

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доцент Нипорко Олексій Юрійович

Протокол №\_\_\_\_ засідання кафедри

від “\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2022 р.

**УЧАСТЬ ОКСИДУ АЗОТУ В РЕГУЛЯЦІЇ СКОРОЧУВАЛЬНОЇ  
ФУНКЦІЇ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
студента спеціальності 091 «Біологія»

ОП «Біологія (високі технології)»

**Кривенко Іванни Олександрівни**

Науковий керівник:

професор кафедри молекулярної  
біотехнології та біоінформатики

**д.б.н. Цимбалюк Ольга Володимирівна**

Оцінка захисту роботи

---

Київ-2022 р.

## АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота бакалавра містить 49 сторінок, 10 рисунків, 84 джерела.

Участь оксиду азоту в регуляції скоротливості гладком'язової стінки матки викликає особливий інтерес у фізіологів та репродуктологів. Наразі залишається недослідженим питання впливу рівня синтезу NO в міометрії на механокінетичні параметри окремих спонтанних скорочень. У зв'язку з цим, існує необхідність проведення таких досліджень, адже їх результати можуть поглибити розуміння фізіологічних процесів, що відбуваються в гладеньких м'язах міометрію під впливом оксиду азоту та його похідних.

У ході роботи було проведено повний механокінетичний аналіз впливу інгібіторів NOS (L-NAME) та донорів NO (нітропрусиду натрію) на скоротливість міометрію самок нелінійних білих щурів. У представленій роботі продемонстровані результати багатопараметричного аналізу скоротливості гладком'язового міометрію та встановлено закономірності між скорочувальною активністю та інгібуванням NOS / підвищенням концентрації NO.

Ключові слова: оксид азоту, міометрій, скорочувальна активність, механокінетичний аналіз, інгібітори NOS, донори NO.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- NANC** — nonadrenergic noncholinergic
- NOS** — NO synthase (синтази оксиду азоту)
- eNOS** — ендотеліальна синтаза оксиду азоту
- bNOS / nNOS** — нейрональна синтаза оксиду азоту
- cNOS** — конститутивна синтаза оксиду азоту
- iNOS** — індукцйбельна синтаза оксиду азоту
- NO-GC** — NO-sensitive soluble guanylyl cyclase
- GSNO** — S-нітрозоглутатіона
- SNO** — S-нітрозотіоли
- cGMP** — циклічний гуанозин монофосфат
- PKG** — протеїнкіназа
- MLC** — легкий ланцюг міозину
- MLCP** — фосфорилаза легкого ланцюга міозину
- BH4** — тетрагідробіоптерин
- L-NMMA** — NG-монометил-L-аргінін
- L-NAME** — *N*<sup>w</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester
- АПФ** — ангіотензинперетворюючий фермент
- АЦП** — аналого-цифровий перетворювач
- pГЦ** — розчинна гуанілатциклаза
- НПН** — нітропрусид натрію
- ЕОМ** — електронно-обчислювальна машина
- СР** — саркоплазматичний ретикулум
- ГМ** — гладкі м'язи
- ІМТ** — індекс маси тіла
- АТФ** — аденозинтрифосфат

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Будова, локалізація та функції гладкої мускулатури в організмі людини.....	8
1.1.1. Цитологічна та гістологічна характеристика гладких м'язів	9
1.1.2. Механізм скорочення гладких м'язів .....	10
1.1.3. Структурні особливості гладких м'язів міометрію.....	12
1.1.4. Функціональні особливості гладкої мускулатури міометрію	13
1.2. NO як фактор регуляції скорочення гладких м'язів .....	15
1.2.1. Історія дослідження оксиду азоту .....	16
1.2.2. Метаболізм оксиду азоту в організмі .....	17
1.2.3. Впливу оксиду азоту на ГМ міометрію.....	21
1.2.4. Роль донорів та інгібіторів оксиду азоту та їх застосування в лікувальній практиці.....	22
Розділ 2. Матеріали і методи досліджень.....	25
2.1. Тензометричні експерименти.....	25
2.2. Комплексний механокінетичний аналіз спонтанних скорочень .....	27
2.3. Статистичний аналіз експериментальних даних .....	28
Розділ 3. результати та їх обговорення .....	30
3.1. Повний механокінетичний аналіз спонтанних скорочень міометрія шурів у контролі .....	30

<b>3.2. Аналіз механокінетичних параметрів спонтанних скорочень міометрія шурів за блокування синтезу оксиду азоту .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3. Аналіз механокінетичних параметрів спонтанних скорочень міометрія шурів за підвищеної концентрації оксиду азоту .....</b>	<b>36</b>
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>40</b>
<b>СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ .....</b>	<b>41</b>

## ВСТУП

У вісцеральних гладеньких м'язах, зокрема, стінок травного тракту і дихальних шляхів, оксид азоту (NO), поряд з АТФ, відіграє роль важливого регулятора базального напруження і скорочувальної активності. Разом ці молекули забезпечують так зване неадренергічне нехолінергічне гальмування (nonadrenergic noncholinergic, NANC)[1]–[3]. У випадку NO, його синтез і вивільнення відбувається з різних джерел: безпосередньо м'язовими клітинами та нейронами ентерального нервового плетива. Зокрема, при стимулюванні ентеральних нейронів стінки травного тракту спостерігається розвиток NANC, який розвивається як сукупність швидкого і повільного компонентів; саме повільний компонент обумовлюється ефектами NO[4], [5]. Наразі не викликає сумнівів участь NANC та, зокрема, NO, в підтриманні збудливості гладеньком'язових стінок матки [6–8]. Так, відомо, цей трансмітер синтезується синтазами оксиду азоту (NOS) у міометрії та ендометрії. Як і в інших вісцеральних ГМ, оксид азоту спричиняє зниження збудливості та загальну розслаблювальну реакцію. Відомо, що «канонічним» сигнальним каскадом дії NO: в ГМ травного тракту є активація каталітичного центру розчинної гуанілатциклази (NO-sensitive soluble guanylyl cyclase, NO-GC) за рахунок дії на  $Fe^{2+}$  гему  $\rightarrow$  посилення синтезу циклічного гуанозинмонофосфату (cGMP)  $\rightarrow$  активація cGMP-залежних клітинних мішеней, головними з яких є протеїнкіназа G (PKG, яка, зокрема, фосфорилує фосфатазу легких ланцюгів міозину), фосфодіестераза, cGMP-регульовані іонні канали плазматичної мембрани (зокрема потенціалкеровані  $Ca^{2+}$ -канали, внаслідок чого вони інактивуються) [2, 9]. Однак, наразі більшість дослідників сходяться на думці, що клітинні ефекти NO в міоцитах матки, опосередковуються «некласичними» шляхами: *S*-нітрозилюванням (приєднанням нітрозогрупи (NO-) з утворенням *S*-нітрозотіолів (SNO) зокрема до залишків цистеїну) і *S*-нітрозуванням (за участі *S*-нітрозоглутатіона (GSNO) – сполуки, яка є продуктом вільнорадикальних

процесів за участі глутатіона) важливих клітинних протеїнів; *цитотоксичним шляхом*, в якому ONOO<sup>-</sup> (продукт взаємодії NO і O<sub>2</sub><sup>-</sup>) є сильним окисником та спричиняє пошкодження ДНК і активує процеси запалення [9], [10].

Наразі донори оксиду азоту активно застосовується у медичній практиці з метою розслаблення міометрія при терапії гіпертонусу матки вагітних та запобіганню передчасних пологів [10]–[12]. Втім, наразі залишається не дослідженим питання впливу рівня синтезу NO в міометрії на механокінетичні параметри окремих спонтанних скорочень.

*Метою роботи* було дослідження впливу рівня синтезу NO на механокінетичні параметри окремих спонтанних скорочень міометрія щурів.

Для вирішення мети було поставлено наступні *задачі*:

1. Здійснити повний механокінетичний аналіз спонтанних скорочень міометрія щурів;
2. Провести повний механокінетичний аналіз окремих спонтанних скорочень міометрія щурів за повного блокування базального синтезу NO;
3. Визначити механокінетичні параметри окремих спонтанних скорочень міометрія за присутності підвищеного рівня NO у тканині.

## Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Будова, локалізація та функції гладеньком'язової тканини в організмі людини

Гладенькі м'язи (ГМ) носять таку назву тому, що клітини не мають видимої під мікроскопом посмугованості. Фундаментальною відмінністю гладеньких м'язів від скелетних м'язів є їх здатність контролюватися і скорочуватися мимовільно. Нервова система може використовувати гладенькі м'язи для жорсткого регулювання багатьох систем внутрішніх органів організму без свідомої участі істоти. Так, до прикладу, людині не потрібно думати про свій кров'яний тиск, щоб він адаптувався до збільшення потреби в кисні в результаті фізичних вправ. Натомість нервова система використовує гормони, нейротрансмітери та інші рецептори для спонтанного керування гладенькими м'язами [13].

ГМ розташовані по всьому тілу, де виконують безліч функцій. Вони знаходяться в шлунку та кишечнику, де допомагають механічному просуванню харчових мас та всисанню поживних речовин. Цей тип мускулатури також зустрічається у всій сечовидільній системі, де формує стінки сечоводів і сечового міхура, тож залучений до очищення організму від токсинів і допомагає забезпечити баланс електролітів. Він зустрічається у всіх артеріях та більшості вен, де відіграє життєво важливу роль у регуляції артеріального тиску та оксигенації тканин. Без цих життєво важливих функцій організм не міг би підтримувати стабільну життєздатність.

Також порушення функціонування гладеньком'язової тканини відіграє важливу роль у патологіях всього організму. Використання бронходилататорів для розслаблення ГМ дихальних шляхів є важливим аспектом лікуванням у хворих на бронхіальну астму і хронічне обструктивне

захворювання легень[14]. Так само такі ліки, як метоклопрамід, можуть стимулювати моторну функцію і таким чином сприяти спорожненню шлунка за рахунок збільшення ефективності нейротрансмісії у тканині ГМ його стінок. Можливо, одним з найбільш відомих застосувань медикаментозної терапії, тропної до ГМ, є використання нітратів при лікуванні стенокардії та ішемічної хвороби серця [15], де нітрати у поєднанні з інгібіторами ангіотензин-перетворювального ензиму можуть знизити смертність пацієнтів [16]. Крім того, особливий інтерес викликає роль ГМ в пологах, їх патології та зв'язок з передчасними пологами тощо.

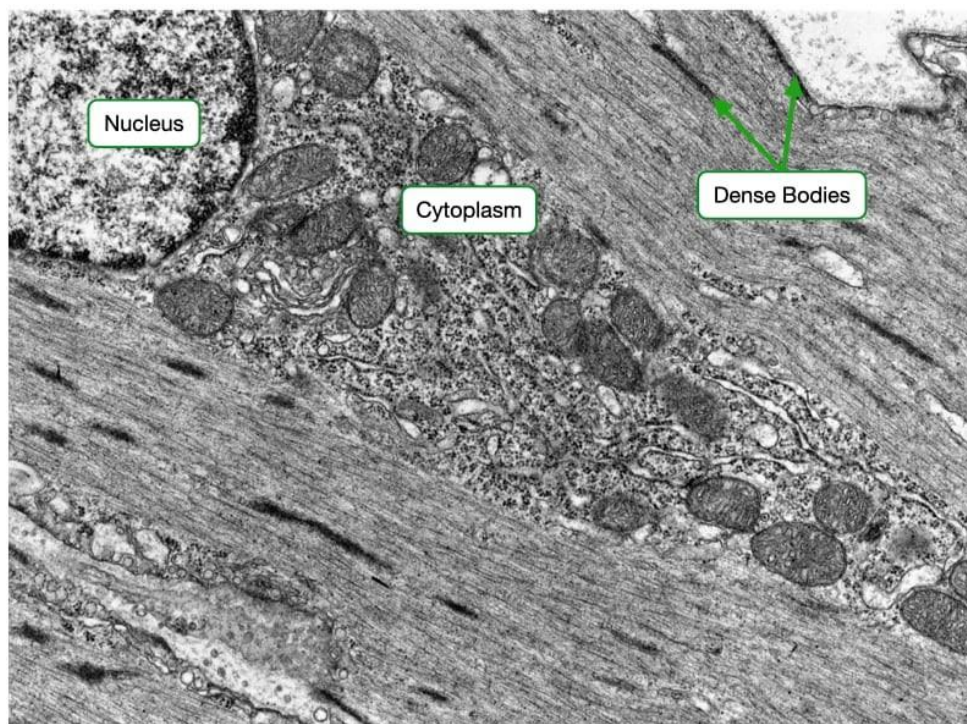
### **1.1.1. Цитологічна та гістологічна характеристика гладеньких м'язів**

Структурно-функціональною одиницею гладеньком'язової тканини є гладеньком'язова клітина (міоцит, ГМК). ГМК мають веретеноподібну форму і, на відміну від волокон скелетних м'язів, одноядерні; розмір окремих клітин становить від 30 до 200 мкм. Скоротливий апарат міоцита представлений білковими актиновими та міозиновими філаментами в цитоплазмі, які взаємодіють, створюючи напруження м'язу. Вони не упорядковані в саркомери, в результаті чого немає посмугованості, при мікроскопічному дослідженні тканина візуально гомогенна.

Сарколема клітин утворена з плазмолемі міоцита, яка зовні оточена базальною мембраною. Плазмолема утворює специфічні мембранні рафти - колбоподібні вп'ячуння – кавеоли, які розміщені перпендикулярно довжині всієї клітини. Кавеоли відкриті в сторону міжклітинного простору, містять високу концентрацію іонів  $Ca^{2+}$ , а в їх мембрані присутні сигнальні протеїнові комплекси та системи транспорту іонів кальцію в саркоплазму та з неї.

Актинові філаменти прикріплені до специфічних протеїнових комплексів – щільних тілець (dense bodies), поширених по всій цитоплазмі і вмонтованих до сарколеми (тіляця прикріплення). Щільні тільця аналогічні Z-дискам скелетних м'язів, які підтримують структуру філаментів - мережа проміжних волокон проходить між щільними тільцями, створюючи внутрішній каркас для скоротливих білків. Щільні тільця можна спостерігати під електронним мікроскопом у вигляді темних утворень.

Іншою важливою структурою є  $\text{Ca}^{2+}$ -депо - саркоплазматичний ретикулум, який допомагає підтримувати скорочення.



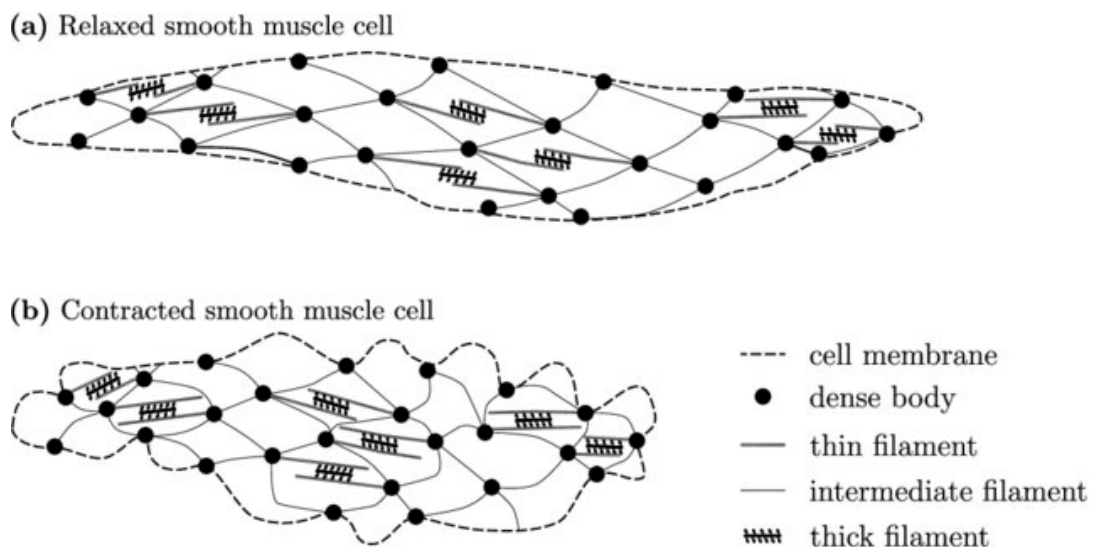
**Рис. 1.1.** Електронна мікрофотографія гладеньком'язових клітин[17].

### **1.1.2. Механізм скорочення гладеньких м'язів**

Етапи скорочення клітин гладеньких м'язів:

1. Деполяризація плазматичної мембрани або активація рецепторів збуджувальних гормонів/нейротрансмітерів
2. Активація і відкриття потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів L-типу

3. Індуковане входом позаклітинних іонів  $\text{Ca}^{2+}$  додаткове вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із СР (явище так званого  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ )
4. Підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$
5. Зв'язування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з протеїном кальмодуліном (формування комплексів  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін)
6. Активація комплексом  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін кінази легких ланцюгів міозину (КЛЛМ)
7. Фосфорилування КЛЛМ легких ланцюгів міозину
8. Підвищення активності міозинової АТФази
9. Міозин-Р зв'язує актин
10. Циклічне крос-фосфорилування призводить до взаємного переміщення актину і міозину, а отже збільшення напруження м'язів[18].



**Рис. 1.2.** Структура гладеньком'язової клітини судин у розслабленому (а) та скороченому (б) стані [19].

В інтактному організмі процес скорочення клітин гладеньком'язової тканини регулюється головним чином рецепторною та механічною (розтягування) активацією скорочувальних білків міозину та актину. Зміна мембранного потенціалу, викликана збудженням потенціалів дії або

активацією залежних від розтягування іонних каналів у плазматичній мембрані, також може викликати скорочення. Щоб відбулося скорочення, кіназа легких ланцюгів міозину (кіназа MLC) має фосфорилувати легкі ланцюги міозину (два на одну молекулу міозину, молекулярна маса 20 кДа), забезпечуючи молекулярну взаємодію міозину з актином. Енергія, що вивільняється при гідролізі АТФ в результаті активності міозинової АТФази, призводить до взаємодії голівок міозину з актином та взаємного переміщення актинових і міозинових філаментів та, як наслідок, скорочення ГМК.

Таким чином, скорочувальна активність у гладких м'язах визначається насамперед станом фосфорилування легких ланцюгів міозину – чітко регульованим процесом. У деяких гладеньком'язових клітинах фосфорилування легких ланцюгів міозину підтримується на низькому, базальному рівні без зовнішніх подразників (тобто без рецепторної або механічної активації). В результаті забезпечується базальне напруження тканини гладеньких м'язів, та його інтенсивність може змінюватись [20].

Дефосфорилування легких ланцюгів міозину припиняє скорочення гладеньких м'язів. На відміну від скелетних м'язів, гладенькі м'язи фосфорилуються під час їх активації, що створює потенційні перешкоди, оскільки просте зниження внутрішньоклітинного рівня  $Ca^{2+}$  не призведе до розслаблення м'язів. Натомість фосфатаза легких ланцюгів міозину (MLCP) відповідає за дефосфорилування легких ланцюгів міозину, що зрештою призводить до розслаблення гладких м'язів.

### **1.1.3. Структурні особливості гладеньких м'язів міометрія**

Міометрій складається з двох шарів гладеньком'язової тканини із судинною зоною між ними. М'язові волокна зовнішнього поздовжнього шару розташовуються паралельно, а волокна внутрішнього кругового шару концентрично навколо довгої осі матки. Веретеноподібні мембранозв'язані

м'язові клітини зібрані в пучки по 10-50 клітин. Сусідні клітини зближуються у певних спеціалізованих областях своїх плазматичних мембран, утворюючи міжклітинні контакти, які називаються щілинними контактами. Вони являють собою модифікації плазматичних мембран сусідніх клітин, що стикаються, і з'єднують їх електрично і метаболічно. Щілина є вузьким простором розміром від 2 до 3 нм, що складається з декількох тисяч каналів.

Деякі м'язові клітини спеціалізуються на стимулюванні скорочень матки. Пейсмейкерні області мають розмір від 2 до 4 мм і містять одну або кілька спеціалізованих клітин-водіїв ритму. Будь-яка клітина міометрія здатна взяти на себе роль водія ритму. Тому пейсмейкерні регіони можуть переміщатися з одного місця в інше. Окрема м'язова клітина є одиницею збудження міометрія, але саме пучок м'язових клітин є одиницею поширення електричного стимулу. Щілинні контакти є місцями міжклітинного поширення потенціалів дії. Канали щілинних контактів швидко переходять із відкритого стану до закритого.

Кількість щілинних контактів та їх проникність визначають ефективність електричного та метаболічного зв'язку клітин міометрія та швидкість проведення потенціалів дії[21].

#### **1.1.4. Функціональні особливості гладеньком'язової тканини міометрія**

Гладеньком'язова тканина матки дуже схожа на гладенькі м'язи інших внутрішніх органів, але має значну відмінність, яка обумовлюється, її скорочувальною активністю. Під час вагітності вона підтримується у спокійному стані. Неефективні міжклітинні комунікації через низький рівень експресії щілинних контактів та інгібуючого впливу оксиду азоту є важливими факторами, відповідальними за мінімальну скорочувальну активність гладеньком'язової тканини матки у міру розвитку вагітності [22].

Пологи — це стан, при якому матка часто і сильно скорочується, щоб виштовхнути плід. Нестабільність мембранного потенціалу гладеньком'язової тканини матки є основою спонтанності скорочень гладкої мускулатури матки. Відбуваються зміни у механізмах регуляції кальцію, що сприяє сильнішій скоротливості м'яза. Причиною ефективності цих скорочень є здатність міометрія поширювати свою електричну активність, у чому полягає значення щілинних контактів. У пізні терміни вагітності організм характеризується сприятливим співвідношенням естрогену до прогестерону та активацією щілинних контактів в тканині матки, що робить міометрій функціональним синцитієм. На цю підвищену активність та реактивність матки накладається ряд ендогенних утеротоніків, таких як простагландини та окситоцин, які за відсутності маткових релаксантів призводять до сильних, стійких, ритмічних та регулярних скорочень матки та початку пологів.

Скоротлива активність матки є прямим наслідком електричної активності міоцитів. Ця активність характеризується циклічною деполяризацією та реполяризацією плазматичної мембрани та потенціалами дії. Деполяризація в основному пов'язана з підвищеною проникністю для  $\text{Ca}^{2+}$  та, меншою мірою, для  $\text{Na}^+$ . Обидва іони мають більш високі концентрації у позаклітинному просторі і, отже, легко переміщуються у внутрішньоклітинний простір, роблячи мембранний потенціал більш позитивним. Мембрана реполяризується за рахунок збільшення проникності для  $\text{K}^+$  (висока концентрація у цитозолі), що призводить до витоку  $\text{K}^+$  назовні.

Величина скорочень матки залежить від загальної кількості одночасно та синхронно активних гладеньком'язових клітин. Одиночний потенціал дії може спричинити судомне посмикування. Синхронізоване скорочення багатьох клітин міометрія (за оцінками, мільярди) зменшує діаметр просвіту матки. При частоті генерування потенціалів дії близько 1 циклу за секунду виникає тетанічний тип скорочення[22].

## 1.2. NO як фактор регуляції скорочення гладких м'язів

Терміном «оксид азоту» (або «окис азоту») позначається відновлена форма монооксиду азоту (NO), яка має період напіврозпаду від 2 до 30 с. NO — безбарвний газ, розчинний у воді та ліпідах, з унікальними фізіологічними властивостями. Хімічно NO являє собою невелику ліпофільну молекулу, що складається з атома азоту та атома кисню з неспареним електроном, який перетворює її на високо реакційноздатний вільний радикал, який вільно проникає через біологічні мембрани і легко взаємодіє з іншими сполуками. Загалом кількість NO, що виробляється у здорової людини, становить в середньому 1 ммоль/добу [23].

Незважаючи на те, що NO є структурно простою гетероядерною двоатомною молекулою, вона є однією з ключових речовин, що бере участь у різних біологічних процесах у всьому організмі[24]. У судинній мережі NO (основна частина NOS3, але NOS1 тип також присутній навколо артеріол) регулює судинний тонус та кровотік шляхом активації розчинної гуанілатциклази (pГЦ) у гладеньких м'язах судин. Крім того, він необхідний для адгезії лейкоцитів та агрегації тромбоцитів та контролює споживання кисню мітохондріями шляхом інгібування цитохром-с-оксидази. Порушення продукції та транспорту NO у судинах призводять до ендотеліальної дисфункції з різними серцево-судинними патологіями, такими як гіпертонія, атеросклероз та порушення, пов'язані з ангіогенезом [25]. Цікаво, що NOS3 може генерувати супероксид, коли концентрація або L-аргініну або BH4 низька. Це «роз'єднання» NOS3 відбувається при деяких патологіях, таких як діабет, гіперхолестеринемія та гіпертонія[26]. Нещодавно повідомлялося про вищу продукцію NO у вагітних індійських жінок з низьким індексом маси тіла (ІМТ)[27]. Отже, результати багатьох досліджень підтверджують

взаємозв'язок між змінами рівню оксиду азоту та змінами функціональної активності гладеньких м'язів різних органів, у тому числі й міометрія матки.

### **1.2.1. Історія дослідження оксиду азоту**

Початок вивчення біологічної ролі NO припадає на 1980 рік, коли Robert Furchgott відкрив так званий ендотеліальний фактор релаксації (EDFR)[28]. Цей короткоживучий фактор виділявся з ендотелію ізольованих кровоносних судин у відповідь на введення в середовище біологічно активних речовин, викликаючи розслаблення гладкої мускулатури судин. У 1986 році Л. Ігнарро та ін., з огляду на результати порівняльного аналізу здатності ендотеліального фактора релаксації судин і NO розслабляти судини, а також факторів, що впливають на цю здатність, першими припустили, що активним інгредієнтом ендотеліального фактора релаксації судин слугує оксид азоту[29].

У 1992 році NO отримав звання «Молекули року» в журналі «Science», а в 1998 р. вчені Р. Фурчготт, Л. Ігнарро та Ф. М'юрред були удостоєні Нобелівської премії за роботи, що стосуються пояснення ролі монооксиду азоту [NO] як сигнальної молекули у серцево-судинній системі[30]. З того часу з'ясування механізмів, пов'язаних з участю NO у функціонуванні клітини в умовах фізіології та при розвитку різних захворювань, присвячено багато наукових праць, і це питання ще довго привертатиме увагу дослідників[31]–[33].

В зв'язку з тим, що на початку 90-х рр. ХХ ст. було остаточно встановлено домінуюче значення оксиду азоту в механізмах розслаблення гладеньких м'язів[34], окремі наукові колективи почали вивчати роль NO в регуляції контрактильної активності міометрія. Останні дослідження дозволяють висунути припущення стосовно значення NO в процесах, які

попереджають контрактильну відповідь на розтягування стінок матки під час росту ембріона та зменшення чутливості міометрія до утероконстрикторних агентів (за підвищеного рівня прогестерону в тканинах матки). У спеціальній медичній літературі це явище одержало назву прогестеронової блокади[35]–[37].

До теперішнього часу накопичено величезний експериментальний та клінічний матеріал щодо метаболізму NO: субстрат, ферменти та ізоферменти, що беруть участь у біосинтезі оксиду азоту, тканнна специфічність ізоферментів синтази оксиду азоту (NOS), молекулярний механізм фізіологічного та патофізіологічного ефекту NO. Розроблено препарати, що активують та інгібують функції ізоферментів NOS. Встановлено функціональний взаємозв'язок та сполученість ефектів оксиду азоту з активними речовинами та регуляторними білками у регуляції функцій клітин різних тканин організму. З цього випливає, що ізоферменти NOS і сам NO є важливими мішенями для фармакологічного впливу при багатьох патологічних станах[38]–[41].

### **1.2.2. Метаболізм оксиду азоту в організмі**

Стаціонарна концентрація і, отже, біологічні ефекти NO вирішальною мірою визначаються як швидкістю його утворення, так і швидкістю його інактивації. Біореактивність NO у фізіологічних концентраціях може суттєво відрізнитись від передбачуваної в експериментах *in vitro*. Нейтральність заряду та його висока дифузійна здатність є відмінними рисами біологічної активності NO[42].

NO утворюється в результаті перетворення L-аргініну на цитрулін, при цьому кисень служить акцептором електронів (рис. 1.3.). Видалення кінцевого гуанідинового азоту каталізується ферментом синтазою оксиду

азоту (NOS)[43]. NOS існує у трьох ізоформах: NOS1 (nNOS), NOS2 (iNOS) та NOS3 (eNOS). Усі ізоформи NOS використовують L-аргінін як субстрат, а молекулярний кисень і відновлений нікотинамід-аденін-динуклеотидфосфат (НАДФН) як сусубстрати. Флавінаденіндинуклеотид (FAD), флавінмононуклеотид (FMN) і (6R-)5,6,7,8-тетрагідроL-біоптерин (BH4) є кофакторами всіх ізоферментів[44].

За фізіологічними властивостями ізоформи синтази оксиду азоту поділяються на  $Ca^{2+}$ - кальмодулінзалежні «конститутивні» NOS (cNOS), що включають нейрональну (nNOS) і ендотеліальну (eNOS), і  $Ca^{2+}$ -кальмодуліннезалежну «індуцибельну» (iNOS), що синтезується у відповідь на певний зовнішній вплив на клітину. Активність індукцибельної NO-синтази не залежить від рівня кальцію / кальмодуліну, оскільки, як вважають, кальмодулін постійно і міцно зв'язаний із ферментом[45].

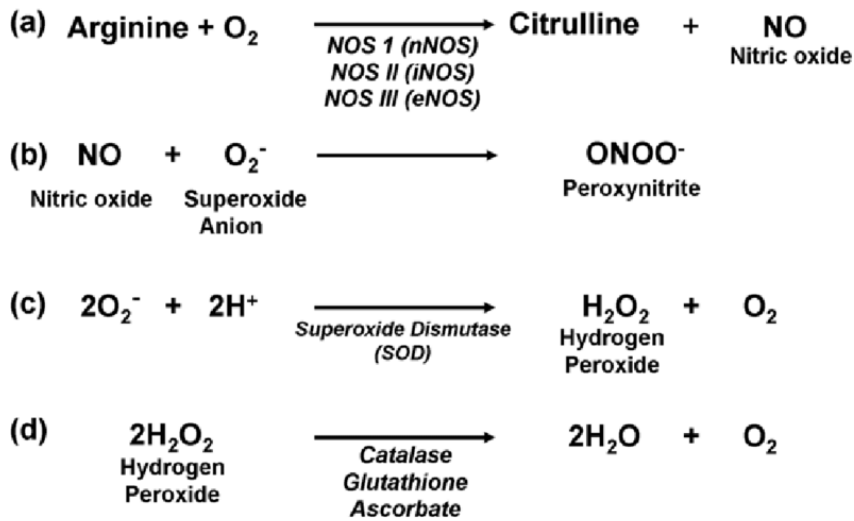
Активність конститутивних ізоформ ферменту прямо залежить від внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію або кальмодуліну і підвищується під впливом різних агентів, що призводять до збільшення рівня в клітині. Конститутивні ізоформи NO-синтази мають переважно фізіологічне значення, оскільки кількість утвореного ними NO відносно невелика. Він виділяється під дією факторів, які впливають або через рецептори, або незалежно від рецепторів. До рецепторозалежних факторів належать ацетилхолін, брадикінін, норадреналін, ангіотензин, а також фактори, які вивільняються з тромбоцитів, тобто АТФ, тромбін і серотонін. Факторами, що не залежать від рецепторів, є концентрація кисню в клітині й напруга зсуву[46].

Індуцибельні ізоформи NO-синтази проявляють активність через кілька годин після зовнішнього впливу на клітину (близько 6-8 годин). Цей час необхідний для активації генів та початку синтезу ферменту. Індукуючими агентами для iNOS є ендотоксини,  $\gamma$ -інтерферон, інтерлейкін-1 та фактор

некрозу пухлини- $\alpha$ . Активують індукцію iNOS цитокіни та ліпополісахариди бактерій[47]. Індуцибельні NOS продукують величезні (у 100-1000 разів більше, ніж конститутивні NOS) кількості NO. Оскільки високі дози NO є токсичними для клітин, ця ізоформа ферменту вважається патологічною на відміну від конститутивної.

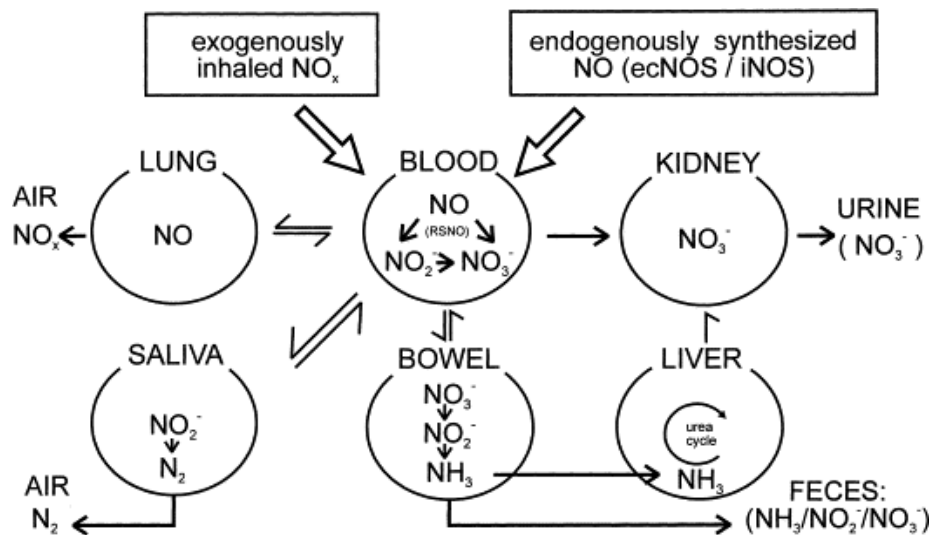
Хоча індуцибельна NOS не пов'язана з мембранними білками та є цитозольним ферментом, а конститутивні ізоформи NOS пов'язані з мембранними білками клітин, механізм їх дії схожий і полягає в тому, що  $\text{Ca}^{2+}$  під впливом певних стимуляторів (ацетилхолін, гістамін, серотонін, глутамат та ін.) надходить у клітину, де в цитоплазмі утворює комплекс із кальмодуліном. Комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін виступає як кофактор і активує NOS. Утворений при цьому NO активує клітинний фермент гуанілатциклазу, що призводить до утворення циклічного гуанозинмонофосфату, який і опосередковує всі ефекти NO[48].

Руйнівні ефекти NO пов'язані з його здатністю поєднуватися з аніонами супероксиду ( $\text{O}^{2-}$ ) з утворенням активних форм кисню. Неспарені електроні-радикали на NO і  $\text{O}^{2-}$  з'єднуються, утворюючи потенційно небезпечніший продукт пероксинітрит ( $\text{ONOO}^-$ ). NO також може зв'язуватися з реактивним тіолом цистеїну з утворенням S-нітрозотіолів, які є дуже важливими регуляторами фізіології та патології, відіграючи роль у передачі сигналів та модуляції клітинної та ферментативної функції[49].



**Рис. 1.3.** Біохімія оксиду азоту. (a) Оксид азоту утворюється при перетворенні аргініну на цитрулін. (b) Оксид азоту – це високореактивний газ, який може взаємодіяти з аніонами супероксиду з утворенням пероксинітриду. (c) Аніони супероксиду дисмутують до пероксиду водню за допомогою супероксиддисмутази, яка є в суглобовому хрящі. (d) Перекис водню далі метаболізується антиоксидантами до води та кисню[42].

Активні форми кисню є основними детермінантами розпаду NO. Біотрансформація NO та споріднених до нього N-оксидів відбувається різними метаболічними шляхами в організмі. S-нітрозотіоли, що утворюються при взаємодії NO з редокс-активованими тіолами, є активним запасним пулом для NO. Основними окисними метаболітами є нітрити та нітрати, співвідношення яких визначається окисно-відновними умовами мікросередовища. У людини циркулюючий нітрит є стандартним показником місцевого ендотеліального утворення NO, тоді як нітрат, з деякою обережністю, є корисним для оцінки загального обміну азоту / NO. Найближчим часом будуть доступні більш специфічні біохімічні інструменти для діагностики зниженої біологічної активності NO. Збільшення знань про складний метаболізм NO *in vivo* призведе до розробки нових терапевтичних стратегій для підвищення біоактивності NO за допомогою модуляції його метаболізму.



**Рис. 1.4.** Біотрансформація NO та споріднених йому N-оксидів в організмах ссавців[42].

### 1.2.3. Впливу оксиду азоту на ГМ міометрія

Регуляція функцій міометрія під час вагітності та пологів знаходиться в авангарді досліджень у галузі репродуктивних наук. Складність проблеми відображається в нашому мізерному розумінні внутрішніх клітинних і молекулярних подій, що лежать в основі цих явищ, незважаючи на великі зусилля протягом кількох десятиліть. На відміну з інших гладеньких м'язів, міометрій значною мірою перебуває під гормональним контролем. Крім стероїдних гормонів, існує ряд факторів, що модулюють скорочувальну здатність міометрія (окситоцин, простагландини, ендотелін, фактор активації тромбоцитів) та релаксацію (кортикотропін-релізінг-гормон, простациклін, оксид азоту)[50].

Релаксуюча (токолітична) дія оксиду азоту на міометрій є одним з перспективних сучасних напрямків досліджень функціонування гладкої мускулатури[51].

Попередні дослідження, які порівнювали тканини, отримані безпосередньо до і після початку пологів, не виявили змін у синтезі оксиду азоту в міометрії, плаценті, оболонках або децидуальній оболонці[52]–[57]. Підтримуючи теорію щодо ролі NO в нормальному перебігу вагітності Bansal та ін.[58] повідомили, що експресія iNOS у міометрії, оцінена за допомогою імуногістохімії та Вестерн-блот, була вищою на початку третього триместру (26–34 тижні вагітності), ніж наприкінці третього триместру (37–41 тиждень вагітності) або у невагітному стані. Жодна із жінок не народжувала на момент взяття проби. Ці дані свідчать про те, що збільшення експресії iNOS у міометрії може сприяти підтримці спокою матки під час вагітності. Роль конститутивних ізоформ NOS (eNOS та bNOS) не встановлена. Існує також припущення, що конститутивні ізоформи NOS можуть брати участь у регуляції активності матки під час вагітності.

Введення донорів NO може бути корисним для пригнічення скорочень матки в ситуаціях, коли така активність є небажаною, наприклад, при передчасних пологах. NO в невагітному стані відіграє потенційну роль у полегшенні імплантації та запобіганні дисменореї.

#### **1.2.4. Роль донорів та інгібіторів оксиду азоту та їх застосування в лікувальній практиці**

Різноманітні та важливі фізіологічні ролі NO дозволяють припустити, що модуляція NO у фізіологічній системі за рахунок збільшення його концентрації в результаті екзогенного вивільнення донорами NO або зниження рівня за допомогою інгібіторів NOS може бути корисною для лікування деяких захворювань[59].

Залежно від кількості, що продукується різними ізоферментами та в різних клітинних системах, NO може мати як благотворну, так і токсичну

дію. У фізіологічних концентраціях, що продукуються конститутивними ферментами eNOS і nNOS у відповідь на агоністи, такі як ацетилхолін в ендотелії судин, глутамат в головному мозку або колаген, що впливає на тромбоцити, NO має сприятливу дію (судинорозширювальну). Така рецептор-опосередкована відповідь призводить до збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію, що має вирішальне значення для активації конститутивної NOS[60]. Отже, є сенс вводити донори NO, які здатні повільно вивільняти NO, компенсуючи певні стани, коли ендогенна продукція NO недостатня [61].

На противагу, після експресії iNOS генерує значно більші та стійкіші кількості NO, ніж конститутивні ізоформи, що призводить до небезпечних станів гіпотензії та пошкодження клітин[62]. У таких випадках було б корисно зменшити фізіологічну продукцію NO інгібіторами NOS, такими як NG-монометил-L-аргінін (L-NMMA).

Ліки, що викликають ендогенне вивільнення NO, роблять це завдяки стимуляції його синтезу NOS. До таких препаратів відносяться мускаринові агоністи, гістамін та деякі інші судинорозширювальні засоби (брадикінін, гідралазин).

NOS також можуть й інгібуватися аналогами аргініну, такими як NG-монометил-L-аргінін (L-NMMA). За деяких обставин (наприклад, за ішемії) NO може утворюватися з ендогенного нітрат-іону. Інгібування iNOS призводить до зниження овуляції на 50%, ефекту, повністю протилежного до наслідків впливу NO[63].

Оксид азоту також регулює функції ендометрію, такі як рецептивність ендометрію, імплантація та менструація. Донори NO можуть бути корисними для підвищення фертильності, тоді як інгібітори NO можуть використовуватися для контрацепції[64].

Протягом усієї вагітності продукція NO у міометрії підвищується, що сприяє досягненню спокою матки. Ближче до пологів продукція NO

знижується, сприяючи ефективним скороченням, що необхідні для початку пологів. Клінічні випробування показали, що донори NO є ефективними токолітиками[65], [66].

На відміну від міометрію, продукція NO у шийці матки низька під час вагітності та підвищується, коли вагітність наближається до терміну. NO-донори є ефективними та безпечними засобами для дозрівання шийки матки. Цей висновок із досліджень на тваринах було підтверджено кількома клінічними випробуваннями[67]–[69].

У кровоносних судинах NO є потужним судинно-розширювальним засобом та інгібітором агрегації тромбоцитів. Нестача NO під час гестації була пов'язана з розвитком викликаної вагітністю артеріальної гіпертензії та прееклампсії[70].

На закінчення можна сказати, що донори NO та інгібітори NOS можуть стати новими, ефективними, безпечними та недорогими препаратами для регулювання різних функцій жіночої репродуктивної системи. Переваги наявні від контрацепції до запобігання можливим летальним ускладненням вагітності, таким як прееклампсія. Введення NO-донорів як токолітиків та агентів дозрівання шийки матки може сприяти зниженню перинатальної захворюваності та смертності плода та матері.

## РОЗДІЛ 2.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Тензометричні експерименти

Експерименти проводили на самках нелінійних білих щурів (вік 3-5 місяців, середня маса тварин 170-200 г). Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України „Про захист тварин від жорстокого поводження” Умертвіння щурів здійснювали дислокацією шийних хребців в умовах ефірного наркозу.

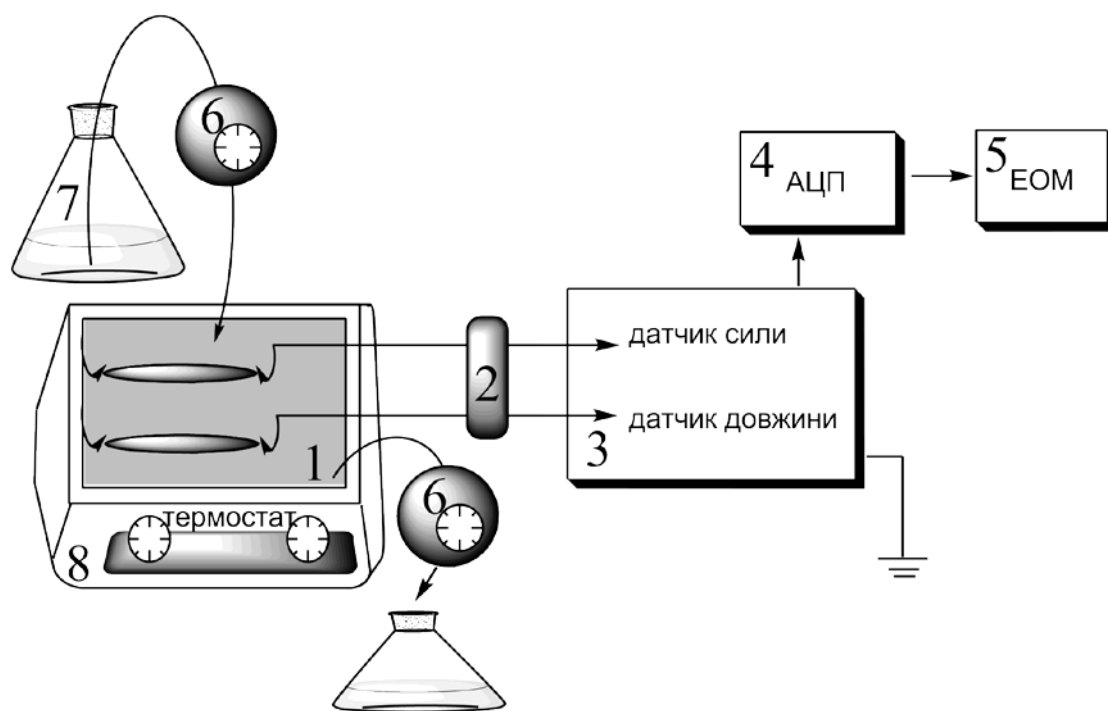
Скоротливу активність досліджували тензометрично в ізометричному режимі на препаратах поздовжніх м'язів рогів матки (середній розмір м'язових смужок - 2 x 10 мм). Гладеньком'язові смужки вміщували в робочу камеру (ефективний об'єм 2 мл) з проточним розчином Кребса (швидкість протікання - 5 мл/хв., постійна температура розчину 37 °С); препаратам надавали пасивний натяг (10 мН) і залишали на 1 годину до появи спонтанних скорочень з постійними амплітудою і частотою. Реєстрацію механічних сигналів проводили, використовуючи ємнісний датчик сили, підсилювач електричних сигналів, аналогово-цифровий перетворювач та комп'ютер (рис. 2.1.).

Для дослідів використовували розчин Кребса наступного складу (мМ): 120,4 NaCl; 5,9 KCl; 15,5 NaHCO<sub>3</sub>; 1,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,2 MgCl<sub>2</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 11,5 глюкоза; рН розчину становив 7,4.

У роботі використовували L-NAME (*N*<sup>w</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester) (ефективна концентрація 100 мкМ, виробництво «Sigma») та нітропрурид натрію (у концентрації 100 мкМ, виробництво «Sigma»).

Експерименти з вивчення ролі синтаз оксиду азоту були побудовані за схемою: після 20 хв передінкубації з неселективним інгібітором NO-синтаз

L-NAME з 100 мкМ упродовж 10 хв реєстрували спонтанні скорочення для механокінетичного аналізу. Реєстрацію спонтанних скорочень препаратів міометрія на тлі окремих концентрацій донора оксиду азоту нітропрусиду натрію для розрахунку механокінетичних параметрів здійснювали через 10 хв від початку дії сполуки.



**Рис. 2.1.** Схема установки для реєстрації скорочувальної активності гладеньком'язових смужок: 1 - робоча камера, перфузована за допомогою насосів (6) розчином, та містить м'язові препарати, які закріплено на гачках з медичної сталі; 2 – тензометричні датчики: ємнісний датчик сили (для реєстрації скорочень у ізометричному режимі) та датчик переміщення (для реєстрації укорочень у ізотонічному режимі); 3 – підсилювач сигналів; 4 – аналого-цифровий перетворювач (АЦП); 5 – комп'ютер (ЕОМ); 6 –насоси перистальтичні для подачі і відведення розчинів; 7 – ємкості з робочими розчинами; 8 – термостат рідинний, з'єднаний з робочою камерою.

## 2.2. Комплексний механокінетичний аналіз спонтанних скорочень

Аналіз кінетичних властивостей скорочень здійснювали згідно з методом комплексного механокінетичного аналізу[71].

Для аналізу повного профілю окремих скорочень здійснювали їх лінеаризацію у координатах  $\ln \frac{f}{f_c}$ ;  $\ln \frac{1}{1 + \Delta t \frac{f}{t}}$  де:

-  $f$  і  $t$  – миттєві значення сили та часу на рівні скоротливого циклу (тут  $C$  та  $R$  – відповідно позначення фаз скорочення та розслаблення),

-  $F_C$  і  $F_R$  – відповідно значення сили в точках перегину (максимальних швидкостей) частин скорочувальної відповіді на рівні фаз скорочення і розслаблення,

-  $\Delta t$  – заданий довільно фіксований інтервал часу (він емпірично обирався та варіював у межах 6-11 с).

Лінеаризовані графіки використовували для встановлення значень характеристичних констант  $k$  і  $n$ , які чисельно відповідали виразам:

$$n = \frac{c_0}{c_R - c_0} = \frac{c_0}{c_0 - c_C}$$

$$k = \frac{c_0}{(c_R - c_0)^2} = \frac{c_0}{(c_0 - c_C)^2}$$

Надалі характеристичні константи підставляли в розрахункові формули та визначали параметри скорочувального процесу:

- часові ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ) – миттєві значення часу у точках перегину частин скорочувальної відповіді на рівні фаз скорочення і розслаблення відповідно,

- силові ( $F_{max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ) – тут  $F_C$  та  $F_R$  значення сили  $f$  у точках перегину частин скорочувальної відповіді на рівні фаз скорочення і розслаблення відповідно:

$$F = F_{max} \cdot \left( \frac{e^{-\frac{t}{\tau}}}{n} - n \cdot e^{\frac{t}{\tau}} \right)$$

$$F = F_{max} \cdot \left( \frac{n+1}{n} \right)^n \cdot e^{-\sqrt{n}}$$

- швидкісні ( $V_C$  і  $V_R$ ) – максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення відповідно

$$V_C = k \cdot F_{max} \cdot \left( \frac{n+1}{n} \right)^{n-1} \cdot \frac{e^{\sqrt{n}}}{\sqrt{n}}$$

$$V_R = -k \cdot F_{max} \cdot \left( \frac{n+1}{n} \right)^{n-1} \cdot \frac{e^{-\sqrt{n}}}{\sqrt{n}}$$

- імпульсні ( $I_{max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) – імпульси сили на рівні амплітуди та максимальних швидкостей скорочення і розслаблення відповідно:

$$I_C = F_{max} \cdot \left( \frac{n+1}{n} \right)^{n+1} \cdot \frac{n}{k} \cdot e^{\sqrt{n}}$$

$$I_R = F_{max} \cdot \left( \frac{n+1}{n} \right)^{n+1} \cdot \frac{n}{k} \cdot e^{-\sqrt{n}}$$

### 2.3. Статистичний аналіз експериментальних даних

Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики із використанням програм Excel та Origin 2018.

Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували парний t-критерій Стьюдента. У всіх випадках достовірними вважали результати за умови значення ймовірності  $p$ , менше 5% ( $p < 0.05$ ).

Аналіз достовірності апроксимації даних лінійною функцією здійснювали із використанням F-критерію Фішера; коефіцієнти детермінації ( $R^2$ ) були не нижчими за 0,9.

Результати представлені як середнє арифметичне  $\pm$  стандартна похибка середнього ( $M \pm m$ ) і вказано кількість дослідів  $n$ .

## РОЗДІЛ 3.

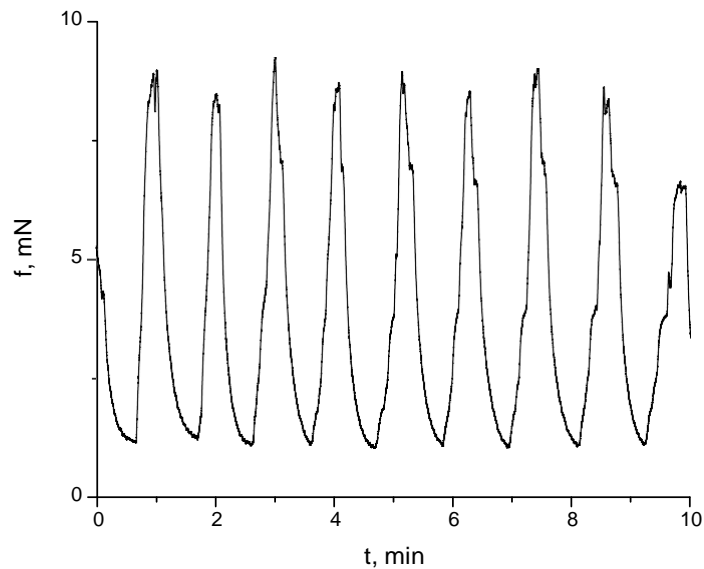
### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Повний механокінетичний аналіз спонтанних скорочень міометрія щурів у контролі

Контроль збудження-скорочення гладеньких м'язів матки забезпечує підтримання фертильності жінок, а також нормального протікання вагітності та пологів[72], [73]. На жаль, як свідчить статистика Всесвітньої організації охорони здоров'я, близько половини інцидентів загибелі новонароджених у світі спричиняється передчасними пологами[74]. В основі порушення здатності до підтримання нормального тонуусу стінок матки при виношуванні плоду під час вагітності та порушення скорочувальної діяльності при пологовій активності лежать зміни процесів підтримання іонного гомеостазу в клітинах міометрія та регуляції збудливості фізіологічно-активними речовинами (простагландинами, оксидом азоту, нейротрансмітерами) тканин стінок матки.

Якщо спонтанна активність тіла матки характерна для усієї маси тканини міометрія, то маткові труби мають окремі частини у цервікальному і оваріальному відділах, які генерують спонтанні хвилі деполяризації (внаслідок яких виникають спонтанні скорочення). Втім, ключовим джерелом спонтанних скорочень маткових труб є саме оваріальний відділ[75], [76].

Нами встановлено, що міометрій маткових труб невагітних щурів генерує спонтанні скорочення (рис. 3.1), який характеризується середньою частотою  $11,6 \pm 0,9$  скорочень упродовж 10 хв та амплітудою  $8,4 \pm 0,7$  мН ( $n = 7$ ).



**Рис. 3.1.** Типова механограма спонтанних скорочень препаратів поздовжніх гладеньких м'язів мультиклітинних маткових труб щурів.

Окремі механокінетичні криві скорочення-розслаблення препаратів міометрія достовірно апроксимувались лінійною функцією у координатах

$\ln \left( \frac{LR}{\Delta L_C} \right); \ln \left( 1 + \frac{\Delta t}{\tau} \right)$  Так, для кривої, наведеної на рис.2, величина

коефіцієнта  $R^2$  становить 0.99 (рис. 3.2).

Для спонтанної скорочувальної активності препаратів міометрія у контролі отримано такі усереднені показники механокінетичних параметрів ( $M \pm SEM$ ;  $n=7$ ):

Часові параметри:

$$\tau_0 = 10,55 \pm 0,72 \text{ с};$$

$$\tau_C = 3,43 \pm 0,28 \text{ с};$$

$$\tau_R = 17,65 \pm 0,99 \text{ с};$$

Силові параметри:

$$F_{\max} = 8,36 \pm 0,69 \text{ мН};$$

$$F_C = 3,26 \pm 0,21 \text{ мН};$$

$$F_R = 6,21 \pm 0,27 \text{ мН};$$

Швидкісні параметри:

$$V_C = 1,43 \pm 0,11 \text{ мН/с};$$

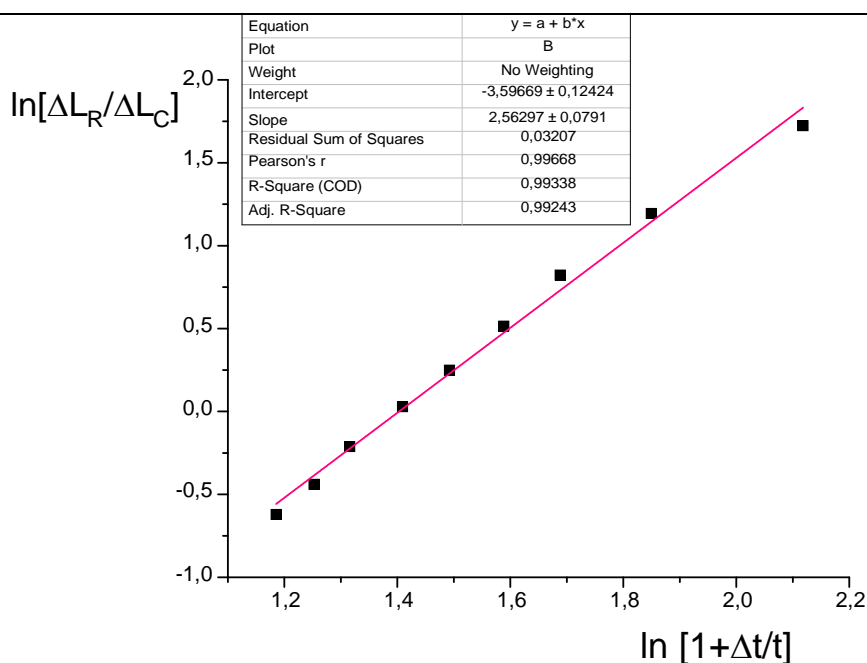
$$V_R = 0,52 \pm 0,04 \text{ мН/с};$$

Імпульсні параметри:

$$I_{\max} = 92,88 \pm 5,64 \text{ мН};$$

$$I_C = 11,28 \pm 0,82 \text{ мН};$$

$$I_R = 109,36 \pm 0,89 \text{ мН}.$$



**Рис. 3.2.** Механокінетичний аналіз окремої спонтанної скоротливої відповіді поздовжніх гладеньких м'язів мультиклітинних препаратів маткових труб щурів. Наведено типовий графік.

Як видно із усереднених механокінетичних параметрів, навіть за умови невеликого об'єму вибірки ( $n=7$ ), їх відтворюваність є доброю та є додатковим підтвердженням корисності застосування методу багатопараметричного аналізу для повного кількісного характеризування скорочувальної активності міометрія.

### 3.2. Аналіз механокінетичних параметрів спонтанних скорочень міометрія щурів за блокування синтезу оксиду азоту

Здійснення аналізу механокінетики окремих циклів скорочення-розслаблення ГМ та їх порівняння за умови реєстрації в контролі та за дії фізіологічно- і фармакологічноактивних сполук – важливий етап у з'ясуванні здійснення і модуляції механізмів електро- і фармакомеханічного спряження збудження-скорочення та гальмування-розслаблення[71].

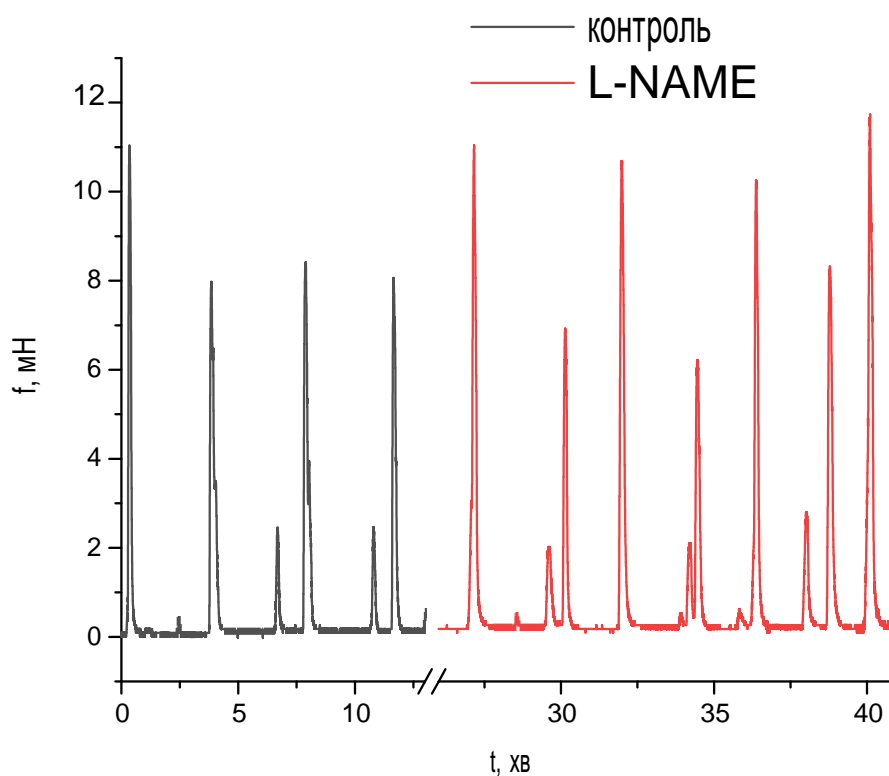
Оксид азоту є важливим регулятором напруження і скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів, зокрема міометрія[6]–[8]. Цей газотрансмітер синтезується ензимами – синтазами оксиду азоту (NOS) у міометрії та ендометрії.

Відомо три ізоформи NOS: нейрональна (nNOS), індукцибельна (iNOS) та ендотелійна (eNOS). Усі NOS потребують однакових кофакторів: Fe<sup>2+</sup>-гем, флавінові нуклеотиди, NADPH, шаперон HSP90, тетрагідробіоптерин та кальмодулін (CaM). Ізоформи NOS вибірково експресуються у тканинах, а також відрізняються за здатністю регулюватися іонами Ca<sup>2+</sup>. Важливо, що наявність домену PSD95 в ізоформи nNOS і ацилювання N-кінцевого фрагменту в ізоформ iNOS/eNOS обумовлює мембранну локалізацію цих ензимів, де вони утворюють сигнальні модулі з іншими білками. Нейрональна NOS та eNOS експресуються конститутивно (nNOS домінує у нейронах і скелетних м'язах; eNOS в ендотелії та міокарді). Експресія iNOS індукується клітинними сигналами запалення. Усі ізоформи NOS потребують для активації CaM, але необхідність формування його комплексів з іонами Ca<sup>2+</sup> принципово відрізняється для конститутивних ізоформ (так, EC<sub>50</sub> для nNOS/eNOS ≈100–300 нМ Ca<sup>2+</sup>, тоді як для iNOS EC<sub>50</sub> Ca<sup>2+</sup> на багато порядків вища, так що не має фізіологічного значення)[8], [68], [77].

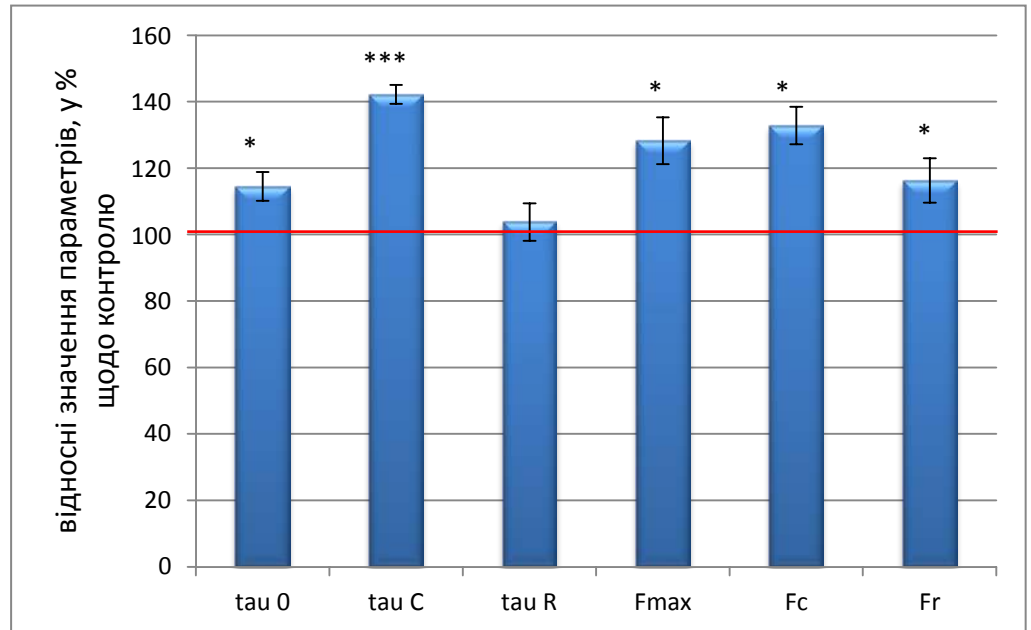
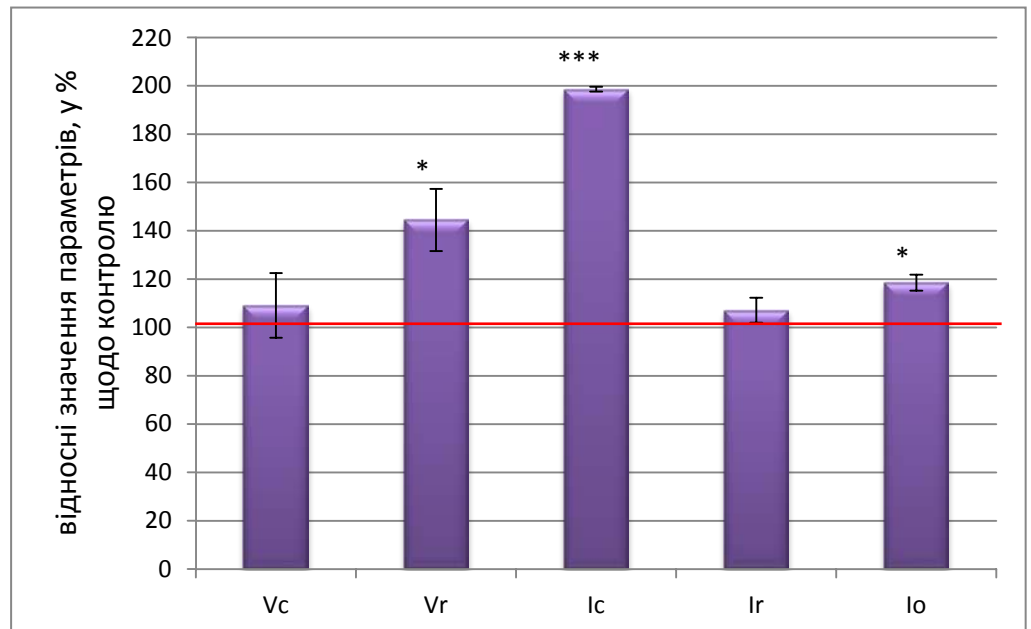
У міометрії щурів експресуються eNOS, iNOS, а також мітохондрійна NOS (mtNOS); остання за своїми властивостями близька до конститутивних ізоформ[78].

Оскільки наразі роль базального синтезу у спонтанній скорочувальній активності та кінетиці окремих спонтанних скорочень наразі у повній мірі не з'ясована, нашою наступною задачею було дослідити механокінетику спонтанних скорочень міометрія за повного блокування NO-синтаз неселективним інгібітором L-NAME (*N<sup>w</sup>*-Nitro-L-arginine methyl ester).

Інкубація гладеньком'язових препаратів міометрію у присутності L-NAME (упродовж 20 хвилин, 100  $\mu$ M) спричиняла активацію спонтанних скорочень (рис. 3.3). Так за дії L-NAME показники амплітуди скорочень щодо контролю у середньому становили  $128,3 \pm 7,0\%$  ( $n=7$ ,  $p<0,05$ ), а частота –  $138,0 \pm 9,5\%$  ( $n=7$ ,  $p<0,05$ ).



**Рис. 3.3.** Спонтанна скорочувальна активність препаратів поздовжніх гладеньких м'язів маткових труб щурів: порівняння типових скорочень у контролі та за попередньої інкубації з неселективним блокатором NO-синтаз L-NAME (100  $\mu$ M). Наведено типові механограми.

**А****Б**

**Рис. 3.4.** Параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів за попередньої інкубації з неселективним блокатором NO-синтаз L-NAME (100  $\mu$ M): А – часові ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ) і силові ( $F_{max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ) параметри; Б – швидкісні ( $V_C$  і  $V_R$ ) та імпульсні ( $I_{max}$  - позначено  $I_0$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) параметри.

За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі (n=7, \* -  $p < 0.05$  та \*\*\* -  $p < 0.001$  – різниця достовірна щодо контролю).

З використанням методу багатопараметричного аналізу підтверджено, що L-NAME загалом спричиняє активацію скорочувальної активності міометрія (рис. 3.4). Так, достовірно і в однаковій мірі зростали усі амплітудні параметри ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ); серед часових параметрів  $\tau_R$  залишався на рівні контролю, а  $\tau_0$ ,  $\tau_C$  збільшувалися. Найбільше зростання спостерігалось для параметра  $I_C$  (удвічі щодо контролю,  $p < 0.001$ ). Також при блокуванні базової активності синтаз оксиду азоту достовірно збільшувався імпульсний показник  $I_{\max}$ , тоді як імпульс сили на рівні фази розслаблення ( $I_R$ ) був на рівні контролю. Що стосується швидкісних параметрів, то  $V_C$  залишався на рівні контролю, тоді як  $V_R$  достовірно зростав (рис. 3.4 Б).

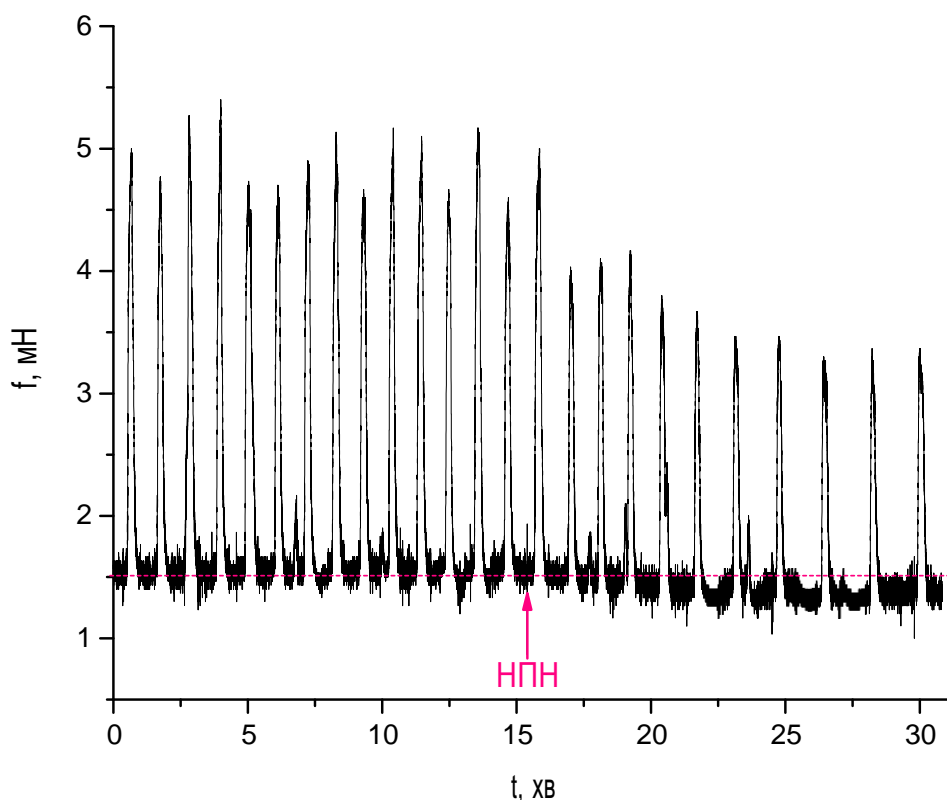
Таким чином, отримані нами результати загалом вказують на суттєвий базальний синтез NO тканинами матки щурів, а NO-синтазна активність є достатньою для регуляції спонтанної скорочувальної активності міометрія. Це твердження добре узгоджується з даними інших дослідників щодо значення базального рівня синтезу NO як регулятора збудливості міометрія при невагітному і вагітному стану, а також руху яйцеклітин матковими трубами [79]–[81].

### **3.3. Аналіз механокінетичних параметрів спонтанних скорочень міометрія щурів за підвищеної концентрації оксиду азоту**

На наступному етапі досліджень вивчали спонтанну скорочувальну активність міометрія щурів на тлі донора оксиду азоту нітропрусида натрію (НПН) у концентрації 100  $\mu\text{M}$ .

Внесення НПН до омиваючого гладеньком'язові препарати розчину спричиняло суттєве зниження їх базального напруження, на тлі якого спостерігалось значне зниження амплітуди спонтанних скорочень (рис. 3.5). Достовірно зниження тонузу препаратів міометрія досягало свого

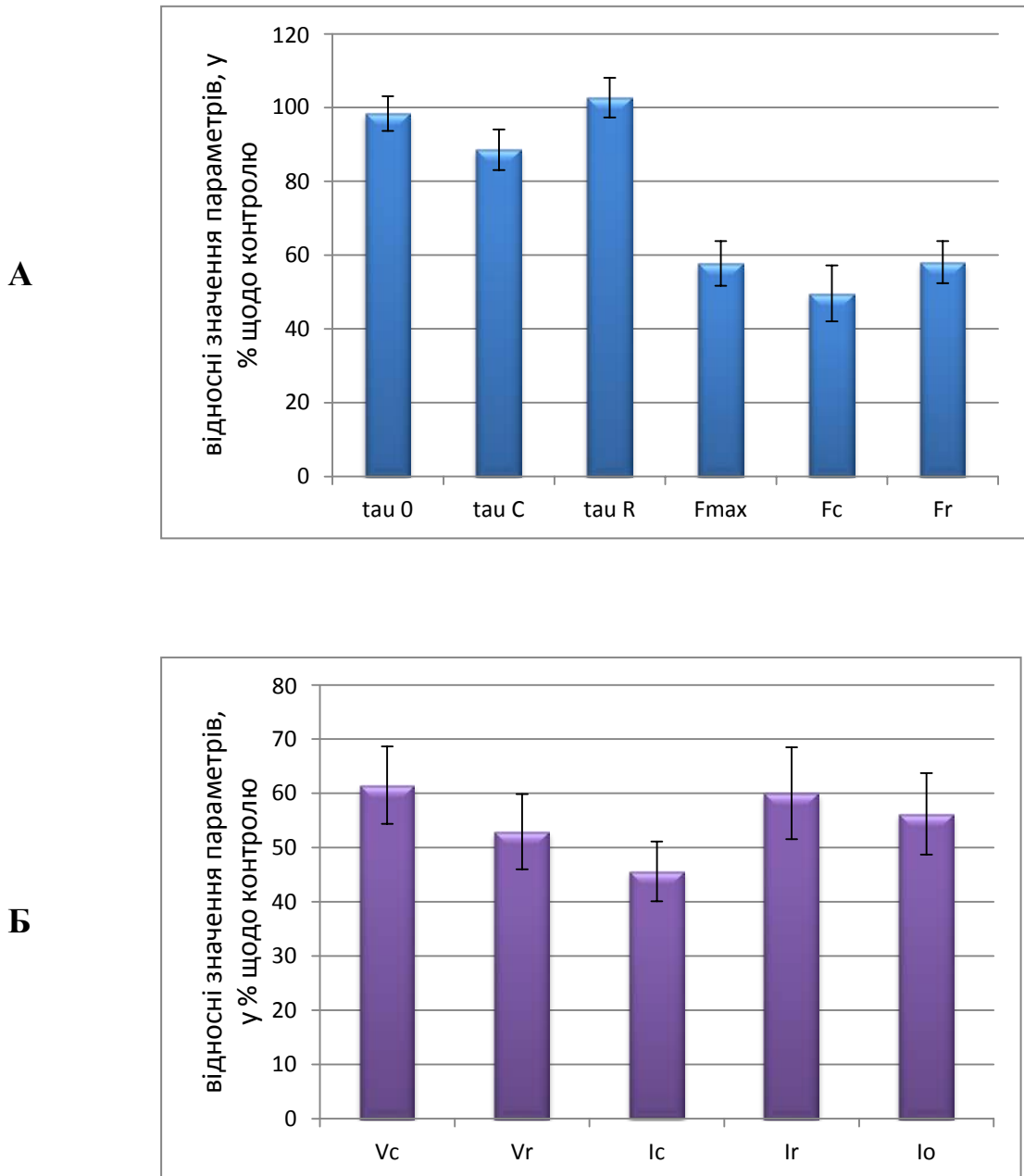
стаціонарного рівня протягом 2-4 хв і далі було постійним. За даних умов мало місце вірогідне зниження амплітуди спонтанних скорочень у середньому до  $56,4 \pm 4,2 \%$  ( $n=7$ ,  $p<0,001$ ), тоді як їх частота зменшувалась у середньому до  $73,8 \pm 6,8 \%$  ( $n=7$ ,  $p<0,05$ ).



**Рис. 3.5.** Спонтанна скорочувальна активність препаратів поздовжніх гладеньких м'язів маткових труб щурів: порівняння типових скорочень у контролі та на тлі донора NO нітропрусида натрію (НПН, 100  $\mu$ M). Стрілкою вказано момент додавання НПН; штриховою лінією позначено рівень базального напруження м'язового препарату в контролі. Наведено типову механограму.

Механокінетичним аналізом встановлено, що НПН індукував також суттєві зміни окремих параметрів спонтанних скорочень (рис. 3.6): на тлі підвищеної концентрації NO у однаковій мірі (у середньому на близько 40%)

зменшувалися усі силові ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ) параметри. За дії НПН часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ) залишалися на контрольному рівні.



**Рис. 3.6.** Параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів за попередньої інкубації з донором NO нітропрусидом натрію (100  $\mu\text{M}$ ): А – часові ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ) і силові ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ) параметри; Б – швидкісні ( $V_C$  і  $V_R$ ) та імпульсні ( $I_{\max}$  - позначено  $I_0$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) параметри.

За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі (n=7, \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$  та \*\*\* -  $p < 0.001$  – різниця достовірна щодо контролю).

Також під дією НПН суттєво і приблизно на одному рівні (у середньому на 45-55 %) зменшувалися швидкісні ( $V_C$  і  $V_R$ ) та імпульсні ( $I_{max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) параметри (рис. 3.6 Б) (n=7,  $p < 0,01$ ). Оскільки розрахункові формули цих груп параметрів включають значення амплітуди скорочень, такі кінетичні ефекти можуть бути обумовлені саме пригніченням амплітуди. На користь такого передбачення свідчать однакова міра зменшення силових ( $F_{max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ), швидкісних ( $V_C$  і  $V_R$ ) та імпульсних ( $I_{max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) параметрів, а також усунення зазначених змін при нормуванні параметрів у контролі і за дії НПН на амплітуду скорочень.

Ми можемо передбачити механізми, які, ймовірно, залучені у реалізацію отриманих нами ефектів НПН. Наразі серед дослідників домінує гіпотеза, що пригнічення напруження і скорочення у м'язах матки за збільшеного рівня NO забезпечується прямою модифікацією клітинних протеїнів, які приймають участь у реалізації скорочення-розслаблення[82].

На користь такого трактування механізмів які лежать в основі отриманих нами ефектів є той факт, що НПН здатен продукувати не тільки NO, але й його редокс-форми (зокрема,  $NO^+$ ). Відомо, що  $NO^+$  в міометрії метаболізується до йону нітрозонію ( $NO_2^+$ ), який може нітрозилувати фенольні та сульфгідрильні групи протеїнів[83]. Також відомо, за таким механізмом модифікації з суттєвих сульфгідрильних груп активного центру АТФ-ази міозину обумовлюється пригнічення його активності[83]. Оскільки молекули NO здатні вільно проникати в клітини, ймовірно, що саме цей шлях може бути активно залучений у пригнічення спонтанної скорочувальної активності міометрія НПН та переважати. Також іншим можливим додатковим шляхом, за яким НПН може індукувати розслаблення міометрія – безпосередня активація NO  $K^+$ -провідності плазматичної мембрани[84].

## ВИСНОВКИ

1. Здійснено повний механокінетичний аналіз спонтанних скорочень міометрія щурів та встановлено, що метод багатопараметричного аналізу надійно описує процес скорочення-розслаблення і може бути застосований для повного кількісного аналізу скорочувальної активності міометрія, а також з метою передбачення молекулярних мішеней у випадку модуляції скоротливої активності при дослідженні NO-залежного функціонування цих м'язів.

2. Встановлено, що повне блокування базального синтезу NO у тканині міометрія щурів супроводжується активацією спонтанної скорочувальної активності міометрія та збільшенням більшості часових ( $\tau_0$  і  $\tau_C$ ), силових ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ), швидкісних ( $V_R$ ) та імпульсних ( $I_{\max}$  і  $I_C$ ) механокінетичних параметрів.

3. Визначено, що на тлі підвищення концентрації NO у тканині міометрія щурів спостерігається зниження базального напруження і пригнічення спонтанних скорочень, а також суттєве зменшення силових ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ), швидкісних ( $V_C$  і  $V_R$ ) та імпульсних ( $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) механокінетичних параметрів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- [1] K. M. Sanders and S. M. Ward, “Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission.,” *Am J Physiol*, vol. 262, no. 3 Pt 1, pp. G379-92, Mar. 1992, doi: 10.1152/ajpgi.1992.262.3.G379.
- [2] E. Idrizaj, C. Traini, M. G. Vannucchi, and M. C. Baccari, “Nitric Oxide: From Gastric Motility to Gastric Dysmotility.,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 18, Sep. 2021, doi: 10.3390/ijms22189990.
- [3] A. Lympelopoulou, N. Cora, J. Maning, A. R. Brill, and A. Sizova, “Signaling and function of cardiac autonomic nervous system receptors: Insights from the GPCR signalling universe.,” *FEBS J*, vol. 288, no. 8, pp. 2645–2659, 2021, doi: 10.1111/febs.15771.
- [4] K. M. Sanders and S. M. Ward, “Nitric oxide and its role as a non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmitter in the gastrointestinal tract.,” *Br J Pharmacol*, vol. 176, no. 2, pp. 212–227, 2019, doi: 10.1111/bph.14459.
- [5] Y. W. Min *et al.*, “Nitrgic Pathway Is the Main Contributing Mechanism in the Human Gastric Fundus Relaxation: An In Vitro Study.,” *PLoS One*, vol. 11, no. 9, p. e0162146, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0162146.
- [6] J. K. Hennan and J. Diamond, “Evidence that spontaneous contractile activity in the rat myometrium is not inhibited by NO-mediated increases in tissue levels of cyclic GMP.,” *Br J Pharmacol*, vol. 123, no. 5, pp. 959–67, Mar. 1998, doi: 10.1038/sj.bjp.0701678.
- [7] B. A. Summers, J. L. Overholt, and N. R. Prabhakar, “Nitric oxide inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> current in glomus cells of the rabbit carotid body via a cGMP-independent mechanism.,” *J Neurophysiol*, vol. 81, no. 4, pp. 1449–57, Apr. 1999, doi: 10.1152/jn.1999.81.4.1449.
- [8] M. Chaud, A. M. Franchi, V. Rettori, S. M. McCann, and M. F. Gimeno, “Nitric oxide in the contractile action of bradykinin, oxytocin, and prostaglandin F<sub>2</sub> alpha in the estrogenized rat uterus.,” *Proc Natl Acad Sci U*

- S A*, vol. 94, no. 20, pp. 11049–54, Sep. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.20.11049.
- [9] D. D. Guerra and K. J. Hurt, “Gasotransmitters in pregnancy: from conception to uterine involution.,” *Biol Reprod*, vol. 101, no. 1, pp. 4–25, 2019, doi: 10.1093/biolre/ioz038.
- [10] K. Duckitt and S. Thornton, “Nitric oxide donors for the treatment of preterm labour.,” *Cochrane Database Syst Rev*, no. 3, p. CD002860, 2002, doi: 10.1002/14651858.CD002860.
- [11] K. Duckitt, S. Thornton, O. P. O’Donovan, and T. Dowswell, “Nitric oxide donors for treating preterm labour.,” *Cochrane Database Syst Rev*, no. 5, p. CD002860, May 2014, doi: 10.1002/14651858.CD002860.pub2.
- [12] J. P. Vogel, J. M. Nardin, T. Dowswell, H. M. West, and O. T. Oladapo, “Combination of tocolytic agents for inhibiting preterm labour.,” *Cochrane Database Syst Rev*, no. 7, p. CD006169, Jul. 2014, doi: 10.1002/14651858.CD006169.pub2.
- [13] Brant B. Hafen, Micah Shook, and Bracken Burns, “Anatomy, Smooth Muscle,” *StatPearls*, Jan. 2022.
- [14] D. M. Williams and B. K. Rubin, “Clinical Pharmacology of Bronchodilator Medications.,” *Respir Care*, vol. 63, no. 6, pp. 641–654, Jun. 2018, doi: 10.4187/respcare.06051.
- [15] C. Giuseppe, J. Paul, and I. Hans-Ulrich, “Use of nitrates in ischemic heart disease.,” *Expert Opin Pharmacother*, vol. 16, no. 11, pp. 1567–72, 2015, doi: 10.1517/14656566.2015.1052742.
- [16] “GISSI-3: effects of lisinopril and transdermal glyceryl trinitrate singly and together on 6-week mortality and ventricular function after acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell’infarto Miocardico.,” *Lancet*, vol. 343, no. 8906, pp. 1115–22, May 1994.
- [17] “Yale Histology: Muscle.”
- [18] B. B. Hafen and B. Burns, *Physiology, Smooth Muscle*. 2022.

- [19] J.-L. Gade, *Mechanical Properties of Arteries: An In Vivo Parameter Identification Method*, vol. 2113. Linköping: Linköping University Electronic Press, 2021. doi: 10.3384/diss.diva-172297.
- [20] R. C. Webb, “Smooth muscle contraction and relaxation.,” *Adv Physiol Educ*, vol. 27, no. 1–4, pp. 201–6, Dec. 2003, doi: 10.1152/advan.00025.2003.
- [21] T. Katila, “Uterine Contractility,” *Current Therapy in Equine Reproduction*, pp. 44–51, Jan. 2007, doi: 10.1016/B978-0-7216-0252-3.50011-4.
- [22] V. Jain, G. R. Saade, and R. E. Garfield, “Structure and function of the myometrium,” *Advances in Organ Biology*, vol. 8, pp. 215–246, Jan. 2000, doi: 10.1016/S1569-2590(00)08009-5.
- [23] Завгородняя АН and Малахов ВА, “Проблема оксида азота в неврологии,” *Харьков: СумДПУім. АС Макаренка*, 2009.
- [24] S. Moncada and A. Higgs, “The L-arginine-nitric oxide pathway.,” *N Engl J Med*, vol. 329, no. 27, pp. 2002–12, Dec. 1993, doi: 10.1056/NEJM199312303292706.
- [25] K. Chen, R. N. Pittman, and A. S. Popel, “Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective.,” *Antioxid Redox Signal*, vol. 10, no. 7, pp. 1185–98, Jul. 2008, doi: 10.1089/ars.2007.1959.
- [26] H. Cai and D. G. Harrison, “Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress.,” *Circ Res*, vol. 87, no. 10, pp. 840–4, Nov. 2000, doi: 10.1161/01.res.87.10.840.
- [27] A. v Kurpad *et al.*, “In vivo arginine production and nitric oxide synthesis in pregnant Indian women with normal and low body mass indices.,” *Eur J Clin Nutr*, vol. 63, no. 9, pp. 1091–7, Sep. 2009, doi: 10.1038/ejcn.2009.24.
- [28] R. F. Furchgott, “Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide.,” *Biosci Rep*, vol. 19, no. 4, pp. 235–51, Aug. 1999, doi: 10.1023/a:1020537506008.
- [29] L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, and G. Chaudhuri, “Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and

- vein is nitric oxide.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 84, no. 24, pp. 9265–9, Dec. 1987, doi: 10.1073/pnas.84.24.9265.
- [30] Литвинов А.В and Литвинова И.А, “Нобелевская плеяда медицинских открытий,” *Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал*, vol. 7, 2008.
- [31] Беленичев И.Ф., Черний В.И, and Колесник Ю.М, *Рациональная нейропротекция*. Изд. дом Заславский, 2009.
- [32] Ивашкин В.Т and Драпкина О.М., *Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока*, 2nd ed. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2011.
- [33] Манухина Е.Б, Дауни Х.Ф, Маклет Р.Т, and Малышев И.Ю., “Защитные и повреждающие эффекты периодической гипоксии: роль оксида азота ,” *Вестник РАМН*, no. 2, pp. 25–34, 2007.
- [34] N. S. Bryan, K. Bian, and F. Murad, “Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development.,” *Front Biosci (Landmark Ed)*, vol. 14, no. 1, pp. 1–18, 2009, doi: 10.2741/3228.
- [35] I. L. O. Buxton, “Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation.,” *Mol Pharmacol*, vol. 65, no. 5, pp. 1051–9, May 2004, doi: 10.1124/mol.65.5.1051.
- [36] S. M. Sladek, R. R. Magness, and K. P. Conrad, “Nitric oxide and pregnancy.,” *Am J Physiol*, vol. 272, no. 2 Pt 2, pp. R441-63, Feb. 1997, doi: 10.1152/ajpregu.1997.272.2.R441.
- [37] Danylovyh GV, Bohach TV, and Danylovyh YV, “The biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. Nitric oxide formation features and its functional role in mitochondria,” *Ukr.Biochem.J*, vol. 90, no. 1, pp. 3–24, Jan. 2018.
- [38] Левченкова О.С, Новиков В.Е, and Пожилова Е.В, “Митохондриальная пора как мишень фармакологического воздействия,” *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*, vol. 13, no. 4, pp. 24–33, 2014.

- [39] Новиков В.Е and Левченкова О.С, “Индукцированный гипоксией фактор как мишень фармакологического воздействия,” *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, vol. 11, no. 2, pp. 8–16, 2013.
- [40] Новиков В.Е and Левченкова О.С, “Митохондриальные мишени для фармакологической регуляции адаптации клетки к воздействию гипоксии ,” *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, vol. 12, no. 2, pp. 28–35, 2014.
- [41] Новиков В.Е, Левченкова О.С, and Пожилова Е.В, “Роль митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала и его модуляторов в адаптации клетки к гипоксии,” *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*, vol. 13, no. 2, pp. 48–54, 2014.
- [42] M. Kelm, “Nitric oxide metabolism and breakdown,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1411, no. 2–3, pp. 273–289, May 1999, doi: 10.1016/S0005-2728(99)00020-1.
- [43] N. S. Kwon, C. F. Nathan, C. Gilker, O. W. Griffith, D. E. Matthews, and D. J. Stuehr, “L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen.,” *J Biol Chem*, vol. 265, no. 23, pp. 13442–5, Aug. 1990.
- [44] M. A. Marletta, P. S. Yoon, R. Iyengar, C. D. Leaf, and J. S. Wishnok, “Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate.,” *Biochemistry*, vol. 27, no. 24, pp. 8706–11, Nov. 1988, doi: 10.1021/bi00424a003.
- [45] W. K. Alderton, C. E. Cooper, and R. G. Knowles, “Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.,” *Biochem J*, vol. 357, no. Pt 3, pp. 593–615, Aug. 2001, doi: 10.1042/0264-6021:3570593.
- [46] P. Pacher, J. S. Beckman, and L. Liaudet, “Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.,” *Physiol Rev*, vol. 87, no. 1, pp. 315–424, Jan. 2007, doi: 10.1152/physrev.00029.2006.

- [47] P. J. Kolodziejcki, A. Musial, J.-S. Koo, and N. T. Eissa, "Ubiquitination of inducible nitric oxide synthase is required for its degradation.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no. 19, pp. 12315–20, Sep. 2002, doi: 10.1073/pnas.192345199.
- [48] P. Gautam and S. Jain, "Functions and significance of nitric oxide in pathophysiological processes," *Indian Journal of Biotechnology Vol*, vol. 6, pp. 293–304, Aug. 2007.
- [49] Y. E. Henrotin, P. Bruckner, and J.-P. L. Pujol, "The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage.," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 11, no. 10, pp. 747–55, Oct. 2003, doi: 10.1016/s1063-4584(03)00150-x.
- [50] F. Hertelendy and T. Zakar, "Regulation of myometrial smooth muscle functions.," *Curr Pharm Des*, vol. 10, no. 20, pp. 2499–517, 2004, doi: 10.2174/1381612043383926.
- [51] J. Norman, "Nitric oxide and the myometrium.," *Pharmacol Ther*, vol. 70, no. 2, pp. 91–100, 1996, doi: 10.1016/0163-7258(96)00004-6.
- [52] Gude N.M, DiIulio J, Brennecke S.P, and R. G. King, "Human placental villous nitric oxide synthase activity," *Pharmacol Commun.*, vol. 4, pp. 163–171, 1994.
- [53] J. L. di Iulio, N. M. Gude, R. G. King, and S. P. Brennecke, "Human placental and fetal membrane nitric oxide synthase activity before, during and after labour at term.," *Reprod Fertil Dev*, vol. 7, no. 6, pp. 1505–8, 1995, doi: 10.1071/rd9951505.
- [54] B. Ramsay, M. R. Johnson, A. M. Leone, and P. J. Steer, "The effect of exogenous oestrogen on nitric oxide production in women: a placebo controlled crossover study.," *Br J Obstet Gynaecol*, vol. 102, no. 5, pp. 417–9, May 1995, doi: 10.1111/j.1471-0528.1995.tb11296.x.
- [55] B. Ramsay, S. R. Sooranna, and M. R. Johnson, "Nitric oxide synthase activities in human myometrium and villous trophoblast throughout

- pregnancy.,” *Obstet Gynecol*, vol. 87, no. 2, pp. 249–53, Feb. 1996, doi: 10.1016/0029-7844(95)00391-6.
- [56] A. J. Thomson *et al.*, “Nitric oxide synthase activity and localization do not change in uterus and placenta during human parturition.,” *Hum Reprod*, vol. 12, no. 11, pp. 2546–52, Nov. 1997, doi: 10.1093/humrep/12.11.2546.
- [57] A. J. Thomson, C. B. Lunan, A. D. Cameron, I. T. Cameron, I. A. Greer, and J. E. Norman, “Nitric oxide donors induce ripening of the human uterine cervix: a randomised controlled trial.,” *Br J Obstet Gynaecol*, vol. 104, no. 9, pp. 1054–7, Sep. 1997, doi: 10.1111/j.1471-0528.1997.tb12066.x.
- [58] R. K. Bansal, P. C. Goldsmith, Y. He, C. J. Zaloudek, J. L. Ecker, and R. K. Riemer, “A decline in myometrial nitric oxide synthase expression is associated with labor and delivery.,” *J Clin Invest*, vol. 99, no. 10, pp. 2502–8, May 1997, doi: 10.1172/JCI119434.
- [59] S. R. Deshpande, K. Satyanarayana, M. N. A. Rao, and K. v. Pai, “Nitric oxide modulators: an emerging class of medicinal agents.,” *Indian J Pharm Sci*, vol. 74, no. 6, pp. 487–97, Nov. 2012, doi: 10.4103/0250-474X.110572.
- [60] R. G. Knowles and S. Moncada, “Nitric oxide synthases in mammals.,” *Biochem J*, vol. 298 ( Pt 2), pp. 249–58, Mar. 1994, doi: 10.1042/bj2980249.
- [61] K. Schönafinger, “Heterocyclic NO prodrugs.,” *Farmaco (Societa chimica italiana : 1989)*, vol. 54, no. 5, pp. 316–20, May 1999, doi: 10.1016/s0014-827x(99)00031-2.
- [62] R. M. Clancy, A. R. Amin, and S. B. Abramson, “The role of nitric oxide in inflammation and immunity.,” *Arthritis Rheum*, vol. 41, no. 7, pp. 1141–51, Jul. 1998, doi: 10.1002/1529-0131(199807)41:7<1141::AID-ART2>3.0.CO;2-S.
- [63] H. Maul, M. Longo, G. Saade, and R. Garfield, “Nitric Oxide and its Role During Pregnancy: From Ovulation to Delivery,” *Current Pharmaceutical Design*, vol. 9, no. 5, pp. 359–380, Feb. 2003, doi: 10.2174/1381612033391784.

- [64] L. Shukovski and A. Tsafiri, "The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat.," *Endocrinology*, vol. 135, no. 5, pp. 2287–90, Nov. 1994, doi: 10.1210/endo.135.5.7525265.
- [65] C. Buhimschi, I. Buhimschi, C. Yallampalli, K. Chwalisz, and R. E. Garfield, "Contrasting effects of diethylenetriamine-nitric oxide, a spontaneously releasing nitric oxide donor, on pregnant rat uterine contractility in vitro versus in vivo.," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 177, no. 3, pp. 690–701, Sep. 1997, doi: 10.1016/s0002-9378(97)70166-2.
- [66] M. H. Hedrick *et al.*, "Chronic fetal vascular access.," *Lancet*, vol. 342, no. 8879, pp. 1086–7, Oct. 1993, doi: 10.1016/0140-6736(93)92065-2.
- [67] I. Buhimschi, M. Ali, V. Jain, K. Chwalisz, and R. E. Garfield, "Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour.," *Hum Reprod*, vol. 11, no. 8, pp. 1755–66, Aug. 1996, doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019481.
- [68] M. Ali, I. Buhimschi, K. Chwalisz, and R. E. Garfield, "Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition.," *Mol Hum Reprod*, vol. 3, no. 11, pp. 995–1003, Nov. 1997, doi: 10.1093/molehr/3.11.995.
- [69] K. Chwalisz and R. Garfield, "Nitric oxide as the final mediator of cervical ripening," *Hum Reprod*, vol. 13, pp. 245–248, Mar. 1998, doi: 10.1093/humrep/13.2.245.
- [70] G. D. Helmbrecht *et al.*, "L-arginine reverses the adverse pregnancy changes induced by nitric oxide synthase inhibition in the rat.," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 175, no. 4 Pt 1, pp. 800–5, Oct. 1996, doi: 10.1016/s0002-9378(96)80002-0.
- [71] Kosterin S, Tsymbalyuk O, and Holden O, "Multiparameter analysis of mechanokinetics of the contractile response of smooth muscles," *Series on Biomechanics*, vol. 35, no. 1, pp. 14–30, Apr. 2021.
- [72] J. Xu, S. N. Menon, R. Singh, N. B. Garnier, S. Sinha, and A. Pumar, "The role of cellular coupling in the spontaneous generation of electrical activity in

- uterine tissue.,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, p. e0118443, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0118443.
- [73] C. P. Testrow, A. v Holden, A. Shmygol, and H. Zhang, “A computational model of excitation and contraction in uterine myocytes from the pregnant rat.,” *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 9159, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-27069-x.
- [74] H. Blencowe *et al.*, “National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications.,” *Lancet*, vol. 379, no. 9832, pp. 2162–72, Jun. 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(12)60820-4.
- [75] Казарян К.В., Унанян Н.Г., and Мкртчян А.В., “Взаимодействие пейсмеркерных активностей крайних отделов маточных труб у небеременных крыс.,” *Доклады НАН Армении*, vol. 114, no. 1, pp. 69–75, 2014.
- [76] Казарян К.В. and Пилипосян Т.А., “Овариальная область миометрия и ее роль в регуляции спонтанной электрической активности.,” *Медицинская наука Армении НАН РА*, vol. 56, no. 2, pp. 46–54, 2016.
- [77] S. A. Törnblom *et al.*, “mRNA expression and localization of bNOS, eNOS and iNOS in human cervix at preterm and term labour.,” *Reprod Biol Endocrinol*, vol. 3, p. 33, Aug. 2005, doi: 10.1186/1477-7827-3-33.
- [78] D. Ogando *et al.*, “Steroid hormones augment nitric oxide synthase activity and expression in rat uterus.,” *Reprod Fertil Dev*, vol. 15, no. 5, pp. 269–74, 2003, doi: 10.1071/rd03013.
- [79] H. Gupta and S. B. Deshpande, “Bisphenol A decreases the spontaneous contractions of rat uterus in vitro through a nitrenergic mechanism.,” *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, vol. 29, no. 6, pp. 593–598, Nov. 2018, doi: 10.1515/jbcpp-2017-0068.
- [80] S. Perez Martinez *et al.*, “Effect of nitric oxide synthase inhibitors on ovum transport and oviductal smooth muscle activity in the rat oviduct.,” *J Reprod Fertil*, vol. 118, no. 1, pp. 111–7, Jan. 2000, doi: 10.1530/jrf.0.1180111.

- [81] A. Faletti, S. Pérez Martínez, C. Perotti, and M. A. de Gimeno, “Activity of ovarian nitric oxide synthase (NOs) during ovulatory process in the rat: relationship with prostaglandins (PGs) production.,” *Nitric Oxide*, vol. 3, no. 4, pp. 340–7, Aug. 1999, doi: 10.1006/niox.1999.0231.
- [82] Данилович Ю, “Оксид азоту як регулятор внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в міоцитах матки,” *Український біохімічний журнал*, vol. 84, no. 3, pp. 5–25, 2012.
- [83] J. E. Norman *et al.*, “Effects of cGMP and the nitric oxide donors glyceryl trinitrate and sodium nitroprusside on contractions in vitro of isolated myometrial tissue from pregnant women.,” *J Reprod Fertil*, vol. 110, no. 2, pp. 249–54, Jul. 1997, doi: 10.1530/jrf.0.1100249.
- [84] F. Lovren and C. Triggle, “Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery.,” *Br J Pharmacol*, vol. 131, no. 3, pp. 521–9, Oct. 2000, doi: 10.1038/sj.bjp.0703588.