

Д.А. Кришталь, О.М. Падурау, О.І. Болдирєв,
О.Ю. Кіт, В.В. Рекалов Я.М. Шуба

Зміни кальційзалежної калієвої провідності ізолюваних гладеньком'язових клітин сечового міхура щурів при експериментальному діабеті

Активация кальційзалежних калієвих каналів великої провідності (ВК-канали) впливає на реполяризацію мембрани під час генерації потенціалу дії та на потенціал спокою гладеньком'язових клітин (ГМК) детрузора. Одним із ускладнень діабету є синдром гіперактивного сечового міхура (СГАСМ). З використанням методу patch-clamp було встановлено значне зменшення калієвого струму через ВК-канали (I_{BK}) ізолюваних ГМК детрузора щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом порівняно з контрольними тваринами, а також пригнічення амплітуди та частоти ВК-опосередкованих спонтанних транзйентних вихідних струмів (СТВС). При діабеті густина I_{BK} викликаного деполяризацією мембрани до +50 мВ, становила $10,0 \text{ nA/nF} \pm 0,5 \text{ nA/nF}$ (у контролі $15,0 \text{ nA/nF} \pm 0,4 \text{ nA/nF}$), середні значення частоти й амплітуди СТВС при підтримуваному потенціалі -20 мВ знижувалися з $12,0 \pm 1,5$ до $2,4 \text{ Гц} \pm 0,6 \text{ Гц}$ та з $0,9 \pm 0,1$ до $0,5 \text{ nA/nF} \pm 0,1 \text{ nA/nF}$ відповідно. За допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції показано, що при діабеті збільшується експресія мРНК основної, пороформуальної $K_{Ca}1.1$ -субодиниці ВК-каналу та зменшується – його допоміжної $VK_{Ca}\beta1$ -субодиниці. Зроблено висновок, що виявлені зміни у струмах через ВК-канали при діабеті можуть підвищувати збудливість ГМК детрузора та зумовлювати виникнення міогенного СГАСМ. Однак потрібні додаткові дослідження того, яким чином зниження експресії $VK_{Ca}\beta1$ позначається на функціональних властивостях ВК-каналу та для встановлення типу і спрямованості змін кальцієвих сигналів, що впливають на активацію цього каналу при діабеті.

Ключові слова: сечовий міхур, детрузор, гладенькі м'язи, діабет, кальційзалежні калієві канали, ВК-канали.

ВСТУП

Серед багатьох ускладнень, пов'язаних із діабетом, спонтанне сечовипускання значно погіршує якість життя хворого, що зумовлює важливість дослідження механізмів формування цього ускладнення для розробки ефективних методів його корекції. Нині добре відомим є холінергічний (парасимпатичний) механізм скорочення детрузора (гладеньком'язова тканина сечового міхура), а тому основним лікуванням спонтанного сечовипускання є застосування селективних антагоністів мускаринових

M_3 -холінорецепторів детрузора та ботулотоксину А, який, зв'язуючись із пресинаптичними холінергічними нервовими закінченнями, блокує вивільнення ацетилхоліну із синаптичних везикул [11]. Проте ці препарати мають значні побічні дії. Тому актуальним залишається детальне вивчення також інших механізмів активації та регуляції скорочення детрузора і пошук на їх основі нових мішеней для терапевтичного втручання. Кальційзалежні калієві канали великої провідності (ВК-канали, відомі ще як $MaxiK$, $K_{Ca}1.1$, $Slo1$, $KCNMA1$) є одним із найбільш широко представлених типів

© Д.А. Кришталь, О.М. Падурау, О.І. Болдирєв, О.Ю. Кіт, В.В. Рекалов Я.М. Шуба

калієвих каналів у мембрані гладеньком'язових клітин (ГМК) детрузора, а їх активація є основним механізмом реполяризації мембрани під час генерації потенціалу дії (ПД) [2–4]. У мишей з нокаут-ваними пороформуальною α -, або допоміжною β -субодиницями ВК-каналів збільшені фазні скорочення детрузора та спостерігається витікання сечі [8, 10] – симптоми, схожі із синдромом гіперактивного сечового міхура (СГАСМ) і нетримання сечі людини.

Мета роботи – виявлення можливих відмінностей у активації та експресії ВК-каналів у нормальних щурів і щурів з діабетом для використання фармакологічної корекції спонтанного сечовипускання у перспективі.

МЕТОДИКА

Модель діабету щурів. Усі експерименти над тваринами проводили відповідно до норм Європейської Конвенції із захисту хребетних тварин при їх використанні в експериментах та інших наукових цілях (Страсбург, 18 березня 1986 р. ETS N 123). Лабораторних щурів лінії Вістар масою 150–200 г утримували на стандартному раціоні віварію. Діабет у тварин викликали одноразовим інтраперитоніальним введенням розчину стрептозотоцину (СТЦ) («Sigma-Aldrich», США) в 1 М цитратному буфері (рН 5,5) в дозі 45 мг/кг. Щурів використовували в експерименті через 8 тиж після ін'єкції, якщо вміст глюкози в крові перевищував 250 мг/л і при наявності інших ознак захворювання.

Ізоляція ГМК детрузора. Щурів анестезували пентабарбіталом (500 мг/кг) та декапітували. Після розтину черевної порожнини сечовий міхур вилучали та поміщали у безкальцієвий розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 135, KCl – 6, MgCl₂ – 1,2, D-глюкоза – 10, HEPES – 10; рН 7,45 (доводили за допомогою NaOH). Сечовий міхур розрізали на смужки, які механічно очищали від уротелію.

Ізольовані ГМК детрузора отримували інкубацією в 1 мл безкальцієвого розчину Кребса з додаванням 1 мг колагенази (Type XI, «Sigma-Aldrich», США) і 0,2 мг протеази («Protease Calbiochem», США). Інкубацію проводили при 36° С протягом 35 хв. Після ферментативної обробки смужки відмивали від ферментів безкальцієвим розчином Кребса, розрізали на шматочки та подрібнювали пастерівською піпеткою до отримання суспензії клітин, яку потім поміщали в холодильник.

Електрофізіологічні дослідження. Реєстрації іонних струмів ізольованих ГМК детрузора проводили з використанням методу patch-clamp у конфігурації “ціла клітина” в режимі фіксації потенціалу при кімнатній температурі (20–23 °С). Апаратна частина установки складалася з інвертованого мікроскопа “Olympus”, електрофізіологічного підсилювача «Axopatch 200B», інтерфейс Digidata 1300 (обидва пристрої від фірми «Axon Instruments, Inc.», США) та персонального комп'ютера. Управління експериментом та аналіз результатів забезпечувалися програмним пакетом pClamp 8.0 («Axon Instruments, Inc.», США). Відвідні мікропіпетки виготовляли із боросилікатного скла («WPI», США) на програмованій горизонтальній витяжці («Sutter Instruments», США). Опір мікропіпеток був у діапазоні 5–7 МОм при їх заповненні базовим внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): KCl – 140, HEPES – 10, EGTA – 0,3, MgATФ – 1; рН 7,3 (доводили NaOH). Зовнішньоклітинний розчин Кребса містив (ммоль/л): NaCl – 135, KCl – 6, CaCl₂ – 5, MgCl₂ – 2,5, D-глюкоза – 10, HEPES – 10; рН 7,45 (доводили NaOH).

Для усунення розбіжностей у значеннях вимірювальних струмів, пов'язаних із розміром ГМК, їх при порівнянні нормували за ємністю мембрани клітини для отримання густини струму в пікоамперах на пікофаради.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) із зворотною транскрипцією. Процедура проведення кількісної ПЛР у реальному часі не відрізнялася від описаної раніше [1]. Для зворотної транскрипції використовували сумарну РНК, виділену з очищеного від уротелію детрузора сечового міхура контрольних щурів і щурів з діабетом. З отриманої кДНК ампліфікували фрагменти, що належать кДНК основної пороформуваної α -субодиниці ($K_{Ca}1.1$) та допоміжної $\beta 1$ -субодиниці ($BK_{Ca}\beta 1$) ВК-каналу гладеньком'язового типу, а також β -актину. Останній був внутрішнім контролем, до якого нормували значення всіх рівнів експресії. Ампліфікаційна суміш складалася з двократною ПЛР-суміші SYBR-Green PCR MasterMix ("Applied Biosystems", США), 5 мкмоль/л розчину суміші прямого та зворотного праймерів, 2 мкл кДНК. ПЛР здійснювали у термоциклері 7500 Fast Real-Time PCR System («Applied Biosystems», США) за програмою: 94 °C (10 с), 65 °C (60 с) протягом 45–50 циклів. У реакціях ампліфікації використовували праймери, специфічні до кДНК $K_{Ca}1.1$ та $BK_{Ca}\beta 1$ щура (номери доступу Генбанку (NM_031828.1 та NM_019273.1 відповідно), які були валідовані в попередніх дослідженнях [12]. Праймери $K_{Ca}1.1$ мали таку послідовність: $K_{Ca}1.1$ прямий 5'-tacttcaatgacaatactctcaccct-3', $K_{Ca}1.1$ зворотний – 5'-ACCATAA CAACCCATCCSSTAAG-3', а $BK_{Ca}\beta 1$: $BK_{Ca}\beta 1$ прямий 5'-TGAAAGCACTGСТА СТСТTСAGC-3', $BK_{Ca}\beta 1$ зворотний 5'-GTATCACACAGAAGACACTCGGGA-3'. Для визначення кількості β -актину використовували праймери: прямий 5'-catccatgccctgagtc-3', зворотний 5'-acasctcaaccctccag-3'.

Візуалізацію ампліконів після горизонтального електрофорезу у 3%-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію здійснювали за допомогою трансільюмінатора ViTran («Біоком», Росія). Кількісну оцінку експресії та обробку результатів проводили з використанням програмного

забезпечення 7500 Fast System SDS Software 1.3.1 ("Applied biosystems", США). *Статистика.* Кожен експеримент проводили декілька разів. Електрофізіологічні результати обробляли за допомогою програмних пакетів pClamp 8.0 та Origin 7.0 ("Origin Lab. Corp.", США). Їх представляли як середні значення \pm стандартне відхилення із позначенням у дужках кількості клітин, на яких вони були отримані. Для оцінки достовірності визначених відмінностей використовували двохсторонній, непарний t-тест; відмінності з $P < 0,05$ вважали достовірними.

РЕЗУЛЬТАТИ

Особливістю ГМК, ізольованих з детрузора щурів з діабетом, була значно вища ємність їх мембрани ($34 \text{ пФ} \pm 6 \text{ пФ}$, $n=10$) порівняно з контролем ($27 \text{ пФ} \pm 5 \text{ пФ}$, $n=10$), що вказує на значну гіпертрофію ГМК детрузора при діабеті.

Вплив діабету на вихідний калієвий струм, активований деполяризацією. Загалом струми у відповідь на деполяризацію ГМК як нормальних, так і щурів з діабетом склалися з невеликого початкового вхідного компонента, який з часом змінювався на потужний вихідний калієвий (рис. 1). Вхідний компонент струму значною мірою маскувався як досить тривалим перезарядом ємності мембрани ГМК, так і активацією протилежно спрямованого калієвого струму. Його доволі повільна кінетика (порівняно з потенціалзалежним натрієвим), невелика амплітуда та діапазон мембранних потенціалів (V_m), в яких він найбільше проявлявся ($-30 - 0 \text{ мВ}$), вказували на його кальцієву природу.

Вихідний калієвий струм прогресивно збільшувався з підвищенням деполяризації, а при сталому її значенні в діапазоні $0 - +50 \text{ мВ}$ його амплітуда зазнавала значних флуктуацій. Відомо, що ГМК детрузора експресують низку калієвих каналів і відповідних їм струмів [3], а флуктуації

вихідного струму можуть бути зумовлені накладанням спонтанних транзйентних вихідних струмів (СТВС) внаслідок активації ВК-каналів [5]. Підтвердженням того, що ВК-канали роблять значний внесок у загальний вихідний калієвий струм ГМК детрузора як нормальних, так і щурів з діабетом був той факт, що цей струм пригнічувався на 90 % відомим блокатором ВК-каналів паксиліном (5 мкмоль/л).

Навіть поверхневе порівняння густини вихідного калієвого струму нормальних щурів і щурів з діабетом (див. рис. 1) вказувало на те, що в останніх він помітно менший. Для кількісної оцінки відмінностей використовували значення струмів у кінці деполаризувального імпульсу до +50 мВ тривалістю 200 мс. Якщо в цей момент спостерігалася генерація СТВС, то брали значення струму до їх виникнення. Виявилося, що якщо в контролі середня густина вихідного калієвого струму, який, як впливає із його чутливості до паксиліну, на 90 % переноситься через ВК-канали, становить 15,0 пА/пФ \pm 0,4 пА/пФ (n=10),

то при діабеті вона зменшується до 10,0 пА/пФ \pm 0,5 пА/пФ (n=10; рис. 2,а). Таким чином діабет призводить до зменшення струму через ВК-канали, активованого деполаризацією, приблизно на 33 %.

Вплив діабету на СТВС. У разі підтримуваних потенціалів (V_h) у діапазоні -30 – 0 мВ ГМК детрузора генерували СТВС. Загалом основним механізмом їх виникнення в ГМК різних типів є спонтанні вивільнення Ca^{2+} із підсарколемальних ділянок саркоплазматичного ретикулума (кальцієві спалахи) та активації в результаті цього кальційзалежних ВК-каналів [6]. На рис. 3 наведено приклади типових записів СТВС при $V_h = -20$ мВ в ГМК детрузора контрольних тварин і тварин з експериментальним діабетом. Амплітуди СТВС були пронормовані до значень ємності мембрани відповідних клітин. Одразу відзначаємо відмінності як у амплітуді, так і у частоті виникнення СТВС. Кількісний аналіз експериментальних записів показав, що амплітуда СТВС зменшувалася із контрольного значення 0,9

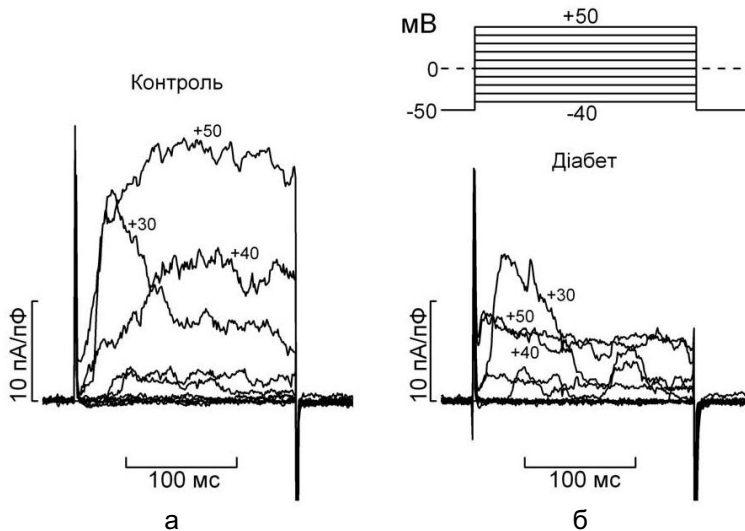


Рис. 1. Зменшення густини активованого деполаризацією загального калієвого струму ізолюваних гладеньком'язових клітин (ГМК) детрузора: а – контрольні щури, б – щури з діабетом і протокол стимуляції; цифри біля записів струму відповідають мембранному потенціалу; флуктуації вихідних калієвих струмів відображають активність кальційзалежних калієвих каналів великої провідності; вертикальна калібровка подана в одиницях густини струму, щоб врахувати різницю в розмірах ГМК контрольних щурів і щурів з діабетом (ємність мембрани становить 17 та 26 пФ відповідно)

пА/пФ \pm 0,1 пА/пФ (n=6) до 0,5 пА/пФ \pm 0,1 пА/пФ (n=5) при діабеті, тоді як середня частота виникнення СВТС знижувалася з 12,0 Гц \pm 1,5 Гц (n=6) у контролі до 2, 4 Гц \pm 0,6 Гц (n=5) при діабеті (див. рис. 2, б,в). Отже, діабет викликав майже дворазове зниження амплітуди та зменшення частоти

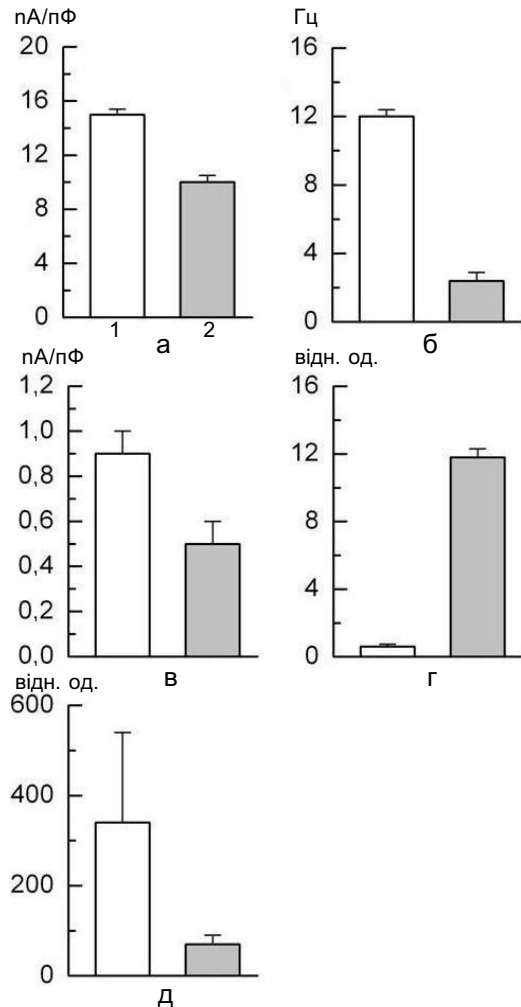


Рис. 2. Вплив діабету на струми та експресію субодиниць кальційзалежних калієвих каналів великої провідності в ізолюваних гладеньком'язових клітинах (ГМК) детрузора щура. Наведено середні значення (\pm стандартна похибка, n=4-5 для кожного досліджу) густини загального калієвого струму, активованого деполаризацією (а), частоти (б) та амплітуди (в) спонтанних транзйентних вихідних струмів, а також відносних рівнів експресії мРНК $K_{Ca}1.1$ α - (г) та β -субодиниць (д) в ізолюваних ГМК детрузора контрольних щурів (1) та щурів з діабетом (2)

виникнення СВТС приблизно у 5 разів порівняно з контролем.

Вплив діабету на експресію субодиниць ВК-каналів. Однією з причин пригнічення струмів через ВК-канали в ГМК детрузора щурів при діабеті може бути зменшення експресії субодиниць, що утворюють ці канали. З точки зору молекулярної структури ВК-канали – це гетерооктамери, що складаються з чотирьох пороформувальних α -субодиниць (позначення $K_{Ca}1.1$, ген $KCNMA1$) і чотирьох допоміжних β -субодиниць, які модулюють функціональні властивості каналу [9]. З чотирьох відомих ізоформ β -субодиниць ($ВК_{Ca}\beta1-4$, гени $KCNMB1-4$) специфічною для гладеньком'язової тканини загалом і до ГМК сечового міхура зокрема є $ВК_{Ca}\beta1$ [9, 10]. Основна роль $ВК_{Ca}\beta1$ -субодиниці полягає у стабілізації відкритого стану каналу, підвищенні його потенціал- та Ca^{2+} -чутливості [7, 9], а також у регуляції поверхневої експресії [13]. Щоб визначити наскільки виявлене нами пригнічення струму через ВК-канали може бути пов'язане зі зміною в експресії субодиниць ми порівняли рівні експресії мРНК $K_{Ca}1.1$ та $ВК_{Ca}\beta1$ у гладеньких м'язах детрузора нормальних щурів і щурів з діабетом за допомогою ПЛР у реальному часі. Результати виявилися доволі складними для інтерпретації, оскільки показали, що при діабеті, з одного боку, спостерігається зростання мРНК $K_{Ca}1.1$ майже у 20 разів, а з іншого – чотириразове зменшення експресії мРНК $ВК_{Ca}\beta1$ (див. рис. 3, г,д). Чи зможе зниження експресії модулювальної β -субодиниці виявитися превалюючим за своїм негативним впливом на величину ВК-струмів порівняно зі зростанням експресії α -субодиниці і таким чином пояснити пригнічення струмів через ВК-канали ГМК-детрузора при діабеті поки залишається неясним.

ОБГОВОРЕННЯ

Проведені нами дослідження свідчать про суттєве пригнічення функції ВК-каналів ГМК детрузора шурів при діабеті як на рівні макрострумів, викликаних деполяризацією, так і на рівні генерації СВТС. Результатом пригнічення ВК-каналів, з одного боку, є зниження потенціалу спокою ГМК детрузора внаслідок зменшення внеску СВТС у базальну калієву провідність, а з іншого – уповільнення реполяризації ПД, що у сукупності посилює збудливість ГМК.

ВК-канал поєднує у собі властивість потенціалзалежності через наявність у його складі основної пороформувальної α -субодиниці S4-сенсора потенціалу та кальцієвої залежності, що зумовлюється наявністю в С-термінальній частині α -субодиниці кальційзв'язувального домену [9]. Крім того, у складі ВК-каналу є модуляторна $\beta 1$ -субодиниця, яка стабілізує відкритий стан, підвищує потенціал- і Ca^{2+} -чутливість каналу, а також впливає на його локалізацію в плазматичній мембрані [7, 9, 13]. Таким чином, в основі зменшення ВК-струму при діабеті можуть лежати принаймні три

причини: 1) зменшення експресії $\text{K}_{\text{Ca}} 1.1 \alpha$ -субодиниці, 2) зниження ймовірності відкритого стану каналу та його мембранного скерування внаслідок зменшення експресії $\text{K}_{\text{Ca}} \beta 1$ та/або 3) зміни в кальцієвій сигналізації ГМК детрузора, які послаблюють кальційзалежну активацію ВК-каналу. Першу причину можна відкинути, оскільки наші результати показують не зменшення, а навпаки, суттєве збільшення експресії мРНК $\text{K}_{\text{Ca}} 1.1$ при діабеті. Однак виявлені нами протилежні зміни в експресії основної $\text{K}_{\text{Ca}} 1.1$ - та допоміжної $\text{K}_{\text{Ca}} \beta 1$ -субодиниці поки не дають змоги з упевненістю говорити, як остаточно вони можуть позначитися на розмірі струму. Можливо, що для оптимальної модуляції як функціональних властивостей ВК-комплексу, так і його мембранної локалізації потрібна певна пропорція α - і β -субодиниць. У зв'язку з цим зазначимо, що за нашими результатами, якщо у нормі у ГМК детрузора спостерігається приблизно в 100 разів перевищення кількості мРНК $\text{K}_{\text{Ca}} \beta 1$ щодо $\text{K}_{\text{Ca}} 1.1$, то при діабеті воно знижується приблизно до 7 разів (див. рис. 2, г,д). Ймовірно, що збільшення експресії мРНК

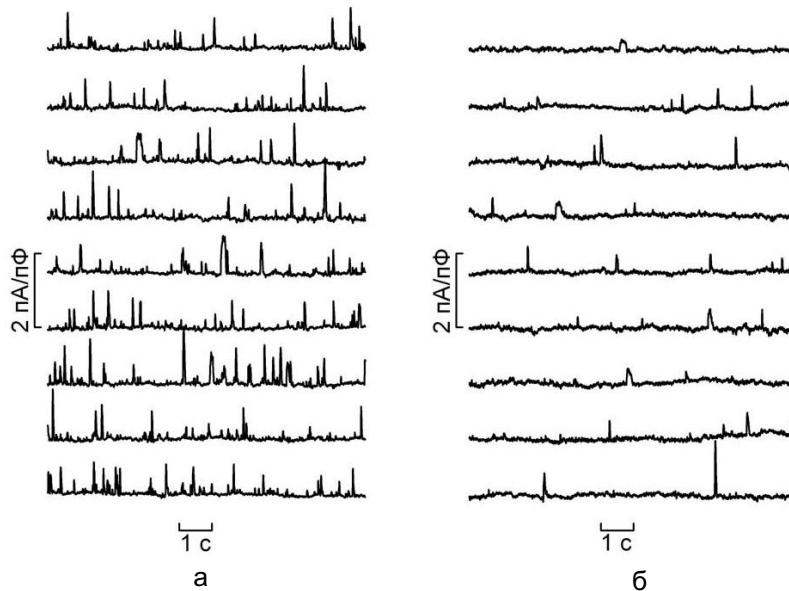


Рис. 3. Спонтанні транзйентні вихідні калієві струми в ізольованих гладеньком'язових клітинах (ГМК) детрузора шура при підтримуваному потенціалі -20 мВ, контрольних шурів (а) та шурів із діабетом (б); вертикальна калібрівка – густина струму; ємність «контрольної» ГМК становить 25, а «діабетичної» – 36 пФ

пороформувальної $K_{Ca}1.1$ -субодиниці є компенсаторною відповіддю на відсутність функціонального каналу у мембрані при діабеті. Остання може бути наслідком зменшення експресії $BK_{Ca}\beta1$ або порушення нормальної трансляції білка, наприклад, під впливом певних мікроРНК. Необхідні додаткові дослідження для визначення, як співвідношення в експресії $K_{Ca}1.1$ і $BK_{Ca}\beta1$ позначається на мембранній локалізації та ймовірності відкритого стану ВК-каналу, а також для встановлення типу та спрямованості змін у кальцієвих сигналах, що впливають на активацію каналу при діабеті.

Отже, наші результати показують, що компоненти молекулярної будови та/або Ca^{2+} - і потенціалзалежної активації ВК-каналу можна розглядати як потенційні мішені для розробки лікарських засобів у лікуванні синдрому гіперзбудливого сечового міхура при діабеті.

**Д.А. Крышталь, О.Н. Падурару,
А.И. Болдырев, О.Ю. Кот, В.В. Рекалов
Я.М. Шуба**

ИЗМЕНЕНИЯ КАЛЬЦИЙЗАВИСИМОЙ КАЛИЕВОЙ ПРОВОДИМОСТИ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ

Активация кальцийзависимых калиевых каналов большой проводимости (BK-каналы) влияет на реполяризацию мембраны во время генерации потенциала действия и на потенциал покоя гладкомышечных клеток (ГМК) детрузора. Одним из осложнений диабета является синдром гиперактивного мочевого пузыря (СГАМП). С использованием метода patch-clamp было установлено значительное уменьшение калиевого тока через ВК-каналы (I_{BK}) изолированных ГМК детрузора крыс со стрептозотининдуцированным диабетом по сравнению с контрольными животными, а также угнетение амплитуды и частоты ВК-опосредованных спонтанных транзистентных выходящих токов (СТВТ). При диабете плотность I_{BK} , вызванного деполяризацией мембраны до +50 мВ, была $10,0 \text{ пА/пФ} \pm 0,5 \text{ пА/пФ}$ (в контроле $15,0 \text{ пА/пФ} \pm 0,4 \text{ пА/пФ}$), а средние значения частоты и амплитуды СТВТ при поддерживаемом потенциале -20 мВ снижались с $12,0 \pm 1,5$ до $2,4 \text{ Гц} \pm 0,6 \text{ Гц}$ и с $0,9 \pm 0,1$ до $0,5 \text{ пА/пФ} \pm 0,1 \text{ пА/пФ}$ соответственно. При помощи количественной полимеразной цепной реакции показано, что при диабете возрастает экспрессия мРНК

основной, пороформирующей $K_{Ca}1.1$ -субодиниці ВК-канала и уменьшается – его вспомогательной $BK_{Ca}\beta1$ -субодиниці. Сделан вывод о том, что выявленные изменения в токах через ВК-каналы при диабете могут повышать возбудимость ГМК детрузора и обуславливать возникновение миогенного СГАМП. Однако необходимы дополнительные исследования того, каким образом снижение экспрессии $BK_{Ca}\beta1$ сказывается на функциональных свойствах ВК-канала, а также для определения типа и направленности изменений в кальциевых сигналах, которые влияют на активацию этого канала, при диабете. Ключевые слова: мочевого пузыря, детрузор, гладкие мышцы, диабет, кальцийзависимые калиевые каналы, ВК-каналы.

**D.A. Krishtal, O.M. Paduraru, O.I. Boldyrev,
O.Iu. Kit, V.V. Rekalov Ia.M. Shuba**

DIABETES-EVOKED CHANGES IN Ca^{2+} - DEPENDENT POTASSIUM CONDUCTANCE OF ISOLATED SMOOTH MUSCLE CELLS OF THE RAT BLADDER

Activation of large conductance Ca^{2+} -dependent potassium channels (BK channels) influences repolarization of the action potential and the level of the resting potential of detrusor smooth muscle cells (SMC). Overactive bladder syndrome (OBS) is one of the complications of diabetes. Here using whole-cell patch clamp technique we show sizable reduction of depolarization-evoked BK current (I_{BK}) and decrease in the amplitude and frequency of spontaneous transient outward currents (STOCs) in isolated SMC from detrusor of rats with streptozocin-induced diabetes compared to control animals. Under the diabetes I_{BK} density at step depolarization to +50 mV decreased from control value of $15.0 \pm 0.4 \text{ pA/pF}$ to $10.0 \pm 0.5 \text{ pA/pF}$, whereas the mean values of the STOCs' frequency and amplitude at holding potential -20 mV were reduced from $12.0 \pm 1.5 \text{ Hz}$ to $2.4 \pm 0.6 \text{ Hz}$ and from $0.9 \pm 0.1 \text{ pA/pF}$ to $0.5 \pm 0.1 \text{ pA/pF}$, respectively. Using real time RT-PCR it was found that the expression of mRNA for the BK-channel primary pore-forming $K_{Ca}1.1$ -subunit increases under the diabetes, whilst that for the auxiliary $BK_{Ca}\beta1$ -subunit decreases. It is concluded that the observed changes in the BK-channel currents can enhance excitability of the detrusor SMCs thereby promoting myogenic OBS. However, further studies are needed to determine how the decrease in $BK_{Ca}\beta1$ expression under the diabetes impairs functional properties of BK channels and to establish possible changes in calcium signals that modulate channel activation.

Key words: bladder, detrusor, smooth muscles, diabetes mellitus, calcium dependent potassium channels, BK-channels.

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

International Center of Molecular Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болдирев О.І., Соткіс Г.В., Кулієва Є.М., Владимиrowa Й.А., Філіппов І.Б., Скрима Р., Преварська Н., Шуба Я.М. Експресія холодового рецептора TRPM8 у гладеньких м'язах сім'явидних протоків шурів // Фізіол. журн. – 2009. – 55, №5. – С. 17–27.
2. Brading A.F. Spontaneous activity of lower urinary tract smooth muscles: correlation between ion channels and tissue function // J. Physiol. – 2006. – 570. – P. 13–22.
3. Christ G.J., Hodges S. Molecular mechanisms of detrusor and corporal myocyte contraction: identifying targets for pharmacotherapy of bladder and erectile dysfunction // Brit. J. Pharmacol. – 2006. – 147. – P. S41–S55.
4. Heppner T.J., Bonev A.D., Nelson M.T. Ca(2+)-activated K⁺ channels regulate action potential repolarization in urinary bladder smooth muscle // Amer. J. Physiol. – 1997. – 273, № 1. – P. C110–C117.
5. Hristov K.L., Cui X., Brown S.M., Kellett W.F., Petkov G.V. Stimulation of beta3-adrenoceptors relaxes rat urinary bladder smooth muscle via activation of the large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels // Ibid. – 2008. – 295, № 5. – P. C1344–C1353.
6. Jaggar J.H., Porter V.A., Lederer W.J., Nelson M.T. Calcium sparks in smooth muscle // Amer. J. Physiol. – 2000. – 278, № 2. – P. C235–C256.
7. McManus O.B., Helms L.M., Pallanck L., Ganetzky B., Swanson R., Leonard R.J. Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels // Neuron. – 1995. – 14. – P. 645–650.
8. Meredith A.L., Thorneloe K.S., Werner M.E., Nelson M.T., Aldrich W.T. Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel // J. Biol. Chem. – 2004. – 279. – P. 36746–36752.
9. Orio P., Rojas P., Ferreira G., Latorre R. New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits // News Physiol. Sci. – 2002. – 17. – P. 156–161.
10. Petkov G.V., Bonev A.D., Heppner T.J., Brenner R., Aldrich R.W., Nelson M.T. Beta 1-subunit of the Ca²⁺-activated K⁺ channel regulates contractile activity of mouse urinary bladder smooth muscle // J. Physiol. – 2001. – 537. – P. 443–452.
11. Roxburgh C., Cook J., Dublin N. Anticholinergic drugs versus other medications for overactive bladder syndrome in adults // Cochrane Database Syst. Rev. – 2007. – 3, № 4. – P. CD00319.
12. Soloviev A., Tishkin S., Ivanova I., Zelensky S., Dosenko V., Kyrychenko S., Moreland R.S. Functional and molecular consequences of ionizing irradiation on large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat aortic smooth muscle cells // Life Sci. – 2009. – 84, №5–6. – P. 164–171.
13. Toro B., Cox N., Wilson R.J., Garrido-Sanabria E., Stefani E., Toro L., Zarei M.M. KCNMB1 regulates surface expression of a voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channel via endocytic trafficking signals // Neuroscience. – 2006. – 142, № 3. – P. 661–669.

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Міжнарод. центр молекуляр. фізіології НАН України, Київ
E-mail: yshuba@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 17.11.2010*