

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 “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2022р

**ДОСЛІДЖЕННЯ МАНОКІНЕТИКИ СПОНТАННОЇ СКОРОЧУВАЛЬНОЇ  
АКТИВНОСТІ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО  
ТРАКТУ ЩУРІВ ЗА ХРОНІЧНОЇ ДІЇ НАНО-TIO<sub>2</sub>**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
студента спеціальності 091 Біологія  
ОП «Біологія (високі технології)»

**Гурського Леоніда Анатолійовича**

Науковий керівник:

професор кафедри молекулярної  
біотехнології та біоінформатики

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

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2022 р.**

## РЕФЕРАТ

У даній роботі було проведено дослідження спонтанної скорочувальної активності гладеньких м'язів шлунку і товстого кишечника щурів за хронічного (упродовж 6 місяців) надходження наночастинок  $\text{TiO}_2$ , здійснено повний механокінетичний аналіз спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку і товстого кишечника (на прикладі саесум) щурів за допомогою методу багатопараметричного механокінетичного аналізу, досліджено спонтанну скорочувальну активність ізольованих кільцевих гладеньком'язових смужок antrum та саесум щурів, які упродовж 6 місяців отримували водну суспензією наночастинок  $\text{TiO}_2$ . Проведено огляд сучасних та актуальних досліджень на тему біорозподілу, токсичності та механізмів впливу нано- $\text{TiO}_2$  на клітини, органи і тканини організмів.

Ключові слова: нано- $\text{TiO}_2$ , саесум, antrum, гладенькі м'язи, спонтанні скорочення, багатопараметричний механокінетичний аналіз, токсичність.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	3
ВСТУП .....	4
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	6
1.1 Використання наночастинок та шляхи їх надходження у навколишнє середовище .....	6
1.2 Властивості та використання наночастинок $TiO_2$ .....	7
1.3 Загальні шляхи надходження наночастинок (і $TiO_2$ зокрема) в організм .....	7
1.4 Біорозподіл наночастинок загалом і $TiO_2$ зокрема .....	10
1.5 Токсичність $TiO_2$ . Дія на клітини та органи .....	11
1.6 Вплив і взаємодія наночастинок $TiO_2$ з клітинними макромолекулами .....	18
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ .....	21
2.1. Робота з тваринами при постановці експериментів .....	21
2.2. Підготовка гладеньком'язових препаратів і тензометричні експерименти .....	21
2.3. Повний механокінетичний аналіз спонтанних скорочень .....	23
2.4. Розрахунок нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення гладеньких м'язів 25	
2.5. Статистичний аналіз даних .....	26
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	27
3.1. Механокінетичні характеристики спонтанних скорочень гладеньких м'язів шлунку і товстого кишечника щурів у контролі .....	27
3.2. Механокінетичні характеристики спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів шлунку щурів за хронічної дії наночастинок $TiO_2$ в .....	31
3.2. Механокінетичні характеристики спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки щурів за хронічної дії наночастинок $TiO_2$ в .....	38
ВИСНОВКИ .....	44
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	45

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ENP – штучно створені наночастинки

НЧ– наночастинки

ШКТ- шлунково-кишковий тракт

ГЕБ- гемато-енцефалічний бар'єр

ZO-1- zonula occludens-1 – білок щільних контактів

ROS- reactive oxygen species- реактивні форми кисню

ДОРАС- дигідроксифеніл оцтової кислоти

HVA- гомованілінова кислота

NER- nucleotide excision repair abilities- здібності до репарації нуклеотидів

BER- base excision repair

PARP- poly (ADP-ribose) polymerase

AP1- білок апоптозу 1

TLR- toll-like receptor

## ВСТУП

Сучасні тенденції розвитку технологій промислового виробництва передбачають, зокрема, створення матеріалів з принципово новими характеристиками. Зокрема, одним із найбільш промислово поширених новітніх матеріалів є наноматеріали (наночастинки, нанотрубки, квантові точки тощо). Наразі велика кількість технологічних процесів використовують нанорозмірні матеріали амфотерної сполуки діоксиду титану ( $\text{TiO}_2$ ), світовий ринок якого за останні роки оцінюється приблизно у п'ять мільйонів тон за рік, з них великий сектор займає харчова, медична та фармакологічна промисловість. Втім, наразі відкритою до з'ясування залишається проблема токсичності  $\text{TiO}_2$  для живих організмів, що ускладнюється в силу його високої активності щодо взаємодії з іншими хімічними речовинами, а також завдяки фотокаталітичним властивостям – і з фізичними факторами. Дослідженнями останніх років показано, що такі активні групи наночастинок  $\text{TiO}_2$  можуть взаємодіяти з тіольними, карбоксильними, аміногрупами та групами бічних ланцюгів амінокислот, а також з пептидними зв'язками макромолекул білків, зокрема, рецепторів на плазматичних мембранах клітин.

Регуляція тонуусу і скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів здійснюється шляхом парасимпатичного та симпатичного контролю за участі відповідно нейромедіаторів збудження і гальмування. У той же час, навіть за відсутності впливів нейромедіаторів і гормонів у гладеньких м'язах стінок травного тракту реєструється спонтанна скорочувальна активність, в основі формування якої лежать механізми пейсмейкерної активності інтерстиціальних клітин Кахаля.

При потраплянні до організму нанорозмірні ксенобіотики, зокрема наночастинки  $\text{TiO}_2$  легко долають ендотелійний бар'єр кишечника і через

портальну вену потрапляють у системний кровотік. Відомо, що наночастинки, зокрема і нано- $\text{TiO}_2$ , транспортуються протеїнами плазми крові та здатні накопичуватись у тканинах і органах.

Оскільки відомо, що наночастинки потрапляють в тканини стінки травного тракту і там частково накопичуються, є актуальним і цікавим дослідити стан пейсмерних механізмів регуляції спонтанних скорочень гладеньком'язової тканини шлунку і товстого кишечника за умов хронічного надходження в організм нано- $\text{TiO}_2$ . Тож метою дипломної роботи було дослідження спонтанної скорочувальної активності гладеньких м'язів шлунку і товстого кишечника щурів за хронічного (упродовж 6 місяців) надходження наночастинок  $\text{TiO}_2$ .

Для вирішення мети було поставлено такі задачі:

1. Здійснити повний механокінетичний аналіз спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку і товстого кишечника (на прикладі *caecum*) щурів;
2. Дослідити спонтанну скорочувальну активність ізольованих кільцевих гладеньком'язових смужок *antrum* щурів, які упродовж 6 місяців отримували водну суспензією наночастинок  $\text{TiO}_2$ ;
3. Проаналізувати спонтанну скорочувальну активність ізольованих кільцевих гладеньком'язових смужок *caecum* щурів, які упродовж 6 місяців отримували водну суспензією наночастинок  $\text{TiO}_2$ .

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Використання наночастинок та шляхи їх надходження у навколишнє середовище

«Наноматеріал» визначають як матеріал з будь-яким зовнішнім виміром в нанорозмірі або такий, що має внутрішню структуру чи структуру поверхні в нанорозмірі. Наночастинка визначається як нанооб'єкт з усіма трьома зовнішніми вимірами в нанорозмірі, а «нанорозмір» визначається як розмір менше 100 нм. Штучно створені наночастинки в наш час широко використовуються у багатьох областях, до яких відносяться зокрема біомедицина, сільське господарство, косметика, електроніка, фармацевтика, енергетична сфера, каталіз, екологічна детекція[1]. До таких наночастинок належать вуглецеві, органічні, наночастинки металів, металооксидні, квантові точки, тощо. Так, наночастинки металів використовуються у лікарських засобах та мають антимікробні властивості, а наночастинки ZnO і TiO<sub>2</sub> наприклад, мають високу здатність до розсіювання світла і використовуються для захисту від шкідливого ультрафіолетового випромінювання, наприклад, у косметиці, зокрема у сонцезахисних кремах[2]. Також ENP можуть використовуватись як носії для доставки терапевтичних агентів у цільові клітини, клітинні компартменти, тканини та органи[3]. Зростання кількості продуктів на основі ENP для різноманітних застосувань, в кінцевому рахунку, збільшує їх надходження в повітря, воду та ґрунт. Відходи наноматеріалів надходять в навколишнє середовище в результаті експлуатації або утилізації нанопристроїв, а також під час виробництва наноматеріалів. Через малий розмір частинок такі викиди легко розповсюджуються в повітрі, можуть хімічно перетворюватись, впливати на якість води, накопичуються в ґрунтах, тощо.

Крім того, ENP можуть прямо чи опосередковано потрапляти до клітин живих організмів. Часто результати таких взаємодій іще не досліджувались. Розвиток галузей нанотехнологій, пов'язаних з ENP, та розробка і впровадження у виробництво нових наноматеріалів сильно випереджує дослідження їх токсичності для людини[2].

## **1.2 Властивості та використання наночастинок $\text{TiO}_2$**

В останні десятиліття спостерігається ріст використання  $\text{TiO}_2$  через відкриття у нього нових властивостей, що присутні його частинкам у нанорозмірі. Властивості наночастинок  $\text{TiO}_2$  при відповідному застосуванні включають очищення повітря, очищення води, знезараження, антибактеріальний ефект, захист від ультрафіолету, фотокаталіз, тощо. Тому  $\text{TiO}_2$  є одним з найпопулярніших комерційно доступних наноматеріалів, який знайшов застосування в різних областях завдяки своїй доступності, біосумісності, низькій вартості та високій хімічній стабільності[4]. Нано- $\text{TiO}_2$  використовується як ультрафіолетовий (УФ) фільтр у сонцезахисних кремах, тональних кремах та бальзамах для губ[5]. Доведено його ефективність як УФ-фільтра у запобіганні раку шкіри та сонячних опіках[6]. Нано- $\text{TiO}_2$  також використовується у зубних пастах, продуктах харчування, засобах зберігання їжі. Усі ці способи застосування роблять потрапляння нано- $\text{TiO}_2$  в організм людини різноманітними шляхами дуже легким і імовірним.

## **1.3 Загальні шляхи надходження наночастинок (і $\text{TiO}_2$ зокрема) в організм**

### **Надходження у дихальні шляхи**

Вдихання визнане основним шляхом потрапляння наночастинок у організм. Частинки з аеродинамічним діаметром понад 10 мкм фільтруються

носом людини і не досягають решти дихальних шляхів. Частинки з аеродинамічним діаметром менше 10 мкм потрапляють в легені людини та відкладаються в дихальних шляхах або дихальній зоні легенів. Загалом, чим дрібніші частинки, тим глибше вони можуть проникати в легені; частинки приблизно 2,5 мкм в аеродинамічному діаметрі найбільше відкладаються в альвеолах, в той час як частинки розміром 2,5–10 мкм більше осідають в верхніх дихальних шляхах. Частинки з аеродинамічним діаметром менше 100 нм сильно відкладаються в альвеолярній області через дифузійні сили[7]. У легенях є шар слизу, функція якого полягає у захисті трахеобронхіального епітелію. Потраплення ENP у цю облась призводить до їх часткового виведення шляхом мукоциліарного кліренсу. Однак наночастинки все одно осаджуються у дихальних шляхах. Це обумовлюється інерцією, гравітаційним осадженням, а також броунівською дифузією, яка характерна для малих ENP тому що вони поведуться як молекули газу. Тому осадження сильніше із вдиханням менших частинок[1]. Однак для наночастинок менше ніж 10 нм, альвеолярне відкладення зменшується через високу ступінь відкладення в носовій порожнині[7]. Для працівників допустима концентрація нано- $\text{TiO}_2$  у середовищі була оцінена як 15 mg/m<sup>3</sup>, а безпосередньо шкідлива концентрація як 7 500 mg/m<sup>3</sup>[8].

### **Надходження у шлунково-кишковий тракт**

Нано- $\text{TiO}_2$  додають до багатьох харчових продуктів, включаючи сири, соуси, знежирене молоко, морозиво та кондитерські вироби. Наприклад його використовують у покритті на цукерках та жуйках. Його вміст у солодощах, зокрема в цукерках, жуйках, шоколаді і продуктах з білим покриттям, порівняно з іншими продуктами, дуже високий, і може досягати 2,5 мг/г їжі[9]. Споживання з харчовими добавками, водою та ліками дозволяє ENP досягати шлунково-кишкового тракту. Крім того, НЧ, що вдихаються, можуть бути виведені шляхом мукоциліарного кліренсу. Такі наночастинки потім

ковтаються і потрапляють в ШКТ[7]. Загальноприйнято, що ступінь поглинання НЧ у ШКТ збільшується зі зменшенням діаметра частинок. Через шлунково-кишковий тракт вони можуть надходити в лімфатичну систему. Більшість ENP, що надходять у шлунково-кишковий тракт швидко виводяться. Результати останніх досліджень показали, що нано- $\text{TiO}_2$  слабо захоплюється з шлунково-кишкового тракту і передається в системний кровообіг у щурів і людини. Також, зміна в рН може викликати агрегацію наноматеріалів всередині ШКТ. Малі агрегати виводяться з фекаліями, невелика кількість адсорбується у кишківнику. Великі агрегати можуть блокувати ШКТ. ENP, які не були виведені за короткий час, транслюкуються в кровоносні капіляри і, в залежності від розміру, переміщуються до тих чи інших органів[1]. При пероральному надходженні НЧ  $\text{TiO}_2$  імовірно переміщуються через клубовий епітелій і через пейєрові латки, що може призводити до пошкодження і хронічної недостатності епітелію кишечника. Після введення наночастинок  $\text{TiO}_2$  пероральним зондом в тонкому кишечнику спостерігали запалення. Результати тестів на мишах показують, що пероральний прийом НЧ  $\text{TiO}_2$  може сприяти посиленню наявного раку кишківника[8].

### **Трансдермальне надходження**

Вважається, що сильним бар'єром проти проникнення ENP через шкіру є роговий шар- шар ороговілих клітин- корнеоцитів. Однак відомо, що наночастинок  $\text{TiO}_2$  мікронного та субмікронного розмірів проходять через шкіру, досягаючи волосяні фолікули і дерму. Також підтверджене проникнення  $\text{TiO}_2$  розміром 10–50 нм через шкіру. Показана також можливість проникнення нано-  $\text{TiO}_2$  у глибші шари через міжклітинні канали і волосяні фолікули[1]. Було встановлено, що нано- $\text{TiO}_2$  проникає через шкіру безшерстих мишей при хронічному впливі, викликаючи ураження шкіри та печінки. Доведено також, що компоненти сонцезахисних кремів краще проникають через хвору шкіру у людей, зокрема уражену псоріазом[8]. Крім того, важливо зазначити, що при

застосуванні в сфері наномедицини, внутрішньовенні та підшкірні ін'єкції носіїв наночастинок доставляють екзогенні наночастинки безпосередньо в організм людини без проходження нормального процесу всмоктування.

#### **1.4 Біорозподіл наночастинок загалом і нано-TiO<sub>2</sub> зокрема**

ENP можуть потрапляти у кров шляхом фагоцитозу. Після потрапляння у кров вони здатні розповсюджуватись по організму і накопичуватись у органах, перелік яких включає нирки, селезінку, серце, печінку, кістковий мозок і нервову систему. Розподіл по цих органах залежить від фізико-хімічних властивостей наночастинок, а швидкість розподілу визначається швидкістю кровотоку і швидкістю дифузії з капілярів в органи і тканини. Після потрапляння до крові НЧ фільтруються селезінкою, що призводить до їх накопичення у ній. Більші частинки накопичуються в печінці, що може викликати некроз тканин печінки.

ENP можуть виводитись через сечу, кал, піт, грудне молоко і слину. Так, нирковий кліренс залежить від співвідношень розмірів ENP і ниркових капілярів. Також нирковій фільтрації запобігає адсорбція біомолекул на поверхні ENP, що збільшує розмір частинок. Таким чином НЧ можуть накопичуватись у видільній системі, ушкоджуючи її[1]. Відомо, що розчинні наночастинки, при осадженні в легенях, можуть розчинятися і швидко проникати в системний кровообіг. Нерозчинні же наночастинки можуть фагоцитуватись макрофагами альвеол, мігрувати в інтерстиціальний простір альвеолярних перегородок або надходити у лімфатичні протоки. Частинок менше 200 нм можуть проникати через гемато-енцефалічний бар'єр. Досліди показують, що після надходження в організм нано- TiO<sub>2</sub> шляхом вдихання, ін'єкції, контакту зі шкірою чи всмоктування в травному тракті, наночастинки TiO<sub>2</sub> знаходять в легенях, органах шлунково-кишкового тракту, печінці, серці, селезінці, нирках та серцевому м'язі[10]. ENP можуть долати біологічні бар'єри.

До 2,67% загальної встановленої кількості наночастинок перетинають гемато-енцефалічний, гемато-тестикулярний, гемато-плацентарний та гемато-молочний бар'єри. Перетину НЧ біологічних бар'єрів забезпечується, по перше, трансклітинним шляхом, що опосередкований рецепторним транспортом або адсорбцією, а по друге- параклітинним шляхом, що полягає у індукції порушення функції щільних контактів. Так, нано- $\text{TiO}_2$  внутрішньовенно введений мишам в період лактації може викликати опосередковане окисним стресом пошкодження молочної залози, дисфункцію щільних контактів та пошкодження клітин альвеолярного епітелію, що призводить до накопичення наночастинок  $\text{TiO}_2$  у потомства через лактацію. Після ендоцитозу ENP можуть активувати у ендотелії клітин утворення активних форм кисню, які призводять до погіршення регуляції білків щільного з'єднання, таких як ZO-1, оклюдин, тощо, і активують запальну відповідь через посилення регуляції E-селектину. НЧ також можуть активувати сигнальні шляхи Rho-кінази, що призводить до перебудови цитоскелету та зміни проникності бар'єру. Крім того, НЧ (включаючи  $\text{TiO}_2$ ) у діапазоні розмірів від 20 до 30 нм можуть бути інтерналізовані ендотеліальними клітинами шляхом кавеоларного чи рафт-опосередкованого ендоцитозу, що призводить до внутрішньоклітинного підвищення концентрації кальцію, скорочення актоміозину та дисфункції ендотеліального бар'єру[11]. Також відомо, го НЧ можуть транспортуватись шляхом аксонального транспорту після інтраназального введення, долаючи ГЕБ[12].

### **1.5 Токсичність нано- $\text{TiO}_2$ . Дія на клітини та органи.**

#### **Загальний опис дії нано- $\text{TiO}_2$ на органи**

Незалежно від того, яке введення використовується у дослідженнях на тваринах, легені зазвичай є основним ушкодженим органом. НЧ можуть

викликати пошкодження клітинної структури, мікросудинну дисфункція, порушення функції альвеолярних макрофагів, інфільтрацію нейтрофілів, запалення легенів, тромбоз, потовщення альвеолярної перегородки, тощо. При дії на мозок нано-TiO<sub>2</sub> погіршує просторове розпізнавання і пам'ять мишей через порушення гомеостазу нейромедіаторної системи та балансу мікроелементів, викликає зміни експресії генів, пов'язані з розвитком мозку, апоптоз нейронів, окислювальний стрес і запалення. Нано-TiO<sub>2</sub> може накопичуватись в печінці і приводити до появи вогнищ апоптозу гепатоцитів і порушень функції печінки, що супроводжуються гістопатологічними змінами, такими як зменшення синусоїдного простору і гідропічна дистрофія. Розширення ниркових каналців і набряк ниркових клубочків спостерігались в результаті накопичення нано-TiO<sub>2</sub> в нирках. Також у дослідях наноматеріали TiO<sub>2</sub> могли накопичуватись у репродуктивній системі, призводячи до пошкодження яєчників і зниження фертильності через зміни у експресії цитокінів, які пов'язані із запаленням та фолікулярною атрезією[11].

Дослідження канцерогенності на гризунах показують, що наночастинки TiO<sub>2</sub> викликали пухлини легенів при інгаляції та внутрішньотрахеальної інстиляції у щурів. Результати показали що захворюваність на пухлини легенів включаючи доброякісні і злоякісні плоскоклітинні та альвеолярно-клітинні пухлини значно зросла порівняно з контрольною групою[7].

Також НЧ TiO<sub>2</sub> чинять токсичну дію на репродуктивну систему. Так, результати досліджень показали, що нано-TiO<sub>2</sub> **може** переміщуватись в цитоплазму або ядро первинно культивованих клітин Сертолі, що призводить до зниження життєздатності клітин, появи порушень у морфологічних структурах і індукції апоптозу[13]

### **Клітинні механізми**

Реактивні форми кисню, ROS, грають фізіологічно важливі ролі в організмах у нормі, однак надлишок ROS може призводити до окислення клітинних компонентів, таких як ДНК, білки і ліпіди, загрожуючи тим самим життєздатності клітини. Встановлено, що ROS можуть генеруватись за участі НЧ напряду, але також можуть продукуватись нейтрофілами і макрофагами через сигнальний шлях запалення. ROS, що утворені таким чином, можуть переокислювати ліпіди. Продукти цих реакцій можуть негативно впливати на інші функції клітини[14]. Дослідження пов'язують індуковану НП генотоксичність з окислювальним стресом. Накопичення реактивних форм кисню може порушити баланс окислювачів/антиоксидантів. Завдяки підвищеним рівням ROS НЧ можуть призводити до виснаження глутатіону, дофаміну, DOPAC і гомованілової кислоти (HVA). ROS, що утворюється в результаті впливу НЧ можуть швидко пошкоджувати біологічні цілі і запускають апоптотичний процес. Дисбаланс між виробленням активних форм кисню і детоксикацією викликає стан окиснювального стресу у клітинах.

НЧ за розміром подібні до багатьох біологічних молекул і структур (~0,1-100 нм), що дозволяє НЧ легко проникати в клітини, органели та функціональні біомолекулярні структури і взаємодіяти з життєво важливими біологічними системами. Так, адсорбція білків на поверхню НЧ також може змінити конформацію білка. Встановлено, що після впливу нано- $\text{TiO}_2$  проникність мітохондріальних мембран зазнавала значних змін, що могло призвести до вивільнення цитохрому С з мітохондрій до цитозолу. Мітохондріальні порушення, такі як втрата потенціалу мітохондріальної мембрани та пошкодження мітохондрій, зазвичай призводить до загибелі клітини. Дослідження *in vitro* також показали, що НЧ можуть загрожувати життєздатності клітин через руйнування цілісності цитоскелету- змінювати нормальну функцію цитоскелетної мережі через вплив на кавеолін, ендоцитоз і адгезивні взаємодії. У новонароджених щурів, що піддавались впливу нано-

TiO<sub>2</sub> міофібрили у шлуночкових міоцитах показували менш організовану структуру, ніж у клітинах, які не піддалися впливу. Наночастинки здатні пошкоджувати ДНК, порушувати прогресування клітинного циклу і призводити до подальшої хромосомної сегрегації та трансформації клітин. Після тривалого впливу нано-TiO<sub>2</sub> на культивовані клітини фібробластів було продемонстровано збільшення кількості багатоядерних клітин і мікроядер, затримка G2 та M фаз клітинного циклу і уповільнення поділу клітин[ 9].

Сигнальні шляхи, задіяні в апоптозі, спричиненому наночастинками TiO<sub>2</sub> були досліджені. Була виявлена активація каспази-8, Bid, BAX, каспази-3 та зниження Bcl-2 у клітинах, які були оброблені наночастинками TiO<sub>2</sub>. Наночастинки TiO<sub>2</sub> також індукували вивільнення цитохрому C з мітохондрії в цитозоль, викликали значні зміни проникності мітохондріальної мембрани, що свідчить про залучення мітохондрій в апоптотичному процесі. Каспаза-8 і можуть відігравати важливу роль в апоптозі, індукованому НЧ TiO<sub>2</sub> за участю внутрішнього мітохондріального шляху[15].

#### **Токсична дія на клітини шкіри. Фототоксичність у дослідженнях *in vitro***

Дослідження показують, що дія нано-TiO<sub>2</sub> на кератиноцити людини викликає загальне зменшення числа мітохондрій та чинить цитотоксичну і генотоксичну дію, що опосередкована ROS, які утворюються при УФ опроміненні. Таким чином дія НЧ TiO<sub>2</sub> на клітини шкіри фототоксична. При УФ-опроміненні електрони у валентній зоні TiO<sub>2</sub> поглинають енергію фотона і перескакують до зони провідності, залишаючи діри в валентній зоні, що витягують електрони з води або гідроксильних іонів і утворюють гідроксильні радикали. Також можливе формування супероксиду і синглетного кисню за іншими механізмами. Припускають, що ROS і окисний стрес призводять до окисного пошкодження ДНК та утворення мікроядер, що і є ймовірним механізмом генотоксичності. Також було показано, що опосередкована нано-

TiO<sub>2</sub> загибель епітеліальних клітин незалежна від класичного p53- шляху апоптозу.

### **Токсична дія на клітини легень у дослідженнях *in vitro***

Вплив нано-TiO<sub>2</sub> може індукувати окислювальний стрес, апоптоз і чинити генотоксичну дію у клітинах легень. Встановлено, що менші та сферичні НЧ мали у цьому випадку більш виражені токсичні ефекти. В одних дослідженнях пошкодження ДНК, викликані нано-TiO<sub>2</sub>, являли собою одноланцюгові розриви і утворення 8-оксо-7,8-дигидро-2-дезоксигуанозину, а дволанцюгові розриви або хромосомні розриви не були виявлені. Проте інші дослідження свідчать про утворення дволанцюгових розривів, що було підтверджено маркером H2AX ( $\gamma$ -H2AX). Генерація  $\gamma$ -H2AX незалежно від фаз клітинного циклу імовірно свідчила про пряме утворення дволанцюгових розривів наночастинками TiO<sub>2</sub>. Крім того, наночастинки інактивували NER та BER що призводило до втрати клітинної здатності до відновлення пошкоджених ДНК. Також у клітинах легень наночастинки TiO<sub>2</sub> індукували апоптоз мітохондріальним шляхом. У молекулярному механізмі індукції НЧ апоптозу брала участь підвищена експресія проапоптотичного гену Bax, опосередковане каспазою розщеплення PARP і фрагментація ДНК. Стверджують, що невелика частка НЧ нано-TiO<sub>2</sub> викликала зміни в експресія кількох генів, пов'язаних з іонним гомеостазом, і функцією м'язів легень. Відповідно, НЧ TiO<sub>2</sub> могли потенційно перешкоджати гомеостазу кальцію, іонів і ліпідів, а також впливають на скорочення легеневої гладкої мускулатури.

### **Дія на клітини печінки у дослідженнях *in vitro***

Припускають, що апоптоз клітин печінки був зумовлений пошкодженням ДНК, опосередкованим ROS через мітохондріальних шлях. Було виявлено пошкодження ДНК, індукцію мікроядер, транскрипційну активацію NF- $\kappa$ B, але не активацію AP1. Вплив НЧ TiO<sub>2</sub> викликали окислювальний стрес із збільшенням рівні H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> та OH, що призводили до пошкодження ДНК,

активації p53, індукції апоптозу шляхом вивільнення цитохрому С в цитоплазму і активації каспази-3. НЧ  $\text{TiO}_2$  індукували експресію маркерних генів пошкодження ДНК, які вказували на те, що тип пошкодження ДНК являв собою дволанцюговий розрив. Також спостерігалась конденсація хроматину, фрагментація ядра та апоптоз. Встановлено, що гепатотоксичність нано- $\text{TiO}_2$  була тісно пов'язана з підвищеною експресією деяких факторів запалення, таких як інтерлейкіни IL-4, IL-5, IL-12, інтерферон IFN- $\gamma$ , GATA-зв'язуючі домени GATA3 і GATA4, T-bet, фактори транскрипції STAT3, STAT6, еотаксин, MCP-1 і MIP-2. Крім того, відбувалось зниження експресії STAT1. Відповідно, індуковані НЧ  $\text{TiO}_2$  ураження печінки могли бути викликані змінами у експресії цитокінів Th2 та/або IL-4-опосередкованим шляхом.

### **Нефротоксичність у дослідженнях *in vivo***

Вплив наночастинок  $\text{TiO}_2$  призводив до збільшення ниркових індексів, індукції запалення та некрозу клітин. Нефротоксичність, імовірно, була близько пов'язаною зі зниженням експресії ядерного фактора, пов'язаного з Nrf2. Спостерігали значне підвищення експресії таких факторів як: NF- $\kappa\text{B}$ , фактор некрозу пухлини- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), фактор інгібування міграції макрофагів (MIF), IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IL-1 $\beta$ , білок перехресної реакції (CRP), трансформуючий фактор росту- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), INF- $\gamma$ . Була виявлена експресія цитохрому р450 1A (CYP1A) та значне зниження експресії білка теплового шоку HSP70 після впливу різних концентрацій нано- $\text{TiO}_2$ .

### **Нейротоксичність у дослідженнях *in vitro* і *in vivo***

Відомо, що нано- $\text{TiO}_2$  можуть транспортуватись до центральної нервової системи і призводити до пошкоджень нейронів і тканин мозку *in vitro* та *in vivo*. Нано- $\text{TiO}_2$  може спричинити травму мозку та сприяти розвитку нейродегенеративних захворювань. Так, поглинання та інтерналізація НЧ  $\text{TiO}_2$  гліальними клітинами викликало інгібування їх поділу. Виявляли сильні морфологічні зміни, пов'язані з деполімеризацією F-актину. Також

повідомляється, що нано-TiO<sub>2</sub> може індукують окислювальний стрес, підвищення внутрішньоклітинного ріння Ca<sup>2+</sup>, зниження потенціалу мітохондріальної мембрани і посилення експресії апоптотичних білків в первинно культивованих нейронах гіпокампу щурів. У нейронах гіпокампу НЧ TiO<sub>2</sub> викликали типові апоптотичні ознаки, такі як набряк мітохондрій, зморщення ядра, аномалії ядерної мембрана і маргіналізація хроматину[16]. Визначено, що НЧ TiO<sub>2</sub> у гіпокампі можуть викликати підвищення активності глутамінази і зниження активності глутамат синтази. Крім того, дисбаланс Glu провокував інгібування субодиниць рецептора N-метил-d-аспартату. У мозку НЧ TiO<sub>2</sub> можуть викликати окислення білка, порушення антиоксидантної здатності. Також повідомляють про зміну вмісту мікроелементів і макроелементи, таких як Cu, K і Zn[8]. Припускають, що НЧ TiO<sub>2</sub> стимулюють мікроглію виробляти фактори запалення, що є одним з механізмів цитотоксичності.

### **Вплив на клітини крові у дослідженнях *in vitro* і *in vivo***

За дії нано- TiO<sub>2</sub> в клітинах лімфоцитів людини виявили зниження активності мітохондріальної дегідрогенази і зниження мітохондріального мембранного потенціалу. Пошкодження ДНК, викликане цими наночастинками призвело до апоптозу. Спостерігали конденсацію ДНК, пошкодження хромосомної ДНК, фрагментацію ДНК та активацію каспази-3. У експериментах *in vivo* НЧ TiO<sub>2</sub> індукували апоптоз спленоцитів. При дослідженні впливу нано-TiO<sub>2</sub> на еритроцити було встановлено, що еритроцити, оброблені нано-TiO<sub>2</sub>, зазнавали аномальної седиментації, гемаглютинації та дозозалежного гемолізу, спостерігався витік вмісту назовні еритроцита через його розрив, викликаний як пошкодженням нано-TiO<sub>2</sub> цитоплазматичної мембрани, так і окислювальним стресом. Нано-TiO<sub>2</sub> пошкоджував мембрану, вбудовуючись у біліпідний шар цитоплазматичної мембрани еритроцитів[17].

### **Вплив на селезінку у дослідженнях *in vitro* і *in vivo***

Наночастинки  $\text{TiO}_2$  викликали проліферацію лімфатичних вузлів тканини селезінки мишей після внутрішньошлункового введення, та значне посилення утворення ROS в селезінці, що згодом призвело до сильної індукції гемоксигенази-1 (HO-1) через сигнальний шлях p38-Nrf-2. Більше того, підвищена проліферація Т-клітин і В-клітини селезінки та посилення активності НК були помічені при багаторазовому введенні НЧ  $\text{TiO}_2$ . Також виявили, що важливу роль у індукованому НЧ  $\text{TiO}_2$  пошкодженню селезінки важливу роль відіграло збільшення експресія циклооксигенази ЦОГ-2[19].

### **Кардіотоксичність *in vivo***

При дії НЧ  $\text{TiO}_2$  спостерігали підвищену експресія запальних цитокінів, таких як TNF- $\alpha$ , INF-g та IL-8 у крові. У результаті тестів *in vivo* на щурах була висунута гіпотеза, що пошкодження серця та запальні реакції являють собою основні механізми негативного впливу нано- $\text{TiO}_2$  на серцево-судинну систему. Через 90 днів внутрішньовенного введення НЧ  $\text{TiO}_2$  спостерігалась аритмія серця, а також зниження активності лактатдегідрогенази,  $\alpha$ -гідроксибутиратдегідрогенази і креатинкінази, що свідчить про ураження серцевого м'язу. При коротшому впливі НЧ  $\text{TiO}_2$  (30 днів), значно збільшувались частота серцевих скорочень та артеріальний тиск, змінювалась активність активності лактатдегідрогенази і  $\alpha$ -гідроксибутиратдегідрогенази порівняно з контрольною групою. 6 місяців впливу НЧ  $\text{TiO}_2$  викликали пошкодження серцевого м'язу і пневмонію, яка може бути наслідком порушення експресії цитокінів, пов'язаних з Th1 або Th2 в серці[10].

### **1.6 Вплив і взаємодія наночастинок $\text{TiO}_2$ з клітинними макромолекулами**

Встановлено, що  $\text{TiO}_2$  у вигляді нанорозмірного матеріалу здатен утворюючи надмолекулярну структуру шляхом взаємодії з позаклітинною частиною GABAB1a субодиниці рецептора GABAB, і можна припустити, що це буде супроводжуватися модуляцією його просторової організації[18]. Вплив

наночастинок  $\text{TiO}_2$  здатен призводити до перекисного окислення ліпідів, пошкодження лізосом і вивільнення катепсину В. Наночастинки  $\text{TiO}_2$  можуть утворювати всередині клітин агрегати більших розмірів, які мають гострі края, що потенційно пояснюють селективне пошкодження лізосом, спричинене цими наноматеріалами. Агрегати наночастинок  $\text{TiO}_2$  можуть спостерігатись як у везикулах, так і у вільному стані.

На додаток до обговорених вище, ще один можливий механізм токсичності наноматеріалів- взаємодія з білками. Адсорбція білків на поверхні наноматеріалів в фізіологічному середовищі призводить до утворення так званої білкової корони, яка була детально вивчена. Ця корона може змінювати агрегатний стан, біорозподіл, клітинне поглинання та реакційну здатність наноматеріалів. Крім того, ця взаємодія наноматеріалів з білками можуть впливати на активність білка і, таким чином, мати важливі фізіологічні наслідки. Взаємодія наноматеріалів з білками може інактивувати їх конформаційними змінами та/або денатурацією. Так, було показано, що наночастинки  $\text{TiO}_2$  могли інгібувати активність ферментів і викликати конформаційні процеси зміни ариламін N-ацетилтрансферази- ферменту, що метаболізує ксенобіотики та бере участь в деактивації канцерогенів. У досліджах наночастинки  $\text{TiO}_2$  адсорбували цитокіни. Крім того, зв'язування наночастинок з білками системи комплементу може викликати активацію цієї системи. Було показано, що НЧ здатні проникати в міжклітинний простір та взаємодіяти з білками міжклітинних контактів. Така взаємодія включає розрив з'єднання та призводить до ретракції клітин і порушення функції ендотелію. Взаємодія наноматеріалів з іонними каналами або клітинними рецепторами, безпосередньо або через білкову корону, може індукувати і активувати шляхи клітинної сигналізації. Наприклад, було показано, що наночастинки  $\text{TiO}_2$  імовірно можуть активувати мембранні кальцієві канали L-типу і рецептори TLR, призводячи до відповідних передач сигналів. Індукція НЧ певних рецепторів

може призводити до загибелі клітини. Взаємодія з ферментами або цитокінами може призводити, відповідно, до порушення обміну речовин і імунних відповідей. Модифікації структурних білків, такі як протеїни цитоскелету або міжклітинних контактів, може призвести до суттєвих змін у функціонуванні клітини, приводячи до аутофагії, міграції клітин, змін у комунікаційній та бар'єрній функціях[20].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

#### 2.1. Робота з тваринами при постановці експериментів

Для вивчення хронічної дії суспензії  $\text{TiO}_2$  використовували щурів лінії Вістар. Перед початком експерименту було обрано 14 щурів віком 6 тижнів, яких рандомно розділили на 2 групи: контроль (інтактні тварини) та експериментальна група (щодня упродовж 6 місяців вживали водну суспензію наночастинок  $\text{TiO}_2$  із розрахунку 0,1 мг/кг). Для контролю дозування  $\text{TiO}_2$  вагу щурів контролювали щотижня.

Для експериментів було використано комерційний препарат НЧ  $\text{TiO}_2$  (PlasmaChem GmbH, D-12489 Berlin, Germany) у формі нанопорошку (суміш рутилу і анатазу), питома площа поверхні ( $50 \pm 10$ )  $\text{m}^2/\text{г}$ ; ступінь чистоти  $> 99.5\%$ , домішки:  $\text{Al}_2\text{O}_3 < 0.3$  мас.% та  $\text{SiO}_2 < 0.2$  мас.%.

Усіх тварин утримували на стандартному раціоні харчування в умовах віварію (температура приміщення  $20 \pm 2$  °C, відносна вологість повітря 50-70%, режим доби «світло:темрява» = 12:12 годин).

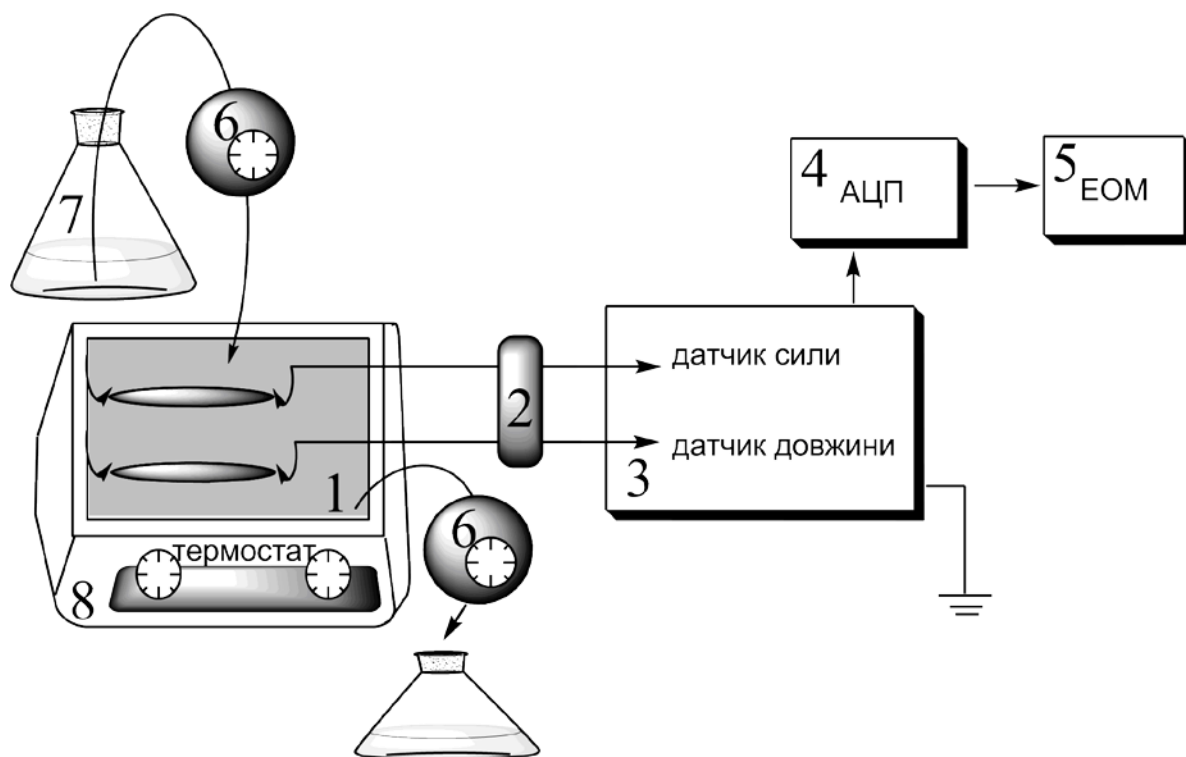
Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до державних і міжнародних норм гуманного поводження з хребетними тваринами: Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України „Про захист тварин від жорстокого поводження” Умертвіння тварин проводили під ефірним наркозом шляхом дислокації шийних хребців.

#### 2.2. Підготовка гладеньком'язових препаратів і тензометричні експерименти

Після декапітації тварин і розкриття черевної порожнини здійснювали забір шлунку і сліпої кишки, які розкривали по малій кривизні, дбайливо промивали фізіологічним розчином до прозорого розчину та поміщали у розчин Кребса (такого 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 7,4).

Надалі м'язи антрального відділу шлунку та сліпої кишки під бінокулярним мікроскопом мікроножицями очищували від слизової оболонки і нарізали у кільцевому напрямку на смужки середнього розміру 2 x 10 мм. Надалі препарати зберігали при 4 °С у 150 мл розчину Кребсу.

Для реєстрації спонтанної скорочувальної активності використовували тензометричне устаткування (Рис. 2.1) з можливістю одночасної реєстрації скорочувальної активності двох гладеньком'язових препаратів – у ізометричному і ізотонічному режимах реєстрації.



**Рис. 2.1.** Принципова схема тензометричного устаткування: 1 - робоча

камера з проточним розчином Кребса (ефективний об'єм, температура 37 °С, швидкість протікання розчину 5 мл/хв.) та закріпленими гладеньком'язовими препаратами; 2 – тензометричні датчики; 3 – підсилювач; 4 – аналого-цифровий перетворювач; 5 – комп'ютер; 6 – перестальтичні насоси для прокачування робочих розчинів (7); 8 – термостат.

Для аналізу механокінетичних параметрів використовували записи спонтанних скорочень, зареєстровані у ізометричному режимі при постійному навантаженні 10 мН. Реєстрацію скорочень для аналізу здійснювали не раніше, ніж через 60 хв. після вміщення препарату в камеру тензометричного устаткування та надання йому постійного навантаження.

### 2.3. Повний механокінетичний аналіз спонтанних скорочень

Повний механокінетичний аналіз здійснювали відповідно до методу багатопараметричного механокінетичного аналізу[22]. Початковим етапом методу була лінеаризація у координатах

$$\ln \frac{f_R}{f_C} = \ln \frac{F_R}{F_C} + \Delta t$$

-  $f$  і  $t$  – миттєві значення сили і часу на рівні фази скорочення (С) і розслаблення (R),

-  $F_C$  і  $F_R$  – значення сили в точках перегину фаз скорочення і розслаблення (за їх максимальних швидкостей),

-  $\Delta t$  – довільно обраний постійний інтервал часу (в даному випадку містився в межах 5-9 с).

Із лінеаризованих кривих визначали характеристичні константи  $k$  і  $n$ :

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

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

Надалі характеристичні константи використовували для розрахунку параметрів скорочувального процесу:

- часові ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ) параметри – показники часу в точці амплітуди та у точках перегину фаз скорочення і розслаблення, відповідно

$$r_0 = \frac{c_C + c_R}{2} = \frac{n}{k},$$

$$r_C = \frac{n - \sqrt{n}}{k},$$

$$r_R = \frac{n + \sqrt{n}}{k},$$

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

$$F_C = F_{\max} \cdot \left( \frac{n - \sqrt{n}}{n} \right)^n \cdot e^{\sqrt{n}},$$

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

- швидкісні ( $V_C$  і  $V_R$ ) параметри – максимальні швидкості фази скорочення і фази розслаблення, відповідно:

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

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

- імпульсні ( $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) параметри – імпульси сили в точках амплітуди  $F_{\max}$  і перегину фаз скорочення і розслаблення відповідно:

$$I_{c_0} = F_{max} \cdot r_0 = F_{max} \cdot \frac{n}{k}$$

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

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

#### 2.4. Розрахунок нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення гладеньких м'язів

Аналіз нормованих максимальних швидкостей спонтанних скорочень здійснювали окремо на рівні фаз скорочення та розслаблення із використанням модифікованого методу С.О. Костеріна та Ф.В. Бурдиги[23]. Для графічного визначення коефіцієнтів  $\tau$  і  $n$  ( $\tau$  – характеристичний час скорочувальної відповіді;  $n$  – логарифмічний коефіцієнт крутизни механокінетичної кривої,  $n = d\{\ln[(f_m - f)/f]\}/dt$ ) лінеаризували окремо фазу скорочення і розслаблення у координатах  $\left\{ \ln \left( \frac{f_m - f}{f} \right); \ln t \right\}$ .

Значення  $n$  і  $\tau$  використовували для розрахунку нормованої максимальної швидкості фази розслаблення ( $V_{nr}$ ) або скорочення ( $V_{nc}$ ):

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

## 2.5. Статистичний аналіз даних

Дані механокінетичного аналізу обробляли статистичними методами із використанням програм Excel та Origin 2018.

Перевірку даних на приналежність нормально розподілених генеральних сукупностей здійснювали із використанням тесту Шапіро-Уїлка. Для встановлення достовірних відмінностей між середніми груп контролю і хронічної обробки TiO<sub>2</sub> застосовували непарний t-критерій Стьюдента (для визначення гомогенності дисперсій застосовували критерієм Фішера).

Достовірність апроксимації лінеаризованих даних лінійною функцією перевіряли F-критерієм Фішера; коефіцієнти детермінації ( $R^2$ ) у всіх випадках були не нижчими за 0,96.

У всіх випадках достовірними вважали результати за умови значення ймовірності  $p < 0.05$ .

Результати представлені як середнє  $\pm$  стандартна похибка середнього ( $M \pm m$ );  $n$  - кількість дослідів.

## РОЗДІЛ 3

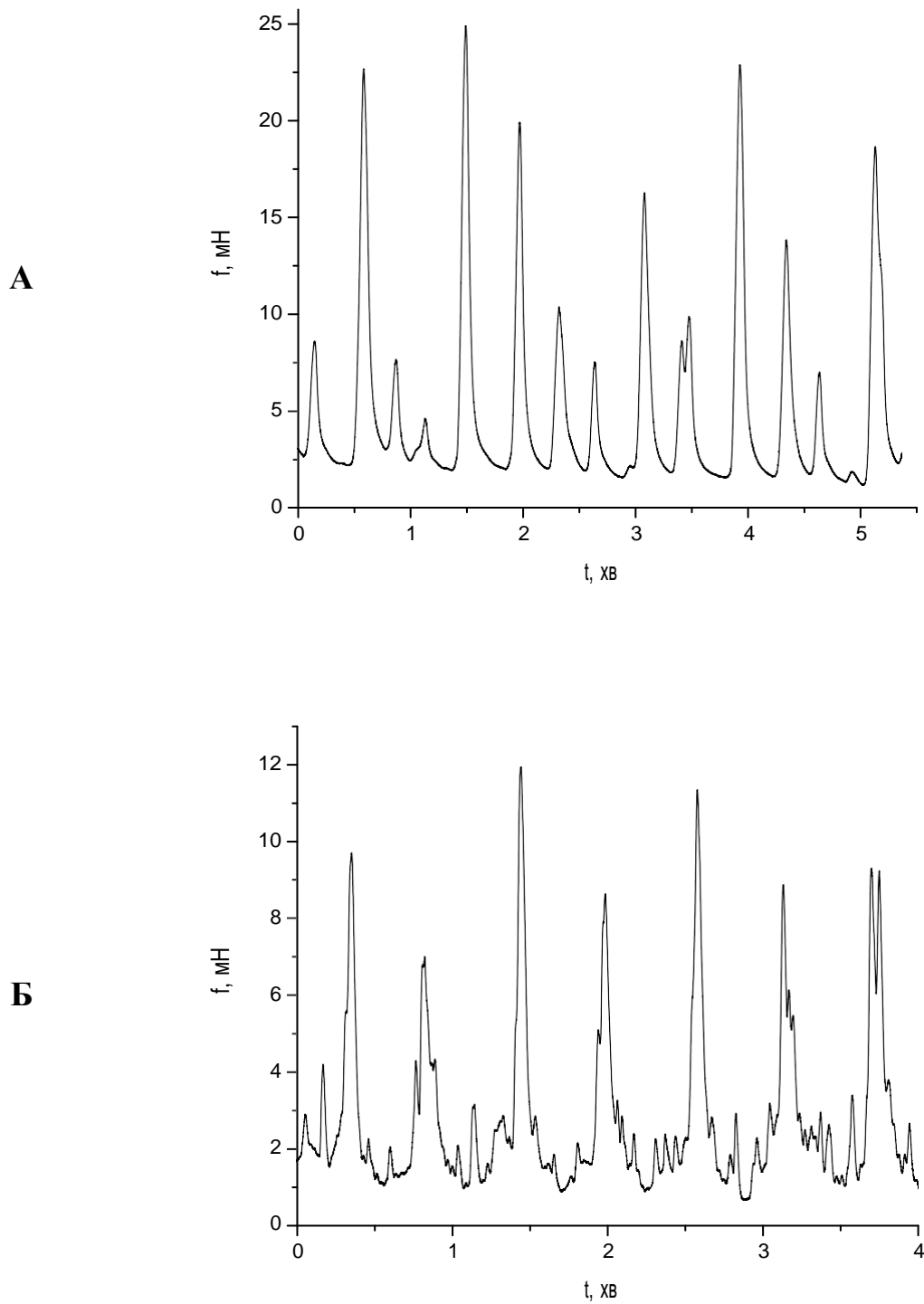
### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Механокінетичні характеристики спонтанних скорочень гладеньких м'язів шлунку і товстого кишечника щурів у контролі

Як відомо, у тканині гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту спонтанні хвилі деполяризації, на плато яких виникають потенціали дії та спричиняють спонтанні скорочення, генеруються пейсмекерними клітинами Кахаля декількох типів[24]. Процеси пейсмекерної активності модулюються шляхом парасимпатичного та симпатичного контролю за участі відповідно нейромедіаторів збудження та гальмування.

У межах виконання першого завдання досліджень було здійснено повний механокінетичний аналіз спонтанних окремих скорочень фрагментів стінки шлунково-кишкового тракту (шлунку – на прикладі кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу *antrum*, і товстого кишечника – на прикладі кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки *caecum*) контрольних щурів 8-9 місячного віку. У контролі спонтанна скорочувальна активність кільцевих гладеньких м'язів *antrum* шлунку характеризувалася розподілом амплітуд в межах від 2,3 мН до 17,4 мН (рис. 3.1 А). У зазначеному інтервалі амплітуд спостерігався їх розподіл за частотами з трьома вірогідними максимумами; з найбільшою частотою  $12,8 \pm 0,7$  % зустрічались скорочення з амплітудою  $14,4 \pm 1,3$  мН. Розрахована у контролі частота скорочень препаратів впродовж 10 хв дорівнювала  $22,3 \pm 1,8$  (n=7).

Окремі контрольні скорочення *antrum* характеризувалися середньою амплітудою  $10,1 \pm 0,9$  мН; для цієї точки механограми були характерні середні значення характеристичного часу ( $\tau_0$ ) на рівні  $10,7 \pm 0,9$  с та імпульсу ( $I_{\max}$ )  $105,8 \pm 10,2$  мН·с (n=7) (Табл. 3.1).



**Рис. 3.1.** Типові механограми спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу (*antrum*, А) шлунку та сліпої кишки (*caecum*, Б)

щурів у контролі.

Фрагмент механокінетичних кривих спонтанних скорочень *antrum* (від максимального значення до повернення сили на мінімальний рівень (фаза розслаблення) мав наступні середні значення кінетичних параметрів: значення часу, при якому спостерігалась максимальна швидкість спадання сили ( $\tau_R$ )  $14,16 \pm 0,98$  с, значенням сили в цій точці механограми  $6,68 \pm 0,62$  мН, значенням максимальної швидкості ( $V_R$ )  $1,46 \pm 0,14$  мН/с та імпульсом сили в цій точці ( $I_R$ )  $93,27 \pm 8,95$  мН·с (n=7).

**Таблиця 3.1.** Характеристики спонтанних процесів скорочення-розслаблення кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку (*antrum*) та сліпої кишки (*caecum*) щурів (n=7)

<b>Механокінетичний параметр</b>	<i>antrum</i>	<i>caecum</i>
<i>Часові параметри:</i>		
$\tau_0$	$10,69 \pm 0,85$	$4,41 \pm 0,39$
$\tau_C$	$7,21 \pm 0,74$	$2,35 \pm 0,31$
$\tau_R$	$14,16 \pm 0,98$	$6,48 \pm 0,51$
<i>Силові параметри:</i>		
$F_{max}$	$10,08 \pm 0,93$	$10,75 \pm 0,74$
$F_C$	$5,55 \pm 0,65$	$5,09 \pm 0,46$
$F_R$	$6,68 \pm 0,62$	$7,32 \pm 0,48$
<i>Швидкісні параметри:</i>		
$V_C$	$2,31 \pm 0,23$	$4,87 \pm 0,49$
$V_R$	$1,46 \pm 0,14$	$2,5 \pm 0,26$

<i>Імпульсні параметри:</i>		
$I_{\max}$	$105,77 \pm 10,17$	$48,13 \pm 6,58$
$I_C$	$37,07 \pm 3,74$	$12,52 \pm 2,49$
$I_R$	$93,27 \pm 8,95$	$47,73 \pm 5,58$

Частина механокінетичних кривих спонтанних скорочень *antrum* (від початку генерації сили до її максимального значення (фаза скорочення) характеризувалась середніми показниками: значенням часу, при якому спостерігалась максимальна швидкість наростання сили ( $\tau_C$ )  $7,21 \pm 0,74$  с, значенням сили в цій точці механограми  $5,55 \pm 0,65$  мН, значенням максимальної швидкості ( $V_C$ )  $2,31 \pm 0,23$  мН/с та імпульсом сили в цій точці ( $I_C$ )  $37,07 \pm 3,74$  мН·с (n=7).

У випадку спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів *caecum* ми спостерігали розподіл амплітуд в межах від 0,9 мН до 12,6 мН (рис. 3.1 Б). У зазначеному інтервалі амплітуд спостерігався їх розподіл за частотами з двома вірогідними максимумами:  $10,65 \pm 0,48$  % із середньою амплітудою 2,9 мН та зміщеним по шкалі амплітуд в сторону їх збільшення –  $5,71 \pm 0,41$  %, (n=7). При цьому, скорочення м'язових препаратів з низькою амплітудою зустрічались із суттєво більшою частотою, ніж скорочення з високою амплітудою. Розрахована у контролі середня частота скорочень препаратів *caecum* упродовж 10 хв. дорівнювала  $45,3 \pm 2,1$  (n=7).

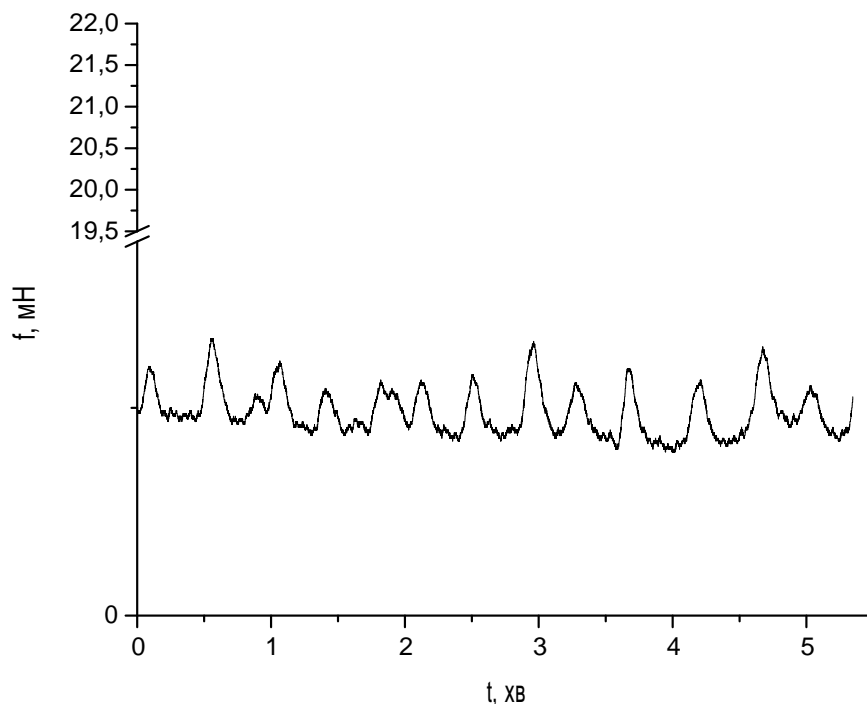
Відповідно до методу багатопараметричного механокінетичного аналізу було розраховано силові ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ), часові ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ), швидкісні ( $V_C$  і  $V_R$ ) та імпульсні ( $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) параметри [22]. Встановлено, що окремі контрольні скорочення *caecum* характеризувалися середньою амплітудою  $10,75 \pm 0,74$  мН; для цієї точки механограми були характерні середні значення характеристичного часу ( $\tau_0$ ) на рівні  $4,41 \pm 0,39$  с та імпульсу ( $I_{\max}$ )  $48,13 \pm 6,58$  мН·с (n=7) (Табл. 3.1).

Фаза скорочення для препаратів *saesum* характеризувалась середніми показниками: значенням часу, за якого спостерігалась максимальна швидкість наростання сили ( $\tau_C$ )  $2,35 \pm 0,31$  с, значенням сили в цій точці механограми  $5,09 \pm 0,46$  мН, значенням максимальної швидкості ( $V_C$ )  $4,87 \pm 0,49$  мН/с та імпульсом сили в цій точці ( $I_C$ )  $12,52 \pm 2,49$  мН·с ( $n=7$ ).

Для фази розслаблення препаратів *saesum* були характерні наступні середні значення кінетичних параметрів: значення часу, при якому спостерігалась максимальна швидкість спадання сили ( $\tau_R$ )  $6,48 \pm 0,51$  с, значенням сили в цій точці механограми ( $F_R$ )  $7,32 \pm 0,48$  мН, значенням максимальної швидкості ( $V_R$ )  $2,50 \pm 0,26$  мН/с та імпульсом сили в цій точці ( $I_R$ )  $47,73 \pm 5,58$  мН·с ( $n=7$ ).

### **3.2. Механокінетичні характеристики спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів шлунку щурів за хронічної дії наночастинок TiO<sub>2</sub> в умовах *in vivo***

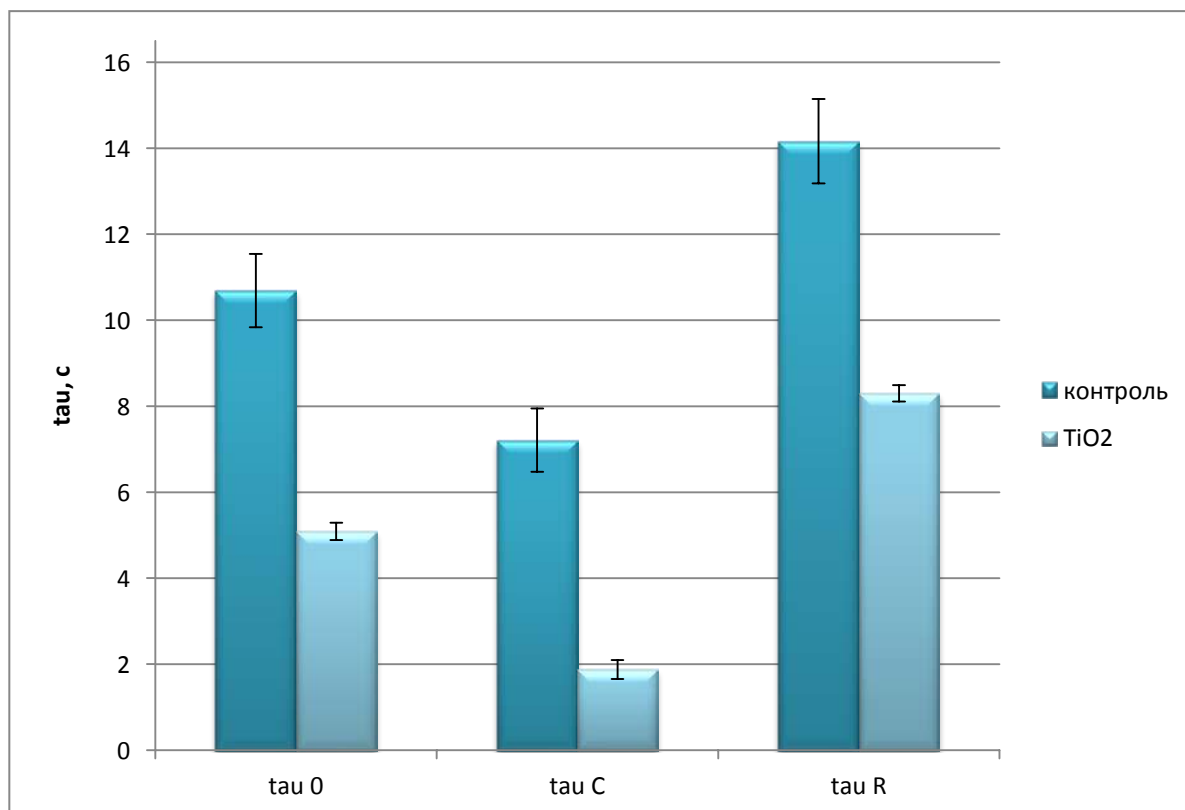
На наступному етапі виконання роботи нами було досліджено та проаналізовано спонтанну скорочувальну активність ізольованих кільцевих гладеньком'язових смужок *antrum* щурів, які упродовж 6 місяців отримували водну суспензією наночастинок TiO<sub>2</sub> (суміш поліморфів рутил:анатаз = 1:4, середній розмір частинок  $21 \pm 5$  нм) у дозі 0,1 мг/кг ваги упродовж 6 місяців. Встановлено, що хронічне надходження наноматеріалу TiO<sub>2</sub> спричиняє суттєві зміни механокінетики спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів (Рис. 3.2).



**Рис. 3.2.** Типова механограма спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу (*antrum*, А) шлунку щурів за хронічного впливу (упродовж 6 місяців) водної суспензії наночастинок діоксиду титану (0,1 мг/мл).

Так, на тлі цього ксенобіотика відбувалось значне пригнічення моторики шлунку, яке на рівні загальних характеристик амплітуди і частоти становило:  $F_{\max}$  – у середньому 9,80% та середня кількість скорочень за 10 хв – 78,21 % (n=7), щодо відповідних контрольних показників, прийнятих за 100 %.

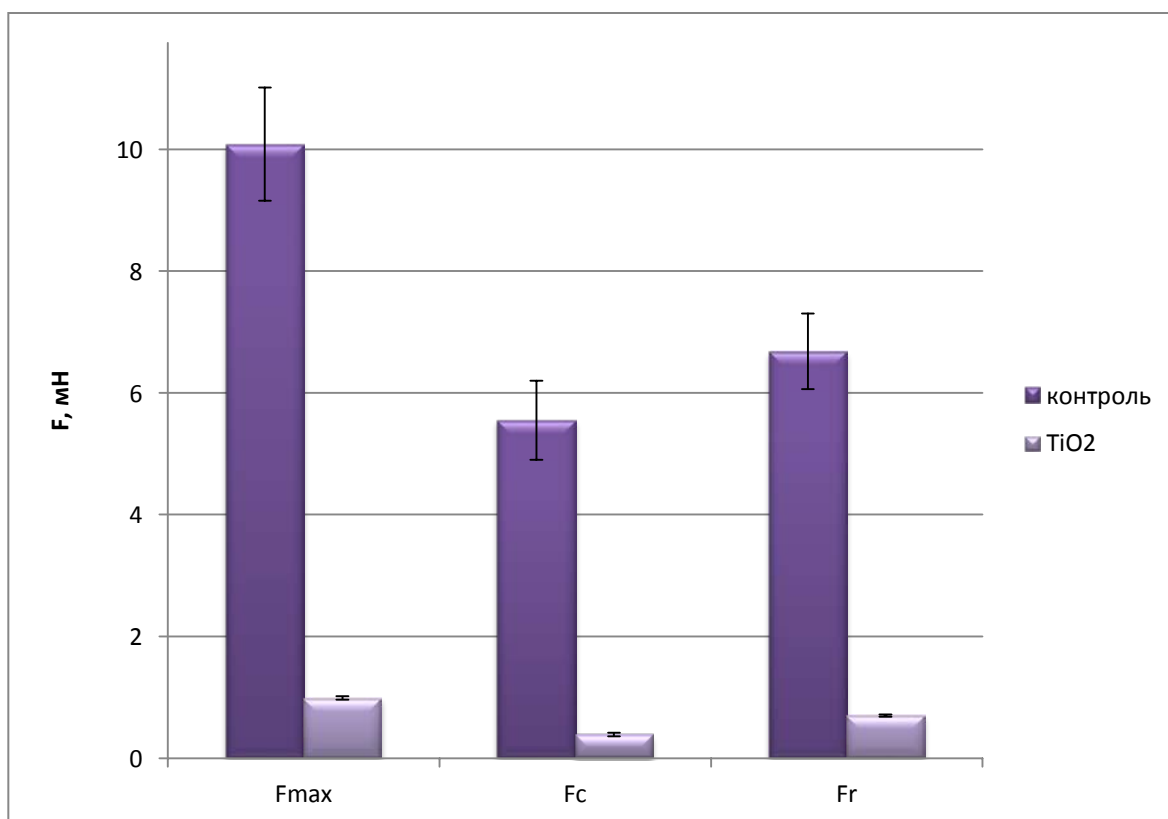
Повним механокінетичним аналізом окремих спонтанних скорочень було встановлено, за хронічної дії нано-TiO<sub>2</sub> часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ), суттєво зменшувалися та у середньому складали: 47,59 % (n=7,  $p < 0.01$ ), 25,99 % (n=7,  $p < 0.001$ ) та 58,62 % (n=7,  $p < 0.01$ ) щодо відповідних контрольних показників, прийнятих за 100 % (Рис. 3.3).



**Рис. 3.3.** Часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ) спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів шлунку щурів у контролі та за хронічної дії упродовж 6 місяців наночастинок  $\text{TiO}_2$  (0,1 мг/кг/добу):

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

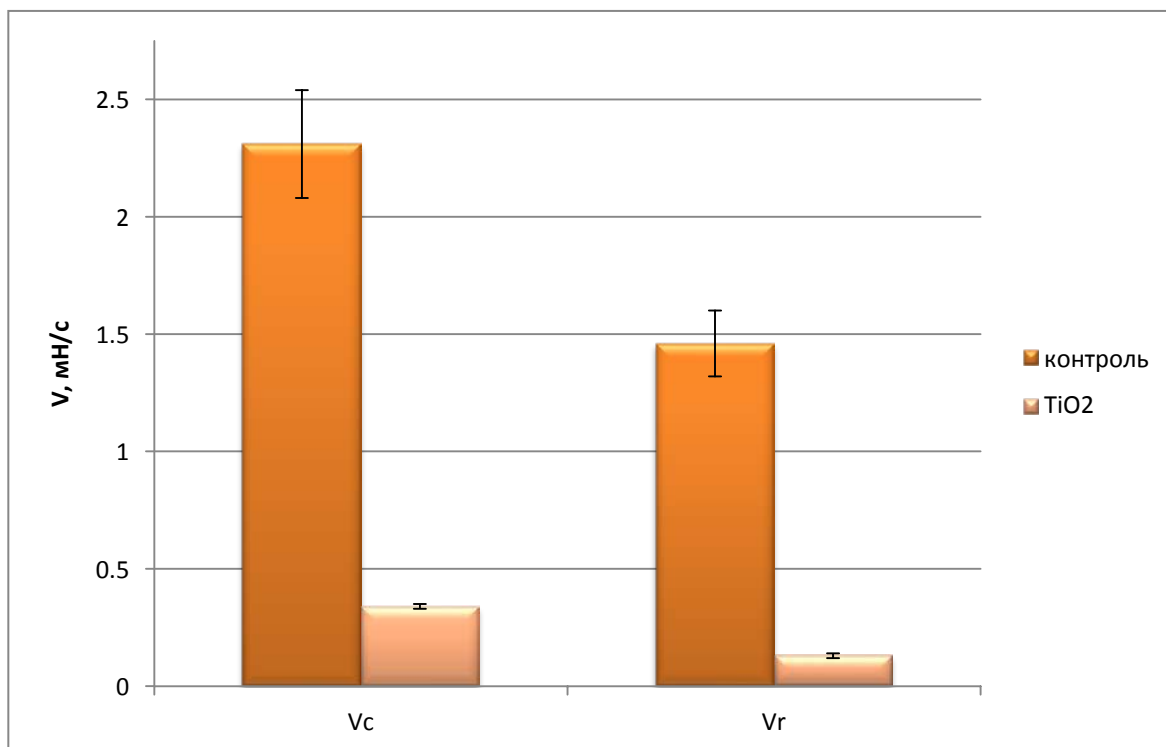
Також за хронічної дії наночастинок  $\text{TiO}_2$  спостерігалось значне зменшення показників сили, за яких спостерігається перегин фаз скорочення і розслаблення: показник  $F_C$  у середньому становив 7,03 % щодо контролю та  $F_R$  – у середньому 10,49 % щодо контролю (у обох випадках n=7,  $p < 0.001$ ) (Рис. 3.4).



**Рис. 3.4.** Силкові параметри ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ) спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів шлунку щурів у контролі та за хронічної дії упродовж 6 місяців наночастинок  $TiO_2$  (0,1 мг/кг/добу):

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

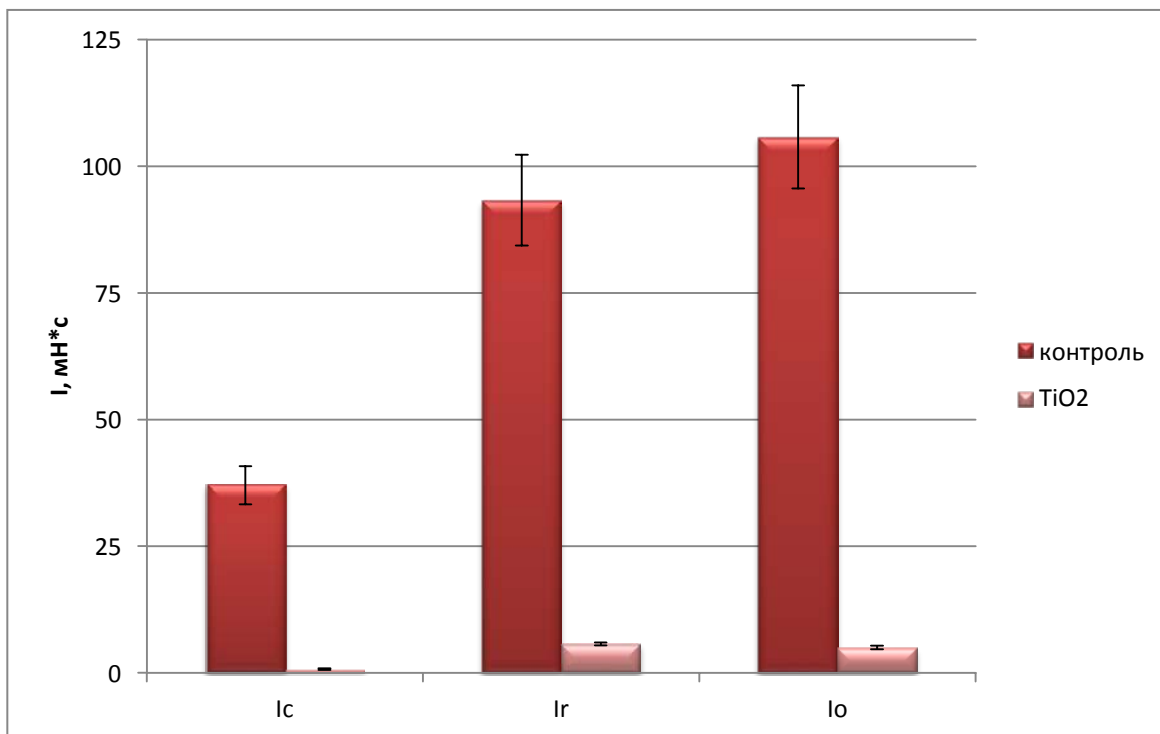
Також було встановлено, що за хронічної дії нано- $TiO_2$  суттєво зменшуються швидкісні параметри точок перегину фази скорочення та розслаблення (відповідно  $V_C$  і  $V_R$ ) (Рис. 3.5). Так, у експериментальній групі максимальна швидкість  $V_C$  у середньому становила 14,59 % щодо контролю (n=7,  $p < 0.001$ ); у випадку фази розслаблення максимальна швидкість  $V_R$  зменшувалася іще більш суттєво (у середньому до 9,11 % відносно контролю, n=7,  $p < 0.001$ ).



**Рис. 3.5.** Швидкісні параметри ( $V_C$  і  $V_R$ ) спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів шлунку щурів у контролі та за хронічної дії упродовж 6 місяців наночастинок  $TiO_2$  (0,1 мг/кг/добу):

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

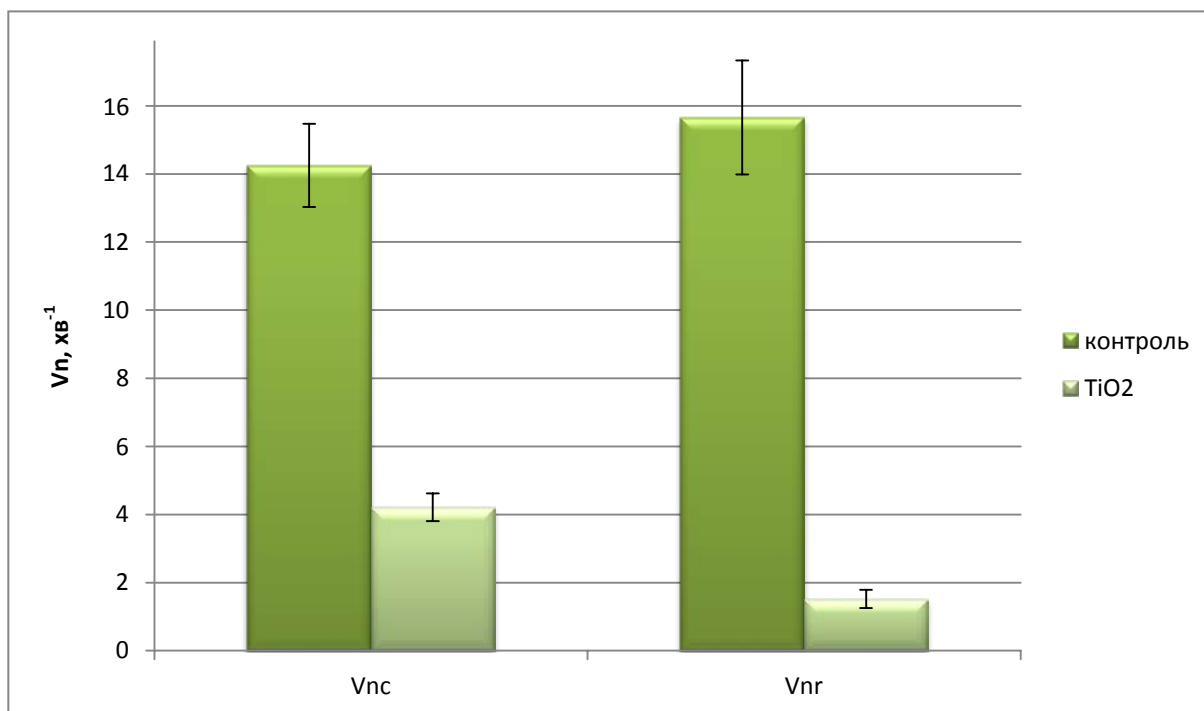
Інша група механокінетичних параметрів, яка у зазнавала найбільшого пригнічення в умовах хронічного впливу нано- $TiO_2$ , – імпульсні показники ( $I_{max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ): вони зменшувалися у понад десять разів щодо контролю і становили у середньому 4,78 %, 2,06 % та 6,18 % (n=7, \*\*\* -  $p < 0.001$ ) (Рис. 3.6).



**Рис. 3.6.** Імпульсні параметри ( $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів шлунку щурів у контролі та за хронічної дії упродовж 6 місяців наночастинок  $TiO_2$  (0,1 мг/кг/добу):

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

Оскільки у розрахункових формулах швидкісних параметрів не враховується внесок зміни силових компонент, нами було розраховано незалежні від амплітуди нормовані максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення ( $Vn_C$  і  $Vn_R$ ) [23]. Як і у випадку швидкостей  $V_C$  і  $V_R$ , нормовані показники  $Vn_C$  і  $Vn_R$  суттєво зменшувалися (Рис. 3.7): параметр  $Vn_C$  у середньому складав 29,6 % і  $Vn_R$  – у середньому 17,1% щодо відповідних контрольних параметрів (у обох випадках n=7, \*\*\* -  $p < 0.001$ ).



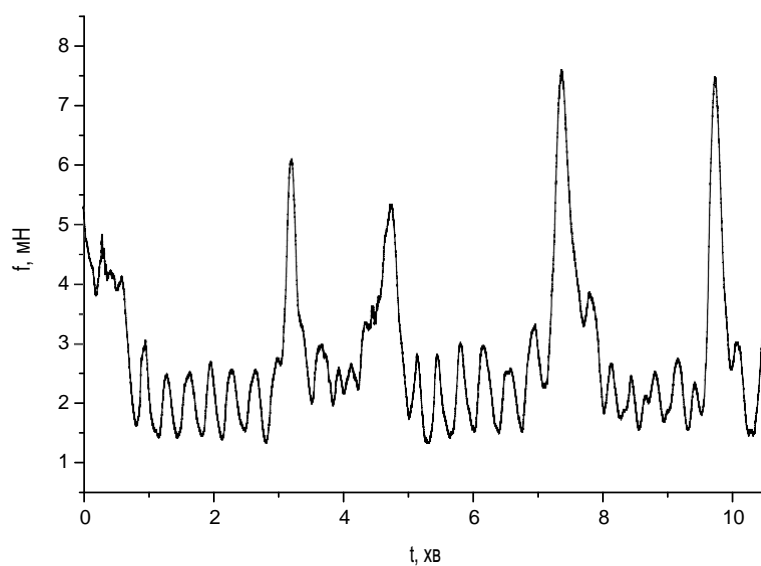
**Рис. 3.7.** Нормовані максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення (відповідно  $V_{n_C}$  і  $V_{n_R}$ ) спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів шлунку щурів у контролі та за хронічної дії упродовж 6 місяців наночастинок  $TiO_2$  (0,1 мг/кг/добу):

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

Тож хронічне надходження наноматеріалу  $TiO_2$  супроводжується суттєвим пригніченням скорочувальної функції гладеньких м'язів шлунку. Оскільки за величиною інгібіторних ефектів параметри фаз скорочення і розслаблення не відрізняються, ймовірно, що ефекти  $TiO_2$  не є специфічними для окремих  $Ca^{2+}$ -систем, які приймають участь у розвитку скорочувальних відповідей.

### 3.2. Механокінетичні характеристики спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки щурів за хронічної дії наночастинок TiO<sub>2</sub> в умовах *in vivo*

На цьому етапі дослідження було проаналізовано спонтанну скорочувальну активність ізольованих кільцевих гладеньком'язових смужок *саесит* щурів, які підлягали хронічній дії наночастинок TiO<sub>2</sub>. Було встановлено, що хронічне надходження наноматеріалу TiO<sub>2</sub> спричиняє суттєві зміни механокінетики спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів *саесит* щурів (Рис. 3.8).

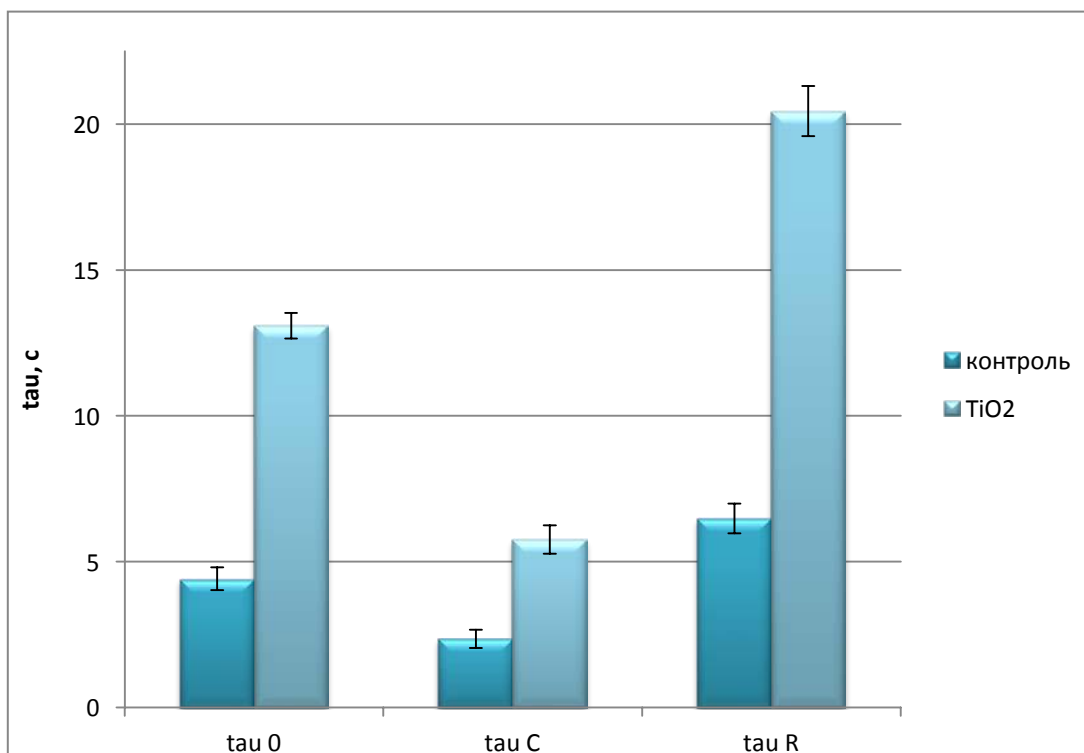


**Рис. 3.8.** Типова механограма спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки (*саесит*) шлунку щурів за хронічного впливу (упродовж 6 місяців) водної суспензії наночастинок діоксиду титану (0,1 мг/мл).

При дії наночастинок TiO<sub>2</sub> відбувалось пригнічення моторики сліпої кишки на рівні зменшення амплітуди. Амплітуда  $F_{\max}$  у середньому становила

53.49% щодо відповідних контрольних показників, прийнятих за 100 % (n=7, p<0.001).

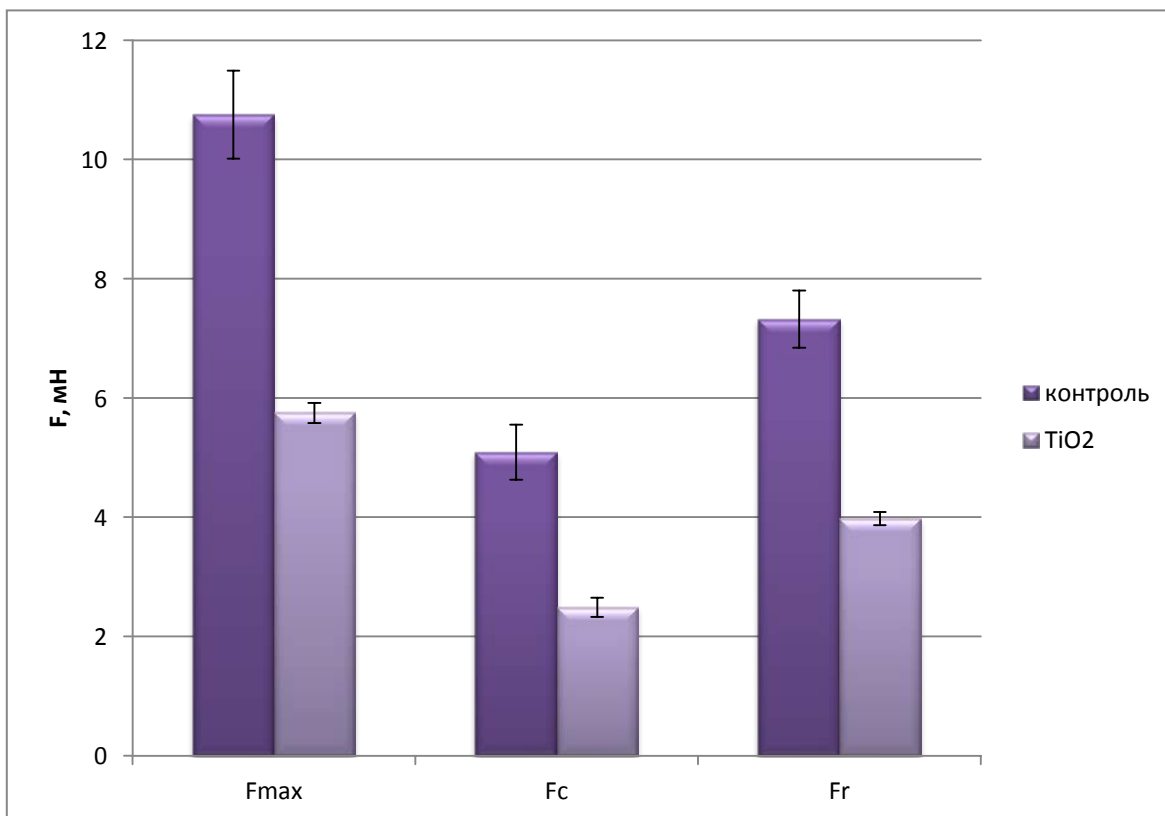
Надалі було проведено повний механокінетичний аналіз окремих спонтанних скорочень. Було встановлено, що за хронічної дії нано-TiO<sub>2</sub> часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ) навпаки суттєво збільшуються, та у середньому складають: 286,83 % (n=7), 244,68 % (n=7) та 315,43 % (n=7) щодо відповідних контрольних показників, прийнятих за 100 % (у всіх випадках n=7, p<0.001) (Рис. 3.9).



**Рис. 3.9.** Часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ) спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки щурів у контролі та за хронічної дії упродовж 6 місяців наночастинок TiO<sub>2</sub> (0,1 мг/кг/добу):

За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі; n=7, \*\*\* - p<0.001.

За хронічної дії наночастинок  $\text{TiO}_2$  спостерігалось суттєве зменшення показників сили, що відповідають точкам перегину у фазах скорочення і розслаблення: показник  $F_C$  у середньому становив 48,92 % щодо контролю та  $F_R$  – у середньому 54,37 % щодо контролю (у обох випадках  $n=7$ ,  $p<0.001$ ) (Рис. 3.10).

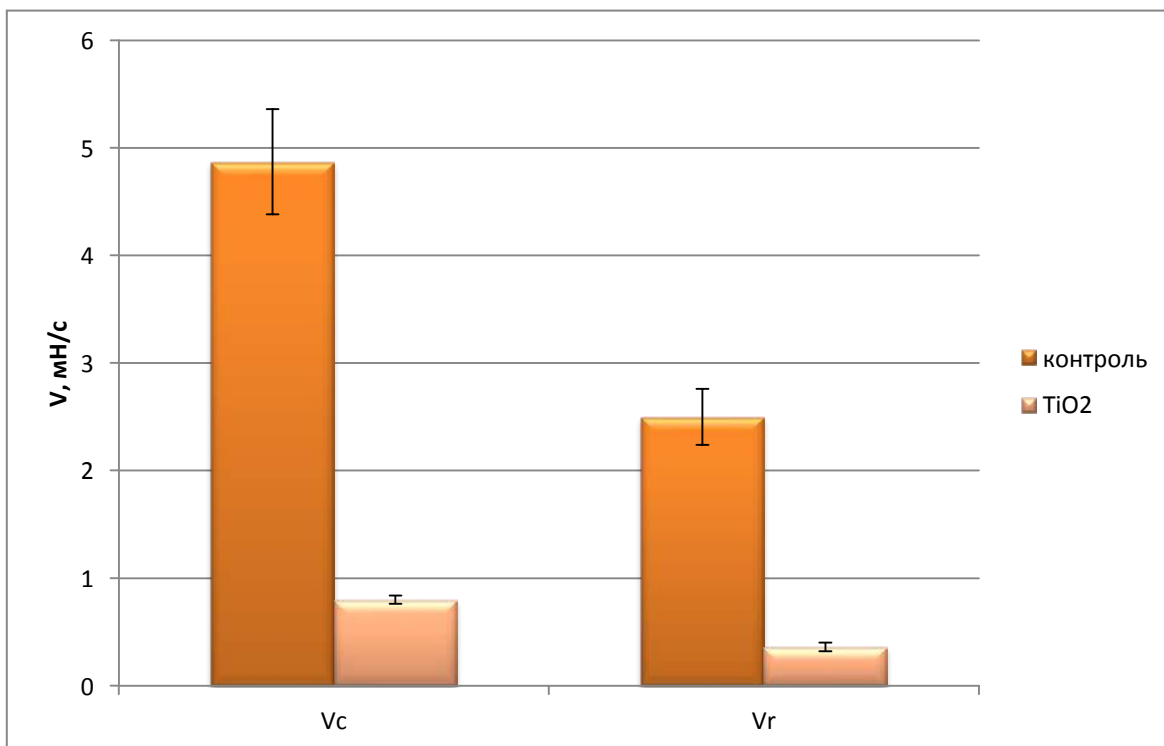


**Рис. 3.10.** Силіві параметри ( $F_{max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ) спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки щурів у контролі та за хронічної дії упродовж 6 місяців наночастинок  $\text{TiO}_2$  (0,1 мг/кг/добу):

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

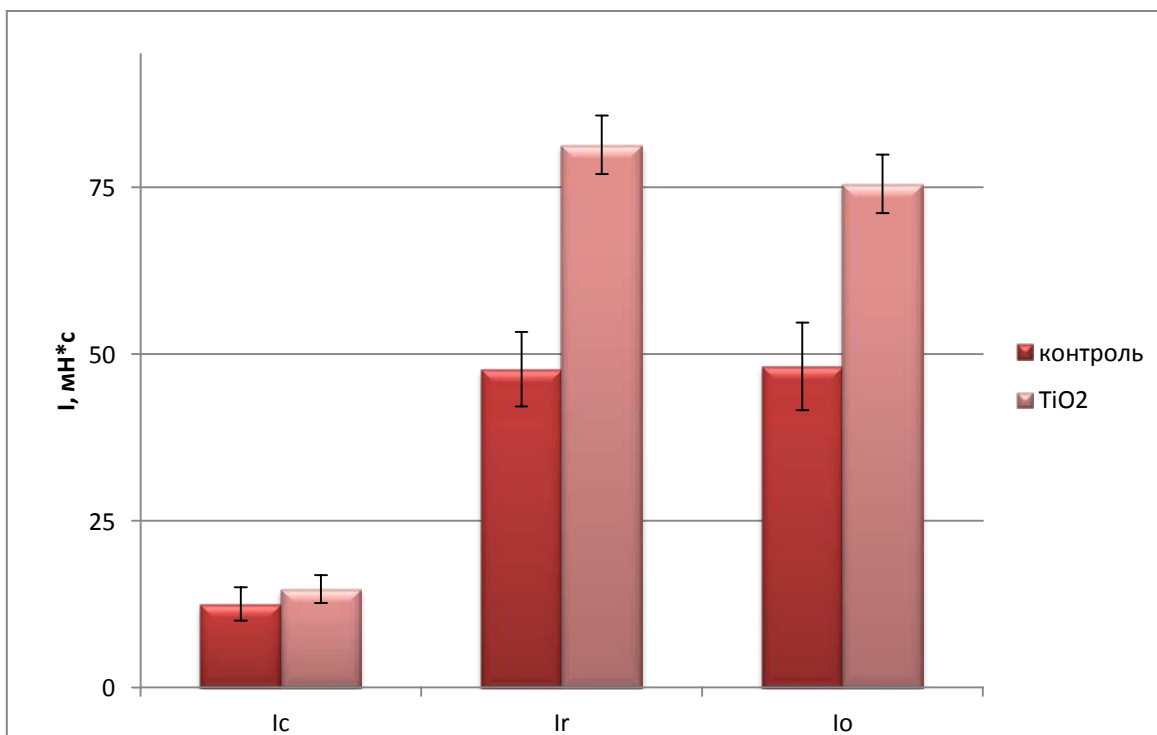
Було встановлено, що за хронічної дії nano- $\text{TiO}_2$  суттєво зменшуються швидкісні параметри точок перегину фази скорочення та розслаблення

(відповідно  $V_C$  і  $V_R$ ) (Рис. 3.11). Максимальна швидкість під час фази скорочення  $V_C$  у середньому становила 16,43 % щодо контролю ( $n=7$ ,  $p < 0.001$ ); максимальна швидкість під час фази розслаблення  $V_R$  становила у середньому 14.4 % відносно контролю,  $n=7$ ,  $p < 0.001$ ).



**Рис. 3.11.** Швидкісні параметри ( $V_C$  і  $V_R$ ) спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки щурів у контролі та за хронічної дії упродовж 6 місяців наночастинок  $TiO_2$  (0,1 мг/кг/добу): за 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі ( $n=7$ , \*\*\* -  $p < 0.001$  – різниця достовірна щодо контролю).

Також за умов хронічного впливу нано- $TiO_2$  імпульсні показники істотно зростали. Так,  $I_{max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$  по відношенню до контролю становили у середньому 156,87 %, 117,81 % та 170,42 % ( $n=7$ ,  $p < 0.05$ ) (Рис. 3.12).



**Рис. 3.12.** Імпульсні параметри ( $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки щурів у контролі та за хронічної дії упродовж 6 місяців наночастинок  $TiO_2$  (0,1 мг/кг/добу): за 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі ( $n=7$ , \*\*\* -  $p<0.05$  – різниця достовірна щодо контролю).

Отже, проведені дослідження показали принципові відмінності чисельних значень механокінетичних параметрів спонтанних скорочень гладеньких м'язів різних відділів шлунково-кишкового тракту (шлунку, товстого кишечника) у контролі та за хронічної дії на організм наночастинок  $TiO_2$ .

Ми можемо передбачати клітинні механізми, які лежать в основі встановлених ефектів нано- $TiO_2$  щодо спонтанних скорочень гладеньких м'язів травного тракту. Спонтанні хвилі деполяризації цієї тканини генерують пейсмейкерні клітини Кахаля (ICC), причому частота повільних хвиль визначає частоту спонтанних скорочень. Початковий компонент деполяризації при

розвитку спонтанної хвилі обумовлюється вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  через інозитол1,4,5трифосфат-чутливі кальцієві канали саркоплазматичного ретикулуму, а надалі ці іони захоплюються мітохондріями. Загалом повільні хвилі деполяризації координуються сукупністю взаємопов'язаних процесів: активації потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів L-типу, вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  з саркоплазматичного ретикулуму та їх секвестрації у мітохондрії. Процес мобілізації  $\text{Ca}^{2+}$  з саркоплазматичного ретикулуму та їх перерозподіл в мітохондрії визначає частоту спонтанної активності. Амплітуда спонтанних скорочень визначається  $\text{Ca}^{2+}$ -залежними (і частково  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежними) процесами в робочих гладеньком'язових клітинах.

Отже ми маємо всі підстави припустити, що наночастинки  $\text{TiO}_2$ , після проникнення у клітини гладеньком'язової стінки шлунково-кишкового тракту, по-перше, змінюють функціонування пейсмеркерних клітин Кахаля, та, по-друге, пригнічує процеси надходження  $\text{Ca}^{2+}$  і їх секвестрацію в мітохондрії робочих міоцитів; врешті, ймовірно, що за хронічної дії  $\text{TiO}_2$  порушується координація між пейсмеркерними і робочими міоцитами у тканині гладеньких м'язів.

## ВИСНОВКИ

1. У роботі здійснено повний механокінетичний аналіз спонтанних окремих скорочень фрагментів стінки шлунково-кишкового тракту (шлунку – на прикладі кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу *antrum*, і товстого кишечника – на прикладі кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки *caecum*) контрольних щурів 8-9 місячного віку.
2. Встановлено, що за хронічної дії *in vivo* упродовж 6 місяців наночастинок  $\text{TiO}_2$  (0,1 мг/кг/добу) спостерігається суттєве пригнічення скорочувальної функції гладеньких м'язів *antrum*, яке супроводжується зниженням усіх часових, силових, швидкісних та імпульсних механокінетичних параметрів. Оскільки за величиною інгібіторних ефектів параметри фаз скорочення і розслаблення шлунку не відрізняються, ймовірно, ефекти  $\text{TiO}_2$  не є специфічними для окремих  $\text{Ca}^{2+}$ -систем, які приймають участь у розвитку скорочувальних відповідей.
3. Показано, що також за хронічної дії *in vivo* нано- $\text{TiO}_2$  спостерігається інгібування спонтанних скорочень товстого кишечника щурів. Втім, за даних умов має місце підвищення часових та ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ) імпульсних ( $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) параметрів на тлі зниження силових ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ) і швидкісних ( $V_C$  і  $V_R$ ) та механокінетичних параметрів. Ймовірно, що наночастинки  $\text{TiO}_2$ , після проникнення у тканину товстого кишечника змінюють функціонування пейсмекерних клітин Кахаля, та пригнічують процеси надходження  $\text{Ca}^{2+}$  і їх секвестрацію в мітохондрії робочих міоцитів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. MATTEIS, Valeria De; RINALDI, Rosaria. Toxicity assessment in the nanoparticle era. Cellular and molecular toxicology of nanoparticles, 2018, 1-19.
2. SONI, Deepika, et al. Release, transport and toxicity of engineered nanoparticles. Reviews of environmental contamination and toxicology, 2015, 1-47.
3. ZHAO, Jinshun; CASTRANOVA, Vincent. Toxicology of nanomaterials used in nanomedicine. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 2011, 14.8: 593-632.
4. HAIDER, Adawiyah J.; JAMEEL, Zainab N.; AL-HUSSAINI, Imad HM. Review on: titanium dioxide applications. Energy Procedia, 2019, 157: 17-29.
5. DRENO, Brigitte, et al. Safety of titanium dioxide nanoparticles in cosmetics. Journal of the European academy of dermatology and venereology, 2019, 33: 34-46.
6. BURNETT, Mark E.; WANG, Steven Q. Current sunscreen controversies: a critical review. Photodermatology, photoimmunology & photomedicine, 2011, 27.2: 58-67.
7. ZHAO, Jinshun; CASTRANOVA, Vincent. Toxicology of nanomaterials used in nanomedicine. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 2011, 14.8: 593-632.
8. BARANOWSKA-WÓJCIK, Ewa, et al. Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on human health—a review. Biological Trace Element Research, 2020, 193.1: 118-129.
9. SHA, Baoyong, et al. The potential health challenges of TiO<sub>2</sub> nanomaterials. Journal of Applied Toxicology, 2015, 35.10: 1086-1101.
10. CAO, Yi, et al. A review of cardiovascular toxicity of TiO<sub>2</sub>, ZnO and Ag nanoparticles (NPs). Biometals, 2018, 31.4: 457-476.
11. JIA, Jianbo, et al. Crossing biological barriers by engineered nanoparticles. Chemical Research in Toxicology, 2020, 33.5: 1055-1060

12. SONG, Bin, et al. A review on potential neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Nanoscale research letters*, 2015, 10.1: 1-17.
13. HONG, Fashui, et al. Wnt pathway-mediated nano TiO<sub>2</sub>-induced toxic effects on rat primary cultured Sertoli cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2018, 14.12: 2124-2134.
14. WANI, Mohammad Rafiq; SHADAB, G. G. H. A. Titanium dioxide nanoparticle genotoxicity: A review of recent in vivo and in vitro studies. *Toxicology and Industrial Health*, 2020, 36.7: 514-530.
15. ZHAO, Jinshun, et al. Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles induce JB6 cell apoptosis through activation of the caspase-8/Bid and mitochondrial pathways. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2009, 72.19: 1141-1149.
16. CZAJKA, Magdalena, et al. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. *Toxicology in vitro*, 2015, 29.5: 1042-1052.
17. LI, Shi-Qiang, et al. Nanotoxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to erythrocyte in vitro. *Food and chemical toxicology*, 2008, 46.12: 3626-3631.
18. NAUMENKO, A. M., et al. Molecular docking of nanosized titanium dioxide material to the extracellular part of GABAB-receptor. *Studia Biologica*, 2016, 10.3-4: 5-16.
19. ZHANG, Xiaochen; LI, Wen; YANG, Zhuo. Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update. *Archives of toxicology*, 2015, 89.12: 2207-2217.
20. BOLAND, Sonja; HUSSAIN, Salik; BAEZA-SQUIBAN, Armelle. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce distinct molecular mechanisms of toxicity. *Wiley interdisciplinary reviews: Nanomedicine and nanobiotechnology*, 2014, 6.6: 641-652.
21. JOHNSTON, Helinor J., et al. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO<sub>2</sub> particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Particle and fibre toxicology*, 2009, 6.1: 1-27.

22. KOSTERIN, S.; TSYMBALYUK, O.; HOLDEN, O. Multiparameter analysis of mechanokinetics of the contractile response of smooth muscles. Series on Biomechanics, 2021.
23. BURDYGA, V.; KOSTERIN, S. A. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. *General Physiology and Biophysics*, 1991, 10.6: 589-598.
24. THOMSON, Lars, et al. Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. *Nature medicine*, 1998, 4.7: 848-851.