УДК 615.275_616.37

Н. В. Добреля, Є. В. Стрєлков, О. С. Хромов, К. І. Клименко, Т. В. Новохацька, А. І. Соловйов

Роль дельта-ізоформи протеїнкінази С у розвитку порушень коронарного кровотоку, що викликані цукровим діабетом

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

Ключові слова: цукровий діабет, стрептозотоцин, дельта-ізоформа протеїнкінази С, малі інтерферуючі РНК, коронарний кровотік, скоротливість міокарда

Перебіг цукрового діабету (ЦД) може призводити до численних різноманітних ускладнень. Особливе місце серед них, у зв'язку з підвищеним ризиком для життя пацієнтів, займають діабетична кардіоміопатія та коронарна недостатність.

Діабетична кардіопатія є наслідком дії гіперглікемії на міокард, що призводить до гіпертрофії лівого шлуночка, оксидативного стресу, апоптозу та некрозу кардіоміоцитів, фіброзу. Усі ці фактори викликають суттєві порушення скоротливої та насосної функції серця та виражаються в розвитку серцевої недостатності [1, 2].

За сучасними уявленнями коронарна недостатність, яка розвивається у хворих на ЦД як 1, так і 2 типу, головним чином пов'язана з порушенням ендотелійзалежного розслаблення коронарних артерій, імовірно, унаслідок субендотеліального та ендотеліального фіброзу. При такому ускладненні спостерігається суттєве зниження коронарного кровотоку та виникає ризик розвитку інфаркту міокарда [3–5].

Відомо, що важливу роль у реалізації негативних впливів гіперглікемії на серцево-судинну систему відіграє протеїнкіназа С (ПКС). За різними даними її активація може бути ключовим фактором порушень коронарного кровообігу, розвитку фіброзу, підвищеної проникності судин, кардіоміопатії та ін. [6]. Показано, що за умов ЦД експресія дельта-ізоформи ПКС (ПКС-δ) у серці суттєво посилюється. Водночас її роль у розвитку означених патологічних процесів не з'ясована [7, 8].

Мета дослідження – визначення залученості ПКС-δ в розвиток порушень скорочувальної функції міокарда та дилатації коронарних артерій при цукровому діабеті.

Матеріали та методи. *Моделювання цукрового діабету в щурів.* Дослідження проводили на 18 самцях білих щурів (276 г ± 15 г). Усіх тварин методом випадкової вибірки було розподілено на три групи по 6 тварин у кожній. Перша група – контрольна, а у тварин другої та третьої груп викликали розвиток цукрового діабету одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину (СТЗ) у дозі 60–65 мг/кг. СТЗ розчиняли в буферному розчині, який містив 0,9 % NaCl та 10 ммоль/л цитрату, pH = 4,6. Щурам третьої групи вводили міРНК, яка пригнічує експресію δ ізоформи ПКС (PRKCD-міРНК). Щурам контрольної групи внутрішньоочеревинно вводили цитратний буфер, що використовували для розведення СТЗ.

У дослід із застосуванням технології РНК-інтерференції тварин брали через 2 місяці після уведення СТЗ.

Визначення вмісту цукру в крові щурів. Концентрацію глюкози в плазмі крові вимірювали безпосередньо перед уведенням міРНК та в день проведення досліджень на ізольованому серці за допомогою глюкозометра Bionime (BIONIME Rightest GM 300, Швейцарія).

Блокування експресії генів ПКС за допомогою міРНК за умов in vivo. Малі інтерферуючі РНК (міРНК), які використовували в дослідах для «заглушен-

© Колектив авторів, 2014

ня» гена ПКС-δ (PRKCD), були синтезовані на замовлення фірмою «Metabion» (Німеччина).

міРНК для гена ПКС-δ PRKCD мали наступну послідовність: PRKCD-S-5'- GGA AAG GUA CUU UGC AAU CUU -3'; PRKCD-A-5'- AGA UCU UUU GUU UCU GAG UUU – 3'.

Перед дослідом з одноланцюгових РНК отримували дволанцюгові за допомогою анелінгу (відпалу). Для цього розчини відповідних сенсових та антисенсових олігонуклеотидів розчиняли в буфері для анелінгу наступного складу (у ммоль/л): 30 HEPES-KOH pH 7,4, 100 KCl, 2 $MgCl_2$, 50 $NH_4C_2H_3O_2$. В окремі пробірки вносили рівні об'єми кожного з розчинів олігонуклеотидів та додавали до них рівні об'єми буфера для анелінгу. Після змішування розчинів сенсових та антисенсових олігонуклеотидів в одній пробірці до суміші додавали в 4 рази менший об'єм буфера для анелінгу. Отриману суміш інкубували протягом 1 хв при 90 °С, а потім протягом 45 хв охолоджували до кімнатної температури. Анелінг проводили за допомогою термоциклера «GeneAmp System 2700».

Дволанцюгові міРНК вводили дослідним щурам внутрішньовенно в хвостову вену в кількості 400 мкг/кг двічі з 24-годинним інтервалом. У дослід тварин брали через один тиждень після введення міРНК.

Неінвазивне вимірювання артеріального тиску. Неінвазивне вимірювання артеріального тиску у хвостовій артерії здійснювали за допомогою сфігмоманометра S-2 (Hugo-Sachs Elektronik, Німеччина).

Визначення функціональної активності ізольованого серця (за Лангендорффом. Досліди проводили на восьмий день після введення міРНК.

Процедура виділення та підключення серця до апарата для перфузії з постійним протоком, реєстрація тиску в системі коронарних артерій (КПТ), у порожнині лівого шлуночка (ТЛШ) і кардіограми, розрахунок максимальної та мінімальної швидкості зміни тиску в порожнині шлуночка (dP/dt) та індексу скоротливості міокарда (ІС) були описані [9]. Оксигенація розчину для перфузії підтримувалася за рахунок пропускання карбогену (95 % кисню та 5 % двоокису вуглецю).

Функціональну активність міокарда оцінювали за реакцією на різні концентрації бета-адреностимулятора ізопротеренола.

Аналіз та статистична обробка отриманих даних. Сигнали оцифровували аналого-цифровим перетворювачем PowerLab 4/30 (ADInstruments, Австралія), розрахунок параметрів, збереження та аналіз проводили за допомогою програми Chart 5 (ADInstruments, Австралія).

Фактичний матеріал було оброблено методами варіаційної статистики. Проводили тест на нормальність розподілу Шапіро-Уїлка; нормально розподілені дані обчислювали за критерієм Стьюдента для залежних вибірок з урахуванням тесту Левена на гомогенність вибірки. Дані представлено у вигляді середнього ± похибка середнього (M ± m). Статистично значущими вважали зміни в довірчому інтервалі не менше ніж 95 % або $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Початкова концентрація глюкози в крові щурів складала (6,9 ± 0,2) ммоль/л (n = 18). Через 2 міс після ін'єкції СТЗ у тварин другої та третьої груп розвивалася виражена гіперглікемія: рівень глюкози підвищувався до (30,0 ± 0,5) ммоль/л (n = 12; $p < 0,05$). Слід відзначити, що введення PRKCD-міРНК суттєво не впливало на концентрацію глюкози в крові щурів з експериментальним ЦД (28,7 ± 0,9) ммоль/л; n = 6; $p > 0,05$).

Перед уведенням СТЗ артеріальний тиск у щурів складав (112,7 ± 1,6) мм рт. ст. Розвиток гіперглікемії в таких тварин супроводжувався підвищенням тиску: він був на 12 % вище початкової величини (126,5 ± 3,9) мм рт. ст.; $p < 0,05$). Уведення PRKCD-міРНК при цьому на артеріальний тиск практично не впливало (123,7 ± 3,9) мм рт. ст.; $p > 0,05$).

Тиск у порожнині лівого шлуночка серця ($T_{ЛШ}$) щурів з цукровим діабетом (сЩЦД) був нижчим на 25 % за такий, що реєструвався в сердець нормальних щурів (сНЩ), але величини індексу скоротливості (ІС) при цьому практично не відрізнялися. У той самий час

$T_{ЛШ}$ у тварин з експериментальним ЦД, яким вводили PRKCD-міРНК, був вищим майже на 60 % порівнянно з тваринами з ЦД другої групи ($p < 0,01$), скоротливість міокарда була нижчою приблизно на 30 % ($p < 0,05$; табл. 1).

Перфузія ізольованих сердець агоністом бета-адренорецепторів ізопротеренолом у концентраціях 10^{-8}, 10^{-7} та 10^{-6} моль/л протягом 5 хв викликала транзиторне підвищення $T_{ЛШ}$ та ІС у тварин усіх груп. За умов дії всіх трьох концентрацій ізопротеренолу $T_{ЛШ}$ у сЩЦД був значно зниженим ($p < 0,05$; табл. 1) порівняно з контрольною групою, а в сЩЦД, яким вводили PRKCD-міРНК, суттєво не відрізнявся від такого в сНЩ ($p > 0,05$). Крім того, ІС сердець із пригніченням експресії гена ПКС-δ був знижений на 40 % ($p < 0,05$).

Вихідні величини тиску в коронарних судинах та опору коронарних судин практично не відрізнялися в групах сНЩ та сЩЦД (табл. 2). Перфузія сердець розчином зі зростаючими концентраціями ізопротеренолу призводила до зниження тиску в коронарних судинах та опору коронарних судин у тварин усіх груп. Але слід відзначити, що такі зміни опору коронарних судин у сЩЦД були менш виразними та статистично недостовірними. У серцях тварин із ЦД, яким вводили PRKCD-міРНК, спостерігали найнижчі величини опору коронарних судин, які не тільки достовірно відрізнялися від початкових величин, але й були нижчими за такі в сЩДЦ без пригнічення експресії ПКС-δ (табл. 2).

Величини частоти серцевих скорочень і тривалості інтервалу QTC у сНЩ та сЩЦД суттєво не відрізнялися як на початковому етапі експерименту, так і за умов дії ізопротеренолу. Вихідна тривалість інтервалу QTC у сЩЦД, яким вводили PRKCD-міРНК, була вищою на 32 %, ніж у сНЩ ($p < 0,05$). За умов пригнічення експресії гена ПКС-δ спостерігали суттєве зменшення

Таблиця 1

Насосна та скорочувальна функції лівого шлуночка ізольованого серця щура за умов цукрового діабету та блокади дельта-ізоформи протеїнкінази С

		Показник	Контроль (n = 6)	Діабет (n = 6)	Діабет + PRKCD-міРНК (n = 6)
Вихідні величини		$T_{ЛШ}$, мм рт. ст	70,8 ± 6,7	52,6 ± 4,9	84,8 ± 5,9*
		$dP/dt_{макс}$, мм рт. ст./с	2282 ± 237	1578 ± 134	1908 ± 224*
		$dP/dt_{мін}$, мм рт. ст./с	-1134 ± 109	-842 ± 79	-1136 ± 118
		ІСВ, $с^{-1}$	32,5 ± 2,3	31,1 ± 2,4	21,8 ± 2,3&*
Дози ізопротеренолу, моль/л	10^{-8}	$T_{ЛШ}$, мм рт. ст	136,7 ± 15,7	77,2 ± 4,8&	168,8 ± 18,0*
		$dP/dt_{макс}$, мм рт. ст./с	5665 ± 396	3477 ± 271&	4794 ± 412
		$dP/dt_{мін}$, мм рт. ст./с	-3173 ± 289	-1616 ± 150&	-2760 ± 315
		ІСВ, $с^{-1}$	41,6 ± 2,2	45,8 ± 1,4	31,2 ± 3,3&*
	10^{-7}	$T_{ЛШ}$, мм рт. ст	173,0 ± 16,8	79,3 ± 6,8&	211,2 ± 25,3*
		$dP/dt_{макс}$, мм рт. ст./с	9843 ± 647	3928 ± 241&	7061 ± 680
		$dP/dt_{мін}$, мм рт. ст./с	4112 ± 209	1899 ± 139&	3592 ± 420*
		ІСВ, $с^{-1}$	53,9 ± 4,0	49,0 ± 2,0	31,2 ± 3,9&*
	10^{-6}	$T_{ЛШ}$, мм рт. ст	202,7 ± 20,8	89,5 ± 6,0&	206,0 ± 21,8*
		$dP/dt_{макс}$, мм рт. ст./с	12659 ± 1065	5285 ± 486&	7051 ± 665&
		$dP/dt_{мін}$, мм рт. ст./с	5035 ± 464	2422 ± 212&	3673 ± 265
		ІСВ, $с^{-1}$	61,9 ± 3,1	59,2 ± 2,0	32,4 ± 3,5&*

*Примітка. Тут і в табл. 2: &p < 0,05 порівняно з відповідними величинами в контрольній групі, *p < 0,05 порівняно з відповідними величинами в групі щурів з діабетом.*

Таблиця 2

Показники функціонального стану ізольованих сердець щурів за умов цукрового діабету та блокади дельта-ізоформи протеїнкінази С

		Показник	Контроль (n = 6)	Діабет (n = 6)	Діабет + PRKCD-міРНК (n = 6)
Вихідні величини		КПТ, мм рт. ст	77,9 ± 7,5	71,5 ± 5,4	94,4 ± 11,3
		ОКС, у.о.	5,9 ± 0,8	5,7 ± 0,5	5,9 ± 0,2
		ЧСС, уд/хв	215 ± 18	196 ± 7	197 ± 12
		QT_C, мс	137 ± 6	162 ± 14	180 ± 12[&]
Дози ізопротеренолу, моль/л	10^{-8}	КПТ, мм рт. ст	59,5 ± 3,2	70,6 ± 7,5	64,7 ± 9,4
		ОКС, у.о.	4,4 ± 0,9	5,6 ± 0,4[&]	3,9 ± 0,6*
		ЧСС, уд/хв	325 ± 27	263 ± 13	228 ± 10[&]
		QT_C, с	246 ± 36	251 ± 42	202 ± 10
	10^{-7}	КПТ, мм рт. ст	60,6 ± 3,9	65,2 ± 6,1	54,9 ± 6,7
		ОКС, у.о.	4,5 ± 0,2	5,2 ± 0,3[&]	3,5 ± 0,6*
		ЧСС, уд/хв	321 ± 15	297 ± 16	248 ± 22[&]
		QT_C, с	186 ± 26	214 ± 29	232 ± 24
	10^{-6}	КПТ, мм рт. ст	56,4 ± 3,6	59,6 ± 4,6	55,2 ± 4,7
		ОКС, у.о.	4,2 ± 0,2	4,8 ± 0,2	3,5 ± 0,5*
		ЧСС, уд/хв	370 ± 45	329 ± 20	258 ± 17[&]*
		QT_C, с	204 ± 39	196 ± 41	313 ± 42

частоти серцевих скорочень, викликаного ізопротеренолом, та тенденцію до подовження інтервалу QTC (табл. 2).

Отримані дані свідчать про суттєве зниження чутливості міокарда у відповідь на бета-адреностимуляцію в сЩЦД. Це, зокрема, проявлялося в суттєвому зменшенні величини позитивного інотропного та коронародилататорного ефекту ізопротеренолу. Такі зміни підтверджуються результатами й інших досліджень [10], і, імовірно, указують на розвиток діабетичної кардіоміопатії в дослідних тварин. Раніше було показано, що зміни чутливості міокарда до бета-адреностимуляції за умов ЦД пов'язані із порушенням механізмів вивільнення Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулуму кардіоміоцитів [11].

Пригнічення експресії гена ПКС-δ за допомогою міРНК призводило до суттєвих змін у реакціях сЩЦД, а саме: відбувалася нормалізація величини $T_{ЛШ}$ у відповідь на ізопротеренол; максимальні величини тиску на піку реакції статистично не відрізнялися від таких у сНЩ; водночас, ІС був суттєво нижчим порівняно з іншими групами. Останнє, імовірно, пояснюється тим, що ПКС-δ відіграє важливу роль у регуляції скоротливості міокарда, опосередковуючи позитивні ізотропні ефекти [12]. Це може відбуватися внаслідок активуючого впливу ПКС-δ на Ca^{2+}-АТФазу саркоплазматичного ретикулума кардіоміоцитів [13, 14]. Крім того, показано, що активність ПКС-δ значною мірою регулює активність утилізації глюкози та ліпідів кардіоміоцитами [15], тому пригнічення її експресії, теоретично, може мати позитивний вплив на їхній метаболізм за умов ЦД.

Відомо, що ЦД призводить до суттєвих змін у механізмі регуляції тонусу коронарних артерій. Головним чином це проявляється в порушеннях ендотелійзалежної релаксації та посиленні ефекту вазоконстрикторів. Зокрема показано, що в пацієнтів з ЦД виявляється протилежна реакція на ацетилхолін – коронарні артерії відповідають скороченням [16, 17]. Здатність коронарних артерій до розслаблення оцінювали за реакцією на бета-адреноміметик ізопротеренол. Як зазначено в літе-

ратурі, вазодилатація у відповідь на ізопротеренол значною мірою опосередковується ендотелієм [18]. У нашому дослідженні в сЩЦД спостерігали суттєве пригнічення розслаблення коронарних артерій у відповідь на стимуляцію бета-адреноміметиком (табл. 2). Так, зменшення опору коронарних судин під впливом ізопротеренолу в концентрації 10^{-8} моль/л у сЩЦД було лише 0,1 у. о., у той час як у сНЩ воно складало 1,4 у. о. Такі зміни можуть призводити до розвитку ішемії міокарда за умов підвищеної потреби міокарда в кисні за ЦД [19].

Пригнічення експресії гена ПКС-δ за введення міРНК у щурів з ЦД призводило до відновлення реакцій коронарних артерій у відповідь на бета-адреностимуляцію, що проявлялось дозозалежними змінами тиску в коронарних судинах. При цьому опір судин за умов дії ізопротеренолу був у середньому на 30 % нижчим, ніж у сЩЦД, яким не вводили PRKCD-міРНК (табл. 2).

Значно нижчі величини частоти серцевих скорочень, які досягалися при стимуляції сердець ізопротеренолом, а також подовження інтервалу QTC за цих умов, на наш погляд, можуть бути пов'язані з вищезгаданим зниженням скоротливості міокарда, викликаним пригніченням експресії ПКС-δ [20].

Таким чином, отримані дані свідчать: перебіг експериментального ЦД 1 типу у щурів супроводжується зменшенням дилататорного потенціалу коронарних судин у відповідь на дію агоніста бета-адренорецепторів ізопротеренолу, а також розвитком компенсованих змін скоротливої активності міокарда. Пригнічення експресії гена ПКС-δ у щурів з ЦД сприяє нормалізації дилататорної реакції коронарних судин у відповідь на дію ізопротеренолу, але водночас призводить до зниження скоротливості міокарда. Іншими словами, роль ПКС-δ двояка: з одного боку, її експресія при ЦД є одним з механізмів адаптації міокарда до гіперглікемії, з іншого боку – причиною порушень функціональної активності коронарних судин.

На наш погляд, існує перспектива використання ПКС-δ як фармакологічної мішені для корекції порушень коронарного кровотоку (коронарної недостатності), що розвинулися внаслідок ЦД, за умов, якщо буде виявлена можливість усунути негативний вплив пригнічення активності ПКС-δ на скоротливу здатність міокарда.

1. *Boudina S.* Diabetic cardiomyopathy, causes and effects / S. Boudina, and E. Abel // Rev. Endocr. Metab. Disord. – 2010. – V. 11 (1). – P. 31–39.
2. *Falcão-Pires I.* Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment / I. Falc o-Pires, A. F. Leite-Moreira // Heart Fail. Rev. – 2012. – V. 17. – P. 325–344.
3. Role of Chronic Hyperglycemia in the Pathogenesis of Coronary Microvascular Dysfunction in Diabetes / M. F. Di Carli, J. Janisse, G. Grunberger, J. Ager // Journal of the American College of Cardiology. – 2003. – V. 41 (8). – P. 1387–1393.
4. Correlation of functional and structural alterations of the coronary arterioles during development of type II diabetes mellitus in rats. / Y. Yu [et al.] // J. Cardiovasc. Res. – 2002. – V. 56. – P. 303–311.
5. Diabetes Mellitus, Prediabetes, and Incidence of Subclinical Myocardial Damage / E. Selvin [et al.] // Circulation. – 2014. – V. 130. – P. 1374–1382.
6. *Way K. J.* Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications / K. J. Way, N. Katai, G. L. King // Diabet. Med. – 2001. – V. 18. – P. 945–959.
7. Changes in protein kinase C in early cardiomyopathy and in gracilis muscle in the BB/Wor diabetic rat / T.D. Giles [et al.] // Am. J. Physiol. – 1998. – V. 274. – P. H295–H307.
8. Diacylglycerol production and protein kinase C activity are increased in a mouse model of diabetic embryopathy / Y. Hiramatsu [et al.] // Diabetes. – 2002. – V. 51 (9). – P. 2804–2810.
9. Isolated heart perfusion according to Langendorff-Still viable in the new millennium / M. Skrzypiec-Spring, B. Grotthus, A. Szeląg, R. Schulz // J. Pharmacological and Toxicological Methods. – 2007. – V. 55. – P. 113–126.
10. Effect of hypoglycemia on beta-adrenergic sensitivity in normal and type 1 diabetic subjects / A. Fritsche [et al.] // Diabetes Care. – 1998. – V. 21 (9). – P. 1505–1519.
11. beta-Adrenergic activation reveals impaired cardiac calcium handling at early stage of diabetes / J. op den Buijs [et al.] // Life Sci. – 2005. – V. 76, №. 10. – P. 1083–1098.
12. *Kang M.* Protein kinase C delta and epsilon mediate positive inotropy in adult ventricular myocytes / M. Kang, J. W. Walker // J. Mol. Cell Cardiol. – 2005. – V. 38, № 5. – P. 753–764.

13. *Qu Y.* Protein kinase C mediated activation and phosphorylation of $Ca^{(2+)}$-pump in cardiac sarcolemma / Y. Qu, J. Torchia, A. K. Sen // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1992. – V. 70 (9). – P. 1230–1235.
14. *Periasamy M.* SERCA pump level is a critical determinant of Ca(2+) homeostasis and cardiac contractility / M. Periasamy, S. Huke// J. Mol Cell Cardiol. – 2001. – V. 33 (6). – P. 1053–1063.
15. Loss of PKC-delta alters cardiac metabolism / M. Mayr [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2004. – V. 287 (2). – H937–H945.
16. Maximal Coronary Flow Reserve and Metabolic Coronary Vasodilation in Patients With Diabetes Mellitus / P. J. Nahser [et al.] // Circulation. – 1995. – V. 91. – P. 635–640.
17. Decreased Vasodilator Response to Isoproterenol During Nitric Oxide Inhibition in Humans / C. Cardillo [et al.] // Hypertension. – 1997. – V. 30. – P. 918–921.
18. Endothelial defect mediates attenuated vasorelaxant response to isoproterenol after lung transplantation / K. Yoshida // Am. J. Physiol. – 1999. – V. 276 (1 Pt 2). – P. H159–H166.
19. Association Between Coronary Vascular Dysfunction and Cardiac Mortality in Patients With and Without Diabetes Mellitus / V. L. Murthy [et al.] // Circulation. – 2012. – V. 126. – P. 1858–1868.
20. *Howarth F. C.* Heart Rate and QT Interval in Streptozotocin-induced Diabetic Rat / F. C. Howarth, E. Adeghate, M. Jacobson // J. Med. Sci. – 2009. – V. 2 (3). – P. 108–118.

Н. В. Добреля, Є. В. Стрєлков, О. С. Хромов, К. І. Клименко, Т. В. Новохацька, А. І. Соловйов

Роль дельта-ізоформи протеїнкінази С у розвитку порушень коронарного кровотоку, що викликані цукровим діабетом

Мета дослідження – визначення залученості ПКС-δ у розвиток порушень функції міокарда та дилатації коронарних артерій за цукрового діабету.

Дослідження, проведені на білих щурах зі стрептозотоциновою моделлю цукрового діабету, показали, що в тварин експериментальних груп на тлі вираженої гіперглікемії спостерігалося збільшення артеріального тиску. Пригнічення експресії дельта-ізоформи ПКС за допомогою малих інтерферуючих РНК практично не впливало на вміст глюкози та величину тиску крові.

Розвиток експериментального ЦД 1 типу в щурів супроводжується зменшенням дилататорного потенціалу коронарних судин у відповідь на дію ізопротеренолу й розвитком компенсаторних змін скорочувальної активності міокарда. Пригнічення експресії гена ПКС-δ у щурів з ЦД сприяє нормалізації дилататорної реакції коронарних судин ізольованого серця, але водночас призводить до зниження скоротливості міокарда.

Ключові слова: цукровий діабет, стрептозотоцин, дельта-ізоформа протеїнкінази С, малі інтерферуючі РНК, коронарний кровотік, скоротливість міокарда

Н. В. Добреля, Е. В. Стрелков, А. С. Хромов, Е. И. Клименко, Т. В. Новохацкая, А. И. Соловьев

Роль дельта-изоформы протеинкиназы С в развитии нарушений коронарного кровотока, обусловленных сахарным диабетом

Согласно современным представлениям коронарная недостаточность, которая развивается у пациентов с сахарным диабетом (СД) как 1, так и 2 типа, главным образом, связана с нарушением эндотелий-зависимого расслабления коронарных артерий, что приводит к существенному снижению коронарного кровотока и обусловливает риск развития инфаркта миокарда. Важную роль в реализации воздействия гипергликемии на сердечно-сосудистую систему играет протеинкиназа С (ПКС). Ее активация может быть ключевым фактором нарушений коронарного кровообращения, развития фиброза, повышенной проницаемости сосудов, кардиомиопатии. Показано, что при СД экспрессия дельта-изоформы ПКС (ПКС-δ) в сердце существенно усиливается, но ее роль в развитии указанных патологических процессов остается не выясненной.

Цель исследования – определение вовлеченности ПКС-δ в развитие нарушений сократительной функции миокарда и дилатации коронарных артерий при сахарном диабете.

Исследования проводили на 18 самцах белых крыс. Сахарный диабет вызывали одноразовым внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (СТЗ) в дозе 60–65 мг/кг. Экспрессию δ изоформы ПКС подавляли введением малых интерферирующих РНК (PRKCD-миРНК). Для оценки функциональной активности использовали возрастающие концентрации изопротеренола (10^{-8}–10^{-6} моль/л) при постоянной скорости перфузии изолированного сердца.

Через 2 месяца после введения СТЗ у животных экспериментальных групп выявляли выраженную гипергликемию (30,0 ± 0,5 vs 6,9 ± 0,2 ммоль/л, $p < 0,05$) и увеличение артериального давления (126,5 ± 3,9 vs 112,7 ± 1,6 мм рт. ст., $p < 0,05$). Введение PRKCD-миРНК (400 мкг/кг дважды с 24-часовым интервалом) на содержание глюкозы и величину давления крови практически не влияло.

Давление в полости левого желудочка ($P_{лж}$) изолированного сердца крыс с сахарным диабетом (сКСД) было на 25 % ниже, чем в сердце нормальных крыс (сНК), а величины индекса сократимости (ИС) при этом практически не отличались. Введение PRKCD-миРНК приводило к увеличению (на 60 %)

РЛЖ и уменьшению (на 30 %) ИС по сравнению с аналогичными величинами в сКСД ($p < 0,01$). В условиях действия всех концентраций изопротеренола $P_{ЛЖ}$ сКСД было снижено по сравнению с контрольной группой, а при введении PRKCD-миРНК, существенно не отличалось от такового в сНК. ИС сердец с угнетением экспрессии гена ПКС-δ был снижен на 40 % ($p <0,05$).

Перфузия сердец раствором с возрастающими концентрациями изопротеренола приводила к снижению сопротивления коронарных сосудов ($C_{КС}$) сердец животных контрольной группы и его увеличению в сКСД. Введение PRKCD-миРНК предотвращало рост $C_{КС}$, а его величины были меньшими, как по сравнению с наблюдаемыми в сКСД, так и с исходными.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют: течение экспериментального СД 1 типа у крыс сопровождается уменьшением дилататорного потенциала коронарных сосудов в ответ на действие изопротеренола и развитием компенсированных изменений сократительной активности миокарда. Подавление экспрессии гена ПКС-δ у крыс с СД способствует нормализации дилататорной реакции коронарных сосудов, но в то же время приводит к снижению сократимости миокарда.

Ключевые слова: сахарный диабет, стрептозотоцин, дельта-изоформа протеинкиназы С, малые интерферирующие РНК, коронарный кровоток, сократимость миокарда

N. V. Dobrelya, E. V. Strelkov, A. S. Khromov, K. I. Klimenko, T. V. Novokhatskaya, A. I. Soloviev

Role of protein kinase C delta-isoform in the development of coronary blood flow disturbances due to diabetes mellitus

According to modern concepts, the coronary insufficiency in patients with both I and II type of diabetes mellitus (DM) is mainly associated with impaired endothelium-dependent relaxation of the coronary arteries, which leads to significant decrease in coronary blood flow and raises the risk of myocardial infarction. Protein kinase C (PKC) plays an important role in the realization of hyperglycemia effects on the cardiovascular system. Its activation may be a key factor in disturbances of the coronary circulation, development of fibrosis, increase in vascular permeability, cardiomyopathy. It is shown that expression of delta-isoform of PKC (PKC-δ) in the heart is significantly enhanced in DM, but its role in the development of these pathological processes remains unknown.

The aim of the study was to determine an involvement of PKC-δ in the development of disorders in myocardial contractile function and coronary artery dilatation in DM.

The studies were conducted on 18 male albino rats. Diabetes was induced by single intraperitoneal administration of Streptozotocin (STZ) at a dose of 60–65 mg/kg. Expression of PKC-δ was suppressed by injection of small interfering RNA (PRKCD-siRNA). To assess the functional activity, Isoproterenol in increasing concentrations (10^{-8}–10^{-6} mol/L) was used at constant perfusion rate of the isolated heart.

Two months after STZ injection, severe hyperglycemia (30,0 ± 0,5 vs 6,9 ± 0,2 mmol/L, $p < 0,05$) and increased blood pressure (126,5 ± 3,9 vs 112,7 ± 1,6 mm Hg, $p < 0,05$) have been revealed in animals of the experimental groups. Injection of PRKCD-siRNA (400 μg/kg twice with a 24-hour interval) had virtually no effect on glucose levels and blood pressure.

The left ventricle pressure (Plv) in the isolated hearts of the rats with induced diabetes (hDR) was lower by 25 % compared to the hearts of normal rats (hNR), but the values of the contractility index (CI) were hardly differed. Injection of PRKCD-siRNA resulted in increase in Plv (by 60 %) and decrease in CI (by 30 %) compared with the observed respective values in hDR ($p < 0,01$). Under the influence of Isoproterenol in all concentrations, Plv in hDR was decreased versus the control group, but after injection of PRKCD-siRNA, Plv did not significantly differ from values in hNR. In the hearts with suppressed expression of PKC-δ gene, CI was reduced by 40 % ($p < 0.05$).

Perfusion of hearts with isoproterenol solution in increasing concentrations resulted in both decrease in resistance of coronary vessels (Rcv) in the hearts of animals in the control group, and its increase in hDR. Injection of PRKCD-siRNA prevented rise in Rcv, and its values were lower as compared with both those observed in hDR and baseline values.

Thus, the data obtained evidence that the course of type 1 experimental diabetes in rats is accompanied by decrease in dilatation capacity of the coronary vessels in response to Isoproterenol and by development of the compensated changes of the myocardium contractile activity. Suppression of gene PKC-δ expression in diabetic rats favours the normalization of dilatatory reaction of the coronary vessels, but at the same time leads to decrease in myocardial contractility.

Key words: diabetes mellitus, streptozotocin, protein kinase C delta-isoform, siRNA, coronary flow, myocardial contractility

Надійшла: 26.11.2014 р.

Контактна особа: Добреля Наталія Володимирівна, молодший науковий співробітник,
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потьє, м. Київ, 03680.
Тел. + 38 0 44 456 02 88. Електронна пошта: ndobrelya@gmail.com