

С.В. Кириченко, С.М. Тишкін, В.Є. Досенко, О.О. Мойбенко, А.І. Соловійов

Функціонально-молекулярні зміни кальційзалежних калієвих каналів великої провідності у гладенько-м'язових клітинах аорти щура після дії іонізуючого опромінення

Исследовали влияние общего однократного γ -облучения (6 Гр) на функциональную активность кальцийзависимых калиевых каналов большой проводимости и экспрессию мРНК их структурных компонентов – пороформирующей α - и регулирующей $\beta 1$ -субъединиц в гладкомышечных клетках аорты крысы. Было установлено, что радиация значительно ингибирует входящий ток через эти каналы. Такой эффект проявлялся на 9-е и усиливался на 30-е сутки после облучения животного. Селективный блокатор кальцийзависимых калиевых каналов большой проводимости паксиллин не оказывал влияния на выходящий ток в гладких мышечных клетках после воздействия радиации, что говорит об отсутствии проводимости через эти каналы. На 30-е сутки пострадиационного периода было зарегистрировано существенное уменьшение экспрессии мРНК α - и $\beta 1$ -субъединиц, чем частично и объясняется снижение роли указанных каналов в регуляции тонуса сосудов.

ВСТУП

Відомо, що іонізуюча радіація, навіть у сублетальних дозах призводить до розладів скоротливої активності судин внаслідок пригнічення ендотеліязалежної вазодилатації [9]. Ці аномалії судинного тонузу пов'язані, насамперед, з селективним пошкодженням NO-залежного компонента вазодилатації, котрий може призводити до пригнічення кальційзалежних калієвих каналів великої провідності ($ВК_{Ca}$) в ендотеліальних клітинах коронарних судин щура [10]. Дія радіації також спричинює збільшення констрикторної здатності судин [7]. Встановлено, що опромінення підвищує чутливість міофіламентів до Ca^{2+} і цей ефект залежить від активації протеїнкінази С [7]. Таким чином, скоротливість судин після дії радіації може збільшуватися і незалежно від ендотелію.

Один із можливих шляхів збільшення судинного тонузу пов'язаний зі змінами трансмембранного потенціалу гладеньких м'язових клітин (ГМК), у регуляції якого важливу роль відіграють калієві канали. Мембранна гіперполяризація, викликана активацією цих каналів, призводить до закриття потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу, що є одним із головних факторів, які відповідають за розслаблення [4].

Відомо, що $ВК_{Ca}$ -канали – складні гетероолігомерні білки, утворені тетраметрами пороформуючих α -субодиниць і регуляторними $\beta 1$ -субодиницями, що здійснюють модифікацію ворітних механізмів каналу, визначають кальцієву- та потенціалчутливість [3, 6] і кодуються єдиним геном Slo ($Slo1$, $KCNMA1$) [5]. $ВК_{Ca}$ -канали беруть участь у здійсненні багатьох життєво важливих функцій. Зокрема вони задіяні в процесах реполяризації та підтри-

© С.В. Кириченко, С.М. Тишкін, В.Є. Досенко, О.О. Мойбенко, А.І. Соловійов

манні судинного тону.

Метою нашої роботи було вивчення функціональної активності $ВК_{Ca}$ -каналів і експресії мРНК їх α - та β 1-субодиниць у ГМК аорти щура в різні терміни після дії іонізуючого γ -випромінювання.

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на свіжо-ізолюваних поодиноких ГМК аорти щура. Клітини виділяли інкубацією шматочків аорти протягом 30 хв при 37°C у номінально безкальцієвому розчині Кребса з розчиненими в ньому колагеназою (тип ІА, 2 мг/мл), проназою Е (0,5 мг/мл), сироватковим альбуміном бика (2 мг/мл) то подальшим промиванням від ферментів і піпетуванням.

Трансmemбранні струми вимірювали у режимі фіксації мембранного потенціалу – методика «patch-clamp» у конфігурації «ціла клітина» із використанням антибіотика амфотерицину В. Мікропіпетки були виготовлені з боросилікатного скла («Clark Electromedical Instruments», Великобританія) та заповнені розчином такого складу (ммоль/л): KCl – 140, NaCl – 10, $MgCl_2$ – 1,2, HEPES – 10, $CaCl_2$ – 2,5, D-глюкоза – 11,5 (pH 7,2), а також амфотерицином В – 250 мкг/мл. Опір піпеток становив 2,5–5 МОм. Зовнішній розчин містив (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 5,9, $CaCl_2$ – 2,5, $MgCl_2$ – 1,2, HEPES – 10, D-глюкоза – 11,5 (pH 7,4). Номінально безкальцієвий розчин мав такий склад (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 5,9, $MgCl_2$ – 2,5, HEPES – 10, D-глюкоза – 11,5 (pH 7,4). Експерименти проводили при кімнатній температурі (20°C).

Іонні струми реєстрували за допомогою підсилювача («Axopatch 200B», США) та програмного забезпечення (pClamp Software V.6.02, «Axon Instruments Inc.», США). Сигнал з виходу перетворювача струм–напруга надходив через фільтр низьких частот (смуга частоти до 2 кГц) на аналогово-цифровий перетворювач і оцифровувався з частотою дискретизації 10

кГц. Типові значення мембранного опору клітин у наших експериментах становили 2–5 ГОм. Макроскопічні струми були нормалізовані до пікоампер на пікофаради (пА/пФ).

Тотальну РНК виділяли з торакальної аорти щура за допомогою набору Trizol RNA-prep («Isogen», Росія). Концентрацію РНК визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop ND 1000 («NanoDrop Technologies Inc.», США). кДНК синтезували з використанням випадкового шестинуклеотидного рандомізованого праймера та зворотної транскриптази RevertAid™ H Minus («Fermentas», Литва) на однаковій кількості тотальної РНК (1,2–1,5 мкг). Напівкількісну полімеразно-ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в об'ємі 25 мкл реакційної суміші, яка містила 5 мкл 5-кратного буфера для ПЛР з $MgCl_2$, 0,2 ммоль суміші дезоксинуклеотидтрифосфатів, 10 Од Taq полімерази («AmpliSense», Росія) та по 40 пмоль праймерів для відповідних генів:

α -субодиниця $ВК_{Ca}$ -каналів: Up – 5'-TAC TTC AAT GAC AAT ATC CTC ACC CT-3' ; Dw – 5'-ACC ATA ACA ACC ACC ATC CCC TAA G-3';

β 1-субодиниця $ВК_{Ca}$ -каналів: Up – 5'-GTA TCA CAC AGA AGA CAC TCG GGA-3' та Dw – 5'-AAG AAG GAG AAG AGG AGG ATT TGG G-3'.

Ампліфікація фрагментів $ВК_{Ca}$ -каналів включала 43 цикли, кожен з яких складався з таких етапів: денатурації ДНК при 94°C (45 с), аннелінгу праймерів при 62,5°C (45 с) та елонгації при 72°C (45 с) («GeneAmp System 2700», «Applied Biosystem», США). Для контролю якості ізолюваної РНК і порівняння інтенсивності експресії генів $ВК_{Ca}$ -каналів було використано фрагмент гена β -актину. Продукти ПЛР детектували в 1,6%-му агарозному гелі з бромідом етидіуму. Візуалізацію та оцінку інтенсивності світіння ампліфікованих фрагментів після горизонтального електрофорезу (160 В протягом 30 хв) здійснювали

у транслюмінаторі з програмним забезпеченням Vitran («Biosom», Росія).

Дослідження функціональної активності $ВК_{Ca}$ -каналів та експресії мРНК їх структурних компонентів проводили на інтактних щурах (1-ша група, $n=10$) та на тваринах на 9-ту та 30-ту добу після їх опромінення (2-га і 3-тя групи, $n=10$ і $n=12$ відповідно). Дослідні тварини підлягали загальному одноразовому зовнішньому γ -опроміненню з використанням джерела ^{60}Co («ТГТ Рокус-М», Росія). Потужність при опроміненні становила $0,833$ Гр/хв, доза – 6 Гр.

Для приготування розчинів використовували реактиви виробництва компанії «Sigma» (США).

Обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми Origin 7.5. Їх представлено у вигляді середнього арифметичного (M) та стандартної похибки середнього арифметичного (m) для певної вибірки (n). Аналіз результатів “patch-

clamp”-експериментів було проведено за допомогою програмного забезпечення pCLAMP версія 6.02 («Axon Instruments Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У першій серії експериментів досліджували функціональну активність $ВК_{Ca}$ -каналів у ГМК аорти інтактних щурів і тварин на 9-ту і 30-ту добу після їх опромінення. Було встановлено, що в ГМК аорти контрольних щурів при ступінчастих деполяризувальних зміщеннях мембранного потенціалу тривалістю 300 мс від підтримуваного потенціалу -60 мВ виникали калієві струми вихідного напрямку з густиною $36,4$ пА/пФ $\pm 2,9$ пА/пФ ($n=5$) при $+70$ мВ (рис. 1). Вихідні струми в ГМК, отриманих від тварин на 9-ту та 30-ту добу після опромінення, демонстрували зменшення густини до $22,8 \pm 1,9$ ($n=5$) та $6,5$ пА/пФ $\pm 0,9$ пА/пФ ($n=5$)

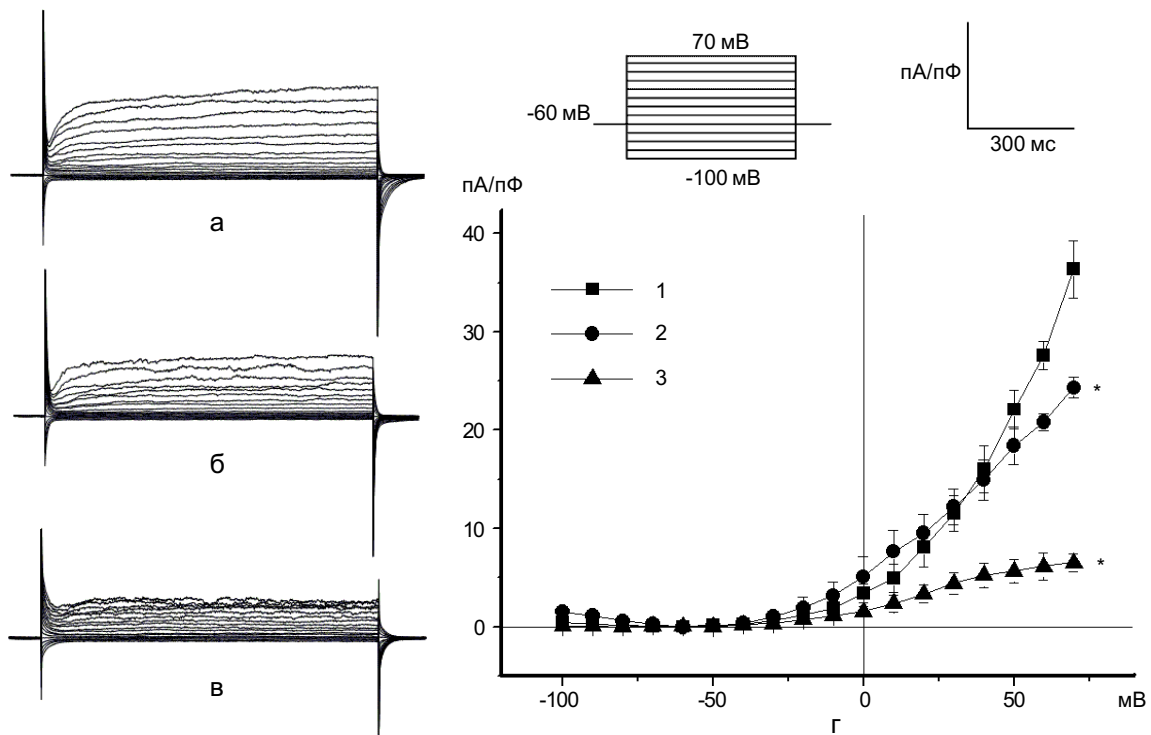


Рис.1. Вплив γ -випромінення на вихідний калієвий струм у гладеньком'язових клітинах (ГМК) торакальної аорти щурів: а, б, в – оригінальні записи струмів, зареєстрованих у ГМК аорти інтактних щурів та на 9-ту і 30-ту добу після опромінення; г – їх вольт-амперні характеристики: 1 – контроль; 2 – 6 Гр, 9-та доба; 3 – 6 Гр, 30-та доба. * $P < 0,05$

відповідно. Суттєвих змін потенціалу реверсії після опромінення для цих сумарних струмів не виявлено.

Для визначення природи вихідного струму, нами було використано відомий селективний блокатор VK_{Ca} -каналів – паксилін [3]. Аплікація паксиліну (500 нмоль) викликала різке зменшення вихідного калієвого струму в ГМК контрольних шурів – до $4,4 \text{ пА/пФ} \pm 0,4 \text{ пА/пФ}$ ($n=5$), знижувалися також його осциляції (рис. 2.). Густина вихідного струму при додаванні паксиліну на 9-ту та 30-ту добу після опромінення вірогідно не змінювалася ($24,3 \pm 1,0$ та $19,3 \pm 3,2$ на 9-ту добу і $6,5 \pm 0,9$ та $7,6 \text{ пА/пФ} \pm 1,3 \text{ пА/пФ}$ на 30-ту добу до та після дії паксиліну, $P > 0,05$). Це вказує на відсутність провідності через VK_{Ca} -канали.

Таким чином, при γ -опроміненні тварин порушується функціональна активність VK_{Ca} -каналів у гладеньких м'язах судинної стінки. В свою чергу, це може бути одним з механізмів збільшення судинного тонуусу в пострадіаційному періоді, який пов'язаний зі змінами в трансмембранному потенціалі ГМК судин.

Дані медичної статистики свідчать, що судинні дисфункції займають перше місце в переліку хвороб, пов'язаних з Чорнобильськими подіями [1]. Найбільш серйозними з них (з точки зору зниження працездатності та якості життя) є артеріальна гіпертензія та ішемічна хвороба серця, які становлять близько 80 % від загальної кількості серцево-судинних захворювань. Оскільки клітинні механізми індукованих радіацією серцево-судинних порушень до цього часу не встановлені, стає зрозумілим, що їх вивчення є досить актуальним.

Раніше було продемонстровано, що через 9 діб після опромінення у шурів значно підвищувався систолічний кров'яний тиск, і цей ефект зберігався протягом 6 міс [8].

Ендотелій є найбільш вразливим і радіочутливим компонентом судинної стінки. Однак бракує даних щодо прямого впливу опромінення на ГМК, що значно

ускладнює фармакотерапію викликаних радіацією судинних розладів і гіперско-

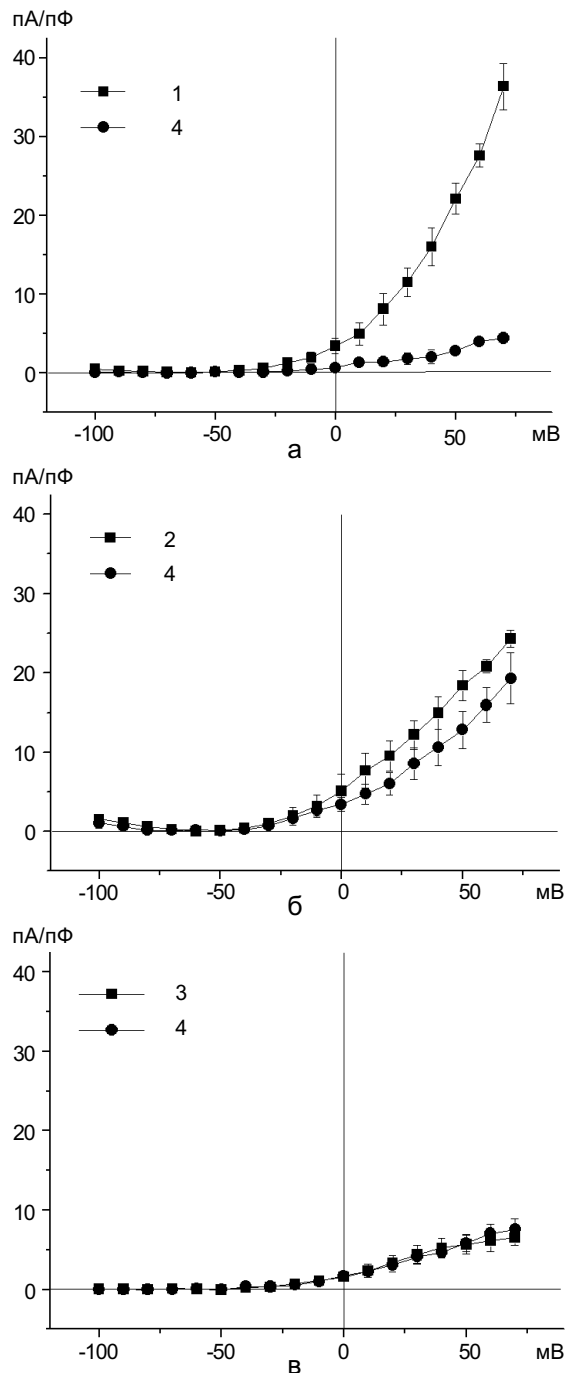


Рис. 2. Дія паксиліну на вихідний струм у гладеньком'язових клітинах аорти інтактних шурів (а) та на 9-ту (б) і 30-ту добу (в) після дії γ -випромінення: 1 – контроль; 2 – 6 Гр, 9-та доба; 3 – 6 Гр, 30-та доба; 4 – паксилін.* $P < 0,05$ при потенціалі +70 мВ

ротливості. Отримані результати свідчать, що одним з можливих механізмів розвитку судинних дисфункцій внаслідок опромінення є порушення діяльності VK_{Ca} -каналів у ГМК судинної стінки, котрі є одними з головних регуляторів мембранного потенціалу в цих клітинах.

У другій серії експериментів досліджували експресію α - та $\beta 1$ -субодиниць VK_{Ca} -каналів у ГМК аорти інтактних та опромінених щурів. Треба було встановити який із структурних компонентів каналу є більш чутливим до радіації. Для цього застосували метод ПЛР з використанням зворотної транскрипції (рис. 3, 4). Слід

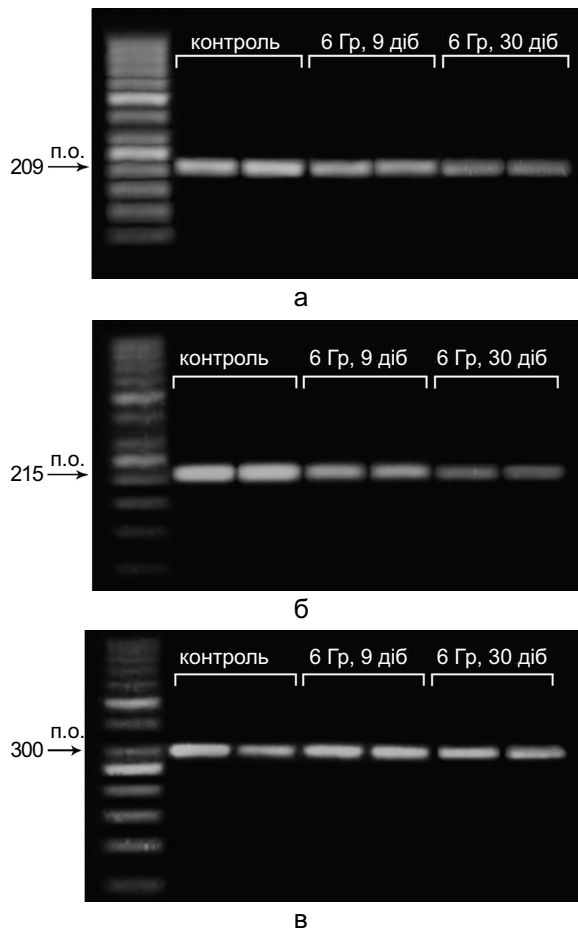


Рис. 3. Інтенсивність експресії мРНК α - та $\beta 1$ -субодиниць VK_{Ca} -каналів у гладеньком'язових клітинах аорти щурів після дії іонізуючого опромінення: а – α -субодиниця; б – $\beta 1$ -субодиниця; в – β -актин; п.о. – пари основ нуклеотидів

відмітити, що рівень експресії α -субодиниці VK_{Ca} -каналів на 9-ту добу після опромінення суттєво не змінювався (від $0,8 \pm 0,05$ до $0,7$ відн.од. $\pm 0,07$ відн.од. ($P > 0,05$, $n = 6$), в той час як на 30-ту добу значно зменшувався до $0,6$ відн.од. $\pm 0,02$ відн.од. ($P < 0,05$, $n = 10$). Рівень експресії мРНК $\beta 1$ -субодиниці в опромінених тканинах був незначно зменшений на 9-ту добу – з $0,8 \pm 0,01$ до $0,6$ відн.од. $\pm 0,08$ відн.од. ($P > 0,05$, $n = 6$), і цей пригнічувальний ефект радіації чітко прослідковувався на 30-ту добу після опромінення (до $0,4$ відн.од. $\pm 0,02$ відн.од., $P < 0,01$, $n = 10$).

Експерименти з використанням методу ПЛР чітко продемонстрували, що рівень мРНК як α - так і $\beta 1$ -субодиниці VK_{Ca} -каналу у ГМК аорти був помітно нижчим у опромінених щурів, внаслідок чого і може зміншуватися вазорелаксуюча сила цих каналів у кровоносних судинах, які зазнали дії іонізуючого опромінення. Водночас $\beta 1$ -субодиниця, є дещо чутливішою до опромінення. Раніше було показано, що генетично-модифіковані тварини без $\beta 1$ -субодиниці VK_{Ca} -каналу мають збільшення скоротливості судин та підвищений артеріальний тиск, а зменшення експресії цього білка виявлено на моделях гіпертонії у

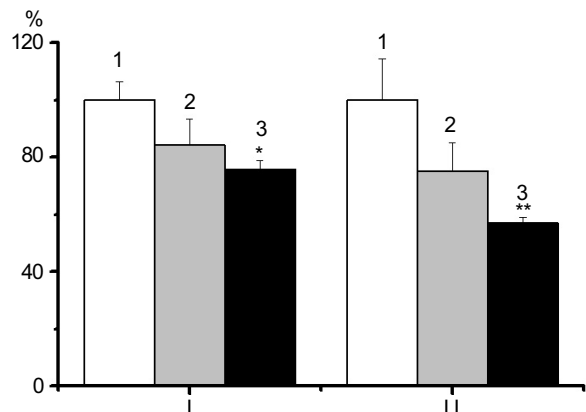


Рис. 4. Вплив іонізуючої радіації на рівень мРНК α - та $\beta 1$ -субодиниць VK_{Ca} -каналів у гладеньком'язових клітинах аорти щура. Показники експресії α та $\beta 1$ -субодиниць нормалізовано за рівнем експресії β -актину: I – α -субодиниця, II – $\beta 1$ -субодиниця; 1 – контроль, 2 – 6 Гр, 9-та доба, 3 – 6 Гр, 30-та доба. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

щурів [2]. Наступні дослідження в цьому напрямку можуть допомогти ідентифікувати нові мішені для терапевтичного втручання та намітити стратегію створення більш специфічних антигіпертензивних ліків.

Таким чином, було встановлено, що іонізуюча радіація призводить до прогресуючого з часом пригнічення вихідного струму через BK_{Ca} -канали ГМК аорти щура. На 30-ту добу після опромінення тварин реєструється суттєве зменшення експресії мРНК α - та $\beta 1$ -субодиниці цих каналів. Гіперскоротливість судин і, як наслідок, розвиток артеріальної гіпертензії в пострадіаційний період, може бути викликана дефіцитом BK_{Ca} -провідності у ГМК судинної стінки.

**S.V.Kyrychenko, S.M.Tishkin,
V.E.Dosenko, O.O.Moybenko, A.I.Soloviev**

FUNCTIONAL AND MOLECULAR CHANGES OF BK_{Ca} CHANNELS IN RAT AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS AFTER IONIZING IRRADIATION

The effects of whole body γ -irradiation on large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels (BK_{Ca}) function and mRNA expression in rat thoracic aorta smooth muscle cells (SMCs) were studied using combined patch-clamp technique in whole-cell modification and RT-PCR analysis. The stimulation of control SMCs by increasingly depolarized voltage steps showed clearly expressed outward K^{+} currents in control SMCs. Outward currents in SMCs obtained from irradiated animals on the 9th and 30th days post-irradiation demonstrated a significant decrease of K^{+} current density amplitudes. Paxillin was without effect on irradiated cells on 30th day post-irradiation indicating the absence of conductance through BK_{Ca} channels. The results of RT-PCR analysis showed that expression both α -subunit and $\beta 1$ -subunit of BK_{Ca} channels appears to be considerably diminished on 30th day post-irradiation. It is likely that radiation-induced malfunction functional activity of channels is related with insufficient expression of BK_{Ca} structural elements in SMCs. In conclusion, the data obtained clearly demonstrate that decreased of the BK_{Ca} channels α - and $\beta 1$ -subunit expression in SMCs is a key factor of abnormality in BK_{Ca} channels activity. This abnormal-

ity may contribute to vasorelaxing force depression following non-fatal whole-body γ -irradiation.

State institution "Institute of Pharmacology and Toxicology AM S of Ukraine", Kyiv;

Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Стан здоров'я потерпілого населення України через 20 років після Чорнобильської катастрофи. Статистично-аналітичний довідник у 2-х частинах. – Ч. II. – К.: НДВП «Техмедкол», 2007. – 254 с.
2. Amberg G.C., Santana L.F. Downregulation of the BK channel $\beta 1$ -subunit in genetic hypertension // *Circulat. Res.* – 2003. – **93**. – P. 965–971.
3. Chung S.H., Andersen O.S., Krishnamurthy V.V. Biological membrane ion channels dynamics, structure, and applications series: Biological and medical physics, biomedical engineering. – NY.: Springer Science+BusinessMedia, 2006. – 658 p.
4. Ledoux J., Werner M.E., Brayden J.E. et al. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone // *Physiology*. – 2006. – **21**. – P. 69–78.
5. Lu R., Alioua A., Kumar Y. et al. Maxi K channel partners: physiological impact // *J. Physiol.* – 2006. – **570**. – P. 65–72.
6. Orio P., Rojas P., Ferreira G. et al. New disguises for an old channel: MaxiK channel β -subunit // *News Physiol. Sci.* – 2002. – **17**. – P.151–161.
7. Soloviev A., Tishkin S., Zelensky S. et al. Ionizing radiation alters myofilament calcium sensitivity in vascular smooth muscle: potential role of protein kinase C // *Amer. J. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2005. – **289**. – P. R755–R762.
8. Soloviev A.I., Stefanov A.V., Tishkin S.M. et al. Saline containing phosphatidylcholine liposomes possess the ability to restore endothelial function damaged resulting from γ -irradiation // *J. Physiol. and Pharm.* – 2002. – **53**, №. 4. – P. 701–702.
9. Soloviev A.I., Tishkin S.M., Parshikov A.V. et al. Mechanisms of endothelial dysfunction after ionized radiation: selective impairment of the nitric oxide component of endothelium-dependent vasodilatation // *Brit. J. Pharmacol.* – 2003. – **138**, № 8. – P. 837–844.
10. Tishkin S.M., Recalov V.V., Ivanova I.V. et al. Ionizing non-fatal whole-body irradiation inhibits Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in endothelial cells of rat coronary artery: Possible contribution to depression of endothelium-dependent vascular relaxation // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2007. – **83**, № 3. – P. 161–169.

*ДУ «Ін-т фармакології та токсикології АМН України»,
Київ;*

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: ksv.neuro@mail.ru*

*Матеріал надійшов до
редакції 12.03.2008*