

УДК 577.3

ВУГЛЕЦЕВІ НАНОТРУБКИ ЯК МОДУЛЯТОРИ СПОНТАННОЇ СКОРОЧУВАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ КИШЕЧНИКА

Н. В. Меленевська¹
 О. В. Цимбалюк¹
 О. В. Романенко²
 Т. Л. Давидовська¹
 Ю. І. Прилуцький¹
 В. В. Черепанов³
 О. А. Марченко³

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
 ННЦ «Інститут біології»

²Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця,
 Київ

³Інститут фізики НАН України, Київ

E-mail: prylut@ukr.net

Отримано 16.09.2011

Тензометричним методом в ізометричному режимі на ізольованих гладенько-м'язових смужках саесум показано, що їхня спонтанна скорочувальна активність характеризується розподілом амплітуд скорочення за частотами. Встановлено, що за присутності багатостінних вуглецевих нанотрубок у розведеннях 1:1 000, 1:100 та 1:50 у нормальному розчині Кребса відбувається звуження амплітудного діапазону спонтанних скорочень гладенько-м'язових смужок, зміщення їх у ділянку більших значень амплітудно-частотного максимуму, а також зменшення частоти генерації для розведень багатостінних вуглецевих нанотрубок 1:100 та 1:50. Відмивання м'язових препаратів у нормальному розчині Кребса розширює амплітудний діапазон скорочень, усуває спричинені нанотрубками у розведеннях 1:1 000 та 1:100 зсув і підсилення амплітудно-частотного максимуму скорочень гладеньких м'язів, але не забезпечує відновлення контроль-ного профілю розподілу амплітуди скорочень за частотами, окрім випадку присутності у нормальному розчині Кребса нанотрубок у розведенні 1:1 000. Зміни спонтанної скорочувальної активності гладенько-м'язових смужок, зумовлені багатостінними вуглецевими нанотрубками у розведенні 1:50, є незворотними.

Ключові слова: багатостінні вуглецеві нанотрубки, гладенькі м'язи, спонтанні скорочення.

Відомо [1, 2], що гладенькі м'язи шлунково-кишкового тракту навіть за відсутності впливу нейромедіаторів, гормонів та паракринних факторів генерують повільні хвилі деполяризації і, відповідно, спонтанні скорочення. В основі їх виникнення лежать механізми пейсмеркерної активності, притаманні інтерстиціальним клітинам Кахаля (ІКК), розташованим у м'язовій тканині. Ці клітини перебувають у тісному зв'язку з нервовими терміналями з одного боку та гладенько-м'язовими клітинами (ГМК) — з другого. Між собою, а також сусідніми ГМК вони сполучаються щільними контактами, утворюючи електричний синцитій. Такі електричні пейсмеркери генерують повільні хвилі деполяризації, контролюючи частоту фазних скорочень гладеньких м'язів [3, 4], класичним способом модуляції якої як в експериментальній біології, так і в практичній медицині є фармакологічні препарати.

Останнім часом значну увагу дослідників привертають штучні біосумісні наноконструкції, зокрема вуглецеві нанотрубки (ВНТ), як перспективні матеріали для застосу-

вання у різноманітних нанобіотехнологіях [5, 6]. Показано [7–9], що багатостінні ВНТ (БВНТ), які становлять систему вкладених коаксіальних циліндрів (діаметр 8–12 нм, довжина 1–4 мкм), поверхня яких вкрита гексагональною мережею з атомами вуглецю у вузлах — згорнутий шар графену [10], за концентрації <0,1 мг/мл не спричинюють значної токсичної дії на нормальні й трансформовані клітини. Ці БВНТ здатні адсорбуватися на поверхні мембрани або проникати внаслідок пасивної дифузії у ліпідний бішар і формувати трансмембранні пори [11]. У зв'язку з цим виникає питання щодо можливості нефармакологічної модуляції, зокрема спонтанної ритмоактивності гладеньких м'язів кишечника, унаслідок дії БВНТ. Така модуляція є важливим чинником для нормального функціонування системи травлення організму.

Матеріали і методи

Експерименти проводили на ізольованих гладеньких м'язах саесум самців щурів. Кільцеві смужки саесум (середній розмір

1×10 мм), очищені від слизової оболонки, розміщували у робочій камері об'ємом 2 мл з проточним розчином Кребса (швидкість протікання — 5 мл/хв), термостатованій при 37 °С. Мультиклітинному препарату надавали пасивного натягу (10 мН) і залишали на 1 год (до появи спонтанних скорочень постійної амплітуди і частоти). Реєстрацію скорочень гладенько-м'язових смужок (ГМС) проводили в ізометричному режимі за допомогою електромеханічного перетворювача 6МХ-1С (Росія), підключеного за мостовою схемою. Електричні сигнали з перетворювача подавали на один з каналів автоматичного самозаписувального пристрою Н-3021-3 (Росія).

У досліді використовували нормальний розчин Кребса (НРК) з концентрацією складових (ммоль/л): NaCl — 120,4; KCl — 5,9; NaHCO₃ — 15,5; NaH₂PO₄ — 1,2; MgCl₂ — 1,2; CaCl₂ — 2,5; глюкоза — 11,2; рН 7,4.

Високоочищені БВНТ та їх водну суспензію максимальної концентрації 1 мг/мл було отримано за методиками, детально описаними в роботі [7].

Стан БВНТ у воді контролювали за допомогою атомно-силового мікроскопа (АСМ; комерційна система Solver Pro M виробництва NT-MDT, Росія). Для цього на свіжосколену підкладку слюди наносили краплю водної суспензії БВНТ. АСМ-вимірювання проводили після повного випаровування розчинника. Візуалізацію зразків було здійснено в напівконтактному режимі з використанням АСМ-зондів типу NSG10 (NT-MDT).

Результати статистичного аналізу подавали як середнє арифметичне ± стандартна похибка середнього арифметичного ($n = 7$). Розбіжності між групами числових параметрів (контрольними та дослідними вимірами) вважали вірогідними за $P < 0,05$. Комп'ютерною версією методу статистичного аналізу з оцінюванням величини t-розподілу Стьюдента було програмне забезпечення Origin 5.

Результати і обговорення

Дані АСМ (рис. 1) свідчать про присутність у водній суспензії поодиноких ниткоподібних БВНТ завдовжки до 2 мкм. Мінімальний діаметр БВНТ становить 12 нм. У незначній кількості також присутні кластери, що містять декілька БВНТ (висота кластерів — 25–100 нм).

Амплітудно-частотні залежності спонтанних скорочень ізольованих ГМС саесум щурів досліджували за присутності в НРК БВНТ у розведеннях 1:1000, 1:100 та 1:50.

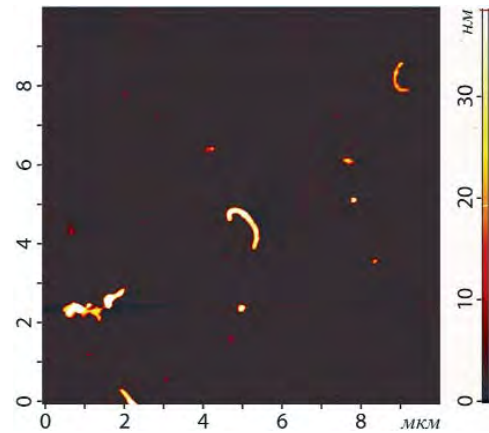


Рис. 1. АСМ-зображення багатостінних вуглецевих нанотрубок, осаджених з водної суспензії на підкладку слюди (напівконтактний режим): концентрація нанотрубок у воді 1 мг/мл

Перед початком аплікації суспензії БВНТ в НРК упродовж 30 хв проводили контрольні вимірювання амплітудно-частотної залежності спонтанних скорочень ГМС. Для виконання аналізу спонтанної скорочувальної активності ГМС формували групи скорочень, кількість яких у кожній становила 50. З'ясовано, що величина амплітуди скорочень у групах змінювалась у межах від 2 до 15 мН (для стандартних м'язових препаратів, що їх використовували в досліді). У зазначеному інтервалі амплітуд спостерігали їх розподіл за частотами з двома вірогідними максимумами: $(14,0 \pm 0,8)\%$ та $(8,6 \pm 0,5)\%$, $n = 7$, які відповідали амплітудам скорочень гладеньких м'язів 8 та 11 мН, відповідно (рис. 2, а). Аналогічний амплітудно-частотний розподіл було одержано в контрольних вимірюваннях спонтанної скоротливої активності м'язових препаратів упродовж 1,5–2 год. Отримані в контролі результати експериментальних досліджень добре узгоджуються з даними літератури [12, 13], згідно з якими спонтанні скорочення кільцевих гладеньких м'язів у товстому кишечнику щура бувають двох типів: низькоамплітудні з відносно високою частотою та високоамплітудні з меншою частотою.

Після контрольних вимірювань НРК заміняли на аналогічний, але зі вмістом БВНТ у розведенні 1:1000 (рис. 2, а). Реєстрацію спонтанних скорочень ГМС проводили починаючи з перших хвилин аплікації суспензії БВНТ, тривалість якої становила 15 хв. Результати експериментів показали, що порівняно з контролем має місце зміщення в групах амплітудного діапазону спонтанних скорочень м'язових препаратів з межами 5–18 мН. У цьому інтервалі, як і в контролі, відбувався розподіл амплітуд скорочень за

частотами з двома максимумами, один з яких за величиною та положенням практично збігався з контрольним, а другий — був зміщений в ділянку більших амплітуд скорочення (14 мН, що відповідало частоті $(18,8 \pm 1,0)\%$, $n = 7$). Відмивання ГМС упродовж 15–20 хв НРК супроводжувалось практично повним відновленням профілю розподілу амплітуд скорочень ГМС за частотами, який відповідав контрольному. Розрахунок частоти генерації спонтанних скорочень гладеньких м'язів за присутності в НРК БВНТ у розведенні 1:1 000 показали, що її усереднене значення $(13,0 \pm 0,7$ скорочень/хв, $n = 7$) статистично достовірно не відрізнялось від контролю $(13 \pm 1$ скорочень/хв, $n = 7)$. Відмивання ж препаратів НРК супроводжувалось незначним порівняно з контролем збільшенням цього параметра.

Далі проводили аплікацію НРК зі змістом БВНТ у розведенні 1:100. Спостерігали звуження меж, у яких відбувався розподіл амплітуд (3–13 мН, $n=7$), скорочення за їхніми частотами з трьома максимумами в положеннях 7, 10 та 12 мН ($n=7$) (рис. 2, б). Останні два максимума за своїми частотними характеристиками не відрізнялись між собою і були такого самого поряд-

ку, як і частотний максимум 14 мН для випадку застосування суспензії БВНТ у розведенні 1:1 000 (рис. 2, а). Відмивання ГМС НРК практично усувало спонтанні скорочення амплітудою 10 та 12 мН, але не забезпечувало відновлення профілю розподілу амплітуд за частотами до контролю. У зазначеному інтервалі найбільшу частоту мали скорочення з амплітудою 3 мН. Встановлено, що частота генерації спонтанних скорочень м'язових препаратів за присутності в НРК БВНТ у розведенні 1:100 порівняно з контролем зменшувалась і становила $8,0 \pm 0,6$ скорочень/хв, $n = 7$, $P < 0,05$. Подальше, порівняно з контролем, звуження меж амплітудного інтервалу (6–13 мН) відбувалося за повторної аплікації НРК зі змістом БВНТ у розведенні 1:100 (рис. 2, в). За цих умов більш ніж утричі, порівняно з контролем, зростала частота появи скорочень з амплітудою 13 мН, яка становила $70,0 \pm 5,5\%$, $n = 7$. Відмивання препаратів НРК повністю усувало скорочення з амплітудою, частота появи яких, як зазначалось вище, була максимальною. В інтервалі ж амплітуд скорочень ГМС 4–12 мН, $n = 7$, не спостерігалось відновлення їхнього профілю, який би відповідав контролю: макси-

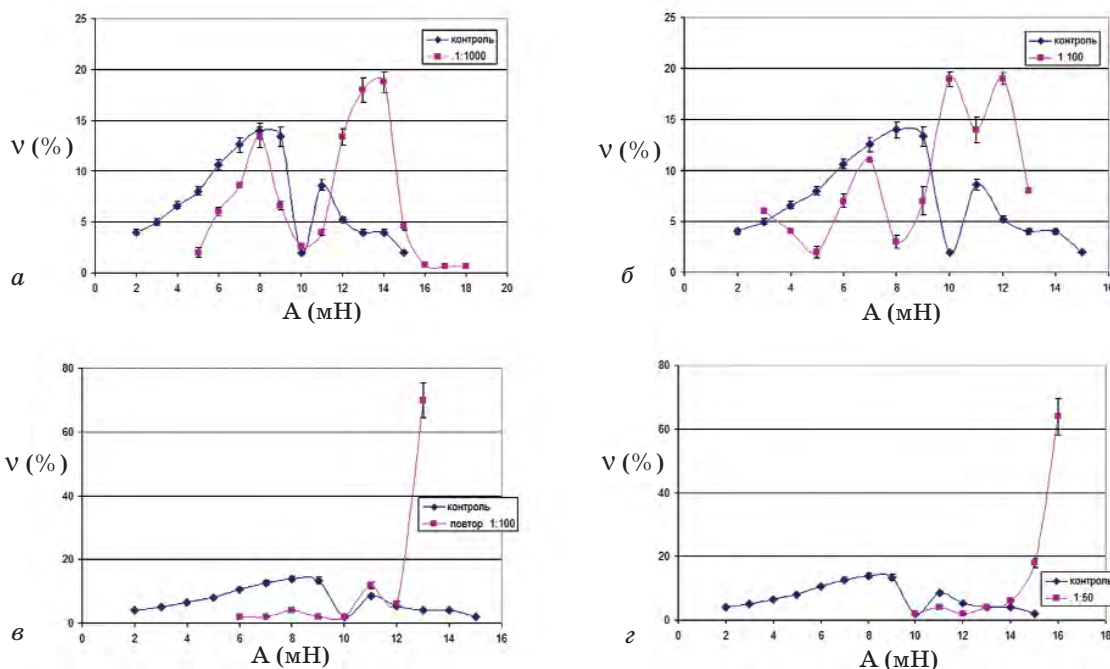


Рис. 2. Частотний (v) розподіл амплітуд (A) спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів саесум у контролі та за присутності в нормальному розчині Кребса багатостінних вуглецевих нанотрубок за різних розведеннь:

а — 1:1 000; б — 1:100 (за умов наступної аплікації, якій передувало відмивання м'язових смужок нормальним розчином Кребса); в — 1:100 (за умов повторної аплікації, якій передувало відмивання м'язових смужок нормальним розчином Кребса); г — 1:50 (за умов наступної аплікації, якій передувало відмивання м'язових смужок нормальним розчином Кребса). У всіх серіях експериментів $n = 7$.

Вихідна концентрація нанотрубок у воді — 1 мг/мл

мальну частоту мали скорочення з амплітудою 6 мН. Що стосується частоти генерації спонтанних скорочень, то їхня величина за аплікації суспензії БВНТ вірогідно зменшувалась відносно контролю і становила $8,0 \pm 1,5$ скорочень/хв, $n = 7$, $P < 0,05$, а в разі відмивання НРК цей параметр дещо перевищував контрольне значення. Максимальне звуження амплітудного інтервалу скорочень 10–16 мН, $n = 7$, порівняно з контролем, спостерігалось за наступної аплікації суспензії БВНТ у розведенні 1:50 (рис. 2, з). За цих умов частотний максимум відповідав скороченню з амплітудою 16 мН, частота генерації спонтанних скорочень ГМС зменшувалась, порівняно з контролем, майже удвічі і становила $7,0 \pm 0,7$ скорочень/хв, $n = 7$, $P < 0,05$. Відмивання ГМС НРК упродовж 15–20 хв відновлювало контрольний рівень цього параметра з незначним його перевищенням — $15,0 \pm 0,8$ скорочень/хв, $n = 7$, $P < 0,05$. Також мало місце розширення діапазону амплітуд скорочень 5–19 мН, $n = 7$, але не відбувалось відновлення їхнього амплітудно-частотного профілю (з найбільшою частотою продовжували реєструвати скорочення з амплітудою 17 мН).

Аналіз одержаних результатів свідчить, що суспензія БВНТ за концентрацій (10^{-4} — $2 \cdot 10^{-3}$) мг/мл, коли БВНТ не є цитотоксичними [7–9], здатна ефективно модулювати амплітуду та частоту спонтанних скорочень, а також частоту появи скорочень певної величини. Враховуючи дані [12–14] про те, що ключовими механізмами регуляції спонтанної скорочувальної активності гладеньких м'язів товстого кишечника щурів є зміни пейсмеркерної активності ІКК та процеси іонного транспорту в

ГМК, можна припустити, що саме вони є причиною встановлених в експериментах змін амплітудно-частотних характеристик скорочень саесум. Дійсно, згідно з вищезазначеними літературними джерелами, зміна амплітуди спонтанних скорочень свідчить про модифікацію ефективності функціонування ГМК, тимчасом як зміна їхньої частоти безпосередньо пов'язана з модифікацією клітин Кахаля, що й спостерігалось у дослідях за присутності суспензії БВНТ. У контексті цього важливими є врахування таких специфічних функціональних властивостей БВНТ, як адсорбція на клітинній мембрані або формування каналів провідності в ній [11].

Отже, спонтанні скорочення кільцевих гладеньких м'язів саесум характеризуються розподілом амплітуд скорочень за частотами: низькоамплітудні з відносно високою та високоамплітудні з низькою частотами.

За дії БВНТ (у розведеннях 1:1 000, 1:100 та 1:50 у НРК) на гладенькі м'язи відбувається звуження амплітудного діапазону та зміщення в ділянку більших його значень підсиленого амплітудно-частотного максимуму (АЧМ) скорочень. Відмивання ГМС НРК розширює амплітудний діапазон та усуває спричинене БВНТ у розведеннях 1:1 000 та 1:100 зміщення АЧМ, але не забезпечує відновлення контрольного розподілу амплітуд скорочення за частотами у разі дії БВНТ у розведеннях 1:100 та 1:50.

БВНТ у розведенні 1:1 000 у НРК не спричинює впливу на частоту генерації спонтанних скорочень гладеньких м'язів, водночас за розведень 1:100 та 1:50 відбувається зменшення цього параметра. В останньому разі зазначені зміни є незворотними.

ЛІТЕРАТУРА

1. Horiguchi K. Distribution of pacemaker function through the tunica muscularis of the canine gastric antrum // *J. Physiol.* — 2001. — V. 537. — P. 237–250.
2. Suzuki H. Involvement of intramuscular interstitial cells in nitroergic inhibition in the mouse gastric antrum // *Ibid.* — 2003. — V. 546, Pt. 3. — P. 751–763.
3. Komuro T. Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract // *Ibid.* — 2006. — V. 576, Pt. 3. — P. 653–658.
4. Ward S. M., Sanders K. M. Involvement of intramuscular interstitial cells of Cajal in neuroeffector transmission in the gastrointestinal tract // *Ibid.* — 2006. — V. 576, Pt. 3. — P. 675–682.
5. Прилуцька С. В., Ременяк О. В., Гончаренко Ю. В., Прилуцький Ю. І. Вуглецеві нанотрубки як новий клас матеріалів для нанобіотехнології // *Біотехнологія.* — 2009. — Т. 2, № 2. — С. 51–62.
6. Ротко Д. М., Прилуцька С. В., Богуцька К. І., Прилуцький Ю. І. Вуглецеві нанотрубки як новітні матеріали для нейроінженерії // Там само. — 2011. — Т. 4, № 5. — С. 9–24.
7. Prylutska S. V., Grynyuk I. I., Matyshevskaya O. P. et al. Estimation of multi-walled carbon nanotubes toxicity *in vitro* // *Physica E.* — 2008. — V. 40, N 7. — P. 2565–2569.
8. Prylutska S. V., Grynyuk I. I., Grebinyk S. M. et al. Comparative study of biological action of fullerenes C₆₀ and carbon nanotubes in thymus cells // *Mat. wiss. u. Werkstofftech.* — 2009. — V. 40, N 4. — P. 238–241.
9. Ременяк О. В., Прилуцька С. В., Прилуцький Ю. І., Матишевська О. П. Порівняльний аналіз цитотоксичності вуглецевих нанотрубок // *Доп. НАН України.* — 2010. — № 3. — С. 180–183.
10. Сагалянов І. Ю., Прилуцький Ю. І., Радченко Т. М., Татаренко В. А. Графенові системи:

- способи виготовлення й оброблення, структуроутворення та функціональні властивості // УФМ. — 2010. — Т. 11, № 1. — С. 95–138.
11. Ременяк О. В., Прилуцька С. В., Бичко А. В. та ін. Мембранотропна дія вуглецевих нанотрубок // Доп. НАН України. — 2009. — № 2. — С. 163–167.
 12. Kato T., Nakamura E., Imaeda K., Suzuki H. Modulation of the activity of two pacemakers by transmural nerve stimulation in circular smooth muscle preparations isolated from

- the rat proximal colon // J. Smooth Muscle Res. — 2009. — V. 45, N 6. — P. 249–268.
13. Huizinga J. D., Martz S., Gill V. et al. Two independent networks of interstitial cells of Cajal work cooperatively with the enteric nervous system to create colonic motor patterns // Front. Neurosci. — 2011. — V. 5. — P. 1–14.
 14. Pluja L., Ester Fernandez E., Jimenez M. Neural modulation of the cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle: putative role of ATP and NO // Br. J. Pharmacol. — 1999. — V. 126. — P. 883–892.

УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ КАК МОДУЛЯТОРЫ СПОНТАННОЙ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛАДКИХ МЫШЦ КИШЕЧНИКА

*Н. В. Меленевская¹, О. В. Цимбалюк¹,
О. В. Романенко², Т. Л. Давидовская¹,
Ю. И. Прилуцкий¹, В. В. Черепанов³,
О. А. Марченко³*

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології»
²Національний медичний університет ім. А. А. Богомольця, Київ
³Інститут фізики НАН України, Київ

E-mail: prylut@ukr.net

Тензометрическим методом в изометрическом режиме на изолированных гладкомышечных полосках саесис показано, что их спонтанная сократительная активность характеризуется распределением амплитуд сокращения по частотам. Установлено, что в присутствии многостенных углеродных нанотрубок в разведениях 1:1 000, 1:100 и 1:50 в нормальном растворе Кребса происходит сужение амплитудного диапазона спонтанных сокращений гладкомышечных полосок, их смещение в область больших значений амплитудно-частотного максимума, а также уменьшение частоты генерации для разведений 1:100 и 1:50. Отмывание мышечных препаратов в нормальном растворе Кребса расширяет амплитудный диапазон сокращений, устраняет вызванные многостенными углеродными нанотрубками в разведениях 1:1 000 и 1:100 сдвиг и усиление амплитудно-частотного максимума сокращений гладких мышц, но не обеспечивает восстановление контрольного профиля распределения амплитуды сокращений по частотам, кроме случая присутствия нанотрубок в нормальном растворе Кребса в разведении 1:1 000. Изменения спонтанной сократительной активности гладкомышечных полосок, вызванные многостенными углеродными нанотрубками в разведении 1:50, необратимы.

Ключевые слова: многостенные углеродные нанотрубки, гладкие мышцы, спонтанные сокращения.

CARBON NANOTUBES AS THE MODULATORS OF SPONTANEOUS CONTRACTING ACTIVITY OF INTESTINAL SMOOTH MUSCLES

*N. V. Melenevska¹, O. V. Tsybalyuk¹,
O. V. Romanenko², T. L. Davydovska¹,
Yu. I. Prylutskyi¹, V. V. Cherepanov³,
O. A. Marchenko³*

¹ESC «Institute of Biology», Kyiv National Taras Shevchenko University
²Bogomolets National Medical University, Kyiv
³Institute of Physics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: prylut@ukr.net

By use the tensometrical method in the isometric condition on the isolated caecum smooth muscle strips it is shown that their spontaneous contracting activity is characterized by the amplitude distribution of contractions on the frequencies. It is established that in the presence of multi-walled carbon nanotubes in the dilutions of 1:1000, 1:100 and 1:50 in the normal Krebs solution the narrowing of the amplitude range of smooth muscle strips spontaneous contractions, their displacement in the region of large values for amplitude-frequency maximum, and also decreasing of generation frequency for the 1:100 and 1:50 dilutions take place. The washing of muscular preparations in normal Krebs solution expands the amplitude range of contractions, removes, caused by multi-walled carbon nanotubes in the dilutions of 1:1000 and 1:100, the shift and strengthening of amplitude-frequency maximum smooth muscle contractions, but does not ensure the restoration of the control profile for the amplitude distribution of contractions on the frequencies, except the case of presence multi-walled carbon nanotubes in normal Krebs solution in dilution of 1:1000. The changes in the spontaneous contracting activity of smooth muscle strips, caused by multi-walled carbon nanotubes in a dilution of 1:50, are not irreversible.

Key words: multi-walled carbon nanotubes, smooth muscles, spontaneous contractions.