

УДК 577.25
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.95.20-23

Семен ЄЛЬЯШОВ, асп.
ORCID ID: 0000-0002-1633-4828
e-mail: s.yeliash@biph.kiev.ua
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

Вадим РИМАР, провідний біолог
ORCID ID: 0009-0000-8119-3489
e-mail: rymarvi@gmail.com
ТОВ "БІОКОРП", Київ, Україна

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ МЕХАНОЧУТЛИВИХ РЕЦЕПТОРІВ У ДЕТРУЗОРІ СЕЧОВОГО МІХУРА ЩУРА

Вступ. Автономна механочутливість м'язового шару (детрузора) сечового міхура є актуальною проблемою, що досі залишається малодослідженою. Відомо про ймовірну експресію низки механочутливих каналів, однак на сьогодні встановлено лише провідну роль механочутливого каналу TREK-1. Метою дослідження було перевірити експресію генів механорецепторів гладком'язової тканини (KCNK2 (TREK-1), TRPV4, Piezo1 та Piezo2) у детрузорі сечового міхура.

Методи. За допомогою програмного забезпечення BLAST були підібрані унікальні праймери для детекції зазначених генів каналів, а також референсного гена GAPDH. Валідацію проводили за допомогою однокрокової ПЛР зі зворотною транскрипцією на ампліфікаторі CFX96 з детекцією флуоресценції Fat-проби. Зразок матричної РНК виділяли з м'язового й уротеліального шарів сечового міхура та дорзальних корінцевих гангліїв (ДКГ) здорових щурів лінії Wistar за допомогою комерційного колонкового набору для екстракції нуклеїнових кислот (Біокорп, Україна).

Результати. Було показано експресію каналів Piezo1 та TREK-1 в уротеліальному й м'язовому шарах сечового міхура, тоді як TRPV4 в наших зразках був експресований лише в уротелії. Експресії гена Piezo2 не було виявлено.

Висновки. Підібрані послідовності праймерів до TREK-1, Piezo1, TRPV4 й гена "домашнього господарства" GAPDH ефективні для дослідження експресії зазначених генів у щурів. Синтезовані послідовності відповідають очікуваному розмірам фрагментів. У сечовому міхурі експресуються гени трьох механочутливих каналів: TREK-1, Piezo1 та TRPV4.

Ключові слова: механочутливість, сечовий міхур, гладком'язові клітини, експресія.

Вступ

Сечовий міхур, як і більшість порожнистих м'язових органів, регулюється як ефектор центральною нервовою системою (Araki *et al.*, 2008). Однак наразі відомо про його самостійну здатність до сприймання механічних подразнень без залучення аферентних нейронів (Young *et al.*, 2013). Було показано, що сечовому міхуру властивий механочутливий рефлекс, який має два типи відповіді залежно від критичного об'єму: на початковій фазі наповнення розслабляти гладком'язовий шар (детрузор) і наповнюватись, а також скорочувати м'язи після наповнення на понад 50 % для утримання максимального об'єму органа (Rocchibianca, & Bush, 2016). За механічну чутливість відповідають специфічні механочутливі іонні канали (Ranade, Syeda, & Patapoutian, 2015). У літературі зазначається фундаментальна роль TREK-1 – K⁺-провідного механочутливого каналу, активація якого викликає розслаблення м'яза (Qi *et al.*, 2014). Не зовсім визначеною залишається функціональна присутність найбільш вірогідних Ca²⁺-провідних каналів Piezo1 та TRPV4 (англ. *transient receptor potential cation channel subfamily V member 4*) у детрузорі, а також остаточно не встановлені механізми і основний учасник автономного механочутливого рефлексу сечового міхура (Li *et al.*, 2022). Наразі відомо, що уротелій експресує такі механочутливі іонні канали, як: представники субродини ванілоїдного транз'єнтного рецепторного потенціалу (TRPV) TRPV4 та TRPV2, субродини канонічних TRP-каналів – TRPC1 та TRPC4, канали родини Piezo – Piezo1, Piezo2 та епітеліальний натрієвий канал (ENaC) (Merrill *et al.*, 2016). Детальне дослідження клітинспецифічної експресії (крім TREK-1) механочутливих каналів саме у м'язовому шарі (детрузорі) щура не виконували, хоча попередні дослідження вказують на функціонування цих каналів у м'язових клітинах детрузора.

Отже, метою представленої роботи було підібрати праймери для пошуку мРНК генів найбільш перспективних імовірних механорецепторів – KCNK2 (TREK-1), TRPV4, Piezo1 та Piezo2 – і перевірити експресію відповідних генів у детрузорі сечового міхура.

Методи

Модельним об'єктом було обрано лабораторного щура (*Rattus norvegicus* var. *alba*) лінії Wistar. Ця лінія характеризується альбінізмом. В експеримент брали щурів віком 3 місяці, статевозрілих, масою від 200 до 250 г (n = 4). Тварини були виховані й утримувалися на стандартній дієті й водогінній воді, забезпечені *ad libitum* зі стандартним лікуванням. Необхідні умови утримання забезпечувались згідно зі стандартами віварію Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України.

За зразки брали тканини, які не мали анатомічних вад, без видимих новоформовань або пухлин і внутрішніх сечових каменів. Після вилучення органи поміщали в охолоджений (4 °C) стерильний фізіологічний розчин Рінгера для промивання від крові. У стерильних умовах сечовий міхур розрізали поздовжньо і стерильними хірургічними інструментами відділяли уротеліальний шар від м'язового.

Після очищення і розділення тканини одразу заморожували в рідкому азоті, а подальше виділення нуклеїнової кислоти проводили за допомогою набору для виділення нуклеїнової кислоти з колонками (ТОВ Біокорп, Україна) згідно з рекомендаціями виробника. Концентрацію та чистоту отриманої нуклеїнової кислоти перевіряли спектрофотометром DS-11 (DeNovix, США).

Для визначення експресії каналів було підібрано праймери та флуоресцентні проби для подальшого дослідження згідно з послідовностями відповідних генів *Rattus norvegicus* із бази даних NCBI Gene за допомогою програмного забезпечення BLAST. Як референсний брали ген гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (англ.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), який використовують для перевірки якості проходження реакції та виділеної нуклеїнової кислоти (Barber et al., 2005). Як і до механорецепторів KCNK2 (TREK-1),

TRPV4, Piezo1 та Piezo2, проби для GAPDH були обрані зі флюорофором під канал FAM (табл. 1) і разом із праймерними олігонуклеотидами синтезовані на замовлення фірмою "Metabion" (Німеччина).

Таблиця 1

Підібрані послідовності праймерів і проб для генів *Rattus norvegicus*

Ген	Праймер	Послідовність	Розмір продукту, нукл.
GAPDH	For	5'-CATCTTCCAGGAGCGAGATCC-3'	323
	Rev	5'-CATGGACTGTGGTCATGAGC-3'	
	Probe	5'-Cy5 – AGAAGGCTGGGGCTCACCTGAAG – BHQ3 -3'	
Piezo1	For	5'-CAGCTGAAAAGACAGATGAAGCG-3'	189
	Rev	5'-ACCAGAGTGGATGACTGTGG-3'	
	Probe	5'-FAM – TCAGGAGCCAGGGCCCTGACAG – BHQ1 -3'	
Piezo2	For	5'-GACGATGCAAGGACACACAG-3'	243
	Rev	5'-CCCTTCAAGCTTTCGAAGCC-3'	
	Probe	5'-FAM – ACCCGCTTACAACCTGCTCAACTTGGG – BHQ1 -3'	
TRPV4	For	5'-TCTTTACAGTATCAAAGACTTGTTCATG-3'	265
	Rev	5'-TCTTTGAAGAGGATCTTCTGAATCATG-3'	
	Probe	5'-FAM – TCCAGTTGCTCTACTTCATCTACTCAGTGCT – BHQ1 -3'	
KCNK2 (TREK-1)	For	5'-ATGAACATCATCCAGCAATAGTGAC-3'	313
	Rev	5'-GTCTGACATAACATTCACCTTAATAATGTGTC-3'	
	Probe	5'-FAM – TGTTATCACAACCATAGGATTTGGAAACATCTCCC – BHQ1 -3'	

Для проведення зворотної транскрипції і подальшої ампліфікації використовували "Суміш для однокрокової ПЛР" (ТОВ "Біокорп", Україна) з Taq-полімеразою і РНК-залежною ДНК-полімеразою згідно з рекоменда-

ціями виробника. Ампліфікацію здійснювали за допомогою термоциклера CFX 96 (Bio-Rad, США) відповідно до протоколу, наведеного в табл. 2.

Таблиця 2

Протокол однокрокової ампліфікації зі зворотною транскрипцією

Стадія 1 – зворотна транскрипція	50 °C	10 хв
Стадія 2 – гарячий старт полімерази	95 °C	10 хв
Стадія 3 – вирівнювання сигналу (5 циклів)	95 °C	10 с
	60 °C	20 с
	72 °C	30 с
Стадія 4 – ампліфікація цільової послідовності (40 циклів)	95 °C	10 с
	60 °C	20 с*
	72 °C	30 с

Примітка: * – детекція флуоресцентного сигналу відбувається на цьому етапі.

Електрофорез проводили за допомогою набору з електричного блока живлення, комплектних клем та електрофоретичної камери (Bio Rad, США). 1 %-й агарозний гель готували з агарози (Sigma, США) у TBE-буфері (Trizma 0,1 моль/л, борна кислота 0,1 моль/л, EDTA 0,002 моль/л) (Sigma, США) з додаванням 10 мкл на 100 мл розчину етидйї бромід (Sigma, США) для детекції ДНК, а також комерційного маркера для визначення розміру ампліконів із кроком у 100 пар нуклеотидів (Thermo, США).

Результати

У результаті проведеного дослідження було встановлено оптимальну концентрацію праймерів із пробами у пропорції 10-10-10 (For-Rev-Probe) для генів GAPDH, Piezo1 та TRPV4. Для праймерів під ген TREK-1 подібна пропорція виявляла нижчу специфічність, тому пропорція під праймери TREK-1 була 9-9-3 (For-Rev-Probe). В ампліфікаційну реакцію праймери додавали в кінцевій концентрації 10 нМ (крім TREK-1). Методом пос-

лідного розведення встановили оптимальну кількість матричної РНК у зразку: найбільш ефективна ампліфікація GAPDH спостерігалась для кількості мРНК у межах 10–20 нг, номер порогового циклу Cq був близьким до 20 (рис. 1 А). Дослідження показали наявність експресії генів Piezo1 (детрузор – Cq = 29, уротелій – Cq = 27, дорзальні корінцеві ганглії (ДКГ) – Cq = 28) і TREK-1 у всіх досліджених тканинах (детрузор – Cq = 39, уротелій – Cq = 37, ДКГ – Cq = 34), тоді як TRPV4 однозначно експресується лише в уротелії, що є основною чутливою тканиною в сечовому міхурі (Cq = 30) (Girard et al., 2016) (рис. 1 Б, В, Г), але не у ДКГ, хоча з літературних даних нейрони ДКГ мають експресувати TRPV4 (Cao, Yu, & Premkumar, 2009). Контрольні експерименти за відсутності нуклеїнової кислоти у пробірці, а також із внесеною нуклеїновою кислотою людини були негативними, що свідчить про високу специфічність і стабільність реакції з підібраними праймерами.

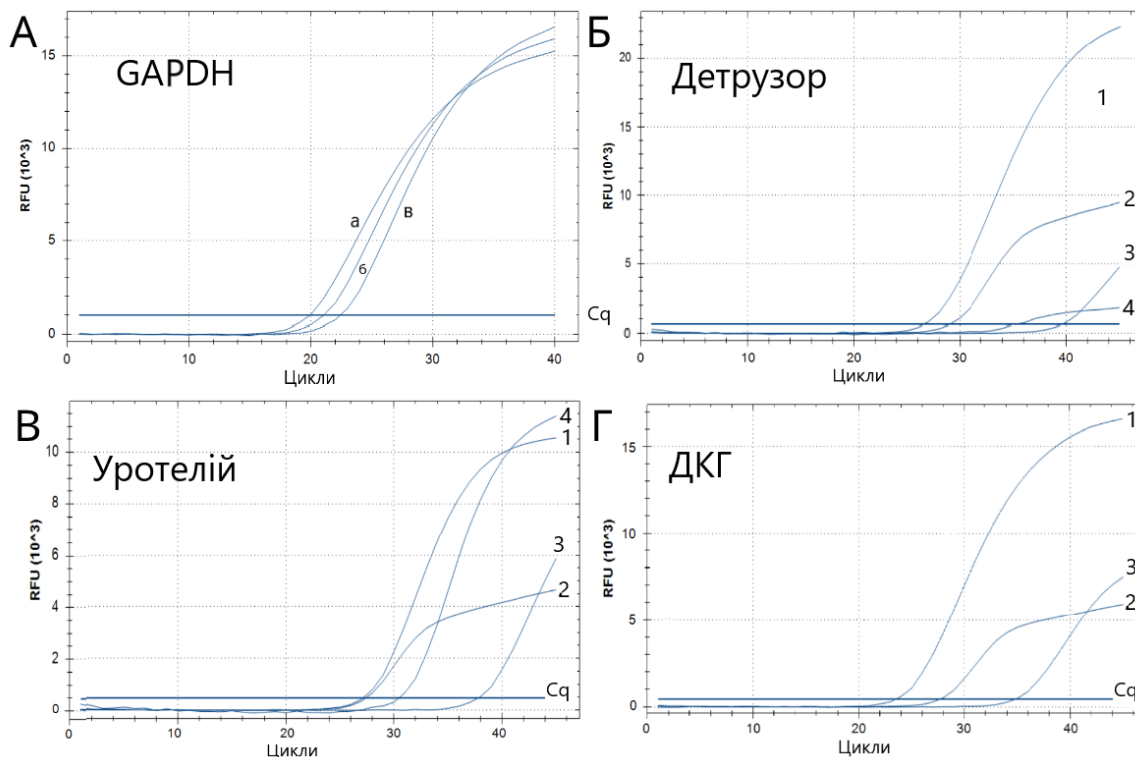


Рис. 1. Криві ампліфікації мРНК досліджених генів, виділеної із тканин щурів.

А – розведення зразка посмугованого м'яза для визначення чутливості праймерів до гена "домашнього господарства": а – 52 нг загальної РНК, б – 10 нг загальної РНК, в – 1 нг загальної РНК. Б – гладком'язова тканина сечового міхура: 1 – GAPDH, 2 – Piezo1, 3 – TREK-1, 4 – TRPV4. В – уротеліальний шар сечового міхура: 1 – GAPDH, 2 – Piezo1, 3 – TREK-1, 4 – TRPV4. Г – дорзальні корінцеві ганглії: 1 – GAPDH, 2 – Piezo1, 3 – TREK-1; Cq – порогова лінія

Для контролю специфічності реакції саме для ділянок досліджуваних генів провели агарозний гель-електрофорез (рис. 2). Виходячи з розмірів ампліконів, продукти ампліфікаційної реакції були специфічні до відповідних генів-мішеней: *GAPDH* – 323 п. н., *Piezo1* – 189 п. н., *TREK-1* – 313 п. н., *TRPV4* – 265 п. н. Крім цього, можна

побачити, що найбільшою мірою світиться ген "домашнього господарства" *GAPDH*, який і на графіках ампліфікації мав найвищий рівень свічення проби (RFU). Практично відсутні розсіяні хвости й амплікони інших розмірів, крім очікуваних, що може вказувати на високу специфічність реакції та відсутність димеризації.

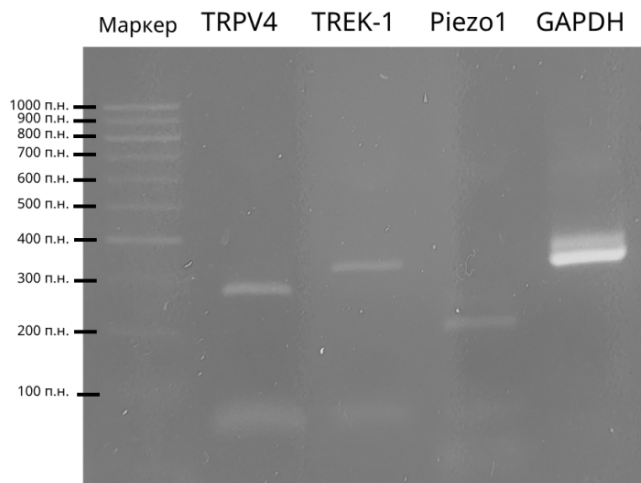


Рис. 2. Агарозний гель-електрофорез ампліконів.

Електрофорез в 1 %-й агарозі протягом 25 хв за напруги 180 В. Маркер молекулярної ваги із кроком 100 пар нуклеотидів. Розміри ампліконів: *GAPDH* – 323 п. н., *Piezo1* – 189 п. н., *TREK-1* – 313 п. н., *TRPV4* – 265 п. н.

Дискусія і висновки

• Було підібрано на основі відомих послідовностей генів (база даних NCBI) п'ять наборів праймерів і проб для детекції мРНК механочутливих іонних каналів щура

TREK-1, *Piezo1*, *Piezo2*, *TRPV4* й гена "домашнього господарства" *GAPDH*.

• Чотири з п'яти пар праймерів (*TREK-1*, *Piezo1*, *TRPV4* та *GAPDH*) дозволяють детектувати відповідні мРНК у клітинах детрузора сечового міхура.

• Синтезовані послідовності відповідають очікуваним розмірам фрагментів послідовностей досліджуваних генів.

• Попередні результати функціонування рецепторів TREK-1, Piezo1 та TRPV4 було підтверджено експресією їхніх генів саме у м'язових клітинах детрузора.

Внесок авторів: Семен Єльяшов – концептуалізація, вибір генів-кандидатів і контрольного гена, аналіз джерел, огляд літератури, практичне виконання та аналіз; Вадим Римар – підбір і супровід праймерів.

Подяки, джерела фінансування: Робота виконана за підтримки гранту 2020.02/0189 від Національного фонду досліджень України.

Список використаних джерел

- Araki, I., Du, S., Kobayashi, H., Sawada, N., Mochizuki, T., Zakoji, H., & Masayuki, T. (2008, May 4). Roles of mechanosensitive ion channels in bladder sensory transduction and over active bladder. *International Journal of Urology*, 15(8), 681–7.
- Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., & Clark, B. J. (2005). GAPDH as a house keeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics*, 21(3), 389–95. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15769908>
- Cao, D. S., Yu, S. Q., & Premkumar, L. S. (2009, Jan. 1). Modulation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4-Mediated Membrane Currents and Synaptic Transmission by Protein Kinase C. *Molecular Pain*, 5, 5.
- Girard, B. M., Merrill, L., Malley, S., & Vizzard, M. A. (2013, May 21). Increased TRPV4 Expression in Urinary Bladder and Lumbosacral Dorsal Root Ganglia in Mice with Chronic Over expression of NGF in Urothelium. *Journal of Molecular Neuroscience*, 51(2), 602–14.
- Li, X., Hu, J., Zhao, X. D., Li, J., & Chen, Y. (2022, Jun 14). Piezo channels in the urinary system. *Experimental and Molecular Medicine*, 54(6), 697–710.
- Merrill, L., Gonzalez, E. J., Girard, B. M., & Vizzard, M. A. (2016, Mar 1). Receptors, channels, and signaling in the urothelial sensory system in the bladder. *Nature Reviews Urology*, 13(4), 193–204.
- Qi, L., Pan, X., Chang, S. S., Malkowicz, B., Guzzo, T. J., & Malykhina, A. P. (2014, May 21). Response of the human detrusor stretches regulated by TREK-1, a two-pore-domain (K_{2P}) mechano-gated potassium channel. *The Journal of Physiology*, 592(14), 3013–30.
- Ranade, S. S., Syeda, R., & Patapoutian, A. (2015, Sep 23). Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron*, 87(6), 1162–79. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4582600/>

Semen YELIASHOV, PhD Student

ORCID ID: 0000-0002-1633-4828

e-mail: s.yeliashov@biph.kiev.ua

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

Vadim RYMAR, Biology Specialist

ORCID ID: 0009-0000-8119-3489

e-mail: rymarvi@gmail.com

LTD BIOCOP, Kyiv, Ukraine

Roccabianca, S., & Bush, T. R. (2016, Mar). Under standing the mechanics of the bladder through experiments and theoretical models: Where westarted and where weare heading. *TECHNOLOGY*, 04(01), 30–41.

Young, J. S., Johnston, L., Soubbrane, C., McCloskey, K. D., McMurray, G., Eccles, R., & Fry, C. H. (2013, Feb). The passive and active contractile properties of the neurogenic, under active bladder. *BJU Int.*, 111(2), 355–61. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11300.x>

References

- Araki, I., Du, S., Kobayashi, H., Sawada, N., Mochizuki, T., Zakoji, H., & Masayuki, T. (2008, May 4). Roles of mechanosensitive ion channels in bladder sensory transduction and over active bladder. *International Journal of Urology*, 15(8), 681–7.
- Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., & Clark, B. J. (2005). GAPDH as a house keeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics*, 21(3), 389–95. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15769908>
- Cao, D. S., Yu, S. Q., & Premkumar, L. S. (2009, Jan 1). Modulation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4-Mediated Membrane Currents and Synaptic Transmission by Protein Kinase C. *Molecular Pain*, 5, 5.
- Girard, B. M., Merrill, L., Malley, S., & Vizzard, M. A. (2013, May 21). Increased TRPV4 Expression in Urinary Bladder and Lumbosacral Dorsal Root Ganglia in Mice with Chronic Over expression of NGF in Urothelium. *Journal of Molecular Neuroscience*, 51(2), 602–14.
- Li, X., Hu, J., Zhao, X. D., Li, J., & Chen, Y. (2022, Jun 14). Piezo channels in the urinary system. *Experimental and Molecular Medicine*, 54(6), 697–710.
- Merrill, L., Gonzalez, E. J., Girard, B. M., & Vizzard, M. A. (2016, Mar 1). Receptors, channels, and signaling in the urothelial sensory system in the bladder. *Nature Reviews Urology*, 13(4), 193–204.
- Qi, L., Pan, X., Chang, S. S., Malkowicz, B., Guzzo, T. J., & Malykhina, A. P. (2014, May 21). Response of the human detrusor stretches regulated by TREK-1, a two-pore-domain (K_{2P}) mechano-gated potassium channel. *The Journal of Physiology*, 592(14), 3013–30.
- Ranade, S. S., Syeda, R., & Patapoutian, A. (2015, Sep 23). Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron*, 87(6), 1162–79. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4582600/>
- Roccabianca, S., & Bush, T. R. (2016, Mar). Under standing the mechanics of the bladder through experiments and theoretical models: Where westarted and where weare heading. *TECHNOLOGY*, 04(01), 30–41.
- Young, J. S., Johnston, L., Soubbrane, C., McCloskey, K. D., McMurray, G., Eccles, R., & Fry, C. H. (2013, Feb). The passive and active contractile properties of the neurogenic, under active bladder. *BJU Int.*, 111(2), 355–61. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11300.x>

Отримано редакцією журналу / Received: 11.10.23

Прорецензовано / Revised: 13.11.23

Схвалено до друку / Accepted: 13.11.23

EXPRESSION OF MECHANO-SENSITIVE RECEPTOR GENES IN THE DETRUSOR OF THE RAT BLADDER

Background. Autonomic mechanosensitivity of the muscle layer (detrusor) of the urinary bladder is an actual problem that still remains understudied. It is known that a number of mechanosensitive channels are probably expressed, but to date, only the leading role of the mechanosensitive channel TREK-1 has been established. The aim of the study was to check the expression of mechanoreceptor genes of smooth muscle tissue (KCNK2 (TREK-1), TRPV4, Piezo1, and Piezo2) in the bladder detrusor.

Methods. Unique primers were selected for the detection of the specified channel genes, as well as the reference gene GAPDH, using the BLAST software. Validation was performed using one-step PCR with reverse transcription on the CFX96 amplifier with fluorescence detection of the Fam sample. A matrix RNA sample was isolated from the muscle and urothelial layers of the urinary bladder and dorsal root ganglia (DRG) of healthy Wistar rats using a commercial nucleic acid extraction column kit (Biocorp, Ukraine).

Results. In our samples, Piezo1 and TREK-1 channels were shown to be expressed in the urothelial and muscle layers of the bladder, whereas TRPV4 was only expressed in the urothelium. Piezo2 gene expression was not detected.

Conclusions. The selected sequences of primers for TREK-1, Piezo1, TRPV4, and the "housekeeping" gene GAPDH are effective for studying the expression of these genes in rats. The synthesized sequences correspond to the expected fragment sizes. The genes of three mechanosensitive channels are expressed in the urinary bladder: TREK-1, Piezo1, and TRPV4.

Key words: mechanosensation; urinary bladder; smooth muscle cells, expression.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.