

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту фізіології
ім. О.О. Богомольця
НАН України, академік НАН України
(посада)



Кришталь О.А.

(підпис)

М.П.

АНОТОВАНИЙ ЗВІТ

про виконану роботу у 2020 році в рамках реалізації проєкту
із виконання наукових досліджень і розробок

Міогенні механізми механочутливості сечового міхура в нормії при діабеті 2-го типу
(назва Проєкту)

Назва конкурсу: Підтримка досліджень провідних та молодих учених

Реєстраційний номер Проєкту: 2020.02/0189

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проєкту) 2020.02/0189 Міогенні механізми механочутливості сечового міхура в нормії і при діабеті 2-го типу

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу Підтримка досліджень провідних та молодих учених (назва конкурсу) протокол від 16-17 вересня 2020 року № 21

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Тривалість виконання Проєкту

Початок – дата укладання Договору про виконання наукових досліджень і розробок;

Закінчення – 2022 рік.

Загальна вартість Проєкту, грн. 6 711 305

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік 695 719

2-й рік 3 575 953

3-й рік 2 439 633

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту буде залучено 7 виконавців, з них:

доктори наук 1 ;

кандидати наук 3 ;

інші працівники 3

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(Ї) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, субвиконавці не залучалися.

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків)

Метою даного проєкту є встановлення механізмів, які зумовлюють механочутливість гладкого м'язу детрузора (ГМД) сечового міхура, та з'ясування тих змін, яких вони зазнають при діабеті 2-го типу.

4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)

- 1) Поставити модель діабету 2-го типу у щурів.
- 2) Визначити експресію мРНК та білка механочутливих іонних каналів у тканинах нормальних і діабетичних тварин.
- 3) Встановити залежності об'єм-тиск та розтягнення-сила препаратів ГМД.
- 4) Зареєструвати механоактивовані мембранні струми клітин ГМД.
- 5) Зареєструвати механоактивовані внутрішньоклітинні кальцієві сигнали клітин ГМД.
- 6) Встановити дію агоністів та антагоністів механочутливих каналів на механічні характеристики сечового міхура.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

Нетримання сечі – це медична проблема, пов'язана із неможливістю сечового міхура нормально виконувати функції накопичення, зберігання та вивільнення сечі, яка приводить до значного погіршення якості життя. У останні роки було відкрито низку молекулярних детермінантів, що визначають механічну чутливість різних типів тканин і клітин, серед яких іонні канали із родини PIEZO, транзйентного рецепторного потенціалу (TRP) та двопородоменних калієвих (K_{2P}) – PIEZO1/2, TRPV4 та TREK-1 відповідно. Однак дані щодо механізмів механочутливості клітин сечового міхура, які зазнають значних механічних впливів при функціонуванні сечового міхура, або недостатні, або суперечливі.

- Новизна Проєкту (до 400 знаків)

Проєкт є інноваційним оскільки комплексних досліджень механізмів механочутливості сечового міхура не тільки при моделюванні найпоширенішої форми цукрового діабету 2-го типу, а і у нормі не проводилося. Водночас, з'ясування цих механізмів дозволить зрозуміти наскільки вплив на них може бути корисним для нормалізації діяльності сечового міхура при дисфункції сечового міхура різної етіології, зокрема, пов'язаної з діабетом 2-го типу.

- Методологія дослідження (до 400 знаків)

Дослідження планується провести на препаратах сечового міхура нормальних щурів лінії Wistar та щурів із модельним діабетом 2-го типу, викликаним введенням комбінації нікотинаміду та стрептозотоцину. Експресія механочутливих каналів у тканинах сечового міхура нормальних та діабетичних тварин на рівні мРНК і білка буде визначена методами ПЛР та імунохімії. Функціональні дослідження будуть проведені методами тензометрії, електрофізіології та флуоресцентної кальційметрії.

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

Створення моделі діабету 2-го типу у щурів

Діабет у щурів викликали одним внутрішньочеревним введенням 230 мг/кг нікотинамід у (NA), після чого через 15 хв додатково вводили стрептозотозин (СТЗ) у дозі 65 мг/кг. NA розчиняли у фізіологічному розчині, а СТЗ (виробник “Сіґма-Алдріх”) – у оцтовому буфері при рН 4,5 у концентрації 100 мМ. Контрольним тваринам вводили аналогічний об’єм чистого буфера. Через 3 дні після введення СТЗ тварин перевіряли на вміст глюкози в крові і тих, рівень глюкози в яких був вищий істотно порівняно із контрольними тваринами відносили до діабетичної групи. Діабетичних тварин використовували в експериментах після 8 і 10 тижнів з дня введення СТЗ.

Валідація моделі діабету 2-го типу у щурів

У щурів з експериментальною моделлю діабету 2-го типу, індуковану NA і СТЗ, було показано, що на 8-й та 10-й тиждень після індукції рівень цукру в плазмі крові натще збільшувався до $9,71 \pm 0,16$ мМ/л і $9,84 \pm 0,14$ мМ/л ($P < 0,5$), відповідно, порівняно із контрольними тваринами – $5,13 \pm 0,17$ мМ/л. Глікемічна відповідь під час тесту на толерантність до глюкози була значно більшою у діабетичних тварин, без статистично достовірних відмінностей між 8-ми і 10-ти тижневими групами. Підтвердженням порушення толерантності до глюкози у тварин із діабетом було зростання площі під кривою тесту на толерантність (area under the curve, $AUC_{0-\infty}$) до $AUC_{0-\infty} = 1200,0 \pm 250,0$ мМ/хв., порівняно із контрольними тваринами – $AUC_{0-\infty} = 450,0 \pm 42,0$ мМ/хв. ($P < 0,001$). У діабетичних тварин також збільшувалася вага сечового міхура до $0,051 \pm 0,002$ г на 100 г маси тварини, у порівнянні з контрольними тваринами – $0,057 \pm 0,003$ г на 100 г маси тварини ($P < 0,05$).

Зміна цистометричних показників в моделі діабету 2-го типу у щурів

Цистометричні вимірювання виявили наступні відмінності (у випадку діабету кількісні дані приводяться для тварин на 8-й і 10-й тиждень після індукції). 1). Статистично достовірне зниження базального тиску в інтактних сечових міхурах діабетичних тварин до $4,50 \pm 0,40$ мм.рт.ст. і $4,20 \pm 0,26$ мм.рт.ст. ($P < 0,5$) відносно контролю – $5,90 \pm 0,45$ мм.рт.ст. ($P < 0,05$). 2). Зменшення максимального тиску у ізольованих міхурах діабетичних тварин до $23,4 \pm 3,28$ мм.рт.ст. і $21,3 \pm 2,89$ мм.рт.ст. ($P < 0,5$), порівняно з контролем – $28,55 \pm 3,75$ мм.рт.ст. 3). Збільшення об’єму сечового міхура у діабетичних тварин до $619,5 \pm 43,5$ мкл і $689,3 \pm 51,0$ мкл ($P < 0,5$) відносно контрольних тварин – $369,9 \pm 34,6$ мкл ($P < 0,05$). Показником функціонального стану сечового міхура є його еластичність, яка визначається як відношення об’єму наповнення до внутрішньоміхурового тиску (V_{\max}/P_{\max}). У діабетичних тварин цей показник відповідав значенням $0,051 \pm 0,006$ мл/мм.рт.ст. і $0,048 \pm 0,008$ мл/мм.рт.ст. ($P < 0,5$) тоді як для контролю він складав $0,21 \pm 0,06$ мл/мм.рт.ст. ($P < 0,001$).

Таким чином, проведені дослідження на тваринах з експериментальним діабетом 2-го типу показали: 1) наявність відмінностей практично у всіх проаналізованих показниках між діабетичними тваринами на 8-й і 10-й тижні після індукції, які дають підстави припустити, що патологічні зміни у сечовому міхурі на 8-й тиждень (2 місяці) ще не виходять на плато, а продовжують прогресувати; 2) відсутність статистично достовірних відмінностей у показниках на 8-й і 10-й тижні діабету свідчить про те, що це прогресування відбувається повільно; 3) для подальших функціональних досліджень доцільно було б збільшити термін діабету до 12-ти тижнів (3 місяці, на жаль, тривалість і умови виконання Проєкту у 2020 р. не дозволяли це зробити) для кращого виявлення викликаних діабетом змін; 4) зменшення відношення V_{\max}/P_{\max} у тварин з діабетом по відношенню до контролю вказує на зниження механочутливості стінки сечового міхура внаслідок дисфункції механізмів, які за неї відповідають.

Експресія мРНК механоактивованих іонних каналів PIEZO1, PIEZO2, TRPV4 та TREK-1 (KCNK2) в нормі та в моделі діабету 2-го типу у щурів

Дані якісного та кількісного ПЛР показали, що як уротелій, так і ГМД експресують мРНК усіх чотирьох механоактивованих іонних каналів. При цьому експресія каналів вхідного струму – PIEZO1, PIEZO2 та TRPV4 при діабеті має тенденцію до падіння у детрузорі з одночасним зростанням в уротелії, тоді як експресія калійпровідного каналу TREK-1 (KCNK2) демонструє протилежну тенденцію – до зростання у ГМД і до падіння в уротелії. Дані по експресії вказують не те, що при діабеті спостерігається посилення гальмівних впливів на ГМД і превалювання релаксації над скороченням.

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами

Відомості про те, як змінюються механічні характеристики сечового міхура та експресія в його тканинах мРНК PIEZO1/2, TRPV4 та TREK-1 каналів при діабеті 2-го типу на даний час у світовій літературі відсутні.

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проєкту для економіки та суспільства (стосується проєктів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)

Даний Проєкт є фундаментальним, а тому отримання результатів, які мають практичну цінність для економіки не передбачає.

5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проєкту в суспільній практиці.

Результати виконання Проєкту у 2020 р. послужать основою для його продовження у наступні роки.

Примітка: Анотований звіт не повинен містити відомостей, заборонених до відкритого опублікування

Науковий керівник Проєкту

Завідувач відділом нервово-м'язової фізіології

Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,

чл.-кор. НАН України, д.б.н., проф.

(посада)

Шуба Я.М.

ПІБ

(підпис)