

К. І. Клименко<sup>1</sup>, Т. В. Новохацька<sup>1</sup>, І. В. Кізуб<sup>1</sup>,  
В. Є. Досенко<sup>2</sup>, А. І. Соловійов<sup>1</sup>

## Вплив сайленсингу генів $\alpha$ та $\delta$ ізоформ протеїнкінази С на іонну каналопатію та ендотеліальну дисфункцію аорти діабетичних щурів

<sup>1</sup>ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

<sup>2</sup>Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, м. Київ

*Ключові слова: судинні ускладнення цукрового діабету, гладеньком'язові клітини, калієві канали, протеїнкіназа С, РНК-інтерференція*

Мікросудинні та макросудинні ускладнення, що розвиваються як за I, так і за II типу цукрового діабету, є головною причиною інвалідизації та смертності хворих [1]. Серед основних порушень функціонування судин за умов діабету варто зазначити дисбаланс між процесами констрикції та дилатації внаслідок порушення функціонування ендотеліальних (ЕК) та гладеньком'язових клітин (ГМК) судинної стінки. У дослідженні зосереджено увагу на ендотелій-залежній вазодилатації, що є основним показником функціонування ендотелію [2] та  $K^+$ -провідності плазматичної мембрани ГМК – основного фактора гіперполяризації судинних ГМК та розслаблення судин [3].

Більшість досліджень з обраної тематики стверджує, що основною причиною розвитку судинної дисфункції за умов діабету є гіперглікемія [4, 5], хоча існують роботи, які вказують на те, що самої гіперглікемії може бути недостатньо [6].

Важливим глюкозо-індукованим фактором, що призводить до порушення функціонування як ГМК, так і ЕК судинної стінки, є активація регуляторного ферменту протеїнкінази С (ПКС) [7]. Сьогодні виділяють 12 ізоформ ПКС, які за структурними характеристиками та умовами активації розділені на три підродини: класичну

(ізоформи  $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $\gamma$ ), новітню (ізоформи  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\mu$ ) та атипову (ізоформи  $\zeta$ ,  $\lambda$ ) ПКС [7].

Серед численних ізоформ ПКС, виявлених у судинній стінці [7, 8], значну роль у розвитку судинних ускладнень цукрового діабету відіграють  $\alpha$  та  $\delta$  ізоформи [9, 7, 10]. Відомо, що ПКС має модулюючий вплив на численні клітинні процеси як в ГМК, так і в ЕК, серед яких проліферація, диференціація та міграція, проникненість, скоротливість, ріст та апоптоз, активність іонних каналів та продукція реактивних форм кисню (РФК) [11, 12]. Саме тому актуальність пошуку нових шляхів регуляції активності ПКС не викликає сумніву.

Не зважаючи на багаторічні дослідження ізоформ ПКС, все ще залишаються дискусійними питання їх залучення до розвитку судинних ускладнень цукрового діабету, регуляції експресії та активації.

Натепер стрімко розвивається технологія РНК-інтерференції (РНКі), за допомогою якої є можливим дослідження функціонування та регуляція активності будь-якої молекулярної структури, для якої відома послідовність кодуючого гена [13, 14].

*Мета дослідження* – встановити роль ПКС- $\alpha$  та ПКС- $\delta$  у розвитку ендотеліальної дисфункції та іонної каналопатії в ГМК аорти діабетичних щурів, а також ефективність блокування експресії даних ізоформ та оцінити можливість корекції судинної дисфункції в щурів із цукровим діабетом за допомогою малих інтерферуючих РНК (міРНК).

**Матеріали та методи.** Дослідження проводили на статевозрілих самцях щурів лінії Wistar (180–200 г). Усі досліди були проведені відповідно до вимог Європейської конвенції захисту тварин, що використовуються в експериментальних та інших цілях, та були ухвалені Комітетом з етики.

**Індукція діабету.** Діабет був індукований одноразовою внутрішньоочеревинною ін'єкцією стрептозоцину (STZ) у дозі 60–65 мг/кг. STZ розчиняли в цитратному буферному розчині, який містив 0,9% NaCl та 10 мМ цитрату, рН = 4,6. Визначення експериментального діабету проводили за наявністю гіперглікемії через 1 міс після ін'єкції STZ і в день експерименту в тварин усіх груп. Концентрацію глюкози визначали, застосовуючи глюкозиметр Bionime (BIONIME Rightest GM 300, Швейцарія).

**Виділення гладеньком'язових клітин аорти щурів.** Досліди проводили на ГМК аорти щурів. Після попередньої анестезії (кетамін – 45 мг/кг, ксилазин – 10 мг/кг) тварини були евтоназовані шляхом декапітації з наступним знекровленням. ГМК виділяли з торакальної аорти, яку попередньо очищали від сполучної тканини та витримували протягом 5–10 хв у безкальцієвому розчині Кребса наступного складу (у ммоль/л): 140 NaCl, 5,9 KCl, 2,5 MgCl<sub>2</sub>, 11,5 глюкози, 10 HEPES (рН 7,4). Ділянку аорти довжиною 1,0–1,5 см розрізали на сегменти розміром 2 × 2 мм, та інкубували протягом 33 хв при температурі 37 °С у номінально безкальцієвому розчині Кребса з додаванням колагенази типу IA (2 мг/мл), пронази Е (0,5 мг/мл), бичачого сироваткового альбуміну (2 мг/мл). Потім сегменти тканини відмивали від ферментів у безкальцієвому розчині та виділяли клітини шляхом багаторазового піпетування. ГМК, що зберігали в холодильнику при температурі + 5 °С, залишалися в функціональному стані протягом 4 год.

**Реєстрація скоротливої активності.** Реєстрацію скоротливої активності проводили в ізометричному режимі на ізольованих кільцевих сегментах аорти, яку виділяли вищезазначеним спосо-

бом. Відпрепаровану ділянку грудної аорти нарізали на кільцеві сегменти шириною 1–2 мм та внутрішнім діаметром 1,5–2,0 мм, під кутом близько 45° і розміщували у проточній плексигласовій камері об'ємом 0,5 мл та підтримуваною температурою 37 °С. Закріплені на двох сталевих гачках судинні сегменти підлягали попередньому пасивному розтягненню з силою 1300–1400 мг. Їх перфузували буферним розчином Кребса із сталою швидкістю 1,5 мл/хв за допомогою 4-канального перистальтичного насоса IPS ISM 930 «Ismatec» (Німеччина). Для визначення ендотелій-залежної вазодилатації застосовували аплікацію ацетилхоліну (АХ) у концентрації 1 нМ – 10 мкМ на попередньо скорочені норадреналіном (НА, 10<sup>-6</sup> М) судинні препарати. Вазодилатацію виражали у відсотках від скорочення, викликаного НА. Аплікацію всіх застосованих фармакологічних агентів здійснювали за допомогою перфузійної системи.

**Реєстрація вихідного струму.** Вихідний трансмембранний струм вимірювали за допомогою методу фіксації потенціалу (patch-clamp) у модифікації «whole-cell perforated patch» із використанням антибіотика амфотерицину В. Реєстрацію іонних струмів проводили за допомогою підсилювача Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., USA), аналого-цифрового перетворювача (АЦП) Digidata 1200B (Axon Instruments Inc., USA) та програмного забезпечення pClamp Software (V.6.02, Axon Instruments Inc., USA). Сигнал з виходу підсилювача надходив крізь фільтр низьких частот (частота зрізу 2 кГц) на АЦП і оцифровувався з частотою дискретизації 10 кГц. Типові значення мембранного опору клітин у наших експериментах склали 2–5 ГОм. Іонні струми були нормалізовані до пА/пФ. Індиферентний Ag-AgCl-електрод було розміщено безпосередньо в камері для клітин об'ємом 200 мкл. Мікропіпетки виготовляли з боросилікатного скла (Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, England) та заповнювали розчином наступного складу (у ммоль/л): 140 KCl; 10 NaCl; 1,2 MgCl<sub>2</sub>; 10 HEPES; 2,5 CaCl<sub>2</sub>;

11,5 D-глюкоза (рН 7,3); 250 мкг/мл амфотерицин В. Опір піпеток становив 2,5–5,0 МОм. Зовнішній розчин містив (у ммоль/л): 140 NaCl; 5,9 KCl; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 1,2 MgCl<sub>2</sub>; 10 HEPES; 11,5 D-глюкоза (рН 7,4).

*Блокування експресії генів ПКС-α та -δ за допомогою РНКі.* міРНК для цільового сайленсингу генів ПКС-α та -δ (PRKCD-S-5' - GGA AAG GUA CUU UGC AAU CUU - 3'; PRKCD-A-5' - AGA UCU UUU GUU UCU GAG UUU - 3') були синтезовані на замовлення фірмою Метабіон (Німеччина). Дволанцюгові міРНК отримували перед дослідом за допомогою анелінгу. Для цього розчини відповідних сенсових та антисенсових нуклеотидів розводили в два рази буфером для анелінгу наступного складу (мМ): 30 HEPES-KOH; 100 KCl; 2 MgCl<sub>2</sub>; 50 NH<sub>4</sub>Ac; рН 7.4. Надалі вносили рівні об'єми розчинів нуклеотидів до пробірки та додавали вдвічі менший об'єм буфера. Використовуючи термоциклер «GeneAmp System 2700», отриману суміш інкубували за температури 90 °С протягом 1 хв, після чого протягом 45 хв охолоджували до кімнатної температури. міРНК вводили в хвостову вену в кількості 40 мкг/щура дворазово з 24-год інтервалом.

*Виділення загальної РНК.* Загальну РНК виділяли з грудної аорти щура із використанням набору Trizol RNA-prep (Isogen, Росія) відповідно до протоколу виробника. Концентрацію РНК визначали за допомогою спектрофотометра ND 1000 (NanoDrop Technologies Inc., США). Комплементарна ДНК була синтезована із використанням набору RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, США) та праймера Random hexamer на однаковій кількості тотальної РНК (200–300 нг). Одноланцюгову ДНК використовували для проведення полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (РЧ-ПЛР).

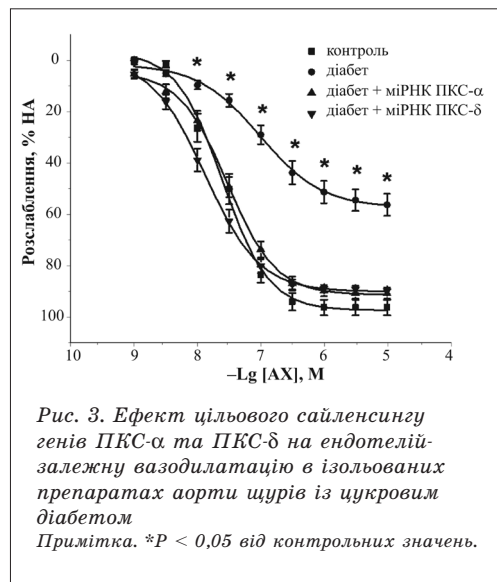
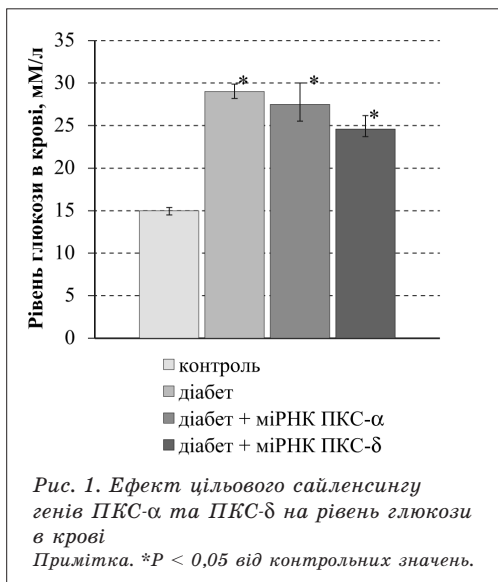
*ПЛР у реальному часі.* РЧ-ПЛР проводили в термоциклері 7500 Fast Real-Time PCR System у 10 мкл реакційної суміші SYBR Green PCR Master Mix, що містила по 30 пмоль праймерів для відповідних генів: ПКС-δ прямий 5' - CTG GAA TAG TGA GCT CCC AGA C - 3'

та зворотний 5' - ATC ACC AGT CAC CCA CTC TTC T - 3'; ПКС-α прямий 5' - STA GCC CCA CAT CCA CTT AGA G - 3' та зворотний 5' - GTG TCT TGA TCC TAC AGC TCC A - 3'. Як зовнішній контроль використовували фрагмент гена β-актину з відповідними праймерами: прямий 5' - TGT TAC GTC GCC TTG GAT TTT GAG - 3' та зворотний 5' - AAG AGA GAG ACA TAT CAG AAG C - 3'. Праймери були синтезовані на замовлення фірмою Metabion (Німеччина). Об'єм зразка доводили до 20 мкл деіонізованою водою.

*Статистична обробка результатів.* Аналіз результатів РЧ-ПЛР дослідів був проведений за допомогою програмного забезпечення 7500 Fast System SDS. Результати дослідів «whole-cell perforated patch» аналізували за допомогою програмного забезпечення рCLAMP версія 6.02 (Axon Instruments Inc., США). Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (One-Way ANOVA) та t-критерію Стюдента, дані вважали статистично достовірними при  $P < 0,05$ . Усі дані наведено у вигляді середнього арифметичного (M) та стандартної похибки середнього арифметичного (m) для певної вибірки (n). Величини середньої ефективної концентрації АХ були виражені як від'ємний логарифм концентрації (EC<sub>50</sub>). Усі розрахунки проводили з використанням комп'ютерних програм EXEL 5.0 та OriginPro 7.5 (Microcal Software Inc.).

*Результати та їх обговорення.* У день дослідів рівень глюкози в крові діабетичних тварин становив  $29,9 \pm 0,6$  мМ/л (n = 12;  $P < 0,05$ ) і був достовірно вищим, ніж у контрольній групі ( $7,3 \pm 0,3$  мМ/л, n = 12). Уведення міРНК, специфічних до α та δ ізоформ ПКС, не знижувало рівень глюкози в крові, який становив  $28,9 \pm 2$  мМ/л (n = 15;  $P < 0,05$ ) та  $27,5 \pm 1,5$  мМ/л (n = 17;  $P < 0,05$ ) відповідно порівняно з діабетичними тваринами (рис. 1).

На першому етапі дослідження було проаналізовано відносні рівні експресії α та δ ізоформ ПКС в аорті дослідних тварин. Судинні тканини діабетичних тварин за результатами РЧ-ПЛР аналі-



зу демонстрували достовірне зростання рівня мРНК ПКС-α, у той час як рівень мРНК ПКС-δ не мав значущих відмінностей від показників групи здорових щурів. Уведення міРНК, специфічних до ПКС-α або до ПКС-δ, призвело до значного зниження мРНК зазначених ізоформ ПКС в аортах діабетичних тварин (рис. 2).

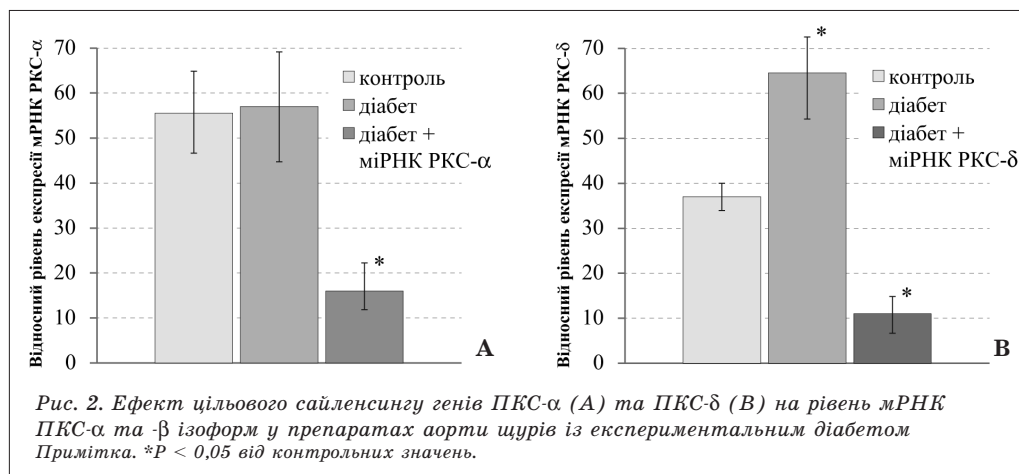
Отже, введення міРНК, специфічних до -α та -δ ізоформ ПКС, є ефективним методом посттранскрипційного сайленсингу генів.

Відомо, що міРНК, потрапляючи в судинне русло, швидко деградують під впливом нуклеаз, тому актуальним є питання захисту міРНК від нуклеазної активності та їхньої цільової доставки. Проте деякі дослідження свідчать, що міРНК без структурних модифікацій та

носіїв також можуть бути ефективними для сайленсингу генів [17, 23].

Чимало робіт вказують на зростання експресії та/або активації ПКС-α та -δ [7], у той самий час деякі дослідження вказують на відсутність змін експресії цих ізоформ на ранніх стадіях діабету [18].

З іншого боку, результати досліджень ендотелій-залежної вазодилатації вказують на відновлення функціонального стану ендотелію аорти за цільового сайленсингу як δ, так і α ізоформ ПКС. Так, порівняно з реакціями судинних сегментів здорових тварин ( $96,5 \pm 3,05$ ,  $n = 12$ ,  $EC_{50} 7,59 \pm 0,08$ ) вазодилатація в діабетичних тварин була пригніченою із максимальною амплітудою  $56,7 \pm 4,26\%$  ( $n = 12$ ,  $P < 0,05$ ,  $EC_{50} = 6,93 \pm 0,11$ ,  $P < 0,05$ ). На



сьому добу амплітуда вазодилатації після нокадауну гена ПКС- $\alpha$  становила  $91,00 \pm 2,11\%$  ( $n = 17$ ,  $P > 0,05$ ,  $EC_{50} = 7,58 \pm 0,07$ ,  $P < 0,05$ ), після нокадауну гена ПКС- $\delta$   $90,10 \pm 1,34\%$  ( $n = 15$ ,  $P > 0,05$ ,  $EC_{50} = 7,9 \pm 0,1$ ,  $P > 0,05$ ), тобто не відрізнялася від контрольних значень (рис. 3).

Отримані результати свідчать про залучення як  $\delta$ , так і  $\alpha$  ізоформ ПКС до розвитку ендотеліальної дисфункції за цукрового діабету. Відсутність кореляції між рівнем мРНК ПКС- $\alpha$  та активністю ферменту вказує на складну регуляцію експресії ізоформ ПКС як на транскрипційному, так і на трансляційному/посттрансляційному рівнях [19].

Для визначення залучення ПКС до  $K^+$ -каналопатії було використано неспецифічний до ізоформ інгібітор ПКС-челеритрин [20]. Внесення челеритрину в концентрації  $10^{-5}$  М до камери з ізольованими ГМК діабетичних тварин призвело до зростання густини сумарного вихідного  $K^+$ -струму з  $15,9 \pm 0,9$  пА/пФ ( $n = 13$ ) до  $24,2 \pm 4,5$  пА/пФ ( $n = 8$ ,  $P < 0,05$ ) (рис. 4).

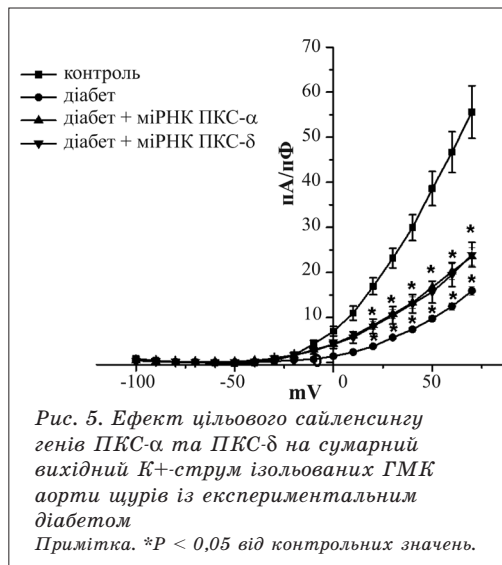
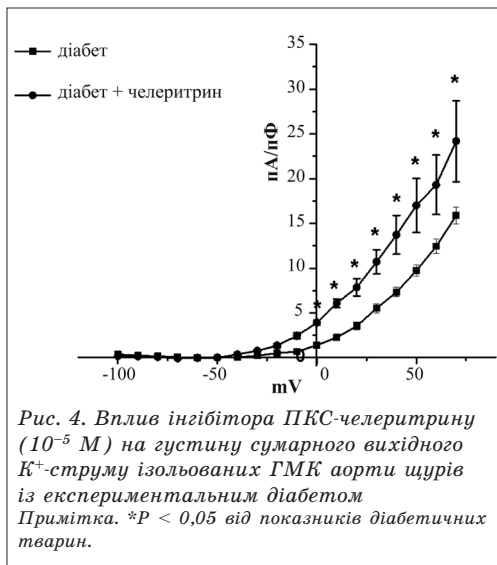
Таким чином, можна стверджувати, що порушення функціонування  $K^+$ -каналів за умов цукрового діабету є ПКС-залежними. Це підтверджує дані літератури щодо залучення ПКС до регуляції іонних каналів плазматичної мембрани ГМК, як  $Ca^{2+}$ -каналів L-типу, так і чисельних  $K^+$ -каналів, серед яких

$VK_{Ca}$ ,  $K_v$ ,  $K_{ATP}$  та ін. [21]. Проте специфічність ізоформ ПКС у регуляції  $K^+$ -каналів все ще має багато невизначенностей.

Порівняно з показниками здорових тварин ( $55,6 \pm 5,8$  пА/пФ,  $n = 8$ ) густина сумарного вихідного  $K^+$ -струму у ізольованих ГМК діабетичних тварин була значно нижчою та становила  $15,9 \pm 0,9$  пА/пФ ( $n = 13$ ,  $P < 0,05$ ). Сайленсинг генів PRKCA та PRKCD за допомогою РНК-інтерференції призвів до зростання сумарного вихідного  $K^+$ -струму до  $23,5 \pm 1,9$  пА/пФ ( $n = 12$ ,  $P < 0,05$ ) та  $23,9 \pm 2,7$  пА/пФ ( $n = 7$ ,  $P < 0,05$ ) відповідно порівняно з діабетичними тваринами (рис. 5).

Результати електрофізіологічних досліджень свідчать про залучення як  $\delta$ , так і  $\alpha$  ізоформ ПКС до порушення функціонування  $K^+$ -каналів плазматичної мембрани ГМК за умов діабету.

Таким чином, ПКС має значний потенціал як мішень для фармакологічної корекції судинних дисфункцій цукрового діабету. Реалізація РНКі-індукованого генного сайленсингу базується на селективній деградації мРНК-мішені комплементарними міРНК, у результаті чого не відбувається синтез білка [15]. Тому РНКі має численні переваги, такі як широка область застосування, висока специфічність та зниження побічних ефектів [16] порівняно з традиційною терапією та існуючими інгібіторами ПКС [22].





## Висновки

Підсумовуючи результати наших досліджень, можна стверджувати, що:

- розвиток ендотеліальної дисфункції та  $K^+$ -каналопатії за експериментального діабету є ПКС- $\alpha$  та  $\delta$  залежним;
- застосування міРНК, специфічних до мРНК  $\alpha$  та  $\delta$  ізоформ ПКС, призводить до значного зниження експресії зазначених ізоформ;
- внутрішньовенне введення міРНК, специфічних до  $\alpha$  та  $\delta$  ізоформ

ПКС, призводить до відновлення ендотелій-залежної вазодилатації аорти та зростання сумарного вихідного  $K^+$ -струму ізольованих ГМК діабетичних тварин, не впливаючи на рівень глюкози в крові.

Таким чином, технологія РНКі, застосована для посттранскрипційного сайленсингу генів  $\alpha$  та  $\delta$ -ізоформ ПКС, є ефективною для корекції ангіопатій, асоційованих із цукровим діабетом.

1. Winer N. Epidemiology of diabetes / N. Winer, J. R. Sowers // J. Clin. Pharmacol.– 2004 – V. 44 – P. 397–405.
2. Endothelial dysfunction in diabetes / A. S. De Vriese, T. J. Verbeuren, J. V. Voorde [et al.] // British Journal of Pharmacology – 2000 – V. 130 – P. 963–974.
3. Sandhiya S. Potassium channels in health, disease & development of channel modulators / S. Sandhiya, S. A. Dkhar // Indian J. Med. Res.– 2009 – V. 129 – P. 223–232.
4. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications / M. Brownlee // Nature – 2001.– V. 414 – P. 813–820.
5. Beckman J. A. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management / J. A. Beckman, M. A. Creager, P. Libby // JAMA.– 2002.– V. 287 – P. 2570–2581.
6. Clinical factors associated with resistance to microvascular complications in diabetic patients of extreme disease duration: the 50-year medalist study / H. Keenan, T. Costacou, J. Sun [et al.] // Diabetes Care.– 2007.– V. 30 – P. 1995–1997.
7. Geraldles P. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications / P. Geraldles, G. L. King // Circ. Res.– 2010 – V. 106 – P. 1319–1331.
8. Identification of protein kinase C isoforms in rat mesenteric small arteries and their possible role in agonist-induced contraction / V. Ohanian, J. Ohanian, L. Shaw [et al.] // Circ. Res.– 1996.– V. 78 – P. 806–812.
9. Koya D. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications / D. Koya, G. L. King // Diabetes.– 1998.– V. 47 – P. 859–866.
10. Requirement of aldose reductase for the hyperglycemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells / K. V. Ramana, B. Friedrich, R. Tammali [et al.] // Diabetes.– 2005.– V. 54 – P. 818–829.
11. High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha / A. Hempel, C. Maasch, U. Heintze [et al.] // Circ. Res.– 1997.– V. 81 – P. 363–371.
12. Mitogenic signaling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence / A. Takahashi, N. Ohtani, K. Yamakoshi [et al.] // Nat. Cell. Biol.– 2006.– V. 8.– P. 1291–1297.
13. Reddy L. S. RNAi in medicine: current and future perspectives / L. S. Reddy, V. Sarojamma, V. Ramakrishna // Biotechnol. Mol. Biol. Rev.– 2006.– V. 1, № 4.– P. 103–114.
14. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems / N. J. Caplen, S. Parrish, F. Imani [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2001.– V. 98.– P. 9742–9747.
15. Czech M. P. RNAi-based therapeutic strategies for metabolic disease / M. P. Czech, M. Aouadi, G. J. Tesz // Nat. Rev. Endocrinol.– 2011.– V. 7 – P. 473–484.
16. Rondinone C. M. Therapeutic potential of iRNA in metabolic diseases / C. M. Rondinone // BioTechniques.– 2006.– V. 40 – P. S31–S36.
17. An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons / M. C. Luo, D. Q. Zhang, S. W. Ma [et al.] // Mol. Pain.– 2005.– V. 1.– P. 29.
18. Differential expression of protein kinase C isoforms in coronary arteries of diabetic mice lacking the G-protein G611 / D. P. Hoyer1, Y. Korkmaz, S. Grunke1 [et al.] // Cardiovasc. Diabetol.– 2010.– V. 9.– P. 93.
19. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses / E. C. Dempsey, A. C. Newton, D. Mochley-Rosen, [et al.] // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.– 2000.– V. 279.– P. L429–438.
20. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C / J. M. Herbert, J. M. Augereau, J. Gleye [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 1990.– V. 172.– P. 993–999.
21. Crozatier B. Central role of PKCs in vascular smooth muscle cell ion channel regulation / B. Crozatier // J. Mol. Cell. Cardiol.– 2006.– V. 41, № 6.– P. 952–955.

22. Protein kinase C inhibitors: a patent review (2008–2009) / M. E. Sobhia, B. K. Grewal, S. Paul M. L. [et al.] // *Expert. Opin. Ther. Pat.* – 2013. – V. 23, № 10. – P. 1297–1315.
23. Корекція калієвої провідності в гладеньком'язових клітинах аорти щурів з генетично детермінованою гіпертензією шляхом пригнічення експресії гена  $\delta$ -ізоформи протеїнкінази C / Т. В. Новохацька, С. М. Тишкін, В. Є. Досенко, А. І. Соловйов // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* – 2012. – № 5 (30). – С. 50–58.

**К. И. Клименко, Т. В. Новохацкая, И. В. Кизуб, В. Е. Досенко, А. И. Соловьев**  
**Влияние сайленсинга генов  $\alpha$  и  $\delta$  изоформ протеинкиназы C**  
**на ионную каналопатию и эндотелиальную дисфункцию**  
**аорты крыс с сахарным диабетом**

Целью исследования стало изучения влияния сайленсинга генов  $\alpha$  и  $\delta$  изоформ протеинкиназы C (ПКС), используя малые интерферирующие РНК (миРНК), на эндотелиальную дисфункцию аорты и калиевую каналопатию в гладкомышечных клетках (ГМК) диабетических крыс. Исследование было проведено с применением следующих методик: индукции диабета (стрептозотоцин, 65 мг/кг), выделения ГМК аорты и тотальной мРНК, методики patch-clamp, РНК-интерференции и полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР). миРНК (40 мкг/крысу) вводили в хвостовую вену дважды с интервалом в 1 день. Результаты РВ-ПЦР продемонстрировали увеличение относительного уровня мРНК ПКС- $\delta$  у диабетических крыс, в то время как показатели относительного уровня мРНК ПКС- $\alpha$  не отличались от показателей здоровых крыс. На 7-й день после введения миРНК было продемонстрировано снижение уровня мРНК  $\alpha$  и  $\delta$  изоформ ПКС. Увеличение плотности суммарного выходящего  $K^+$ -тока, а также восстановление угнетенной эндотелий-зависимой вазодилатации наблюдалось после сайленсинга гена как  $\alpha$ , так и  $\delta$  изоформы ПКС. При этом повышенный уровень глюкозы в крови диабетических крыс не снижался. Полученные данные свидетельствуют о вовлечении в развитие эндотелиальной дисфункции и калиевой каналопатии как  $\alpha$ , так и  $\delta$  изоформ ПКС. Сайленсинг генов данных изоформ с использованием миРНК способствует увеличению суммарного выходящего  $K^+$ -тока в изолированных ГМК, а также восстановлению эндотелиальной функции у крыс с сахарным диабетом без изменения уровня глюкозы крови.

*Ключевые слова: сосудистые осложнения сахарного диабета, гладкомышечные клетки, калиевые каналы, протеинкиназа C, РНК-интерференция*

**К. I. Klymenko, T. V. Novokhatska, I. V. Kizub, V. Dosenko, A. I. Soloviev**  
**The effect of PKC- $\alpha$  and - $\delta$  isozyme gene silencing on potassium channelopathy**  
**and endothelium dysfunction in diabetic rat aorta**

It is known that endothelium and  $K^+$  channels functionality in smooth muscle cells (SMCs) regulate vascular function and are exposed to damage in diabetes. The aim of this study was to evaluate the effect of PKC- $\alpha$  and - $\delta$  gene silencing using small interfering RNAs (siRNAs) on endothelial dysfunction and potassium channelopathy in vascular smooth muscle cells (SMCs) obtained from diabetic rats. Experimental design of the study comprised diabetes induction by streptozotocin (STZ, 65 mg/kg), total mRNA isolation, RNA interference (RNAi), isolation of rat thoracic aorta SMCs, isolated aortic rings contractile recordings, whole-cell patch-clamp technique and RT-PCR technique. Diabetic rats were treated with siRNAs (40 mkg/ per rat) twice via tail vein with 24 hours interval and were taken to the experiment on 7th day. RT-PCR results showed increasing of PKC- $\delta$  relative mRNA level in diabetic rats while PKC- $\alpha$  relative mRNA level was without changes. Posttranscriptional gene silencing using siRNAs on 7th day after injection demonstrated significant decreasing of both  $\alpha$  and  $\delta$  PKC isoforms mRNA relative levels; significant increasing of depressed total outward  $K^+$ -current in isolated vascular SMC and endothelium-dependent vasodilatation. RNAi had no effect on high blood glucose level in diabetic rats. In conclusion, the silencing of PKC- $\alpha$  and - $\delta$  genes expression using siRNAs possess the ability to restore decreased endothelium-dependent relaxation and total outward potassium currents in SMCs from diabetic rats without altering blood glucose level. The data obtained suggest that siRNAs technique can be a good therapeutic tool to normalize vascular functionality.

*Key words: diabetic vascular complications, smooth muscle cells, potassium channels, protein kinase C, RNA interference*

Надійшла: 17.10.2013 р.

**Контактна особа:** Клименко Катерина Ігорівна, аспірант, відділ експериментальної терапії, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», вул. Е. Потьє, 14, м. Київ, 03680.  
Тел.: +38 0 44 456 02 88.