Дринь Дарія Олегівна, провідний інженер ДУ &laquo;Інститут фармакології та токсикології НАМН України&raquo;: &laquo;Біофізич&shy;ні властивості TRPC4 і TRPV4 каналів та їх роль у регуляції скорочення гладеньких м&rsquo;язів&raquo; (03.00.02 - біофізика). Спец- рада Д 26.001.38 у Київському національному університе&shy;ті імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

На правах рукопису

ДРИНЬ ДАРІЯ ОЛЕГІВНА

УДК 577.359/57.043:57.053:57.042

БІОФІЗИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ TRPC4 І TRPV4 КАНАЛІВ ТА ЇХ

РОЛЬ У РЕГУЛЯЦІЇ СКОРОЧЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ М’ЯЗІВ

03.00.02 – біофізика

Дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

Жолос Олександр Вікторович

доктор біологічних наук,

професор

Київ–2016

2

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВСТУП

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Структурна організація та функції гладеньком’язових клітин

1.1.1. Іонні механізми регуляції скорочення гладеньких м'язів

1.1.2. Загальні механізми скоротливої активності гладеньких

м'язів і моторики шлунково-кишкового тракту

1.1.3. Загальні механізми скоротливої активності гладеньких

м'язів судин

1.2. Загальна характеристика родини TRP-каналів

1.2.1. Класифікація TRP-каналів

1.2.2. Загальна характеристика підродини TRPC-каналів

1.2.3. Загальна характеристика підродини TRPV-каналів

1.2.4. Функціональна роль родини TRP-каналів у гладеньких

м’язах. Роль TRPC4 у регуляції скорочення гладеньких м’язів

тонкого кишечнику

1.2.5. Роль TRPV4-каналів у функціонуванні та розвитку

судинних захворювань

1.2.6. Проблеми і перспективи вивчення TRP-каналів

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Тварини, матеріали та реактиви

2.1.1. Експериментальні тварини

2.1.2. Розчини, реактиви

2.2. Виділення ізольованих легеневих артерій щурів

2.3. Виділення ізольованих клітин гладеньких м’язів тонкого

кишечнику

5

7

13

13

17

19

22

26

26

31

34

36

40

42

46

46

46

46

47

48

3

2.4. Методи досліджень

2.4.1. Реєстрація скоротливої активності гладеньких м’язів

легеневих артерій

2.4.2. Реєстрація скоротливої активності гладеньких м’язів

кишечника.

2.4.3. Реєстрація трансмембранних струмів

2.5. Приготування та характеризування водного розчину

немодифікованих С60 фулеренів

2.6. Біоінформаційний аналіз

2.7. Статистична обробка результатів

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Регуляція TRPV4 у судинних гладеньких м’язах

3.1.1. Роль TRPV4-каналів у регуляції фенилефриніндукованого скорочення основних легеневих артерій щурів

3.1.2. Взаємодія каналів транзієнтного рецепторного

потенціалу TRPV4 і кальцій-активованих калієвих каналів

(BKCa) при вазорелаксації легеневих артерій

3.1.3. Взаємодія TRPV4 і потенціалзалежних кальцієвих

каналів при вазоконстрикції легеневих артерій

3.2. Мускаринові катіонні канали опосередковані TRPC4 у

вісцеральних гладеньких м’язах

3.2.1.Біофізичні властивості та регуляція рецептор-керованого

TRPC4 каналу

3.2.2. Структурні та регуляторні відміни TRPC4 різних видів

тварин, що визначають їх різну регуляцію G-білками.

Біоінформаційний аналіз

3.2.3. Аналіз відмінностей карбахол-індукованих мІКАТ у

мишей і морських свинок

3.2.4. Аналіз відмінностей ГТФγS –індукованих мІКАТ у мишей

і морських свинок

50

50

52

52

55

58

58

59

59

59

71

75

77

77

83

86

89

4

3.2.5. Дослідження кінетики потенціалзалежної релаксації

мІКАТ

3.3. Інгаляційний анестетик ізофлуран пригнічує мускаринові

катіонні струми та карабахол-індуковані скорочення гладеньких

м’язів кишечнику

3.3.1. Ізофлуран пригнічує карбахол-індуковані мІКАТ у

міоцитах клубової кишки миші

3.3.2 Інгібування ізофлураном ГТФγS-індукованих мІКАТ

показує декілька різних властивостей у порівнянні з карбахоліндукованими мІКАТ

3.3.3. Ізофлуран інгібує агоніст-індуковані скорочення

гладеньких м’язів кишечнику

3.4. Інгібуюча дія фулеренів С60 на мускариновий катіонний струм

у гладеньких м’язах тонкого кишечнику миші

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

4.1. З’ясування механізмів залучення TRPV4 у формування

судинного тонусу легеневих артерій

4.2. Порівняльний аналіз біофізичних властивостей рецепторкерованого TRPC4 каналу у вісцеральних гладеньких м’язах миші

та морської свинки

4.3. Вплив інгаляційного анестетик ізофлурану на мускаринові

катіонні струми та карбахол-індуковані скорочення гладеньких

м’язів кишечнику

4.4. Пояснення взаємодії фулеренів С60 з мускариновим

катіонним каналом у гладеньких м’язах тонкого кишечнику

РОЗДІЛ 5. ВИСНОВКИ

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ПОСИЛАНЬ

92

96

96

99

103

104

114

114

119

123

127

130

132

5

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ СКОРОЧЕНЬ

І ТЕРМІНІВ

ГМ

ГМК

АТФ

TRP

TRPC

TRPV

[Ca2+]i

мІКАТ

M2

M3

Gαi

НСКК

BKCа

СТВС

PIP2

PLC

ГТФ

ГТФγS

GSK1016790A

ТМ

СР

ЕР

АХ

ДАГ

гладенькі м`язи

гладеньком’язові клітини

аденозинтрифосфорна кислота

транзієнтний рецепторний потенціал

канонічні TRP канали

ванілоїдні TRP канали

внутрішньоклітинна концентрація вільного Ca2+

мускариновий катіонний струм

холінергічний мускариновий рецептор М2 типу

холінергічний мускариновий рецептор М3 типу

αi субодиниця G-білку

неселективні катіонні канали

Са2+

-активовані калієві канали великої провідності

спонтанні транзієнтні вихідні струми

фосфатидилінозитол–4,5–біcфосфат

фосфолипаза С

гуанозинтрифосфат

гуанозинттрифосфат-γS

(N-((1S)-1-{[4-((2S)-2-{[(2,4-дигідрофеніл)-

сульфаніл]аміно}-3-гідроксипропаноіл)-1-

піперазиніл]карбоніл}-3-метилбутил)-1-

бензотіофен-2-карбоксамід

трансмембранні домени

саркоплазматичний ретикулум

ендоплазматичний ретикулум

ацетилхолін

діацилгліцерол

6

GPCR

КЛЛМ

IP3

ІР3-R

α-АР

ПК-С

СаМ

цАМФ

цГМФ

RyR

Кv

ПЗКК

КІВК

ROC

SOC

SAC

рецептори, спряженні с G-білком

кіназа легких ланцюгів міозину

інозитолтрифосфат

ІР3-рецептори

α- адренорецептор

протеїнкіназа-С

кальмодулін

циклічний аденозинмонофосфат

циклічний гуанозинмонофосфат

ріанодинові рецептори

потенціалзалежні калієві канали

потенціалзалежні кальцієві канали

кальцій-індуковане вивільнення кальцію

рецепторкерований катіонний канал

депозалежний катіонний канал

механочутливі катіонні канали

7

ВСТУП

Актуальність теми. Кальцієва сигналізація та кальцієвий гомеостаз є

надзвичайно важливими для регуляції фізіологічних функцій

гладеньком’язових клітин (ГМК) різних систем організму. Вони

забезпечуються та підтримуються такими транспортними мембранними

структурами як помпи, обмінники та іонні канали, головними з яких є класи

потенціал-залежних кальцієвих каналів та сенсорних і рецептор-керованих

катіонних каналів. Останні в основному представлені родиною Са2+

-

проникних катіонних каналів, що належать до надродини TRP (канали

транзієнтного рецепторного потенціалу).

TRP-канали останнім часом привернули значний інтерес дослідників,

оскільки представники цієї родини беруть участь в безлічі клітинних

функцій, а порушення їх експресії або функції були ідентифіковані як одна з

вагомих причин виникнення багатьох спадкових і набутих захворювань, які

відомі як каналопатії [Nilius B., 2007]. TRP-канали експресовані переважно у

плазматичній мембрані багатьох типів клітин, як збудливих, так і

незбудливих, і активуються різноманітними стимулами хімічної та фізичної

природи, як екзогенними, так і ендогенними. В організмі ссавців розрізняють

28 представників TRP каналів, яких розподіляють на 6 підродин [Clapham D.

et al., 2003; Nilius B. et al, 2007]. Одні з них, TRPV4-канали відіграють

важливу ролі у регуляції скорочення гладеньких м’язів судин. TRPV4-канал

активується при температурі вище ніж 250C, механічними стимулами,

ендогенними речовинами (арахідонова кислота), а також синтетичними

сполуками (GSK1016790A). Цей катіонний канал відіграє важливу роль у

забезпечені регуляції артеріального тиску, осмолярності клітин, відчутті

тепла та механочутливості тощо. Важливо зазначити, що TRPV4-канали

підсилюють чутливість судин до хронічної гіпоксичної легеневої гіпертензії,

а також надмірно експресуються за цих умов, що робить їх перспективними

мішенями для лікування цих захворювань [Xia H. et al., 2013]. Однак нині

8

недостатньо відомо про властивості цього каналу в легеневих артеріях. У

мишей з нокаутними генами TRPV4-каналів на фоні гіпоксії значно

пригнічувався розвиток легеневої гіпертензії, гіпертрофії правого шлуночка і

ремоделювання судин. Тому актуальним є дослідження біофізичних

властивостей та функцій TRPV4, а також вивчення TRPV4-каналів, що

вважається перспективним напрямком пошуку засобів для фармакологічної

корекції патологічних станів [Earley S. et al., 2005; Dahan D. et al., 2012].

Інший представник TRP – TRPC4-канал, є не менш важливим, оскільки

він експресований в ГМК кишечника, де відіграє важливу роль у розвитку

холінергічного збудження та внутрішньоклітинній сигналізації при активації

мускаринових рецепторів, а саме М3/Gq/11/PLC та М2/Gi/o систем [Bolton T. et

al., 1999; Tsvilovskyy V. et al., 2009; Zholos A., 2011]. TRPC4 білки формують

рецептор-керовані катіонні канали, які синергічно активуються Gq/11 та Gi/o

білками. Наразі є актуальним звернути увагу на структурно-функціональні

відносини в цих каналах, що базуються на видових відмінностях. Зокрема

біофізичні властивості TRPC4 миші, на відміну від TRPC4 морської свинки,

залишаються малодослідженими, тоді як зараз все більше досліджень

проводиться саме на мишах. Такі дослідження, безсумнівно, сформують не

тільки нові ідеї щодо ролі деяких структурних відмінностей між різними

видами, але і проінформують про найбільш підходящі моделі тварин для

трансляційних досліджень та вивчення регуляції активності каналу.

Селективні блокатори TRPC4 каналів можуть розглядатися як

перспективні модулятори скоротливої активності кишечника. Однак наразі

відомий лише один блокатор цього типу – ML204 [Miller M. et al., 2011].

Відомо, що біологічно активні немодифіковані фулерени С60, що є

алотропними нетоксичними високосиметричними модифікаціями карбону,

розглядають як новітній клас блокаторів іонних каналів, що можуть бути

використані для створення лікарських препаратів для корекції порушень

нормальної функції гладеньких м’язів кишечника [Gharbi N. et al., 2005; Park

9

E. et al., 2003]. Можливість регуляції ними рецептор-керованих іонних

каналів (TRPC4) раніше не досліджували експериментально.

Також у сучасній медицині значною проблемою залишаються побічні

ефекти загальних анестетиків [Ogilvy et al., 1995; Resnick et al., 1997].

Зокрема, одним з поширених ускладнень загальної анестезії є порушення

моторики кишечнику (наприклад, ілеус). Відомо, що анестетики взаємодіють

з клітинними рецепторами, G-білками та іонними каналами, включаючи

TRP-канали. Дослідження цього явища є актуальним, оскільки отримані

результати можуть вказати на можливі механізми розвитку післяопераційних

порушень моторики кишечнику та відкривають нові шляхи для корекції

таких станів [Matta et al., 2008].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідних тем кафедри

біофізики та медичної інформатики ННЦ «Інститут біології та медицини»

«Механізми реалізації адаптаційно-компенсоторних реакцій організму за

умов розвитку різних патологій» за № д/р «0111U004648» (2011-2015 роки)

та «З’ясування клітинних та біофізичних механізмів функціонування і

регуляції біологічних систем в нормі та за умов паталогії, а також розробка

засобів їх корекції» за № д/р 0116U006381 (2016-2019 роки).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити

функціональну експресію, біофізичні властивості та регуляцію двох

ключових TRP каналів, що широко представлені у вісцеральних і судинних

гладеньком`язових клітинах, відповідно TRPC4 і TRPV4. Для її досягнення

були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити роль TRPV4-каналів в кальцієвій сигналізації, зокрема у

взаємодії з Са2+

-каналами L-типу, BKCa калієвими каналами і ріанодиновими

рецепторами саркоплазматичного ретикулуму, для з’ясування ролі і

специфічних функцій TRPV4-каналів у регуляції скоротливої активності

легеневих артерій.

10

2. Дослідити TRPC4 в ізольованих міоцитах тонкого кишечнику миші, в

яких при активації мускаринових ацетилхолінових рецепторів виникає

значний вхідний катіонний TRPC4 струм (мІКАТ), і порівняти їх біофізичні

властивості з краще дослідженим мІКАТ в міоцитах морської свинки у

контексті структурних відмін між відповідними білками.

3. Ідентифікувати сигнальні ланки в системі мускариновий рецетор – G

білок – TRPC4 канал, які порушуються при дії інгаляційного загального

анестетику ізофлурану.

4. Охарактеризувати водорозчинні немодифіковані фулерени С60 як

потенційні новітні блокатори TRPC4-каналів, які опосередковують

нейрогенне холінергічне збудження і скорочення ГМ шлунково-кишкового

тракту.

Об'єкт дослідження – TRPC- і TRPV4-канали у судинних і

вісцеральних гладеньких м’язах.

Предмет дослідження – структурно-функціональні характеристики,

біофізичні властивості та роль TRPC4- і TRPV4-каналів у скоротливій

активності гладеньких м’язів; вплив фулеренів С60 та ізофлурану на

активність TRPC4-каналів у тонкому кишечнику.

Методи дослідження: біофізичні методи (метод реєстрації

трансмембранних іонних струмів петч-клемп, тензометрія),

біоінформатичний аналіз, методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Автором дисертації вперше

було показано складну двофазну скоротливу відповідь на активацію TRPV4-

каналів їх селективним агоністом GSK у гладеньком’язових клітинах

легеневих артерій, а також їх взаємодію з Са2+

-каналами L-типу та кальційчутливими калієвими каналами великої провідності (ВКСа-канали), що дає

можливість з’ясувати механізми їх участі у регуляції судинного тонусу

легеневих артерій. Вперше досліджено ГТФyS-індуковані TRPC4 струми в

ізольованих міоцитах тонкого кишечнику миші і проведено порівняльний

аналіз біофізичних властивостей мІКАТ в контексті структурних відмін між

11

TRPC4-білками морської свинки і миші. Вперше пропонується застосовувати

водорозчинні немодифіковані фулерени С60 як блокатори катіонних каналів

TRPC4, які опосередковують нейрогенне холінергічне збудження і

скорочення ГМ шлунково-кишкового тракту; вперше ідентифікували

сигнальні ланки в системі мускариновий рецетор – G білок – TRPC4 канал,

які порушуються при дії інгаляційного загального анестетику ізофлурану, що

спричиняє пригнічення моторики ГМ тонкого кишечнику після застосування

загальної анестезії під час операційного втручання.

Практичне значення одержаних результатів. Практичне значення

роботи полягає в тому, що отримані результати значно розширюють і

поглиблюють сучасні уявлення про функціональну експресію, біофізичні

властивості та регуляцію двох ключових TRP каналів, що широко

представлені у гладеньком`язових клітинах, зокрема TRPC4 і TRPV4, що у

подальшому допоможе визначити їх роль у розвитку патологій (дисфункцій)

вісцеральних і судинних гладеньких м’язів, а саме при синдромі

подразненого кишечника, гіперактивністі сечового міхура, гіпертонусі

міометрія, що призводить до передчасних пологів або викидів, бронхіальній

астмі та іншх захворюваннях дихальних шляхів, хронічній гіпоксичній

легеневій гіпертензії та інших патологічних станів, що пов’язані з

гіперактивністю ГМ. Одержані результати допоможуть визначити чи можуть

TRP-канали бути використані в якості нових потенційних фармакологічних

мішеней при лікування цих захворювань.

Результати дисертації можуть бути використані при викладанні

спецкурсів на біологічних факультетах («Біофізика іонних каналів»,

«Біофізика м’язів» , «Фармакологія», «Електробіофізика», «Біоінформатика»

та ін.).

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною науковою

працею, в якій висвітлені власні ідеї і розробки автора, що дозволили

вирішити поставлені завдання. Усі експериментальні дослідження, а також

теоретичне обґрунтування результатів, пошук та аналіз літературних джерел

12

виконані дисертантом особисто. Планування експериментів, розробка

методичних підходів, узагальнення результатів та редагування матеріалів,

підготовлених до друку, а також розділів дисертації, здійснено спільно з

науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації

доповідались та обговорювались на VI Міжнародному конгресі Українського

товариства нейронаук (Київ, 4-8 червня, 2014); Міжнародній науковій

конференції «Актуальні проблеми біофізики» (Львів, 13-15 жовтня, 2014); ХІ

Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ

біології» (Львів, 20-23 квітня, 2015); VІ з’їзді Українського біофізичного

товариства (Луцьк, 28-30 травня, 2015); Ukrainian-German Symposium on

Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology (Kyiv, 21-25

September, 2015); ХІІ Міжнародній науковій конференції студентів і

аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 19-21 квітня, 2016); Joint

Meeting of the American Physiological Society and The Physiological Society

(Dublin, Ireland, 29 - 31 July, 2016); усна доповідь на науковому семінарі у

відділі анестезіології медичної школи Вашингтонського університету у місті

Сент-Льюїс (Saint Louis, MO, USA, 2016); ХІІ Національній школі молодих

вчених-фармакологів ім. академіка НАМН України О.В. Стефанова (Київ, 12

жовтня, 2016).

Публікації. За матеріалами дисертації у наукових виданнях

опубліковано 12 наукових робіт: 5 статей у вітчизняних наукових фахових

виданнях, рекомендованих Департаментом акредитації кадрів України, з них

1 стаття у наукових журналах, що включені до Scopus Scientific Journal List;

7 тез наукових конференцій та з’їздів, один патент.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу,

огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, викладення

результатів дослідження, обговорення результатів, висновків та списку

використаних джерел (160 найменувань). Обсяг дисертації складає 149 стор.

Дисертаційна робота ілюстрована 56 рисунками та містить 1 таблицю

ВИСНОВКИ

Впроведеномудослідженніпоказанафункціональнаекспресія

дослідженібіофізичнівластивостітарегуляціядвохключовихканалів

щоширокопредставленіувісцеральнихісудиннихгладенькомязових

клітинахвідповідноі

Показанощовлегеневихартеріяхщурівфункціональніканали

експресованіпереважновГМКтодіякендотеліальні

відіграютьвідноснонезначнурольурегуляціїскороченняНафоні

актваціїαадреноцепторівселективнийагоніст

викликавпочатковерозслабленнятазатриманескороченняОЛАякз

інтактнимендотеліємтакібезендотелію

З’ясованафункціональнавзаємодіязіншимиіоннимиканалами

упроцесахрегуляціїскороченнясудинзокремапоказанощо

селективнийблокаторСканалівпаксилінтаселективнийблокатор

Са

каналівтипуніфедипінпригнічуютьвідповіднупершута

другуфазискоротливоївідповідіОЛАнаТакимчином

відіграєважливурольврегуляціїтонусуОЛА

Аналіззасобамибіоінформатикипоказавзначнугомологію

білкаміжмишеюіморськоюсвинкоюякастановилатодіяк

усіхвідмінспостерігаласьвдистальномукінціканалаВсі

амінокислотнізаміниукінцібілкатавділянцітрансмембранних

сегементівТМТМносилиподібнийхарактер

Проведенопорівняльнийаналізбіофізичнихвластивостей

каналіввізольованихміоцитахтонкогокишечникумишівяких

виникаєзначнийструмприактиваціїмускариновихрецепторів

мІКАТзкращедослідженимимІКАТвміоцитахморськоїсвинкиЗсув

діапазонупотенціалівактиваціїпоміріактиваціїбілківбув

вираженимвміоцитахморськоїсвинкиалепрактичновідсутнімв

міоцитахмишіКрімтогозначнівідміниспостерігалисяуСа

