

Возрастные особенности влияния инсулина на мембранный потенциал клеток пучковой зоны коры надпочечников

В сложной системе нейрогуморальной регуляции существенное значение имеют межэндокринные связи, изменение которых недостаточно изучено при старении. За последние годы [1—3] накоплены факты, подтверждающие, что секреторная активность клеток эндокринных желез во многом определяется мембранными механизмами, в частности поляризацией клеточной мембраны. Известна связь между секрецией тиреоидных, глюкокортикоидных гормонов и транспортом ионов К, Са, Na [1—3].

В межэндокринных взаимосвязях большое значение придается особенностям взаимодействия секреции инсулина и секреции глюкокортикоидов, играющих существенную роль в регуляции углеводного обмена и биосинтеза белка. Вместе с тем, до сих пор не изучены возрастные особенности влияния инсулина на биофизические параметры адренокортикоцитов (АКЦ). Актуальность проблемы связана с тем, что биофизические характеристики клетки, в частности ее мембранный потенциал (МП), являются своеобразной сигнальной системой, определяющей способность клетки реагировать на приходящие воздействия, выполняя тем самым функцию регулятора [5].

В связи с этим представляет интерес изучить возрастные особенности влияния инсулина на МП АКЦ пучковой зоны коры надпочечников, синтезирующих глюкокортикоиды, и проанализировать некоторые стороны механизма их действия, что и явилось целью нашей работы.

Методика

Исследования проведены на изолированных надпочечниках (ИН) крыс-самцов линии Вистар двух возрастных групп: взрослых (6—7 мес) и старых (26—28 мес). Определяли МП клеток пучковой зоны коры надпочечников. Животным обеих возрастных групп инсулин (1,6 Ед/кг) вводили внутривенно. Для предупреждения гипогликемии одновременно с инсулином животным внутривенно вводили 40 %-ный раствор глюкозы (5 мл/кг). Отдельным группам взрослых и старых животных за 40 мин до инъекции инсулина вводили внутривенно ингибитор Na, К-АТФазы оубаин (0,7 мг/кг) или блокатор калиевых каналов 2-аминопиридин (0,8 мг/кг), или ингибитор биосинтеза белка актиномицин Д (50 мкг/кг). Применение этих веществ в указанных дозах у контрольных животных не вызывало достоверных изменений МП АКЦ. Через 1 ч после введения инсулина животных декапитировали, извлекали оба надпочечника, разрезали пополам, фиксировали на пластмассовой подложке и помещали в инкубационные камеры. Для инкубации использовали раствор Кребса—Хенселейта ($t=37^\circ\text{C}$) с бикарбонатным буфером для стабилизации pH раствора в пределах 7,2—7,6 в течение опыта. Аэрацию раствора осуществляли постоянным пропусканием через него газовой смеси, содержащей 95 % кислорода и 5 % углекислого газа.

С целью обеспечения чистоты эксперимента (исключить возможное гиперполяризующее действие гипогликемии, развивающейся после введения инсулина) у части интактных животных обеих возрастных групп определяли влияние инсулина на МП АКЦ *in vitro*. Для этого выделенные надпочечники инкубировали в растворе Кребса—Хенселейта с инсулином, концентрация которого составляла 0,1 Ед/мл.

Регистрацию МП осуществляли с помощью стандартной микроэлектродной техники в течение 1,5 ч после извлечения надпочечников. Для измерения использовали микроэлектродный усилитель типа MZ-4 фирмы «Nichon—Conden» (Япония). Использовали стеклянные микроэлектроды (стекло марки «pireks»), заполненные 2,5 моль/л ра-

створом KCl, имеющие диаметр кончика менее 1 мкм, сопротивление 20—40 МОм и собственный потенциал не более 5 мВ. МП измеряли в течение 5—10 с после появления скачка потенциала при проникновении кончика микроэлектрода в клетку. За более продолжительный период регистрации МП наблюдалось градуальное снижение МП, обусловленное, вероятно, повреждением клеточной мембраны. Регистрируемые значения идентифицировали в соответствии с литературными данными о корреляции электрических потенциалов с гистологическими особенностями строения пучковой зоны коры надпочечников [12]. Определяли также активность Na^+ , K^+ -АТФазы гомогената надпочечников. С этой целью ИН гомогенизировали на холоду в буфере следующего состава: $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л *трис*-HCl, $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л дитиотрейтола, $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л фенилметилсульфанилфторида (pH 7,5). Активность Na^+ , K^+ -АТФазы определяли по методу, описанному Потапенко [4], концентрацию белка в пробах — по методу Лоури [11]. Контрольным животным вводили физраствор. Статистическую обработку результатов исследований проводили общепринятыми методами.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что в старости значение МП АКЦ пучковой зоны надпочечников не изменяется ($P > 0,05$). Внутривенное введение инсулина вызывает выраженную гиперполяризацию АКЦ, причем у старых животных увеличение значения МП под влиянием инсулина достоверно ниже, чем у взрослых. В механизме действия инсулина на состояние ПМ АКЦ, очевидно, играет роль прямое влияние гормона. Это подтверждается специальной серией опытов *in vitro*, проведенной нами в условиях инкубации ИН в растворе Кребса—Хенселейта с инсулином. Из таблицы видно, что инсулин, введенный *in vitro*, вызывает достоверную гиперполяризацию АКЦ животных обеих возрастных групп, при этом ИН взрослых животных также давали более выраженную реакцию на инсулин. Вместе с тем, необходимо учитывать, что в условиях целостного организма этот эффект может суммироваться с действием развивающейся постинсулиновой гипогликемии.

Влияние введения некоторых ингибиторов на инсулининдуцируемую гиперполяризацию плазматических мембран адренокортикоцитов

Воздействие	Мембранный потенциал	
	взрослых животных	старых животных
Контроль	$54,2 \pm 0,6$	$52,8 \pm 0,8$ $P_1 > 0,05$
Инсулин <i>in vivo</i>	$61,8 \pm 0,6$	$56,9 \pm 0,5$ $P_1 < 0,01$
	$P_2 < 0,05$	$P_2 < 0,01$
	$58,4 \pm 0,8$	$56,9 \pm 0,6$ $P_1 > 0,05$
	$P_2 < 0,01$	$P_2 < 0,01$
in vitro	$51,0 \pm 1,0$	$50,0 \pm 0,5$ $P_1 > 0,05$
	$P_2 > 0,05$	$P_2 < 0,05$
	$59,3 \pm 0,6$	$56,0 \pm 0,6$ $P_1 < 0,05$
	$P_2 < 0,01$	$P_2 < 0,05$
Оуабаин и инсулин	$54,4 \pm 0,08$	$53,3 \pm 0,7$ $P_1 > 0,05$
2-Аминопиридин и инсулин	$P_2 > 0,05$	$P_2 > 0,05$
Актиномицин Д и инсулин		

Примечание. P_1 — достоверность возрастных различий, P_2 — достоверность различий по сравнению с контролем.

Развитие гиперполяризации может быть связано с активацией Na^+ , K^+ -АТФазы или K^+ -каналов. Как видно из таблицы, оуабаин блокирует развитие инсулининдуцируемой гиперполяризации АКЦ и взрослых, и старых животных. Для блокады K^+ -каналов был использован

2-аминопиридин. Опыты показали, что этот блокатор не предупреждает развития гиперполяризации АКЦ животных обеих возрастных групп. Дозы препаратов подбирали такие, которые сами по себе не вызывали достоверной деполяризации ПМ АКЦ. Результаты опытов позволяют сделать вывод, что развитие гиперполяризации АКЦ связано с активацией Na^+ , K^+ -насоса.

Для подтверждения предположения о ведущей роли активного транспорта ионов в механизме инсулининдуцированной гиперполяризации ПМ АКЦ определяли активность Na^+ , K^+ -АТФазы гомогената надпочечников животных обеих возрастных групп до и после инъекции инсулина. Установлено, что внутрибрюшинное введение инсулина вызывает достоверную активацию Na^+ , K^+ -АТФазы гомогената надпочечников и взрослых, и старых животных, которая более выражена у взрослых крыс. Так, активность Na^+ , K^+ -АТФазы контрольных взрослых животных составляла $4,9 \pm 0,7$, а у животных, которым вводили инсулин, — $(8,1 \pm 0,9)$ пмоль $\text{P}_i \cdot \text{мг}^{-1}$ белка $\cdot \text{мин}^{-1}$ ($P < 0,05$). Активность Na^+ , K^+ -АТФазы контрольных старых животных составляла $5,8 \pm 0,9$, активность Na^+ , K^+ -АТФазы старых животных, инъектированных инсулином, — $(8,7 \pm 0,5)$ пмоль $\text{P}_i \cdot \text{мг}^{-1}$ белка $\cdot \text{мин}^{-1}$ ($P < 0,05$).

Работами Фролькиса и соавт. [5, 7] показано, что развитие гиперполяризации ПМ клеток различных тканей, наблюдающееся под действием некоторых гормонов, сопряжено с активацией белоксинтезирующих процессов. В наших опытах был использован актиномицин Д, блокирующий транскрипцию. Как следует из таблицы, на фоне действия актиномицина Д инсулин не вызывает увеличения МП АКЦ животных обеих возрастных групп. Не существует единого мнения о возможном механизме развития инсулининдуцируемой гиперполяризации ПМ. Предполагают, что в основе гиперполяризующего действия инсулина на ПМ лежат стимуляция Na^+/H^+ -обмена [10], значительное снижение натриевой проницаемости мембран при относительно небольшом снижении калиевой [13]. Большинство же авторов полагают, что инсулин стимулирует Na^+/K^+ -обмен активацией Na^+/K^+ -насоса [9, 14], что снижает внутриклеточное содержание натрия и тем самым гиперполяризует мембрану. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что гиперполяризующее действие инсулина на плазматические мембраны адренокортикоцитов пучковой зоны коры надпочечников преимущественно связано со стимуляцией активного транспорта ионов вследствие значительной стимуляции Na^+/K^+ -насоса, и зависит от белоксинтезирующих процессов.

Выводы

1. Не обнаружено существенных возрастных различий МП АКЦ пучковой зоны коры надпочечников взрослых и старых крыс.
2. В опытах *in vivo* и *in vitro* инсулин вызывает гиперполяризацию ПМ АКЦ изолированных надпочечников.
3. Под влиянием инсулина повышается активность Na^+ , K^+ -АТФазы изолированных надпочечников животных обеих возрастных групп; оубаин блокирует инсулининдуцируемую гиперполяризацию АКЦ.
4. Влияние инсулина на МП АКЦ изолированных надпочечников более выражено у взрослых животных, чем у старых.

G. M. Tyukhtin

AGE PECULIARITIES OF INSULIN EFFECT ON THE MEMBRANE POTENTIAL OF CELLS OF ADRENOCORTICAL ZONA FASCICULATE

The value of the membrane potential of adrenocorticoocytes (ACC) in zona fasciculata of isolated adrenal (IA) cortex and the activity of Na , K -ATPase of IA homogenate is determined in adult (6-7 months) and old (26-28 months) male Wistar rats. No significant

age differences are found in the above indices. Administration of insulin in vivo (1.6 U/kg) and in vitro (0.1 U/ml) induced hyperpolarization of ACC plasmic membranes. Insulin increases the activity of Na, K-ATPase of IA in animals of both age groups. Ouabain and actinomycin D blocks the insulin-induced hyperpolarization of ACC, while 2-aminopyridine has no effect on this process. Insulin effect on the MP of IA ACC is less pronounced in old vs. adult animals.

Institute of Gerontology, Academy
of Medical Sciences of the USSR, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горбань Е. Н. Возрастные особенности влияния тиротропного гормона на мембранный потенциал клеток щитовидной железы // Физиол. журн.— 1979.— 25, № 6.— С. 395—401.
2. Горбань Е. Н., Файзуллин В. В. Старение секреторных клеток // Физиологические механизмы старения.— Л.: Наука, 1982.— С. 19—34.
3. Золов Г. К., Слепушкин В. Д., Ивакин С. Н., Пак Л. М. Влияние ионов кальция на глюкокортикоидную функцию надпочечников // Пробл. эндокринологии.— 1985.— 25, № 5.— С. 69—71.
4. Потапенко Р. И. Возрастные особенности влияния ацетилхолина, норадреналина и вазопрессина на активность Na, K-АТФазы плазматических мембран нервных окончаний мозга крыс // Нейрохимия.— 1986.— 5, № 1.— С. 57—59.
5. Фролькис В. В. Изменения связи между активностью генетического аппарата и уровнем поляризации мембраны клетки — важный механизм старения // Физиологические и молекулярные аспекты онтогенеза.— Киев, 1977.— С. 35—42.
6. Фролькис В. В., Ступина А. С. Структура и функция клетки // Общая биология старения.— Л.: Наука, 1982.— С. 213—235.
7. Фролькис В. В., Парамонова Г. И., Гольдштейн Н. Б. Влияние гиперполяризации плазматической мембраны на состояние хроматина и биосинтеза белка гепатоцитов крыс разного возраста // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1987.— № 3.— С. 79—81.
8. Clausen N. T., Flatman J. A. Effects of insulin and glucose transport in soleus muscle // *Aver. J. Physiol.*— 1987.— 252, N 4.— P. 492—499.
9. Craciun M., Agrigoroaei St., Jitariu P. Insulin and (Na—K) pump. // *Rev. roum. biol. Ser. biol. anim.*— 1981.— 26, N 2.— P. 171—176.
10. Kernan R. P. Insulin-induced changes in intracellular sodium activity and pH in ouabaininhibited frog sartorii measured by ion-selective micro-electrodes // *J. Physiol.*— 1984.— 355.— P. 16—24.
11. Loury O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. G. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.*— 1951.— 193, N 1.— P. 265—275.
12. Matthews E. K. Membran potential measurement in cells of the adrenal glands // *J. Physiol.*— 1967.— 189.— P. 139—148.
13. Zierler K. Actions of insulin on electrical potential differens across cell membranes // *Mol. Basis Insulin Act.*— New York, London, 1985.— P. 119—133.
14. Rosic N. K., Stanaert M. L., Pollet R. J. The mechanism of insulin stimulation of (Na, K) — ATPase transport activity in muscle // *J. Biol. Chem.*— 1985.— 260, N 10.— P. 6206—6212.

Ин-т геронтологии АМН СССР, Киев

Материал поступил
в редакцию 28.03.90