

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка



ЦИМБАЛЮК Ольга Володимирівна

УДК 577.24/352.4

**БІОФІЗИЧНІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ НАНОРОЗМІРНИХ МАТЕРІАЛІВ НА
МЕХАНОКІНЕТИКУ ВІСЦЕРАЛЬНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ**

03.00.02 – біофізика

Автореферат дисертації
на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Київському національному університеті імені Тараса Шевченка Міністерства освіти і науки України

Науковий консультант: академік НАН України,
доктор біологічних наук, професор
Костерін Сергій Олексійович,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
заступник директора з наукової роботи,
завідувач відділу біохімії м'язів

Офіційні опоненти: академік НАН України,
доктор біологічних наук, професор
Веселовський Микола Сергійович,
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН
України, заступник директора з наукової роботи,
завідувач відділу фізіології нейронних мереж

член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор
Ємець Алла Іванівна,
Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН
України, завідувач відділу клітинної біології та
біотехнології

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Бабський Андрій Мирославович,
Львівський національний університет
імені Івана Франка МОН України, завідувач кафедри
біофізики та біоінформатики

Захист відбудеться «26» лютого 2020 р. о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38 Київського національного університету імені Тараса Шевченка (м. Київ, проспект Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434).

Поштова адреса: 01033 м. Київ, вул. Володимирська, 64

З дисертацією можна ознайомитися у Науковій бібліотеці імені М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка (м. Київ, вул. Володимирська, 58, зал № 12).

Автореферат розісланий « 23 » січня 2020 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
доктор біологічних наук

К.О. Дворченко

ВСТУП

Актуальність теми. Функціонування гладеньких м'язів (ГМ) у значній мірі залежить від механічних і термомеханічних властивостей: м'язові препарати здатні змінювати довжину у відповідь на фізико-хімічні та фармакологічні стимули, активно модулюючи при цьому напруження [Quigley E., 2004; Sanders K.M., 2012, 2016, 2019]. Отже, термомеханокінетичні властивості вісцеральних ГМ, зокрема шлунково-кишкового тракту (ШКТ), у значній мірі визначають нормальну діяльність травної системи і потребують детального дослідження. Вивчення кінетики скорочення-розслаблення і термодинаміки високоеластичної деформації ГМ необхідне для розуміння біофізичних механізмів його функціонування як високоефективного механохімічного двигуна. Механокінетичні параметри м'язового шару стінок вісцеральних органів можуть бути застосовні для діагностування дисфункційних порушень, індукованих, зокрема, нанорозмірними ксенобіотиками [Kreis M.E., 2002; Schwizer W., 2002; Chiooss G., 1012; Gregersen H., 2018].

Сучасні технології у медицині та різних галузях промисловості передбачають інтенсивну розробку та впровадження наноматеріалів і супрамолекулярних речовин [Jie J. Yao, 2017; Trovato M.C., 2018]. Відповідно, це створює передумови інтенсивного проникнення цих сполук у організм людини, а також їх накопичення в різних органах і тканинах та включення у метаболізм. Нанорозмірні ксенобіотики можуть проникати в організм людини різними способами (зокрема, через дихальні шляхи і порожнисті органи ШКТ та трансдермально), головним з них є ШКТ [Song Y., 2014; Missaoui W.N., 2018]. Натепер отримано великий обсяг даних медико-біологічних досліджень, які стосуються вивчення біологічної активності нанорозмірних матеріалів, зокрема, нанотрубок, фулеренів, каліксаренів, квантових точок, наночастинок оксидів металів тощо. Серед ксенобіотиків, фармако-токсикологічне навантаження яких на організм людини в останні десятиріччя набуло загрозливих меж, одне з перших місць посідає наноматеріал діоксиду титану. TiO_2 – за обсягом виробництва і використання найбільш вживаний промисловий барвник білого кольору. Зокрема, він широко застосовується для надання забарвлення харчовим продуктам, косметичним і гігієнічним засобам, наномедичним реактивам, фармацевтичним препаратам [Weir A., 2012; Chen Z., 2015; Fadeel B., 2017; Proquin H., 2018, 2019].

Перспективною основою для створення фармакологічних засобів нового покоління зі спрямованою, вибірковою і оборотною дією на окремі системи клітини, є каліксарени – нанорозмірні макроциклічні сполуки, які синтезують прецизійною циклоконденсацією пара-заміщених фенолів і формальдегіду [Rodik R.V., 2009, 2012; Naseer M.M., 2017; Kalchenko V.I. 2005, 2008, 2012, 2016, 2017, 2019]. Натепер світовими дослідницькими центрами накопичено великий обсяг даних щодо біологічної активності калікс[4]аренів. Так, маються на увазі дослідження, що проводяться в Інституті органічної хімії (академік НАН України В.І. Кальченко) та Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна (академік НАН України С.О. Костерін) НАН України. Зокрема, в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН було детально досліджено вибрані калікс[4]арени, для окремих з них на

моделях *in vitro* встановлена селективна, високоафінна дія щодо вибраних клітинних ензимів (зокрема, АТФ-ази міозину) та іон-транспортувальних систем плазматичної мембрани (ПМ): мова йде за калікс[4]арени з шифрами С-99, С-97, С-107 – на Na^+ , K^+ -АТФ-азу, а С-90 і С-716 – на Ca^{2+} -АТФ-азу ПМ [Kosterin S.O., 2013, 2016, 2019; Veklich T.O., 2010, 2016].

Отже, дослідження біофізичних механізмів дії вищезазначених нанорозмірних матеріалів на механокінетичні властивості вісцеральних ГМ є суттєвим як у фундаментальному, так і в практичному аспекті.

Зв'язок роботи з науково-дослідною тематикою кафедри. Дисертаційна робота виконана в рамках тем наукових досліджень кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій (№ держреєстрації 11БФ07-03 і 16БФ07-03) та кафедри біофізики ННЦ «Інститут біології та медицини» (№ держреєстрації 01БФ036-07) Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у встановленні механокінетичних і термодинамічних закономірностей функціонування вісцеральних ГМ та впливу на їхнє скорочення та високоеластичну деформацію нанорозмірних матеріалів (наночастинок TiO_2 і калікс[4]аренів – інгібіторів систем первинного активного іонного транспорту ПМ).

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити завдання:

1. Вивчити кінетичні закономірності спонтанної скорочувальної активності вісцеральних ГМ, а також процесів їх скорочення-розслаблення, активованих за різними шляхами спряження збудження та скорочення (K^+ -індукованою деполяризацією, нейромедіаторами і агоністами рецепторів).
2. Дослідити термодинамічні властивості високоеластичної деформації ГМ ШКТ.
3. Визначити закономірності та механізми дії нанорозмірного матеріалу TiO_2 на функціонування вісцеральних ГМ за умов впливу *in vitro*.
4. Встановити закономірності дії нанорозмірного матеріалу TiO_2 на функціонування вісцеральних ГМ в умовах тривалого перебування в організмі *in vivo*.
5. Вивчити закономірності та окремі механізми модуляції калікс[4]аренами – інгібіторами Na^+ , K^+ -АТФ-ази ПМ (С-99 і С-107) - процесів скорочення-розслаблення вісцеральних ГМ за дії зазначених макроциклічних сполук в умовах *in vitro*.
6. Визначити закономірності дії калікс[4]арену С-107 та його структурного фрагменту М-3 на процеси скорочення-розслаблення вісцеральних ГМ за умов хронічного перебування в організмі *in vivo*.
7. Дослідити закономірності та окремі механізми модуляції процесів скорочення-розслаблення вісцеральних ГМ калікс[4]аренами - інгібіторами Ca^{2+} -помпи ПМ (С-90 і С-716) в умовах впливу *in vitro*.

Об'єкт дослідження: механокінетичні і термодинамічні властивості, а також функціональна активність вісцеральних ГМ у нормі та при її модуляції нанорозмірними ксенобіотиками (калікс[4]аренами і наночастинками TiO_2).

Предмет дослідження: механізми модуляції термомеханокінетичних параметрів скорочувальної активності вісцеральних ГМ вибраними нанорозмірними матеріалами (наночастинками TiO_2 та калікс[4]аренами С-90, С-99, С-107 і С-716) в умовах їх колоткочасової дії на препарати м'язів (*in vitro*) та тривалого перебування в організмі (*in vivo*).

Методи досліджень. Для досягнення мети використовували біофізичні, біохімічні, фізіологічні, комп'ютерного моделювання і докінгу, статистично-математичні та кінетичні методи, а також метод електронної мікроскопії і метод визначення дзета-потенціалу. Зокрема, для дослідження скорочувальної активності використовували тензометричне устаткування, яке передбачало можливість реєстрації скорочувальної активності одночасно двох м'язових препаратів: у ізометричному та ізотонічному режимах реєстрації. Для характеризування наночастинок TiO_2 використовували метод скануючої електронної мікроскопії (скануючий електронний мікроскоп TescanMira 3 LMU), дзета-потенціал суспензії наночастинок TiO_2 вимірювали із використанням обладнання «Zetasizer Nano ZS». Елементний аналіз тканин здійснювали методом атомно-емісійної спектроскопії із використанням атомно-емісійного спектрометра AES Shimadzu ICPE-9000. ПМ клітин печінки виділяли методом ультрацентрифугування у градієнті щільності сахарози [Song C.S. et al., 1962]; концентрацію білка у препаратах визначали за методом Lowry et al. (1951). АТФ-азні активності визначали за кількістю неорганічного фосфату, що виділився в процесі ферментативної реакції, визначали за методом Rathbun, Betlach (1969). Просторові структури метаботропних рецепторів було взято з бази даних Protein Data Bank. Пошук і аналіз сайтів взаємодії метаботропних рецепторів з нано- TiO_2 здійснювали за допомогою серверу PatchDock, алгоритм молекулярного докінгу на основі геометрії; візуалізацію та аналіз контактних поверхонь здійснювали за допомогою програмного забезпечення Discovery Studio Visualizer.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі вперше проведено комплексне дослідження кінетичних і термодинамічних властивостей вісцеральних ГМ в умовах дії на них окремих нанорозмірних матеріалів (наночастинок TiO_2 , а також калікс[4]аренів – інгібіторів первинного активного іонного транспорту ПМ). Було вперше встановлено термодинамічні закономірності високоеластичної деформації ГМ ШКТ щурів, визначено залежності термодинамічних показників від ступеня деформації.

Вперше досліджено закономірності та механізми дії на вісцеральні ГМ щурів нанорозмірного матеріалу TiO_2 трьох розмірних груп, які містять різні співвідношення сумішей поліморфів рутилу і анатазу. Встановлено, що нано- TiO_2 є ефективним модулятором спонтанної і викликанної скорочувальної активності ГМ ШКТ і міометрія. Зокрема, вперше виявлено, що TiO_2 модулює пресинаптичні і постсинаптичні механізми регуляції скорочення ГМ шлунку за участі ацетилхолінових, гістамінових, а також ГАМК-рецепторів. Встановлено, що блокування роботи дихального ланцюга мітохондрій усуває ефекти TiO_2 на ацетилхолін-викликані скорочення ГМ ШКТ. У міометрії TiO_2 усуває ефекти блокування АТФ-чутливих K^+ -каналів. Дослідженнями *in silico* встановлено, що

нанорозмірний матеріал TiO_2 здатний взаємодіяти з різною спорідненістю із сайтами позаклітинної частини метаболічних рецепторів. Вперше термодинамічним аналізом показано, що в умовах тривалого впливу *in vivo* TiO_2 спричиняє суттєві зміни процесів високоеластичної деформації у ГМ шлунку.

Вперше встановлено, що калікс[4]арени-інгібітори Na^+, K^+ -АТФази ПМ (з шифрами С-99 і С-107) модулюють скорочувальну активність ГМ товстого кишечника і міометрія щурів. Показано, що калікс[4]арен С-107 в умовах хронічного впливу *in vivo* зберігає інгібіторні властивості щодо Na^+, K^+ -АТФ-азної активності ПМ, а також здатність до змін скорочувальної функції ГМ.

Вперше виявлено здатність калікс[4]аренів-інгібіторів Ca^{2+} -помпи ПМ (з шифрами С-90 і С-716) змінювати механокінетичні параметри спонтанних і викликаних скорочень товстого кишечника і міометрія щурів. Встановлено, що блокування синтаз оксиду азоту усуває пригнічення сили фазних K^+ - і окситоциновикликаних скорочень калікс[4]ареном С-90, але не впливає на механокінетику розслаблення ГМ.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати та їхня інтерпретація розширюють і поглиблюють знання про механізми узгодження окремих параметрів спонтанних і викликаних різними ефекторами (K^+ -деполяризацією ПМ, нейромедіаторами, гормонами і агоністами) скорочувальних реакцій вісцеральних ГМ, а також деформаційних процесів у тканині ГМ шлунку, тому вони мають фундаментально-теоретичне значення і є необхідними для пояснення причин виникнення і розвитку патологій м'язових стінок ШКТ, пов'язаних з дією нанорозмірних ксенобіотиків, зокрема оксидів металів. Крім того, результати роботи можуть бути використані для покращення санітарних норм використання барвника діоксиду титану, у зв'язку з чим вони мають важливе значення також для гігієни і санітарії.

Результати вивчення закономірностей і механізмів дії калікс[4]аренів – інгібіторів первинного активного іонного транспорту ПМ можуть бути використані для розробки лікарських засобів нового покоління для спрямованої модуляції патологічних станів вісцеральних органів людини, зокрема, при захворюваннях, які супроводжуються гіпоацидністю шлунку, та порушеннях пологової діяльності у породіль.

Результати дисертаційної роботи впроваджені в педагогічний процес кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій і кафедри медичної радіофізики факультету радіофізики, електроніки та комп'ютерних систем Київського національного університету імені Тараса Шевченка та використовуються під час читання навчальних курсів: «Основи молекулярної фізіології та біохімії», «Міжклітинні взаємодії», «Фізіологія та анатомія людини і тварин», «Методи кінетичного аналізу в біології», «Основи молекулярної фармакології», «Статистичні методи в біології». Вони можуть бути використані для підготовки спеціалістів медико-біологічного профілю у вищих навчальних закладах України.

Особистий внесок здобувача. Здобувач є автором усіх наукових ідей, покладених в основу дисертаційної роботи. Нею здійснене планування

експериментів, підбір та адаптація методів експериментальних та теоретичних досліджень, опрацювання та обговорення результатів, формулювання висновків дисертації. Усі експериментальні дослідження проведені автором особисто; в окремих із них приймали участь співавтори публікацій – О.В. Шелюк, А.М. Науменко, К.І. Богуцька. Електронно-мікроскопічні дослідження здійснені за допомоги М.А. Скорики. Визначення дзета-потенціалу суспензії наночастинок та проведення елементного аналізу методом атомно-емісійної спектроскопії проведені автором за допомоги О.О. Роговцова. У обговоренні результатів приймали участь співавтори публікацій. Аналіз основних результатів здійснено спільно з науковим консультантом академіком НАН України С.О. Костериним.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень та основні положення, які включені до дисертації, були представлені на: XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства (Львів, 2015); IV, VI, V та VII з'їздах Українського біофізичного товариства (Донецьк, 2006; Луцьк, 2009; Луцьк 2011; Луцьк; 2015; Київ; 2018); IX, X, XI Українському біохімічному з'їздах (Харків, 2006; Одеса, 2010; Київ; 2014); III і XI Міжнародних науково-практичних конференціях «Молодь та поступ в біології» (Львів, 2007, 2015, 2019); V Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна. Сучасний стан науки: досягнення, проблеми та перспективи розвитку» (Київ, 2007); Vth International Symposium «Supramolecular Systems in Chemistry and Biology» (Київ, 2009); Міжнародних науково-практичних конференціях «Біологічно активні речовини» (Новий Світ, 2011; Новий Світ, 2013) та «Адаптационные стратегии живых систем» (Новий Світ, 2012); III та IV International Symposium: Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design (Pushchino, 2010; Pushchino, 2012); Advances in Pharmacology and Pathology of the Digestive Tract – 2012 (4th International Scientific Conference) (Kyiv, 2012); IV, V і VI міжнародних конференціях «Медицина фізика – сучасний стан, проблеми, шляхи розвитку. Новітні технології» (Київ, 2014, 2015); IV, V і VI Міжнародних науково-практичних конференціях «Нанотехнології та наноматеріали» (Львів, 2016; Чернівці, 2017; Київ, 2018); XV International scientific conference for students and PhD students. «Youth and progress of biology», dedicated to the 135th anniversary of J. O. Parnas (Львів, 2019), а також на щорічних звітних конференціях Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка (2013-2018 рр.), на наукових семінарах Інституту високих технологій (2014 і 2019 рр.) та на науковому семінарі ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у червні 2019 р.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 54 наукові праці, з яких 29 – статті у фахових виданнях (з них 8 статей у виданнях, які входять до міжнародних наукометричних баз даних SCOPUS та Web of Science); 25 матеріалів і тез доповідей на наукових конференціях.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їхнього обговорення (7 розділів), узагальнення, висновків та списку використаних джерел з 651 найменування. Робота викладена на 449 сторінках (основна частина на 284

сторінках), ілюстрована 125 рисунками і 14 таблицями.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проводили на нелінійних білих щурах популяції віварію Київського національного університету імені Тараса Шевченка, а також щурах лінії Wistar популяції віварію ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Усі експерименти за участі тварин проводили у відповідності до Гельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по біоетиці та правах людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою у 1997 році у м. Ов'єдо (Іспанія) та підписаною Верховною Радою України у 2002 році, Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (висновок комісії з питань біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка № 3 від 2 травня 2019 року).

Для реєстрації спонтанної та викликанної скорочувальної активності, а також ізотонічної зміни довжини препаратів ГМ використовували тензометричне устаткування, яке передбачало можливість реєстрації скорочувальної активності одночасно двох м'язових препаратів: у ізометричному та ізотонічному режимах реєстрації. Препаративні процедури підготовки багатоклітинних препаратів (смужок) ГМ залежали від їх приналежності до окремих органів. М'язи травного тракту (антрального відділу шлунку (*antrum*), сліпої кишки (*caecum*), дистального відділу ободової кишки (*colon*)) попередньо під бінокулярним мікроскопом за допомогою мікроінструментів для очних операцій очищували від слизової оболонки та нарізали у потрібному напрямку розміщення м'язових волокон (зазвичай та якщо не вказано окремо, експерименти проводили на кільцевих м'язах) на смужки (2x10 мм). Скорочувальну активність ГМ рогів матки досліджували на препаратах, для приготування яких роги матки розрізали у поздовжньому напрямку на смужки (2x10 мм), залишаючи ендотеліальний шар інтактним; у випадку необхідності вивчення спонтанних скорочень перевагу віддавали фрагментам рогів з боку яєчників.

У дослідженнях використовували комерційні препарати наночастинок TiO_2 (PlasmaChem GmbH, D-12489 Berlin, Germany) у формі нанопорошків: рутил (середній розмір 1-3 нм); анатаз (середній розмір 4-8 нм); суміш рутилу і анатазу P25 (середній розмір 21 ± 5 нм), питома поверхня (50 ± 10) $\text{m}^2/\text{г}$; чистота > 99.5 %, вміст $\text{Al}_2\text{O}_3 < 0.3$ мас.%; $\text{SiO}_2 < 0.2$ мас. %.

Визначення середнього розміру наночастинок TiO_2 здійснювали методом електронної мікроскопії із використанням скануючого електронного мікроскопу TescanMira 3 LMU (обладнання «НаноМедТех», м. Київ). Дзета-потенціал суспензії наночастинок TiO_2 вимірювали із використанням обладнання «Zetasizer Nano ZS» (Malvern, обладнання «НаноМедТех»). Якісний та кількісний елементний аналіз тканин здійснювали методом атомно-емісійної спектроскопії

із використанням атомно-емісійного спектрометра AES Shimadzu ICPE-9000 (обладнання «НаноМедТех»).

У роботі було здійснено дослідження закономірностей та механізмів дії на вісцеральні ГМ окремих калікс[4]аренів з шифрами:

- ~ С-99 (біс-гідроксилметилфосфонова кислота (5,17-біс(дигідрокси-фосфонілметил)-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен));
- ~ С-107 (каліксаренамінофосфонова кислота (5,17-ди(фосфоно-2-піридил-метил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс-[4]-арен));
- ~ С-716 (5,17-ди(трифтор)метил(фенілсульфаніліміно)-метиламіно-11,23-ди-трет-бутил-25,27-дипропоксикалікс[4]арен);
- ~ С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,26,27,28-тетрапропоскі-калікс[4]арен);
- ~ фрагмент М-3 – 4-гідроксианіліно-(2-піридил)метил-фосфонова кислота.

Усі калікс[4]арени були синтезовані та охарактеризовані методом ЯМР і ІЧС у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України під керівництвом академіка НАН України, проф. В.І. Кальченка та люб'язно надані нам для досліджень.

Аналіз кінетичних параметрів спонтанної скорочувальної активності ГМ здійснювали відповідно до [Nasibyan L.S., Filippov I.B., 2014]. Механокінетичний аналіз процесів скорочення-розслаблення ГМ проводили окремо на рівні фаз скорочення та розслаблення повної механокінетичної кривої із використанням модифікованого методу Костеріна-Бурдиги [Burdyga Th.V., Kosterin S.A., 1991]. Розрахунок нормованих на амплітуду f_m максимальних швидкостей V_n фаз скорочення і розслаблення здійснювали за формулою:

$$V_n = \frac{(n-1)^{\frac{n-1}{n}} \cdot (n+1)^{\frac{n+1}{n}}}{4n\tau},$$

де τ – характеристичний час (момент часу, в яких миттєва сила дорівнює половинному значенню максимальної сили f_m ; n – логарифмічний декремент крутизни фаз наростання та спаду сили f механокінетичної кривої, тобто $n = d\{\ln[(f_m-f)/f]\}/dt$.

ПМ клітин печінки з підвищеним вмістом фракції мембран жовчних протоків виділяли методом ультрацентрифугування у градієнті щільності сахарози з деякими модифікаціями [Song C. S. et al., 1969]. Концентрацію білка у препаратах ПМ визначали за методом Lowry [Lowry O.H. et al., 1951].

АТФазні активності препаратів ПМ оцінювали за різницею вмісту неорганічного фосфату (P_n) у різних середовищах після інкубації, концентрацію якого визначали за методом Rathbun, Betlach [Rathbun W.B., Betlach M.V., 1969].

Для комп'ютерних експериментів було проведено конструювання тривимірної структури наночастинки TiO_2 ; за основу взято дані та методологію Qazi Mohd. S. J. [Qazi Mohd. S. J., 2014]. Структуру наночастинки сконструйовано та вдосконалено за допомогою програмного забезпечення Discovery Studio Visualizer версій 2.0 та 2.5 (Accelrys Software Inc, accelrys.com) з урахуванням

даних кристалографії анатазу. Просторові структури метаботропних рецепторів (мускаринових ацетилхолінових рецепторів M_2 - та M_3 -підтипу, гістамінових H_1 -рецепторів та ГАМК_B-рецепторів було взято з бази даних Protein Data Bank. Пошук і аналіз сайтів взаємодії рецепторів з TiO_2 здійснювали за допомогою PatchDock (bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/).

Статистично-математичне опрацювання даних здійснювали з використанням програм OriginPro8 та Statistica 7.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

1. Дослідження механокінетичних властивостей процесів скорочення-розслаблення спонтанних і викликаних різними ефекторами скорочувальних реакцій, а також термодинамічних властивостей високоеластичної деформації вісцеральних гладеньких м'язів

Скорочувальна активність. Механокінетику спонтанної скорочувальної активності характеризували за параметрами, які визначали на фрагменті механограми за 10 хв. Ці параметри умовно поєднували у три групи: частотно-амплітудні (кількість скорочень упродовж 10 хв.; середня амплітуда скорочень), усереднені значення кінетичних параметрів поодиноких циклів скорочення-розслаблення (тривалість циклу скорочення-розслаблення (скоротливого акту); тривалість пауз між скоротливими актами; тривалість фази скорочення; тривалість фаз розслаблення; коефіцієнт асиметрії (відношення тривалості фази скорочення до тривалості фази розслаблення); скоротливий цикл (тривалість скоротливого акту та паузи після нього); індекс активності скорочень (відношення тривалості скоротливого акту до тривалості пауз між ними); середня швидкість наростання фази скорочення, f_{max}/t ; максимальна швидкість наростання сили скорочення, $V_{max, c}$; максимальна швидкість спаду сили при розслабленні, $V_{max, r}$) та показники загальної ефективності скорочувальної активності ГМ (показник скоротливого індексу в одиницях Монтевідео (MU – добуток середньої амплітуди та на середньої частоти скорочень за 10 хв.); показник скоротливого індексу в Олександрійських одиницях (AU – добуток MU на середню тривалість циклу скорочення-розслаблення). На препаратах ГМ *antrum*, *colon* і міометрія щурів показано, що зазначені параметри є «паспортними» для скорочувальної активності, чутливими до зміни фізико-хімічних параметрів середовища, та можуть бути вдало використані для передбачення окремих ланок впливу фармакологічних чинників та ксенобіотиків на ці тканини.

Викликані (а також в окремих випадках спонтанні) скорочення препаратів вісцеральних ГМ також характеризували із застосуванням методу механокінетичного аналізу Костеріна-Бурдиги [Burdyga Th.V., Kosterin S.A., 1991], який зводиться до розрахунку незалежних від амплітуди скорочувальних нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення (відповідно, V_{nc} та V_{nr}). Даний метод початково був розроблений і застосований лише для аналізу спаду м'язового напруження та зниження Ca^{2+} -сигналу суспензії міоцитів, із розрахунком V_{nr} . Нами було впроваджено його використання для розрахунку V_{nc} , а також застосовано до кінетичних кривих суперпреципітації

актоміозину. Даним методом нами охарактеризовано викликані (K^+ -індукованою деполаризацією, нейромедіаторами і фармакологічно-активними речовинами: ацетилхоліном, гістаміном, нікотинном, брадикініном) скорочення ГМ шлунку і товстого кишечника, а також спонтанні і викликані (K^+ -індукованою деполаризацією, нейромедіатором ацетилхоліном і утеротонічним гормоном окситоцином) поздовжніх ГМ міометрія (табл. 1). Вивчено закономірності та механізми впливу (а також модуляції параметрів V_{nc} і V_{nr}) фізико-хімічних та фармакологічних факторів (зміни концентрації іонів Na^+ і Mg^{2+} , температури, електромагнітних випромінювань, блокування потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів L-типу і Na^+ , K^+ -АТФ-ази ПМ, брадикінінових рецепторів) на агоніст-викликані скорочення кільцевих ГМ шлунку і товстого кишечника. Отримані нами дані вказують на чутливість параметрів V_{nc} та V_{nr} до дії фізико-хімічних факторів, ксенобіотиків та їх корисність для аналізу клітинних механізмів дії цих сполук.

Таблиця 1

Нормовані максимальні швидкості фаз скорочення (V_{nc} , xv^{-1}) та розслаблення (V_{nr} , xv^{-1}) викликаних різними активаторами скорочувальних відповідей вісцеральних гладеньких м'язів щурів ($M \pm m$, $n=6-25$)

М'язи	Активатор скорочення	Нормована максимальна швидкість, xv^{-1}	
		V_{nc}	V_{nr}
Саесит, кільцеві	Гіперкалієвий розчин (80 мМ)	$6,93 \pm 0,37$	$2,26 \pm 0,08$
	Ацетилхолін (10^{-5} М)	$10,36 \pm 0,61$	$1,88 \pm 0,10$
Шлунок, кільцеві	Гіперкалієвий розчин (80 мМ)	$5,69 \pm 0,47$	$1,33 \pm 0,11$
	Ацетилхолін (10^{-5} М)	$7,65 \pm 0,60$	$2,13 \pm 0,20$
	Гістамін (10^{-5} М)	$4,75 \pm 0,54$	$2,27 \pm 0,31$
	Брадикінін (10^{-5} М)	$0,61 \pm 0,11$	$1,21 \pm 0,30$
Міометрій, поздовжні	Спонтанні скорочення	$8,42 \pm 0,39$	$3,13 \pm 0,18$
	Гіперкалієвий розчин (80 мМ)	$4,03 \pm 0,54$	$0,52 \pm 0,06$
	Окситоцин (0,1 МО)	$3,31 \pm 0,59$	$0,23 \pm 0,05$
	Ацетилхолін (10^{-5} М)	$3,67 \pm 0,47$	$0,24 \pm 0,13$

Термодинаміка високоеластичної деформації ГМ ШКТ щурів. Функціонування травної системи в значній мірі обумовлюються механічними та термомеханічними властивостями ГМ, які формують стінки органів ШКТ. Для встановлення термомеханокінетичних властивостей ГМ ШКТ нами було здійснено кількісний аналіз температурних ефектів на механокінетичних кривих «деформація-час» (за фіксованих навантажень) та кривих «навантаження-деформація» (при постійному та градуально зростаючому навантаженні) препаратів кільцевих ГМ *antrum*. Встановлено, що величина відносної деформації препаратів (ΔL) – температуро-залежний показник, найбільші значення якого спостерігаються за фізіологічно значущих температур, тоді як температурні зсуви в бік помірного охолодження або нагрівання його знижують. Так, цей показник із підвищенням температури (від 22 °С до 37 °С збільшувався у середньому на 23% ($n=5-9$, $p<0.05$). Підвищення температури до 48°С викликало його зменшення у середньому на 27% порівняно зі значенням, яке спостерігалось при 37°С ($n=5-9$, $p<0.05$). Розрахунок відносної зміни середніх значень коефіцієнту жорсткості

(dP/dL) виявив, що як помірне охолодження ГМ шлунку (22°C), так і їх нагрівання (48°C) викликає його підвищення в межах близько 34% порівняно зі значенням при 37°C ($n=5-9$, $p<0.05$). Втім, не надто велика термочутливість високоеластичної деформації ГМ вказує на те, що у фізичному сенсі у цьому процесі переважає пасивна складова [Burdyga Th., 2002; Quigley E. M., 2004].

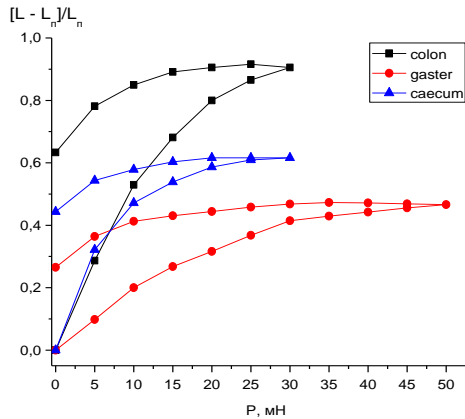


Рис. 1. Криві гістерезису вантаж-деформація у випадку ступінчатого навантаження та розвантаження гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щурів: ободової кишки (*colon*), сліпої кишки (*caecum*) та шлунку (*gaster*) (фіксований час прикладання навантажень 1 хв). На рисунку подані усереднені тренди ($n=5-9$).

Нами було проаналізовано термомеханокінетичні закономірності навантаження-індукованих деформації та релаксації (криві гістерезису) препаратів кільцевих ГМ *colon* та *caecum* (рис. 1). Запропоновано та апробовано математичний феноменологічний опис кривих гістерезису (рівняння (1) і (2)) м'язів із застосуванням кількісних параметрів: силових констант k_1 та k_2 (для навантаження та розвантаження відповідно); показників $P_{1/2,c}$ (таке значення навантаження, яке спричиняє напівмаксимальну деформацію препарату) та $P_{1/2,r}$ (значення залишкового навантаження, при якому спостерігається половинне відновлення довжини препаратів) (табл. 2).

$$\Delta L = \Delta L_{\max} (1 - e^{-k_1 \cdot P}) \quad (1)$$

$$\Delta L = \Delta L_0 + (\Delta L_{\max} - \Delta L_0) \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot P}) \quad (2)$$

де: ΔL_{\max} – величина максимальної деформації препарату, ΔL_0 – величина залишкової деформації після повного розвантаження препарату, k – силові константи процесу деформації (k_1 – для навантаження, k_2 – для розвантаження), P – величина вантажу.

Фрагменти петлі гістерезису, які описуються рівняннями (1) і (2), лінеаризуються у координатах $[\ln \frac{\Delta L_{\max} - \Delta L}{\Delta L_{\max}}]; P]$ та $[\ln \frac{\Delta L_{\max} - \Delta L}{\Delta L_{\max} - \Delta L_0}; P]$ ($r = 0.96-0.97$). Повний цикл гістерезису кількісно характеризується площею петлі гістерезису ($\Delta\Theta$), яка служить енергетичним показником тимчасової незворотності процесу повернення довжини деформованого ГМ до ненавантаженого стану (рівняння 3); із застосуванням вищезазначених кількісних параметрів показано, що деформація ГМ шлунку має незначну термочутливість і фізичному сенсі являє собою пасивний процес. При цьому:

$$\Delta\Theta = \frac{\Delta L_{\max} - \Delta L_0}{k_2} (e^{-k_2 P_{\max}} - 1) - \frac{\Delta L_{\max}}{k_1} (e^{-k_1 P_{\max}} - 1) \quad (3)$$

Типові значення параметрів високоеластичної деформації тканини гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щурів

Гладеньком'язова тканина	$P_{1/2}$ навант, мН	$P_{1/2}$ розвант., мН	k_1 , Н ⁻¹	k_2 , Н ⁻¹	Θ , мм·Н
<i>gaster</i>	9,2	1,2	57,2	120,1	0,049
<i>colon</i>	5,7	2,6	122,7	195,5	0,075
<i>caecum</i>	3,9	3,3	175,0	175,0	0,033

Повна робота по деформації м'язів (ΔA) описується рівнянням (4):

$$\Delta A = -\frac{1}{k_1} \left[(\Delta L_{\max} - \Delta L) \ln \left(\frac{\Delta L_{\max} - \Delta L}{\Delta L_{\max}} \right) + \Delta L \right] < 0 \quad (4)$$

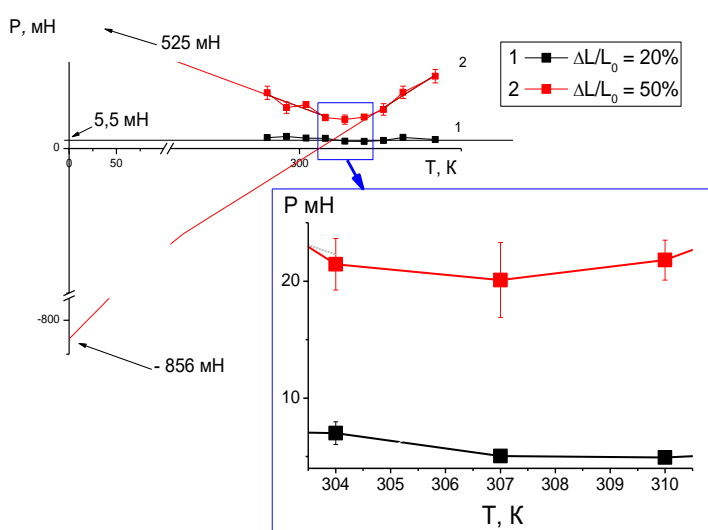


Рис. 2 Термодинамічна інтерпретація використання рівняння Віганда-Снайдера для експериментального тлумачення високоеластичного рівноважного ($\tau = 3-5$ хв) розтягування гладеньких м'язів *antrum* під дією сили P ($M \pm m$, $n=5-9$):

- 1 – відносна деформація $\Delta L/L_{\pi} = 20\%$;
2 – відносна деформація $\Delta L/L_{\pi} = 50\%$.

Встановлено, що при деформуванні ГМ антрального відділу шлунку найбільша робота виконується в межах фізіологічно значущих температур (28-37°C), досягаючи максимального абсолютного значення в області помірного охолодження (28-31°C). У лівій (22-25°C) та правій (40-48°C) частинах температурного діапазону прикладання аналогічних величин деформуючої сили P спричиняє виконання над системою відносно меншої (до 40%, $n=5-9$, $p<0.05$) роботи і, таким чином, є менш термодинамічно вигідним.

Нами із застосуванням рівняння Віганда-Снайдера здійснено термодинамічний аналіз високоеластичної деформації (ΔL) ГМ *antrum*. Встановлено, що малі ($\Delta L/L_{\pi} \approx 20\%$) розтягування гладеньком'язових смужок (діапазон температур 22-48 °C) не супроводжуються змінами впорядкованості системи ($(\partial S / \partial \Delta L)_T = 0$) (рис. 2). Такий самий феномен спостерігається і у випадку значних розтягувань ($\Delta L/L_{\pi} \approx 50\%$), але у більш вузькому діапазоні температур: $>30^{\circ}\text{C}$ і $<40^{\circ}\text{C}$. При великих розтягуваннях ГМ ($\Delta L/L_{\pi} \approx 50\%$), як при відносно низьких (22-30 °C), так і при відносно великих ($>37^{\circ}\text{C}$) температурах мають місце суттєві структурні зміни у тензометричній системі; за цих умов спостерігається інверсія знаку ентропійних ефектів: $(\partial S / \partial \Delta L)_T > 0$ при температурах $<31^{\circ}\text{C}$ та $(\partial S / \partial \Delta L)_T < 0$ при температурах $>37^{\circ}\text{C}$.

2. Закономірності та механізми дії нанорозмірного матеріалу TiO_2 на вісцеральні гладенькі м'язи в умовах *in vitro* та *in vivo*

Механокінетичні ефекти та механізми дії нанорозмірного матеріалу TiO_2 на вісцеральні ГМ в умовах *in vitro*. Було досліджено ефекти аплікування (в умовах некумулятивного і кумулятивного збільшення концентрацій) наночастинок TiO_2 з різними фізико-хімічними параметрами: 1-3 нм (рутил), 4-8 нм (анатаз) та 21 нм (фотокаталітичний стандарт P25, співвідношення рутил:анатаз=1:4), на спонтанну і викликану скорочувальну активність вісцеральних ГМ.

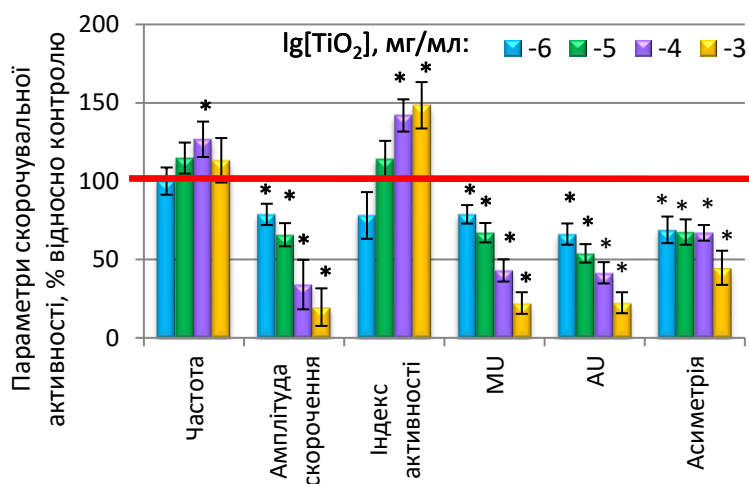


Рис. 3 Відносні зміни параметрів спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів *antrum* у присутності наночастинок TiO_2 (середній розмір 21 нм, концентрації 10^{-6} - 10^{-3} мг/мл). Дані наведено як $M \pm m$ (n=10);

* - $p < 0.05$ – різниця достовірна відносно контролю

середньому вдвічі) пригніченням амплітуди та показників ефективності скорочувальної активності в MU і AU. На противагу цьому, за кумулятивної дії частинки TiO_2 розміру 21 нм (концентрації 10^{-6} - 10^{-3} мг/мл) суттєво та дозозалежно інгібували спонтанну скорочувальну активність ГМ *antrum* (рис. 3); так, за максимальної застосованої концентрації суспензії амплітуда скорочень у середньому становила 19,6% (n=10, $p < 0.01$), скорочувальний індекс в MU – 22,2% (n=10, $p < 0.01$) щодо відповідних контрольних значень, прийнятих за 100%.

Оскільки, з огляду на отримані результати, ймовірним було передбачити вплив TiO_2 на процеси генерації спонтанних скорочень через окремі іонотранспортувальні системи ПМ і внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо [Means S.A., Sneyd J., 2010; Sanders K.M., 2012, 2014; Szymański J, 2017], у наступній серії експериментів було вивчено процеси, які обумовлюються K^+ -індукованою деполяризацією (80 мМ) та агоністом мускаринових холінорецепторів ацетилхоліном (10 мкМ), в умовах присутності у омиваючому ГМ препарати розчині суспензії TiO_2 . Встановлено, що при кумулятивному збільшенні концентрацій TiO_2 ефект цих наночастинок на ацетилхолін-активовані скорочення залежав від їх розмірів та поліморфного складу. Так, за присутності низьких

За кумулятивної дії TiO_2 з розміром 1-3 нм спричиняли помірне дозо-незалежне пригнічення спонтанних скорочень ГМ *antrum* (зокрема, за дії 10^{-4} мг/мл TiO_2 спостерігалось зниження амплітуди у середньому на 38,6%, n=10, $p < 0.05$), із тенденціями до зниження загальної продуктивності м'язів (так, за дії 10^{-4} мг/мл TiO_2 спостерігалось зниження MU на 22,0%, n=10, $p < 0.05$). Нано- TiO_2 у формі анатазу (розмір 4-8 нм, концентрації 10^{-7} - 10^{-4} мг/мл) спричиняв виражений дозо-незалежний ефект з суттєвим (у

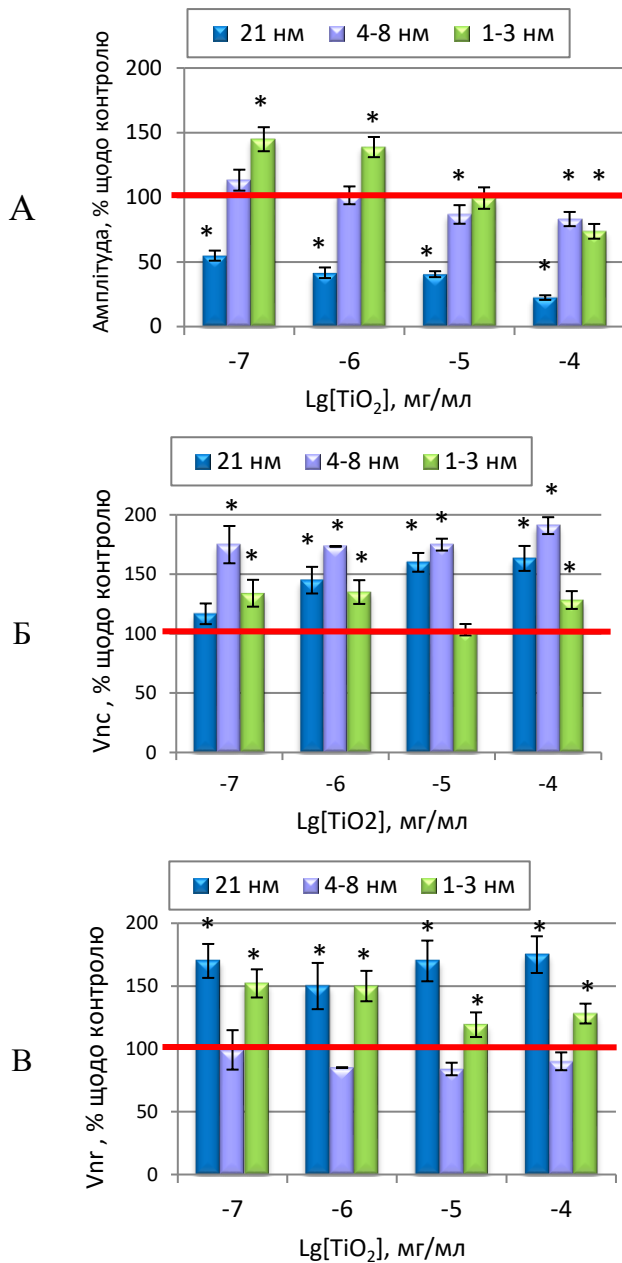


Рис. 4 Відносні зміни параметрів викликаних ацетилхоліном (10 мкМ) скорочень кільцевих гладеньких м'язів *antrum* в умовах кумулятивного зростання концентрації наночастинок TiO₂ з середнім розміром 1-3 нм, 4-8 нм і 21 нм: А – амплітуда фазних скорочень; Б – нормована максимальна швидкість фази скорочення; В – нормована максимальна швидкість фази розслаблення. Дані наведено як $M \pm m$ ($n=5-10$); * - $p < 0.05$ – різниця достовірна відносно контролю.

проявляла не лише концентраційну залежність, але також варіабельність напрямку ефектів (рис. 4, В). Так, за присутності наночастинок TiO₂ з середнім розміром 1-3 нм спостерігалось незначне прискорення процесу розслаблення; дія

концентрацій TiO₂ (10^{-7} мг/мл) наночастинок найбільшого діаметру (21 нм, суміш анатазу і рутилу) спричиняли дозо-залежне пригнічення скорочень; частинки з діаметром 4-8 нм (анатаз) їх не змінювали, тоді як 1-3 нм (рутил) їх активували (рис. 4, А).

Із застосуванням кінетичного аналізу виявлено, що у діапазоні досліджених концентрацій TiO₂ трьох розмірних груп (1-3 нм, 4-8 нм і 21 нм) спостерігається зростання показника нормованої максимальної швидкості фази розслаблення (V_{nc}); втім, величина ефектів та їх концентраційні залежності вірогідно відрізняються (рис. 4, Б). Найменшою відносно активаторною здатністю щодо V_{nc} володіли частинки з розміром 1-3 нм (поліморф рутил). Отримані результати вказують на те, що за дії нано-TiO₂ відбувається прискорення процесів опосередкованого активацією M₃-холінорецепторів збільшення концентрації іонів Ca²⁺ у міоплазмі гладеньком'язових клітин (ГМК); втім, оскільки амплітуда ацетилхолінових скорочень під дією кумулятивного збільшення концентрації TiO₂ суттєво знижувалась, ймовірно ефективність мобілізації іонів Ca²⁺ з внутрішньоклітинних депо ГМК за цих умов зменшується [Ehlert F.J., 2003; McCarron J.G., 2004; Denizalti M., 2011].

Нормована максимальна швидкість фази розслаблення (V_{nr}) ацетилхолінових скорочувальних відповідей, зареєстрованих в умовах передінкубації з нано-TiO₂ різного розміру і поліморфного складу,

наночастинок з середнім розміром 4-8 нм супроводжувалась незначним дозо-незалежним, проте достовірним зниженням показника V_{nr} ; присутність в омиваючому ГМ розчині нано- TiO_2 із середнім розміром 21 нм супроводжувалась достовірним підвищенням швидкості процесу розслаблення агоніст-викликаних скорочень. Такі ефекти щодо V_{nr} можуть бути пов'язані з модулюванням під дією TiO_2 процесів надходження іонів Ca^{2+} , опосередкованих активацією мускаринових холінорецепторів та/або енергозалежних процесів викачування цих катіонів з міоплазми, та/або процесів десенситизації скорочувальних білків у ГМК [McCarron J.G., 2004; Takeuchi T., 2004; Ohama T., 2007; Burdyga T., 2012].

При некумулятивній, короткочасовій дії TiO_2 (21 нм) у концентрації 10^{-3} мг/л спричиняв достовірне зниження (у середньому на 21,2 %, $n=5$, $p<0.05$), а у вищих концентраціях ($2.5 \cdot 10^{-2}$ і $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) підвищення (при дії $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл TiO_2 на 27,4 %, $n=5$, $p<0.05$) амплітуди фазних ацетилхолін-індукованих скорочень ГМ *antrum*. Разом з тим, тонічна складова ацетилхолін-викликаних скорочень, а також їх кінетичні параметри (швидкості V_{nc} та V_{nr}) в умовах дії TiO_2 не зазнавали суттєвих змін.

Ефект TiO_2 на K^+ -індуковані (80 мМ) скорочення ГМ шлунку залежав як від концентрації, так і розміру цих наночастинок. Так, за присутності нано- TiO_2 з середнім розміром 21 нм спостерігалось суттєве, дозо-залежне зниження амплітуди скорочень. Ефект наночастинок TiO_2 меншого розміру (4-8 нм, поліморф анатаз) на K^+ -індуковані скорочення кільцевих ГМ *antrum* можна було вважати двофазним відносно їх концентрації: за присутності частинок 4-8 нм у концентрації 10^{-7} мг/мл мало місце невелике зниження амплітуди (у середньому на 13,3%, $n = 10$, $p < 0.05$), за концентрації 10^{-6} мг/мл скорочення залишались на рівні контролю, а подальше зростання концентрації супроводжувалось активацією скорочень (зокрема, за дії 10^{-4} мг/мл – у середньому на 16,8%, $n = 10$, $p < 0.05$). Аналогічний за трендом двофазний ефект щодо амплітуди K^+ -індукованих скорочень *antrum* спричиняли нано- TiO_2 розміру 1-3 нм: за дії найменшої концентрації TiO_2 (10^{-7} мг/мл) відбувалась активація цих скорочень у середньому на 44,9% ($n = 10$, $p < 0.05$); збільшення концентрації наночастинок на порядок також супроводжувалось активацією скорочень (на 38,9%, $n = 10$, $p < 0.05$). За дії 10^{-5} мг/мл спостерігалось повернення амплітуди до контрольних значень; подальше підвищення концентрації TiO_2 до 10^{-4} мг/мл спричиняло їх пригнічення на 26,3% порівняно з контролем ($n = 10$, $p < 0.05$).

Із застосуванням кінетичного аналізу виявлено, що наночастинок розміру 21 нм на усьому діапазоні досліджених концентрацій дозо-залежно знижували показник V_{nc} K^+ -індукованих скорочень: максимальне пригнічення (за дії 10^{-4} мг/мл) складало 75,0% ($n = 10$, $p < 0.01$). Частинок з середнім розміром 4-8 нм дозо-незалежно і у відносно меншій мірі знижували V_{nc} (у середньому до 79,5% щодо контролю, $n = 10$, $p < 0.05$). На протигагу ефектам нано- TiO_2 більших розмірів, частинки 1-3 нм спричиняли збільшення V_{nc} зі зворотною дозовою залежністю: так, при дії 10^{-7} мг/мл TiO_2 цей параметр зростав на 56,8%, тоді як при кумулятивному збільшенні концентрації TiO_2 до 10^{-4} мг/мл активація складала 36,8% (в обох випадках $n = 10$, $p < 0,05$).

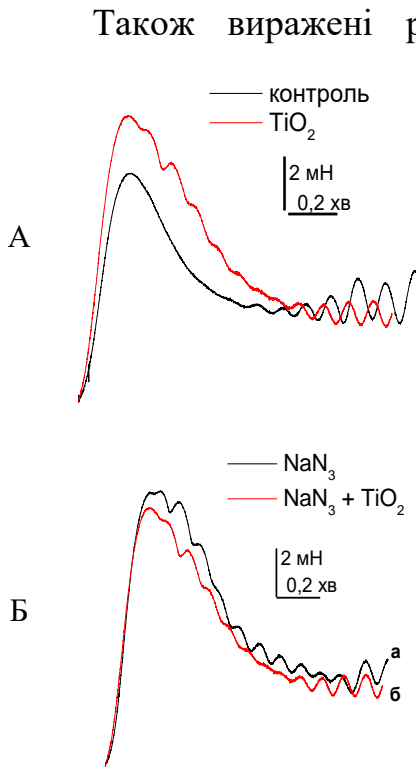


Рис. 5 Викликані ацетилхоліном (10^{-5} М) скорочення кільцевих гладеньких м'язів *antrum* у контролі та за дії TiO_2 (21 нм, концентрація $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) (А), а також за умов передінкубації (30хв.) з блокатором дихального ланцюга мітохондрій NaN_3 (10^{-4} М) та з TiO_2 ($5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) на фоні NaN_3 (10^{-4} М) (Б).

Отже, ці наночастинки не змінюють мобілізацію іонів Ca^{2+} з інозитол-1,4,5-трисфосфат (ІТФ)- і ріанодин-чутливих депо саркоплазматичного ретикулу (СР) ГМК [White С., 2000; Burdyga Т., 2012].

Передінкубація ГМ *antrum* з NaN_3 (0,1 мМ) усувала ефект активації TiO_2 (21 нм, $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) скорочень, викликаних ацетилхоліном (10 мкМ) (рис. 5) та гіперкалієвим розчином (80 мМ). Тож блокування роботи дихального ланцюга мітохондрій, а отже порушення Ca^{2+} - і енергетичного гомеостазу в цих органелах, усуває ефекти TiO_2 [Correa R.M., 2011].

Виявлено, що попереднє блокування Ca^{2+} -каналів D-600 (10^{-5} М) суттєво знижує активаційний ефект TiO_2 (21 нм, $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) на ацетилхолінові скорочення (рис. 6). Ймовірно, що за присутності високих концентрацій нано- TiO_2 має місце активація надходження іонів Ca^{2+} через ПМ за рахунок активації потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів [Kirschstein Т., 2009].

Попередня інкубація ГМ з атропіном (10^{-5} М) не усувала активаційної дії високих концентрацій TiO_2 ($5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) на K^+ -індуковані скорочення. Це свідчить про відсутність впливу TiO_2 на процеси спряження збудження-скорочення, які індукуються ендogenous ацетилхоліном, принаймні за умови

активації його вивільнення при деполяризації ГМ [Fernandes V.S., 2015].

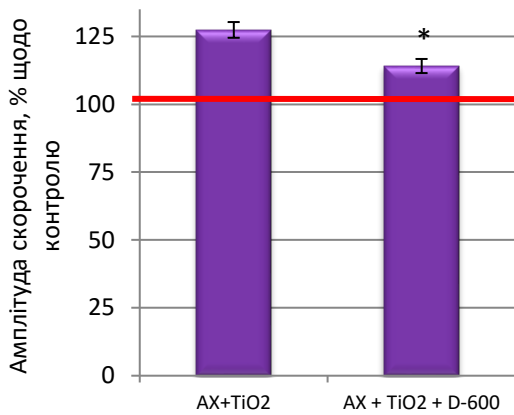


Рис. 6 Викликані ацетилхоліном (10^{-5} М) скорочення кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів за дії TiO_2 (21 нм, концентрація $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) та за умов передінкубації з блокаторм Ca^{2+} -каналів D-600 (10 мкМ). (n=5). Наведено типові механограми. За 100% прийнято відповідні показники в контролі; * - $p < 0.05$ - різниця достовірна щодо дії TiO_2 .

параметри АТФ-викликаного (10^{-5} М) розслаблення *antrum*, тож ймовірно, що система швидкого компонента неадренергічного нехолінергічного розслаблення також не відіграє суттєвого значення у розвитку ефектів цих наночастинок [Vetri T., 2007].

За дії нано- TiO_2 (21 нм, 10^{-6} – 10^{-4} мг/мл) спостерігались суттєві зміни нікотин-викликаних (10^{-7} М) скорочень, які індукували на тонічній складовій гістамінових (10 мкМ) та ацетилхолінових (10 мкМ) скорочень. Зокрема, фазний компонент ацетилхолінового скорочення, модульованого нікотинном, не був чутливий до дії TiO_2 , тоді як тонічний – пригнічувався. Тож цей наноматеріал здатний модулювати пресинаптичні і постсинаптичні механізми регуляції скорочення ГМ *antrum* за участі гістамінових і ацетилхолінових нікотинних рецепторів [Ozger Ilhan S., 2008].

Дослідженнями *in silico* підтверджено, що нано- TiO_2 здатний взаємодіяти зі значною спорідненістю з декількома сайтами позаклітинної частини метаботропних гістамінових H_1 , ГАМК_B-, а також (що дуже важливо у контексті дії на вісцеральні ГМ) M_2 - і M_3 - ацетилхолінових рецепторів (рис. 7).

Сумарна схема ймовірних механізмів впливу наноматеріалу TiO_2 на вісцеральні ГМ наведена на рис. 8.

Ефекти хронічної дії *in vivo* нано- TiO_2 на вісцеральні ГМ щурів. Дослідження, результати яких наведені в розділі 6, стосуються вивчення накопичення TiO_2 у тканинах і органах, а також впливу на вісцеральні ГМ (шлунку, товстого кишечника і міометрія). Для експериментів було обрано частинки з розміром 21 ± 5 нм, які вводили інтрагастрально в дозі 0,1 мг/кг маси.

Некумулятивна дія високих концентрацій TiO_2 (21 нм, $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) супроводжувалась пригніченням брадикінін-викликаних (10^{-6} М) скорочень ГМ *antrum*; (на 66,1%, n=5, $p < 0.01$). Тож ефекти високих концентрацій TiO_2 щодо ацетилхолінових скорочень є рецептор-специфічними.

Передінкубація м'язів з L-NAME (10^{-4} М) не змінювала активаторних ефектів TiO_2 ($5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл, 21 нм) на K^+ -індуковані (80 мМ) та ацетилхолінові (10^{-5} М) скорочення кільцевих ГМ *antrum*. Отже ймовірно, що система повільного компонента неадренергічного нехолінергічного розслаблення не залучена у реалізацію ефектів нано- TiO_2 на механокінетику ГМ *antrum* [Lefebvre R.A., 1992; Vetri T., 2007; Burnstock G., 2014]. Також, TiO_2 (21 нм) не впливав на

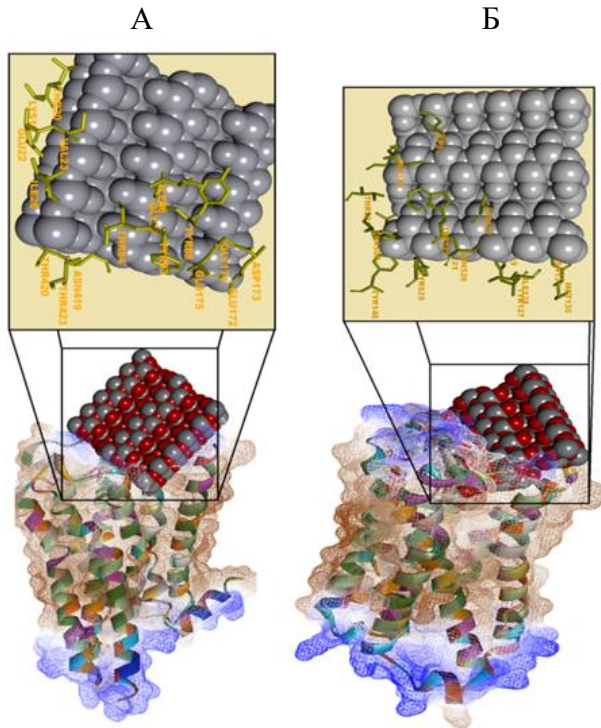


Рис. 7 Передбачені сайти зв'язування нано- TiO_2 з позаклітинними ділянками мускаринових M_2 - (А) і M_3 - (Б) ацетилхолінових рецепторів.

спостерігалось відносно варіювання показників константи k_2 на усьому діапазоні температур. Параметри $P_{1/2}$ навантаження і розвантаження у випадку м'язів тварин, оброблених TiO_2 , загалом мали тренди температурних залежностей аналогічні до контрольних. У випадку площі петлі гістерезису ($\Delta\Theta$), також загалом спостерігалось збільшення цього параметра, особливо за знижених температур. Абсолютні значення показника $A_{1/2\max}$ за дії TiO_2 були суттєво збільшені при помірному охолодженні; на всьому іншому температурному діапазоні (31-48 °C) $A_{1/2\max}$ було на рівні контролю.

Із застосуванням рівняння Віганда-Снайдера для аналізу термодинамічних ефектів високоеластичної деформації було встановлено, що при малих деформаціях ($\approx 20\%$) м'язи після дії TiO_2 поведуть себе аналогічно до контрольних: зміна $\left(\frac{\partial U}{\partial \Delta L_T}\right)$ є величиною постійною та позитивною ($\approx 4,2$ мН, що є дещо меншим, ніж у контролі) (рис. 9). Також деформація ГМ не впливає на величину зміни $\left(\frac{\partial S}{\partial \Delta L_T}\right)$. При суттєвих деформаціях ($\approx 50\%$) термодинамічні ефекти після дії TiO_2 суттєво відрізняються від контрольних: за дії TiO_2 на тлі знижених температур $\left(\frac{\partial U}{\partial \Delta L_T}\right) \approx 1924 \text{ мН} > 0$ та перевищує контрольний показник у понад 3,5 рази. Тож за дії TiO_2 в умовах великих навантажень (на відміну від контролю) відсутній інтервал температур, для якого б не була характерною зміна $\left(\frac{\partial S}{\partial \Delta L_T}\right)$.

При використанні *in vivo* нано- TiO_2 впродовж 30 діб спостерігались наступні закономірності: цей наноматеріал проникав у тканини і нерівномірно накопичувався у різних органах (табл. 3). Елементним аналізом встановлено, що найбільшу кількість Ті накопичують тканини вісцеральних ГМ (шлунок > товстий кишечник > матка) та нирок.

Встановлено, що тривала дія *in vitro* нано- TiO_2 спричиняє зміни термодинамічних властивостей ГМ *antrum*. Зокрема, виявлено окремі відмінності параметрів кривої гістерезису відносно даних контрольної групи: значення силової константи k_1 було достовірно підвищеним практично на усьому діапазоні вивчених температур крім ділянки помірному охолодження;

Елементний аналіз вмісту Тi у зразках тканин і органів щурів, за умов інтрагастрального введення упродовж 30 діб суспензії нано-ТiO₂ (середній розмір 21 нм, співвідношення рутил:анатаз=4:1, доза 0,1 мг / кг маси щодобово)

Тканина	Вміст Тi, мг/кг
Гладенькі м'язи шлунку	11,15
Гладенькі м'язи саесит	3,97
Матка	2,88
Нирки	3,34
Легені	0,49
Печінка	0,41

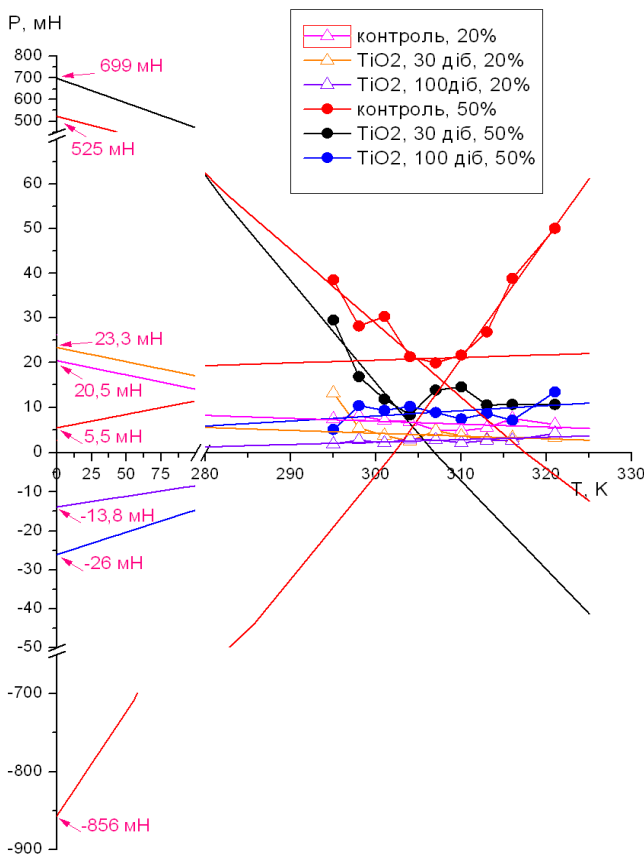


Рис. 9 Температурна залежність відносних деформацій кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів та її інтерпретація відносно рівняння Віганда-Снайдера у контролі та за дії ТiO₂ (середній розмір 21 нм, доза 0,1 мг / кг маси щодобово) в умовах *in vivo* (упродовж 30 і 100 діб).

групи 2. Так, хоча частота спонтанних скорочень надалі збільшувалась, однак спостерігалось подальше пригнічення їх амплітуди. Показник скоротливого індексу, який виражався в Олександрійських одиницях, збільшувався порівняно з даними групи 2 майже на 70%, хоча і залишався суттєво (у чотири рази) меншим відносно контролю. Також спостерігались тенденції до відновлення кінетичних

Після тривалого (30 діб, група 2) інтрагастрального введення нано-ТiO₂ відбувається суттєве збільшення частоти і пригнічення амплітуди (у середньому на 75,0% та на 68,6% відповідно) спонтанних скорочень ГМ *saesit*. Ці зміни позначились на показниках окремих спонтанних скорочень та загальної ефективності моторики: зокрема, тривалість поодиноких циклів «скорочення-розслаблення» зменшувалась втричі, як і тривалість фази скорочення, а тривалість фази розслаблення – майже у п'ять разів. За цих умов також суттєво знижувалась сумарна ефективність скорочувальної активності ГМ (зокрема, скоротливий індекс, який виражався в Олександрійських одиницях, зменшувався порівняно з контролем майже у шість разів).

Вживання щурами суспензії ТiO₂ упродовж 100 діб супроводжувалось частковим відновленням ефективності спонтанної скорочувальної активності їх м'язів *saesit*, порівняно з даними

показників поодиноких скорочень (зокрема, тривалості фаз скорочень і розслаблень).

Для м'язів *antrum*, як і у випадку *saesum*, було характерним зниження амплітуди і підвищення частоти спонтанних скорочень. В умовах вживання TiO_2 упродовж 30 діб спостерігались наступні зміни: збільшення частоти спонтанних скорочень, зменшення їх окремих кінетичних параметрів (тривалостей скоротливого циклу, фази скорочення і фази розслаблення), а також значне (у середньому вдвічі) зниження сумарної ефективності скорочувальної активності (табл. 4). Вживання TiO_2 упродовж 100 діб не супроводжувалось змінами ефективності моторики ГМ *antrum*, порівняно з даними групи 2. Звертає на себе увагу зниження середніх швидкостей наростання/спаду сили фази скорочення/розслаблення: обидва показники були достовірно меншими порівняно з контролем, але особливо (у два рази) уповільнювалась фаза скорочення, що вказує на зниження ефективності координації між ГМК у стінці шлунку.

Таблиця 4.

Кінетичні параметри спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів у контрольній групі 1, а також навантажених суспензією TiO_2 (21 нм, доза 0,1 мг / кг маси щодобово) впродовж 30 діб (група 2) та 100 діб (група 3), ($M \pm m$, n=12)

Параметр спонтанних скорочень	контроль	Група 2	Група 3
Кількість скорочень/10 хв.	12,0±0,6	16,0±0,8*	19,0±1,2*
Амплітуда, мН	12,0±1,0	6,69 ± 0,58*	4,86 ± 0,22*
Тривалість циклу скорочення-розслаблення, с.	48,0±3,4	26,4±1,3*	30,0±1,8*
Тривалість фази скорочення, с.	16,2±0,9	11,2±0,7*	13,2±0,6
Тривалість фази розслаблення, с.	31,8±1,7	15,2±0,9*	16,8±0,9*
Коефіцієнт асиметрії	0,53±0,03	0,82±0,05*	1,07±0,06*
Середня швидкість наростання сили фази скорочення (f_{max}/t), мН/хв.	46,85±4,68	35,6±3,8	22,1±2,3*
Середня швидкість спадусилифази розслаблення (f_{max}/t), мН/хв.	23,32±2,58	26,6±1,9	17,4±1,5*
Індекс скоротливої активності в одиницях Монтевідео, ум.од.	143,8±7,2	93,6±6,5*	92,4±6,5*
Індекс скоротливої активності в Олександрійських одиницях, ум.од.	6900,5± 483,0	2470,0± 148,2*	2772,5± 138,6*

Примітка: * - $p < 0.05$ – різниця достовірна відносно контролю.

Варто відзначити, що присутність *in vivo* нано- TiO_2 спричиняє неоднорідний вплив на спонтанні скорочення міометрія порівняно із загалом часо-залежним пригніченням моторики м'язів ШКТ.

Встановлено, що ефект навантажень організму суспензією TiO_2 в умовах *in vivo* на K^+ -викликані (80 мМ) скорочення кільцевих ГМ *saesum* залежав від тривалості дії наноматеріалу, змінюючись від активації до суттєвого інгібування. Виявлено суттєві зміни механокінетичних властивостей цих скорочень після тривалого (30 діб, група 2) навантаження суспензією TiO_2 : збільшення амплітуди

фазних скорочень (у середньому на третину) та співвідношення фазного і тонічного складових; а також суттєве зростання нормованих максимальних швидкостей V_{nc} (у понад 2.5 рази) та V_{nr} (втричі відносно контролю).

Вивчено закономірності ацетилхолін-індукованих (10^{-5} М) скорочень ГМ ШКТ в умовах хронічного (впродовж 30 і 100 діб) впливу нано- TiO_2 . Встановлено, що скорочення м'язів *saesum* за дії TiO_2 впродовж 30 діб характеризуються суттєвим підвищенням амплітуди фазного та зниженням співвідношення фазного і тонічного складових скорочень (у середньому до 170 та 72,8%, відповідно); нормовані максимальні швидкості V_{nc} та V_{nr} скорочень залишались на рівні контрольних значень. Хронічна дія TiO_2 упродовж 100 діб також супроводжувалась окремими змінами ацетилхолінових скорочень *saesum*; за аналогічних умов скорочення *antrum* характеризуються амплітудою фазного і тонічного компонентів на рівні контролю, як і показники нормованих максимальних швидкостей (V_{nc} і V_{nr}). Також, як і у випадку м'язів *saesum*, спостерігалось суттєве пригнічення осциляцій напруження на тонічній складовій ацетилхолін-викликаних скорочень м'язів *antrum*.

Встановлено закономірності викликаних утеротонічним гормоном окситоцином (0,1 МО) скорочень поздовжніх ГМ міометрія в умовах впливу *in vivo* нано- TiO_2 . Так, при хронічній дії частинок за відсутності змін амплітуди фазних скорочень суттєво зменшувалась їх тонічна складова; значних змін також набули механокінетичні параметри цих скорочень: швидкість V_{nc} зросла майже вдвічі, а V_{nr} – у чотири рази. Зміни окситоцин-індукованих скорочень, які спостерігались в групі 2, зі збільшенням тривалості дії TiO_2 прогресували.

Досліджені ефекти ГАМК в умовах її кумулятивного і некумулятивного аплікування на тонічній складовій K^+ -індукованого скорочення ГМ *saesum* і *antrum*. Показано, що в обох випадках за субхронічного навантаження організму шурів нано- TiO_2 відбувається послаблення та/або з часом усунення модулюючої дії нейромедіатора ГАМК на ГМ травного тракту.

3. Механізми модуляції калікс[4]аренами-інгібіторами натрієвої помпи функціонування вісцеральних гладеньких м'язів

Закономірності та механізми дії калікс[4]аренів-інгібіторів натрієвої помпи в умовах *in vitro*. У розділах 7 і 8 дисертації наведено дані досліджень закономірностей впливу речовин-інгібіторів натрієвої помпи ПМ (калікс[4]аренів з шифрами С-99 і С-107, а також у порівняльному аспекті – відомого інгібітора цього ензиму алкалоїда убаїну) на спонтанну і викликану скорочувальну активність вісцеральних ГМ. Зокрема, встановлено, що убаїн та калікс[4]арен С-99 (обидві сполуки у концентрації 10 мкМ) змінюють їх спонтанну скорочувальну активність міометрія, спричиняючи вірогідне підвищення амплітуди і частоти скорочень. Так, за дії калікс[4]арену С-99 спостерігалось збільшення частоти скорочень на 37,2% та їх амплітуди на 26,2% ($p < 0,05$, $n = 7$); ці показники за дії убаїну відповідно становили 29,3% і 19,9% ($p < 0,05$, $n = 6$). Аналіз закономірностей розвитку окремих спонтанних скорочень не виявив статистично

значущих змін нормованих максимальних швидкостей V_{nc} і V_{nr} у присутності убаїну; на протипагу калікс[4]арен С-99 спричиняв збільшення V_{nc} на 22,4% ($p < 0,05$, $n=7$), тоді як максимальна швидкість фази розслаблення не зазнавала вірогідних змін. Також обидві сполуки спричиняли достовірне зростання показників ефективності функціонування м'язів, які виражали в МУ і МА, однак ефект калікс[4]арену був вірогідно суттєвішим порівняно з таким убаїну.

Обидві сполуки в однаковій мірі викликали зниження сили оксидоциніндукованих (0,1 МО) скорочень, спричиняючи також пришвидшення наростання сили скорочувальних відповідей (це відобразилось у підвищенні параметра V_{nc}). Калікс[4]арен С-99 і убаїн не змінювали максимальну силу ацетилхолін- (10 мкМ) та K^+ -викликаних (80 мМ) скорочень, та не змінювали їх V_{nc} . Чутливість швидкості розслаблення V_{nr} за дії убаїну і калікс[4]арену С-99 залежала від характеру стимулювання скорочувальних відповідей: у випадку окситоцинових скорочень знижувалась, а для K^+ -викликаних скорочень – була на контрольному рівні. Тож ефект калікс[4]арену С-99 на функціонування ГМ міометрія щурів в значній мірі є подібним до дії убаїну [Barajas-Lopez C., 1992; Ausina P., 1996; Espinosa-Tanguma R., 2004].

Як і у випадку ГМ міометрія, блокування натрієвої помпи убаїном і калікс[4]ареном С-99 спричиняло активуючу дію на спонтанну скорочувальну активність препаратів *saesim*. Так, додавання 100 мкМ убаїну до омиваючого розчину супроводжувалось підвищенням напруження препаратів, а також збільшенням амплітуди і частоти їх спонтанних скорочень; наступне кумулятивне підвищення концентрації убаїну до 200 мкМ не викликало їх вірогідних змін (відносно параметрів скорочень за присутності 100 мкМ убаїну). У стаціонарних умовах блокування натрієвої помпи убаїном (100 мкМ), калікс[4]арен С-99 (100 мкМ) здатний додатково активувати спонтанну скорочувальну активність ГМ *saesim* (рис. 10). Базуючись на власних результатах та на даних літературних джерел [Kawamura M., 1978; Данилович Г.В., 2012], можна передбачити, що активаційний ефект калікс[4]арену С-99 на спонтанні скорочення ГМ ШКТ пов'язаний зймовірною дією на інтерстиціальні клітини Кахаля, зокрема на потенціал внутрішньої мембрани мітохондрій цих клітин.

У порівняльному аспекті було досліджено вплив калікс[4]аренів С-99 і С-107, а також убаїну на силові характеристики та кінетичні параметри викликаних скорочень ГМ *saesim*. Встановлено, що убаїн та калікс[4]арен С-99 (обидва 10 мкМ) загалом спричиняють односпрямовану зміну K^+ -індукованих (80 мМ) скорочень. Застосування підвищеної концентрації С-99 (100 мкМ) на фоні убаїну (100 мкМ) спричиняло зниження швидкості V_{nc} та амплітуди фазного скорочення, але, разом з тим – потужне зростання відносного внеску тонічного компоненту в K^+ -скорочення та спряжене з ним зниження V_{nr} . Індуковане С-99 пригнічення сили фазного скорочення і V_{nc} при K^+ -деполяризації не відрізнялись від ефекту використання 200 мкМ убаїну. Однак, зміни тонічної складової і параметра V_{nr} не можна пояснити лише сукупністю внутрішньоклітинних змін, який запускається при блокуванні натрієвої помпи; ймовірно, що зазначені особливості впливу калікс[4]арену С-99 на параметри K^+ -індукованих скорочень,

як і у випадку спонтанної скорочувальної активності, зумовлені його гіперполяризуючою дією на внутрішню мембрану мітохондрій [Kawamura M., 1978; Данилович Г.В., 2012].

Ацетилхолін-індуковані (10 мкМ) скорочення ГМ *saesum* були чутливими до дії калікс[4]арену С-99 (100 мкМ) в умовах попереднього блокування Na^+ , K^+ -АТФази убаїном (100 мкМ): порівняно з дією 100 мкМ убаїну, після

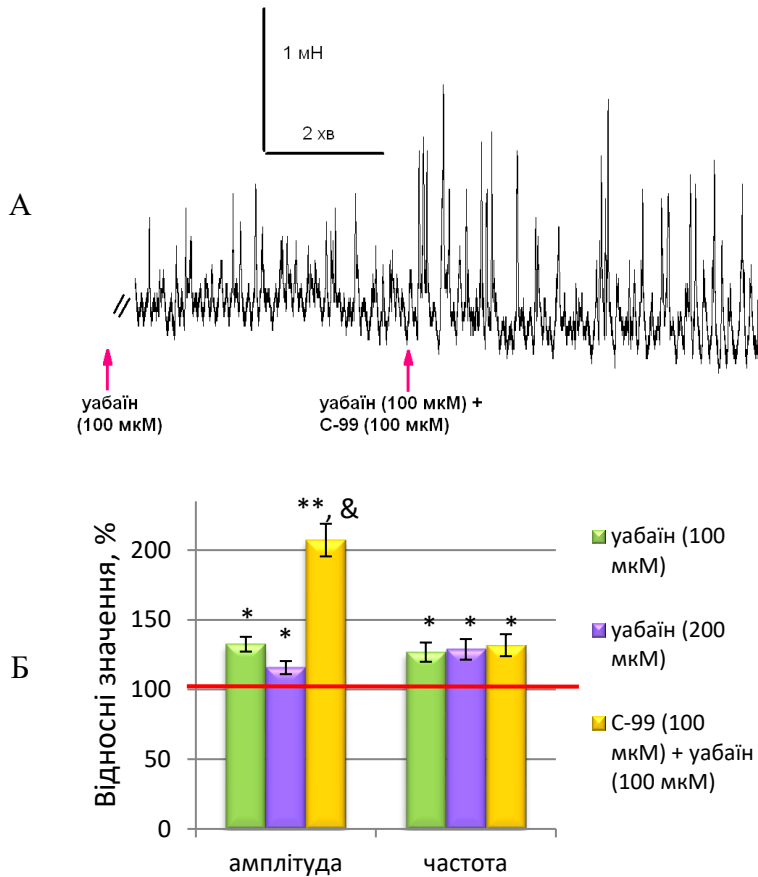


Рис. 10 Модуляція спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів *saesum* 100 мкМ калікс[4]арену С-99 : А – ефект на фоні попередньої 30-хвилинної інкубації з 100 мкМ убаїну; Б - усереднені дані зміни амплітуди і частоти спонтанних скорочень, параметри виражені у % відносно контролю, прийнятого за 100% (n=5).

* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ - зміни вірогідні відносно контролю, & - $p < 0.01$ - зміни вірогідні відносно дії 200 мкМ убаїну

убаїну та 100 мкМ калікс[4]арену С-99 на тлі 100 мкМ убаїну. Із використанням 20 мМ кофеїну (активатора скорочень за рахунок вивільнення Ca^{2+} з ріанодин-чутливої частини депо) встановлено, що убаїн і калікс[4]арен С-99 також не впливають на мобілізацію Ca^{2+} з ріанодин-чутливого пулу СР.

додавання 100 мкМ С-99 вірогідно знизилась амплітуда фазного скорочення, а також збільшилися тонічне скорочення та V_{pr} (рис. 11). Такі зміни агоніст-активованого скорочення могли бути зумовлені модуляцією процесів мобілізації іонів Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо [Ehlert F.J., 2003; Correa R.M., 2011]. Тому для перевірки участі ІТФ-залежного викиду Ca^{2+} з СР здійснювали реєстрацію ацетилхолінових скорочень у безкальцієвому середовищі. В обох випадках (як за присутності С-99, так і убаїну) спостерігали пригнічення цих скорочень, втім між групами різниця була статистично незначущою, отже зниження вивільнення Ca^{2+} з ІТФ-чутливого пулу в умовах дії каліксарену С-99 не може бути причиною описаних вище відмінностей між ацетилхолін-викликаними скороченнями за передінкубації з 200 мкМ

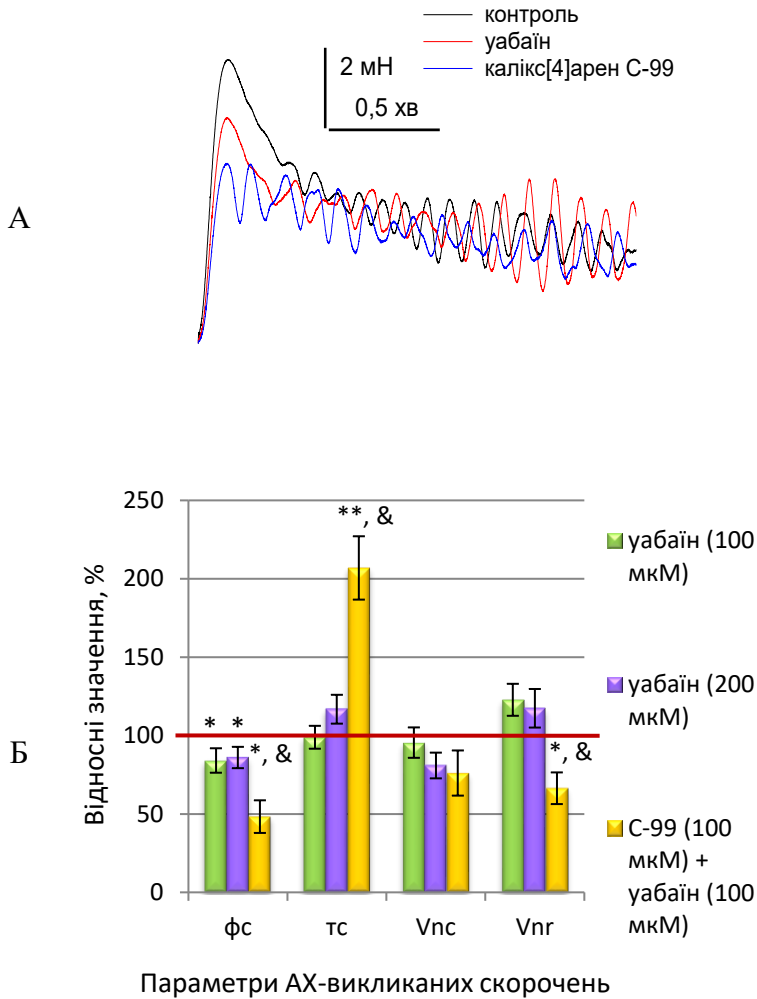


Рис. 11 Викликані ацетилхоліном (АХ, 10 мкМ) скорочення кільцевих гладеньких м'язів *саесит* у контролі, за передінкубації з уабаїном (100 мкМ) та при сукупній дії уабаїну (100 мкМ) і калікс[4]арену С-99 (100 мкМ): А - типові механограми.; Б - статистичні дані параметрів скорочень (ФС – фазний компонент скорочення, ТС – відносний внесок тонічного компонента у скоротливу відповідь, V_{nc} – нормована максимальна швидкість фази скорочення, V_{nr} – нормована максимальна швидкість фази розслаблення), параметри виражені у % відносно контролю, прийнятого за 100% (n=5). * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ - зміни вірогідні відносно контролю, & - $p < 0.01$ - зміни вірогідні відносно дії 200 мкМ уабаїну.

фрагменту М-3 на активність Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ клітин печінки щурів вивчали із використанням п'яти груп тварин: інтактні щури; щури, яким ін'єктували фізіологічний розчин (0,9% NaCl); та відповідні речовини, розведені у фізіологічному розчині: уабаїн; калікс[4]арен С-107; фрагмент М-3. Встановлено, що у випадку ін'єктування ДМСО показники ензиматичних активностей не

Закономірності функціонування вісцеральних ГМ в умовах хронічного інгібування *in vivo* Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ калікс[4]аренами. Здійснено тестування здатності інгібіторів натрієвої помпи ПМ (на прикладі калікс[4]арену С-107 та у порівняльному аспекті - уабаїну) зберігати свою активність в організмі при хронічному надходженні.

Було перевірено здатність калікс[4]арену С-107 та його фрагменту М-3 до блокування натрієвої помпи препаратів ПМ гепатоцитів. Встановлено, що усереднені показники уабаїн-чутливої Na^+, K^+ -АТФ-азної активності цих препаратів становлять 21% від загальної активності; калікс[4]арен С-107-чутлива Na^+, K^+ -АТФ-азна активність дорівнює у середньому 19% відносно загальної Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТФ-азної активності. Фрагмент М-3 не впливає на активність досліджених нами ензимів плазматичної мембрани.

Порівняльний ефект хронічного ін'єктування (упродовж 6,5 місяців) інгібіторів натрієвої помпи уабаїну і калікс[4]арену С-107 та його структурного

виявляли достовірних відмінностей порівняно з групою інтактного контролю. Препарати ПМ клітин печінки щурів, яким тривалий час ін'єктували убаїн, характеризувались загальною АТФ-азною активністю на рівні контрольних значень, убаїн-нечутлива базальна Mg^{2+} -АТФ-азна активність зростала порівняно з контролем, а убаїн-чутлива Na^+, K^+ -АТФ-аза була вірогідно пригнічена. Після ін'єктування калікс[4]арену С-107 убаїн-нечутлива базальна Mg^{2+} -АТФ-азної активність препаратів ПМ була знижена, а убаїн-чутлива Na^+, K^+ -АТФ-азної активність – повністю пригнічена (рис. 12). У випадку використання *in vivo*, фрагмент М-3, як і випадку *in vitro*, не впливав на функціонування цього ензиму. Таким чином, ймовірно, молекулярні механізми взаємодії та впливу досліджених речовин (убаїну та калікс[4]арену С-107) на натрієву помпу в умовах *in vivo* не ідентичні. Втім, наші дослідження доводять, що калікс[4]арен С-107 зберігає свої інгібіторні якості щодо Na^+, K^+ -АТФ-ази в умовах цілісного організму.

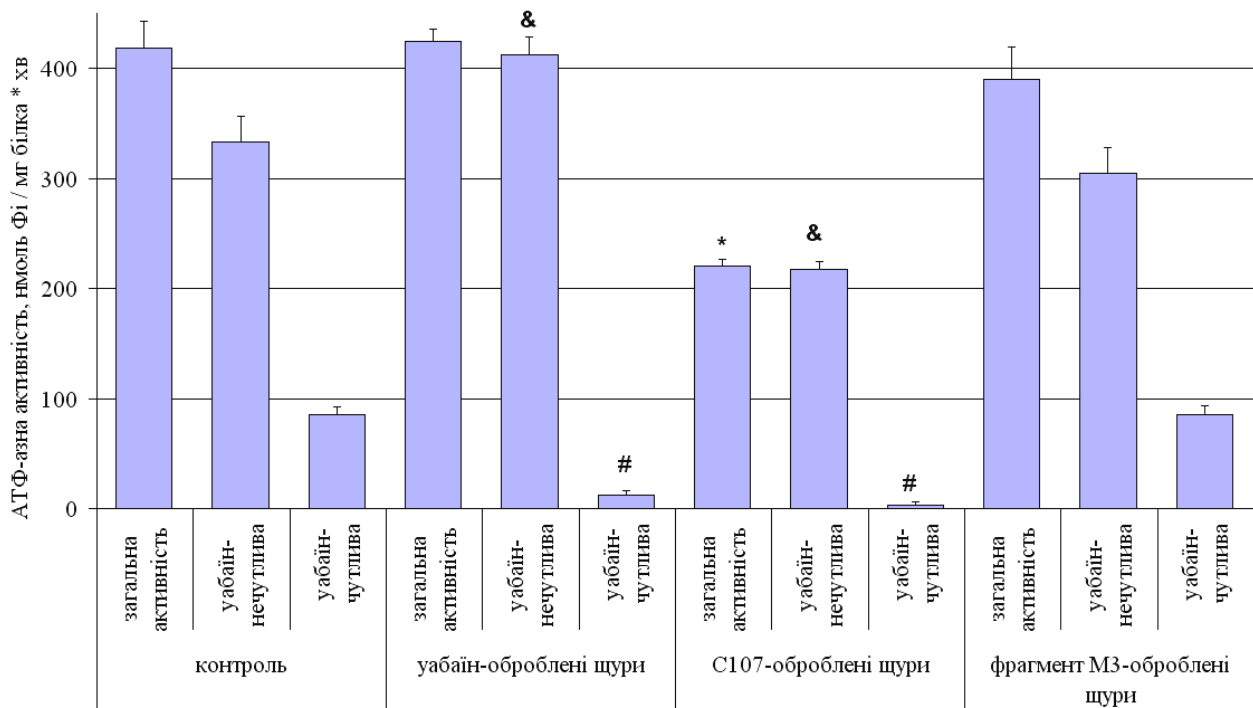


Рис. 12 Порівняльний аналіз ензиматичних активностей: загальної Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТФ-ази, базальної убаїн-нечутливої Mg^{2+} -АТФ-ази та убаїн-чутливої Na^+, K^+ -АТФ-ази (нмоль Φ_i / мг білка \cdot хв) у плазматичних мембранах гепатоцитів щурів за умови хронічної дії убаїну, калікс[4]арену С-107 та його структурного фрагменту М-3 *in vivo* ($M \pm m$; $n = 5-6$); за контроль прийнято показники в ДМСО-оброблених щурів.

* - відмінності щодо загальної Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТФ-ази в контролі достовірні ($p < 0.05$); & - відмінності щодо базальної убаїн-нечутливої Mg^{2+} -АТФ-ази в контролі достовірні ($p < 0.05$), # - відмінності щодо убаїн-чутливої Na^+, K^+ -АТФ-ази в контролі достовірні ($p < 0.05$).

Тезометричними експериментами викликаних K^+ -деполяризацією (80 мМ) і ацетилхоліном (10^{-5} М) скорочень встановлено, що результати в умовах хронічної дії *in vivo* убаїну, калікс[4]арену С-107 та фрагменту М-3 переважно відтворюють тенденції змін функції *caecum* при їх аплікуванні *in vitro*.

Залом можна передбачити, що ефекти калікс[4]аренів С-99 і С-107 обумовлюються блокуванням Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ, а також мітохондріальною ланкою модуляції внутрішньоклітинного гомеостазу іонів Ca^{2+} (рис. 13).

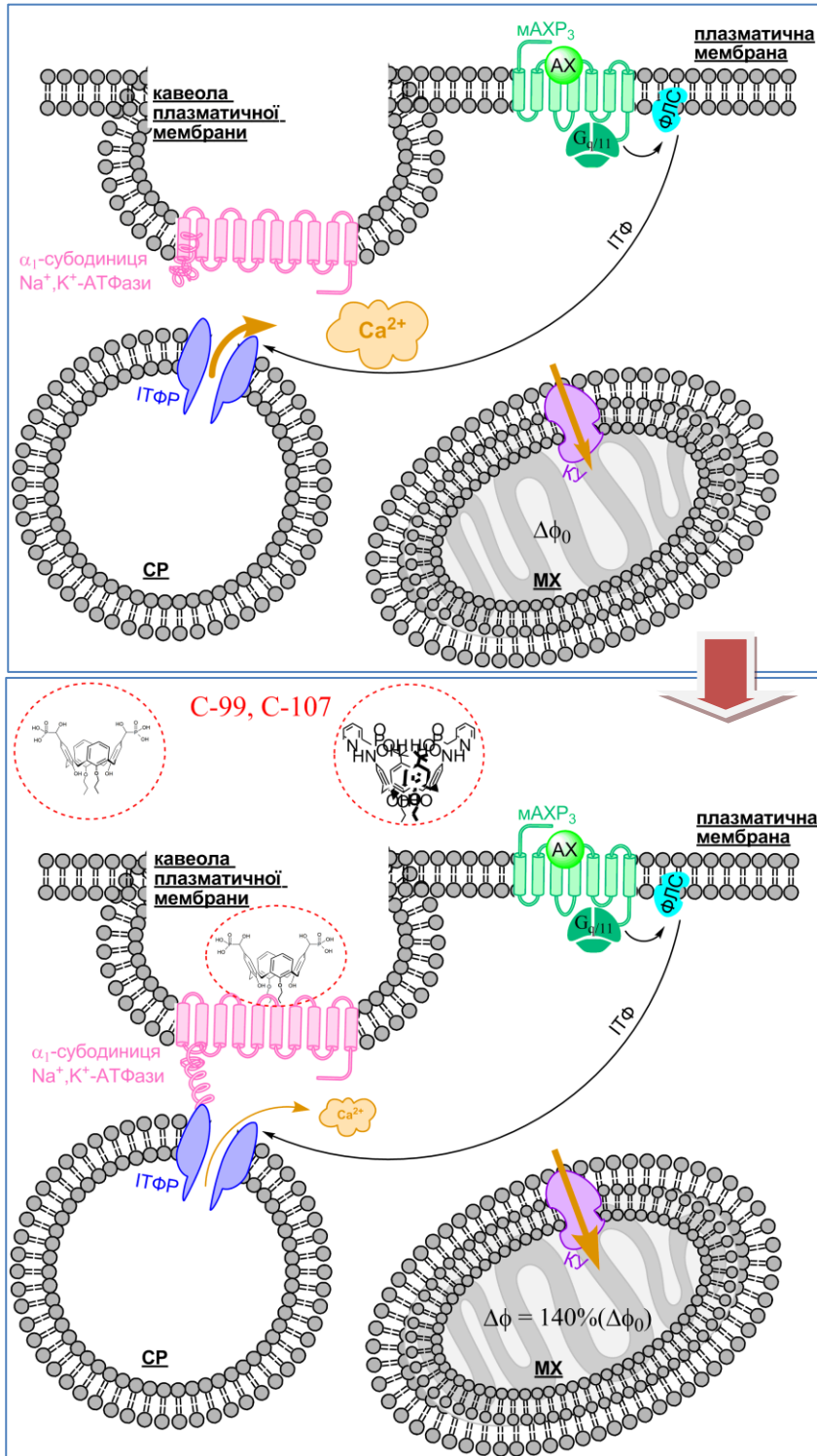


Рис. 13. Схема механізмів дії *in vitro* калікс[4]аренів С-99 і С-107 на вісцеральні гладенькі м'язи.

Позначення: СР – саркоплазматичний ретикулум; МХ – мітохондрія; КУ – Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій; РР – ріанодиновий рецептор; ІТФ – рецептор інозитол-1,4,5-трисфосфату (ІТФ); ФЛС – фосфоліпаза С; mAChR_3 – мускариновий ацетилхоліновий рецептор типу 3.

4. Механокінетичні ефекти та окремі механізми дії калікс[4]аренів-інгібіторів кальцієвої помпи плазматичної мембрани на вісцеральні гладенькі м'язи

Кальцієва помпа ПМ (ПМКА) є конститутивною структурою клітин, яка виконує функцію високоафінної системи по виведенню іонів Ca^{2+} з цитоплазми, забезпечуючи тривале підтримання базальної концентрації цих катіонів у стані спокою. Натепер не існує задовільних засобів фармакологічної корекції функції ПМКА, тому залишається надзвичайно актуальним питання розробки, синтезу та

дослідження на різних моделях сполук зі спрямованою дією на цей ензим. Дослідженнями останніх років у лабораторії академіка НАН України С.О. Костеріна встановлено, що окремі калікс[4]арени, зокрема, з кодами С-90 та С-716, здатні високоселективно інгібувати Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азу препаратів ПМ міометрія [Veklich T.O., 2013, 2014; Mazur I.I., 2018].

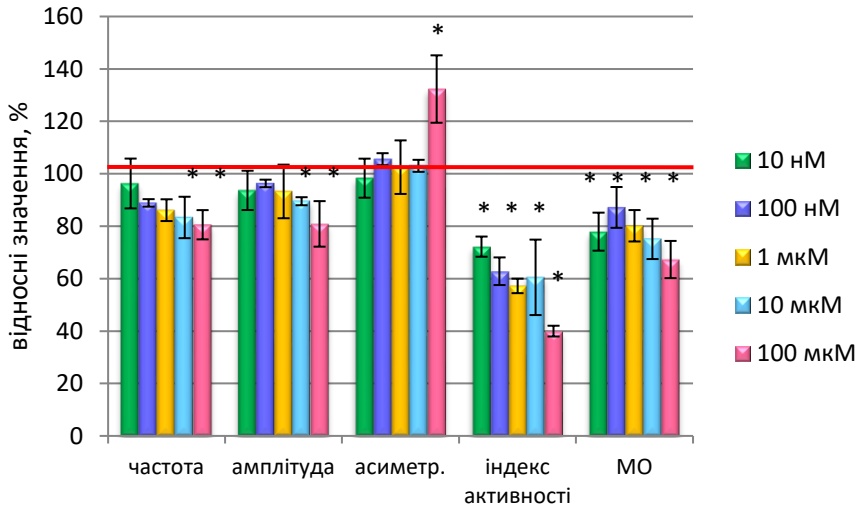


Рис. 14 Окремі параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів за умови кумулятивного збільшення концентрації (10 нМ – 100 мкМ) калікс[4]арену С-90. За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі (вісь ординат), ($M \pm m$, $n=5-7$).

* - $p < 0.05$ – різниця достовірна щодо контролю.

міометрія на фоні підвищеної тонічної складової скорочувальної реакції (у середньому на 283,3% щодо контролю, $n=6$, $p < 0.05$).

Встановлено, що кумулятивне підвищення концентрації калікс[4]арену С-90 (10^{-8} - 10^{-4} М) в омиваючому розчині спричиняє дозо-залежне пригнічення спонтанної скоротливої активності ГМ міометрія, яке відображалось у зниженні амплітуди та частоти скорочень (рис. 14). Зокрема, виявлено, що цей калікс[4]арен не змінює максимальну швидкість наростання скорочень dF_{max}/t_{max} та V_{nc} , втім уповільнює процес розслаблення (достовірно знижує dF_{max}/t_{maxr} та V_{nr} за присутності С-90 у концентраціях 10^{-5} і 10^{-4} М). Отримані результати дослідження функціонування ГМ міометрія в умовах кумулятивного внесення до омиваючого розчину калікс[4]арену С-90 свідчать, що ця сполука впливає на процеси, які залучені до регуляції внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} .

Здійснено вивчення закономірностей некумулятивної дії С-90 (10^{-5} М) на спряження збудження-скорочення і гальмування-розслаблення міометрія. Внесення С-90 в омиваючий м'язи розчин спричиняло підвищення їх базального напруження з пригніченням скорочувальної активності на його тлі: амплітуда скорочень знижувалась у середньому на 22,1 % ($n=9$, $p < 0.05$), а їх частота не зазнавала достовірних змін.

Розрахунками кінетичних параметрів спонтанних скорочень встановлено, що V_{nc} не змінювалась, а V_{nr} знижувалась у середньому на 27% ($n=9$, $p < 0.05$).

Аплікування калікс[4]арену С-716 (100 мкМ) на максимумі фазного K^{+} -індукованого (80 мМ) скорочення в умовах блокування Ca^{2+} -запасаючої функції внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо (за дії блокатора Ca^{2+} -кальцієвої помпи СР тапсигаргину (1 мкМ) і мітохондріального протонифору СССР (2 мкМ)) спричиняло збільшення швидкості процесу розслаблення

Ймовірно, що одержане за передінкубації міометрія щурів з калікс[4]ареном С-90 вірогідне зниження швидкості V_{nr} може зумовлюватись саме спрямованим інгібуванням ПМКА.

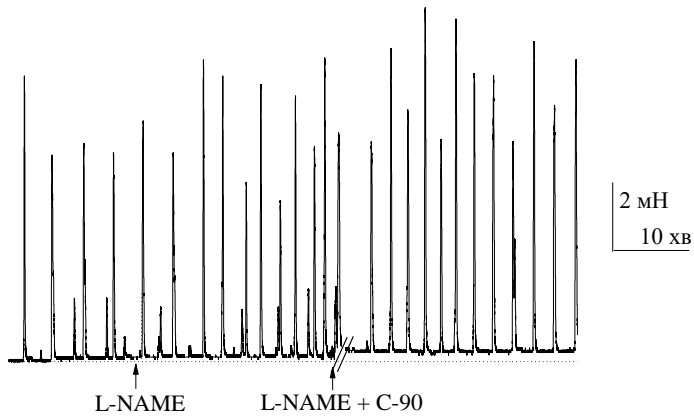


Рис. 15 Спонтанна скорочувальна активність міометрія щурів: порівняння типових скорочень в контролі, за умови попередньої інкубації в присутності неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME (100 мкМ) та сукупної дії L-NAME (100 мкМ) та калікс[4]арену С-90 (10 мкМ).

На тлі дії неселективного інгібітора NO-синтаз L-NAME (100 мкМ) калікс[4]арен С-90 не змінював амплітуду спонтанних скорочень, а також кінетику фази розслаблення (рис. 15). Він у однаковій мірі спричиняв зниження максимальної сили оксидоцинових (0,1 МО) та K^+ -викликаних (80 мМ) скорочень, не впливаючи на характер наростання сили скорочувальних відповідей.

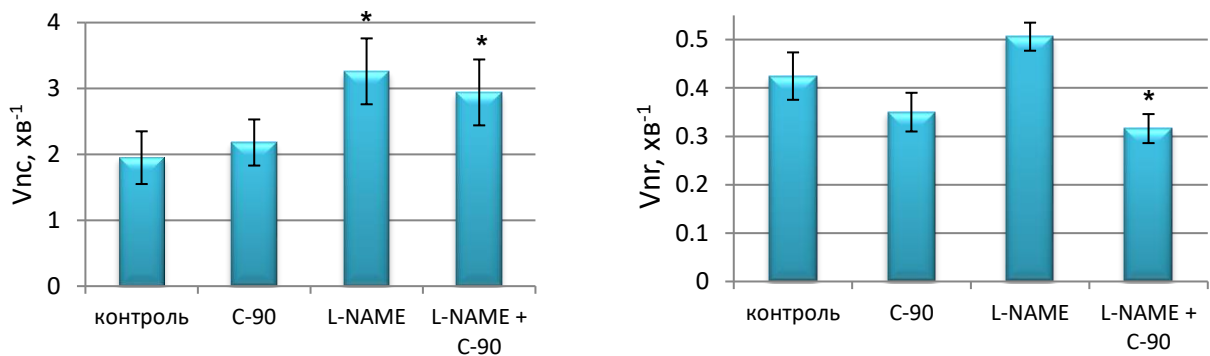


Рис. 16 Нормовані максимальні швидкості V_{nc} та V_{nr} (xv⁻¹) оксидоцин-викликаних (0,1 МО) скорочень міометрія у контролі, за умови дії окремо калікс[4]арену С-90 (10 мкМ), L-NAME (0,1 мМ), а також при сумісній дії С-90 (10 мкМ) і L-NAME (0,1 мМ), ($M \pm m$, $n=4-6$).

* - $p < 0.05$ – різниця достовірна відносно контролю.

Швидкість розслаблення ГМ за дії С-90 зазнавала різноспрямованих змін залежно від характеру стимулювання скоротливих відповідей (рис.16): у випадку оксидоцин-індукованих скорочень вона знижувалась (у середньому на 22,9%, $n=6$, $p < 0,05$), а для K^+ - викликаних скорочень – зростала (у середньому на 19,4%, $n=6$, $p < 0,05$). Таким чином, блокування синтезу NO призводить до усунення інгібування як спонтанних, так і викликаних скорочень міометрія під дією калікс[4]арену С-90.

Тож у інгібування скорочень міометрія під дією калікс[4]арену С-90, можуть робити внесок декілька складників. По-перше, зняття інактивації синтезу NO, індуковане блокуванням ПМКА. Також, за умови підвищення концентрації іонів Ca^{2+} у примембранній області і поблизу СР ймовірними є активація Ca^{2+} -активованих K^+ -каналів та пригнічення депо-керованого входу Ca^+ внаслідок перевантаження цього депо.

Схему ймовірних механізмів впливу каліксаренів-інгібіторів ПМКА на вісцеральні ГМ наведено на **рис. 17**.

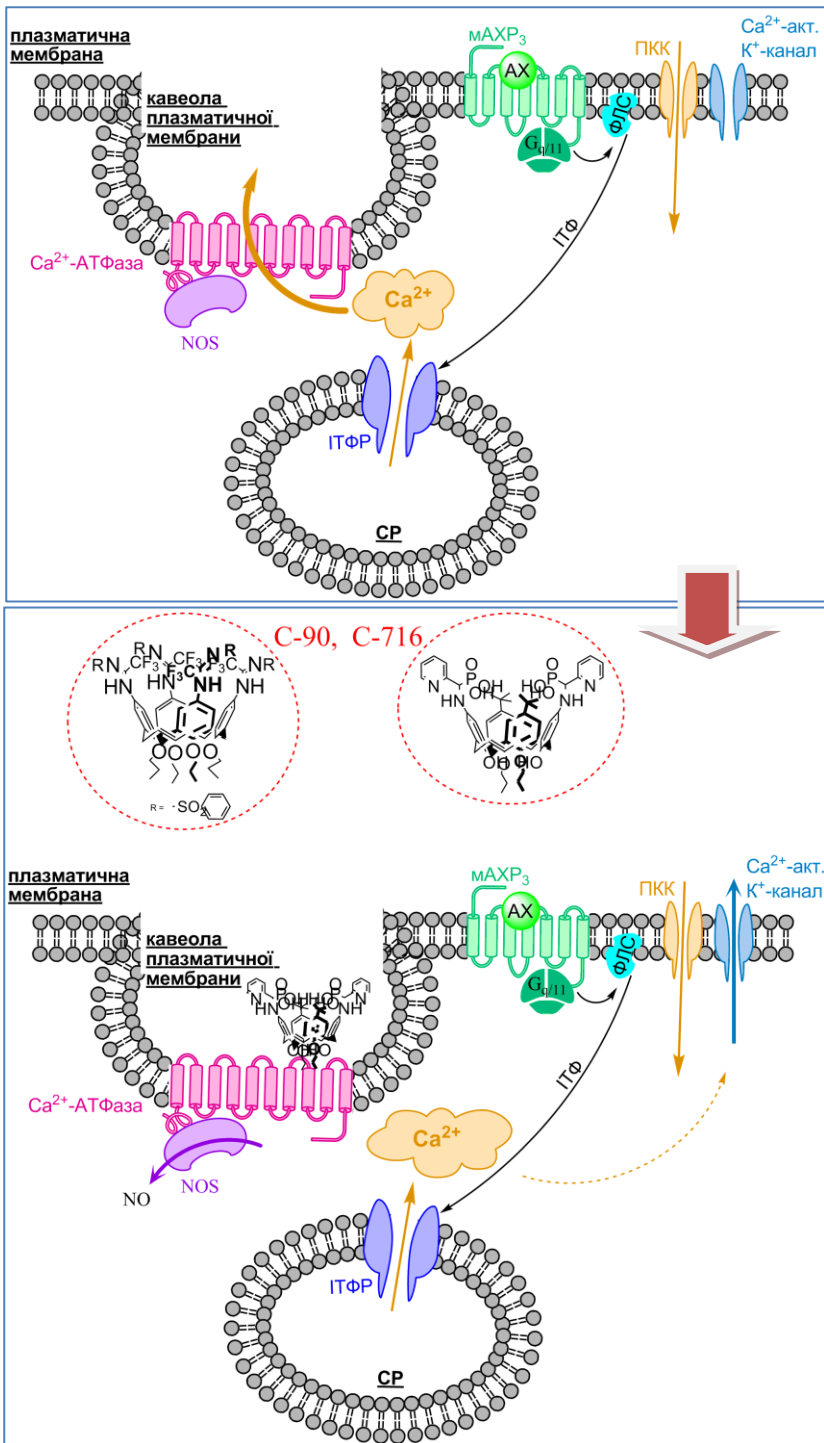


Рис.17 Схема ймовірних механізмів дії *in vitro* калікс[4]аренів-інгібіторів Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани (С-90 і С-716) на тканини вісцеральних гладеньких м'язів. Позначення: CP – саркоплазматичний ретикулум; ПКК – потенціал керований Ca²⁺-канал L-типу; Ca²⁺-акт. K⁺-канал – Ca²⁺-активований K⁺-канал; ITФР – рецептор інозитол-1,4,5-трисфосфату (ITФ); ФЛС – фосфоліпаза С; NOS – синтаза оксиду азоту (NO); MAHR₃ – мускариновий ацетилхоліновий рецептор типу 3.

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 *in vitro*, *in vivo* та *in silico* було детально вивчено закономірності впливу і визначено механізми дії

вибраних нанорозмірних матеріалів на вісцеральні гладенькі м'язи.

1. При вивченні термомеханокінетичних властивостей оборотної високоеластичної деформації та релаксації препаратів кільцевих гладеньких м'язів шлунку встановлено, що показники максимальної (ΔA) та напівмаксимальної ($\Delta A_{1/2}$) роботи куполоподібно змінюються, досягаючи мінімальних значень при 31-40 °С.

2. Із застосуванням рівняння Віганда-Снайдера виявлено, що оборотні малі ($\Delta L/L_p \leq 20\%$) деформації (не залежно від температур) та значні ($\Delta L/L_p \approx 50\%$) деформації (у діапазоні температур $30^\circ\text{C} < T < 40^\circ\text{C}$) гладеньких м'язів шлунку не супроводжуються змінами у впорядкованості тензометричної системи ($(\partial S / \partial \Delta L)_T = 0$); при великих деформаціях за низьких та підвищених температур спостерігається інверсія знаку ентропійних ефектів: $(\partial S / \partial \Delta L)_T > 0$ при $< 31^\circ\text{C}$ та $(\partial S / \partial \Delta L)_T < 0$ при $> 37^\circ\text{C}$.

3. Встановлено, що суспензії нанорозмірного матеріалу TiO_2 трьох розмірних груп, які містять різні співвідношення сумішей поліморфів рутилу і анатазу: 1-3 нм (рутил), 4-8 нм (анатаз) та 21 нм (співвідношення рутил:анатаз=1:4) за умов некумулятивної ($5 \cdot 10^{-2}$, 10^{-5} мг/мл) та кумулятивної (10^{-7} – 10^{-4} мг/мл) дії, є ефективними модуляторами спонтанної і викликанної скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів. Зокрема, TiO_2 модулює пресинаптичні і постсинаптичні механізми регуляції за участі нейрональних ацетилхолінових нікотинових, гістамінових і ГАМК-рецепторів з одного боку, а з іншого боку експресованих власне у гладеньком'язових клітинах ацетилхолінових мускаринових, гістамінових та брадикінінових рецепторів.

4. Показано відсутність впливу наночастинок TiO_2 на процеси спряження збудження-скорочення, які індукуються ендogenousним ацетилхоліном за умови активації його вивільнення деполаризацією тканини гладеньких м'язів. Водночас виявлено модуляцію цим наноматеріалом скорочень, активованих екзогенним ацетилхоліном та пригнічення їх тонічної складової агоністом іонотропних ацетилхолінових рецепторів нікотинном.

5. Виявлено, що попереднє блокування Ca^{2+} -каналів L-типу D-600 у значній мірі усуває активаційний ефект високими концентраціями TiO_2 ацетилхолін-викликаних скорочень, що вказує на індуковану наночастинами активацію надходження іонів Ca^{2+} через ці канали.

6. Встановлено, що нанорозмірний матеріал TiO_2 не змінює мобілізацію іонів Ca^{2+} з інозитол-1,4,5-трисфосфат- та ріанодин-чутливих пулів саркоплазматичного ретикулуму міоцитів шлунку.

7. Виявлено, що блокування роботи дихального ланцюга мітохондрій усуває ефекти TiO_2 на ацетилхолін-викликані скорочення гладеньких м'язів шлунку. У м'язах міометрія TiO_2 усуває ефекти блокування АТФ-чутливих K^+ -каналів, тож мішенню дії TiO_2 є енерго/АТФ-залежні процеси в міоцитах.

8. Дослідженнями *in silico* встановлено, що нанорозмірний матеріал TiO_2 здатний взаємодіяти з різною спорідненістю із декількома сайтами позаклітинної

частини метаботропних ГАМК_B-, гліцинових, M₂- та M₃-ацетилхолінових рецепторів.

9. Елементним аналізом показано, що за умов інтрагастрального введення *in vivo* щурам нано-TiO₂ проникає в тканини та нерівномірно накопичується у різних органах: найбільшу кількість Ti накопичують тканини вісцеральних гладеньких м'язів (шлунок > товстий кишечник > матка) та нирок. Тензометричними дослідженнями та механокінетичним аналізом встановлено, що тривале (30 і 100 діб) навантаження організму *in vivo* щурів TiO₂ спричиняє неоднорідний (часозалежний і тканино-залежний) вплив на спонтанну і викликану скоротливу активність вісцеральних гладеньких м'язів. Термодинамічним аналізом виявлено, що в умовах хронічної дії TiO₂ обумовлює суттєві зміни процесів високоеластичної деформації у гладеньком'язовій тканині шлунку за великих деформацій ($\Delta L/L_0 \approx 50\%$).

10. Виявлено, що викликані ацетилхоліном скорочення гладеньких м'язів товстого кишечника є чутливими до дії калікс[4]арену C-99 (100 мкМ) в умовах попереднього блокування Na⁺,K⁺-АТФази убаїном (100 мкМ) порівняно з дією 200 мкМ убаїну: C-99 спричиняє суттєве пригнічення фазного і збільшення тонічного компонента скорочень, а також зниження нормованої максимальної швидкості фази розслаблення.

11. Показано, що калікс[4]арен C-107 зберігає свої інгібіторні якості щодо Na⁺,K⁺-АТФази в умовах цілісного організму. Встановлено, що цей калікс[4]арен в умовах хронічного впливу *in vivo* (6,5 місяців) спричиняє пригнічення убаїн-чутливої Na⁺,K⁺-АТФ-азної активності препаратів плазмалеми гепатоцитів щурів. Структурний фрагмент калікс[4]арену C-107 (сполука М-3) в разі використання *in vivo*, як і у випадку *in vitro*, не впливає на функціонування натрієвої помпи.

12. Із використанням механокінетичного аналізу викликаних K⁺-деполяризацією і ацетилхоліном скорочень встановлено, що калікс[4]арен C-107 при аплікуванні *in vitro* та в умовах хронічної дії *in vivo* спричиняє подібні зміни скорочувальної функції гладеньких м'язів товстого кишечника.

13. Доведено, що блокування синтезу оксиду азоту призводить до усунення інгібування як спонтанних, так і викликаних скорочень міометрія під дією калікс[4]арену C-90.

14. Встановлено, що підвищення тонічної складової K⁺-індукованого скорочення гладеньких м'язів міометрія під дією калікс[4]арену C-716 (за попереднього блокування обміну іонів Ca у внутрішньоклітинних Ca²⁺-депо) пов'язане з підвищеною концентрацією іонів Ca²⁺ в міоцитах, тоді як збільшення нормованої швидкості розслаблення за цих умов, ймовірно, обумовлюється суттєвою активацією синтезу оксиду азоту.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Богуцька К.І., Цимбалюк О.В., Данилова В.М. Особливості функціонування міози нової АТРази серцевого м'яза. Биополимеры и клетка. 2002; 18 (4): 297-300. (Особистий внесок: участь у проведенні препаративних процедур та експериментів, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).

2. Богуцька К.І., **Цимбалюк О.В.**, Данилова В.М., Мірошніченко М.С. Вплив рН середовища на АТФазну активність міозину різних типів м'язів. Фізіологічний журнал. 2003; 49 (6): 52-55. *(Особистий внесок: участь у проведенні препаративних процедур та експериментів, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
3. **Цимбалюк О.В.**, Онуфрійчук О.В., Векліч Т.О., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу оубаїну і каліксарен біс-гідроксиметилфосфонові кислоти на активність Na^+/K^+ -АТФази на міханокінетику процесу “скорочення-розслаблення” гладенького м'язу. Фізика живого. 2006; 14 (1): 53-72. *(Особистий внесок: аналіз літератури, участь у розробці схеми експериментів, проведення експериментів з вивчення скорочувальної активності м'язів, кінетичні розрахунки, аналіз і узагальнення результатів тензометричних експериментів, участь у написанні статті).*
4. Онуфрійчук О.В., **Цимбалюк О.В.**, Мірошніченко М.С., Костерін С.О. Механокінетика “скорочення-розслаблення” кільцевого м'язу сліпої кишки (*saesit*) щурів. Фізика живого. 2006; 14 (3): 63-75. *(Особистий внесок: аналіз літератури, розробка схеми експериментів, проведення експериментів з вивчення скорочувальної активності гладеньких м'язів, кінетичні розрахунки, аналіз і узагальнення результатів, участь у написанні статті).*
5. **Цимбалюк О.В.**, Онуфрійчук О.В., Мірошніченко М.С., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарен біс-гідроксиметилфосфонові кислота змінює механокінетичні параметри скорочення кільцевих гладеньких м'язів *saesit* щура, що викликані ацетилхоліном. Доповіді НАН України. 2007; 9: 167-173. *(Особистий внесок: аналіз літератури, розробка моделі дослідження та схеми експериментів, проведення експериментів з вивчення скорочувальної активності гладеньких м'язів, кінетичні розрахунки, аналіз і узагальнення результатів, участь у написанні статті).*
6. Онуфрійчук О.В., **Цимбалюк О.В.**, Мірошніченко М.С., Родік Р.В., Бойко В.І. Вплив каліксарену С107 та його фрагменту М3 на механокінетичні параметри процесу “скорочення-розслаблення” гладеньких м'язів *saesit* щура. Науковий вісник Волинського державного університету імені Лесі Українки. 2007; 5: 41-46. *(Особистий внесок: аналіз літератури, розробка моделі дослідження та схеми експериментів, проведення експериментів з вивчення скорочувальної активності гладеньких м'язів, кінетичні розрахунки, аналіз і узагальнення результатів, участь у написанні статті).*
7. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О., Кальченко В.І., Родік Р.В. Порівняльне вивчення в дослідіах *in vitro* та *in vivo* впливу каліксарену С107 та убаїну на Na^+/K^+ -АТФ-азну активність в плазматичних мембранах гепатоцитів щурів. Укр. біохім. журн. 2010; 82 (4): 78-85. *(Особистий внесок: аналіз літератури, розробка схеми експериментів, препаративні процедури, експерименти з визначення АТФ-азних активностей, аналіз та обробка результатів експериментів, узагальнення результатів, участь у написанні статті).*
8. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О., Кальченко В.І., Родік Р.В. Механокінетичні параметри скоротливої активності гладеньких м'язів *saesit* щура за умов

- хронічної дії каліксарену C107 *in vivo*. Фізика живого. 2010; 18 (1): 47-51. (Особистий внесок: аналіз літератури, розробка моделі дослідження та схеми експериментів, проведення експериментів з вивчення скорочувальної активності гладеньких м'язів, кінетичні розрахунки, аналіз і узагальнення результатів, участь у написанні статті).
9. **Цимбалюк О.В.**, Мартынюк В.С. Влияние магнитного поля крайне низкой частоты на вызванную K^+ -деполяризацией и ацетилхолином сократительную активность интестинальных гладких мышц. *Фізика живого*. 2011; 19 (1): 20-26. (Особистий внесок: аналіз літератури, участь у розробці схеми експериментів, експерименти з вивчення скорочувальної активності гладеньких м'язів, кінетичні розрахунки, участь у написанні статті).
 10. Меленевська Н.В., **Цимбалюк О.В.**, Романенко О.В., Давидовська Т.Л. Нефармакологічна корекція ритмоактивності гладеньких м'язів кишечника. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Регуляція фізіологічних функцій». 2012; 1: 36-39. (Особистий внесок: аналіз літератури, участь у проведенні експериментів з вивчення скорочувальної активності м'язів, кінетичні розрахунки, участь у написанні статті).
 11. **Цимбалюк О.В.**, Мартынюк В.С. Вплив магнітного поля наднизької частоти на спонтанну скоротливу активність інтестинальних гладеньких м'язів. Вісник Черкаського університету. Серія «Біологічні науки». 2012; 2 (215): 128-133. (Особистий внесок: аналіз літератури, участь у розробці схеми експериментів, експерименти з вивчення скорочувальної активності м'язів, кінетичні розрахунки, аналіз результатів, участь у написанні статті).
 12. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Термомеханокінетика високоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щура I. Динамічні закономірності розтягування гладеньких м'язів шлунка. *Studia Biologica*. 2012; 6 (2): 87-98.
 13. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Термомеханокінетика високоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щура. II. Явище гістерезису у випадку розтягування гладеньких м'язів шлунка та товстого кишечника. *Studia Biologica*. 2012; 6 (3): 73-84.
 14. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Na^+, K^+ -АТФ-аза, ендогенні кардіостероїди та їх трансдукторна роль. *Укр. біохім. журн.* 2012; 84 (1): 5-17.
 15. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Термомеханокінетика високоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щура. III. Робота високоеластичного розтягування гладеньких м'язів антрального відділу шлунка. *Studia Biologica*. 2013; 7 (1): 21-30.
 16. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Застосування рівняння Віганда-Снайдера до термодинамічної інтерпретації високоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунка. *Доповіді НАН України*. 2013; 6: 162-167.
 17. Pavlovsky V.I., **Tsybalyuk O.V.**, Martynyuk V.S., Kabanova T.A., Semenishyna E.A., Khalimova E.I., Andronati S.A. Analgesic Effects of 3-Substituted Derivatives of 1,4-Benzodiazepines and their Possible Mechanisms. *Neurophysiology*. 2013; 45 (5): 463-468. (Особистий внесок: розробка схеми тензометричних

експериментів, тензометричні експерименти, аналіз та обробка результатів тензометричних експериментів, участь у написанні статті).

18. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Вплив каліксарену С-90 на скоротливу активність гладеньких м'язів міометрія щурів. *Studia Biologica*. 2013; 7(2): 87-98.
19. **Цимбалюк О.В.** Дослідження кінетичних закономірностей впливу оксиду азоту на викликані окситоцином скорочення гладеньких м'язів міометрія. *Вісник Черкаського університету. Серія «Біологічні науки»*. 2013; 2 (255): 121-126.
20. Костенко В.І., Чамор Т.Г., **Цимбалюк О.В.**, Давидовська Т.Л. Модуляція скорочувальної активності гладеньких м'язів кишечника щурів в умовах дії низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання. *Вісник Східноєвропейського національного університету. Серія «Біологічні науки»*. 2014; 1 (13): 24-29. *(Особистий внесок: участь у розробці схеми тензометричних експериментів, проведення тензометричних експериментів, обробка результатів експериментів, участь у написанні статті).*
21. **Цимбалюк О.В.** Порівняльний аналіз механокінетики скоротливої активності гладеньких м'язів міометрія щурів за дії каліксарену С-99 та убаїну. *Studia Biologica*. 2014; 8 (1): 63-72.
22. **Цимбалюк О.В.**, Науменко А.М., Нипорко О.Ю., Давидовська Т.Л., Скришевський В.А. Збудження-гальмування гладеньких м'язів шлунку при взаємодії з нанорозмірним матеріалом диоксиду титану. *Доповіді НАН України*. 2015; 10: 85-92. *(Особистий внесок: розробка схеми експериментів, проведення експериментів із вивчення скорочувальної активності гладеньких м'язів та кінетичних розрахунків, аналіз та обробка отриманих результатів, узагальнення результатів, участь у написанні статті).*
23. **Цимбалюк О.В.** Вплив каліксарену С-99 на скоротливу активність м'язів товстого кишечника щурів. *Studia Biologica*. 2016; 10 (3-4): С.33-46.
24. **Tsybalyuk O.V.**, Naumenko A.M., Skoryk M.A., Nyporko A.Y., Davidovska T.L., Skryshevsky V.A. Histamine- and nicotine-stimulated modulations of mechanic activity of smooth muscles in gastrointestinal tract at the impact of nanosized TiO₂ material. *Biopolymers and Cell*. 2016; 32(2): 140-149. *(Особистий внесок: аналіз літературних джерел, розробка схеми експериментів, проведення експериментів із вивчення скорочувальної активності гладеньких м'язів та кінетичних розрахунків, аналіз та обробка отриманих результатів, узагальнення результатів, участь у написанні статті).*
25. Naumenko A.M., Nyporko A.Yu., **Tsybalyuk O.V.**, Nuryshchenko N.Ye., Voiteshenko I.S., Davidovska T.L. Molecular docking of nanosized titanium dioxide material to the extracellular part of GABA_B-receptor. *Studia Biologica*. 2016; 10 (3-4): 5-16. *(Особистий внесок: аналіз літературних джерел, участь у проведенні експериментів, участь у написанні та оформленні статті).*
26. **Tsybalyuk O.V.**, Naumenko A.M., Rohovtsov O.S., Skoryk M.O., Voyteshenko I.S., Skryshevsky V.A., Davydovska T.L. Titanium dioxide modulation of the contractibility of visceral smooth muscles *in vivo*. *Nanoscale Research Letters*.

- 2017; 12: 129, DOI: 10.1186/s11671-017-1865-7 (*Особистий внесок: аналіз літератури, розробка моделі дослідження і схеми експериментів, проведення тензометричних експериментів та кінетичних розрахунків, аналіз та обробка результатів, узагальнення результатів, участь у написанні статті*).
27. Naumenko A. M., Dmytrenko O. V., Shapoval L. M., **Tsybalyuk O. V.**, Sagach V. F., Davydovska T. L. Effects of Injections of Nanostructured Titanium Dioxide into the Rat Medullary Nuclei Involved in Cardiovascular Control. *Neurophysiology*. 2018; 50 (6): 409-414. doi:10.1007/s11062-019-09772-1 (*Особистий внесок: аналіз літератури, участь у підготовці зразків наноматеріалу, участь в аналізі і обробці отриманих результатів, участь у написанні статті*).
 28. **Tsybalyuk O.V.** Kinetics of relaxation of rat myometrium in conditions of inhibition of plasma membrane calcium pump and systems of active Ca^{2+} transport of intracellular Ca^{2+} -depot. *Studia Biologica*. 2018; 12 (2): 3-12.
 29. **Tsybalyuk O.V.**, Naumenko A.M., Davidovska T.L. The influence of nano-TiO₂ on the functioning of gastric smooth muscles: an *in vitro* and *in silico* studies. *Studia Biologica*. 2019; 13 (1): 3-26. (*Особистий внесок: аналіз літератури, розробка моделі дослідження та схеми експериментів, проведення тензометричних експериментів та кінетичних розрахунків, участь у проведенні молекулярного докінгу, аналіз та обробка отриманих результатів, узагальнення результатів, участь у написанні статті*).
 30. Онуфрійчук О.В., **Цимбалюк О.В.** Вплив інгібіторів Na^+ , K^+ -АТРази на міханокінетику скорочення-розслаблення гладенького м'язу *саесит* щура. IX Український біохімічний з'їзд, 24-27 жовтня, Харків, 2006; Укр. біохім. журн. 2006; 78 (6): 113.
 31. Онуфрійчук О.В., **Цимбалюк О.В.** Вплив фізико-хімічних факторів на механокінетичні параметри процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів. IV з'їзд Українського біофізичного товариства 19-21 грудня, Донецьк, 2006. – С. 401-402.
 32. **Цимбалюк О.В.**, Онуфрійчук О.В. Кінетичний аналіз процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів. IV з'їзд Українського біофізичного товариства 19-21 грудня, Донецьк, 2006. – С. 407-408.
 33. Онуфрійчук О.В., **Цимбалюк О.В.** Вплив інгібіторів натрієвої помпи на механокінетику “скорочення-розслаблення” гладенького м'язу *саесит* щурів. III Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь та поступ біології» 5-6 листопада, Львів, 2007. – С. 16-17.
 34. **Tsybalyuk O.V.**, Shelyuk O.V., Miroshnichenko N.S. Comparative study of influence of ouabain and calixarene bis-hydroxymethylphosphonic acids (C99 and C107) on the mechanokinetics of process contraction-relaxation of intestinal smooth muscles. *Vth International Symposium «Supramolecular Systems in Chemistry and Biology»* May 12-16, 2009, Kyiv, Ukraine. – P. 72.
 35. **Tsybalyuk O.V.**, Davydovska T.L., Miroshnichenko M.S., Radchenko N.V. Study of the kinetic characteristics of Ca^{2+} -dependent tension changes of skinned smooth muscles *caecum*. «*Biological motility-2010. From fundamental*

- achievements to nanotechnologies*», Pushchino, Moscow region, Russia, 10-15 may, 2010. – P.303-306.
36. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О., Родік Р.В., Кальченко В.І. Дослідження впливу убаїну та каліксарену С107 на активність Na^+, K^+ -АТФ-ази в плазматичних мембранах печінки щура в умовах *in vivo* та *in vitro*. *X Український біохімічний з'їзд*, 13-17 вересня, Одеса, 2010; Укр. біохім. журн. 2010; 82 (4) (додаток 1): С. 112-113.
 37. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Дослідження хронічної дії каліксарену С107 на кінетичні характеристики скоротливої активності гладеньких м'язів саесум щура. *V з'їзд Українського біофізичного товариства 22-25 червня*, Луцьк, 2011. – С. 134.
 38. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Особливості дії інгібітора натрієвої помпи каліксарену С107 в умовах *in vivo*. *Міжнародна науково-практична конференція «Біологічно активні речовини»*, 23-28 травня, Новий Світ, 2011. – С. 621-622.
 39. Мартынюк В.С., **Цимбалюк О.В.** Влияние слабого магнитного поля крайне низкой частоты на сократительную активность гладких мышц. *Междисциплинарная конференция «Адаптационные стратегии живых систем»*, 11-16 июля, Новый Свет, 2012. – С. 287.
 40. **Tsybalyuk O.V.**, Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Chronic action of calixarene C-107 under *in vivo* conditions on Na^+, K^+ -ATPase activity of rat hepatocyte plasmatic membranes. *III International Symposium: Intracellular Signaling & Bioactive Molecules Design*, September 2012, Lviv, Ukraine. – P.150.
 41. **Tsybalyuk O.V.**, Martynyuk V.S., Tseyslyer Yu.V., Shelyuk O.V., Nurishenko N.E. Modification of functional state of muscle tissue upon influence extremely low frequency of electromagnetic field. *Biological Motility: Fundamental and Applied Science*, Pushchino, Moscow region, Russia, May 11–15, 2012. – P. 122-126.
 42. **Tsybalyuk O.V.**, Kosterin S.O. Thermomechanokinetics of viscoelastic deformation of smooth muscles in rat stomach. *Advances in Pharmacology and Pathology of the Digestive Tract, 4th International Scientific Conference*. 26-28 september 2012, Kyiv. – P. 64.
 43. Павловский В.И., **Цимбалюк О.В.**, Мартынюк В.С., Кабанова Т.А., Халимова Е.И. Анальгетическая активность 3-пропанокси-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она и выявление механизма, лежащего в его основе. *Міжнародна науково-практична конференція «Біологічно активні речовини»*, 27 травня – 1 червня, Новий Світ, 2013: матер. конф., т.1. – С.439.
 44. Костерин С.А., Бабич Л.Г., Шлыков С.Г., Веклич Т.А., Лабынцева Р.Д., **Цимбалюк О.В.**, Шкрабак А.А., Бевза А.В., Бевза А. А., Родик Р.В., Черенок С.О., Кальченко О.И., Кальченко В.И. Каликс[4]арены как эффекторы атр-гидролаз *Міжнародна науково-практична конференція «Біологічно активні речовини»*, 27 травня – 1 червня, Новий Світ, 2013: матер. конф., т.2. – С.175.
 45. **Цимбалюк О.В.**, Павловский В.И., Мельник М.И., Мартынюк В.С. Изучение действия непептидных синтетических антагонистов брадикининовых рецепторов на гладкие мышцы желудка *Міжнародна науково-практична*

конференція «Біологічно активні речовини», 27 травня – 1 червня, Новий Світ, 2013: матер. конф., т.1. – С.319.

46. Скришевський В.А., **Цимбалюк О.В.**, Нипорко О.Ю., Давидовська Т.Л. Дослідження механізмів впливу наночастинок TiO_2 на скорочувальну активність гладеньких м'язів шлунку. *IV міжнародна конференція «Медична фізика – сучасний стан, проблеми, шляхи розвитку. Новітні технології»*, 23-24 жовтня, Київ, 2014. – С. 41.
47. Naumenko A.M., **Tsymbalyuk O.V.**, Nyporko A.Yu., Davidovska T.L., Skryshevsky V.A. Excitation processes in stomach smooth muscles under action of TiO_2 nanoparticles. *XI Міжнародна конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»*, 20 – 23 квітня, Львів, 2015. – С.118.
48. **Tsymbalyuk O.V.**, Nyporko A.Yu., Naumenko A.M., Davidovska T.L., Skryshevsky V.A. TiO_2 nanoparticles as modulators of stomach smooth muscles function. *XIX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г.Костюка*, 24 - 26 травня, Львів, 2015. – С.19.
49. Науменко А.М., **Цимбалюк О.В.**, Скорик М.А., Нипорко О.Ю., Давидовська Т.Л., Скришевський В.А. Пресинаптична модуляція процесів збудження та гальмування в інтестеціальних гладеньких м'язах за дії нанорозмірного матеріалу TiO_2 . *V Міжнародна конференція «Медична фізика - сучасний стан, проблеми, шляхи розвитку»*, 24 - 25 вересня, Київ, 2015. – С. 52.
50. Naumenko A.M., **Tsymbaluk O.V.**, Skoryk M.A., Nyporko O.Yu., Davidovska T.L., Skryshevsky V.A. Modulations of molecular signaling mechanisms in smooth muscles excitable cells by titanium dioxide nanoscale material. *IV Міжнародна науково-практична конференція «Нанотехнології та наноматеріали»*, 24 - 27 серпня, Львів, 2016. – С. 491.
51. Naumenko A.M., Nyporko A.Yu., **Tsymbalyuk O.V.**, Voiteshenko I.S., Davidovska T.L. The analysis of potential binding sites of TiO_2 nanoparticles docked to the extracellular part of $\text{GABA}_{\text{B}1\text{a}}$. *V міжнародна науково-практична конференція «Нанотехнології та наноматеріали»*, 23 - 26 серпня, Чернівці, 2017. – С. 635.
52. Naumenko A.M., **Tsymbalyuk O.V.**, Voiteshenko I.S., Davydovska T.L. Cholinergic excitation of the gastrointestinal tract smooth muscles due to the action of nanostructured TiO_2 , and its molecular docking to the extracellular parts of muscarinic acetylcholine receptors M2 and M3 types. *VI міжнародна науково-практична конференція «Нанотехнології та наноматеріали»*, 27-30 серпня, Київ, 2018. – С. 80.
53. **Цимбалюк О.В.**, Науменко А.М., Давидовська Т.Л. Нанорозмірні матеріали як модулятори скорочувальної функції гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту. *VII з'їзд Українського біофізичного товариства*, 29-31 жовтня, Київ, 2018. – С.10.
54. Naumenko A.M., **Tsymbalyuk O.V.**, Rohovtsov O.O., Skoryk M.A., Voiteshenko I.S., Davydovska T.L., Skryshevsky V.A. The state of spontaneous contractile activity of *caecum* and myometrium smooth muscles under the actions of nanostructured TiO_2 *in vivo*. *XV International scientific conference for students and*

PhD students. «Youth and progress of biology», dedicated to the 135th anniversary of J. O. Parnas. Lviv, Ukraine. April 9–11, 2019. – P. 143-144.

АНОТАЦІЯ

Цимбалюк О.В. Біофізичні механізми дії нанорозмірних матеріалів на механокінетику вісцеральних гладеньких м'язів. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2019.

У дисертаційній роботі проведено дослідження закономірностей та механізмів дії нанорозмірних матеріалів на механокінетику вісцеральних гладеньких м'язів. Встановлено, що суспензії нанорозмірного матеріалу TiO_2 трьох розмірних груп, які містять різні співвідношення сумішей поліморфів рутилу і анатазу за умов некумулятивної та кумулятивної дії, є ефективними модуляторами спонтанної і викликанної скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів. Зокрема, TiO_2 модулює пресинаптичні і постсинаптичні механізми регуляції скорочення гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту за участі ацетилхолінових, гістамінових, а також ГАМК-рецепторів. Виявлено індуковану високими концентраціями наночастинок активацію надходження іонів Ca^{2+} через Ca^{2+} -канали L-типу. Доведено, що нанорозмірний матеріал TiO_2 не змінює мобілізацію іонів Ca^{2+} з пулів саркоплазматичного ретикулуму міоцитів шлунку. Виявлено, що блокування роботи дихального ланцюга мітохондрій усуває ефекти TiO_2 на ацетилхолін-викликані скорочення. У м'язах міометрії TiO_2 усуває ефекти блокування АТФ-чутливих K^+ -каналів. Дослідженнями *in silico* встановлено, що нанорозмірний матеріал TiO_2 здатний взаємодіяти з позаклітинною частиною метаболічних рецепторів. Тривале (30 і 100 діб) навантаження організму *in vivo* щурів TiO_2 спричиняє неоднорідний (часозалежний і тканино-залежний) вплив на спонтанну і викликану скоротливу активність вісцеральних гладеньких м'язів. Термодинамічним аналізом виявлено, що в умовах хронічної дії TiO_2 спричиняє суттєві зміни процесів високоеластичної деформації у м'язовій тканині шлунку за великих деформацій.

Досліджено закономірності та механізми дії калікс[4]аренів – інгібіторів первинного активного іонного транспорту плазматичної мембрани: натрієвої помпи (С-99 і С-107) та кальцієвої помпи (С-90 і С-716).

Ключові слова: механокінетика, термодинаміка, вісцеральні гладенькі м'язи, нанорозмірні матеріали, діоксид титану, калікс[4]арени.

АННОТАЦИЯ

Цимбалюк О.В. Биофизические механизмы действия наноразмерных материалов на механокинетику висцеральных гладких мышц. – на правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени доктора биологических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2019.

В диссертационной работе проведено исследование закономерностей и

механизмов действия наноразмерных материалов на механокинетику висцеральных гладких мышц. Установлено, что суспензии наноразмерного материала TiO_2 трех размерных групп, которые содержат различные соотношения смесей полиморфов рутила и анатаза, в условиях некумулятивные и кумулятивного действия, эффективны модуляторами спонтанной и вызванной сократительной активности висцеральных гладких мышц. В частности, TiO_2 модулирует пресинаптические и постсинаптические механизмы регуляции сокращения гладких мышц желудочно-кишечного тракта при участии ацетилхолиновых, гистаминовых, а также ГАМК-рецепторов. Выявлено индуцированной наночастицами активацию поступления ионов Ca^{2+} через Ca^{2+} -каналы L-типа. Доказано, что наноразмерный материал TiO_2 не меняет мобилизацию ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикула миоцитов желудка. Выявлено, что блокирование работы дыхательной цепи митохондрий устраняет эффекты TiO_2 на ацетилхолин-вызванные сокращения. В мышцах миометрия TiO_2 устраняет эффекты блокировки АТФ-чувствительных K^+ -каналов. Исследованиями *in silico* установлено, что нано- TiO_2 способен взаимодействовать с внеклеточной частью метаболитных рецепторов. Длительное (30 и 100 суток) введение в организм крыс *in vivo* TiO_2 вызывает неоднородный (время-зависимый и тканезависимый) эффект на спонтанную и вызванную сократительную активность висцеральных гладких мышц. Термодинамическим анализом установлено, что в условиях хронического действия TiO_2 индуцирует существенные изменения процессов высокоэластичной деформации в гладких мышцах желудка.

Изучены закономерности и механизмы действия каликс[4]аренов-ингибиторов первичного активного ионного транспорта плазматической мембраны: натриевой помпы (С-99 и С-107) и кальциевой помпы (С-90 и С-716).

Ключевые слова: механокинетика, термодинамика, висцеральные гладкие мышцы, наноразмерные материалы, диоксид титана, каликс[4]арены.

SUMMARY

Tsymbalyuk O.V. Biophysical mechanisms of action of nanoscale materials on the mechanokinetics of visceral smooth muscles. – Manuscript.

Thesis for Doctor of Science degree on specialty 03.00.02 – biophysics. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, 2019.

The dissertation investigated the mechanisms of action of nanoscale materials on the mechanokinetics and thermodynamics of visceral smooth muscles.

It has been established that suspensions of nano-sized material TiO_2 of three size groups, which contain different ratios of mixtures of rutile polymorphs and anatase under non-cumulative and cumulative effects, are effective modulators of spontaneous and evoked contractions of visceral smooth muscles (SM). In particular, TiO_2 modulates the presynaptic and postsynaptic mechanisms of regulation of the gastrointestinal SM contraction with the participation of the acetylcholine, histamine and GABA receptors. The absence of the influence of TiO_2 nanoparticles on the processes of excitation-contraction conjugation, which are induced by endogenous acetylcholine upon

activation of its release by the depolarization of SM tissue, is shown. At the same time, it was revealed that these nanomaterials modulate contractions activated by exogenous acetylcholine and inhibit their tonic component by the ionotropic acetylcholine receptor agonist nicotine. The TiO₂ induced activation of the influx of Ca²⁺ ions through L-type Ca²⁺-channels. It has been proven that the nano-sized TiO₂ does not change the mobilization of Ca²⁺ ions with inositol-1,4,5-triphosphate- and ryanodine-sensitive pools of the sarcoplasmic reticulum of *antrum* myocytes. It was revealed that blocking the work of the mitochondrial respiratory chain eliminates the effects of TiO₂ on acetylcholine-induced contractions. In the myometrium, TiO₂ eliminates the effects of blocking ATP-sensitive K⁺ channels. *In silico* studies have established that the nano-sized material TiO₂ is able to interact with different affinity with several sites of the extracellular part of the metabotropic GABA_B and M₂ and M₃ acetylcholine and H₁ receptors. By elemental analysis, it was shown that *in vivo* intragastric administration, nano-TiO₂ penetrates tissues and unevenly accumulates in various organs: the greatest amount of Ti is accumulated by visceral smooth muscle tissue (stomach > colon > uterus) and kidneys. By tensometric studies and mechanokinetics analysis, it was established that chronic (30 and 100 days) body loads *in vivo* of TiO₂ cause a non-uniform (time-dependent and tissue-dependent) effect on the contractile activity of visceral smooth muscles. Thermodynamic analysis established that under the conditions of the chronic action of TiO₂ causes significant changes in the processes of highly elastic deformation in the smooth muscle tissue of the stomach with large deformations.

Acetylcholine-induced smooth muscle contractions of *caecum* were found to be sensitive to the action of calix[4]arene C-99 under conditions of pre-blocking of Na⁺, K⁺-ATP-ases of ouabain. It was established that this calix[4]arene under conditions of chronic *in vivo* exposure causes inhibition of ouabain-sensitive Na⁺, K⁺-ATP-ase activity of plasmalemma preparations. Using mechanokinetic analysis of K⁺-depolarization and acetylcholine-induced contractions, it has been established that the results of ouabain, calix[4]arene C-107 and M-3 under chronic *in vivo* conditions predominantly reproduce the trends when they are applied *in vitro*.

The increase in the tonic component of the myometrium smooth muscle K⁺-contraction under the action of calix[4]arene C-716 (previous blocking of the exchange of Ca ions in intracellular Ca²⁺-depot) is associated with an increased concentration of Ca²⁺ ions in myocytes, while an increase in the normalized speed relaxation under these conditions is probably due to the substantial activation of nitric oxide synthesis by constitutive forms of NO-synthase. Obtained in the case of preincubation of the smooth muscle preparations of the myometrium with calix[4]arene C-90, a significant decrease in the normalized maximum relaxation rate of spontaneous and oxytocin-induced contractions is associated with a directed inhibition of the plasma membrane Ca²⁺ pump. Against the background of the action of the nitric oxide synthase blocker, L-NAME, calix[4]arene C-90 is not capable of suppressing the tonic phase of K⁺ - and oxytocin-induced contractions, but leads to a decrease in the maximum relaxation rate.

Key words: mechanokinetics, thermodynamics, visceral smooth muscles, nanoscale materials, titanium dioxide, calix[4]arenes.