

УДК: 612.133

Новохацька Т. В., Тишкін С. М., Досенко В. Є., Іванова І. В., Стрелков Є. В., Соловійов А. І.

ЗАСТОСУВАННЯ ІНТЕРФЕРУЮЧИХ РНК НА ОСНОВІ ПЛАЗМІДНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ПРИГНІЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА ДЕЛЬТА ІЗОФОРМИ ПРОТЕЇНкінази С І КОРЕКЦІЇ СУДИННИХ ДИСФУНКЦІЙ У ЩУРІВ ІЗ ГЕНЕТИЧНО ДЕТЕРМІНОВАНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ

Застосування методу РНК-інтерференції для пригнічення експресії гена PRKCD малими інтерферуючими РНК на основі плазмідного вектора (shПКСδ) у щурів із генетично детермінованою гіпертензією (ГДГ) викликає тривалий і стабільний інтерференційний ефект, що проявляється в істотному зменшенні рівня експресії мРНК δПКС. Введення shПКСδ щурам із ГДГ призводить до збільшення ендотелій-залежного розслаблення ізольованих сегментів аорти у відповідь на ацетилхолін. За допомогою методу фіксації потенціалу показано часткове відновлення функції $ВК_{Ca}$ каналів у гладеньком'язових клітинах аорти, проте амплітуда вихідного струму не досягала значень, що реєструються у клітинах здорових тварин. Встановлено порівняно тривале, але транзиторне зниження систолічного артеріального тиску у дослідних щурів після РНК-інтерференції упродовж 2 тижнів. Таким чином, блокування гена δПКС призводить до вираженої, але неповної нормалізації вазодилаторного потенціалу судинної стінки при артеріальній гіпертензії, що дає підстави вважати перспективним застосування цього методу для корекції судинних дисфункцій.

Ключові слова: дельта ізоформа протеїнінази С, РНК-інтерференція, гладенькі м'язи, $ВК_{Ca}$ канали, артеріальна гіпертензія.

Відомо, що артеріальна гіпертензія (АГ) супроводжується розвитком судинної дисфункції, і головними чинниками, які визначають та ха-
рактеризують цей стан, є послаблення ендотелій-залежного розслаблення і підвищення констрикторної здатності судинної стінки. Встановлено,

що ці аномалії пов'язані зі зменшенням активності кальцій-залежних потенціалкерованих калієвих каналів великої провідності ($ВК_{Ca}$) як в ендотеліальних, так і в гладеньком'язових клітинах (ГМК) [10; 11; 16; 18].

Результати численних досліджень свідчать, що протеїнкіназа С (ПКС) є одним із ключових факторів, які беруть участь у регуляції міогенного тонуусу стінки кровоносних судин [6]. Скорочувальна активність судинних ГМК залежить перш за все від кальцієвої та сумарної калієвої провідності клітинної мембрани, яка значною мірою визначається провідністю $ВК_{Ca}$ каналів, стан яких, своєю чергою, корелює з активністю ПКС [24]. Відомо, що розвиток артеріальної гіпертензії супроводжується гіперактивацією ПКС та зменшенням активності $ВК_{Ca}$ каналів [3]. Окрім того, показано, що блокада ПКС за допомогою селективних інгібіторів челеритрину та стауроспорину призводить до нормалізації скорочувальної функції судинної стінки у щурів із генетично детермінованою гіпертензією (ГДГ) [17].

Останнім часом з'являється дедалі більше доказів, що поряд з іншими факторами у розвитку серцево-судинних дисфункцій і формуванні гіпертензивного стану бере участь δ -ізоформа ПКС (δ ПКС) [15; 23]. Підвищення рівня експресії δ ПКС спостерігається також в аорті щурів із ГДГ [7].

Наше дослідження базується на припущенні, що пригнічення активності δ ПКС при розвитку цього патологічного стану може призвести до нормалізації судинної функції та зниження артеріального тиску.

Для пригнічення активності δ ПКС у судинній стінці застосовано технологію РНК-інтерференції (іРНК), суть якої полягає в пригніченні за допомогою малих інтерферуючих РНК (міРНК) експресії певного гена на стадії трансляції чи порушенні його транскрипції (посттранскрипційний сайленсинг) [8; 19]. Однією з головних проблем при застосуванні цього методу є проблема введення міРНК у цитоплазму клітини, тобто їх доставка до відповідної мішені для селективної деградації відповідної матричної РНК. Безпосереднє введення міРНК у кров'яне русло без застосування додаткових РНК-носіїв є малоефективним через їх відносну нестабільність та швидке руйнування в крові ендо- та екзонуклеазами [4; 12; 13]. Тому для застосування системи РНК-інтерференції використано метод трансфекції міРНК за допомогою генетичної конструкції на основі плазмідного вектора [22].

Метою дослідження було встановлення терапевтичної ефективності блокування експресії гена δ ПКС за допомогою міРНК та оцінка можливості корекції судинної дисфункції у щурів із генетично детермінованою гіпертензією.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на статевозрілих самцях (250–300 г) щурів лінії Вістар, поділених на 3 групи: 1 – контрольна, 2 – щури з генетично детермінованою гіпертензією (ГДГ), 3 – щури з ГДГ після застосування міРНК на основі плазмідного вектора. Усі досліди виконували відповідно до вимог Європейської конвенції захисту тварин, що використовуються в експериментальних та інших цілях, та були ухвалені комітетами з етики обох інститутів.

Ізоляція ГМК клітин аорти щура. ГМК виділяли з попередньо очищеної від сполучної тканини і витриманої протягом 5–10 хв. у безкальцієвому розчині Кребса грудної аорти. Склад розчину, ммоль/л: 140 NaCl, 5,9 KCl, 2,5 MgCl₂, 11,5 глюкози, 10 HEPES (pH 7,4). Сегмент аорти 1,0–1,5 см завдовжки розрізали на шматочки розміром 2x2 мм, які інкубувалися протягом 33 хв при температурі 37 °C в номінально безкальцієвому розчині Кребса з додаванням колагенази тип ІА (2 мг/мл), пронази Е (0,5 мг/мл), сироваткового альбуміну бика (2 мг/мл). Потім шматочки відмивали від ферментів у безкальцієвому розчині, клітини виділяли шляхом багаторазового піпетування. Міоцити, які зберігали в холодильнику при температурі +5 °C, залишалися у функціональному стані протягом 4 год.

Електрофізіологія. Трансміембранні струми вимірювали за допомогою методу фіксації потенціалу в модифікації «whole-cell perforated patch» із використанням антибіотика амфотерицину Б. 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 із підсилювача надходив через фільтр низьких частот (частота зрізу 2 кГц) на АЦП і оцифровувався з частотою дискретизації 10 кГц. Типові значення мембранного опору клітин становили 2–5 ГОм. Макроскопічні струми нормалізовано до пА/пФ. Індиферентний Ag-AgCl-електрод розміщено безпосередньо в камері для клітин об'ємом 200 мкл.

Мікропіпетки виготовляли з боросилікатного скла (Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, England) та заповнювали розчином такого складу, ммоль/л: 140 KCl; 10 NaCl; 1,2 MgCl₂; 10 HEPES; 2,5 CaCl₂; 11,5 D-глюкоза (pH 7,3); амфотерицин В 250 мкг/мл. Опір піпеток становив 2,5–5 МОм. Зовнішній розчин містив, ммоль/л: 140 NaCl; 5,9 KCl; 2,5 CaCl₂; 1,2 MgCl₂; 10 HEPES; 11,5 D-глюкоза (pH 7,4). В експериментах використано реактиви компанії «Sigma» (США).

Виділення РНК. Загальну РНК виділяли з грудної аорти щура за допомогою набору «Trizol RNA-prep» («Isogen», Росія). Концентрацію РНК визначали за допомогою спектрофотометра «NanoDrop ND 1000» («NanoDrop Tehnologies Inc.», США). Комплементарну ДНК синтезували з використанням «Random hexamer» праймера та зворотної транскриптази «RevertAid™ H Minus» («Fermentas», Литва) на однаковій кількості тогальної РНК (1,2–1,5 мкг).

ПЛР в реальному часі у термоциклері 7500 «Fast Real-Time PCR System» проводили в об'ємі 10 мкл реакційної суміші SYBR Green PCR Master Mix, яка містила по 30 пмоль праймерів для відповідних генів: PKC delta-S-5'-CTG GAA TAG TGA GCT CCC AGA C -3', PKC delta-A-5'-ATC ACC AGT CAC CCA CTC TTC T -3', beta-actin-S-5'-TCA TCA CTA TCG GCA ATG AGC -3' та beta-actin-A-5'-GGC CAG GAT AGA GCC ACC A -3'. Об'єм зразків було доведено до 20 мкл деіонізованою водою.

Специфічний сайленсінг гена δПКС. Для пролонгованого ефекту сайленсінгу гена PRKCD у тканинах щура, міРНК у формі шпильки (small hairpin RNA) – shПКСδ клонували у плазмідний вектор pSilencer™ 4.1-CMV neo («Ambion», США), під контролем промотора *H1 RNA polymerase III* та термінаторної послідовності *oligoT*. Олігонуклеотиди, специфічні до δПКС, були знайдені за допомогою програми «siRNA target Finder» («Ambion», США): Top Strand Oligonucleotide Template: 5'-GATCC TGACATCCCAGACAA-CAAC TTCAAGAGA GTTGTGTCTGGGATGTCATT A-3' and Bottom Strand Oligonucleotide Template: 5'-AGCTT AATGACATCCCAGACAA-CAAC TCTCTTGAA GTTGTGTCTGGGATGTCA G-3' («Applied Biosystems», США). Верхній та нижній ланцюги олігонуклеотидів shRNA було розведено до концентрації 1 мкг/мкл у буфері TE та проведено аннелінг у 50 мкл розчину відповідно до протоколу виробника. Після аннелінгу зразок міРНК лігують у вектор pSilencer 4.1-CMV за допомогою лігази T4 DNA (5 Од/мкл), продукт трансформують у клітини штам-реципієнта *E. coli XL*. Клітини висаджено на 16 год. у чашки Петрі з LB, які містили 100 мкг/мл ампіциліну, при 37°C. З обраної колонії виділено плазмідну ДНК за допомогою «GeneJET™ Plasmid Midiprep Kit» («Thermo Scientific», США). Рестрикція ізольованих плазмід проведено за сайтами BamHI та HindIII (Thermo Scientific, США), присутність вставки shПКСδ розміром 55 пар нуклеотидів підтверджено за допомогою електрофорезу у 2,5 % агарозному гелі. Для пригнічення експресії гена PRKCD *in vivo* отриманий вектор, що експресує shПКСδ, доставлено внутрішньовенно щурам (400 мкг/кг).

Молекулярні та функціональні зміни (експресія матричної РНК δПКС, активність VK_{Ca} , ендотелій-залежне розслаблення та систолічний артеріальний тиск) проаналізовані на 7-му та 30-ту добу після доставки генетичної конструкції.

Скорочувальна активність аорти щура. Для вивчення скорочувальної активності аорту видаляли та розміщували у препарувальній чашці зі стандартним буферним розчином Кребса при кімнатній температурі. Частину аорти завдовжки 1,0–1,5 см ретельно очищували від сполучної тканини і розрізали на кільця завширшки 0,5–1,0 мм. Кільцеві фрагменти аорти монтували у проточній термостабілізованій камері об'ємом 0,5 мл при температурі 37 °C на сталевих гачках в ізометричному режимі за вихідного навантаження 10–20 мН та перфузували сольовим буферним розчином Кребса (рН – 7,4) з постійною швидкістю 2,5–3,0 мл/хв. Вихідне тонічне скорочення ізольованих фрагментів судин викликали при введенні в перфузуючий розчин норадrenalіну в концентрації 10⁻⁵ моль/л. Реєстрацію скорочень здійснювали за допомогою аналогового перетворювача «Lab-Trax 4/16» («World Precision Instruments», США), з'єданого з персональним комп'ютером. Ендотелій-залежне розслаблення викликали ацетилхоліном (10⁻⁹ – 10⁻⁵ моль/л), який додавали у перфузуючий розчин (зміна концентрації ацетилхоліну здійснювалась протягом 10–15 сек.). В експериментах використано реактиви компанії «Sigma» (США).

Реєстрація артеріального тиску у щурів. Вимірювання артеріального тиску проводили неінвазивним шляхом у хвостовій артерії щурів протягом 30 діб після РНК-інтерференції. Для цього використано вимірювальний комплекс «Sphygmanometer S-2» («HSE», Німеччина). Наявність пульсацій визначали за допомогою осцилоскопа НМ 303-4 («HAMEG GmbH», Німеччина).

Статистичну обробку даних виконували за допомогою програми «Origin 7,5» («Microcal Software Inc.») з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (One-Way ANOVA) та методу Тьюкі за наявності достовірної різниці. Різницю вважали статистично достовірною при $P < 0,05$. Результати отримують у вигляді середнього арифметичного (M) та стандартної похибки середнього арифметичного (m) для певної вибірки (n). Для визначення концентрації напівмаксимального ефекту залежності доза-ефект були апроксимовані рівнянням Хілла ($F = F_{max} / [1 + \exp(\log EC_{50} - \log C)h]$), де F і F_{max} – поточний та максимальний дилататорні ефекти, h – коефіцієнт Хілла, EC_{50} – напівмаксимальна ефективна концентрація, C – діюча концентрація). Аналіз результатів «whole-cell perforated patch» експериментів проведено за допомогою програмного забезпечення pCLAMP версія 6.02 («Axon Instruments Inc.»), США).

Результати та обговорення

Експерименти із застосуванням молекулярно-біологічного методу «кількісна ПЛР у реальному часі» показали, що рівень експресії матричної РНК (мРНК) δПКС в аорті щурів із ГДГ значно вищий порівняно з контрольними тваринами ($43,6 \pm 6,69$ vs $11,8 \pm 1,88$ відповідно, $p < 0,05$). Після сайленсингу гена ПКС за допомогою плазмідного вектора, що експресує shПКСδ, рівень експресії мРНК δПКС істотно зменшився, на 7-му добу після введення вектора становив $8,04 \pm 4,08$ і з високим рівнем статистичної достовірності ($p < 0,001$) відрізнявся від відповідних значень для щурів з ГДГ (рис. 1). Окрім того, величина експресії гена PRKCD у межах статистичної помилки збігалася з відповідною величиною для контрольних щурів. На 30-ту добу експерименту не виявлено статистично значимих змін експресії мРНК δПКС порівняно із 7-ю добою ($16,92 \pm 1,26$, $p > 0,05$), її величина була значно менша і становила приблизно третину від значень, характерних для щурів із ГДГ. Рівень експресії мРНК δПКС на 30-ту добу не відрізнявся від аналогічного показника у здорових тварин. Ці дані підтверджують факт здійснення РНК інтерференції та демонструють тривалий і стабільний ефект сайленсингу протягом 30-добового експериментального періоду.

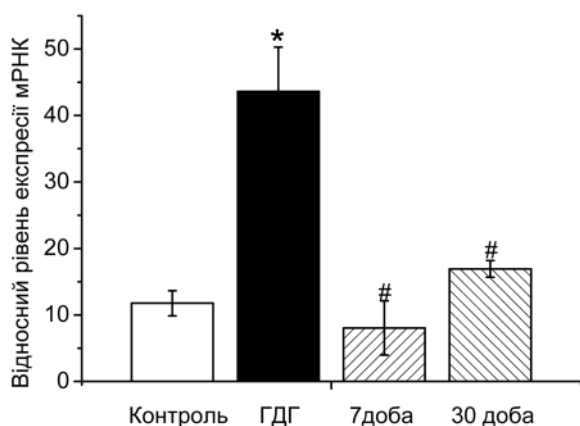


Рис. 1. Вплив пригнічення експресії гена на рівень мРНК дельта ізоформи ПКС у гладеньком'язових клітинах аорти здорових щурів та щурів з генетично детермінованою гіпертензією на 7-му та 30-ту добу після РНК інтерференції. ГДГ – щурі з генетично детермінованою гіпертензією. Показник експресії δПКС нормовано за рівнем експресії β-актину; $n = 8$; * – $P < 0,05$ – порівняно з контролем; # – $P < 0,05$ – порівняно з ГДГ

Введення вектора, що експресує shПКСδ, щурам із ГДГ викликало швидке та тривале зниження артеріального тиску (АТ). На рис. 2 представлена динаміка змін АТ протягом 30 діб після введення. Вже у першу добу виявлялось суттєве зменшення систолічного тиску – з $156 \pm 1,8$ мм рт. ст. ($n = 8$) до $136 \pm 3,2$ мм. рт. ст. ($n = 8$,

$p < 0,05$). Протягом наступних 7 діб АТ істотно не змінювався і залишався на рівні близько 135 мм рт. ст. Однак після 7-ої доби починалось повільне його підвищення і на 17-ту добу артеріальний тиск наближався до вихідного значення 159 ± 3 мм рт. ст. ($n = 8$). Надалі величина тиску не змінювалася до 30-ї доби спостережень.

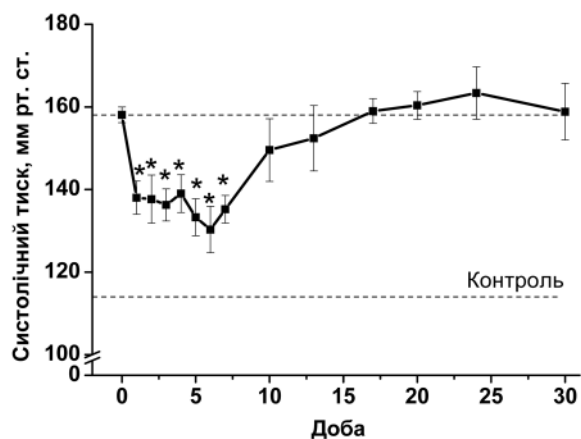


Рис. 2. Вплив сайленсингу гена δПКС на систолічний артеріальний тиск щурів із генетично детермінованою гіпертензією; * – $P < 0,05$ порівняно з початковим рівнем у ГДГ

Таким чином, сайленсинг гена δПКС на початковій стадії у ранні строки протягом тижня викликав помітне, хоча і не до нормальних значень, зниження АТ щурів із ГДГ. Неочікуваними виявилися результати, отримані протягом місячного експерименту, які показали поступове зникнення ефекту сайленсингу гена δПКС, збільшення АТ та його повернення у віддаленому періоді до величин, характерних для щурів з ГДГ, незважаючи на виражене тривале пригнічення експресії мРНК δПКС. Отримані дані свідчать, що хоча δПКС і відіграє певну роль у підвищенні АТ при АГ, але не є головним фактором, який контролює рівень АТ.

Відомо, що артеріальний тиск визначається головним чином серцевим викидом та станом скоротливості гладеньких м'язових клітин судинної стінки. Розвиток артеріальної гіпертензії супроводжується виникненням феномену гіперскоротливості судинної стінки, характерними рисами якого є збільшений судинний тонус, ослаблення дилататорного контролю ендотелію з відповідним зменшенням ендотелій-залежних реакцій у відповідь на стимуляцію ендотелію агентами, що розслаблюють, такими, наприклад, як ацетилхолін (АХ), та збільшення скорочувальної спроможності ГМК судин при дії констрикторних агентів. Судинний тонус чи рівень скорочення ГМК судинної стінки визначається внутрішньоклітиною концентрацією кальцію ($[Ca^{2+}]_i$), який надходить у клітину через активо-

вані потенціал-керовані Ca^{2+} канали L-типу [5]. Ступінь відкриття Ca^{2+} каналів пов'язаний із мембранним потенціалом і збільшується при деполяризації мембрани м'язової клітини. Мембранний потенціал, своєю чергою, залежить від величини калієвої провідності мембрани, значну частину якої становить провідність Ca^{2+} -залежних потенціал-керованих VK_{Ca} каналів. Результатом відкриття VK_{Ca} каналів є гіперполяризація мембрани та зниження входу Ca^{2+} в клітину, що обмежує надмірне скорочення судинної стінки за принципом негативного зворотного зв'язку. Зменшення функціональної активності VK_{Ca} каналів, може призвести до деполяризації мембрани клітини, неконтрольованого росту внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} та виникнення гіперскоротливості м'язових клітин [11]. Для оцінки функціонального стану провідності VK_{Ca} каналів клітинної мембрани зазвичай використовують величину калієвого струму через канали такого типу, яка і є одним із показників констрикторної або дилататорної спроможності ГМК судинної стінки.

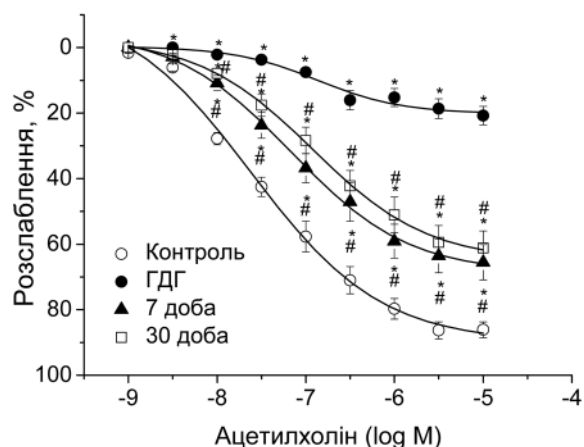


Рис. 3. Вплив блокування експресії гена δPKC за допомогою δPKC -shRNA на ацетилхолін-індуковане розслаблення сегментів грудної аорти щурів: 1 – здорові щурі, 2 – щурі з генетично детермінованою гіпертензією, 7 доба – щурі з ГДГ на 7-му добу після РНК-інтерференції, 4 – щурі з ГДГ на 30-у добу після РНК-інтерференції. Розслаблення виражено у відсотках відносно скорочення при введенні норадреналіну (10^{-5} моль/л); $n = 8$; експериментальні дані апроксимовано за рівнянням Хілла; * – $P < 0,05$ порівняно з контролем; # – $P < 0,05$ порівняно з ГДГ

Для вивчення активності калієвих каналів у ГМК судин контрольних щурів і щурів із ГДГ проведено електрофізіологічні експерименти у модифікації «перфорований whole-cell patch-clamp». Для активації вихідних струмів ізольовані гладеньком'язові клітини аорти стимулювали деполяризуючими імпульсами тривалістю 300 мс у діапазоні від -100 мВ до $+70$ мВ від потенціалу спокою -60 мВ. На рис. 3 представлені вольт-амперні залежності сумарного вихідного

струму від мембранного потенціалу. В ізольованих ГМК аорти контрольних щурів при деполяризувальному зміщенні мембранного потенціалу від підтримуваного потенціалу -60 мВ до $+70$ мВ виникав струм вихідного напрямку зі щільністю $52 \pm 2,5$ пА/пФ ($n = 8$). Щільність струму в ГМК аорти тварин із ГДГ була значно і, вірогідно, менша та становила $25 \pm 1,4$ пА/пФ ($n = 19$, $P < 0,05$). Сайленсинг гена PRKCD на 7-му добу після введення тваринам shPKC δ викликав збільшення вихідного струму до $37 \pm 2,5$ пА/пФ ($n = 15$, $P < 0,05$). Ця величина статистично значимо перевищувала аналогічну у щурів з ГДГ, однак не досягала контрольних значень і була з вірогідністю 95 % менша порівняно з клітинами здорових тварин. Аналогічні електрофізіологічні вимірювання, проведені на 30-ту добу експерименту, показали, що це збільшення струму зберігається на тому ж рівні ($33 \pm 2,7$ пА/пФ ($n = 15$, $P < 0,05$)), проте додаткових статистично значимих змін вихідних струмів не виявлено.

Для виділення із сумарного струму компоненти, яка переноситься через VK_{Ca} канали, використовували селективний блокатор цих каналів – паксилін, який додавали у зовнішній розчин у концентрації 500 нмоль/л [21]. На рис. 4 подано компонентний склад струму, що виникає при деполяризуючому зміщенні мембранного потенціалу від підтримуваного потенціалу -60 мВ до $+70$ мВ. Виявилось, що в ГМК аорти контрольної групи щурів щільність паксилін-чутливої компоненти струму дорівнювала $39 \pm 2,8$ пА/пФ, при цьому щільність цієї компоненти у щурів із ГДГ була значно меншою і становила $18 \pm 2,3$ пА/пФ. У тварин з нокаутом гена PRKCD на 7-му добу величина струму через VK_{Ca} канали була суттєво і статистично значимо збільшена та становила $25 \pm 2,5$ пА/пФ, однак із ймовірністю 95 % не досягала контрольних значень (рис. 4). Таку ситуацію спостерігали і на 30-ту добу після введення тваринам shPKC δ , тобто ступінь збільшення струму через VK_{Ca} канали ($25 \pm 2,4$ пА/пФ) не змінювався і додаткової нормалізації функціонального стану VK_{Ca} каналів не спостерігалось.

Отримані результати свідчать, що зменшення вихідного струму в ГМК аорти щурів із ГДГ виникає через пригнічення паксилін-чутливої компоненти струму. Після здійснення інтерференції та сайленсингу гена δPKC відбувається часткове відновлення цієї компоненти, яка є мірою функціональної активності VK_{Ca} каналів, однак дефіцит провідності через VK_{Ca} канали зберігається.

Ще одним показником стану скоротливості судин є дилататорний потенціал ендотелію, тобто його спроможність контролювати та обмежувати скорочення ГМК судинної стінки за рахунок секретії комплексу розслаблюючих агентів.

У роботі тестували функціональну активність однієї з найпотужніших вазодилаторних систем – системи оксиду азоту. Активація цієї системи здійснювалась стандартним способом із застосуванням вазодилатора ацетилхоліну, який викликає розслаблення судинної стінки ендотелій-залежним опосередкованим системою NO шляхом. Проведено дослідження залежностей доза–ефект для розслаблення гладеньком’язових сегментів грудного відділу аорти щурів, які отримували під кумулятивною дією ацетилхоліну у концентраціях 10^{-9} – 10^{-5} моль/л. Результати експериментів подано на рис. 5. Розслаблення викликали на фоні попереднього скорочення судинних сегментів норадреналіном у концентрації 10^{-5} ммоль/л, величина розслаблення нормована на величину скорочення у відповідь на норадреналін і представлена у відсотках.

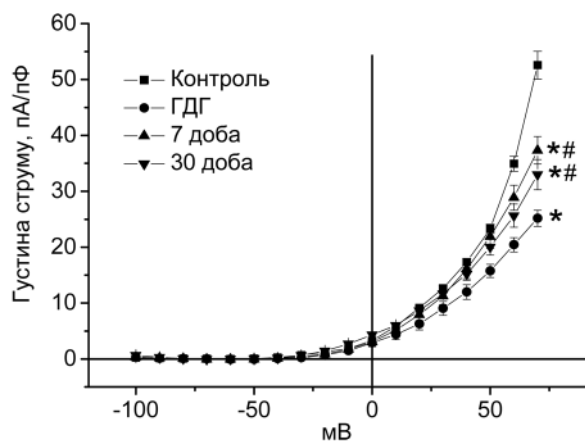


Рис. 4. Вольт-амперні характеристики вихідного струму, зареєстрованому в гладеньком’язових клітинах аорти щурів. Деполаризуюче зміщення мембранного потенціалу імпульсами тривалістю 300 мс кроком 10 мВ від підтримуваного потенціалу -60 мВ до $+70$ мВ викликало струм вихідного напрямку: 1 – здорові щурів, 2 – щурів з генетично детермінованою гіпертензією, 3 – щурів з ГДГ на 7-му добу після РНК-інтерференції, 4 – щурів з ГДГ на 30-ту добу після РНК-інтерференції. $n = 8$; * – $P < 0,05$ – порівняно із контролем; # – $P < 0,05$ – порівняно із ГДГ

Встановлено, що судинна стінка аорти щурів із ГДГ значно слабше реагує на ацетилхолін порівняно із судинами здорових тварин. Величина максимального розслаблення у щурів із ГДГ становила тільки $20,8 \pm 2,85$ % базового скорочення, тоді як у здорових щурів цей параметр дорівнював $86,1 \pm 2,40$ %. Концентрація половинного ефекту, що характеризує чутливість холінорецепторів ендотелію до агоністу, для судин щурів із ГДГ збігалася з контрольними значеннями ($\log EC_{50} = -7,25 \pm 0,5$ і $\log EC_{50} = -7,35 \pm 0,5$ відповідно, $P > 0,05$, $n = 12$).

Застосування РНК інтерференції дПКС у щурів із ГДГ викликало значні зміни скоротливих реакцій сегментів аорти і відповідь на стимуля-

цію ендотелію. Величина максимального розслаблення на АХ вже через тиждень збільшувалась майже втричі та досягала $65,5 \pm 5,38$ % від попередніх значень. Важливо зазначити, що незважаючи на значне посилення спроможності до розслаблення, повної нормалізації дилаторної функції не спостерігалось, і максимальне розслаблення на АХ залишалось приблизно на чверть менше порівняно зі здоровими тваринами. Проте концентрація половинного ефекту ($\log EC_{50} = -7,30 \pm 0,4$, $P > 0,05$, $n = 12$) при цьому не змінювалась і не відрізнялась як від контрольних значень, так і значень, зареєстрованих у щурів із ГДГ. Це може свідчити про відсутність впливу дПКС на кінетичні параметри взаємодії ендотеліальних холінорецепторів з АХ, а також про незмінність кінетики цієї взаємодії у гіпертензивному стані, принаймні у випадку щурів із ГДГ.

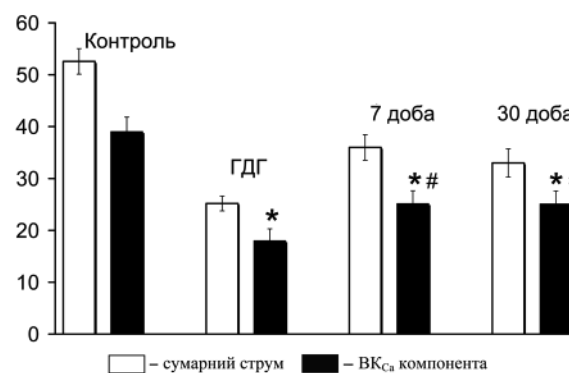


Рис. 5. Дія паксиліну (500 ммоль) на вихідні струми при потенціалі $+70$ мВ, зареєстровані в ГМК, отриманих з аорти щурів: 1 – здорові щурів, 2 – щурів з генетично детермінованою гіпертензією, 3 – щурів з ГДГ на 7-му добу після РНК-інтерференції, 4 – щурів з ГДГ на 30-ту добу після РНК-інтерференції. $n = 8$; * – $P < 0,05$ – порівняно з відповідним компонентом струму в ГМК здорових щурів; # – $P < 0,05$ – порівняно з відповідним компонентом струму в ГМК щурів із ГДГ

Аналогічні дослідження проведено на 30-ту добу після введення експресуючого вектора щурів із ГДГ. Вивчення залежностей доза–ефект для АХ показало, що величина максимального розслаблення на цей час залишалась збільшеною ($61,2 \pm 5,21$ % від попереднього скорочення) і відповідала значенням, зареєстрованим на 7-му добу. Не виявлено статистично значних відмінностей між цими параметрами. Концентрація половинного ефекту ($\log EC_{50} = -7,28 \pm 0,5$, $P > 0,05$, $n = 12$) при цьому також не змінювалась і не відрізнялась як від значень, зареєстрованих у щурів із ГДГ, так і від значень, характерних для здорових тварин.

Отримані дані свідчать, що δ -ізоформа ПКС відіграє важливу роль у розвитку гіперскоротливості судинної стінки у щурів із ГДГ. Ослаблення дилаторного контролю в судинах у стані

АГ, що проявляється у зниженні функціональної активності $ВК_{Ca}$ каналів та зменшенні ендотелій-залежного розслаблення, супроводжується збільшенням активності δ ПКС, проте досі не з'ясовано, чи є і якою мірою це збільшення причиною виникнення підвищеного рівня АТ при розвитку АГ. Літературні дані свідчать, що такі порушення характерні для різних типів артеріальної гіпертензії і є загальною визначною рисою цього патологічного процесу [2; 9; 14; 20].

Застосування РНК-інтерференції гена PRKCD за допомогою векторної конструкції з інтерферуєчими РНК значно, проте лише частково відновлює ендотелій-залежне розслаблення та функцію $ВК_{Ca}$ каналів у ГМК судин щурів із ГДГ, які суттєво пригнічені в судинах цих тварин. Доказом ефективності застосованого методу та здійснення трансфекції вектора та експресії shPKC δ в ГМК судин є значне зниження до нормальних значень рівня експресії мРНК δ ПКС. Отже, РНК інтерференція може бути вдалим методом для «нокдауну генів» ПКС та часткової нормалізації вазодилаторного потенціалу у щурів із ГДГ. Неповне відновлення показників скоротливої активності може свідчити про те, що δ ПКС є не єдиним фактором, що визначає судинні дисфункції при АГ.

Зауважимо, що інтегральний показник стану серцево-судинної системи у щурів зі спонтанною гіпертензією – артеріальний тиск значною мірою знизився у перший тиждень після блокування гена PRKCD за допомогою shPKC δ , проте залишаються незрозумілими механізми відновлення підвищеного рівня артеріального тиску у тривалі терміни, незважаючи на поліпшення ендотеліальної функції і функціонального стану $ВК_{Ca}$ каналів протягом усього періоду спостережень. Отримані дані свідчать, що хоча дефіцит $ВК_{Ca}$ каналів і знижена ендотеліальна функція і відіграють важливу роль у розвитку підвищеної констрикторної активності судин, проте їхній внесок у розвиток АГ не є основним. Підтвердженням цьому можуть слугувати дані про те, що «нокдаун» гена $ВК_{Ca}$ каналів і суттєве зниження їхньої активності не призводить до вираженого підвищення артеріального тиску [1]. Механізми розвитку АГ є багатоаспектними і гіперактивація δ ПКС, ймовірно, є лише одним із факторів її фор-

мування, причому більшою мірою цей фактор впливає на скорочувальні властивості судинної стінки і не є вирішальним механізмом підвищення артеріального тиску. Однак зареєстрована відчутна нормалізація скорочувальної функції судинної стінки внаслідок пригнічення експресії δ ПКС дає підстави вважати доцільним використання у майбутньому методу блокування експресії генів протеїнкінази С за допомогою РНК-інтерференції з метою корекції судинних дисфункцій при есенційній гіпертензії.

Висновки

1. Введення shPKC δ щурам із ГДГ викликає тривалий і стабільний інтерференційний ефект, що проявляється в істотному зменшенні рівня експресії мРНК δ ПКС.
2. Сайленсинг гена δ ПКС на початковій стадії протягом тижня викликає помітне, хоча і не до нормальних значень, зниження АТ щурів із ГДГ, однак у віддаленому періоді цей ефект поступово зникає і АТ збільшується до величин, характерних для щурів із ГДГ, незважаючи на виражене тривале пригнічення експресії мРНК δ ПКС.
3. Після здійснення інтерференції та сайленсингу гена δ ПКС в ізольованих клітинах аорти відбувається часткове відновлення пригніченої паксилін-чутливої компоненти трансмембранного струму, яка є мірою функціональної активності $ВК_{Ca}$ каналів, проте дефіцит провідності через $ВК_{Ca}$ канали зберігається протягом всього експериментального періоду.
4. Застосування РНК інтерференції δ ПКС у щурів із ГДГ значно посилює пригнічене ендотелій-залежне розслаблення сегментів аорти, проте повної нормалізації дилаторної функції не спостерігається, і максимальне розслаблення приблизно на чверть менше порівняно зі здоровими тваринами протягом всього експериментального періоду.
5. Блокування гена δ ПКС призводить до часткової нормалізації вазодилаторного потенціалу судинної стінки при АГ, що дає підстави вважати доцільним використання цього методу для корекції судинних дисфункцій при есенційній гіпертензії.

Література

1. siРНК індукований сайленсинг генів – сподівання та перспективи використання в сучасній фармакології та фізіології: спроба з'ясувати роль $ВК_{Ca}$ каналопатії в розвитку артеріальної гіпертензії / С. В. Кириченко, С. М. Тишкін, В. Є. Досенко [та ін.] // Журн. Акад. мед. наук України. – 2009. – Т. 15. – № 2. – С. 386–398.
2. Amberg G. Downregulation of the BK channel β 1 subunit in genetic hypertension / G. Amberg, L. Santana // Cellular Biology – 2003. – Vol. 93. – P. 965–971.
3. Amberg G. Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca^{2+} activated K^{+} channels in vascular smooth muscle during hypertension / G. Amberg, A. Bonev, C. Rossow // J. Clin. Invest. – 2003. – Vol. 112, № 5. – P. 717–724.
4. Chiu Y. L. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis / Y. L. Chiu, T. M. Rana // RNA. – 2003. – Vol. 9. – P. 1034–1048.
5. Ding Y. Hypotonic swelling stimulates L-type Ca^{2+} channel activity in vascular smooth muscle cells through PKC / Y. Ding,

- D. Schwartz, P. Posner et al. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2004. – Vol. 287, № 2. – P. 413–421.
6. Figueroa X. F. Connexins : gaps in our knowledge of vascular function / X. F. Figueroa, B. E. Isakson, B. R. Duling // *Physiology.* – 2004. – Vol. 19, №5. – P. 277–284.
 7. Gao P. Expression of protein kinase C gene in the brain and heart of spontaneously hypertensive rats / P. Gao, G. Zhao, X. Yuan et al. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* – 1995. – Vol. 1. – P. 204–206.
 8. Gonzalez-Alegre P. Technology insight : Therapeutic RNA interference – how far from the neurology clinic? / P. Gonzalez-Alegre, H. Paulson // *Nat. Clin. Pract.* – 2007. – Vol. 3, № 7. – P. 394–404.
 9. Grimm P. R. BK channels and a new form of hypertension / P. R. Grimm, S. C. Sansom // *Kidney Int.* – 2010. – Vol. 78. – P. 956–62.
 10. Jones A. W. Altered ion transport in vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats / A. W. Jones // *Circ. Res.* – 1973. – Vol. 33. – P. 563–572.
 11. The BK_{Ca} channels deficiency as a possible reason for radiation-induced vascular hypercontractility / S. Kyrychenko, V. Dosenko, S. Tishkin et al. // *Vascular pharmacology.* – 2012. – Vol. 56 – P. 142–149.
 12. Layzer J. M. In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs / J. M. Layzer // *RNA.* – 2004. – Vol. 10. – P. 766–771.
 13. News and Views. Progress in targeted delivery of therapeutic siRNAs // *Journal of RNAi and Gene Silencing.* – 2005. – Vol. 1. – № 2. – P. 52–53.
 14. Rusch N. J. BK channels in cardiovascular disease : a complex story of channel dysregulation / N. J. Rusch // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2009. – Vol. 297. – P. 1580–1582.
 15. Sabri A. Protein kinase C isoform-selective signals that lead to cardiac hypertrophy and the progression of heart failure / A. Sabri, S. Steinberg // *Mol. Cell. Biochem.* – 2003. – Vol. 251. – P. 97–101.
 16. Functional and molecular consequences of ionizing irradiation on large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat aortic smooth muscle cells / A. I. Soloviev, S. M. Tishkin, I. V. Ivanova et al. // *Life Science.* – 2009. – Vol. 84. – P. 164–171.
 17. Ionizing radiation alters myofilament calcium sensitivity in vascular smooth muscle: potential role of protein kinase C / A. Soloviev, S. Tishkin, S. Zelensky, et al. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2005. – Vol. 289. – P. 755–762.
 18. Ionizing non-fatal whole-body irradiation inhibits Ca²⁺-dependent K⁺ current in endothelial cells of rat coronary artery: Possible contribution to depression of endothelium-dependent vascular relaxation / S. M. Tishkin, V. V. Rekalov, I. V. Ivanova et al. // *International J. Rad. Biol.* – 2007. – Vol. 83. – P. 161–169.
 19. Sledz C. A. RNA interference in biology and disease / C. A. Sledz, B. R. Williams // *Blood.* – 2005. – Vol. 106. – P. 787–794.
 20. Sud N. Protein kinase C δ regulates endothelial nitric oxide synthase expression via Akt activation and nitric oxide generation / N. Sud, S. Wedgwood, S. M. Black // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physio.* – 2008. – Vol. 294. – P. 582–591.
 21. Wei A. International union of pharmacology. III. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels / A. Wei, G. Gutman, R. Aldrich // *Pharmacol. Rev.* – 2005. – Vol. 57. – P. 463–472.
 22. Wetering M. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector / M. Wetering, I. Oving, V. Muncan // *EMBO reports.* – 2003. – Vol. 4. – P. 609–615.
 23. Yamanouchi D. Protein kinase C delta mediates arterial injury responses through regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis / D. Yamanouchi, K. Kato, E. Ryer et al. // *Cardiovascular Research.* – 2010. – Vol. 85. – P. 434–443.
 24. Zhou X. Dual role of protein kinase C on BK channel regulation / X. Zhou, I. Wulfsen, E. Utku // *PNAS.* – 2010. – Vol. 107, № 17. – P. 8005–8010.

T. Novokhatska, S. Tishkin, V. Dosenko, I. Ivanova, E. Strielkov, V. Soloviev

PROTEIN KINASE C DELTA ISOFORM GENE SUPPRESSION BY RNA-INTERFERENCE PLASMID VECTOR REDUCES VASCULAR DISORDERS IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

The goal of this study was to clarify the δ PKC role in arterial hypertension development and to make an attempt to reduce vascular abnormalities related to ionic channelopathy and vascular hypercontractility in SHR using RNA-interference plasmid vector, which express shRNA. The experimental design comprised RT-PCR and patch clamp technique, thoracic aorta smooth muscle (SM) contractile recordings and arterial blood pressure measurements. The δ PKC target-specific shRNA (shPKC δ) were injected to conscious SHR intravenously. The expression profile of δ PKC mRNA transcripts in SM was significantly decreased in shPKC δ -treated rats. shPKC δ administration led to considerable but incomplete increment in amplitude of ACh-relaxation. The SM cells obtained from SHR after δ PKC gene silencing showed a significant but incomplete increase in paxilline-sensitive components of outward current. It was found that shPKC δ administration led to a significant decrease in arterial blood pressure on the first post-injection week, and slowly recovered to initial values for 3 weeks after. It may be likely that gene suppression by RNAi plasmid vector is a good approach to inactivate PKC gene encoding function and to normalize vascular tone damaged in arterial hypertension.

Keywords: protein kinase C delta isoform, RNA-interference, smooth muscles, BKCa channels, arterial hypertension.

Матеріал надійшов 10.09.2012