли протонифор Cl-CCP до конечной концентрации 20 мкМ и спустя 2 мин добавляли 0,5 мкМ Ca^{2+} -ионофора A23187.

Индукцированный A23187 входящий поток ионов Ca^{2+} приводил к открыванию $K^+(Ca^{2+})$ -каналов и выходу ионов калия. Это обуславливало гиперполяризацию мембраны клеток [Орлов С.Н., Петрова И.В. и соавт., 1992]. Так как среда инкубации содержала протонифор, изменившийся мембранный потенциал эритроцитов приводил к перераспределению ионов водорода между средой и цитоплазмой клеток, что отражалось в изменении рН среды инкубации. Таким образом, защелачивание среды инкубации клеток отражало процесс гиперполяризации мембраны, а восстановление рН - фазу ее реполяризации.

При анализе полученных данных использовались следующие стационарные и кинетические параметры Ca^{2+} -активированного ГО эритроцитов. Стационарные параметры: ΔE_1 - значение мембранного потенциала, соответствующее максимальному уровню гиперполяризации мембраны эритроцитов в ответ на добавление A23187 по сравнению с исходным мембранным потенциалом клеток (мВ). Кинетические параметры: V_1 - скорость защелачивания среды инкубации, отражающая скорость гиперполяризации (мэкв $\text{OH}^-/\text{мин}\cdot\text{л}$ клеток); V_2 - скорость закисления среды инкубации, отражающая скорость восстановления мембранного потенциала (мэкв $\text{H}^+/\text{мин}\cdot\text{л}$ клеток).

Поскольку начальная фаза изменения мембранного потенциала эритроцитов обусловлена открыванием Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов, то по амплитуде и скорости развития гиперполяризации можно судить об активности этих каналов. Фаза реполяризации связана с активацией Ca^{2+} -насоса мембраны эритроцитов, что отражается в изменении скорости восстановления мембранного потенциала [Орлов С.Н., Петрова И.В. и соавт., 1992].

Для получения повторных пиков гиперполяризации мембраны эритроцитов после получения ответа на введение 0,5 мкМ кальциевого ионофора A23187 в суспензию клеток через каждые 4 мин вносили по 40 мкМ CaCl_2 .

Редокс-индуцированную гиперполяризацию мембраны эритроцитов (рис.1, Б) получали добавлением к изоосмотической среде, содержащей 10 мкМ CaCl_2 , 10 мМ аскорбата и последующим введением через 5 мин инкубации 20 мкМ протонофора С1-ССР и еще через 2 мин 0,1 мМ феназинметосульфата [Гюльханданян А.В., Геокчакян Г.М., 1991].

Для выявления роли спектрина в регуляции Ca^{2+} -активируемой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов использовали подход, связанный с термической денатурацией спектрина мембранного каркаса эритроцитов [Shnygov V.L. et al., 1990]. Для выявления роли актина в регуляции Ca^{2+} -активируемой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов суспензии клеток (гематокрит 20%) обрабатывали 10 мкМ цитохалазина D в течение 10 мин.

Для оценки влияния инсулина на параметры ГО эритроцитов клетки инкубировали в течение 1 и 5 минут в присутствии 0,3 нМ инсулина в изоосмотических условиях (320 мосм).

Для изучения влияния ионов кальция на параметры ГО эритроцитов в изоосмотическую среду инкубации 320 мосм вносили 10, 50, 100 или 200 мкМ CaCl_2 .

Для оценки влияния блокаторов ионтранспортных систем, антимицина А и модификаторов SH-групп на развитие калиевой проницаемости мембраны эритроцитов клетки, до начала записи ГО, 5 минут инкубировали в изоосмотической среде 320 мосм в присутствии реагента.

Достоверность различий параметров сравниваемых групп оценивали по непараметрическим критериям U-Манна-Уитни и Вилкоксона, параметрическому t-критерию Стьюдента и последовательному критерию Бернарда [Лакин Г.Ф., 1980; Урбах В.Ю., 1975]. Для анализа полученных результатов использовали программу Microsoft Excel (1997) и стандартный пакет программ Statistica (1995).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании было установлено, что у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией нарушаются механизмы регуляции калиевой проницаемости мембраны эритроцитов.

Так, было показано, что у больных СД 2 типа в сочетании с АГ по сравнению со здоровыми донорами происходило снижение амплитуды А23187-индуцированного ГО эритроцитов в присутствии 10 мкМ хлорида кальция (рис.2, А). При увеличении концентрации хлорида кальция до 100 мкМ эти различия исчезали (рис.2, Б). У больных СД 2 типа в сочетании с АГ изменений скорости развития А23187-индуцированной гиперполяризации мембраны и скорости восстановления мембранного потенциала эритроцитов не происходило.

Амплитуда редокс-индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов больных СД 2 типа в сочетании с АГ по сравнению со здоровыми донорами также снижалась, но при концентрации хлорида кальция в среде инкубации 100 мкМ (рис.2, Г). Изменения скорости развития редокс-индуцированной гиперполяризации мембраны эритроцитов не происходило, однако отмечалось повышение скорости восстановления мембранного потенциала эритроцитов больных СД 2 типа в сочетании с АГ в присутствии в среде инкубации 10 мкМ хлорида кальция (рис.2, В).

Возможно, что обнаруженное снижение калиевой проницаемости мембраны эритроцитов больных СД 2 типа в сочетании с АГ могло быть связано со снижением чувствительности Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов к ионам кальция. Вероятно, что в суспензии эритроцитов содержатся клетки, обладающие различными активационными порогами $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов. Повышение концентрации ионов кальция в среде инкубации клеток как у больных СД 2 типа в сочетании с АГ, так и у здоровых доноров, может быть достаточным для активации $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов всех эритроцитов, находящихся в суспензии.

Полученные данные также свидетельствуют об участии ионов кальция в регуляции калиевой проницаемости мембраны эритроцитов здоровых доноров и больных СД 2 типа в сочетании с АГ при обоих способах активации Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов. Кроме того, полученные данные позволяют предположить, что, вероятно, существует дополнительный механизм управления Ca^{2+} -активируемыми калиевыми каналами эритроцитов, связанный с редокс-процессами.

Подтверждением участия ионов кальция в регуляции редокс-индуцированной калиевой проницаемости мембраны эритроцитов были результаты экспериментов с варьированием концентрации ионов кальция в изоосмотической среде инкубации клеток.

Повышение концентрации ионов кальция в среде инкубации эритроцитов здоровых доноров приводило к увеличению скорости развития А23187-индуцированного гиперполяризационного ответа клеток, а также к повышению амплитуды и скорости развития редокс-индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов.

У больных СД 2 типа в сочетании с АГ при возрастании концентрации ионов кальция в среде инкубации повышалась А23187-зависимая калиевая проницаемость мембраны эритроцитов, однако изменения редокс-

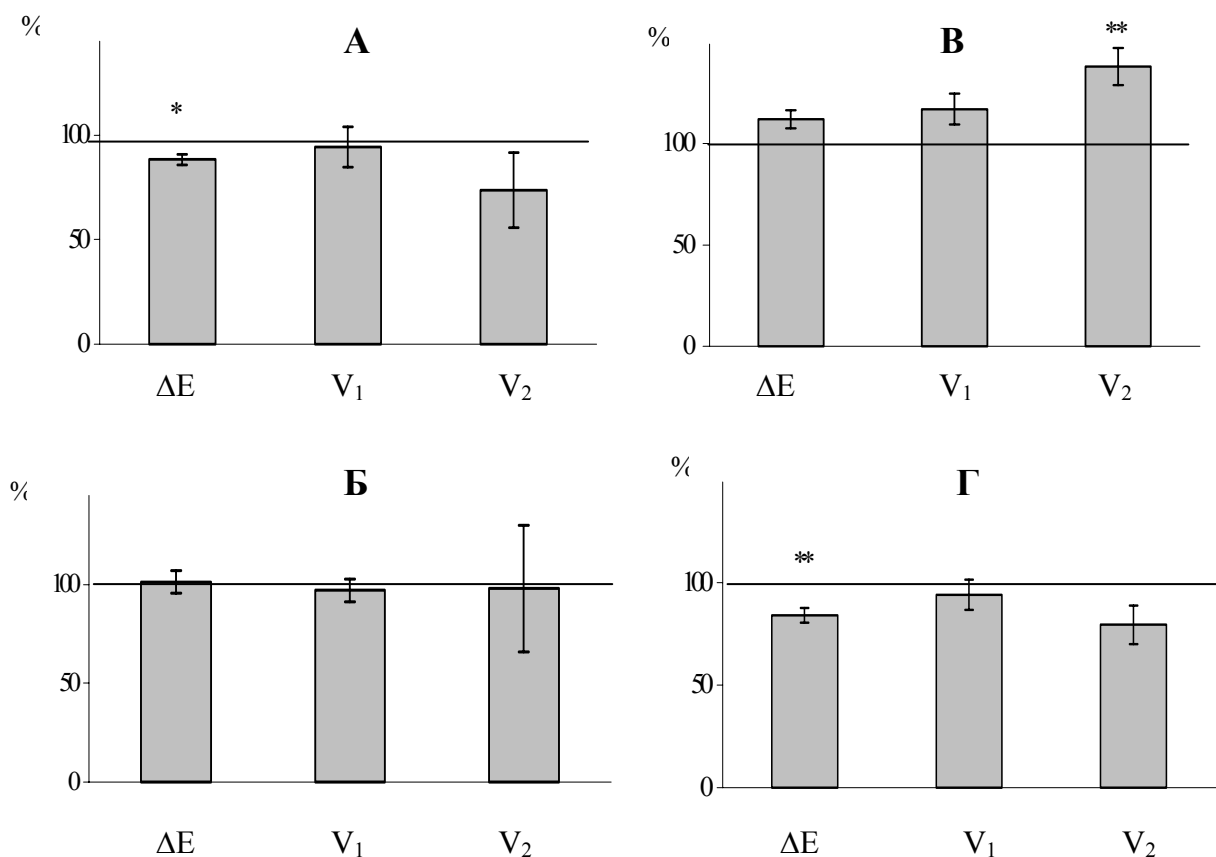


Рис. 2. Параметры A23187 (А, Б)- и редокс (В, Г)- индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией в присутствии 10 мкМ CaCl₂ (А, В) и 100 мкМ CaCl₂ (Б, Г) в изоосмотической среде инкубации (320 мосм).

Примечание:

За 100% приняты значения параметров здоровых доноров.

ΔE (мВ)- амплитуда гиперполяризационного ответа эритроцитов, V₁ (мэВ ОН⁻/мин·л кл)- скорость гиперполяризации мембраны, V₂ (мэВ Н⁺/мин·л кл)- скорость восстановления мембранного потенциала.

Параметры больных, достоверно отличающиеся от таковых в контроле: *p<0,01; **p<0,05.

индуцированной калиевой проницаемости мембраны этих клеток отсутствовали.

С одной стороны, это позволяет предположить, что проводимость K⁺(Ca²⁺)-каналов, помимо ионов кальция, может регулироваться и другими способами. С другой стороны, это свидетельствует о нарушении регуляции калиевой проницаемости мембраны эритроцитов при сахарном диабете 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией.

Не исключено также, что причиной изменения Ca²⁺-зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов у больных СД 2 типа в сочетании с АГ может быть изначально повышенная внутриклеточная концентрация ионов кальция [Caimi G. et al., 1998; Levy J., 1999; Fujita T., Palmieri G.M.A., 2000], при которой чувствительность K⁺(Ca²⁺)-каналов эритроцитов к ионам кальция снижена, а активность Ca²⁺-насоса подавлена. Подтверждением этого служат данные о том, что при каждой последующей повторной индукции ГО эритроцитов, обусловленной добавлением в среду инкубации 40 мкМ хлорида кальция отмечалось снижение параметров ГО эритроцитов по сравнению с

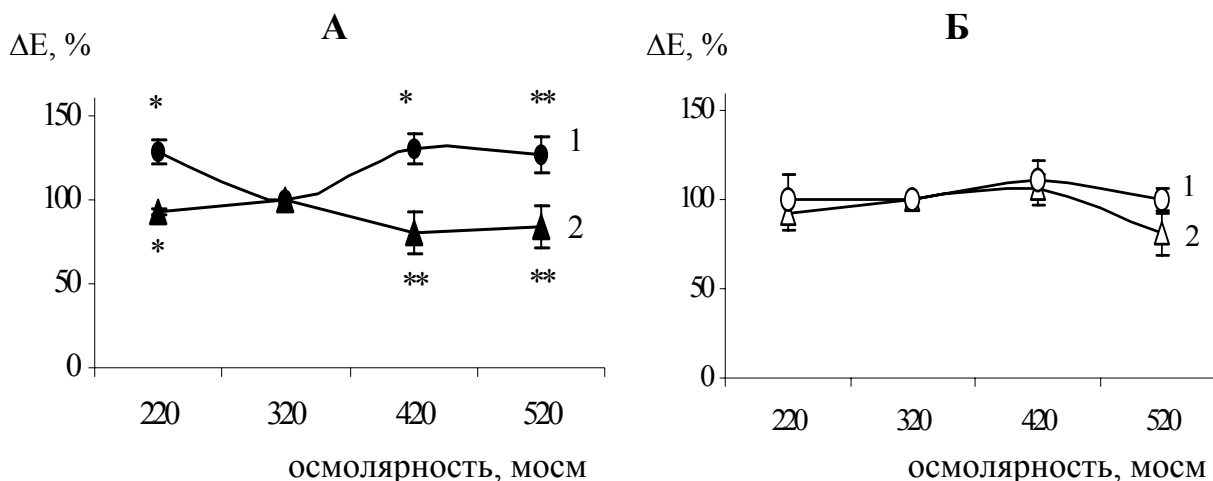


Рис. 3. Зависимость параметров гиперполяризационного ответа эритроцитов, вызванного электронно-донорной системой аскорбат-феназинметосульфат (1) и кальциевым ионофором A23187 (2) от осмолярности среды инкубации.

Примечание:

А - здоровые доноры, Б - больные сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией.

За 100% приняты значения, полученные в изоосмотических условиях (320мосм).

Параметры достоверно отличаются: * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ относительно изоосмотических условий (320мосм).

предыдущим пиком, а также снижение количества возможных ГО эритроцитов. Эти изменения оказались более выраженными в группе больных СД 2 типа в сочетании с АГ.

Другой причиной изменения калиевой проницаемости мембраны эритроцитов у больных СД 2 типа в сочетании с АГ может быть повреждение белков мембранного каркаса клеток. Подтверждением этого служат данные об отсутствии изменений A23187- и редокс- индуцированной калиевой проницаемости мембраны эритроцитов у больных СД 2 типа в сочетании с АГ при варьировании осмолярности среды, в то время как у здоровых доноров отмечалось снижение амплитуды A23187- индуцированного ГО при увеличении объема и сжатии клеток и увеличение амплитуды редокс- индуцированного ГО в этих условиях (рис. 3).

Кроме того, разнонаправленные изменения A23187- и редокс- индуцированной калиевой проницаемости мембраны эритроцитов у здоровых доноров при варьировании осмолярности среды инкубации предполагают наличие двух механизмов регуляции калиевой проницаемости мембраны эритроцитов человека в норме: один - Ca^{2+} - зависимый, другой - опосредованный редокс-агентами. Не исключено, что эти способы регуляции Ca^{2+} - активируемых калиевых каналов эритроцитов имеют и определенное физиологическое значение для этих клеток

Известно, что при изменении объема эритроцитов, как и других клеток, включаются механизмы перераспределения ионов, приводящие к восстановлению их объема [Веренинов А.А., Марахова И.И., 1986; Sabantchik Z.L. et al., 1987; Орлов С.Н., Кузнецов С.Р. и соавт., 1992]. Возможно, что *in vivo* набухание эритроцитов сопровождается активацией редокс-зависимого пути регуляции Ca^{2+} - активируемых калиевых каналов, приводящего к повышению калиевой проницаемости мембраны и восстановлению объема

клетки. А при сжатии клеток, возможно, преобладает путь регуляции каналов, опосредованный ионами кальция и приводящий к снижению калиевой проницаемости мембраны эритроцитов.

Таким образом, увеличение или снижение калиевой проводимости мембраны эритроцитов, регулируемой различными механизмами, может рассматриваться как один из путей стабилизации объема клеток при отклонениях осмолярности среды.

Для выяснения роли спектрина – основного белка мембранного каркаса эритроцитов – в объем-зависимой регуляции $K^+(Ca^{2+})$ -каналов использовался подход, основанный на том, что инкубация эритроцитов при 50 °С в течение 10 мин приводит к термической денатурации спектрина, не затрагивая при этом другие белки мембранного каркаса эритроцитов [Shnygov V.L. et al., 1990].

Результаты проведенного исследования показали, что термическая обработка эритроцитов приводила к значительному снижению амплитуды ГО клеток как в группе больных СД 2 типа в сочетании с АГ, так и у здоровых доноров, а также в обеих группах устраняла зависимость параметров А23187-индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов от объема клеток (рис. 4).

Для выяснения роли актина в регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов, клетки инкубировали в присутствии 10 мкМ цитохалазина D, разобщающего взаимодействие актиновых филаментов [Schliwa M., 1982; Goddette D.W., Frieden C., 1986].

Инкубация эритроцитов с цитохалазином D не приводила к значительному изменению амплитуды ГО клеток, индуцированного Ca^{2+} -ионофором А23187 как у больных СД 2 типа в сочетании с АГ, так и у здоровых доноров.

Таким образом, в настоящем исследовании установлено, что наиболее важную роль в регуляции Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны

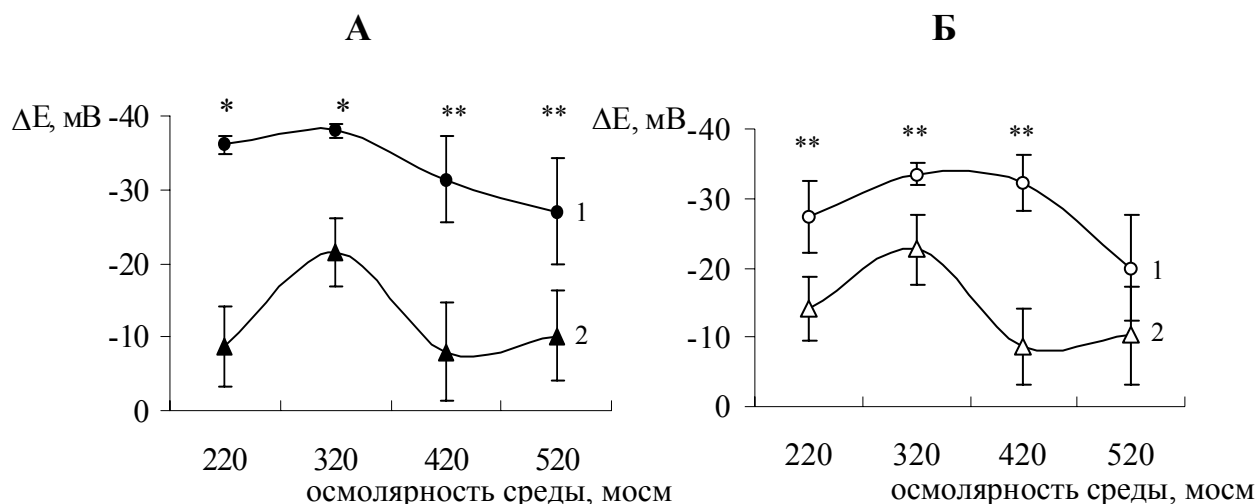


Рис. 4. Влияние термоденатурации спектрина эритроцитов здоровых доноров (А) и больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией (Б) на амплитуду А23187-индуцированного гиперполяризационного ответа клеток.

Примечание:

Параметры достоверно отличаются в обеих выборках: * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$

1-инкубация 37°С, 10 мин; 2- инкубация 50°С, 10 мин.

эритроцитов как у больных СД 2 типа в сочетании с АГ, так и у здоровых доноров, играет спектрин. Отсутствие эффекта цитохалазина D на калиевую проницаемость мембраны, возможно, связано с невысоким содержанием актина в мембранном каркасе эритроцитов.

Известно, что у больных СД 2 типа происходит увеличение степени гликозилирования белков мембранного каркаса эритроцитов, таких как спектрин, анкирин, белок полосы 4.2 [Schwartz R.S. et al., 1991]. Кроме того, отмечается и изменение состава липидного бислоя мембраны эритроцитов, проявляющееся в увеличении содержания холестерина, сфингомиелина и снижении содержания фосфатидилсерина [Максимов О.В., Солун М.Н., 1989; Miossec P. et al., 1999]. Все это может приводить к нарушению белок-липидных взаимодействий, в том числе и взаимодействий липидного бислоя и белков мембранного каркаса эритроцитов у больных СД 2 типа. Учитывая, что $K^+(Ca^{2+})$ -каналы эритроцитов являются интегральными белками [Dunn P.M., 1998; Shieh C.-C. et al., 2000], нельзя исключить, что при СД 2 типа могут происходить как конформационные изменения структуры самого канала, так и нарушения белок-липидных и белок-белковых взаимодействий с компонентами мембраны и мембранного каркаса эритроцитов, оказывающих регуляторное влияние на $K^+(Ca^{2+})$ - каналы эритроцитов. С другой стороны, нарушение регуляции Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов у больных СД 2 типа в сочетании с АГ, в свою очередь, также может приводить к нарушению деформируемости и функции эритроцитов и способствовать прогрессированию тяжести сосудистых осложнений и всего заболевания в целом.

Известно, что состояние инсулинорезистентности является основным звеном патогенеза сахарного диабета, артериальной гипертензии и ряда часто ассоциированных с ними заболеваний [Reaven G.M., 1988; Kaplan N.M., 1989; Kaplan N.M., 1993; Baron A.D., Steinberg H.O., 1997; Алмазов В.А. и соавт., 1999; Reaven G.M., 2002].

Для исследования влияния инсулина на Ca^{2+} - зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроциты инкубировали в течение 1 и 5 минут в присутствии 0,3 нМ инсулина в изоосмотических условиях (320 мосм).

Так, инкубация клеток с инсулином в течение 1 мин приводила к значительному снижению амплитуды A23187-индуцированного ГО эритроцитов у здоровых доноров (рис.5, А). Инкубация эритроцитов с инсулином в течение 5 мин не приводила к изменению параметра ΔE. У больных СД 2 типа в сочетании с АГ, в отличие от здоровых доноров, не обнаруживалось значительного снижения амплитуды ГО эритроцитов (рис.5, Б).

В обеих группах обследованных лиц инсулин не оказывал влияния на скорость развития A23187-индуцированной гиперполяризации мембраны эритроцитов и на скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов.

Таким образом, рассмотренные эффекты влияния инсулина на Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов развиваются в диапазоне времени от одной до нескольких минут и могут быть отнесены к быстрым и очень быстрым эффектам инсулина, заключающимся в изменении ионной проницаемости мембраны клеток [Теппермен Дж., Теппермен Х., 1989].

Вероятно, что изменение калиевой проницаемости мембраны эритроцитов сопровождается перераспределением воды и колебаниями объема клеток. Действительно, существуют данные, что инсулин может вызывать увеличение объема гепатоцитов, осуществляющееся посредством активации Na^+/H^+ обмена и $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта [Hallbrucker C. et al., 1991; Peak M. et al., 1992; Agius L. et al., 1994]. Возможно, что преинкубация эритроцитов здоровых доноров с инсулином в течение 1 минуты приводила к набуханию этих клеток вследствие подавления Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов. Отсутствие эффекта в случае инкубации эритроцитов с инсулином в течение 5 мин могло быть обусловлено тем, что восстановление объема клеток, связанное с ионным транспортом, развивается в течение времени, не превышающем 1 мин. Это вполне вероятно, так как ранее в экспериментах по сжатию и растяжению эритроцитов в анизоосмотических растворах было обнаружено, что изменение объема эритроцитов происходит за время менее 5 мин и в последующие 30 мин не изменяется [Веренинов А.А., Марахова И.И., 1986; McManus M.L. et al., 1995].

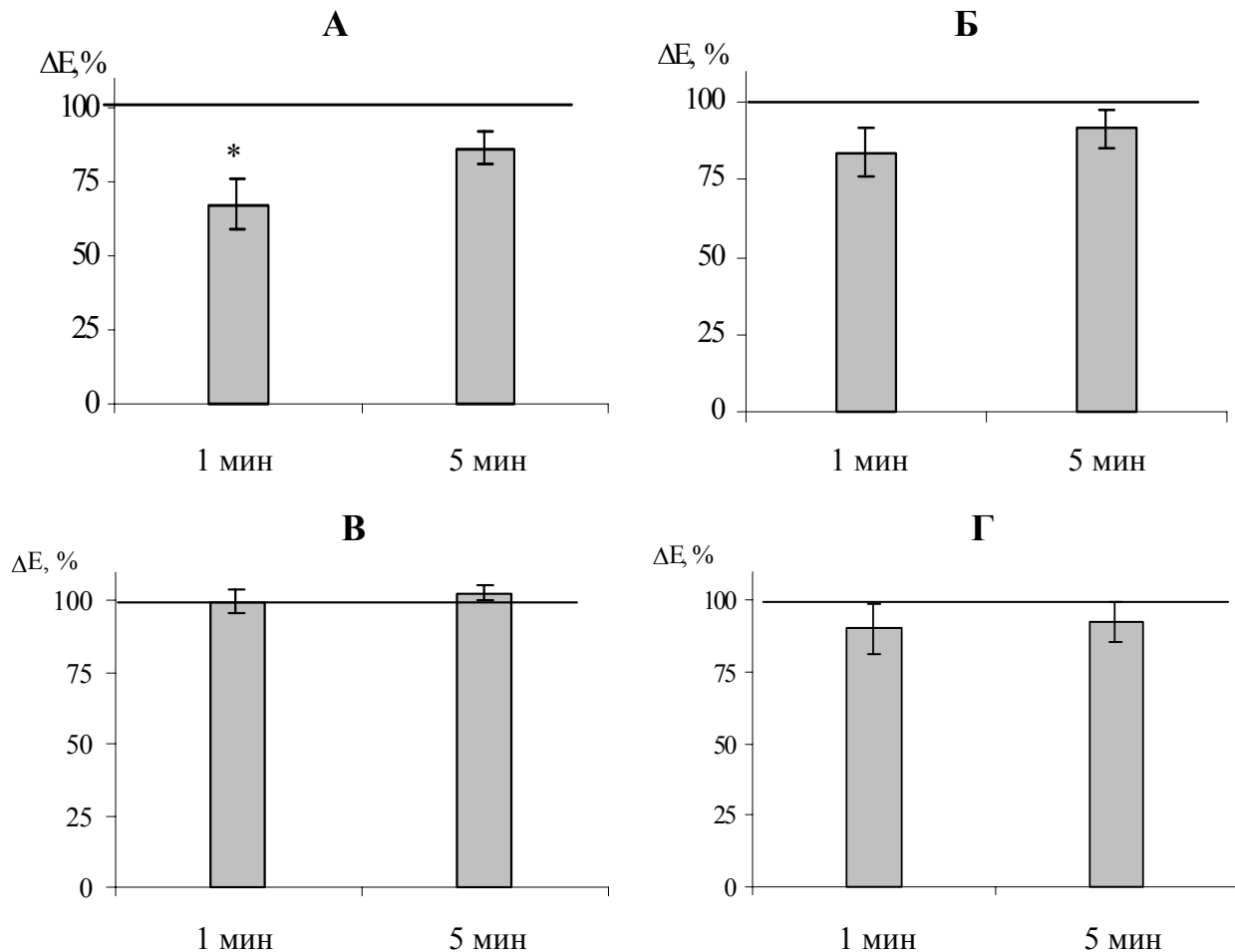


Рис. 5. Влияние инсулина на амплитуду (ΔE) A23187 (А,Б)- редокс (В,Г)-индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией.

Примечание: А, В – здоровые доноры, Б, Г - больные сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией.

За 100 % приняты значения параметров в отсутствие инсулина.

*- параметры достоверно отличаются от параметров, полученных в отсутствие инсулина ($p < 0,05$).

Отсутствие влияния инсулина на A23187-индуцированную калиевую проницаемость мембраны эритроцитов больных СД 2 типа в сочетании с АГ при инкубации клеток с гормоном в течение 1 и 5 мин могло быть обусловлено нарушением взаимодействия гормона с рецепторами на поверхности мембраны эритроцитов. Так, показано, что при синдроме инсулинорезистентности в эритроцитах может происходить снижение количества рецепторов либо уменьшение сродства рецепторов к инсулину, приводящие к снижению связывания гормона и снижению фосфорилирования рецепторов [Grigorescu F. et al., 1986]. Нельзя исключить также нарушения ионных механизмов регуляции объема клеток при данном заболевании.

Исследование влияния инсулина на редокс-индуцированную калиевую проницаемость мембраны эритроцитов показало, что ни у больных СД 2 типа в сочетании с АГ (рис.5, Г), ни у здоровых доноров (рис.5, В) не происходило значительного влияния гормона на параметры редокс-индуцированного ГО эритроцитов. Отсутствие влияния инсулина на редокс-индуцированную калиевую проницаемость мембраны эритроцитов позволяет предположить наличие различных гормон-нечувствительных механизмов регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов.

В связи с установленными в настоящем исследовании различиями в регуляции A23187- и редокс-индуцированной калиевой проницаемости мембраны эритроцитов у здоровых доноров и больных СД 2 типа в сочетании с АГ было проведено исследование природы редокс-индуцированной калиевой проницаемости мембраны эритроцитов на клетках здоровых доноров.

Так, кальциевый ионофор и электронно-донорная система аскорбат-феназинметосульфат вызывают сходные изменения мембранного потенциала эритроцитов, обусловленные выходом ионов калия.

Аскорбат и ФМС, вносимые в суспензию эритроцитов по отдельности, не вызывали развития гиперполяризационного ответа клеток. К открыванию Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов приводило только совместное действие аскорбата и ФМС. По данным литературы, система аскорбат-ФМС, являясь искусственной системой переноса электронов, индуцирует Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость мембраны, вероятно, за счет увеличения сродства Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов к ионам кальция [Freedman J.C., Hoffman J.F., 1979; Alvarez J. et al., 1984; Гюльханданян А.В., Геокчакян Г.М., 1991]. Известно, что широкий спектр редуцирующих агентов, включая аскорбат, НАДН, НАДФН и HS-глутатион увеличивают сродство Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов к ионам кальция в тенях эритроцитов [Alvarez J. et al., 1984]. Однако при исследовании активности одиночных каналов эритроцитов методом patch-clamp на мембранных фрагментах в конфигурации inside-out эти агенты оказывали действие только в присутствии ФМС, где ФМС и цитохром с способны связываться как эффективные переносчики электронов с редокс-системой мембраны [Alvarez J. et al., 1984]. Таким образом, в целых эритроцитах аскорбат и ФМС способны индуцировать калиевую проводимость только совместно, образуя единую систему переноса электронов.

На основании полученных данных можно предположить, что либо в эритроцитах человека существуют две субпопуляции калиевых каналов – Ca^{2+} -активируемые и редокс-активируемые, либо в эритроцитах человека присутствуют один тип калиевых каналов - Ca^{2+} -активируемые калиевые

каналы, которые имеют сложную систему регуляции, включающую механизм активации редокс-агентами. Согласно второму предположению, в структуре $K^+(Ca^{2+})$ -канала должен присутствовать как Ca^{2+} -связывающий центр, так и редокс-чувствительный центр.

Описанное ранее возрастание амплитуды A23187- и редокс-индуцированного ГО эритроцитов здоровых доноров в ответ на повышение концентрации ионов кальция свидетельствует в пользу того, что инкубация клеток в присутствии электронно-донорной системы аскорбат-ФМС приводит к открыванию $K^+(Ca^{2+})$ -каналов за счет увеличения сродства этих каналов к кальцию.

Участие ионов кальция в аскорбат-индуцированной калиевой проницаемости также подтверждают эксперименты с ЭГТА и ингибитором Ca^{2+} -кальмодулин-зависимых процессов - антибиотиком R24571 (кальмидозолиум).

Так, добавление в среду инкубации эритроцитов 1 мМ ЭГТА, приводящее к связыванию внеклеточных ионов кальция, полностью подавляло гиперполяризационный ответ, вызванный кальциевым ионофором A23187, и значительно снижало амплитуду редокс-индуцированной калиевой проницаемости мембраны эритроцитов. Эти данные позволяют предположить, что для развития редокс-индуцированного ГО эритроцитов, вероятно, оказывается достаточно внутриклеточной концентрации ионов кальция.

Известно, что хлорид бария подавляет Ca^{2+} -зависимую калиевую проводимость мембраны эритроцитов, конкурируя с Ca^{2+} за место связывания с $K^+(Ca^{2+})$ -каналом [Dunn P.M., 1998]. При добавлении 2 мМ $BaCl_2$ в среду инкубации происходило существенное снижение амплитуды A23187-индуцированного ГО, что могло быть результатом конкурентного замещения ионов кальция на ионы бария. На параметры редокс-индуцированной гиперполяризации мембраны эритроцитов человека добавление $BaCl_2$ влияния не оказывало. Таким образом, можно предположить, что Ca^{2+} также играет определенную роль в запуске калиевой проводимости в условиях искусственной электронно-донорной системы аскорбат-ФМС.

Существуют данные, что кальмодулин или кальмодулин-подобный кальций-связывающий белок могут принимать участие в регуляции $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов [Орлов С.Н. и соавт., 1989; Гурло Т.Г. и соавт., 1991]. Действительно, добавление в среду инкубации 1 мкМ R24571 (кальмидозолиума) - ингибитора Ca^{2+} -кальмодулин-зависимых процессов - приводило к существенному снижению ГО, вызванного кальциевым ионофором A23187 и редокс-системой. Эти данные позволяют предположить, что в управлении калиевой проницаемости эритроцитов в обоих случаях участвует Ca^{2+} -связывающий белок.

Кальмодулин-подобный Ca^{2+} -связывающий белок может быть одним из компонентов олигомерного белкового комплекса $K^+(Ca^{2+})$ -канала, либо ионы кальция, присоединяясь к кальмодулину, находящемуся в цитозоле, осуществляют свое регуляторное действие на $K^+(Ca^{2+})$ -каналы эритроцитов путем активации Ca^{2+} -кальмодулин-зависимой протеинкиназы либо через другие внутриклеточные системы регуляции, например, оксидоредуктазы [Гюльханданян А.В., 1992].

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что, возможно,

существует дополнительный, не зависящий от ионов кальция, механизм управления $K^+(Ca^{2+})$ -каналами, приводящий к развитию гиперполяризационного ответа. Не исключено, что редокс-агенты могут оказывать влияние на калиевую проницаемость мембраны эритроцитов при достаточно низком внутриклеточном содержании ионов кальция, увеличивая сродство Ca^{2+} -связывающего центра $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов к этому катиону. Более того, при низких внеклеточных концентрациях ионов Ca^{2+} редокс-зависимые механизмы могут быть основным путем регуляции активности $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов. Наиболее вероятным представляется, что этот механизм связан с системой транспорта электронов, имеющейся на мембране эритроцитов.

Для выяснения природы редокс-индуцированного ответа эритроцитов был использован также ряд блокаторов калиевых каналов и других ионтранспортных систем. Влияние блокаторов на развитие гиперполяризации эритроцитов оценивали по отношению амплитуды ГО в присутствии блокатора к амплитуде ГО в отсутствие блокатора, выраженной в процентах.

Добавление в среду инкубации 0,5 мкМ оубаина приводило к значительному снижению A23187- и редокс-индуцированной калиевой проницаемости мембраны эритроцитов. Вероятной причиной этого являлось уменьшение калиевого градиента на мембране эритроцитов вследствие ингибирования Na^+/K^+ -АТФазы. Это служит подтверждением того, что редокс-индуцированная гиперполяризация мембраны эритроцитов связана с выходом ионов калия.

Хинидин (0,1 мМ) и клотримазол (1 мкМ) – блокаторы Ca^{2+} -зависимой калиевой проводимости мембраны эритроцитов [Grygorczyk R., Schwarz W., 1985; Alvarez J. et al., 1992] – приводили к полному подавлению ГО эритроцитов, вызванного кальциевым ионофором A23187, а амплитуда редокс-индуцированного ГО эритроцитов существенно снижалась только в присутствии клотримазола. Увеличение концентрации блокаторов не приводило к более полному подавлению редокс-зависимой калиевой проницаемости.

Для проверки предположения, что редокс-индуцированная гиперполяризация эритроцитов может быть обусловлена другими калиевыми каналами, нами были проведены эксперименты с блокатором потенциалчувствительных калиевых каналов тетраэтиламмонием (ТЭА) [Dunn P.M., 1998] и АТФ-чувствительных калиевых каналов – глибенкламидом [Legtenberg R.J. et al., 2002]. Однако ни ТЭА (10 мМ), ни глибенкламид (10 мкМ) не оказывали воздействия на параметры редокс-индуцированной гиперполяризации мембраны эритроцитов.

Таким образом, установленные различия в ингибировании A23187- и редокс-индуцированной гиперполяризации мембраны эритроцитов позволяют предположить, что в присутствии электронно-донорной системы аскорбат-ФМС существенно изменяется кинетика “ворот” $K^+(Ca^{2+})$ -канала и типичные блокаторы этих каналов снижают свою эффективность.

С другой стороны, неполное ингибирование редокс-индуцированной гиперполяризации мембраны эритроцитов хинидином и клотримазолом может быть связано с тем, что в присутствии электронно-донорной системы аскорбат-ФМС возникает неспецифический поток ионов калия, не связанный с

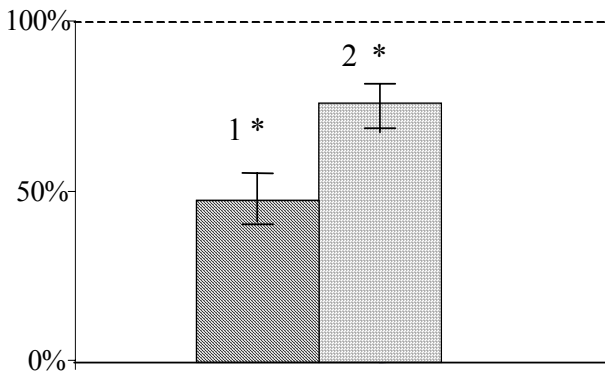


Рис. 6. Влияние антимицина А на амплитуду А23187 (1)- и редокс (2)- индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов.

Примечание:

За 100% принято значение амплитуды гиперполяризационного ответа эритроцитов в отсутствие антимицина А.

Параметры достоверно отличаются ($p < 0,05$) по сравнению со значениями в отсутствие антимицина А.

активацией калиевых каналов, а обусловленный формированием в мембране более гидрофильных участков, образовавшихся при активации процессов перекисного окисления липидов. По данным литературы, это может быть вызвано активацией молекулярного кислорода и образованием H_2O_2 при аутоокислении ФМС, так как неспецифический поток ионов калия в этом случае подавлялся каталазой и исчезал при инкубации везикул мембраны эритроцитов в бескислородной среде [Alvarez J. et al., 1984]. Однако эти данные лишь отчасти объясняют полученные нами результаты, так как активность каталазы в нативных эритроцитах весьма высока. Кроме того, в присутствии 1 мкМ клотримазола сохранялся двухфазный характер редокс-индуцированного ГО эритроцитов. Это также свидетельствует против предположения о возникновении пассивной неспецифической утечки ионов калия, так как ранее было показано, что калиевый ионофор валиномицин, приводящий к выходу из эритроцитов ионов калия по градиенту концентрации, устранял стадию возвращения мембранного потенциала эритроцитов к исходному уровню [Орлов С.Н. и соавт., 1987]. С другой стороны, это дает возможность предположить, что активные формы кислорода участвуют в регуляции $K^+(Ca^{2+})$ -каналов мембраны эритроцитов. Источником активных форм кислорода *in vivo* могут быть компоненты редокс-цепи (цитохромы b, c, НАДН-дегидрогеназа), обнаруженные в мембране эритроцитов [Yubisui T., Takeshita M., 1980; Marques F., Vicho M.P., 1997].

Участие системы переноса электронов, имеющейся на мембране эритроцитов, в регуляции калиевой проницаемости мембраны показано в экспериментах с антибиотиком антимицином А, который блокирует перенос электронов на участке от цитохрома b на цитохром c [Rieske J.S. et al., 1967; Bowyer J.R., Trumpower B.L., 1981]. При добавлении в среду инкубации эритроцитов 20 мкМ антимицина А происходило значительное снижение амплитуды А23187- и редокс- индуцированного ГО клеток (рис.6).

По данным литературы, в регуляцию ряда ионтранспортных систем (K^+/Cl^- -котранспорт, Na^+/Li^+ -противотранспорт) [Senior P.A. et al., 2000; Adragna N.C. et al., 2002] вовлечены SH-группы белков. Не исключено, что акцепторами электронов могут служить SH-группы белков $K^+(Ca^{2+})$ -каналов, которые могут быть вовлечены в регуляцию этих каналов. По-видимому, для перехода $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов в открытое или закрытое состояние необходимо, чтобы некоторые SH-группы постоянно могли подвергаться процессу восстановления-окисления, то есть постоянно должны реализовываться редокс-циклы $2SH - S-S$. Следовательно, при нарушении работы редокс-циклов этот

дополнительный механизм управления работой канала будет устранен. Для проверки этого предположения были проведены эксперименты с блокатором SH-групп - N-этилмалеимидом (NEM) и с 1,4-дителиоэритритолом (ДТЭ), который восстанавливает SH-группы [Zahler W.L., Cleland W.W., 1968; Досон Р. и соавт., 1991].

Инкубация эритроцитов с 1мМ NEM приводила к существенному снижению амплитуды ГО эритроцитов, вызванного кальциевым ионофором A23187 (рис.7, А) и не вызывала значительных изменений амплитуды редокс-индуцированного ГО (рис.7, Б). При добавлении в среду инкубации 1мМ ДТЭ амплитуда редокс-индуцированного ГО эритроцитов значительно уменьшалась (рис.7, Б), а амплитуда A23187-индуцированного ГО эритроцитов не изменялась (рис.7, А).

На основании полученных данных можно предположить, что окисление и восстановление SH-групп играет определенную роль в редокс- индуцированной калиевой проводимости мембраны эритроцитов человека. Возможно, что сульфгидрильные группы структурных белков калиевого канала являются конечным или промежуточным акцептором в электронном транспорте на мембране эритроцитов. В этом случае изменение состояния SH-групп может оказаться пусковым конформационным сигналом для активации $K^+(Ca^{2+})$ -канала. Возможно, что именно данный эффект проявляется в условиях действия искусственной системы аскорбат - ФМС, т.к. ФМС может восстанавливать SH-группы [Досон Р. и соавт., 1991]. В этом случае устойчивое поддержание SH-групп в восстановленном состоянии с помощью ДТЭ действительно должно проявляться снижением редокс-индуцированной калиевой проницаемости мембраны эритроцитов.

На основании проведенного исследования можно предположить, что в управлении Ca^{2+} - активируемых калиевых каналов эритроцитов, с одной

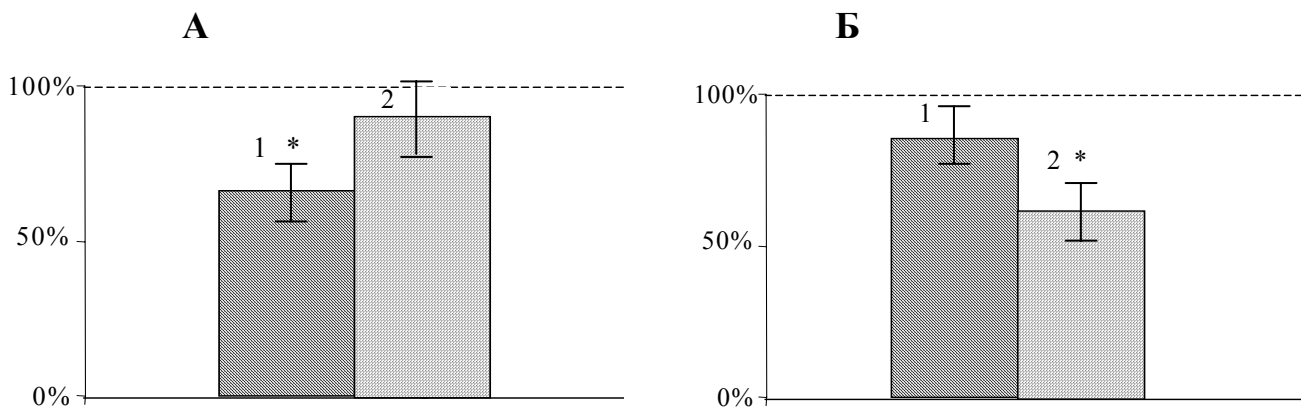


Рис. 7. Влияние N-этилмалеимида и 1,4-дителиоэритритола на амплитуду A23187 (А)- и редокс (Б)- индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов.

Примечание:

1- 1 мМ N-этилмалеимид, 2 – 1 мМ 1,4-дителиоэритритол

За 100% принято значение амплитуды гиперполяризационного ответа эритроцитов в отсутствие этих агентов.

* Параметры достоверно отличаются ($p < 0,05$) по сравнению со значениями, полученными в отсутствие этих агентов.

стороны, участвуют компоненты цепи транспорта электронов, а с другой – белки мембранного каркаса.

Возможно, что в присутствии электронно-донорной системы аскорбат-ФМС открытие Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов обусловлено увеличением сродства этих каналов к ионам Ca^{2+} . Однако не исключено, что существует и другой механизм увеличения калиевой проницаемости мембраны эритроцитов, связанный с редокс-процессами и вовлекающий в активацию канала SH-группы белков. Вполне вероятно, что существующие в клетке пути регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов с помощью ионов кальция и редокс-агентов дополняют друг друга.

Обнаруженное у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией нарушение регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов может быть связано с одной стороны с изменениями белков мембранного каркаса, а с другой стороны – с повреждением механизмов управления этими каналами, связанных с антимицин А – чувствительными компонентами дыхательной цепи и (или) сульфгидрильными группами белков канала.

ВЫВОДЫ

1. У больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией снижена калиевая проницаемость мембраны эритроцитов, индуцированная как кальциевым ионофором A23187, так и электронно-донорной системой аскорбат-феназинметосульфат, что может быть связано с нарушением механизмов регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов.
2. Увеличение объема и сжатие эритроцитов при варьировании осмолярности среды инкубации приводят к разнонаправленным изменениям A23187- и редокс-индуцированной калиевой проницаемости мембраны клеток у здоровых доноров, но не у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией.
3. Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы эритроцитов у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией, как и у здоровых доноров, регулируются белком мембранного каркаса спектрином.
4. Инсулин включается в регуляцию Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов здоровых доноров, но не больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией.
5. В управлении калиевой проницаемостью мембраны эритроцитов здоровых доноров участвуют антимицин А – чувствительные компоненты дыхательной цепи и сульфгидрильные группы белков.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Баюсова Т.В. Влияние агонистов адренергических рецепторов на Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость эритроцитов человека / Т.В. Баюсова, О.В. Черепова, С.В. Кремено // Вестник РГМУ.- 2001.- № 2 (17).- С. 124.
2. Кремено С.В. Исследование Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов мембраны эритроцитов человека при нервно- психических патологиях / С.В. Кремено, И.В. Петрова, В.Д. Прокопьева // Современные технологии психиатрического и наркологического сервиса. – Томск, 2001.- С. 57-59.

3. Изменение чувствительности Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов эритроцитов к повышению осмолярности среды у больных алкоголизмом / В.Д. Прокопьева, И.В. Петрова, С.В. Кремено, А.В. Ситожевский // Тезисы докладов по материалам второй научной конференции “Актуальные вопросы биотехнологии”, МГУ, 27-29 сентября 2001г.- Москва, 2001.- С. 6-7.
4. Кремено С.В. Влияние белков мембранного каркаса на активность Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов у больных инсулиннезависимым сахарным диабетом / С.В. Кремено // Сборник статей по материалам третьего конгресса молодых ученых и специалистов “Науки о человеке” СГМУ, 16 - 17 мая 2002 г.- Томск, 2002.- С. 111-112.
5. Исследование влияния карнозина на Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы эритроцитов человека при разной осмолярности среды инкубации / В.Д. Прокопьева, А.В. Ситожевский, С.В. Кремено, В.И. Корюкин, И.В. Петрова // Тезисы докладов по материалам VI международной конференции “Биоантиоксидант”, г. Москва, 16 – 19 апреля 2002г.- Москва, 2002 .- С. 477-478.
6. Исследование роли липидного матрикса и белков мембранного каркаса в регуляции Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов эритроцитов у больных алкоголизмом и сахарным диабетом II типа / В.Д. Прокопьева, И.В. Петрова, А.В. Ситожевский, С.В. Кремено, В.И. Корюкин, М.Б. Баскаков, Н.А. Бохан, В.В. Новицкий // Бюлл. эксперим. биологии и медицины.- 2002.- Т. 134, №10.- С. 401-404.
7. Кремено С.В. Объем-зависимая регуляция Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов у больных инсулиннезависимым сахарным диабетом / С.В. Кремено // Сборник тезисов Российского национального конгресса кардиологов “От исследований к клинической практике”, г. Санкт-Петербург, 8-12 октября 2002 г.- Санкт-Петербург, 2002.- С. 207.
8. Ситожевский А.В. Изменение калиевой проницаемости мембраны эритроцитов у больных сахарным диабетом 2 типа / А.В. Ситожевский, И.В. Петрова, С.В. Кремено // Тезисы докладов по материалам региональной научно-практической конференции “Сахарный диабет и сердечно-сосудистая патология”, г. Томск, 14-15 ноября 2002г.- Томск, 2002.- С. 23.
9. Кремено С.В. Исследование влияния инсулина на Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов человека / С.В. Кремено, Н.С. Старикова // Сборник статей по материалам четвертого конгресса молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”, СГМУ, 15-16 мая 2003 г.- Томск, 2003.- С. 40-41.
10. Старикова Н.С. Влияние внеклеточной концентрации ионов кальция на редокс-индуцированную калиевую проницаемость мембраны эритроцитов человека / Н.С. Старикова, С.В. Кремено // Сборник статей по материалам четвертого конгресса молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”, СГМУ, 15-16 мая 2003 г.- Томск, 2003.- С. 48-49.
11. Изучение объем-зависимой регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов в норме и у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией / Кремено С.В., Петрова И.В., Ситожевский А.В., Прокопьева В.Д., Коваленко Н.С., Новицкий В.В. // Бюлл. эксперим. биологии и медицины.- 2004.- Т. 137, № 1.- С. 31-34.

12. The erythrocyte cytoskeleton and Ca^{2+} -induced hyper-polarization in diabetes and alcoholism / V.D. Prokopieva, I.V. Petrova, A.V. Sitozhevskii, S.V. Kremeno, O.V. Tyulina, P. Johnson // Biochemical Society Meeting “Stress, signaling and control”, University of Essex, 2-4 July 2003.- London, 2003.- P. 34.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – артериальная гипертензия
 ГО – гиперполяризационный ответ
 ДТЭ – 1,4-дифитоэритритол
 ИБС – ишемическая болезнь сердца
 $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -канал – кальций-активируемый калиевый канал
 ЛПВП – липопротеины высокой плотности
 ЛПНП – липопротеины низкой плотности
 НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
 НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
 Редокс-индуцированный ГО эритроцитов – гиперполяризационный ответ эритроцитов, вызванный системой аскорбат-феназинметосульфат
 СД 2 типа – сахарный диабет 2 типа (инсулиннезависимый)
 ТЭА – тетраэтиламмоний
 ФМС- феназинметосульфат
 ЭГТА – этиленгликоль-бис (2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N¹,N¹-тетрауксусная кислота
 Cl-CCP – карбонилцианид-m-хлорфенилгидразон
 NEM – N-этилмалеимид

Автор выражает благодарность директору ГУ НИИ кардиологии Томского научного центра Сибирского отделения РАМН, академику РАМН Р.С. Карпову, с.н.с., к.м.н. Т.Е. Сусловой, н.с., к.м.н. А.В. Ситожевскому, с.н.с., к.м.н. О.А. Кошельской, в.н.с., д.б.н. В.Д. Прокопьевой, н.с., к.м.н. О.В.Груздевой за оказанное содействие в проведении настоящего исследования.

Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ
Заказ № ____ Тираж 100 экз.