Цимбалюк Ольга Володимирівна, доцент кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики, Київський національний університет імені Тараса Шевченка. Назва дисертації: &laquo;Біофізичні механізми дії нанорозмірних матеріалів на механокінетику вісцеральних гладеньких м&rsquo;язів&raquo;. Шифр та назва спеціальності 03.00.02 біофізика. Спецрада Д26.001.38 Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова праця

на правах рукопису

ЦИМБАЛЮК ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 577.24/352.4

ДИСЕРТАЦІЯ

БІОФІЗИЧНІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ НАНОРОЗМІРНИХ МАТЕРІАЛІВ

НА МЕХАНОКІНЕТИКУ ВІСЦЕРАЛЬНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М’ЯЗІВ

03.00.02–біофізика

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,

результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ О.В. Цимбалюк

Науковий консультант: Костерін С.О., академік НАН України, доктор

біологічних наук, професор

Київ – 2019

ЗМІСТ

ЗМІСТ………………………………………………………………………… 27

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ………………………………………. 35

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ…………………………………………. 37

1.1 Гладенькі м’язи як складна рецепторна тензоелектрохімічна система:

систематика та структурно-функціональні аспекти функціонування

гладеньких м’язів…………………………………………………………….. 37

1.1.1. Структурно-функціональні характеристики гладеньком’язової

стінки шлунково-кишкового тракту………………………………... 37

1.1.2. Механізм генерації пейсмейкерних повільних хвиль

деполяризації у гладеньких м’язах стінки травного тракту……… 41

1.1.3. Структурно-функціональні характеристики міометрія…………… 44

1.2 Біофізичні та біохімічні основи регуляції концентрації іонів Са2+ і

Na+ у клітинах вісцеральних гладеньких м’язів……………………………. 47

1.2.1. Са2+

- і Na+

-транспортуючі системи плазматичної мембрани

гладеньком’язових клітин…………………………………………... 47

1.2.2. Спряжені з мускариновими рецепторами катіонні канали та

термочутливі TRP-канали…………………………………………… 48

1.2.3. Системи первинного активного транспорту іонів Са2+ і Na+

плазматичної мембрани (Са2+

-помпа та Na+

, К+

-АТФ-аза)………. 51

1.2.3.1. Na+

, К+

-АТФ-аза…………………………………………… 51

1.2.3.2. Сa

2+

-помпа плазматичної мембрани……………………… 59

1.2.4. Процеси електро- та фармакомеханічного спряження у

гладеньких м'язах…………………………………………………………….. 71

1.3 Каліксарени як супрамолекулярні наноефектори біофізичних і

біохімічних процесів…………………………………………………………. 74

1.4 Нанорозмірний матеріал ТіО2: фізико-хімічні властивості та

біологічні ефекти……………………………………………………………... 77

РОЗДІЛ 2.МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ………………….. 85

28

2.1 Об’єкт і предмет досліджень……………………………………………. 85

2.2 Тензометричні експерименти…………………………………………… 86

2.2.1 Розчини для тензометричних експериментів……………………….. 86

2.2.2 Вивчення скорочувальної активності багатоклітинних препаратів

вісцеральних гладеньких м’язів…………………………………………….. 86

2.2.3 Дослідження термодинаміки високоеластичної деформації

гладеньких м’язів…………………………………………………………….. 90

2.3 Модель пригнічення активності Na+

, К+

-АТФ-ази в умовах хронічної

дії на організм in vivo………………………………………………………………... 92

2.4 Модель навантаження щурів нанорозмірним матеріалом TiO2 в

умовах тривалої і субхронічної дії на організм in vivo……………………….. 93

2.5 Препаративні процедури…………………………………………………. 94

2.6 Визначення АТФ-гідролазних активностей ……………………………. 96

2.7 Визначення середнього розміру наночастинок методом електронної

мікроскопії……………………………………………………………………. 97

2.8 Визначення дзета-потенціалу наночастинок діоксиду титану………… 98

2.9 Визначення елементного складу тканин методом атомно-емісійної

спектрометрії…………………………………………………………………. 98

2.10 Аналіз кінетичних параметрів спонтанної скоротливої активності

гладеньких м’язів…………………………………………………………….. 99

2.11 Механокінетичний аналіз процесів скорочення та розслаблення

гладеньких м’язів…………………………………………………………….. 100

2.12 Комп’ютерне моделювання взаємодії наноматеріалів ТіО2 з

метаботропними рецепторами…………………………………………………. 103

2.13 Статистична обробка результатів……………………………………. 104

РОЗДІЛ 3. КІНЕТИЧНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ ПРОЦЕСІВ

СКОРОЧЕННЯ ТА РОЗСЛАБЛЕННЯ ВІСЦЕРАЛЬНИХ ГЛАДЕНЬКИХ

М’ЯЗІВ………………………………………………………………………… 105

29

3.1 Кінетичні закономірності скорочення-розслаблення гладеньких

м’язів товстого кишечника………………………………………………….. 105

3.1.1 Аналіз спонтанних скорочень ……………………………………… 105

3.1.2 Аналіз викликаних скорочень ……………………………………… 108

3.2 Кінетичні закономірності спонтанних і викликаних скорочень

гладеньких м’язів шлунку…………………………………………………… 111

3.2.1 Аналіз спонтанних скорочень……………………………………….. 111

3.2.2 Аналіз викликаних скорочень……………………………………….. 112

3.3 Кінетичні закономірності скорочення-розслаблення поздовжніх

гладеньких м’язів міометрія: спонтанні і викликані скорочення…………. 114

3.3.1 Аналіз спонтанних скорочень……………………………………….. 114

3.3.2 Аналіз викликаних скорочень……………………………………….. 115

3.4 Модуляція фізико-хімічними та метаболічними факторами

механокінетики скорочення-розслаблення вісцеральних гладеньких

м’язів………………………………………………………………………….. 116

3.4.1. Вивчення ролі іонів Na+

в реалізації процесів скороченнярозслаблення вісцеральних гладеньких м’язів…………………………….. 117

3.4.2. Встановлення закономірностей модуляції скорочувальної

активності вісцеральних гладеньких м’язів іонами Мg

2+…………………. 118

3.4.3. Кінетика суперпреципітації скорочувальних білків………………… 127

3.4.4. Кінетичний аналіз процесів скорочення-розслаблення гладеньких

м’язів в умовах блокування Сa

2+

-каналів…………………………………… 129

3.4.5. Вивчення температурної чутливості механокінетики викликаних

скорочень інтестинальних гладеньких м'язів……………………………… 131

3.4.6. Кінетичний та фармакокінетичний аналіз дії інгібіторів

30

брадикінінових рецепторів на гладенькі м’язи…………………………….. 133

РОЗДІЛ 4. ТЕРМОДИНАМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

ВИСОКОЕЛАСТИЧНОЇ ДЕФОРМАЦІЇ ВІСЦЕРАЛЬНИХ

ГЛАДЕНЬКИХ М’ЯЗІВ……………………………………………………… 140

4.1 Механокінетика високоеластичної деформації гладеньких м’язів

травного тракту за фізіологічної температури……………………………... 140

4.1.1 Механічні властивості гладеньких м’язів травного тракту. Криві

деформація-навантаження, зареєстровані в режимі сталого

навантаження………………………………………………………………… 142

4.1.2 Високоеластична деформація гладеньких м’язів за різних умов

навантаження. Ізотерми високоеластичної деформації…………………… 145

4.1.3 Гістерезисні кінетичні ефекти у випадку поодинокого

навантаження і розвантаження м’язів за фізіологічної температури……. 147

4.1.4 Гістерезисні кінетичні ефекти при градуйованих навантаженнях і

розвантаженнях гладеньких м’язів за фізіологічної температури………. 147

4.2 Термомеханокінетика високоеластичної деформації гладеньких

м’язів травного тракту: гістерезис у випадку градуйованих

навантажень-розвантажень при різних температурах……………………. 155

4.3 Робота з високоеластичної деформації гладеньких м’язів шлунку 160

4.4 Застосування рівняння Віганда-Снайдера до термодинамічної

інтерпретації високоеластичної деформації гладеньких м’язів шлунку… 167

РОЗДІЛ 5. ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОМЕХАНІЧНИХ ЕФЕКТІВ ТА

МЕХАНІЗМІВ ДІЇ НАНОРОЗМІРНОГО МАТЕРІАЛУ ДІОКСИДУ

ТИТАНУ НА ВІСЦЕРАЛЬНІ ГЛАДЕНЬКІ М’ЯЗИ В УМОВАХ IN

VITRO………………………………………………………………………………….. 175

5.1 Спонтанна скорочувальна активність вісцеральних гладеньких м’язів

в умовах дії in vitro наночастинок TiO2 різного розміру…………………... 176

5.2 Вплив наноматеріалу ТіО2 різного розміру на механокінетичні

параметри викликаних скорочень вісцеральних гладеньких м’язів за

31

умов впливу in vitro………………………………………………………………….. 188

5.2.1. Ацетилхолін-викликані скорочення за дії наночастинок TiO2

різного розміру в умовах in vitro………………………………………………. 189

5.2.1.1. Кумулятивна дія TiO2……………………………………………… 189

5.2.1.2. Некумулятивна дія підвищених концентрацій TiO2…………….. 194

5.2.2. Індуковані К+

-деполяризацією плазматичної мембрани ГМК

скорочення за дії нанорозмірного матеріалу TiO2 різного розміру в

умовах in vitro………………………………………………………………………… 195

5.2.2.1. Кумулятивна дія TiO2……………………………………………… 195

5.2.2.2. Некумулятивна дія підвищених концентрацій TiO2…………….. 199

5.3 Встановлення механізмів дії наночастинок ТіО2 на вісцеральні

гладенькі м’язи в умовах in vitro……………………………………………….. 200

5.3.1 Вивчення функціонування внутрішньоклітинних Са2+ депо в

умовах дії нанонаночастинок ТіО2………………………………………… 200

5.3.2 Вивчення потенціалкерованого входу іонів Са2+ через плазматичну

мембрану в умовах дії наночастинок ТіО2……………………………….. 201

5.3.3 Вивчення ефективності активації мускаринових холінорецепторів

ендогенним ацетилхоліном в умовах дії наночастинок ТіО2……………. 202

5.3.4 Вивчення ефективності неадренергічного нехолінергічного

розслаблення в умовах дії наночастинок ТіО2 ………………………….. 204

5.3.4.1. Оксид азоту………………………………………………………… 204

5.3.4.2. Пуринергічне гальмування………………………………………. 206

5.3.5 Вивчення ефективності пресинаптичної модуляції процесів

збудження та гальмування гладеньких м’язів за дії наночастинок ТіО2 208

5.3.6 Вивчення АТФ-залежної К+ провідності плазматичної і

мітохондріальної мембран гладеньких м’язів за дії наночастинок ТіО2 216

5.4 Молекулярний докінг нано-ТіО2 з метаботропними рецепторами…… 218

РОЗДІЛ 6. ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОМЕХАНІЧНИХ ЕФЕКТІВ

32

НАНОРОЗМІРНОГО МАТЕРІАЛУ ДІОКСИДУ ТИТАНУ НА

ВІСЦЕРАЛЬНІ ГЛАДЕНЬКІ М’ЯЗИ ПРИ ЙОГО ТРИВАЛОМУ

ВВЕДЕННІ В ОРГАНІЗМ…………………………………………………… 227

6.1. Встановлення закономірностей накопичення наночастинок TiO2 в

організмі щурів за дії in vivo………………………………………………………. 228

6.2. Модуляція термодинамічних параметрів високоеластичної

деформації кільцевих гладеньких м’язів антрального відділу шлунку

щурів за дії ТіО2в умовах in vivo………………………………………………… 230

6.3. Спонтанна скорочувальна активність вісцеральних гладеньких

м’язів щурів в умовах різної тривалості дії in vivo наночастинок TiO2…. 234

6.4. Викликана скорочувальна активність вісцеральних гладеньких

м’язів щурів в умовах різної тривалості дії in vivo наночастинок TiO2…. 241

РОЗДІЛ 7 МЕХАНІЗМИ МОДУЛЯЦІЇ КАЛІКС[4]АРЕНАМИІНГІБІТОРАМИ НАТРІЄВОЇ ПОМПИ ФУНКЦІОНУВАННЯ

ВІСЦЕРАЛЬНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М’ЯЗІВ В УМОВАХ IN VITRO……… 252

7.1. Вивчення закономірностей впливу каліксаренів-модуляторів Na+

,K+

-

АТФ-ази плазматичної мембрани на скорочувальну активність міометрія 254

7.1.1. Спонтанна скорочувальна активність міометрія при блокуванні

натрієвої помпи ……………………………………………………………… 254

7.1.2. Викликані скорочення міометрія при блокуванні натрієвої

помпи…………………………………………………………………………. 258

7.2. Вивчення закономірностей та механізмів впливу каліксаренівмодуляторів натрієвої помпи на гладенькі м’язи товстого кишечника в

умовах in vitro………………………………………………………………………… 262

7.2.1. Спонтанна скорочувальна активність гладеньких м’язів…………… 262

7.2.2. Викликані скорочення гладеньких м’язів caecum в умовах in vitro

блокування натрієвої помпи (уабаїном та каліксаренами С-99 і С-107)…. 269

7.2.3. Закономірності мобілізації іонів Са2+ з внутрішньоклітинних Са2+

-

депо в кільцевих гладеньких м’язах товстого кишечника за дії 283

33

каліксарену С-99………………………………………………………………

РОЗДІЛ 8 ЗАКОНОМІРНОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ВІСЦЕРАЛЬНИХ

ГЛАДЕНЬКИХ М’ЯЗІВ В УМОВАХ ХРОНІЧНОГО ІНГІБУВАННЯ

NA+

,K+

-АТФ-АЗИ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ……………………… 288

8.1. Порівняльне вивчення в дослідах in vitro та in vivo впливу уабаїну,

каліксарену С-107 та фрагменту М-3 на активність Na+

,K+

-АТФ-ази

плазматичної мембрани……………………………………………………. 288

8.1.1. Дослідження in vitro……………………………………………………….. 288

8.1.2. Дослідження in vivo……………………………………………………….. 290

8.2. Порівняльне вивчення в дослідах in vivo впливу уабаїну, каліксарену

С-107 та фрагменту М-3 на скорочувальну активність гладеньких м’язів

товстого кишечника…………………………………………………………. 296

РОЗДІЛ 9. ВИВЧЕННЯ ЗАКОНОМІРНОСТЕЙ ТА ВСТАНОВЛЕННЯ

МЕХАНІЗМІВ ДІЇ КАЛІКСАРЕНІВ-МОДУЛЯТОРІВ КАЛЬЦІЄВОЇ

ПОМПИ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ НА ВІСЦЕРАЛЬНІ

ГЛАДЕНЬКІ М’ЯЗИ………………………………………………………… 300

9.1. Вплив каліксарену С-90 на спонтанну скорочувальну активність

гладеньких м’язів міометрія………………………………………………… 303

9.2. Встановлення механізмів впливу каліксарену С-90 на гладенькі

м’язи міометрія………………………………………………………………. 308

9.2.1. Аналіз спонтанної скорочувальної активності гладеньких м’язів

міометрія в присутності каліксарену С-90………………………………… 308

9.2.2. Аналіз участі NO в ефектах каліксарену С-90 на спонтанну

скорочувальну активність гладеньких м’язів міометрія…………………... 312

9.2.3. Аналіз викликаних К+

-деполяризацією і окситоцином скорочень

гладеньких м’язів міометрія у присутності каліксарену С-90…………….. 318

9.2.4. Закономірності впливу каліксарену С-90 на викликані скорочення

321

34

гладеньких м’язів міометрія щурів в умовах блокування NO-синтаз…….

9.3. Викликана скорочувальна гладеньких м’язів міометрія в умовах дії

каліксарену С-716: встановлення закономірностей та механізмів

модуляції процесу розслаблення…………………………………………… 322

РОЗДІЛ 10. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

ДОСЛІДЖЕНЬ………………………………………………………………. 331

ВИСНОВКИ………………………………………………………………… 370

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ…………………………………… 374

ВИСНОВКИ

Уконтекстідослідженняфундаментальнихвластивостей

гладеньком’язовоїтканиниудисертаційнійроботібуливизначені

механокінетичнітатермодинамічніхарактеристикивісцеральнихгладеньких

м’язівЗоглядунаважливістьтаактуальністьвстановленнябіофізичних

закономірностеймодуляціїнанорозмірнимиксенобіотикамифункціонування

гладеньком’язовихвнутрішніхорганівізвикористаннямсукупності

методичнихпідходівтабулодетальновивчено

закономірностівпливуівизначеномеханізмидіївибранихнанорозмірних

матеріалівнавісцеральнігладенькім’язи

Прививченнітермомеханокінетичнихвластивостейоборотної

високоеластичноїдеформаціїтарелаксаціїпрепаратівкільцевихгладеньких

м’язівшлункувстановленощопоказникимаксимальноїΔАта

напівмаксимальноїΔАроботикуполоподібнозмінюютьсядосягаючи

мінімальнихзначеньприоС

ІззастосуваннямрівнянняВігандаСнайдеравиявленощооборотні

маліΔп≤деформаціїнезалежновідтемпературтазначніΔп≈

деформаціїудіапазонітемпературоСоСгладенькихм’язів

шлункунесупроводжуютьсязмінамиувпорядкованостітензометричної

системи











привеликихдеформаціяхзанизькихтапідвищених

температурспостерігаєтьсяінверсіязнакуентропійнихефектів











приоСта











приоС

ВстановленощосуспензіїнанорозмірногоматеріалуТіОтрьох

розмірнихгрупякімістятьрізніспіввідношеннясумішейполіморфіврутилу

іанатазунмрутилнманатазтанмспіввідношення

рутиланатаззаумовнекумулятивної·

мгмлтакумулятивної

–мгмлдіїєефективнимимодуляторамиспонтанноїівикликаної



скорочувальноїактивностівісцеральнихгладенькихм’язівЗокремаТіО

модулюєпресинаптичнііпостсинаптичнімеханізмирегуляціїзаучасті

нейрональнихацетилхоліновихнікотиновихгістаміновихіГАМКрецепторівзодногобокуазіншогобокуекспресованихвласнеу

гладеньком’язовихклітинахацетилхоліновихмускариновихгістаміновихта

брадикініновихрецепторів

Показановідсутністьвпливунаночастинокнапроцесиспряження

збудженняскороченняякііндукуютьсяендогеннимацетилхоліномзаумови

активаціїйоговивільненнядеполяризацієютканинигладенькихм’язів

Водночасвиявленомодуляціюцимнаноматеріаломскороченьактивованих

екзогеннимацетилхоліномтапригніченняїхтонічноїскладовоїагоністом

іонотропнихацетилхоліновихрецепторівнікотином

ВиявленощопопереднєблокуванняСа

каналівтипуу

значнійміріусуваєактиваційнийефектвисокимиконцентраціями

ацетилхолінвикликанихскороченьщовказуєнаіндуковану

наночастинкамиактиваціюнадходженняіонівСачерезціканали

Встановленощонанорозмірнийматеріалнезмінюємобілізацію

іонівСазінозитолтрисфосфаттаріанодинчутливихпулів

саркоплазматичногоретикулумуміоцитівшлунку

Виявленощоблокуванняроботидихальноголанцюгамітохондрій

усуваєефектиТіОнаацетилхолінвикликаніскороченнягладенькихм’язів

шлункуУм’язахміометріяТіОусуваєефектиблокуванняАТФчутливих

К



каналівтожмішеннюдіїТіОєенергоАТФзалежніпроцесивміоцитах

ДослідженнямивстановленощонанорозмірнийматеріалТіО

здатнийвзаємодіятизрізноюспорідненістюіздекількомасайтами

позаклітинноїчастиниметаботропнихГАМКВгліциновихМтаМ

ацетилхоліновихрецепторів

Елементниманалізомпоказанощозаумовінтрагастральноговведення

щурамнаноТіОпроникаєвтканинитанерівномірнонакопичуєтьсяу

різнихорганахнайбільшукількістьнакопичуютьтканинивісцеральних



гладенькихм’язівшлуноктовстийкишечникматкатанирок

Тензометричнимидослідженнямитамеханокінетичниманалізом

встановленощотривалеідібнавантаженняорганізмущурів

ТіОспричиняєнеодноріднийчасозалежнийітканинозалежнийвпливна

спонтаннуівикликанускоротливуактивністьвісцеральнихгладеньких

м’язівТермодинамічниманалізомвиявленощовумоваххронічноїдіїТіО

обумовлюєсуттєвізмінипроцесіввисокоеластичноїдеформаціїу

гладеньком’язовійтканинішлункузавеликихдеформаційΔ≈

Виявленощовикликаніацетилхоліномскороченнягладенькихм’язів

товстогокишечникаєчутливимидодіїкаліксаренуСмкМв

умовахпопередньогоблокування

К

АТФазиуабаїноммкМ

порівняноздієюмкМуабаїнуСспричиняєсуттєвепригнічення

фазногоізбільшеннятонічногокомпонентаскороченьатакожзниження

нормованоїмаксимальноїшвидкостіфазирозслаблення

ПоказанощокаліксаренСзберігаєсвоїінгібіторніякостіщодо





АТФазивумовахцілісногоорганізмуВстановленощоцей

каліксаренвумоваххронічноговпливумісяцівспричиняє

пригніченняуабаїнчутливоїа



АТФазноїактивностіпрепаратів

плазмалемигепатоцитівщурівСтруктурнийфрагменткаліксаренуС

сполукаМвразівикористанняякіувипадкуневпливає

нафункціонуваннянатрієвоїпомпи

ІзвикористанняммеханокінетичногоаналізувикликанихК



деполяризацієюіацетилхоліномскороченьвстановленощокаліксаренСприаплікуваннітавумоваххронічноїдіїспричиняє

подібнізмінискорочувальноїфункціїгладенькихм’язівтовстогокишечника

Доведенощоблокуваннясинтезуоксидуазотупризводитьдо

усуненняінгібуванняякспонтаннихтаківикликанихскороченьміометрія

піддієюкаліксаренуС

ВстановленощопідвищеннятонічноїскладовоїК

скорочення

гладенькихм’язівміометріяпіддієюкаліксаренуСзапопереднього



блокуванняобмінуіонівСаувнутрішньоклітиннихСа

депопов’язанез

підвищеноюконцентрацієюіонівСавміоцитахтодіякзбільшення

нормованоїшвидкостірозслабленнязацихумовймовірнообумовлюється

суттєвоюактивацієюсинтезуоксидуазоту