

О. І. Яцина¹, М. І. Мельник², О. В. Паршиков², Ф. І. Костєв³,
Ю. О. Фурманов⁴, А. І. Соловйов²

Ліпосомальний кверцетин нормалізує калієву провідність в ізольованих клітинах гладеньких м'язів гіперактивного сечового міхура щурів

¹Державна установа «Інститут урології Національної академії медичних наук України», м. Київ

²Державна установа «Інститут фармакології та токсикології Національної академії медичних наук України», м. Київ

³Одеський національний медичний університет Міністерства охорони здоров'я України

⁴Державна установа «Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова Національної академії медичних наук України», м. Київ

Ключові слова: іонні канали, VK_{Ca} канали, гладенькі м'язи сечового міхура, гіперактивність сечового міхура, ліпосомальний кверцетин

З'ясування механізму регуляції скоротливої активності сечового міхура та пошук фармакологічних засобів для корекції цього стану сьогодні є дуже актуальним питанням, оскільки така дисфункція як гіперактивний сечовий міхур (ГСМ) зустрічається досить часто, особливо в похилому віці, і негативно впливає на комфорт життя. Такі симптоми як ніктурія, часте та термінове сечовипускання, що супроводжується нетриманням сечі, характеризують наявність ГСМ [1, 2]. Деякі з симптомів характерні й ряду інших захворювань, що робить ГСМ складним для виявлення. Але при цьому відбувається порушення однакових фізіологічних функцій та властивостей: збільшення спонтанної міогенної активності, затримка відповіді на подразнення, морфологічні зміни структури гладеньких м'язів, локальна денервація міхура, збільшення сенсорних нейронів, гіпертрофія гангліозних клітин та інше [2–5]. Це вказує на те, що не дивлячись на різну етіологію, механізм розвитку патологій сечового міхура є спільним.

Сьогодні наукова спільнота все більше приділяє увагу пошуку молекулярних мішеней для корекції патологій, і найперспективнішими в цьому напрямі є іонні канали – молекулярні пропуск-

ні структури, що вбудовані в клітинну мембрану, які регулюють надходження та вихід іонів з клітини та, тим самим, модулюють найважливіші фізіологічні процеси, такі як збудження, забезпечення скорочення м'яза та зворотне розслаблення, проліферація та інші. Патології, що пов'язані з дисфункцією конкретних іонних каналів клітинної мембрани, отримали назву каналопатій [6, 7].

Порушення скоротливої функції сечового міхура можна теж віднести до каналопатії, де найвірогіднішою мішенню є калієві канали. Калієві канали відіграють надзвичайно важливу роль у гладеньких м'язах, оскільки їхня активація призводить до виходу іонів калію з клітини, що викликає гіперполяризацію мембрани та розслаблення м'яза. Залежно від молекулярної будови та специфіки активації розрізняють декілька класів калієвих каналів, з яких найзначущішими для забезпечення міорелаксації є потенціал-залежні калієві канали (K_v) та кальцій-чутливі калієві канали великої провідності (VK_{Ca}) [8–10]. Дані літератури вказують, що саме VK_{Ca} канали експресовані в більшій мірі та є найважливішими в регуляції скоротливої функції сечового міхура [11–13]. Так, у мишей з генетично видаленим поро-формуєчим геном *mSlo1* були відсутні струми через VK_{Ca} канали, тоді як кальцієві спарки та потенціал-залежні струми через калієві канали не відрізнялися від таких у контрольних мишей, і в

цих генетично змінених мишей спонтанна та нейрогенна скоротлива відповідь сечового міхура була значно більшою [11]. Такі результати вказують на вірогідне залучення VK_{Ca} каналів до регуляції скоротливої активності сечового міхура в нормі та їхню дисфункцію при патології, зокрема в разі ГСМ.

Мета дослідження – порівняти характеристику калієвого струму в гладеньком'язових клітинах (ГМК) здорових щурів та щурів з ГСМ, з'ясувати роль VK_{Ca} каналів у роботі сечового міхура та запропонувати фармакологічну корекцію модулятором цих каналів – ліпосомальним кверцетином.

Матеріали та методи. В експериментах використовували щурів-самців лінії Wistar середньою вагою 180–200 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію експериментальної лабораторії ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова НАМН України», м. Київ. Дослідження проводили відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях. Воно було ухвалене Комітетом з етики.

Модель ГСМ. Для створення експериментальних моделей ГСМ використовували методику, запропоновану В. М. Державиним та співавт. [14]. Модель відтворювали шляхом щоденного внутрішньовенного введення рауседилу в дозі 0,5 мг/кг упродовж 5–6 днів. Оцінку резервуарної функції міхура проводили за допомогою методу ретроградної цистотометрії до введення рауседилу та через 2 доби після проведення курсу. Параметри характеризувались достовірними ($P < 0,05$) змінами порівняно з контролем і відповідали даним літератури [14].

Виділення ізольованих ГМК сечового міхура. Усі дослідження проводили на свіжоізольованих ГМК сечового міхура. Тварини були етаназовані шляхом зміщення шийних хребців під дією етеру. Після цього розтинали тазову порожнину і вилучали сечовий міхур. Міхур розтинали вздовж і відмивали в модифікованому розчині Кребсу наступного складу (ммоль/л): 120 NaCl, 12 глюкоза, 10 HEPES, 6 KCl, 2,5 $CaCl_2$,

1,2 $MgCl_2$, pH 7,4 (NaOH). Далі під бінокулярним мікроскопом очищували гладеньком'язову тканину міхура від уротелію та супутніх тканин, а потім у розчині безкальцієвого Кребсу (у ммоль/л: 120 NaCl, 12 глюкоза, 10 HEPES, 6 KCl, pH 7,4 (NaOH)) нарізали її на фрагменти з середніми розмірами 1×1 мм.

Ферментативна інкубація клітин відбувалася в два етапи в розчині безкальцієвого Кребсу. Спочатку тканинні фрагменти інкубували з додаванням папаїну (1 мг/мл), дитіотреїтолу (1 мг/мл) та бичачого альбуміну (1 мг/мл) (Sigma, США) впродовж 22 хв за температури 36 °C, а потім переносили їх у ферментний розчин, що містив колагеназу типу 1А (1,5 мг/мл), дитіотреїтол (1,0 мг/мл) та бичачий сироватковий альбумін (1,5 мг/мл) (Sigma, США) упродовж 18 хв за температури 36 °C. Далі препарат відмивали тричі в розчині безкальцієвого Кребсу та механічно відокремлювали піпеткою Пастера. До отриманої клітинної суспензії додавали звичайний розчин Кребсу в пропорції 1:2. Суспензію клітин розливали на покривні скельця та використовували в експериментах не більше ніж 8 год.

Реєстрація трансмембранних струмів. Вихідні калієві струми ізольованих ГМК реєстрували методом «петч-клемп» у конфігурації whole-cell з використанням підсилювача AxoPatch 200B та програмного забезпечення pClamp 8 (Molecular Devices, CA, США). Мікроелектроди були зроблені в два етапи на пуллері P-97 (Flaming/Brown) з боросилікатного скла (1,5 мм OD, 0,86 мм ID; Harvard Apparatus) і мали опір 3,5–4,5 МОм. У досліді використовували зовнішній розчин Кребсу, а скляні мікроелектроди заповнювали розчином з високою концентрацією калію (у ммоль/л: KCl 130, MgATP 1, креатин 5, глюкоза 10, EGTA 0,3, HEPES 10, pH 7,4 (KOH)). Реєстрацію вихідних трансмембранних струмів проводили з використанням імпульсного step-протоколу від -70 мВ до +120 мВ. Утримуючий потенціал був -50 мВ.

Синтез кверцетин-вмісних ліпосом. Фосфатидилхолінові ліпосоми отримували з ліпідного розчину в етанолі,

який вилучали роторним випарювачем. Для створення ліпосомального кверцетину суспензію ліпосом та біофлавоноїд кверцетин спільно висушували, перемішували в 140 ммоль/л NaCl, соніфікували ультразвуком та заморожували при -250°C . Розмір кверцетинвмісних ліпосом становив (135 ± 20) нм. Кінцева концентрація ліпосомального кверцетину в робочому розчині була 3 мкг/мл у перерахунку на активний кверцетин.

Статистична обробка результатів. Усі експериментальні дані наведені у вигляді середнього арифметичного (M) та стандартної похибки середнього арифметичного (m) для певної вибірки (n). Усі розрахунки проводили з використанням комп'ютерної програми OriginPro 8.5 (Microcal Software Inc., США).

Результати та їх обговорення. Патологія ГСМ пов'язується з рядом каналопатій, зокрема, дисфункцією калієвих каналів [11–13]. Результати дослідження демонструють значне зниження густини вихідного калієвого струму в модельних щурів з ГСМ порівняно з контрольними тваринами (рис. 1, 2).

Показано, що густина калієвого струму при потенціалі $+120$ мВ у щурів з ГСМ зменшувалася від $(175,9 \pm 6,7)$ у контролі до $(64,9 \pm 12,1)$ пА/пФ (рис. 2А). Аналогічним чином змінювалася провідність іонних каналів: від $(0,87 \pm 0,03)$ у здорових тварин до $(0,32 \pm 0,06)$ пС/пФ у модельних (рис. 2Б).

У мембрані ГМК експресована велика різноманітність калієвих каналів, серед яких найзначущими являються K_v та $ВК_{Ca}$ канали [8–10]. Обидва класи активуються зміщенням мембранного потенціалу в бік деполяризуючих значень. Тому, використовуючи стандартний протокол реєстрації калієвих струмів, який поетапно змінює фіксує потенціал від -70 мВ до $+120$ мВ, неможливо відокремити внесок одного з цих двох класів каналів. Традиційно з цією метою використовують або селективні блокатори, або фіксацію внутрішньоклітинної концентрації кальцію на рівні, якого не достатньо для активації $ВК_{Ca}$ каналів.

Згідно з сучасними даними літератури, саме $ВК_{Ca}$ канали найвірогідніше

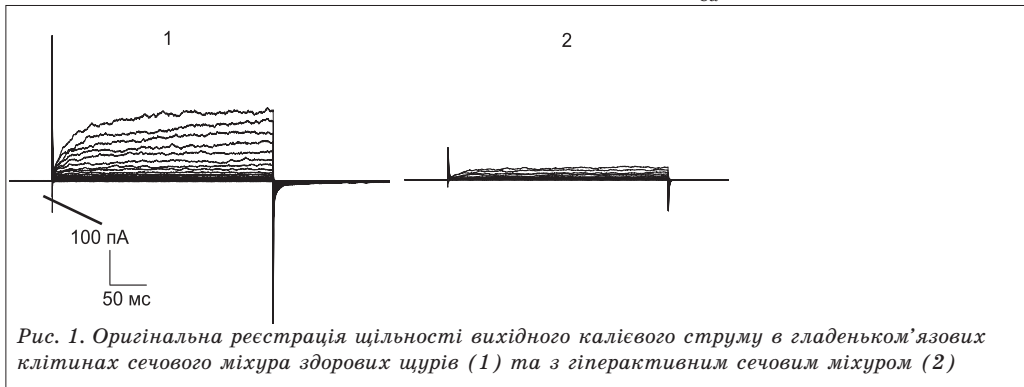


Рис. 1. Оригінальна реєстрація щільності вихідного калієвого струму в гладеньком'язових клітинах сечового міхура здорових щурів (1) та з гіперактивним сечовим міхуром (2)

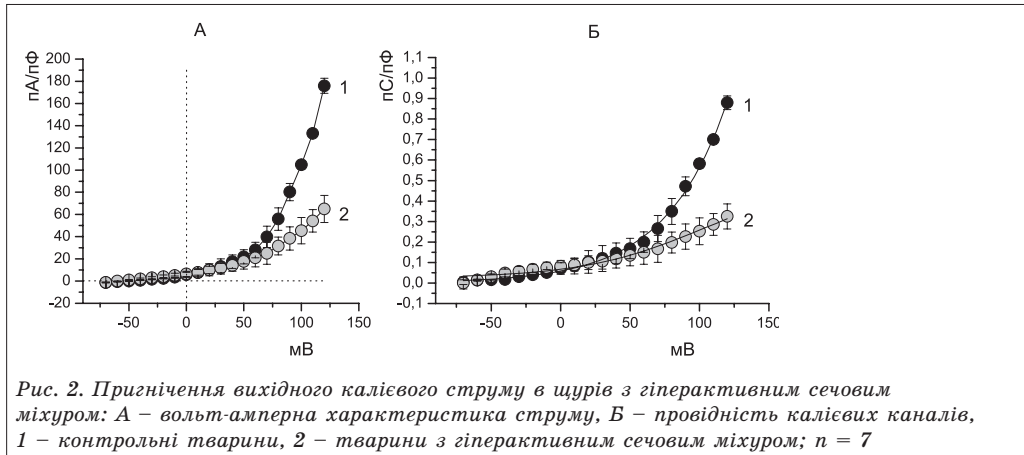
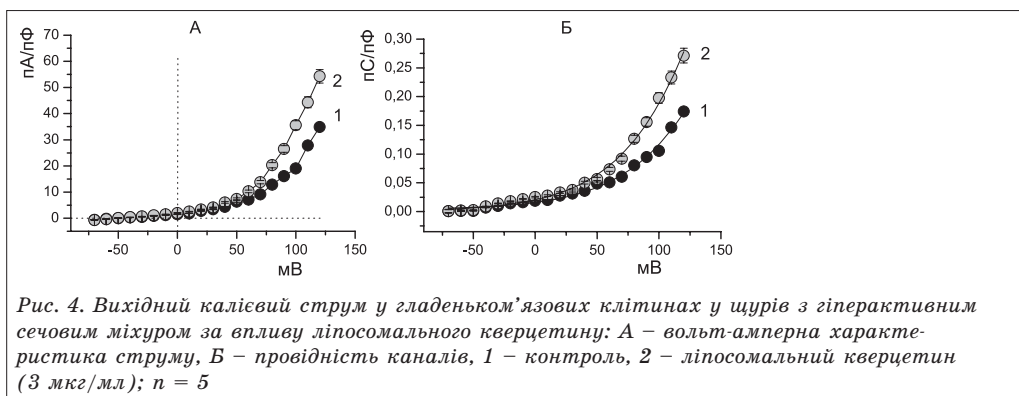
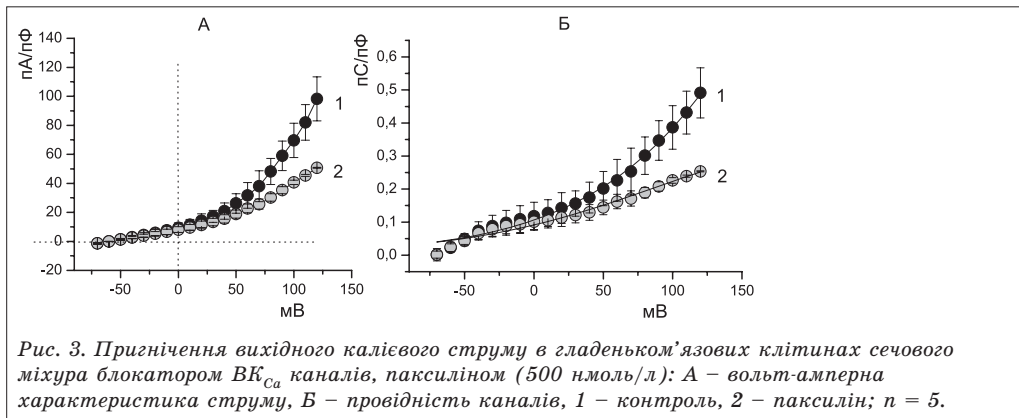


Рис. 2. Пригнічення вихідного калієвого струму в щурів з гіперактивним сечовим міхуром: А – вольт-амперна характеристика струму, Б – провідність калієвих каналів, 1 – контрольні тварини, 2 – тварини з гіперактивним сечовим міхуром; n = 7



залучені в розвиток патології ГСМ [11–13]. Результати дослідження показали, що селективний блокатор BK_{Ca} каналів паксилін у концентрації 500 нмоль/л пригнічував калієві струми приблизно на 50 %, з $(98,2 \pm 15,1)$ до $(50,7 \pm 1,3)$ пА/пФ (рис. 3А) та провідність каналів з $(0,49 \pm 0,07)$ до $(0,25 \pm 0,01)$ пС/пФ (рис. 3Б). Це свідчить про значну експресію цих каналів та їхню ймовірну важливу роль у регуляції функцій сечового міхура.

Не дивлячись на те, що калієві канали відіграють надзвичайну роль у підтриманні тону судин, перистальтики травного тракту та функціонуванні сечового міхура та міометрію, сьогодні практично не існує ефективних модуляторів цих каналів. Останнім часом значна увага наукової спільноти приділяється біофлавоноїдам як перспективним лікарським засобам. Зокрема, кверцетин – широко розповсюджений флавоноїд, який виявляє широкий спектр фармакологічних властивостей, таких як вплив на апоптоз клітин, на активність протеїнкінази С, інгібування ліпоксигенази та ін. [15–17].

Для забезпечення кращих проникаючих властивостей кверцетину було

запроваджено його інкапсуляцію в фосфатидилхолінові ліпосоми [18]. Однак ліпосомальна форма кверцетину виявила не тільки кращу здатність проникнення в клітину та меншу токсичність, але також і вищу біологічну активність. Так, ліпосомальний кверцетин показав здатність відновлювати пригнічений γ -радіацією калієвий струм через BK_{Ca} канали [19].

У цьому дослідженні як перспективний фармакологічний препарат для відновлення калієвого струму при ГСМ був застосований ліпосомальний кверцетин у концентрації 3 мкг/мл. Експериментальні дані свідчать, що він збільшував густину струму з $(34,8 \pm 0,8)$ до $(54,2 \pm 2,5)$ пА/пФ (рис. 4А) і провідність каналів з $(0,17 \pm 0,04)$ до $(0,27 \pm 0,01)$ пС/пФ (рис. 4Б). Таким чином, він може бути запропонований як модулятор дисфункцій сечового міхура.

Висновки

У щурів з моделлю ГСМ середня густина струму та провідність калієвих каналів ГМК була значно меншою порівняно зі здоровими тваринами. При цьому

селективний блокатор $ВК_{Ca}$ каналів паксилін пригнічував калієві струми приблизно вдвічі. Це підтверджує значну роль цих каналів у регуляції активності сечового міхура та їхнє ймовірне залучення до розвитку патології. Ліпо-

сомальний кверцетин певною мірою збільшував пригнічений калієвий струм за гіперактивності сечового міхура, що дозволяє вважати його перспективним фармакологічним засобом для лікування даної патології.

1. *Milsom I.* Overactive bladder: current understanding and future issues / I. Milsom // *BJOG*. – 2006. – V. 113, Is. s2. – P. 2–8.
2. *Steers W. D.* Pathophysiology of Overactive Bladder and Urge Urinary Incontinence / W. D. Steers // *Reviews in Urology*. – 2002. – V. 4, Is. 4. – P. s7-s18.
3. Focal changes in nerve, muscle and connective tissue in normal and unstable human bladder / R. G. Charlton, A. R. Morley, P. Chambers [et al.] // *Br. J. Urol.* – 1999. – V. 84. – P. 953–960.
4. *Brading A. F.* The unstable bladder: towards a common mechanism / A. F. Brading, W. H. Turner // *Br. J. Urol.* – 1994. – V. 73. – P. 3–8.
5. *De Groat W. C.* A neurological basis for the overactive bladder / W. C. De Groat // *Urology*. – 1997. – V. 50. – P. 36–52.
6. *Ashcroft F. M.* From molecule to malady / Ashcroft F. M. // *Nature*. – 2006. – V. 440. – P. 440–447.
7. *Kim J.-B.* Channelopathies / Kim J.-B. // *Korean J Pediatr.* – 2014. – V. 57, № 1. – P. 1–18.
8. $ВК_{Ca}$ channels as physiological regulators: a focused review / F. Vetri, M. S. R. Choudhury, D. A. Pelligrino [et al.] // *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*. – 2014. – V. 7. – P. 3–13.
9. *Ko E. A.* Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells / E. A. Ko, I. D. Jung, W. S. Park // *J. Smooth Muscle Res.* – 2008. – V. 44, № 2. – P. 65–81.
10. Direct modulation of Ca^{2+} -activated K^+ current by H-89 in rabbit coronary arterial smooth muscle cells / W. S. Park, Y. K. Son, N. R. Kim [et al.] // *Vascul Pharmacol.* – 2007. – V. 46. – P. 105–113.
11. Overactive Bladder and Incontinence in the Absence of the BK Large Conductance Ca^{2+} -activated K^+ Channel / A. L. Meredith, K. S. Thorneloe, M. E. Werner [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279, № 35. – P. 36746–36752.
12. *Petkov G. V.* Central role of the BK channel in urinary bladder smooth muscle physiology and pathophysiology / G. V. Petkov // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. – 2014. – V. 307, № 6. – P. R571–R584.
13. BK channel activation by NS11021 decreases excitability and contractility of urinary bladder smooth muscle / J. Layne, B. Nausch, S.-P. Olesen [et al.] // *Am J. Physiol Regul Integr Comp Physiol*. – 2010. – V. 298, № 2. – P. R378–R384.
14. *Державин В. М.* Экспериментальное изучение патогенеза нейрогенного мочевого пузыря / В. М. Державин, Е. А. Вишнеvский, Б. С. Гусев // *Урология и нефрология*. – 1977. – Т. 4. – С. 32–36.
15. The dietary flavonoid quercetin activates $ВК_{Ca}$ currents in coronary arteries via production of H_2O_2 . Role in vasodilatation / A. Cogolludo, G. Frazziano, A. Briones [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2007. – V. 73. – P. 424–431.
16. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle / J. Duarte, P. F. Vizcaino, A. Zarzuelo [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 1993. – V. 239. – P. 1–7.
17. Inhibition of protein kinase C activity by flavonoids / T. Takagi, Y. Tanino, S. Takekoshi [et al.] // *Proc School Engineer Tokai Univ.* – 1998. – V. 23. – P. 110–111.
18. Arrhythmogenic peroxynitrite-induced alterations in mammalian heart contractility and its prevention with quercetin-filled liposomes / A. Soloviev, A. Stefanov, A. Parshikov [et al.] // *Cardiovasc Toxicol.* – 2002. – V. 2. – P. 129–140.
19. *Soloviev A.* Quercetin-filled phosphatidylcholine liposomes restore abnormalities in rat thoracic aorta $ВК_{Ca}$ channel function following ionizing irradiation / A. Soloviev, S. Tishkin, S. Kyrychenko // *Acta Physiol Sinica*. – 2009. – V. 61, № 3. – P. 201–210.

О. І. Яцина, М. І. Мельник, О. В. Паршиков, Ф. І. Костев, А. І. Соловій
Ліпосомальний кверцетин нормалізує калієву провідність в ізольованих клітинах гладеньких м'язів гіперактивного сечового міхура щурів

Гіперактивність сечового міхура характеризується ніктурією, частим і терміновим сечовипусканням, що може супроводжуватися нетриманням сечі. Така патологія викликає значне погіршення якості життя людини. Натепер відомо, що гіперактивність сечового міхура пов'язана з порушенням функціонування нейронів, залучених до регуляції гладеньких м'язів та уротелію, але чіткий механізм розвитку дисфункції сечового міхура не з'ясовано. Однак вірогідною причиною може бути каналопатія $ВК_{Ca}$ каналів у гладеньких м'язах міхура.

Мета дослідження – порівняти характеристику калієвого струму в гладеньком'язових клітинах здорових щурів та щурів з моделлю гіперактивного сечового міхура, з'ясувати роль $ВК_{Ca}$ каналів у роботі сечового міхура та запропонувати фармакологічну корекцію модулятором цих каналів – ліпосомальним кверцетином.

За допомогою методу реєстрації трансмембранних струмів «петч клемп» показано суттєве зменшення густини калієвого струму в гладеньком'язових клітинах у щурів з гіперактивним сечовим міхуром від $(175,9 \pm 6,7)$ пА/пФ у контролі до $(64,9 \pm 12,1)$ пА/пФ на моделі. Селективний блокатор $ВК_{Ca}$ каналів

паксилін зменшував калієвий струм приблизно вдвічі, що вказує на значну функціональну експресію цих каналів та їхню важливу роль у регуляції скоротливої активності сечового міхура. Ліпосомальний кверцетин – ефективний активатор BK_{Ca} каналів – збільшував густину калієвого струму в гладеньком'язових клітинах сечового міхура модельних щурів з $(34,8 \pm 0,8)$ пА/пФ до $(54,2 \pm 2,5)$ пА/пФ.

Отже, гіперактивність сечового міхура пов'язана з каналопатією калієвих каналів і, зокрема, BK_{Ca} каналів, а їхня пригнічена функція може бути частково відновлена ліпосомальним кверцетином.

Ключові слова: іонні канали, BK_{Ca} канали, гладенькі м'язи сечового міхура, гіперактивність сечового міхура, ліпосомальний кверцетин

**А. И. Яцына, М. И. Мельник, А. В. Паршиков, Ф. И. Костев,
Ю.А. Фурманов, А. И. Соловьев**

Липосомальный кверцетин нормализует калиевую проводимость в изолированных гладкомышечных клетках гиперактивного мочевого пузыря крыс

Гиперактивность мочевого пузыря характеризуется никтурией, частым и срочным мочеиспусканием, что может сопровождаться недержанием мочи. Такая патология вызывает значительное ухудшение качества жизни человека. На сегодняшний день известно, что гиперактивность мочевого пузыря связана с нарушением функционирования нейронов, вовлеченных в регуляцию гладких мышц и уротелия, но точный механизм развития дисфункции мочевого пузыря пока не ясен. Тем не менее, вероятной причиной может быть каналопатия BK_{Ca} каналов в гладких мышцах пузыря.

Цель исследования – сравнить характеристику калиевого тока в гладкомышечных клетках здоровых крыс и крыс с моделью гиперактивного мочевого пузыря, а также выяснить роль BK_{Ca} каналов в функционировании мочевого пузыря и предложить фармакологическую коррекцию модулятором этих каналов липосомальным кверцетином.

С помощью метода регистрации трансмембранных токов «пэтч клемп» показано существенное уменьшение плотности калиевого тока в гладкомышечных клетках у крыс с гиперактивным мочевым пузырем от $(175,9 \pm 6,7)$ пА/пФ в контроле до $(64,9 \pm 12,1)$ пА/пФ на модели. Блокатор BK_{Ca} каналов паксилін уменьшал калиевый ток примерно вдвое, что указывает на значительную функциональную экспрессию этих каналов и их важную роль в регуляции сократительной активности мочевого пузыря. Липосомальный кверцетин – эффективный активатор BK_{Ca} каналов, увеличивал плотность калиевого тока в гладкомышечных клетках мочевого пузыря модельных крыс от $(34,8 \pm 0,8)$ пА/пФ до $(54,2 \pm 2,5)$ пА/пФ.

Таким образом, гиперактивность мочевого пузыря связана с каналопатией калиевых каналов и, в частности, BK_{Ca} каналов, а их угнетенная функция может быть частично восстановлена с помощью липосомального кверцетина.

Ключевые слова: ионные каналы, BK_{Ca} каналы, гладкие мышцы мочевого пузыря, гиперактивность мочевого пузыря, липосомальный кверцетин

O. Iatsyna, M. Melnyk, A. Parshikov, F. Kostev, Yu. Furmanov, A. Soloviev Liposomal quercetin normalizes potassium conductivity in isolated smooth muscle cells of rat's overactive bladder

Overactive bladder disease is characterized with nocturia, frequency and urgency of urination, often with urinary incontinence that worsening the comfort of patients life. Nowadays it is known that overactive bladder associated with a malfunction of neurons, smooth muscle and urothelium, but the mechanism of this dysfunction remains unclear. However, it probably might be due to BK_{Ca} channelopathy in bladder smooth muscle.

The aim of study was to compare the characteristics of potassium current in smooth muscle cells of healthy rats and rats with an overactive bladder model, to clarify the role of BK_{Ca} channels in the bladder and to propose the pharmacological correction of these channels by liposomal quercetin.

Using the method of patch clamp it was shown a significant decreasing of the potassium current density in smooth muscle cells of the rats with overactive bladder, from $(175,9 \pm 6,7)$ pA/pF in control to $(64,9 \pm 12,1)$ pA/pF in the model. Selective blocker of BK_{Ca} channels paxilline reduced potassium current about half, indicating significant functional expression of these channels and their important role in the regulation of bladder contractile activity. An perspective activator of BK_{Ca} channels, liposomal quercetin, increased current density in model rats from $(34,8 \pm 0,8)$ pA/pF to $(54,2 \pm 2,5)$ pA/pF.

Thus, overactive bladder disease is associated with channelopathy of potassium channels, particularly with BK_{Ca} channels and their suppressed function can be partially restored by liposomal quercetin.

Key words: ion channels, BK_{Ca} channels, smooth muscle of the bladder, overactive bladder, liposomal quercetin

Надійшла: 29 вересня 2016 р.

Контактна особа: Яцына Олександр Іванович, старший науковий співробітник, ДУ «Інститут урології НАМН України», буд. 9-А, вул. Ю. Коцюбинського, м. Київ, 04053. Тел.: + 38 0 67 698 55 11. Електронна пошта: yatsyna@gmail.com