

J. Krhut¹, D. Hammerer², S. Hering²,
H. Madersbacher³

¹Urologické oddělení FNsP Ostrava-Poruba

²Institut der Biochemischen Farmakologie,
Universität Innsbruck, Rakousko

³Neuro-Urologische Einheit, Uni-Kliniken
Innsbruck, Rakousko

EXPRESE KALIOVÝCH KANÁLŮ V HUMÁNNÍM DETRUZORU

KLÍČOVÁ SLOVA

Kaliové kanály
Detruzor
Imunohistochemie
Polyklonální protilátky

KEY WORDS

Potassium channels
Detrusor muscle
Immunohistochemistry
Polyclonal antibodies

SOUHRN

Kaliové kanály jsou proteiny, které zajišťují transport kaliových iontů přes plazmatickou membránu buněk. Jejich významná funkce byla prokázána zejména u buněk svalových a nervových, kde se podílejí významnou měrou na regulaci excitability buňky. Cílem práce je imunohistochemický průkaz kaliových kanálů ve tkáni humánního detruzoru. Celkem byly zpracovány biopsie detruzoru 16 pacientů, které byly vyšetřeny pomocí polyklonálních protilátek proti subtypům kaliových kanálů typu KCa (*calcium-gated potassium channels*) a KV (*voltage-gated potassium channels*). Imunohistochemicky jsme prokázali rozsáhlou expresi kanálů SK-3 a BK, nebyl zjištěn rozdíl v distribuci jednotlivých tříd kaliových kanálů v závislosti na lokalizaci biopsie.

Průkaz přítomnosti kaliových kanálů ve svalovině humánního detruzoru otevírá nové potenciální možnosti terapeutického ovlivnění kontraktility detruzoru.

SUMMARY

THE EXPRESSION OF POTASSIUM CHANNELS IN HUMAN DETRUSOR MUSCLE

Potassium channels are proteins, the function of which is to transport potassium ions across the plasma membrane of cells. Their important function was proven especially in muscular and neural cells, where they participate in an important way in the regulation of cellular excitability. The aim of the work is the immunohistochemical detection of potassium channels in the tissue of human detrusor muscle. Detrusor biopsies of 16 patients altogether were investigated by polyclonal antibodies against potassium channels subtypes KCa (calcium-gated potassium channels) and KV (voltage-gated potassium channels). Immunohistochemically we proved an excessive expression of SK-3 and BK channels, no difference in the distribution of different classes of receptors depending on the localization of biopsy was detected.

The detection of the presence of potassium channels in the human detrusor muscle tissue opens new opportunities in therapeutic management of detrusor contractility.

ÚVOD

Plazmatická membrána všech buněk obsahuje transmembránové proteiny, jež jsou zodpovědné za transport iontů i větších molekul z extracelulárního do intracelulárního prostoru a naopak. Tyto proteiny - kanály - jsou selektivní pro různé ionty (sodík, draslík, vápník), jejich distribuce a funkční charakteristiky se v jednotlivých tkáních výrazně liší.

Kaliové kanály představují velmi různorodou skupinu proteinů, kterou můžeme dělit na několik skupin podle jejich molekulární struktury, fyziologického způsobu otevírání (*ligand-gated, voltage-gated*) a farmakologických vlastností (odlišná citlivost k různým modulatorům funkce) [1, 2].

Mezi nejdůležitější skupiny kaliových kanálů patří:

K_v kanály (*voltage-gated potassium channels*) - jsou regulovány v závislosti na hodnotách transmembránového potenciálu v průběhu depolarizace a repolarizace buněčné membrány. Je popsáno 16 subtypů, strukturálně velmi podobných, které se však vzájemně liší hodnotami potenciálu, který je otevírá, resp. uzavírá.

K_{Ca} kanály (*calcium-gated potassium channels*) - jsou regulovány v závislosti na intracelulární koncentraci kalcia. Dále se dělí podle své transportní kapacity na tři podtřídy (*large conductance K_{Ca}-BK, intermediate conductance K_{Ca}-IK a small conductance K_{Ca}-SK*).

KCNQ kanály - jsou funkčně blízké K_v kanálům, liší se od nich především strukturou molekuly. Popsány byly zejména v srdečním svalu a mozku.

Eag-like kanály - strukturálně podobné K_v kanálům, liší se funkčními charakteristikami. Takřka výlučně byly popsány v srdečním svalu [3].

K_{IR} kanály (*inward rectifiers*) - na rozdíl od ostatních typů kanálů závislých na transmembránovém potenciálu (které jsou otevírány v různých fázích depolarizace) jsou tyto kanály aktivovány ve fázi hyperpolarizace. Předpokládá se úloha K_{IR} ve zprostředkování efektu hormonů a neurotransmiterů na excitabilitu buňky. Popsány byly v srdečním svalu, mozku a pankreatu.

K_{2P} kanály (*background channels*) - umožňují permanentní tok kaliových iontů bez závislosti na momentálním funkčním stavu buňky. Popsáno bylo 8 typových skupin těchto kanálů ve všech tkáních s výjimkou svalu [4].

8TM/2P kanály - byly popsány teprve před nedávnem, bližší poznatky o jejich funkci a distribuci dosud chybí.

Byla popsána důležitá funkce kaliových kanálů u non-excitabilních buněk (T- a B-lymfocyty, renální epitel, erytrocyty), zdá se však, že daleko nejdůležitější úlohu mají kaliové kanály v regulaci transmembránového potenciálu u excitabilních buněk (svalové a nervové buňky).

Zásadní roli hrají iontové kanály v procesu svalové kontrakce. Depolarizace membrány svalové buňky je provázána mohutným influxem natriových iontů a uvolněním kalciových iontů z intracelulárního (příčně pruhovaný sval) nebo extracelulárního depa (hladký sval). Volné intracelulární kalcium pak startuje reakci komplexu aktin-myozin, která vede ke kontrakci svalové buňky. Současně však pozitivní polarita buněčné membrány ve fázi depolarizace a zvýšená koncentrace volného kalcia v cytoplazmě iniciuje otevření kaliových kanálů s rychlým efluxem kaliových iontů, což má za následek hyperpolarizaci membrány, návrat transmembránového potenciálu ke klidovým hodnotám, a tím i relaxaci svalové buňky. Kaliové kanály tedy tvoří funkční zpětnou vazbu v procesu depolarizace buněčné membrány. Byla proto vyslovena

hypotéza, že modulací funkce kaliových kanálů by bylo možno regulovat sílu a délku trvání svalové kontrakce a délku refrakterní fáze svalové buňky. To bylo také potvrzeno v řadě studií, zabývajících se možností regulovat prostřednictvím kaliových kanálů tonus hladké svaloviny velkých cév a některých orgánů [5, 6].

Problematickou výzkumu kaliových kanálů v detruzoru se dosud zabývalo jen několik autorů, a to převážně ve zvířecím modelu [7, 8, 9, 10].

Ve své práci jsme se zaměřili na dvě velké skupiny kaliových kanálů K_{Ca} a K_v, neboť vzhledem k tomu, co je známo o jejich expresi a funkci v ostatních tkáních a orgánech, lze předpokládat jejich expresi i v humánním detruzoru.

Cílem práce je stanovit, zda jsou v detruzoru kaliové kanály exprimovány, resp. jak jsou zastoupeny jednotlivé subtypy.

MATERIÁL A METODY

Do studie bylo zahrnuto celkem 16 pacientů (10 mužů a 6 žen), kteří podstoupili otevřenou operaci močového měchýře. Průměrný věk souboru byl 63,4 let (27 – 81). Ve všech případech byli pacienti bez větších subjektivních mikčních obtíží, sonograficky bez postmikčního rezidua, preoperačně byla vyloučena infekce močových cest. V 8 případech byla provedena radikální prostatektomie pro lokalizovaný karcinom prostaty, ve 4 případech radikální cystektomie pro lokálně pokročilý karcinom močového měchýře, ve 3 případech neoimplantace ureteru po iatrogenním poranění v rámci gynekologické operace a v 1 případě Boariho plastika pro primární neobstrukční megaureter. U 10 pacientů byla provedena biopsie z přední stěny nebo hrdla močového měchýře. U 6 pacientů byly odebrány současně 3 biopsie (hrdlo močového měchýře, přední stěna, boční stěna), aby bylo možno provést i srovnání vzorků z jednotlivých lokalizací. Celkem tedy bylo odebráno a vyhodnoceno 28 biopsií. Velikost biopsií byla 5 x 5 mm v širce stěny močového měchýře. U onkologických pacientů byly biopsie odebírány vždy minimálně 2 cm od makroskopicky zjevného nádoru.

Při mikroskopickém vyšetření v rámci dalšího zpracování biopsií vzorků nebyly ani v jednom z případů zachyceny ve tkáni detruzoru nádorové struktury.

Biopsie byly bezprostředně po odběru promyty ve sterilním fyziologickém roztoku, pod mikroskopickou kontrolou byla odstraněna mukóza, submukóza a perivezikální tuková tkáň a zbylá svalovina detruzoru pak byla konzervována po dobu 10 min v 5% DMSO (dimethylsulfoxyd). Následně byla tkáň prudce zmrazena na -70 °C. Biopsie pak byly zpracovány na přístroji Kryostat do řezů o tloušťce 12 µm a přeneseny na podložní skla potažená filmem 0,1% roztoku poly-L-lysinu.

Při přípravě preparátů pro imunofluorescenční vyšetření byla nejprve provedena permeabilizace v roztoku PBS - Triton 0,1% na 30 min (složení PBS (100mM): 13,79 g NaH₂PO₄ x H₂O, 18 g NaCl v 1000 ml destilované vody, adjustace pH 7,4 pomocí 10N NaOH). Po promytí v roztoku PBS (10 min) byla provedena blokáda endogenní peroxidázy roztokem 0,99% H₂O₂ v PBS-methanol (20%) (20 min). Po dalším opakovaném promytí v roztoku PBS (3x 3 min) následovala blokáda nespecifických vazebních míst 10% roztokem NGS (*normal goat serum*) v PBS - 0,2% BSA (*bovine serum albumin*) - 0,1% Triton (60 min) a konečně inkubace s primární protilátkou (v roztoku PBS - 0,2% BSA - 0,1% Triton) na 18 hodin při teplotě 4 °C. Poté byly opět preparáty promyty v PBS (3 x 3 min) a inkubovány se sekundární protilátkou (v roztoku PBS - 0,2% BSA - 0,1% Triton) na 90 min při pokojové teplotě. Po promytí v PBS (3 x 10 min) byly preparáty fixovány pD-glycerolem.

Byly použity následující polyklonální protilátky: anti-SK2 (538 – 555), anti-SK3 (504 – 522), anti-BK α 11 (913 – 926), anti-K_V 1.1 (458 – 475), anti-K_V 1.2 (462 – 481), anti-K_V 1.3 (456 – 474), anti-K_V 1.3 (458 – 476), anti-K_V 1.4 (605 – 624), anti-K_V 1.4 (270 – 284), anti-K_V 1.5 (578 – 596). Všechny primární protilátky byly pro možnost srovnání použity vždy v koncentracích 1 : 250, 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2000 a 1 : 4000 v PBS.

Jako sekundární protilátky byly použity g-a-r imunoglobuliny (*goat-anti-rabbit*), značené fluorochromy Cy2, Cy3 a Texas Red. Sekundární protilátky byly použity vždy v koncentraci 1 : 2000 v PBS.

Specifická výsledků byla ověřována dvěma metodami:

a) v každé sérii pokusů byly kontrolní preparáty inkubovány se sekundární protilátkou bez předchozí inkubace s protilátkou primární k vyloučení nespecifické vazby sekundární protilátky na strukturálně podobné buněčné proteiny;

b) v každé sérii pokusů byla u kontrolních preparátů primární protilátka nahrazena intaktním sérem stejného pokusného zvířete (tzv. preimunní sérum) k vyloučení nespecifické vazby sekundární protilátky na strukturálně podobné sérové proteiny.

Preparáty byly pozorovány imunofluorescenčním mikroskopem Zeiss Optik při zvětšení 10x – 63x, obrazová dokumentace byla provedena CCD kamerou za použití software Axiovision 3.0.6.

VÝSLEDKY

V našem materiálu jsme imunohistochemicky prokázali rozsáhlou expresi kaliových kanálů K_{Ca} typu SK3 (16 pacientů/16 specificky pozitivních reakcí). Rozdíl mezi specificky pozitivní



Obr. 1. Expresie kaliových kanálů K_{Ca} typu SK3 (blíže v textu).



Obr. 2. Expresie kaliových kanálů K_{Ca} typu SK2 (blíže v textu).



Obr. 3. Expresie kaliových kanálů K_V 1.2 (blíže v textu).

reakcí a kontrolami byl evidentní (obr. 1). V případě K_{Ca} kanálů typu BK jsme rovněž prokázali vysokou míru exprese (16/15), v jednom případě byla přítomna nespecifická reakce s preabsorpčním sérem v kontrolním pokusu. Naopak ani v jednom pokusu prokázat expresi K_{Ca} kanálů typu SK2 jsme nepozorovali specifickou reakci (12/0). Ani v paralelních kontrolních pokusech jsme nezachytili žádný signál, což vede k závěru, že tento typ kanálu není v tkáni detruzoru exprimován (obr. 2). V případě K_V kanálů jsou výsledky nejednoznačné. U K_V 1.1 jsme zaznamenali 2 specifické reakce (9/2), u K_V 1.3 1 specifickou reakci (9/1). U ostatních pokusů byly reakce nespecifické (žádný nebo minimální rozdíl mezi intenzitou signálu v preparátu inkubovaném s primární protilátkou a preparátu inkubovaném s preabsorpčním sérem). Při pokusech s K_V 1.2, K_V 1.4 a K_V 1.5 jsme nezaznamenali ani jednu specifickou reakci (7/0), ve všech případech byly reakce nespecifické (žádný nebo minimální rozdíl mezi intenzitou signálu v preparátu inkubovaných s primární protilátkou a preparátu inkubovaných s preabsorpčním sérem) (obr. 3).

V 6 případech jsme srovnali výsledky z biopsií z různých míst močového měchýře (přední stěna, boční stěna, hrdlo) u téhož pacienta. Nebyly zjištěny žádné rozdíly v intenzitě a distribuci signálu.

DISKUSE

Naše výsledky dokazují rozsáhlou expresi K_{Ca} kanálů typu SK-3 a BK v tkáni normálního humánního detruzoru. To koresponduje s literárními údaji o výskytu K_{Ca} kanálů v hladké svalovině dalších orgánů i s výsledky dosavadních experimentů na zvířecích modelech. Stejně tak absence exprese K_{Ca} kanálů typu SK-2 zapadá do kontextu současných poznatků, neboť tento typ kanálů byl doposud popsán pouze v nadledvinách a imunitním systému a v naší práci plnil spíše úlohu další kontroly. Výsledky pokusů prokázat expresi jednotlivých subtypů K_V kanálů jsou naproti tomu nejednoznačné. Ve většině případů byly reakce nespecifické, což lze vysvětlit tím, že jednotlivé typy K_V kanálů mají morfologicky v podstatě stejnou strukturu a liší se jen svými funkčními charakteristikami. Polyklonální protilátky jsou namířeny jen proti určité části hlavního peptidového řetězce antigenu (K_V kanálu), který je stejný u více subtypů K_V kanálů, a proto vzniká celá řada křížových reakcí. I když elektrofyziologické pokusy (*patch-clamp*) nepřímo ukazují na přítomnost K_V kanálů v buňkách hladkého svalu močového měchýře [11], provést jejich přesnou imunohistochemickou typizaci pomocí polyklonálních protilátek je podle našich zkušeností jen velmi obtížné.

Průkaz přítomnosti kaliových kanálů ve svalovině humánního detruzoru otevírá nové potenciální možnosti ovlivnění kontraktility detruzoru. Lze předpokládat, že otevření kaliových kanálů vede k hyperpolarizaci buněčné membrány, a to ve svém důsledku k relaxaci svalové buňky detruzoru. Analogicky uzavření kaliového kanálu vede ke zvýšení kontraktility detruzoru. To činí z kaliových kanálů možné cílové struktury při hledání nových cest farmakologického ovlivnění kontraktility detruzoru v léčbě hyperaktivního měchýře a akontraktilního detruzoru.

ZÁVĚR

Naše práce prokazuje imunohistochemicky širokou expresi K_{Ca} kaliových kanálů třídy SK-3 a BK v detruzoru normálního humánního močového měchýře. Expresi K_v kaliových kanálů lze předpokládat na podkladě výsledků publikovaných elektrofyziologických experimentů. Farmakologické ovlivnění funkce kaliových kanálů by v budoucnu mohlo znamenat další možnost terapeutického ovlivnění kontraktility detruzoru.

LITERATURA

1. Miller C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol* 2000; 1(4): reviews 0004.1 - 0004.5.
2. Biggin PC, Roosild T, Choe S. Potassium channel structure: domain by domain. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10(4): 456-61.
3. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995; 80: 795-803.
4. Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: 793-801.
5. Carl A, Bayguinov O, Shuttleworth CWR, Ward SM, Sanders KM. Role of Ca-activated K channels in electrical activity of longitudinal and circular muscle layers of canine colon. *Am J Physiol* 1995; 268: 619-627.
6. Zhang L, Bonev AD, Nelson MT, Mawle GM. Ionic basis of the action potential of guinea pig gallbladder smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993; 265: 1552-61.
7. Gopalakrishnan M, Whiteaker KL, Molinari EJ, Davis-Taber R, Scott VE, Shieh CC, Buckner SA, Milicic I, Cain JC, Postl S, Sullivan JP, Brioni JD. Characterization of the ATP-sensitive potassium channels (KATP) expressed in guinea pig bladder smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289(1): 551-8.
8. Siemer C, Bushfield M, Newgreen D, Grissmer S. Effects of NS1608 on MaxiK channels in smooth muscle cells from urinary bladder. *J Membr Biol* 2000; 173(1): 57-66.
9. Heppner TJ, Bonev AD, Nelson MT. Ca(2+)-activated K⁺ channels regulate action potential repolarization in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol* 1997; 273(1 Pt 1): 110-7.
10. Imai T, Okamoto T, Yamamoto Y, Tanaka H, Koike K, Shigenobu K, Tanaka Y. Effects of different types of K⁺ channel modulators on the spontaneous myogenic contraction of guinea-pig urinary bladder smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 2001; 173(3): 323-33.
11. Davies AM, Batchelor TJP, Eardley I, Beech DJ. Potassium channel Kv7.1 subunit expression and function in human detrusor muscle. *J Urol* 2002; 168: 1881-86.

Práce podporována grantem Evropského školícího programu EAU.

MUDr. Jan Krhut
Urologické oddělení FNŠP
Tř. 17. listopadu 1790
708 52 Ostrava-Poruba
e-mail: jan.krhut@fnspo.cz