

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ЦИМБАЛЮК ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 577.24/352.4

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

03.00.02–біофізика

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ О.В. Цимбалюк

Науковий консультант: Костерін С.О., академік НАН України, доктор
біологічних наук, професор

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Цимбалюк О.В. Біофізичні механізми дії нанорозмірних матеріалів на механокінетику вісцеральних гладеньких м'язів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України. Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України. Київ, 2019.

Дисертаційна робота присвячена встановленню закономірностей і механізмів дії в умовах *in vitro* та *in vivo* окремих нанорозмірних матеріалів (на прикладі наночастинок діоксиду титану, а також каліксаренів – інгібіторів первинного активного іонного транспорту плазматичної мембрани) на скорочувальну функцію вісцеральних гладеньких м'язів.

Функціонування гладеньких м'язів у значній мірі залежить від механічних і термомеханічних властивостей: ця тканина здатна змінювати довжину у відповідь на фізико-хімічні та фармакологічні стимули, активно модулюючи при цьому напруження. Отже, термомеханокінетичні властивості вісцеральних гладеньких м'язів, зокрема шлунково-кишкового тракту, у значній мірі визначатимуть нормальне функціонування травної системи і потребують детального дослідження. Вивчення кінетики і термодинаміки вискоеластичної деформації гладенького м'язу необхідне для розуміння біофізичних механізмів його функціонування як вискоефективного механохімічного двигуна. Механокінетичні параметри функціонування м'язового шару стінок вісцеральних органів можуть бути застосовні для діагностування дисфункційних порушень, індукованих, зокрема, нанорозмірними ксенобіотиками.

Сучасні технології у медицині та різних галузях промисловості передбачають інтенсивну розробку та впровадження наноматеріалів і супрамолекулярних речовин. Відповідно, це створює передумови інтенсивного проникнення цих сполук у організм людини, а також їх

накопичення в різних органах і тканинах та включення у метаболізм. Нанорозмірні ксенобіотики можуть проникати в організм людини різними шляхами (зокрема, через дихальні шляхи і порожнисті органи шлунково-кишкового тракту та трансдермально), головним з них є шлунково-кишковий тракт. Серед ксенобіотиків, фармако-токсикологічне навантаження яких на організм людини в останні десятиріччя набуло загрозливих меж, одне з перших місць посідає наноматеріал діоксиду титану (TiO_2). TiO_2 – найбільш вживаний промисловий барвник білого кольору; зокрема, він широко використовується для надання забарвлення харчовим продуктам, косметичним і гігієнічним засобам, наномедичним реактивам, фармацевтичним препаратам. Перспективною основою для створення фармакологічних засобів нового покоління зі спрямованою, вибірковою і оборотною дією на окремі системи клітини, є каліксарени – нанорозмірні макроциклічні сполуки, які одержують прецизійною циклоконденсацією пара-заміщених фенолів і формальдегіду. Таким чином, питання визначення механізмів дії окремих, зокрема зазначених вище, нанорозмірних матеріалів є надзвичайно важливим і актуальним для сучасної біофізики.

Отож, з огляду на важливість встановлення кількісних закономірностей і механізмів регуляції напруження і скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів в умовах дії супрамолекулярних і нанорозмірних матеріалів, у роботі представлені комплексні дослідження із залученням сукупності методичних підходів *in vitro* та *in vivo*.

Для дослідження даної проблеми у першу чергу із застосуванням термодинамічного і механокінетичного методів аналізу було детально охарактеризовано властивості вискоеластичної деформації гладеньких м'язів, а також спонтанні та викликані різними ефекторами і агоністами рецепторів скорочення гладеньких м'язів шлунку, товстого кишечника і міометрія щурів. У випадку спонтанних і викликаних м'язових скорочень проаналізовано чутливість механокінетичних параметрів до дії окремих фізико-хімічних факторів.

При вивченні термомеханокінетичних закономірностей оборотної вискоеластичної деформації та релаксації кільцевих м'язів шлунку встановлено, що показники максимальної (ΔA) та напівмаксимальної ($\Delta A_{1/2}$) роботи куполоподібно змінюються, досягаючи мінімальних значень при 31-40 °C. Із застосуванням рівняння Віганда-Снайдера встановлено, що оборотні малі ($\Delta L/L_{\pi} \leq 20\%$) деформації (не залежно від температур) та значні ($\Delta L/L_{\pi} \approx 50\%$) деформації (у діапазоні температур $30^{\circ}\text{C} < T < 40^{\circ}\text{C}$) гладеньких м'язів шлунку не супроводжуються змінами у впорядкованості тензометричної системи ($(\partial S / \partial \Delta L)_T = 0$); при великих деформаціях за низьких та підвищених температур спостерігається інверсія знаку ентропійних ефектів: $(\partial S / \partial \Delta L)_T > 0$ при $< 31^{\circ}\text{C}$ та $(\partial S / \partial \Delta L)_T < 0$ при $> 37^{\circ}\text{C}$.

Встановлено, що суспензії нанорозмірного матеріалу TiO_2 трьох розмірних груп, які містять різні співвідношення сумішей поліморфів рутилу і анатазу: 1-3 нм (рутил), 4-8 нм (анатаз) та 21 нм (співвідношення рутил:анатаз=1:4) за умов некумулятивної ($5 \cdot 10^{-2}$, 10^{-5} мг/мл) та кумулятивної дії ($10^{-7} - 10^{-4}$ мг/мл), є ефективними модуляторами спонтанної і викликанної скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів. Зокрема, TiO_2 модулює пресинаптичні і постсинаптичні механізми регуляції за участі нейрональних ацетилхолінових нікотинових і ГАМК-рецепторів з одного боку, а з іншого боку експресованих власне у гладеньком'язових клітинах ацетилхолінових мускаринових, гістамінових, а також брадикінінових рецепторів. На підтвердження цього дослідженнями *in silico* встановлено, що нанорозмірний матеріал TiO_2 здатний взаємодіяти з різною спорідненістю із декількома сайтами позаклітинної частини метаботропних ГАМК_B-, гліцинових, M_2 - та M_3 -ацетилхолінових рецепторів.

Також показано відсутність впливу наночастинок TiO_2 (з середнім розміром 21 нм, співвідношення рутилу і анатазу 1:4) на процеси спряження збудження-скорочення, які індукуються ендogenousним ацетилхоліном за умови

активації його вивільнення деполяризацією м'язової тканини. Водночас виявлено модуляцію цим наноматеріалом скорочень, активованих екзогенним ацетилхоліном та пригнічення їх тонічної складової агоністом іонотропних ацетилхолінових рецепторів ніотином.

Виявлено, що попереднє блокування Ca^{2+} -каналів L-типу D-600 (10^{-5} М) у значній мірі усуває активаційний ефект високими концентраціями TiO_2 ацетилхолін-викликаних скорочень, що вказує на індуковану наночастинками активацію надходження іонів Ca^{2+} через ці канали. Тестування функції внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо виявлено, що нанорозмірний матеріал TiO_2 не змінює мобілізацію іонів Ca^{2+} з інозитол-1,4,5-трисфосфат- та ріанодин-чутливих пулів саркоплазматичного ретикулуму міоцитів шлунку.

На багатоклітинних препаратах кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку встановлено, що блокування роботи дихального ланцюга мітохондрій азидом натрію (0,1 мМ) усуває модуляцію ацетилхолін-викликаних скорочень наночастинками TiO_2 . Також дослідженнями скорочувальної функції поздовжніх гладеньких м'язів міометрія показано, що TiO_2 усуває ефекти блокування АТФ-чутливих K^+ -каналів плазматичної мембрани і мітохондрій. Обидва зазначені ефекти вказують на те, що мішенню дії нано- TiO_2 є енерго/АТФ-залежні процеси в міоцитах.

Дослідженнями тривалої дії *in vivo* (упродовж 30 і 100 діб) нано- TiO_2 за умов інтрагастрального введення виявлено, що цей наноматеріал проникає в тканини та нерівномірно накопичується у різних органах (дані елементного аналізу методом атомно-емісійної спектроскопії): найбільшу кількість Ti накопичують тканини вісцеральних ГМ (шлунок > товстий кишечник > матка) та нирок. Також тензометричними дослідженнями та механокінетичним аналізом встановлено, що тривале навантаження організму спричиняє неоднорідний (часо-залежний і тканино-залежний) вплив на спонтанну і викликану скоротливу активність м'язів шлунку, товстого кишечника та міометрія.

Вивчення закономірностей дії калікс[4]аренів-інгібіторів Na^+, K^+ -АТФази плазматичної мембрани (з кодами С-99 та С-107) показало, що викликані ацетилхоліном скорочення ГМ *saesum* є чутливими до дії калікс[4]арену С-99 (100 мкМ) в умовах попереднього блокування Na^+, K^+ -АТФази убаїном (100 мкМ) порівняно з дією 200 мкМ убаїну: С-99 спричиняє суттєве пригнічення фазного і збільшення тонічного компонента скорочень, а також зниження нормованої максимальної швидкості фази розслаблення V_{pr} . Також показано, що калікс[4]арен С-107 зберігає свої інгібіторні якості щодо Na^+, K^+ -АТФ-ази в умовах цілісного організму. Встановлено, що цей калікс[4]арен в умовах хронічного впливу *in vivo* (впродовж 6,5 місяців) спричиняє пригнічення убаїн-чутливої АТФ-азної активності препаратів плазмалеми гепатоцитів щурів. У випадку використання *in vivo*, структурний фрагмент калікс[4]арену С-107 (сполука М-3), як і у випадку *in vitro*, також не впливає на функціонування натрієвої помпи. З використанням механокінетичного аналізу викликаних K^+ -деполяризацією і ацетилхоліном скорочень встановлено, що калікс[4]арен С-107 та його фрагмент М-3 при аплікуванні *in vitro* та в умовах хронічної дії *in vivo* спричиняють подібні зміни скорочувальної функції м'язів *saesum*.

Дослідження впливу калікс[4]аренів-інгібіторів Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани (з кодами С-90 і С-716) дозволили встановити, що зростання тонічної складової K^+ -викликаного скорочення гладеньких м'язів міометрія під дією цих калікс[4]аренів (як у випадку інтактних внутрішньоклітинних систем депонування кальцію, так і та за попереднього блокування обміну іонів Ca у внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо) пов'язане з підвищеною концентрацією іонів Ca^{2+} в міоцитах, тоді як збільшення нормованої швидкості розслаблення за цих умов, чутливу до блокування синтезу оксиду азоту та, ймовірно, обумовлюється суттєвою активацією синтезу оксиду азоту конститутивними формами NO-синтаз.

Тож вивчені у роботі нанорозмірні матеріали є ефективними модуляторами скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів, а

їх дія опосередковується зміною функціонування окремих систем активного і пасивного іонного (Na^+ , K^+ та Ca^{2+}) транспорту міоцитів. За сукупністю отриманих даних запропоновані схеми клітинних механізмів дії нано- TiO_2 та калікс[4]аренів-модуляторів первинного активного іонного транспорту плазматичної мембрани.

Ключові слова: вісцеральні гладенькі м'язи, термодинаміка, механокінетика, нанорозмірні матеріали, TiO_2 , калікс[4]арени.

SUMMARY

Tsymbalyuk O.V. Biophysical mechanisms of action of nanoscale materials on the mechanokinetics of visceral smooth muscles. – Qualified scientific work on the rights of the manuscript. Thesis for Doctor of Science degree on specialty 03.00.02 – biophysics. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation is devoted to the establishment of features and mechanisms of action in vitro and in vivo of some nanoscale materials (for example, titanium dioxide nanoparticles, as well as calix[4]arenes - inhibitors of the primary active ion transport of the plasma membrane) on the contractile function of visceral smooth muscles.

The functioning of smooth muscles is largely dependent on mechanical and thermomechanical properties: this tissue is able to change length in response to physicochemical and pharmacological stimulus, while actively modulating stress. So, the thermomechanokinetic properties of visceral smooth muscles, including the gastrointestinal tract, to a large extent determine the normal functioning of the digestive system and require a detailed study. The study of the kinetics and thermodynamics of highly elastic smooth muscle deformation is necessary to understand the biophysical mechanisms of its functioning as a highly efficient mechanochemical system. Mechanokinetic parameters of the functioning of the

muscular layer of the walls of visceral organs can be used to diagnose dysfunctional disorders induced, in particular, by nanoscale xenobiotics.

Modern technologies in medicine and various industries provide for the intensive development and implementation of nanomaterials and supramolecular substances. Accordingly, this creates the prerequisites for the intensive penetration of these compounds into the human body, as well as their accumulation in various organs and tissues and inclusion in the metabolism. Nanoscale xenobiotics can penetrate the human body in various ways (in particular, through the respiratory system, the gastrointestinal tract and transdermally), the main of which is the gastrointestinal tract. Among xenobiotics, the pharmaco-toxicological burden of which on the human body in recent decades has acquired threatening boundaries, one of the first places is occupied by titanium dioxide nanomaterial (TiO_2). TiO_2 - the most widely used industrial dye in white, in particular, it is widely used to color food products, cosmetics and hygiene products, nanomedical reagents, pharmaceuticals. A promising basis for creating a new generation of pharmacological agents with a directed, selective and circulating effect on individual cell systems is calix[4]arenes - nanoscale macrocyclic compounds that receive precision cyclocondensation of para-substituted phenols and formaldehyde. Thus, the question of determining the mechanisms of action of some nanoscale materials is extremely important and relevant for modern biophysics.

Therefore, given the importance of establishing quantitative patterns and mechanisms for regulating the tension and contractile activity of visceral smooth muscles under the action of supramolecular and nanoscale materials, the work presents complex studies involving a combination of methodological approaches *in vitro* and *in vivo*.

To study this problem, primarily using thermodynamic and mechanokinetic methods of analysis, the properties of highly elastic deformation of smooth muscles, as well as spontaneous and evoked (by various effectors and receptor agonists) contractions of rat smooth muscle stomach, colon and myometrium, are described in detail. In the case of spontaneous and evoked contractions, the

sensitivity of mechanokinetic parameters to the action of individual physicochemical factors is analyzed.

When studying the thermomechanokinetic patterns of reverse highly elastic deformation and relaxation of the circular muscles of the stomach, it was found that the maximal (ΔA) and half-maximal ($\Delta A_{1/2}$) dome-shaped parameters change, reaching minimum values at 31-40 °C. Using the Wiehand-Snyder equation, it was found that reverse small ($\Delta L/L_n \leq 20\%$) deformations (regardless of temperature) and significant ($\Delta L/L_n \approx 50\%$) deformations (in the temperature range 30 °C < T < 40 °C) of the smooth muscles of the stomach are not accompanied by changes in ordering tensometrical system ($(\partial S / \partial \Delta L)_T = 0$); for large deformations at low and high temperatures observed entropic effects the inversion of the sign: $(\partial S / \partial \Delta L)_T > 0$ when temperature < 31 °C and $(\partial S / \partial \Delta L)_T < 0$ when temperature > 37 °C.

It was found that suspensions of nanosized material TiO₂ of three size groups that contain different ratios of mixtures of rutile and anatase polymorphs: 1-3 nm (rutile), 4-8 nm (anatase) and 21 nm (rutile: anatase ratio = 1: 4) non-cumulative conditions ($5 \cdot 10^{-2}$, 10^{-5} mg/ml) and cumulative conditions (10^{-7} - 10^{-4} mg/ml) are effective modulators of the spontaneous and induced contractile activity of visceral smooth muscles. In particular, TiO₂ modulates presynaptic and postsynaptic regulatory mechanisms involving neuronal acetylcholine nicotinic and GABA receptors on the one hand, and on the other hand, acetylcholine muscarinic, histaminic, and bradykinin receptors actually expressed in smooth muscle cells. In support of this, *in silico* studies found that the nanosized material TiO₂ is able to interact with different affinities with several sites of the extracellular part of the metabotropic GABA, glycine, M₂, and M₃ acetylcholinic receptors.

The absence of the influence of TiO₂ nanoparticles (with an average size of 21 nm, rutile: anatase ratio = 1: 4) on the processes of excitation-contraction coupling is also shown to be induced by endogenous acetylcholine upon activation of its release by depolarization of muscle tissue. At the same time, modulation by

these nanomaterials of contractions activated by exogenous acetylcholine and inhibition of their tonic component by an agonist of ionotropic acetylcholine receptors nicotine was revealed.

It was revealed that preliminary blocking of L- type Ca^{2+} -channels by D-600 (10^{-5} M) to a large extent eliminates the activation effect by high TiO_2 concentrations of acetylcholine-induced contractions, indicates the activation of Ca^{2+} current via these channels induced by nanoparticles. Testing the function of intracellular Ca^{2+} depots, it was found that the nano- TiO_2 does not change the mobilization of Ca^{2+} ions from inositol-1,4,5-trisphosphate and ryanodine-sensitive pools of the sarcoplasmic reticulum.

On multicellular preparations of the antral smooth muscles, it was found that blocking the work of the respiratory chain of mitochondria with sodium azide (0.1 mmol) eliminates the modulation of acetylcholine-induced contractions by nano- TiO_2 . It has also been shown by studies of the contractile function of the myometrium smooth muscles that TiO_2 eliminates the effects blocking ATP-sensitive K^+ -channels of the plasma membrane and mitochondria. Both of these effects indicate that the target of the action of nano- TiO_2 is energy/ATP-dependent processes in myocytes.

Studies of long-term *in vivo* action (for 30 and 100 days) of nano- TiO_2 under conditions of intragastral administration revealed that this nanomaterial penetrates into tissues and unevenly accumulates in various organs (elemental analysis by atomic emission spectrometry): the largest amount of Ti accumulate tissues of visceral muscles (stomach > large intestine > uterus) and kidneys. It was also determined by tensometric studies and mechanokinetic analysis that *in vivo* nano- TiO_2 action leads to an inhomogeneous (time-dependent and tissue-dependent) effect on the spontaneous and induced contractile activity of the stomach, large intestine and myometrium.

The study of action of calix[4]arenes of plasma membrane Na^+ , K^+ -ATPase inhibitors (with codes C-99 and C-107) showed that acetylcholine-induced contractions of *caecum* muscle are sensitive to the action of calix[4]arene C-99

(100 μM) under the conditions of preliminary blocking of Na^+ , K^+ -ATPase by ouabain (100 μM) compared with the action of 200 μM ouabain: C-99 causes a significant inhibition of the phasic and increase of the tonic component of contractions, as well as a decrease in the normalized maximal rate of the relaxation phase (V_{nr}). It was also shown that calix[4]arene C-107 retains its inhibitory properties in Na^+ , K^+ -ATPase under conditions of a whole organism. It was established that this calix[4]arene under chronic *in vivo* exposure (for 6.5 months) causes inhibition of the ouabain-sensitive ATPase activity of rat hepatocyte plasmalemma preparations. In the case of *in vivo* use, the structural fragment of calix[4]arene C-107 (compound M-3), as in the case of *in vitro*, also does not affect the functioning of the sodium pump. Using mechanokinetic analysis of contractions caused by K^+ -depolarization and acetylcholine, it was found that calix[4]arene C-107 and its fragment M-3, when applied *in vitro* and under chronic *in vivo* conditions, cause similar changes in the contractile function of large intestinal muscles.

Investigation of the effect of calix[4]arenes of plasma membrane Ca^{2+} pump inhibitors (with codes C-90 and C-716) revealed that the growth of the tonic component of the K^+ -evoked contraction of the myometrial smooth muscles under the influence of these calix[4]arenes (as in the case of intact intracellular calcium depot or in mode of the previous blocking of Ca ion exchange depot) is associated with an increased concentration of Ca^{2+} ions in myocytes, while an increase in the normalized relaxation rate under these conditions is sensitive to blocking the synthesis of nitric oxide, and is probably due to significant activation of nitric oxide synthesis by constitutive forms of NO-synthase.

Therefore, the nanoscale materials studied in this work are effective modulators of the contractile activity of visceral smooth muscles, and their effects is mediated by a change in the functioning of some active and passive ionic (Na^+ , K^+ and Ca^{2+}) transport systems of myocytes. Based on the obtained data, schemes of cellular mechanisms of action of nano- TiO_2 and calix[4]arenes are proposed.

Key words: visceral smooth muscles, thermodynamics, mechanokinetics, nanoscale materials, TiO_2 , calix[4]arenes.

Список публікацій за темою дисертації

1. Богущька К.І., **Цимбалюк О.В.**, Данилова В.М. Особливості функціонування міози нової АТРази серцевого м'яза. *Биополимеры и клетка*. 2002; 18 (4): 297-300.
2. Богущька К.І., **Цимбалюк О.В.**, Данилова В.М., Мірошніченко М.С. Вплив рН середовища на АТФазну активність міозину різних типів м'язів. *Фізіологічний журнал*. 2003; 49 (6): 52-55.
3. **Цимбалюк О.В.**, Онуфрійчук О.В., Векліч Т.О., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу оуабаїну і каліксарен біс-гідроксиметилфосфонової кислоти на активність Na^+/K^+ -АТФази на міханокінетику процесу “скорочення-розслаблення” гладенького м'язу. *Фізика живого*. 2006; 14 (1): 53-72.
4. Онуфрійчук О.В., **Цимбалюк О.В.**, Мірошніченко М.С., Костерін С.О. Механокінетика “скорочення-розслаблення” кільцевого м'язу сліпої кишки (*saesum*) щурів. *Фізика живого*. 2006; 14 (3): 63-75.
5. **Цимбалюк О.В.**, Онуфрійчук О.В., Мірошніченко М.С., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарен біс-гідроксиметилфосфонова кислота змінює механокінетичні параметри скорочення кільцевих гладеньких м'язів *saesum* щура, що викликані ацетилхоліном. *Доповіді НАН України*. 2007; 9: 167-173.
6. Онуфрійчук О.В., **Цимбалюк О.В.**, Мірошніченко М.С., Родік Р.В., Бойко В.І. Вплив каліксарену C107 та його фрагменту M3 на механокінетичні параметри процесу “скорочення-розслаблення” гладеньких м'язів *saesum* щура. *Науковий вісник Волинського державного університету імені Лесі Українки*. 2007; 5: 41-46.
7. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О., Кальченко В.І., Родік Р.В. Порівняльне вивчення в дослідках *in vitro* та *in vivo* впливу каліксарену C107 та уабаїну на Na^+/K^+ -АТФ-азну активність в плазматичних мембранах гепатоцитів щурів. *Укр. біохім. журн*. 2010; 82 (4): 78-85.
8. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О., Кальченко В.І., Родік Р.В. Механокінетичні параметри скоротливої активності гладеньких м'язів *saesum* щура за умов хронічної дії каліксарену C107 *in vivo*. *Фізика живого*. 2010; 18 (1): 47-51.
9. **Цимбалюк О.В.**, Мартинюк В.С. Влияние магнитного поля крайне низкой частоты на вызванную K^+ -деполяризацией и ацетилхолином сократительную активность кишечинальных гладких мышц. *Фізика живого*. 2011; 19 (1): 20-26.
10. Меленевська Н.В., **Цимбалюк О.В.**, Романенко О.В., Давидовська Т.Л. Нефармакологічна корекція ритмоактивності гладеньких м'язів

- кишечнику. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Регуляція фізіологічних функцій». 2012; 1: 36-39.
11. **Цимбалюк О.В.**, Мартинюк В.С. Вплив магнітного поля наднизької частоти на спонтанну скоротливу активність інтестинальних гладеньких м'язів. Вісник Черкаського університету. Серія «Біологічні науки». 2012; 2 (215): 128-133.
 12. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Термомеханокінетика високоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щура I. Динамічні закономірності розтягування гладеньких м'язів шлунка. *Studia Biologica*. 2012; 6 (2): 87–98.
 13. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Термомеханокінетика високоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щура. II. Явище гістерезису у випадку розтягування гладеньких м'язів шлунка та товстого кишечника. *Studia Biologica*. 2012; 6 (3): 73–84.
 14. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Na^+, K^+ -АТФ-аза, ендogenous кардіостероїди та їх трансдукторна роль. *Укр. біохім. журн.* 2012; 84 (1): 5-17.
 15. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Термомеханокінетика високоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щура. III. Робота високоеластичного розтягування гладеньких м'язів антрального відділу шлунка. *Studia Biologica*. 2013; 7 (1): 21-30.
 16. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Застосування рівняння Віганда-Снайдера до термодинамічної інтерпретації високоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунка. *Доповіді НАН України*. 2013; 6: 162-167.
 17. Pavlovsky V.I., **Tsymbalyuk O.V.**, Martynyuk V.S., Kabanova T.A., Semenishyna E.A., Khalimova E.I., Andronati S.A. Analgesic Effects of 3-Substituted Derivatives of 1,4-Benzodiazepines and their Possible Mechanisms. *Neurophysiology*. 2013; 45 (5): 463-468.
 18. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Вплив каліксарену C-90 на скоротливу активність гладеньких м'язів міометрія щурів. *Studia Biologica*. 2013; 7(2): 87-98.
 19. **Цимбалюк О.В.** Дослідження кінетичних закономірностей впливу оксиду азоту на викликані окситоцином скорочення гладеньких м'язів міометрія. Вісник Черкаського університету. Серія «Біологічні науки». 2013; 2 (255): 121-126.
 20. Костенко В.І., Чамор Т.Г., **Цимбалюк О.В.**, Давидовська Т.Л. Модуляція скорочувальної активності гладеньких м'язів кишечника щурів в умовах дії низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання. Вісник Східноєвропейського національного університету. Серія «Біологічні науки». 2014; 1 (13): 24-29.
 21. **Цимбалюк О.В.** Порівняльний аналіз механокінетики скоротливої активності гладеньких м'язів міометрія щурів за дії каліксарену C-99 та убаїну. *Studia Biologica*. 2014; 8 (1): 63-72.
 22. **Цимбалюк О.В.**, Науменко А.М., Нипорко О.Ю., Давидовська Т.Л.,

- Скришевський В.А. Збудження-гальмування гладеньких м'язів шлунку при взаємодії з нанорозмірним матеріалом диоксиду титану. Доповіді НАН України. 2015; 10: 85-92.
23. **Цимбалюк О.В.** Вплив каліксарену C-99 на скоротливу активність м'язів товстого кишечника щурів. *Studia Biologica*. 2016; 10 (3-4): С.33-46.
 24. **Tsybalyuk O.V.**, Naumenko A.M., Skoryk M.A., Nyporko A.Y., Davidovska T.L., Skryshevsky V.A. Histamine- and nicotine-stimulated modulations of mechanic activity of smooth muscles in gastrointestinal tract at the impact of nanosized TiO₂ material. *Biopolymers and Cell*. 2016; 32(2): 140-149.
 25. Naumenko A.M., Nyporko A.Yu., **Tsybalyuk O.V.**, Nuryshchenko N.Ye., Voiteshenko I.S., Davidovska T.L. Molecular docking of nanosized titanium dioxide material to the extracellular part of GABA_B-receptor. *Studia Biologica*. 2016; 10 (3-4): 5-16.
 26. **Tsybalyuk O.V.**, Naumenko A.M., Rohovtsov O.S., Skoryk M.O., Voyteshenko I.S., Skryshevsky V.A., Davydovska T.L. Titanium dioxide modulation of the contractibility of visceral smooth muscles *in vivo*. *Nanoscale Research Letters*. 2017; 12: 129, DOI: 10.1186/s11671-017-1865-7
 27. Naumenko A. M., Dmytrenko O. V., Shapoval L. M., **Tsybalyuk O. V.**, Sagach V. F., Davydovska T. L. Effects of Injections of Nanostructured Titanium Dioxide into the Rat Medullary Nuclei Involved in Cardiovascular Control. *Neurophysiology*. 2018; 50 (6): 409-414.
 28. **Tsybalyuk O.V.** Kinetics of relaxation of rat myometrium in conditions of inhibition of plasma membrane calcium pump and systems of active Ca²⁺ transport of intracellular Ca²⁺-depot. *Studia Biologica*. 2018; 12 (2): 3-12.
 29. **Tsybalyuk O.V.**, Naumenko A.M., Davidovska T.L. The influence of nano-TiO₂ on the functioning of gastric smooth muscles: an *in vitro* and *in silico* studies. *Studia Biologica*. 2019; 13 (1): 3-26.
 30. Онуфрійчук О.В., **Цимбалюк О.В.** Вплив інгібіторів Na⁺,K⁺-АТРази на міханокінетику скорочення-розслаблення гладенького м'язу *саесит* щура. *IX Український біохімічний з'їзд*, 24-27 жовтня, Харків, 2006; Укр. біохім. журн. 2006; 78 (6): 113.
 31. Онуфрійчук О.В., **Цимбалюк О.В.** Вплив фізико-хімічних факторів на механокінетичні параметри процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів. *IV з'їзд Українського біофізичного товариства* 19-21 грудня, Донецьк, 2006. – С. 401-402.
 32. **Цимбалюк О.В.**, Онуфрійчук О.В. Кінетичний аналіз процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів. *IV з'їзд Українського біофізичного товариства* 19-21 грудня, Донецьк, 2006. – С. 407-408.
 33. Онуфрійчук О.В., **Цимбалюк О.В.** Вплив інгібіторів натрієвої помпи на механокінетику “скорочення-розслаблення” гладенького м'язу *саесит* щурів. *III Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь та поступ біології»* 5-6 листопада, Львів, 2007. – С. 16-17.
 34. **Tsybalyuk O.V.**, Shelyuk O.V., Miroshnichenko N.S. Comparative study of

- influence of ouabain and calixarene bis-hydroxymethylphosphone acids (C99 and C107) on the mechanokinetics of process contraction-relaxation of intestinal smooth muscles. *Vth International Symposium «Supramolecular Systems in Chemistry and Biology»* May 12-16, 2009, Kyiv, Ukraine. – P. 72.
35. **Tsymbalyuk O.V.**, Davydovs'ka T.L., Miroshnichenko M.S., Radchenko N.V. Study of the kinetic characteristics of Ca^{2+} -dependent tension changes of skinned smooth muscles *caecum*. «*Biological motility-2010. From fundamental achievements to nanotechnologies*», Pushchino, Moscow region, Russia, 10-15 may, 2010. – P.303-306.
 36. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О., Родік Р.В., Кальченко В.І. Дослідження впливу убаїну та каліксарену C107 на активність Na^+, K^+ -АТФ-ази в плазматичних мембранах печінки щура в умовах *in vivo* та *in vitro*. *Х Український біохімічний з'їзд*, 13-17 вересня, Одеса, 2010; Укр. біохім. журн. 2010; 82 (4) (додаток 1): С. 112-113.
 37. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Дослідження хронічної дії каліксарену C107 на кінетичні характеристики скоротливої активності гладеньких м'язів саесум щура. *І з'їзд Українського біофізичного товариства* 22-25 червня, Луцьк, 2011. – С. 134.
 38. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Особливості дії інгібітора натрієвої помпи каліксарену C107 в умовах *in vivo*. *Міжнародна науково-практична конференція «Біологічно активні речовини»*, 23-28 травня, Новий Світ, 2011. – С. 621-622.
 39. Мартинюк В.С., **Цимбалюк О.В.** Влияние слабого магнитного поля крайне низкой частоты на сократительную активность гладких мышц. *Междисциплинарная конференция «Адаптационные стратегии живых систем»*, 11-16 июля, Новый Свет, 2012. – С. 287.
 40. **Tsymbalyuk O.V.**, Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Chronic action of calixarene C-107 under *in vivo* conditions on Na^+, K^+ -ATPase activity of rat hepatocyte plasmatic membranes. *III International Symposium: Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design*, September 2012, Lviv. – P.150.
 41. **Tsymbalyuk O.V.**, Martynyuk V.S., Tseyslyer Yu.V., Shelyuk O.V., Nurishenko N.E. Modification of functional state of muscle tissue upon influence extremely low frequency of electromagnetic field. *Biological Motility: Fundamental and Applied Science*, Pushchino, Moscow region, Russia, May 11–15, 2012. – P. 122-126.
 42. **Tsymbalyuk O.V.**, Kosterin S.O. Thermomechanokinetics of viscoelastic deformation of smooth muscles in rat stomach. *Advances in Pharmacology and Pathology of the Digestive Tract, 4th International Scientific Conference*. 26-28 september 2012, Kyiv. – P. 64.
 43. Павловский В.И., **Цимбалюк О.В.**, Мартинюк В.С., Кабанова Т.А., Халимова Е.И. Анальгетическая активность 3-пропанокси-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она и выявление механизма, лежащего в его основе. *Міжнародна науково-практична конференція «Біологічно активні речовини»*, 27 травня – 1 червня, Новий Світ, 2013: матер. конф.,

- т.1. – С.439.
44. Костерин С.А., Бабич Л.Г., Шлыков С.Г., Веклич Т.А., Лабынцева Р.Д., **Цимбалюк О.В.**, Шкрабак А.А., Бевза А.В., Бевза А. А., Родик Р.В., Черенок С.О., Кальченко О.И., Кальченко В.И. Каликс[4]арены как эффекторы атр-гидролаз *Міжнародна науково-практична конференція «Біологічно активні речовини»*, 27 травня – 1 червня, Новий Світ, 2013: матер. конф., т.2. – С.175.
 45. **Цимбалюк О.В.**, Павловский В.И., Мельник М.И., Мартынюк В.С. Изучение действия непептидных синтетических антагонистов брадикининовых рецепторов на гладкие мышцы желудка *Міжнародна науково-практична конференція «Біологічно активні речовини»*, 27 травня – 1 червня, Новий Світ, 2013: матер. конф., т.1. – С.319.
 46. Скришевський В.А., **Цимбалюк О.В.**, Нипорко О.Ю., Давидовська Т.Л. Дослідження механізмів впливу наночастинок TiO_2 на скорочувальну активність гладеньких м'язів шлунку. *IV міжнародна конференція «Медицина фізика – сучасний стан, проблеми, шляхи розвитку. Новітні технології»*, 23-24 жовтня, Київ, 2014. – С. 41.
 47. Naumenko A.M., **Tsybalyuk O.V.**, Nyporko A.Yu., Davidovska T.L., Skryshevsky V.A. Excitation processes in stomach smooth muscles under action of TiO_2 nanoparticles. *XI Міжнародна конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»*, 20-23 квітня, Львів, 2015. – С.118.
 48. **Tsybalyuk O.V.**, Nyporko A.Yu., Naumenko A.M., Davidovska T.L., Skryshevsky V.A. TiO_2 nanoparticles as modulators of stomach smooth muscles function. *XIX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г.Костюка*, 24 - 26 травня, Львів, 2015. – С.19.
 49. Науменко А.М., **Цимбалюк О.В.**, Скорик М.А., Нипорко О.Ю., Давидовська Т.Л., Скришевський В.А. Пресинаптична модуляція процесів збудження та гальмування в інтестеціальних гладеньких м'язах за дії нанорозмірного матеріалу TiO_2 . *V Міжнародна конференція «Медицина фізика - сучасний стан, проблеми, шляхи розвитку. Інноваційні технології»*, 24 - 25 вересня, Київ, 2015. – С. 52.
 50. Naumenko A.M., **Tsybalyuk O.V.**, Skoryk M.A., Nyporko O.Yu., Davidovska T.L., Skryshevsky V.A. Modulations of molecular signaling mechanisms in smooth muscles excitable cells by titanium dioxide nanoscale material. *IV Міжнародна науково-практична конференція «Нанотехнології та наноматеріали»*, 24 -27 серпня, Львів, 2016. – С. 491.
 51. Naumenko A.M., Nyporko A.Yu., **Tsybalyuk O.V.**, Voiteshenko I.S., Davidovska T.L. The analysis of potential binding sites of TiO_2 nanoparticles docked to the extracellular part of GABA_{B1a}. *V міжнародна науково-практична конференція «Нанотехнології та наноматеріали»*, 23 - 26 серпня, Чернівці, 2017. – С. 635.
 52. Naumenko A.M., **Tsybalyuk O.V.**, Voiteshenko I.S., Davydovska T.L. Cholinergic excitation of the gastrointestinal tract smooth muscles due to the action of nanostructured TiO_2 , and its molecular docking to the extracellular

parts of muscarinic acetylcholine receptors M2 and M3 types. *VI міжнародна науково-практична конференція «Нанотехнології та наноматеріали»*, 27-30 серпня, Київ, 2018. – С. 80.

53. **Цимбалюк О.В.**, Науменко А.М., Давидовська Т.Л. Нанорозмірні матеріали як модулятори скорочувальної функції гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту. *VII з'їзд Українського біофізичного товариства*, 29-31 жовтня, Київ, 2018. – С.10.
54. Naumenko A.M., **Tsymbalyuk O.V.**, Rohovtsov O.O., Skoryk M.A., Voiteshenko I.S., Davydovska T.L., Skryshevsky V.A. The state of spontaneous contractile activity of *caecum* and myometrium smooth muscles under the actions of nanostructured TiO_2 *in vivo*. *XV International scientific conference for students and PhD students. «Youth and progress of biology»*, dedicated to the 135th anniversary of J. O. Parnas. Lviv, Ukraine. April 9–11, 2019. – P. 143-144.

ВСТУП

Актуальність теми. Функціонування гладеньких м'язів (ГМ) у значній мірі залежить від механічних і термомеханічних властивостей: м'язові препарати здатні змінювати довжину у відповідь на фізико-хімічні та фармакологічні стимули, активно модулюючи при цьому напруження [1-4]. Отже, термомеханокінетичні властивості вісцеральних ГМ, зокрема шлунково-кишкового тракту (ШКТ), у значній мірі визначають нормальну діяльність травної системи і потребують детального дослідження. Вивчення кінетики скорочення-розслаблення і термодинаміки високоеластичної деформації ГМ необхідне для розуміння біофізичних механізмів його функціонування як високоєфективного механохімічного двигуна. Механокінетичні параметри м'язового шару стінок вісцеральних органів можуть бути застосовні для діагностування дисфункційних порушень, індукованих, зокрема, нанорозмірними ксенобіотиками [5-8].

Сучасні технології у медицині та різних галузях промисловості передбачають інтенсивну розробку та впровадження наноматеріалів і супрамолекулярних речовин [9, 10]. Відповідно, це створює передумови інтенсивного проникнення цих сполук у організм людини, а також їх накопичення в різних органах і тканинах та включення у метаболізм. Нанорозмірні ксенобіотики можуть проникати в організм людини різними способами (зокрема, через дихальні шляхи і порожнисті органи ШКТ та трансдермально), головним з них є ШКТ [11, 12]. Натепер отримано великий обсяг даних медико-біологічних досліджень, які стосуються вивчення біологічної активності нанорозмірних матеріалів, зокрема, нанотрубок, фулеренів, каліксаренів, квантових точок, наночастинок оксидів металів тощо. Серед ксенобіотиків, фармако-токсикологічне навантаження яких на організм людини в останні десятиріччя набуло загрозливих меж, одне з перших місць посідає наноматеріал діоксиду титану. TiO_2 – за обсягом виробництва і використання найбільш вживаний промисловий барвник

білого кольору. Зокрема, він широко застосовується для надання забарвлення харчовим продуктам, косметичним і гігієнічним засобам, наномедичним реактивам, фармацевтичним препаратам [13-17].

Перспективною основою для створення фармакологічних засобів нового покоління зі спрямованою, вибірковою і оборотною дією на окремі системи клітини, є каліксарени – нанорозмірні макроциклічні сполуки, які синтезують прецизійною циклоконденсацією пара-заміщених фенолів і формальдегіду [18-30]. Натепер світовими дослідницькими центрами накопичено великий обсяг даних щодо біологічної активності калікс[4]аренів. Так, маються на увазі дослідження, що проводяться в Інституті органічної хімії (академік НАН України В.І. Кальченко) та Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна (академік НАН України С.О. Костерін) НАН України. Зокрема, в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН було детально досліджено вибрані калікс[4]арени, для окремих з них на моделях *in vitro* встановлена селективна, високоафінна дія щодо вибраних клітинних ензимів (зокрема, АТФ-ази міозину) та іон-транспортувальних систем плазматичної мембрани (ПМ): мова йде за калікс[4]арени з шифрами С-99, С-97, С-107 – на Na^+ , K^+ -АТФ-азу, а С-90 і С-716 – на Ca^{2+} -АТФ-азу ПМ [31-37].

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

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

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у встановленні механокінетичних і термодинамічних закономірностей функціонування

вісцеральних ГМ та впливу на їхнє скорочення та високоеластичну деформацію нанорозмірних матеріалів (наночастинок TiO_2 і калікс[4]аренів – інгібіторів систем первинного активного іонного транспорту ПМ).

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити завдання:

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

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

Предмет дослідження: механізми модуляції термомеханокінетичних параметрів скорочувальної активності вісцеральних ГМ вибраними

нанорозмірними матеріалами (наночастинками TiO_2 та калікс[4]аренами C-90, C-99, C-107 і C-716) в умовах їх колоткочасової дії на препарати м'язів (*in vitro*) та тривалого перебування в організмі (*in vivo*).

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

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі вперше проведено комплексне дослідження кінетичних і термодинамічних властивостей вісцеральних ГМ в умовах дії на них окремих нанорозмірних матеріалів (наночастинок TiO_2 , а також калікс[4]аренів – інгібіторів

первинного активного іонного транспорту ПМ). Було вперше встановлено термодинамічні закономірності високоеластичної деформації ГМ ШКТ щурів, визначено залежності термодинамічних показників від ступеня деформації.

Вперше досліджено закономірності та механізми дії на вісцеральні ГМ щурів нанорозмірного матеріалу TiO_2 трьох розмірних груп, які містять різні співвідношення сумішей поліморфів рутилу і анатазу. Встановлено, що нано- TiO_2 є ефективним модулятором спонтанної і викликанної скорочувальної активності ГМ ШКТ і міометрія. Зокрема, вперше виявлено, що TiO_2 модулює пресинаптичні і постсинаптичні механізми регуляції скорочення ГМ шлунку за участі ацетилхолінових, гістамінових, а також ГАМК-рецепторів. Встановлено, що блокування роботи дихального ланцюга мітохондрій усуває ефекти TiO_2 на ацетилхолін-викликані скорочення ГМ ШКТ. У міометрії TiO_2 усуває ефекти блокування АТФ-чутливих K^+ -каналів. Дослідженнями *in silico* встановлено, що нанорозмірний матеріал TiO_2 здатний взаємодіяти з різною спорідненістю із сайтами позаклітинної частини метаботропних рецепторів. Вперше термодинамічним аналізом показано, що в умовах тривалого впливу *in vivo* TiO_2 спричиняє суттєві зміни процесів високоеластичної деформації у ГМ шлунку.

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

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

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

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

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

Особистий внесок здобувача. Здобувач є автором усіх наукових ідей,

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

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень та основні положення, які включені до дисертації, були представлені на: XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства (Львів, 2015); IV, VI, V та VII з'їздах Українського біофізичного товариства (Донецьк, 2006; Луцьк, 2009; Луцьк 2011; Луцьк; 2015; Київ; 2018); IX, X, XI Українському біохімічному з'їздах (Харків, 2006; Одеса, 2010; Київ; 2014); III і XI Міжнародних науково-практичних конференціях «Молодь та поступ в біології» (Львів, 2007, 2015, 2019); V Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна. Сучасний стан науки: досягнення, проблеми та перспективи розвитку» (Київ, 2007); Vth International Symposium «Supramolecular Systems in Chemistry and Biology» (Київ, 2009); Міжнародних науково-практичних конференціях «Біологічно активні речовини» (Новий Світ, 2011; Новий Світ, 2013) та «Адаптационные стратегии живых систем» (Новий Світ, 2012); III та IV International Symposium: Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design (Pushchino, 2010; Pushchino, 2012); Advances in Pharmacology and Pathology of the Digestive Tract – 2012 (4th International Scientific Conference) (Kyiv, 2012); IV, V і VI міжнародних конференціях «Медична фізика – сучасний стан,

проблеми, шляхи розвитку. Новітні технології» (Київ, 2014, 2015); IV, V і VI Міжнародних науково-практичних конференцій «Нанотехнології та наноматеріали» (Львів, 2016; Чернівці, 2017; Київ, 2018); XV International scientific conference for students and PhD students. «Youth and progress of biology», dedicated to the 135th anniversary of J. O. Parnas (Львів, 2019), а також на щорічних звітних конференціях Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка (2013-2018 рр.), на наукових семінарах Інституту високих технологій (2014 і 2019 рр.) та на науковому семінарі ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у червні 2019 р.

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

Структура і обсяг дисертації. Дисертація включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їхнього обговорення (7 розділів), узагальнення, висновків та списку використаних джерел з 651 найменування. Робота викладена на 449 сторінках (основна частина на 284 сторінках), ілюстрована 125 рисунками і 14 таблицями.

Висновок біоетичної експертизи. Згідно з висновком комісії з питань біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 3 від 2 травня 2019 р.) експериментальні дослідження дисертаційної роботи не суперечать загально прийнятим біоетичним нормам та здійснені з дотриманням відповідних міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт та клінічних досліджень. Експерименти у повній мірі проведені у відповідності до Гельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986),

Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по біоетиці та правах людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою у 1997 році у м. Ов'єдо (Іспанія) та підписаною Верховною Радою України у 2002 році, Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [38-43].

ЗМІСТ

ЗМІСТ.....	27
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	35
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	37
1.1 Гладенькі м'язи як складна рецепторна тензоелектрохімічна система: систематика та структурно-функціональні аспекти функціонування гладеньких м'язів.....	37
1.1.1. Структурно-функціональні характеристики гладеньком'язової стінки шлунково-кишкового тракту.....	37
1.1.2. Механізм генерації пейсмейкерних повільних хвиль деполяризації у гладеньких м'язах стінки травного тракту.....	41
1.1.3. Структурно-функціональні характеристики міометрія.....	44
1.2 Біофізичні та біохімічні основи регуляції концентрації іонів Ca^{2+} і Na^+ у клітинах вісцеральних гладеньких м'язів.....	47
1.2.1. Ca^{2+} - і Na^+ -транспортуючі системи плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин.....	47
1.2.2. Спряжені з мускариновими рецепторами катіонні канали та термочутливі TRP-канали.....	48
1.2.3. Системи первинного активного транспорту іонів Ca^{2+} і Na^+ плазматичної мембрани (Ca^{2+} -помпа та Na^+ , K^+ -АТФ-аза).....	51
1.2.3.1. Na^+ , K^+ -АТФ-аза.....	51
1.2.3.2. Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани.....	59
1.2.4. Процеси електро- та фармакомеханічного спряження у гладеньких м'язах.....	71
1.3 Каліксарени як супрамолекулярні наноефектори біофізичних і біохімічних процесів.....	74
1.4 Нанорозмірний матеріал TiO_2 : фізико-хімічні властивості та біологічні ефекти.....	77
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	85

2.1 Об'єкт і предмет досліджень.....	85
2.2 Тензометричні експерименти.....	86
2.2.1 Розчини для тензометричних експериментів.....	86
2.2.2 Вивчення скорочувальної активності багатоклітинних препаратів вісцеральних гладеньких м'язів.....	86
2.2.3 Дослідження термодинаміки вискоеластичної деформації гладеньких м'язів.....	90
2.3 Модель пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази в умовах хронічної дії на організм <i>in vivo</i>	92
2.4 Модель навантаження щурів нанорозмірним матеріалом TiO_2 в умовах тривалої і субхронічної дії на організм <i>in vivo</i>	93
2.5 Препаративні процедури.....	94
2.6 Визначення АТФ-гідролазних активностей	96
2.7 Визначення середнього розміру наночастинок методом електронної мікроскопії.....	97
2.8 Визначення дзета-потенціалу наночастинок діоксиду титану.....	98
2.9 Визначення елементного складу тканин методом атомно-емісійної спектрометрії.....	98
2.10 Аналіз кінетичних параметрів спонтанної скоротливої активності гладеньких м'язів.....	99
2.11 Механокінетичний аналіз процесів скорочення та розслаблення гладеньких м'язів.....	100
2.12 Комп'ютерне моделювання взаємодії наноматеріалів TiO_2 з метаботропними рецепторами.....	103
2.13 Статистична обробка результатів.....	104
 РОЗДІЛ 3. КІНЕТИЧНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ ПРОЦЕСІВ СКОРОЧЕННЯ ТА РОЗСЛАБЛЕННЯ ВІСЦЕРАЛЬНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ.....	 105

3.1 Кінетичні закономірності скорочення-розслаблення гладеньких м'язів товстого кишечника.....	105
3.1.1 Аналіз спонтанних скорочень	105
3.1.2 Аналіз викликаних скорочень	108
3.2 Кінетичні закономірності спонтанних і викликаних скорочень гладеньких м'язів шлунку.....	111
3.2.1 Аналіз спонтанних скорочень.....	111
3.2.2 Аналіз викликаних скорочень.....	112
3.3 Кінетичні закономірності скорочення-розслаблення поздовжніх гладеньких м'язів міометрія: спонтанні і викликані скорочення.....	114
3.3.1 Аналіз спонтанних скорочень.....	114
3.3.2 Аналіз викликаних скорочень.....	115
3.4 Модуляція фізико-хімічними та метаболічними факторами механокінетики скорочення-розслаблення вісцеральних гладеньких м'язів.....	116
3.4.1. Вивчення ролі іонів Na^+ в реалізації процесів скорочення-розслаблення вісцеральних гладеньких м'язів.....	117
3.4.2. Встановлення закономірностей модуляції скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів іонами Mg^{2+}	118
3.4.3. Кінетика суперпреципітації скорочувальних білків.....	127
3.4.4. Кінетичний аналіз процесів скорочення-розслаблення гладеньких м'язів в умовах блокування Ca^{2+} -каналів.....	129
3.4.5. Вивчення температурної чутливості механокінетики викликаних скорочень інтестинальних гладеньких м'язів.....	131
3.4.6. Кінетичний та фармакокінетичний аналіз дії інгібіторів	

брадикінінових рецепторів на гладенькі м'язи.....	133
РОЗДІЛ 4. ТЕРМОДИНАМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ	
ВИСОКОЕЛАСТИЧНОЇ ДЕФОРМАЦІЇ ВІСЦЕРАЛЬНИХ	
ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ.....	
140	
4.1 Механокінетика високоеластичної деформації гладеньких м'язів	
травного тракту за фізіологічної температури.....	140
4.1.1 Механічні властивості гладеньких м'язів травного тракту. Криві	
деформація-навантаження, зареєстровані в режимі сталого	
навантаження.....	142
4.1.2 Високоеластична деформація гладеньких м'язів за різних умов	
навантаження. Ізотерми високоеластичної деформації.....	145
4.1.3 Гістерезисні кінетичні ефекти у випадку поодинокого	
навантаження і розвантаження м'язів за фізіологічної температури.....	147
4.1.4 Гістерезисні кінетичні ефекти при градуйованих навантаженнях і	
розвантаженнях гладеньких м'язів за фізіологічної температури.....	147
4.2 Термомеханокінетика високоеластичної деформації гладеньких	
м'язів травного тракту: гістерезис у випадку градуйованих	
навантажень-розвантажень при різних температурах.....	155
4.3 Робота з високоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунку	160
4.4 Застосування рівняння Віганда-Снайдера до термодинамічної	
інтерпретації високоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунку...	167
РОЗДІЛ 5. ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОМЕХАНІЧНИХ ЕФЕКТІВ ТА	
МЕХАНІЗМІВ ДІЇ НАНОРОЗМІРНОГО МАТЕРІАЛУ ДІОКСИДУ	
ТИТАНУ НА ВІСЦЕРАЛЬНІ ГЛАДЕНЬКІ М'ЯЗИ В УМОВАХ <i>IN</i>	
<i>VITRO</i>	
175	
5.1 Спонтанна скорочувальна активність вісцеральних гладеньких м'язів	
в умовах дії <i>in vitro</i> наночастинок TiO_2 різного розміру.....	176
5.2 Вплив наноматеріалу TiO_2 різного розміру на механокінетичні	
параметри викликаних скорочень вісцеральних гладеньких м'язів за	

умов впливу <i>in vitro</i>	188
5.2.1. Ацетилхолін-викликані скорочення за дії наночастинок TiO_2 різного розміру в умовах <i>in vitro</i>	189
5.2.1.1. Кумулятивна дія TiO_2	189
5.2.1.2. Некумулятивна дія підвищених концентрацій TiO_2	194
5.2.2. Індуковані K^+ -деполяризацією плазматичної мембрани ГМК скорочення за дії нанорозмірного матеріалу TiO_2 різного розміру в умовах <i>in vitro</i>	195
5.2.2.1. Кумулятивна дія TiO_2	195
5.2.2.2. Некумулятивна дія підвищених концентрацій TiO_2	199
5.3 Встановлення механізмів дії наночастинок TiO_2 на вісцеральні гладенькі м'язи в умовах <i>in vitro</i>	200
5.3.1 Вивчення функціонування внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо в умовах дії наночастинок TiO_2	200
5.3.2 Вивчення потенціалкерowanego входу іонів Ca^{2+} через плазматичну мембрану в умовах дії наночастинок TiO_2	201
5.3.3 Вивчення ефективності активації мускаринових холінорецепторів ендogenous ацетилхоліном в умовах дії наночастинок TiO_2	202
5.3.4 Вивчення ефективності неадренергічного нехолінергічного розслаблення в умовах дії наночастинок TiO_2	204
5.3.4.1. Оксид азоту.....	204
5.3.4.2. Пуринергічне гальмування.....	206
5.3.5 Вивчення ефективності пресинаптичної модуляції процесів збудження та гальмування гладеньких м'язів за дії наночастинок TiO_2	208
5.3.6 Вивчення АТФ-залежної K^+ провідності плазматичної і мітохондріальної мембран гладеньких м'язів за дії наночастинок TiO_2	216
5.4 Молекулярний докінг нано- TiO_2 з метаботропними рецепторами.....	218

РОЗДІЛ 6. ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОМЕХАНІЧНИХ ЕФЕКТІВ

НАНОРОЗМІРНОГО МАТЕРІАЛУ ДІОКСИДУ ТИТАНУ НА ВІСЦЕРАЛЬНІ ГЛАДЕНЬКІ М'ЯЗИ ПРИ ЙОГО ТРИВАЛОМУ ВВЕДЕННІ В ОРГАНІЗМ.....	227
6.1. Встановлення закономірностей накопичення наночастинок TiO_2 в організмі щурів за дії <i>in vivo</i>	228
6.2. Модуляція термодинамічних параметрів вискоеластичної деформації кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів за дії TiO_2 в умовах <i>in vivo</i>	230
6.3. Спонтанна скорочувальна активність вісцеральних гладеньких м'язів щурів в умовах різної тривалості дії <i>in vivo</i> наночастинок TiO_2	234
6.4. Викликана скорочувальна активність вісцеральних гладеньких м'язів щурів в умовах різної тривалості дії <i>in vivo</i> наночастинок TiO_2	241
РОЗДІЛ 7 МЕХАНІЗМИ МОДУЛЯЦІЇ КАЛІКС[4]АРЕНАМИ- ІНГІБІТОРАМИ НАТРІЄВОЇ ПОМПИ ФУНКЦІОНУВАННЯ ВІСЦЕРАЛЬНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ В УМОВАХ <i>IN VITRO</i>	252
7.1. Вивчення закономірностей впливу каліксаренів-модуляторів Na^+, K^+ - АТФ-ази плазматичної мембрани на скорочувальну активність міометрія	254
7.1.1. Спонтанна скорочувальна активність міометрія при блокуванні натрієвої помпи	254
7.1.2. Викликані скорочення міометрія при блокуванні натрієвої помпи.....	258
7.2. Вивчення закономірностей та механізмів впливу каліксаренів- модуляторів натрієвої помпи на гладенькі м'язи товстого кишечника в умовах <i>in vitro</i>	262
7.2.1. Спонтанна скорочувальна активність гладеньких м'язів.....	262
7.2.2. Викликані скорочення гладеньких м'язів <i>caecum</i> в умовах <i>in vitro</i> блокування натрієвої помпи (уабаїном та каліксаренами С-99 і С-107)....	269
7.2.3. Закономірності мобілізації іонів Ca^{2+} з внутрішньоклітинних Ca^{2+} - депо в кільцевих гладеньких м'язах товстого кишечника за дії	283

каліксарену С-99.....

РОЗДІЛ 8 ЗАКОНОМІРНОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ВІСЦЕРАЛЬНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ В УМОВАХ ХРОНІЧНОГО ІНГІБУВАННЯ

NA⁺,K⁺-АТФ-АЗИ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ..... 288

8.1. Порівняльне вивчення в дослідях *in vitro* та *in vivo* впливу убаїну, каліксарену С-107 та фрагменту М-3 на активність Na⁺,K⁺-АТФ-ази плазматичної мембрани..... 288

8.1.1. Дослідження *in vitro*..... 288

8.1.2. Дослідження *in vivo*..... 290

8.2. Порівняльне вивчення в дослідях *in vivo* впливу убаїну, каліксарену С-107 та фрагменту М-3 на скорочувальну активність гладеньких м'язів товстого кишечника..... 296

РОЗДІЛ 9. ВИВЧЕННЯ ЗАКОНОМІРНОСТЕЙ ТА ВСТАНОВЛЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ДІЇ КАЛІКСАРЕНІВ-МОДУЛЯТОРІВ КАЛЬЦІЄВОЇ ПОМПИ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ НА ВІСЦЕРАЛЬНІ ГЛАДЕНЬКІ М'ЯЗИ..... 300

9.1. Вплив каліксарену С-90 на спонтанну скорочувальну активність гладеньких м'язів міометрія..... 303

9.2. Встановлення механізмів впливу каліксарену С-90 на гладенькі м'язи міометрія..... 308

9.2.1. Аналіз спонтанної скорочувальної активності гладеньких м'язів міометрія в присутності каліксарену С-90..... 308

9.2.2. Аналіз участі NO в ефектах каліксарену С-90 на спонтанну скорочувальну активність гладеньких м'язів міометрія..... 312

9.2.3. Аналіз викликаних K⁺-деполяризацією і окситоцином скорочень гладеньких м'язів міометрія у присутності каліксарену С-90..... 318

9.2.4. Закономірності впливу каліксарену С-90 на викликані скорочення..... 321

гладеньких м'язів міометрія щурів в умовах блокування NO-синтаз.....

9.3. Викликана скорочувальна гладеньких м'язів міометрія в умовах дії каліксарену C-716: встановлення закономірностей та механізмів модуляції процесу розслаблення.....	322
РОЗДІЛ 10. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	
ДОСЛІДЖЕНЬ.....	331
ВИСНОВКИ.....	370
СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	374

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТФ	- аденозинтрифосфорна кислота
АФК	- активні форми кисню
ВК	- брадикінін
ГАМК	- γ -аміномасляна кислота
ГМ	- гладенький м'яз
ГМК	- гладеньком'язова клітина
ДАГ	- діацилгліцерол
ДМСО	- диметилсульфоксид
ІТФ	- інозитол-1,4,5-трифосфат
КЛЛМ	- кіназа легких ланцюгів міозину
КІВК	- Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+}
КТС	- кардіотонічні стероїди
ЛЛ ₂₀ , РЛЛМ	- регуляторні легкі ланцюги молекули міозину
НПН	- нітропрусид натрію
НЧ	- наночастинка
ПМКА	- Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани
ПКК	- потенціалкеровані канали
СР	- саркоплазматичний ретикулум
СРКА	- кальцієва помпа саркоплазматичного ретикулуму
ФІФ	- фосфатидилінозитолдифосфат
ФЛЛМ	- фосфатаза легких ланцюгів міозину
цАМФ	- циклічний аденозинмонофосфат
ШКТ	- шлунково-кишковий тракт

CCCP	- carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CCE	- capacitative Ca^{2+} entry (ємнісний вхід іонів Ca^{2+})
SOC	- депо-керований канал (store-operated channel)
ICC	- interstitial cell of Cajal (інтерстиціальна клітина Кахаля)
ICC-MY	- ICC в Ауербаховому сплетенні
ICC-SM	- ICC в Мейснеровому сплетенні
DHP	- dihydropyridine (дигідропіридин)
5- HD	- 5-гідроксидеканоат
L-NAME	- N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester
NCX	- sodium-calcium exchanger ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник)
NO	- оксид азоту
NOS	- синтаза оксиду азоту
NSCC	- non-selective cationic channel (неселективний катіонний канал)
ROC	- receptor-operated channel (рецептор-керований канал)
ROK	- RhoA/Rho-асоційована кінза
RyR	- ryanodine receptor (ріанодиновий рецептор)
TG	- тапсигаргін
TiO ₂	- діоксид титану
TRP-канал	- Transient Receptor Potential channel (канал транз'єнтного рецепторного потенціалу)
SERCA	- sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (Ca^{2+} -помпа сарко/ендоплазматичного ретикулуму)

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Гладенькі м'язи як складна рецепторна тензоелектрохімічна система: систематика та структурно-функціональні аспекти функціонування гладеньких м'язів

Гладеньком'язова тканина складає структурно-функціональну основу багатьох порожнистих органів та систем, зокрема травного тракту, серцево-судинної та сечостатевої системи, дихальних шляхів [44-47]. За традиційною класифікацією ГМ поділяють на два типи: фазні та тонічні [48]. До тонічних м'язів належать ГМ стінок кровоносних судин та дихальних шляхів; їх функція полягає у підтриманні певного діаметру стінок порожнини. До фазних м'язів належать, зокрема ГМ стінок шлунково-кишкового тракту, матки, сечового міхура і сечоточників; вони здатні генерувати фазні скорочення. Гістологічні і метаболічні особливості гладеньком'язового шару тих чи інших органів у значній мірі визначаються розташуванням та функцією, які для нього характерні [49-52].

1.1.1. Структурно-функціональні характеристики гладеньком'язової стінки шлунково-кишкового тракту.

М'язові стінки порожнистих органів ШКТ мають складну структуру, яка об'єднує принаймні два шари ГМ: зовні розташовується шар поздовжніх м'язів, а всередині – кільцевих [53-55]. В окремих випадках, зокрема у шлунку, між ними міститься середній гладеньком'язовий шар із косим спрямуванням клітин. Зовні кільцеві ГМ оточені шаром підслизової оболонки, над якою розташовується слизова оболонка, звернута у простір травного каналу. Між кільцевим і поздовжнім гладеньком'язовими шарами міститься шар нервових клітин міоентерального нервового плетива (ентеральна нервова система) [54-56].

Гладеньком'язова тканина крім «робочих» скорочувальних гладеньком'язових клітин (ГМК) містить у своїй структурі нейрони, пейсмейкерні інтестинальні клітини, фібробласти, макрофаги та мастоцити (Рис. 1.1).

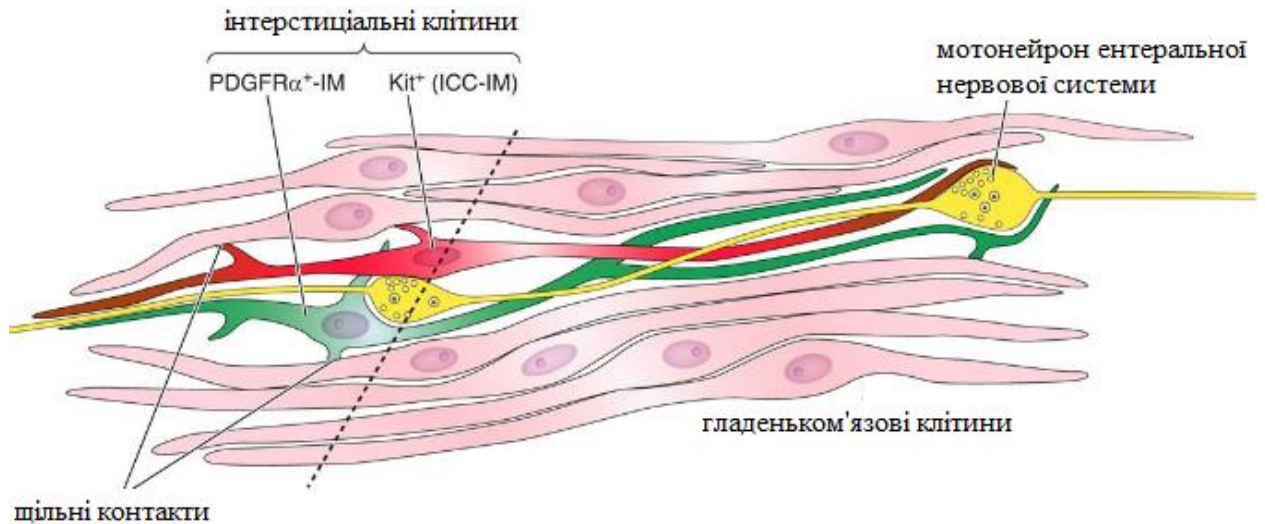


Рис. 1.1. Структура електричного синцитію (SIP-синцитію) гладеньком'язової стінки шлунково-кишкового тракту. Позначення: PDGFRα⁺-IM – внутрішньом'язові інтерстиціальні (PDGFRα-позитивні) PDGFRα⁺-клітини; Kit⁺ (ICC-IM) – внутрішньом'язові інтерстиціальні (Kit-позитивні) клітини Кахалю. Адаптовано за [54].

Важливим чинником регуляції функціонування м'язових стінок ШКТ є інтерстиціальні клітини Кахалю (interstitial cells of Cajal - ICC) – специфічні, не здатні до скорочення клітини, які функціонують як пейсмейкери і передавачі-модулятори сигналів з інтрамуральних нейронів на «робочі» ГМК [54]. Головною відмінністю від інших клітин м'язової стінки клітин Кахалю є здатність експресувати мембранні рецептори з тирозинкіназною активністю c-Kit (визначаються методами імуногістохімії). Морфологічно ICC характеризуються різною формою (від біполярної до зірчатої), мають відносно щільну цитоплазму, темне витягнуте ядро, численні мітохондрії і кавеоли, добре розвинений ендоплазматичний ретикулум та вільні рибосоми. ICC контактують між собою формуючи мережі чотирьох можливих

локалізації у гладеньком'язовій стінці; також за допомогою щільних контактів ICC взаємодіють з сусідніми ГМК [57, 58].

Ідентифіковано ряд популяцій ICC, які відрізняються за розташуванням і параметрами пейсмейкерної активності (Рис. 1.2). По-перше, це зірчасті ICC міоентерального (Ауербахового) нервового плетива (ICC-MP або ICC-MY - myenteric plexus, або ICC-AP - Auerbach's plexus), які розташовуються поряд з міоентеральними гангліями між гладеньком'язовими шарами. По-друге, біполярні ІКК розташовані усередині м'язових шарів (ICC-IM, intramuscular); іноді їх поділяють на ICC кільцевих (circular muscle - ICC-CM) та поздовжніх(longitudinal muscle - ICC-LM) м'язів, хоча морфологічно і функціонально вони однакові. Обидва ці типи ICC характерні для стінки шлунка і тонкого кишечника. Специфічними для тонкого кишечника є біполярні ІКК, розміщені під кільцевим шаром ГМК (deep muscular plexus – ICC-DMP). Під кільцевим шаром м'язів товстого кишечника і шлунка розташовуються ICC, що контактують з підслизовим шаром (submucosa – ICC-SM) [57-62].

ICC виконують роль пейсмейкерів – водіїв ритму гладеньком'язової стінки шлунка і кишечника. Вони генерують повільні хвилі деполяризації (осциляції мембранного потенціалу на 10-60 мВ відносно базального рівня спокою) з певною, залежною від типу клітин внутрішньою частотою. Наприклад, як показано на гладеньком'язовій тканині ШКТ собаки, товстий кишечник має два джерела пейсмейкерної активності: ICC-MY генерують низькоамплітудний ритм 17 скорочень/хв. та ICC-SM генерують високоамплітудний ритм 6 скорочень/хв. [60].

Окремі частини ШКТ відрізняються між собою за популяціями ICC та за пейсмейкерною активністю. Також спостерігаються видові відмінності популяцій ICC. Для гризунів маємо наступний склад пейсмейкерів [63]: у стравоході ідентифіковані тільки ICC-IM; у тонкому кишечнику водіями ритму виступають ICC-MY і ICC-DMP; у стінці шлунка генераторами ритму є: ICC-SM, також у всіх частинах крім фундальної - ICC-MY (далі збудження

передається на поздовжній і кільцевий шари ГМ); у товстому кишечнику ритмоактивність генерують ICC-IM, ICC-MY і ICC-SM.

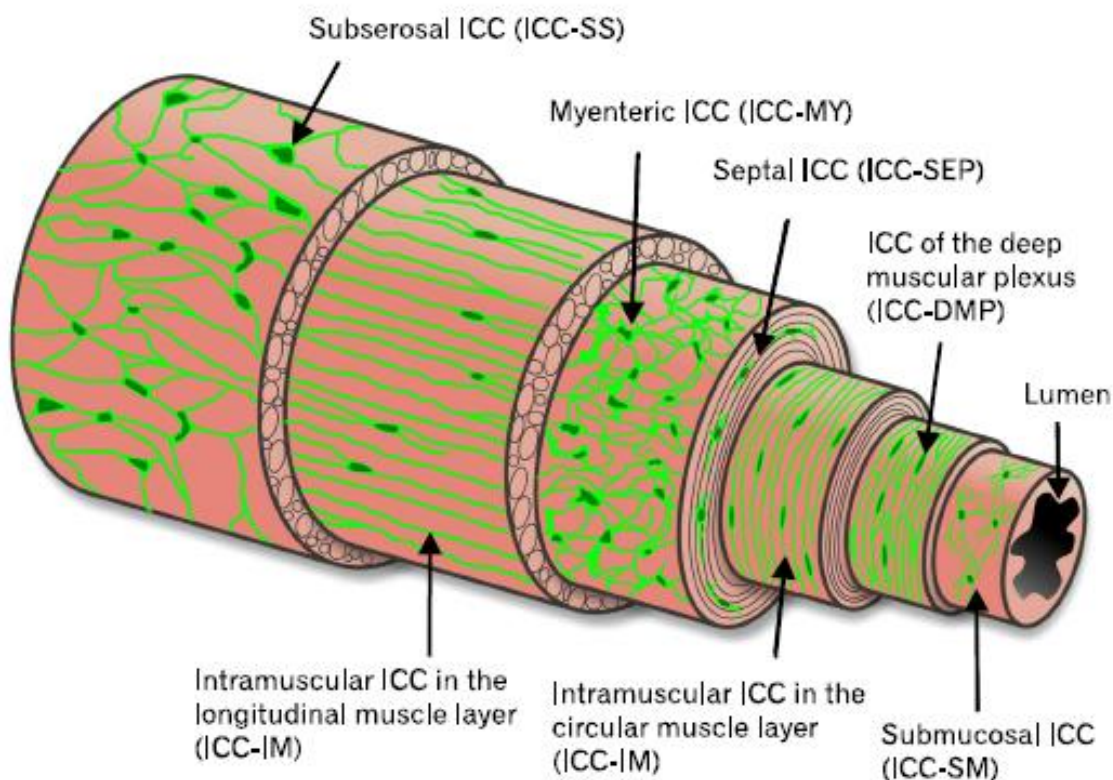


Рис. 1.2. Розташування субпопуляцій інтерстиціальних клітин Кахаля у гладеньком'язовій стінці шлунково-кишкового тракту [57].

Стінки травного тракту людини характеризуються наступним розташуванням популяцій ICC: у стравоході ідентифіковано: ICC-IM та ICC-SM; стінки антрального відділу шлунка містять: ICC-IM, ICC-MY і ICC-SM, а у інших відділах – відсутні ICC-MY. У тонкому кишечнику людини є ICC-IM і ICC-MY, але популяція ICC-DMP є дифузною, нестійкою. Кільцеві м'язи товстого кишечника містять добре розвинену мережу ICC-IM; у поздовжньому шарі вони охоплюють клітини інтрамуральних гангліїв Ауербахового сплетення. Також у товстому кишечнику людини присутні ICC-MY і ICC-SM [63-67].

У останнє десятиріччя було відкрито ще один клас інтерстиціальних клітин, які отримали назву «фібробластоподібні клітини» (fibroblast-like cells) [68, 69]. Ці клітини специфічно визначаються антитілами до рецептора фактора росту PDGFR α , не мають кавеол, а їх цитоплазма менш

оптично щільна порівняно з ICC. Як і ICC, PDGFR α ⁺- клітини формують електричні зв'язки з ГМК, утворюючи таким чином мультиклітинний електричний синцитій (smooth muscle cell/ICC/PDGFR α ⁺-cell (SIP), див. рис. 1.1) [54]. ICC, на відміну від PDGFR α ⁺- клітин розташовуються у безпосередній близькості (<20 нм) від синаптичних потовщень інтрамуральних нейронів.

PDGFR α ⁺-клітини поділяють на дві популяції залежно від їх розташування у м'язовій стінці. По-перше, це внутрішньом'язові PDGFR α ⁺-ІМ (розташовуються усередині шарів ГМК), та, по-друге, PDGFR α ⁺-МҀ-містяться у міжм'язовому Ауербаховому сплетенні [68, 69].

Повної картини функції фібробластоподібних клітин у SIP на тепер не існує. Однак, відомі окремі ланки участі цих клітин у підтриманні збудливості гладеньких м'язів. Так, за сукупністю даних щодо експресії апамін-чутливих Ca²⁺-залежних K⁺-каналів малої провідності і генерації інгібіторних постсинаптичних потенціалів на аплікування пуринових агоністів [63] передбачається, що вони є головними у пуринергічній нейротрансмісії.

1.1.2. Механізм генерації пейсмейкерних повільних хвиль деполяризації у гладеньких м'язах стінки травного тракту

Спонтанна пейсмейкерна активність ICC призводить до підвищення ймовірності відкривання Ca²⁺-каналів, що спричиняє їх активацію, вхід іонів Ca²⁺ з позаклітинного простору та активацію скорочення (спряження збудження та скорочення) [70, 71].

Іонні механізми генерації повільних хвиль деполяризації дотепер повністю не з'ясовані. Експериментами на культурі клітин та ізольованих ICC доведено, що внесок мають: ендоплазматичний ретикулум (ймовірно джерело ініціації повільної хвилі), Ca²⁺-активовані Cl⁻-канали (фаза плато повільних хвиль), Ca²⁺-канали Т-типу (поширення повільних хвиль). Варто відзначити, що саме Ca²⁺-активовані Cl⁻-канали (їх позначають як Anoctamin

1 або ANO1) є головними протеїнами, що визначають пейсмейкernу активність ICC, а їх структурно-функціональні порушення супроводжуються розвитком патологій скоротливості м'язів ШКТ, зокрема діабетичних гастропарезів [72-75].

Ймовірним механізмом запуску і поширення повільної хвилі деполяризації є наступні етапи [54]. Перша фаза генерації: стохастичний вихід Ca^{2+} з CP через ІТФ-чутливі Ca^{2+} -канали → активація Ca^{2+} -активованих Cl^- -каналів та виток іонів Cl^- → генерація spontaneous transient inward currents (STICs) → деполяризація плазматичної мембрани (spontaneous transient depolarizations - STDs); активація Ca^{2+} -помпи CP (CPKA) і повернення Ca^{2+} в CP → Друга фаза генерації: внаслідок STICs активація низькопорогових потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів (Т-типу) → синхронізація входу Ca^{2+} через різні ділянки плазматичної мембрани ICC → синхронізоване відкриття ANO1 → генерація повільної хвилі деполяризації → передавання хвилі деполяризації через електричні контакти на сусідні ICC клітини і ГМК → активація високопорогових Ca^{2+} -каналів (L-типу) → активація процесу спряження збудження-скорочення у ГМК → Третя фаза генерації: зв'язування хронотропних нейромедіаторів (перш за все, ацетилхоліну) з рецепторами (перш за все, M_3 -типу) → активація $\text{G}_{q/11}$ -білків → активація синтезу ІТФ фосфоліпазою $\text{C}\beta$ → активація ІТФ-чутливих Ca^{2+} -каналів CP → збільшення частоти і амплітуди STICs → підвищення амплітуди повільних хвиль деполяризації.

Для підтримання здатності генерувати повільні хвилі деполяризації необхідно постійно і вчасно відновлювати іонні трансмембранні градієнти, що забезпечується системами енергозалежного іонного транспорту, перш за все – Na^+ , K^+ -АТФ-азою (натрієвою помпою) ПМ та Ca^{2+} -АТФ-азами (кальцієвими помпами) плазматичної мембрани і CP [54, 76, 77]. Забезпечення безперебійної роботи цих систем потребує ефективного синтезу АТФ мітохондріями. Тому ці органели в ICC містяться у значній кількості. Варто відзначити, що у пейсмейкерних клітинах плазматична

мембрана, ендоплазматичний ретикулум і мітохондрії розташовуються у безпосередній близькості одна від одної, таким чином забезпечуючи оптимальну структурно-функціональну основу для генерації повільних хвиль деполяризації; тому разом ці три клітинні компоненти називають «пейсмейкерною одиницею» [54, 74, 78].

1.1.3. Структурно-функціональні характеристики міометрії

Гладеньком'язовий шар матки (міометрій), як і у випадку інших вісцеральних ГМ, є функціональним синцитієм. Міометрій людини і гризунів складається з двох шарів: поздовжнього і кільцевого [79]. ГМК організовані в пучки, які в свою чергу об'єднуються в крупніші конгломерати-пучки (*fasciculata*). Крім гомогенних «робочих» ГМК, міометрій містить подібні до ІСС клітини – телоцити [80, 81]. Ці клітини мають невелику сому і від 1 до 5 довгих виростів – телоподій, збагачених мітохондріями, ендоплазматичним ретикулумом та зі значною кількістю кавеол у плазматичній мембрані. Телоцити і ГМК пов'язані між собою щільними контактами. Дослідженнями останніх років показано присутність в тканині міометрія ІСС-подібних клітин, які експресують тирозинкіназу c-Kit [82].

Дослідженнями міометрія людини мікроелектродними методами показано, що ці м'язи генерують повільні хвилі деполяризації – плато-потенціали амплітудою -30 мВ (мембранний потенціал спокою становить близько -50 мВ) і тривалістю 30-40 с. Оскільки ці потенціали є стабільними у часі, вони, ймовірно не обумовлюються іонами Na^+ і K^+ , а оскільки потенціал реверсії струму Cl^- становить близько -30 мВ, припускають, що саме іони хлору відіграють ключову роль у підтриманні хвиль деполяризації [83].

Молекулярні механізми активації пейсмейкерних струмів у міоцитах матки натепер не в повній мірі вивчені, хоча загальні закономірності етапів спряження збудження-скорочення в цих м'язах відомі. На відміну від пейсмейкерного механізму у ГМ ШКТ, джерелом генерації повільних хвиль деполяризації в міометрії є ГМК. Міоцити в пучках тісно поєднані

метаболічно і електрично за допомогою щільних контактів, через які вільно проходять сигнальні молекули, зокрема ІТФ (для таких пучків міоцитів характерна рівноважна концентрація ІТФ) [83].

М. Беррідж систематизував актуальні уявлення про генерацію хвиль збудження вагітною маткою [58]. Тут спрацьовує механізм, який отримав назву «ендогенний мембранний осцилятор». Повільні хвилі деполяризації, які спричиняють генерування потенціали дії та розвиток скорочувальних відповідей, є результатом сукупної активації іонних каналів і транспортерів. По-перше, внесок у вхідний деполяризуючий струм мембранного осцилятора роблять керовані спустошенням депо Ca^{2+} -канали (store-operated Ca^{2+} channel – SOC). Так, головний утеротонічний гормон окситоцин (його дія супроводжується підвищенням сили і головне – частоти спонтанних скорочень міометрія) спричиняє ІТФ-кероване вивільнення Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулума, яке, у свою чергу, активує SOC. Далі процес розвивається аналогічно до пейсмейкерних клітин ШКТ: вхід Ca^{2+} через SOC активує Ca^{2+} -активовані Cl^- -канали, а вихідний Cl^- струм спричиняє деполяризацію плазматичної мембрани міоцитів [84]. Коли деполяризація досягає порогового рівня, відбувається відкривання Ca^{2+} -каналів, вхід Ca^{2+} та активацію скорочувальних білків. По-друге, у ГМК міометрія експресуються низькопорогові Ca^{2+} -канали ($\text{Ca}_v3.1$), які є конститутивною структурою «класичних» пейсмейкерних клітин у інших ГМ [85].

Фаза реполяризації потенціалу дії в ГМК міометрія обумовлюється сукупною роботою іншої функціональної частини мембранного осцилятора: Ca^{2+} -активованих K^+ -каналів великої і малої провідності (Ca^{2+} -sensitive BK&SK channels), Na^+ , K^+ -АТРази і Na^+ , Ca^{2+} -обмінника [85-88].

На відміну від тіла матки, де кожна ГМК має здатність до пейсмейкерної активності, маткові труби містять ділянки з джерелами спонтанної активності в цервікальному і оваріальному відділах. Як показано науковою групою К.В. Казаряна і колег [89-91], головним джерелом ритму в

маткових трубах є оваріальний відділщо, ймовірно, забезпечує спрямовану перистальтику. Окситоцин сприяє реалізації домінуванню оваріального відділу та скоординованому функціонуванню всіх ритмогенних ділянок міометрія [91].

Окситоцин. Процеси спряження збудження і скорочення у вісцеральних ГМ умовно поділяються на дві ключові групи: електромеханічне спряження (сукупність потенціал-залежних процесів) і фармакомеханічне спряження (сукупність процесів, які не залежать від змін мембранного потенціалу) [92-95].

Міометрій належить до фазних ГМ та здатний генерувати спонтанні скорочення, які мають ендогенне (міогенне) походження та лише модулюються, але не визначаються гормонами і нейромедіаторами. Тканина міометрія, на відміну від наприклад ГМ ШКТ, не містить с-kit експресуючих інтерстиціальних клітин Кахаля (ICC). Проте дослідженнями наукової групи під керівництвом С. Рей [86, 87, 96] у тканині міометрія доведено наявність ICC-подібних клітин та встановлено їх функціональне значення. Як і ICC в тканині гладеньких м'язів ШКТ, ICC-подібні клітини у міометрії опосередковують зміни частоти спонтанних скорочень, тоді як робочі міоцити в обох тканинах визначають їх амплітуду. На клітинах первинної культури міоцитів міометрія людини та щурів показано, що спонанні Ca^{2+} -транз'єнти не зникають при внесенні безкальцієвого розчину, але повністю пригнічуються блокуванням Ca^{2+} -помпи тапсигаргіном. Це вказує на те, що головним джерелом іонів Ca^{2+} у спонтанних процесах збудження відіграє ІТФ-залежний вихід кальцію з СР [97-100].

Шляхами, які забезпечують збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} в міоцитах міометрія є їх надходження через іонні канали ПМ (потенціалкеровані, рецепторкеровані і керовані спустошенням депо) та вивільнення їх із внутрішньоклітинних депо [101-103]. Далі процес активації м'язового скорочення забезпечується за таким загальним шляхом: зв'язування іонів Ca^{2+} з кіназою легких ланцюгів міозину та її активація;

фосфорилування легких ланцюгів в молекулах міозину; активація актин-міозинової взаємодії; скорочення. Фосфатаза легких ланцюгів міозину зупиняє процес активації скорочувального апарату і спричиняє розслаблення.

Окситоцин – головний утеротонічний гормон, який регулює процеси збудження та рівень механічного напруження матки. Рецептори окситоцину належать до надродини метаботропних. Вони спряжені переважно з $G_{q/11}$ -рецепторами, головним ефекторним ферментом яких є фосфоліпаза C- β [103-108]. Цей фермент здійснює розщеплення фосфатидилінозитолдифосфату (ФІФ) з утворенням двох вторинних посередників — ІТФ та ДАГ. Обидві ці сполуки приймають участь у реалізації фізіологічної відповіді на окситоцин. Головний тип ІТФ-рецепторів у СР міометрія — ІТФР1 [109-111]; він характеризується дзвіноподібною залежністю від внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} : при малих концентраціях цей іон діє як співагоніст, при високих — як інгібітор.

Відомо три фізіологічні ефекти окситоцину в міометрії: по-перше, збільшення частоти спонтанних скорочень; по-друге, початкове транзйентне підвищення базального тону м'язів (неповне розслаблення); та, по-третє, тривале підвищення амплітуди і тривалості фазних скорочень [103, 112]. Цікаво, що тривале блокування наповнення СР (блокування Ca^{2+} -помпи протягом понад годину тапсигаргіном) усуває перші два з перерахованих ефектів але не має жодного впливу на третій. Окситоцин спричиняє ІТФ-залежне швидке транзйентне збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} , причому воно супроводжується практично повним спустошенням кальцієвого депо. Цей процес призводить до, по-перше, активації процесу керованого спустошення депо входу Ca^{2+} до клітини, та, по-друге, активації процесів відновлення концентрації Ca^{2+} у СР. Механізм окситоцин-індукованого збільшення частоти спонтанних скорочень у міометрії дотепер не з'ясований, але оскільки воно усувається тапсигаргіном, це свідчить про участь ІТФ-залежного виходу іонів Ca^{2+} з депо [113, 114].

Іншим шляхом, яким окситоцин активує скорочувальну функцію міометрія, є сенситизація білків скорочувального апарату. У цьому випадку чутливість до Ca^{2+} підвищується за рахунок пригнічення активності фосфатази легких ланцюгів міозину і таким чином ефективність дефосфорилування легких ланцюгів міозину. Також доведено [115, 116], що окситоцинові рецептори здатні частково активувати $\text{G}_{12/13}$ -білки і таким чином забезпечувати проведення активаційного сигналу на Rho-кіназу, яка фосфорилує регуляторні легкі ланцюги міозинових молекул, переводячи їх у активований стан. Варто підкреслити, що шлях активації скорочення через Rho-кіназу є Ca^{2+} -незалежним.

1.2. Біофізичні та біохімічні основи регуляції концентрації іонів Ca^{2+} і Na^+ у клітинах вісцеральних гладеньких м'язів

1.2.1. Ca^{2+} - і Na^+ -транспортуючі системи плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин

Головними шляхами, які забезпечують збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} у ГМК, зокрема травного тракту і міометрія, є їх надходження через іонні канали плазматичної мембрани та їх вивільнення із внутрішньоклітинних депо [52, 117-120].

Деполяризація ГМК, наприклад при використанні гіперкалієвого фізіологічного розчину, призводить до відкриття потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів та входу іонів Ca^{2+} до міоплазми. Це призводить до Ca^{2+} /кальмодулін-залежної активації кінази легких ланцюгів міозину (КЛЛМ) [121, 122]. Цей ензим фосфорилує легкі ланцюги (ML_{20}) молекул міозину, спричиняючи активацію їх ензиматичної активності.

У клітинах вісцеральних ГМ експресуються потенціалкеровані Ca^{2+} -канали L- та T-типів [123-125]. При активації збудження значна кількість іонів Ca^{2+} надходить до клітин через канали L-типу (від «long-lasting»), забезпечуючи стійке підвищення внутрішньоклітинної концентрації цих катіонів, що пов'язане з розвитком тонічного скорочення. Ці канали відкриті

при помірних рівнях деполяризації плазматичної мембрани (-40 - -20 мВ); вони характеризуються великою провідністю (8-25 pS) та специфічно чутливі до дигідропіридинів (dihydropyridine, DHP) – блокуються сполуками цієї групи, наприклад, нифедипіном, тому часто іменуються DHP-чутливими каналами [126, 127].

Ca^{2+} -канали Т-типу (від «transient») належать до групи низькопорогових та активуються при досягненні мембранного потенціалу величини близько (-70 - -60) мВ. Головним чином, їх функція пов'язана з генерацією пейсмейкерних потенціалів [128-132]. Цікаво, що в умовах інгібування натрієвої помпи спостерігається активація Ca^{2+} -провідності через канали L- та Т-типів [133].

1.2.2. Спряжені з мускариновими рецепторами катіонні канали та термочутливі TRP-канали

Фармакомеханічне спряження збудження-скорочення в ГМК як сукупність молекулярних, мембранних і клітинних процесів, які призводять до незалежного від мембранного потенціалу (точніше – від процесу деполяризації) збудження тісно пов'язане з поняттям рецептор-керованих каналів (receptor-operated channels, ROC) плазматичної мембрани (Рис. 1.3.) [134-137]. Агоністи здатні активувати потенціал-незалежний вхід Ca^{2+} та забезпечувати фармакомеханічне спряження в ГМ за трьома різними шляхами [138]. По-перше, до цих процесів належить ємнісний (capacitative Ca^{2+} entry, CCE) вхід іонів Ca^{2+} через депо-керовані (store-operated Ca^{2+} channels, SOC) Ca^{2+} -канали. Численними дослідженнями із застосуванням блокаторів Ca^{2+} -помпи СР циклопіазонієвої кислоти і тапсигаргіну встановлено [138, 139], що головним активатором процесу CCE є спустошення (зниження концентрації Ca^{2+} в люмені) СР. Іонний струм (Na^+ і Ca^{2+}) під час CCE не інгібується блокаторами Ca^{2+} -каналів і переноситься іонними каналами, які належать до родини TRPC (canonical transient receptor potential). Сенсором суттєвого спустошення депо слугують протеїни STIM1

(stromal-interacting molecule 1); показано [139-141], що молекули STIM1 розташовуються в ПМ поряд з SOC-каналом (попроформуюча субодиниця каналу отримала назву Orai1) та в мембрані CP, ймовірно, контактуючи між собою. Вважають, що комплекс STIM1-Orai1, який включає протеїни TRPC, контролює процес CCE [141].

До другого типу ROC належать неселективні катіонні канали (non-selective cationic channels, NSCC), які відкриваються внаслідок безпосередньої взаємодії з рецепторними білками [142-145]. NSCC в однаковій мірі проникні для одновалентних катіонів (Na^+ і K^+), а також є суттєвим джерелом надходження Ca^{2+} в міоплазму. Струм через ці канали є потенціал-залежним; при 0 мВ спостерігається його реверсія. Численні дані свідчать [146-149], що NSCC належать до надродини каналів TRP. Молекулярні механізми активації NSCC на тепер визначені не в повній мірі, втім для інтестинальних ГМ встановлено, що активація ацетилхоліном M_2 -холінорецепторів спричиняє $\text{G}_{i/o}$ -опосередковане їх відкривання, що в значній мірі посилюється через M_3 -холінорецептори [150-152].

Третім шляхом надходження в міоплазму іонів Ca^{2+} , який належить до ROC, є їх індукований активацією метаботропних рецепторів (через вторинні посередники, зокрема ІТФ і ДАГ) вхід через неселективні катіонні канали, що не залежить від рівня наповнення внутрішньоклітинних депо. Іонні струми через NSCC, які забезпечують цей шлях, мають біофізичні властивості неселективних іонних каналів з варюючою провідністю до іонів Ca^{2+} . Ці іонні струми переносяться каналами, що належать до родини TRPC, зокрема TRPC3, TRPC6 та TRPC7 [152-155].

Як уже згадувалось, головний внутрішньоклітинний механізм збільшення Ca^{2+} у відповідь на стимулювання агоністами, є їх ІТФ-залежний вихід з CP [156].

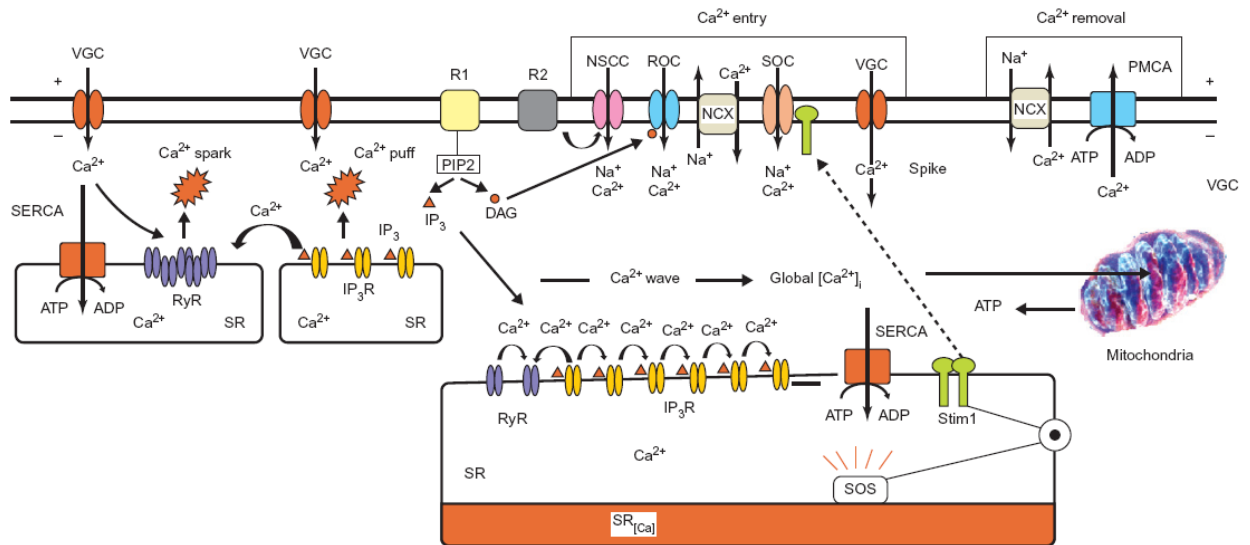


Рис. 1.3. Схема процесів і систем, які забезпечують зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} в гладеньком'язовій клітині [138]. Потенціалкеровані Ca^{2+} -канали L-типу (VGC) відкриваються внаслідок деполяризації плазматичної мембрани; це призводить до генерації Ca^{2+} спайків (spikes), які переходять формування і поширення потенціалів дії. Вхід Ca^{2+} через VGC може активувати Ca^{2+} -спарки двома шляхами: безпосередньо (через процеси Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} (CICR)) або непрямим шляхом (внаслідок збільшення захоплення іонів Ca^{2+} саркоплазматичним ретикуломом). Зв'язування агоністів з $\text{G}_{q/11}$ -спряженими метаботропними рецепторами активує фосфоліпазу C_β , спричиняючи синтез інозитол-1,4,5-трифосфату (IP_3) і диацилгліцеролу (DAG). DAG активує рецептор-керовані канали (receptor-operated channel, ROC), це посилює вхід іонів Na^+ і Ca^{2+} . IP_3 активує IP_3 -чутливі рецептори саркоплазматичного ретикулуму (IP_3R), спричиняючи локальні (Ca^{2+} -пуфи (puffs)) або глобальні (Ca^{2+} -хвилі/осциляції (waves/oscillation)) підвищення концентрації Ca^{2+} . Також вивільнення Ca^{2+} через IP_3R активує сусідні р'анодинові рецептори (RyR). Спустошення депо відчувається трансмембранними молекулами саркоплазматичного ретикулуму (STIM1), які перебудовуючись, активують депо-керовані канали (SOC). Підвищення концентрації іонів Na^+ у примембранних ділянках (внаслідок функціонування неселективних іонних каналів (NSCC), неселективних каналів, активованих метаботропними рецепторами (ROC) або SOC) може призводити до переходу $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника (NCX) в режим реверсної роботи. Більшість іонів Ca^{2+} , які надійшли до клітини, секвеструються в саркоплазматичний ретикулум (через помпу SERCA) і мітохондрії. Циклічність процесів вивільнення і захоплення іонів Ca^{2+} саркоплазматичним ретикуломом призводить до появи Ca^{2+} -осциляцій. Викачування Ca^{2+} з клітини забезпечують Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани (PMCA) і NCX (в режимі прямого функціонування).

1.2.3. Системи первинного активного транспорту іонів Ca^{2+} і Na^+ плазматичної мембрани (Ca^{2+} -помпа та Na^+ , K^+ -АТФ-аза)

Натрієва помпа ПМ, як і кальцієві помпи ПМ та СР належать до надродини іон- та ліпід-транспортних АТФ-аз. Ця надродина поділяється на 5 підродин (позначаються P1-P5), які у свою чергу класифікуються на підгрупи (їх найменування маркують великими літерами латиниці) [157]. Усі транспортні АТФ-ази характеризуються подібними принципами будови і функціонування каталітичної субодиниці: каталітична субодиниця являє собою один поліпептидний ланцюг, а інтермедіат під час каталітичного циклу зв'язує залишок неорганічного фосфату на бічному радикалі аспартату; також у процесі здійснення іонного транспорту відбуваються значні конформаційні перебудови макромолекули помпи [158-159]. Загалом, гомологія поліпептидного ланцюга Р-АТФ-аз незначна (близько 15% амінокислотної посліовності), однак у внутрішньоклітинному домені обов'язково присутній фрагмент: SDKTGT[L/I/V/M][T/I/S] з безальтернативним залишком Asp (D). Головні відмінності між транспортними АТФ-азами полягають у механізмах регуляції активності цих ензимів та, власне, у субстанціях, які вони транспортують [157]. Загальна класифікація надродини транспортних АТФаз наведена у табл. 1.1.

1.2.3.1. Na^+ , K^+ -АТФ-аза

Структура натрієвої помпи Na^+ , K^+ -АТФ-аза (натрієва помпа, ЕС 3.6.3.9) – трансмембранна структура, яка складається з двох нековалентно зв'язаних субодиниць α і β , а також для деяких тканин – також і регуляторної γ -субодиниці. В клітинах ссавців експресується 4 ізоформи α -субодиниці та 3 – β -субодиниці [160-162].

Найбільша у комплексі Na^+ , K^+ -АТФ-ази – α -субодиниця (близько 112 кДа). Молекула субодиниці 10 разів перетинає плазматичну мембрану, формуючи десять α -спіральних сегментів, причому обидва кінці поліпептидного ланцюга містяться у внутрішньоклітинному просторі. Виділяють три функціональні домени в молекулі α -субодиниці: А-домен

(активаційний), Р-домен (фосфориляційний) та N-домен (нуклеотид-зв'язуючий або нуклеотидний). В процесі формування функціональної конформації Na^+, K^+ -АТФ-ази, α -спіральні сегменти структуруються навколо трьох центральних 4-го, 5-го та 6-го. Внутрішньоклітинна петля між 2 і 3 сегментами та N-кінець молекули формують активаційний домен, що містить ділянку TGES, яка приймає участь на етапі дефосфорилювання. Інша важлива внутрішньоклітинна петля (між 4 і 5 трансмембранними фрагментами) формує два домени: фосфориляційний та нуклеотидний. Фосфориляційний домен утворюється проксимальною та дистальною частинами петлі. Він містить амінокислотну послідовність DKTGT, аспартатний амінокислотний залишок якої (D376, а за іншими даними D369) залучений до обміну γ -фосфату аденозинтрифосфорної кислоти.

Таблиця 1.1

Класифікація надродини іон-та ліпід-транспортних АТФ-аз та головні характеристики представників її підродин [157]

Підродина	Представники підродини	Головні характеристики
P1-АТФ-ази	K^+ -помпи (підгрупа А); Помпи важких металів (підгрупа В);	
P2-АТФ-ази	Ca^{2+} -помпи (підгрупи А і В); Na^+ , K^+ -помпи, H^+ , K^+ -помпи (підгрупа С); Na^+ -помпи (підгрупа D);	Підгрупа А: Ca^{2+} -помпи сарко(ендо)плазматичного ретикулуму, Ca^{2+} -АТФ-ази секреторного шляху (розташовуються, зокрема, в мембрані апарату Гольджі); Підгрупа В: Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани;
P3А-АТФ-ази	H^+ -помпи;	
P4-АТФ-ази	Ліпідні фліппази;	
P5-АТФ-ази	Помпи, для яких іон-транспортна специфічність ще не встановлена	

Нуклеотидний домен сформований головною частиною другої внутрішньоклітинної петлі; він утворює АТФ-зв'язуючий сайт [160, 163]. Частина α -субодиниці, через яку здійснюється транспорт іонів, утворюють трансмембранні сегменти 1, 2, 4, 6 та, ймовірно, 5 [164].

Серцеві глікозиди (зокрема, дігосин і убаїн), які є оборотними інгібіторами Na^+, K^+ -АТФ-ази, взаємодіють з сайтом, сформованим позаклітинною частиною α -субодиниці. Найвищою спорідненістю до убаїну володіє фермент у фосфорильованому стані (конформація E2P). Кардіотонічні стероїди взаємодіють з сайтом, який переважно сформований трьома позаклітинними петлями (між трансмембранними сегментами 1 і 2, 5 і 6 та 7 та 8) і самими трансмембранними сегментами. Він має консервативну структуру в ряді організмів від дрозоділи і земноводних до гризунів, ссавців та людини. Найбільш консервативна частина сайту міститься в N-кінцевій області і формується петлею між 1 і 2 трансмембранними сегментами. В ряді досліджень було виявлено зв'язок між амінокислотним складом цієї ділянки (особливо в позиціях 111 і 122) та чутливістю різних ізоформ у різних видів тварин до кардіотонічних стероїдів [165, 166]. Зокрема, для α -субодиниці вівцібуло доведено, що висока чутливість (порівняно з такою для α_1 -субодиниці щура) пов'язана з двома амінокислотними залишками – Gln-111 та Asn-122 (в молекулі α_1 щура вони відповідно замінені на аргінін та аспарагінат) [165]. Також і убаїн-чутлива α_2 -субодиниця щура в положенні 111 містить Gln і в положенні 122 – Asn [166]. Крім того, встановлено, що мутації сусідніх залишків першої позаклітинної петлі (Asp-121, Cys-104, Tug-108) спричиняють зниження чутливості до убаїну [167-169]. Показано, що залишки Cys-104, Tug-108, Glu-111 знаходяться поблизу сайту зв'язування цукру молекули кардіостероїдів [169**Error! Reference source not found.**], тоді як за зв'язування стероїдної групи, ймовірно, відповідають амінокислотні залишки Phe-783, Thr-797 та Asp-804 (остання – опосередковано) петлі між трансмембранними сегментами 5 і 6 [170]. Ймовірно, петля між трансмембранними фрагментами 3 і 4 також задіяна у формуванні сайту

зв'язування кардіотонічних стероїдів. На користь такого твердження свідчать дані дослідженнями функціональних наслідків точкових мутацій амінокислотних залишків Cys-113 і Tyr-317 [171]. Іншими важливими амінокислотними залишками є Glu-334 і Glu-960 (α -субодиниця електричного органу Torpedo); їх зміна на аланін призводить до підвищення чутливості натрієвої помпи до убаїну [172]. Амінокислотні залишки, розміщені в трансмембранних сегментах 5, 6 і 7, також забезпечують чутливість α -субодиниці до убаїну; це – Phe-786, Leu-793 (петля між 5 і 6), Thr-797, Phe-863, Arg-880 (петля між M7 і 8) [168].

Нещодавно була запропонована альтернативна модель, яка передбачає розташування сайту зв'язування кардіостероїдів у площині ПМ [173]. Так, проведені рентгеноструктурний аналіз і молекулярне реконструювання (за основу було взято α -субодиницю акули) свідчить, що молекула убаїну тісно “вклинюється” між трансмембранними сегментами, частково розкручуючи спіраль сегмента 4. Передбачається, що за даних умов головними формувачами сайту зв'язування глікозиду є трансмембранні сегменти 5 та 6.

Варто відзначити, що β - і γ -субодиниці Na^+, K^+ -АТФ-ази також приймають участь в утворенні сайту зв'язування кардіотонічних стероїдів. Так, ектодомен β -субодиниці, внаслідок специфічної взаємодії з α -субодиницею, посилює спорідненість ферменту до іонів K^+ , а також впливає на формування убаїн-зв'язуючого сайту [174]. Існують дані, які вказують на те, що γ -субодиниця може бути задіяна у формуванні убаїн-зв'язуючого центру натрієвої помпи [175].

α -субодиниця класифікаційно належить до підгрупи Пс родини Р-АТФаз, визначною рисою якої є транзієнтне формування фосфорильованого залишку аспартату в процесі каталітичного циклу [163]. Родину Р-АТФаз також називають E1-E2, оскільки ці ферменти можуть перебувати в двох головних конфірмаційних станах E1 та E2 з різними спорідненістю до іонів натрію (вища спорідненість в «дефосфорильованій» конформації E1) і калію (вища – в «фосфорильованій» конформації E2) та чутливістю до АТФ і АДФ.

Взаємодія з серцевими глікозидами фіксує фермент в конформації, подібній до E2 [176].

α_1 -субодиниця експресується у широкої різноманітності тканин, ізоформа α_2 характерна для серцевого, скелетних і гладеньких м'язів, легень і адипоцитів; α_3 -субодиниця виявлена в нервовій тканині та яєчниках, а також в кардіоміоцитах (в щурів – у процесі розвитку, а у людини – в дорослих особин); ізоформа α_4 експресується в сперматозоїдах [167]. Нокаут α_1 -субодиниці призводить до загибелі організмів в період ембріогенезу на стадії бластоцисту; у випадку патології ізоформи α_2 , загибель настає зразу після народження через неможливість здійснювати дихання внаслідок десинхронізації нейронів дихального центру [177-179]. При нокауті α_3 -субодиниці організм також гине при народженні, однак причини цього нез'ясовані. Ізоформа α_4 експресується виключно в сперматозоїдах, де слугує допоміжним чинником виведення H^+ , створюючи передумови функціонування Na^+, H^+ -обмінника [179].

Цікаво, що чутливість різних ізоформ (також існує значна видова варіабельність чутливості) α -субодиниць до природного блокатора убаїну відрізняється на декілька порядків. Так, відносно мало чутливою є ізоформа α_1 , тоді як інші ізоформи – високочутливі. Наприклад, для тканин щура визначено такі значення константи дисоціації (K_d) убаїну α_1 – 48 000 нМ, α_2 , α_3 та α_4 , відповідно, 115 нМ, 1.6 нМ та 312 нМ [180].

За відсутності контакту з β -субодиницею (виконує роль білка-шаперона), зона якого локалізована поряд з 7 та 8 трансмембранними сегментами, α -субодиниця не здатна здійснювати транспорт іонів. β -субодиниця – глікопротеїн з молекулярною масою близько 35-40 кДа, який один раз перетинає ПМ. Короткий N-кінець молекули розташований внутрішньоклітинно, а великий C-кінцевий домен міститься у позаклітинному боці і видоспецифічно глікозилується по декільком (4-9) сайтам [180].

Найменша субодиниця Na^+, K^+ -АТФ-ази – γ -субодиниця (близько 7.3 кДа). Це дрібний білок, який належить до групи семи білків FXYD. Хоча для усіх з них показана здатність тканино- і ізоформо-специфічно взаємодіяти з комплексом α, β -субодиниць натрієвої помпи, змінюючи її функціональні властивості, γ -субодиницею вважають FXYD2 [166,177]. γ -субодиниця регулює активність натрієвої помпи, у тканино-специфічний спосіб знижуючи або підвищуючи її.

Уабаїноподібні гормони, їх фізіологічна і патофізіологічна роль. У середині 20-го сторіччя з'явилися перші дані, які вказували на наявність в організмі ссавців речовин, здатних дублювати ефект рослинного уабаїну, а з початку 80-х років таких даних було достатньо накопичено, щоб стверджувати про існування ендогенних уабаїн-подібних сполук. Їх синтез здійснюється в наднирниках, а вивільнення в кров ініціюється адренокортикотропним гормоном. Іншим джерелом ендогенних кардіотонічних стероїдів (КТС) є гіпоталамус [181-184]. В тканинах і плазмі тварин ідентифіковано ряд КТС, які поділяють на дві групи: карденоліди (уабаїн і дігосин) та буфадієноліди (буфалін, марінобуфагенін, цінобуфоталін, ресібуфогенін, телоцінобуфагін, 19-норбуфалін і, ймовірно, інші похідні) [183, 185]. Припускають, що транспортування цих гормонів в кров'яному руслі людини здійснюють альбумін, а також білок з молекулярною масою 14.4 кДа (Fc фрагмент IgG, $K_d = 75 \text{ нМ}$) [186, 187].

Звичайні концентрації КТС в крові людини у спокійному стані варіюють в субнанолярних концентраціях (у межах $0,9 \cdot 10^{-9} - 10^{-10} \text{ М}$) і всередньому становить 0,5 нМ. У цьому випадку нанолярні концентрації КТС володіють здатністю пригнічувати натрієву помпу ($K_d = 10^{-8} - 10^{-9} \text{ М/л}$), тоді як для субнанолярних концентрацій властива регуляторна, трансдукторна функція [183].

Дослідженнями з використанням імунізації щурів антитілами антиуабаїну протягом 1 місяця було висвітлено роль КТС в нормальному функціонуванні організму [188]. Тривале зниження рівня ендогенних уабаїн-

подібних речовин призводило: до гіпертрофії наднирників, що свідчить про їх домінантну роль у синтезі КТС; знижувало екскрецію натрію з сечею, тобто КТС в нормі є натрійуретичним гормоном; зменшувало здатність аортальних гладеньком'язових препаратів реагувати на аплікацію адреналіну і передсердного натрійуретичного пептиду, що свідчить про роль КТС у регуляції скоротливості аорти (підвищують чутливість до катехоламінів і знижують – до передсердного натрійуретичного пептиду). Разом з тим, зниження рівня КТС в крові не змінювало ріст серця і нирок, що свідчить про те, що КТС не приймають участі у контролі росту цих тканин, принаймні у щурів [188].

Численними дослідженнями було показано, що хронічне підвищення концентрації КТС супроводжується розвитком гіпертензії, серцевою і нирковою недостатністю, гіперальдостеризмом, преекламписією, порушенням водного і сольового балансу [183, 189-192]. Насьогодні практично доведеним є факт, що ендogenous КТС можна вважати гормонами, задіяними в регуляції тону судин і артеріального тиску, тому найбільш важливим наслідком хронічного впливу високого рівня цих речовин є порушення з боку серцево-судинної системи. Дійсно, у людей збільшений рівень ендogenous КТС часто супроводжується підвищеними артеріальним тиском, опором периферійних судин та гіпертрофією лівого шлуночка серця [183]; аналогічні дані стосуються і щодо спонтанно-гіпертензивних щурів [193]. Аналогічно, на тваринних моделях в умовах *in vivo* доведено, що хронічний вплив низьких доз (які відповідають підвищеним концентраціям) убаїну призводить до розвитку артеріальної гіпертензії, гіпертрофії та фіброзу міокарду і судин, порушення функції нирок і водно-сольового обміну [183, 194-197].

Насьогодні існують дві гіпотези, які пояснюють механізми, за рахунок яких ендogenous кардіостероїди спричиняють специфічні ефекти на серцево-судинну систему. Перша, розроблена на етапі, коли Na^+, K^+ -АТФ-азу вважали виключно іон-транспортуючою структурою, – гіпотеза натрієвої затримки (Na^+ -lag hypothesis). Відповідно до неї часткове пригнічення натрієвої помпи

серцевими глікозидами викликає локальне збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів Na^+ . Як наслідок $\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}$ -обмінник починає працювати у реверсному режимі, підвищуючи концентрацію Ca^{2+} в клітині і виводячи іони натрію. Таким чином, підвищення рівня Na^+ є транзійтним [183]. В межах цієї гіпотези, підтримуваної Блауштейном з колегами, знаходиться пояснення результатів досліджень, коли при розвитку гіпертензії не спостерігається значного зростання рівню Na^+ в клітині. Передбачається, що саме такий механізм збільшення рівню Ca^{2+} в клітині можливий за рахунок існування в плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин судинної стінки та нейронів гіпокампу (зокрема, щурів) специфічних білкових комплексів – плазмЕРосом (plasmERosome). В цих тканинах Na^+, K^+ -АТФ-аза (містить α_2 - і α_3 -субодиниці) дуже близько контактує з NCX (ізоформа 1, NCX1) та ендоплазматичним ретикуломом [198]. На користь цієї гіпотези свідчать результати експериментів на препаратах артерій щура, за якими Ca^{2+} -транзійнти, викликані судинозвужуючими агентами (ангіотензином II та адреналіном), посилювались при блокуванні натрієвої помпи убаїном та активації депо-керованих Ca^{2+} -каналів; при цьому сумарна концентрація іонів Na^+ залишалась постійною, але могла підвищуватись у локальному просторі плазмЕРосом. Транзійтне зростання Ca^{2+} посилюється вивільненням цього катіона з внутрішньоклітинних депо: шляхом Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} з ріанодин-чутливого депо або інозитол-1,4,5-трифосфат-викликаного - внаслідок рецептор-активованого (адреналіном або ангіотензином II) синтезу цього вторинного посередника [199-201]. Коли в плазмЕРосомі натрієва помпа не заблокована, НКО1 і Ca^{2+} -помпа викачують Ca^{2+} з клітини. На підтримку гіпотези натрієвої затримки також свідчать результати експериментів, коли в умовах заблокованого НКО пригнічувався ефект наномолярних концентрацій убаїну [202-204]. Разом з тим, ці дані не протирічають іншій гіпотезі, яка привертає значну увагу дослідників у останнє десятиріччя і отримала численне експериментальне підтвердження, - існуванню в кавеолах білкових комплексів, залучених до регуляції багатьох

клітинних процесів, – сигналосом [205]. Сигналосами - структурно-функціональні білкові комплекси, які об'єднують іон-транспортні системи ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник-1, Na^+, K^+ -АТФ-азу, H^+, K^+ -АТФ-азу, Ca^{2+} -АТФ-азу плазматичної мембрани), іонні канали (Ca^{2+} -канали L-типу, Na^+ -канали, ІТФ-рецептори і ріанодинові рецептори ендоплазматичного ретикулу), ферменти (фосфоліпазу C- γ , NO-синтазу нейронального типу, фосфоінозитол-3'-кіназу, тирозинкіназу Src і протеїнкінази C і B), скефолдні білки (кавеолін, анкерин, фодрін, аддуцин), рецептори (епідермального фактора росту та іонотропні рецептори) та молекули клітинної адгезії [183, 206-208]. Ключовою структурою сигналосами є натрієва помпа. На відміну від плазматичної помпи, до складу якої можуть входити комплекси Na^+, K^+ -АТФ-ази з α_2 - і α_3 -субодиницями, у формуванні сигналосом приймають усі ізоформи α -субодиниць. Зв'язування КТС (ефективними є субнано- і наномолярні концентрації) натрієвою помпою сигналосами слугує пусковим механізмом каскаду внутрішньоклітинного сигналу (Рис. 1.3).

Отже, Na^+, K^+ -АТФ-аза є одним з ключових білкових комплексів клітини, роль якого не обмежується підтриманням іонного гомеостазу і трансмембранного потенціалу. Не викликає сумнівів зв'язок цього ферменту з множинними внутрішньоклітинними сигнальними процесами, які забезпечують, зокрема, регуляцію кровообігу та підтримання водно-сольового гомеостазу. Ендогенні кардіостероїди на сьогодні визнані гормонами і їх баланс забезпечує виконання натрієвою помпою сигнальної функції.

1.2.3.2. Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани.

Викачування Ca^{2+} з ГМК здійснюється двома шляхами – через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник та Ca^{2+} -помпу ПМ (ПМКА) [209-212]. Порівняно з ПМКА, НКО має відносно низьку афінність до Ca^{2+} (K_M для Ca^{2+} становить 0,2-0,5 мкМ та 1-10 мкМ відповідно). Кальцієва помпа виконує роль високоафінної системи по виведенню іонів Ca^{2+} з цитоплазми, забезпечуючи тривале підтримання базальної концентрації цих катіонів у стані спокою [213-215].

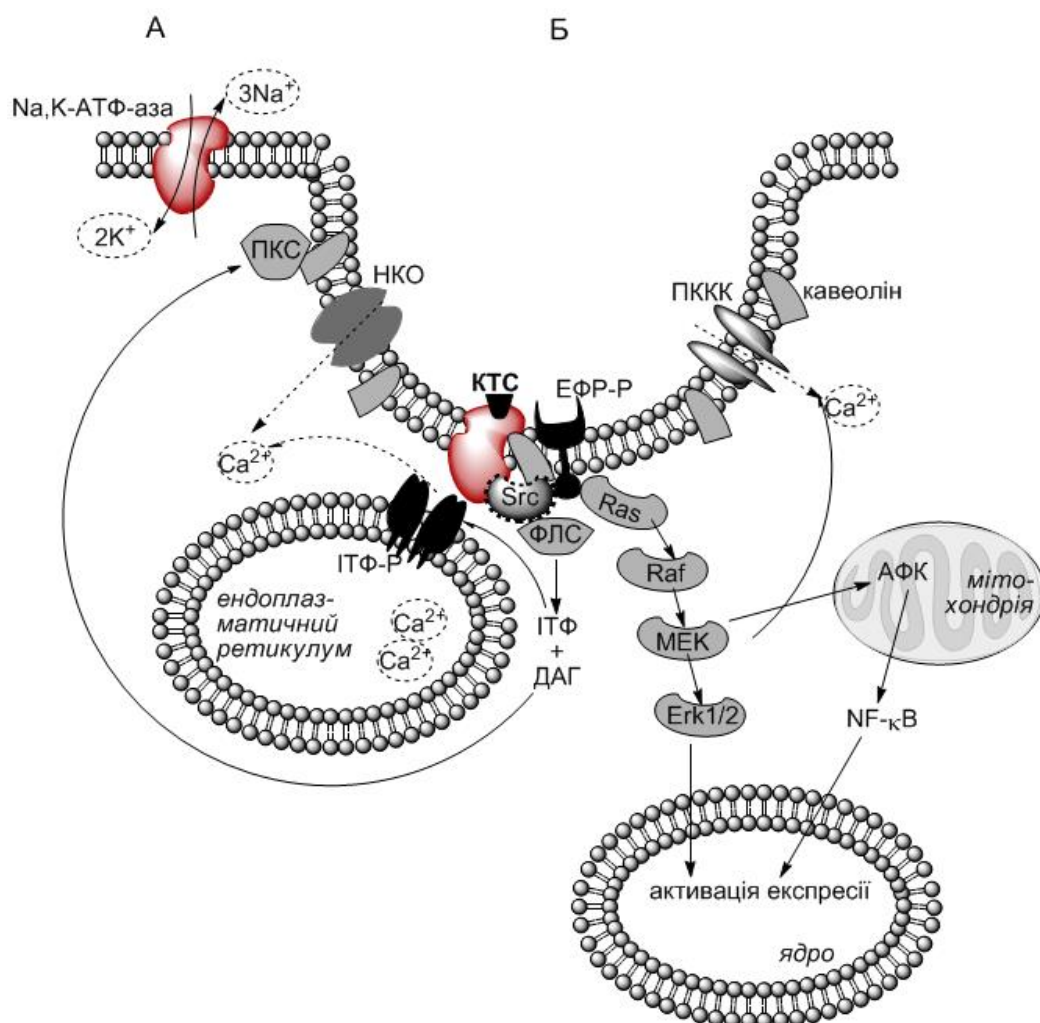


Рис. 3.1. Схема функціонування сигналосоми (Б). Коли Na^+, K^+ -АТФ-аза розташовується в кавеолі, зв'язування кардіотонічних стероїдів (КТС) призводить до активації декількох внутрішньоклітинних сигнальних ланцюгів. По-перше, вона механічно спряжена з інозитол-1,4,5-трифосфатними рецепторами (ІТФ-Р) ендоплазматичного (саркоплазматичного) ретикулуму. Також Na^+, K^+ -АТФ-аза контактує з кавеоліном та тирозинкіназою Src, і зв'язування убаїну призводить до активації цього ферменту. Кіназа Src активує фосфоліпазу C_γ (ФЛС) і, таким чином, синтезуються вторинні посередники інозитол-1,4,5-трифосфат (ІТФ) і діацилгліцерол (ДАГ). ІТФ активує ІТФ-Р, а ДАГ стимулює протеїнкіназу С (ПКС). ПКС фосфорилує множинні внутрішньоклітинні мішені, зокрема таким чином активується вхід Ca^{2+} через потенціалкеровані Ca^{2+} -канали (ПККК) та $\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}$ -обмінник (НКО). Фосфорилування кіназою Src рецептора епідермального фактора росту (ЕФР-Р) зумовлює опосередковану адаптером Grb2 (не показано) активацію сигнального каскаду Ras-Raf-МЕК-ERK1/2, яка спричиняє активацію експресії генів в ядрі. Також MAPK-стимульована генерація активних форм кисню (АФК) мітохондріями стимулює транскрипційний фактор NF- κB . У випадку, коли Na^+, K^+ -АТФ-аза не належить до кавеолярного пулу, вона виконує роль іонної помпи (А), здійснюючи транспорт іонів Na^+ і K^+ [218].

ПМКА належить до підродини P2В. Вона характеризується високою спорідненістю до Ca^{2+} і низькою транспортною ємністю [216, 217]. Стехіометрія $\text{Ca}^{2+}:\text{АТФ} = 1:1$. ПМКА працює як $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмінник, однак стехіометрія обміну іонів Ca^{2+} і протонів дотепер викликає дискусії. Залежно від мембранного потенціалу вона може функціонувати у реверсному режимі. У оптимальних умовах K_d іонів Ca^{2+} ПМКА варіює в межах 0,2-0,5 мкМ, у стані спокою цей показник коливається в межах 10-30 мкМ.

ПМКА може існувати у двох конформаційних станах: E1 та E2. E1 зв'язує АТФ і Ca^{2+} в цитозолі, формуючи високоенергетичний аспартилфосфатний інтермедіат (відбувається фосфорилування залишку аспартату в Ca^{2+} -залежний спосіб; Mg^{2+} підвищує швидкість фосфорилування ПМКА). Транслокуючи іон Ca^{2+} в позаклітинне середовище, ПМКА переходить в стан E2 (оскільки цей стан має низьку афінність до Ca^{2+} , іон звільняється в екзоплазму).

Унікальною властивістю, яка відрізняє ПМКА з-посеред інших представників надродина транспортних АТРаз, є її здатність активуватись комплексом Ca^{2+} -кальмодулін через С-кінцевий домен [219-221].

Структура ПМКА. Макромолекула ПМКА складається з єдиного поліпептидного ланцюга довжиною від 1100 до 1250 амінокислотних залишків та має молекулярну масу від 125 до 140 кДа. Вона формує в плазматичній мембрані структуру з середніми розмірами 120 Å у довжину і 40 Å у ширину, обидва кінець міститься внутрішньоклітинно [222].

Макромолекула ПМКА – асиметрична структура: вона α -спіральними фрагментами 10 разів перетинає плазматичну мембрану, формуючи трансмембранний домен (позначаються M1-M10); невелика кількість структурних компонентів її молекули міститься у позаклітинному боці, тоді як її цитоплазматична частина велика і формує 3 канонічні домени: А – чутливий (actuator), N – нуклеотидзв'язуючий (nucleotide binding) і Р – фосфориляційний (phosphorylation). На N- і С-кінцях амінокислотної

послідовності ПМКА розташовуються регуляторні домени, які містять інгібіторні і активаторні сайти [220, 223, 224] (Рис. 1.4).

Чутливий А-домен взаємодіє з трьома трансмембранними доменами: M1, M2 та M3. Він має консервативну ділянку Thr-Gly-Glu (TGE), суттєву для каталітичного циклу, а також принаймні 2 регуляторні ділянки: автоінгібітор-зв'язуючий, що опосередковує взаємодію між С-кінцевим кальмодулін-зв'язуючим доменом (R-доменом) і головною частиною макромолекули ПМКА, а також активаторний – він забезпечує активацію ПМКА шляхом взаємодії з кислими фосфоліпідами. Також А-домен мстить сайт А – один з двох головних сайтів альтернативного сплайсингу, що забезпечує різноманіття ізоформ ПМКА.

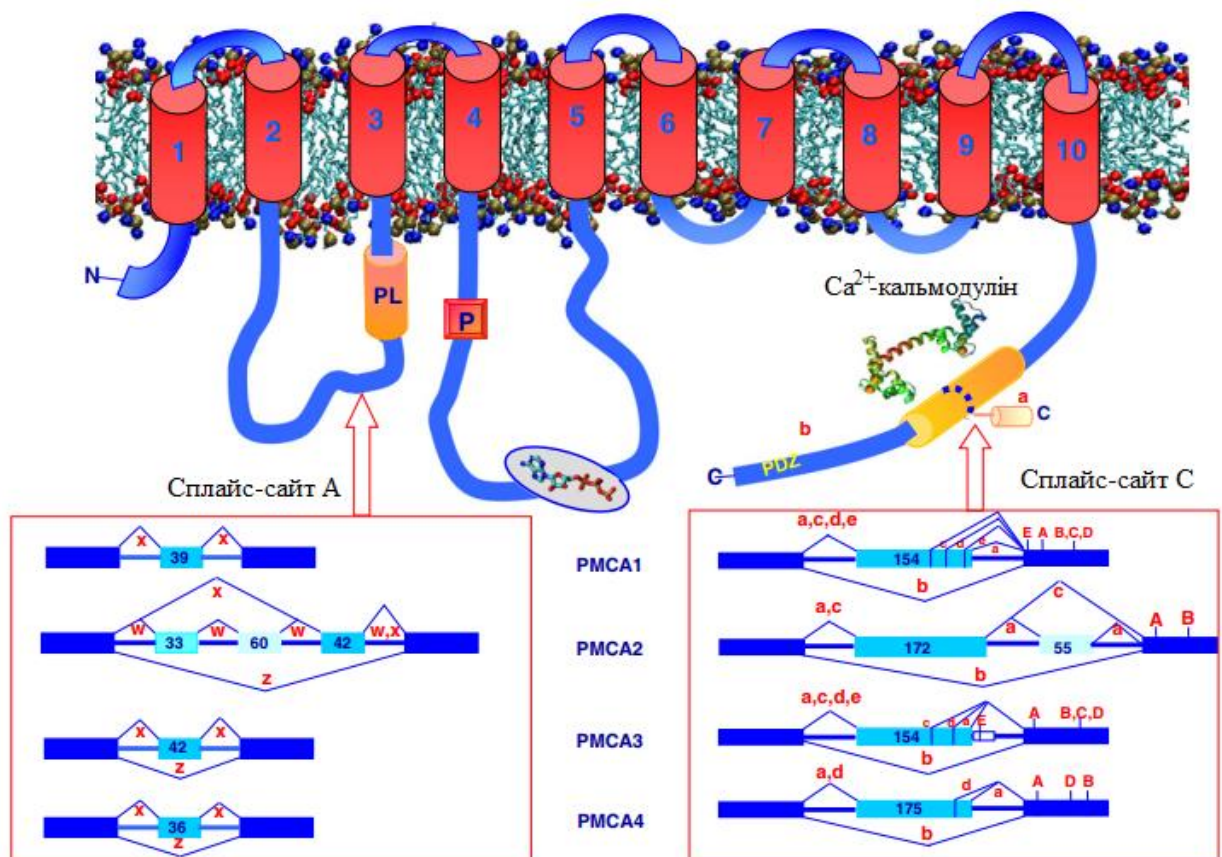


Рис. 1.4. Загальна схема топології доменів і сплайсинг-варіантів ізоформ ПМКА людини (адаптовано з [220]). Позначення: PL – фосфоліпід-зв'язуючий домен; P – розташування суттєвого фосфорильованого залишку Asp; PDZ – домен PSD-95/Dlg/ZO-1.

Фосфорильяційний Р-домен має декілька консервативних амінокислотних послідовностей. Так, два фрагменти: Thr-Gly-Asp-Asn (TGDN) та Gly-Asp-Glyx-Asn-Asp (GDGXND) залучені до формування координаційних зв'язків іону Mg^{2+} у комплексі з АТР N-домену. Також на центральній поверхні Р-домену міститься висококонсервативна ділянка **SD**KTGT[L/I/V/M][T/I/S], у якій безальтернативно розташовується фосфорильований залишок Asp (D) [220].

Нуклеотид-зв'язуючий N-домен забезпечує фосфорилування каталітичного залишку Asp у Р-домені, з яким він зв'язаний шарнірною ділянкою.

Таким чином, три канонічні домени цитоплазматичної частини ПМКА працюють злагоджено: А-домен є продовженням першої цитоплазматичної петлі, а N-домен є вставкою до Р-домену, крім того вони формують другий автоінгібітор-зв'язуючий сайт до С-кінцевого R-домену.

R-домен – унікальна структура ПМКА, яка складається з близько 120 амінокислотних залишків і вирізняє її з-поміж інших транспортних АТРаз. Він містить кальмодулін-зв'язуючий фрагмент, що забезпечує автоінгібування ПМКА внаслідок контакту з консервативними «акцепторними» сайтами, розміщеними на першій і другій цитоплазматичній петлі ПМКА. Функціональне значення такого автоінгібування полягає у можливості за його рахунок значного варіювання константи дисоціації (K_d) ПМКА до іонів Ca^{2+} : зняття автоінгібування з «акцепторних» сайтів призводить до зниження K_d з 10-20 мкМ до значення <1 мкМ [220].

Усі ізоформи ПМКА мають 5 позаклітинних петель. Перша петля (амінокислотні залишки 121-152 для ПМКА1) з'єднує перший та другий трансмембранні домени; це – найбільша позаклітинна петля. Вона містить цистеїн, тому, ймовірно, залучена в формуванні третинної структури молекули ПМКА. Для усіх ізоформ помпи ця петля має приблизно однакову довжину, але містить фрагменти з консервативними та варіабельними послідовностями амінокислотних залишків. Найбільш консервативна – третя

позаклітинна петля (для ПМКА1 – 879-884 амінокислотні залишки). Друга, четверта та п'ята позаклітинні петлі (амінокислотні залишки 401-413, 951-970 та 1027-1040 відповідно для ізоформи 1 ПМКА) досить вкорочені та мають мінімальну варіабельність відносно амінокислотного складу різних ізоформ. Насьогодні невідомо, щоб позаклітинні петлі ПМКА були залучені в ензиматичній реакції, однак, вони мають надзвичайне значення, оскільки взаємодіють із синтетичними інгібіторами помпи – калоксінами [220, 225-227].

Послідовності M2, M4 та M6 трансмембранного домену формують напівканал, який також містить Ca^{2+} -зв'язуючий сайт, що має суттєвий градієнт спорідненості до іонів кальцію: високоафінний з цитоплазматичного боку і низькоафінний – звернений у позаклітинний бік [228, 229].

Ізоформи ПМКА. У ссавців базово експресуються 4 ізоформи ПМКА (ПМКА1-4), які кодуються окремими генами (ATP2B1–4) в різних хромосомах (для людини це: 12q21.3, 3p25.3, Xq28, 1q32.1), однак завдяки альтернативному сплайсингу кількість ізоформ збільшується до близько 30. Хоча локалізація окремих сплайс-варіантів ізоформ ПМКА є органо-, тканино-, статеві- і вік-специфічною, доведено, що ПМКА1 і ПМКА4 експресуються не вибірково всіма клітинами (ПМКА1 вважають “housekeeping” помпою, а ПМКА4 характерна для переважної більшості тканин) та мають найнижчу спорідненість до кальмодуліну (K_d становить близько 30-50 нМ) [230-232]. Навпаки, ПМКА 2 і ПМКА3 мають вищу спорідненість до кальмодуліну (K_d становить близько 2-8 нМ) і експресуються тканиноспецифічно. Так, обидві ізоформи характерні для клітин нервової системи, але ПМКА2 визначається також в тканині молочної залози (де у лактуючих клітинах взаємодіє з каналом Orai1, забезпечуючи конститутивне, депо-незалежне надходження Ca^{2+} до цитоплазми) [233], а ПМКА3 – у скелетних м'язах [224].

Усі первинні транскрипти ПМКА піддаються альтернативному сплайсингу у двох сайтах (сайт А і сайт С). Сайт А розміщується над

фосфоліпід-зв'язуючим доменом у першій цитоплазматичній петлі помпи. Сайт С локалізується в С-кінцевому Ca^{2+} -кальмодулін-зв'язуючому домені.

Сплайсинг в сайті А у випадку ізоформ ПМКА1, 3 і 4 полягає у включенні одного екзону та призводить до утворення варіанта х. У випадку ізоформи ПМКА2 може відбуватись включення від 1 до 3 екзонів: при інсерції 1 екзону маємо варіант х; при інсерції 2 екзонів маємо варіант у; та при інсерції 3 екзонів маємо варіант w [224]. При відсутності інсерцій формується варіант z; виключенням для цього випадку становить ПМКА1, вона завжди має 1 інсерцію. Ізоформи ПМКА 3 і 4 завжди існують у формах х або z [220].

Сплайсинг у сайті С полягає у включенні 1 (у випадку ПМКА1 і 4) або 2 (у випадку ПМКА2 і 3) зовнішніх екзотів. Вставка 2 екзонів призводить до зміни рамки зчитування і появи стоп-кодону раніше звичайного, що спричиняє формування укороченого варіанту ПМКА, який позначають а. Коли інсерції не відбуваються, формується повнорозмірний варіант ПМКА, який позначають b. У випадку вставки одного з двох екзотів залежно від її позиції, відбувається формування форм: с, d, e та f, а у випадку ПМКА3 крім екзону і наступного інтрону відбувається вставка також поліА-хвоста (Рис. 1.1) [220].

Таким чином, значне різноманіття форм ПМКА дозволяє у широкому діапазоні варіювати ензиматичну активність, шляхи регуляції та структурні властивості макромолекул ПМКА.

Регуляція активності ПМКА. Головний спосіб регуляції активності ПМКА – взаємодія з комплексом Ca^{2+} -кальмодулін, яка призводить до зняття автоінгібування С-кінцевим доменом [220, 234-236]. Кальмодулін, безпосередньо взаємодіючи з молекулою ПМКА, зменшує K_M до Ca^{2+} приблизно у 30 разів та підвищує $V_{\max}$ в десять разів. У цьому сенсі цікаво, що ПМКА2 є відносно унікальною ізоформою кальцієвої помпи, оскільки міра її активації кальмодуліном не перевищує 30%, тоді як для усіх інших ізоформ спостерігається чотири/шестикратне збільшення загальної активності. Також,

сплайс-форми *a* і *b* одних і тих же ізоформ ПМКА суттєво відрізняються між собою за показниками спорідненості до кальмодуліну та кінетикою активації-інактивації кальмодуліном.

Інший механізм активації ПМКА – взаємодія з кислими фосфоліпідами, зокрема фосфатидилсерином і фосфорильованими похідними фосфатидидилінозитолдифосфату [237-239]. Вони мають два сайти зв'язування на молекулі ПМКА: один – на кальмодулін-зв'язуючому домені, та другий розташований на цитоплазматичній петлі між M2 і M3. Таким шляхом залежно від складу мембрани в околі молекули ПМКА її ензиматична активність може змінюватись вдвічі.

Також зміна активності ПМКА спричиняється фосфорилуванням протеїнкіназами A і C (однак ПКА впливає лише на ПМКА1), тирозинкіназою src [240, 241]. Зокрема, C-кінцевий домен містить сайти, фосфорилування яких забезпечує зміну функціонування ПМКА безпосередньо, або опосередковано через регуляцію взаємодії з кальмодуліном. ПКС здатна різноспрямовано модулювати функціонування ПМКА залежно від ізоформи і форми альтернативного сплайсингу.

Ще один шлях активації ПМКА пов'язаний з C-кінцевим доменом: підвищення ефективності її функціонування спостерігається при олігомеризації молекул ПМКА, яка обумовлюється саме цією ділянкою поліпептидного ланцюга [242, 243].

Цікавий механізм активації ПМКА кальпаїном. Ця протеаза відщеплює C-кінцевий фрагмент макромолекули якраз над кальмодулін-зв'язуючим доменом, призводячи до незворотної активації ПМКА [240, 244, 245]. Такий механізм активації може мати фізіологічний сенс у випадку патологічно високих внутрішньоклітинних концентрацій іонізованого кальцію.

Важливі особливості взаємодії ПМКА з іншими молекулами.
Дослідженнями останнього десятиріччя зібрано достатньо даних, аби стверджувати, що поряд із транспортною ПМКА виконує також сигнальну функцію за рахунок специфічної взаємодії з окремими

внутрішньоклітинними білками [246-248]. С-кінцевий фрагмент молекули ПМКА форми *b* (і більшість *c*- і *d*-форм) усіх ізоформ помпи відповідає консенсусній амінокислотній послідовності до консервативного PDZ-домену. Таким чином, забезпечується взаємодія ПМКА з групою внутрішньоклітинних білків, це зокрема: представники родини мембрано-асоційованих гуанілаткіназ (membrane associated guanylate kinase - MAGUK), а також – адапторні, регуляторні і сигнальні білки як синтаза оксиду азоту нейронального (NOS-1, nNOS) і ендотеліального (ділянка 735-934 амінокислотних залишків eNOS) типів [248-251].

Інші ділянки молекули ПМКА також взаємодіють з важливими внутрішньоклітинними білками. Так, доведено N-кінцева частина контактує з білком 14-3-3ε, а цитозольні петлі – з кальціневроном A, α1-синтрофіном іRASSF-1 [252, 253].

За рахунок таких міжбілкових взаємодій (особливо в місцях інвагінацій плазматичної мембрани - кавеол) формуються сигналомні комплекси, які забезпечують передавання сигналів досередини клітини. Наприклад групою дослідників під керівництвом Oseandy [254], на трансгенних мишах показано, що гіперекспресія ПМКА4b у кардіоміоцитах відповідальна за гіпетрофію міокарду, опосередковану активацією адренорецепторів, причому частково цей ефект опосередковується ПМКА-залежним контактним інгібуванням nNOS. Також взаємодія ПМКА4b/nNOS-синтрофін має фізіологічне значення у реалізації скорочувальної відповіді серцевого м'язу на активацію β-адренорецепторів. Гіперекспресія ПМКА4b спричиняє пригнічення скорочувальної функції міокарду через nNOS-залежну цГМФ/цАМФ-сигналізацію [254, 255].

ПМКА концентрується в кавеолах, так, що стехіометрія розташування цього ензиму в поза- та внутрішньокавеолярних мембранах становить 1:25. Таким чином, у кавеолах забезпечується формування специфічних, локальних внутрішньоклітинних примембранних зон зі зниженою концентрацією Ca^{2+} . Ймовірно, розташовані тут Ca^{2+} -залежні ферменти

перебувають у заінгібованому стані, тобто інгібування, зокрема NOS є Ca^{2+} -залежним. Доведено, що в клітинах серцевого м'язу ПМКА (ізоформа ПМКА 4b) разом з α -1 синтрофіном та pNOS формують тріадний комплекс, таким чином, що перші два білки синергістично спричиняють інгібування синтезу оксиду азоту. Відомо, що інотропний ефект β -адреноміметиків опосередковується взаємодією ПМКА 4b та pNOS, а гіперекспресія кардіоміоцитами ПМКА 4b супроводжується зниженням здатності клітин реагувати на активацію β -адренорецепторів [256-261]. З іншого боку, в клітинах, що в надлишковій мірі експресували мутантну форму ПМКА 4b (з втратою PDZ-зв'язуючого домену – і без здатності взаємодіяти з ПМКА, але зі збереженою високою Ca^{2+} -транспортувальною активністю) зберігали здатність реагувати на стимуляцію β -адренорецепторів на рівні контролю. Отже, інгібування pNOS кальцієвою помпою кардіоміоцитів головним чином пов'язане із їх безпосередньою взаємодією [262]. Важливо, що це інгібування знімається блокуванням ПМКА.

Експериментами *in vitro* встановлено цікаві закономірності, які вказують на взаємодію ПМКА і окремих метаботропних, зокрема окситоцинових і мускаринових рецепторів [263-266]. Так, групою Missiaen L. і колег [263] на двох об'єктах вісцеральних гладеньких м'язів описано приблизно одного порядку ефекти: на фракції мікросом ПМ ГМК шлунку свині було показано, що агоніст мускаринових ацетилхолінових рецепторів карбахолін спричиняє часткове пригнічення кальмодулін-активованої Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази та викачування іонів Ca^{2+} , також на препаратах міометрія - окситоцин-викликане пригнічення енергозалежного транспорту Ca^{2+} . Дослідженнями Magosci M., Penniston J.T. [264], препаратів вагітного міометріящурів показано, що аплікування окситоцину спричиняє зниження енергозалежного транспорту іонів Ca^{2+} в однаковій мірі (приблизно на третину) як у фракції ПМ, так і СР; однак інгібітор на дія окситоцину залежить від стадії вагітності: на пізніх етапах (21-22 доби) СР втрачав чутливість до окситоцину. Дослідженнями Popescu L. і колег було

встановлено [265], що напівмаксимальне інгібування ПМКА міометрія людини спричиняє окситоцин у концентрації 4 мкМО/мл (10 пМ).

Експресія і функціонування ПМКА в клітинах вісцеральних ГМ.

Конститутивними ізоформами ПМКА є 1 і 4; втім при абляції гену, що кодує ПМКА1, гомозиготи гинуть на ранніх стадіях ембріогенезу, тоді як аналогічна ситуація з ПМКА4 супроводжується окремими локальними дисфункціями, такими як порішення скорочувальної активності ГМ судин, чоловіче безпліддя та модуляція Ca^{2+} -сигналізації в В-лімфоцитів [224]. У вісцеральних ГМ експресуються ці ізоформи ПМКА; тут присутні обидві сплайс-форми *a* і *b* ензиму [224, 268-273].

Дослідами наукової групи під керівництвом Liu L., з генетичною модифікацією мишей на ГМ сечового міхура отримано дані [272, 273], які свідчать, що ймовірно ці ізоформи ПМКА мають свою відносну «спеціалізацію»: тоді як ПМКА1 переважно виконує роль підтримання базальної внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , ПМКА4 забезпечує трансмембранну трансдукцію сигналів. Так, генетична лінія мишей з нокаутом ПМКА4 і гетерозиготністю ПМКА1 (один ген ПМКА1) характеризувалась порушенням викачування Ca^{2+} (внаслідок нокауту ПМКА4) та сигналювання через ацетилхолінові мускаринові рецептори (внаслідок гіпофункції ПМКА1).

У ГМ шлунку свині встановлено експресію ПМКА1b [270]. У тканинах матки експресуються ізоформи 1 і 4 ПМКА. Для міометрія щурів ідентифіковано ПМКА1b, 4a і 4b; у міометрії людини присутні ті ж ізоформи ПМКА, однак форму 4a знайдено у дуже незначних кількостях [274]. Цікаво, що експресія ПМКА1b, на відміну від ПМКА4, не залежить від гормонального фону [275]. Функціональними дослідженнями встановлено, що зниження внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} після деполяризації у міоцитах матки мишей і щурів забезпечують $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник та ПМКА4 [276-278].

Синтетичні інгібітори ПМКА. Як і всі помпи Р-типу, ПМКА інгібується іонами La^{3+} (вони блокують конформаційний перехід ферментів зі стану E1-P у стан E2-P) і ортованадатом (блокує перехід помпи зі стану E2 у стан E1; причому інгібування наприклад натрієвої помпи значно ефективніше порівняно з ПМКА) [279-282]. Також в якості блокатора ПМКА використовують аналог флуоресцеїну карбоксиеозин, який взаємодіє з АТФ-зв'язуючим сайтом, та інгібітори кальмодуліну, що блокують взаємодію С-домену з кальмодуліном [283-285]. Всі інгібітори ПМКА поділяють на 4 групи: неорганічні іони (La^{3+} , VO_3^-), молекули, які взаємодіють з амінокислотними залишками макромолекули (карбоксиеозин), антагоністи кальмодуліну (кальмідазоліум та трифлуоперазин) та термодинамічно обумовлене пригнічення транспортування протиіонів (пригнічення здатності до транспорту протонів шляхом залуження позаклітинного простору). У будь-якому випадку, ці інгібітори не є специфічними щодо ПМКА і, головне, не є ізоформо-специфічними.

Розробки ефективних і селективних інгібіторів ПМКА продовжуються. Натепер можна виділити 2 групи перспективних сполук-інгібіторів, які можуть претендувати на селективність щодо ПМКА. По-перше, науковою групою під керівництвом Ashok Grover синтезовані калоксіни – невеликі (10-15 амінокислотних залишків) пептиди, які зв'язуються з позаклітинною частиною ПМКА [286, 287]. Калоксіни діють як алостеричні модулятори, впливаючи на функціонально-важливі конформаційні переходи в молекулі кальцієвої помпи [255]. Номенклатура калоксінів побудована наступним чином: калоксіни, які взаємодіють з першою, другою і третьою позаклітинними петлями молекули ПМКА, відповідно отримали номери 1, 2 та 3 [2887-290]. Від початку дизайну і дослідження ефективності та специфічності, було розроблено три серії калоксінів: перші мають позначення А і є мають найгірші біохімічні показники; друга серія (В) калоксінів була розроблена на основі попередньої на основі експериментів з повно розмірними молекулами ПМКА; при розробці третьої серії (С) було

застосовано точковий мутагенез з метою покращення калоксінів серії В. Таким чином, для калоксінів вдалось досягти значного покращення: наприклад калоксін 2A1 мав K_i близько 0,5 мМ, а для калоксіну 1B1 показник K_i складає біля 50 мкМ. Натепер ефективність калоксінів досягла значень K_i на рівні декількох мкМ; останні покоління калоксінів мають також виражену специфічність щодо ізоформ ПМКА. Так, калоксін 1C2 селективно інгібує ПМКА4 ($K_i = 2,35$ мкМ, тоді як для ізоформ ПМКА1, 2 і 3 цей показник на один порядок вищий).

Другою групою синтетичних інгібіторів є калікс[4]сарени – макроциклічні супрамолекулярні сполуки, що є похідними альдегідів фенолів. Взагалі калікс[n]арени ($n = 4, 6, 8$) не будучи цитотоксичними, володіють широким спектром біологічної активності, яка, залежно від функціоналізації верхнього і нижнього вінців макроциклу, є специфічною відносно тих чи інших молекул (Див. розд. 1.3). Науковою групою під керівництвом акададеміка НАН України С.О. Костеріна встановлено [291-293], що калікс[4]арени з шифрами С-90 та С-716 володіють здатністю інгібувати ПМКА, не змінюючи при цьому активність інших іон-транспортувальних ензимів ПМ. Так, на препаратах ПМ міоцитів матки свиней встановлена здатність калікс[4]арену С-90 вибірково інгібувати Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазу ($I_{0,5}=34,6\pm 6,4$ мкМ) [293]. Також ці калікс[4]арени не впливають на інші системи активного іонного транспорту в саркоплазматичному ретикулумі та мітохондріях ГМК міометрія [292, 293]. Втім, варто відзначити, що, для каліксарену С-90 встановлена потужна здатність активувати АТФ-азу актоміозину ГМК міометрія свиней (константа активації становить 52 ± 11 мкМ) [294].

1.2.4. Процеси електро- та фармакомеханічного спряження у гладеньких м'язах

У ГМК під час їх активації, яка реалізується як збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), умовно виділяють

процеси електромеханічного та фармакомеханічного спряження між збудженням та скороченням [92, 93, 295-305]. Як згадувалось раніше, зростання $[Ca^{2+}]_i$ може бути спричинене надходженням цього катіона через потенціалкеровані Ca^{2+} -канали (ПКК) L-типу внаслідок деполяризації ГМ, рецептор-керовані канали, або канали активовані спустошенням внутрішньоклітинних кальцієвих депо, або комбінацією зазначених механізмів. Тип індукування Ca^{2+} -сигналу залежить від властивостей окремих ГМ та визначається активаційними стимулами. Стимулювання збільшення $[Ca^{2+}]_i$ в клітинах ГМ, обумовлене деполяризацією ПМ, є електромеханічним спряженням. Класичним індуктором активації електромеханічного спряження в умовах експериментів *in vitro* є застосування гіперкалієвого розчину (ГКР, фізіологічного розчину зі збільшеною концентрацією калію внаслідок часткової заміни іонів Na^+ на K^+), що спричиняє деполяризацію плазматичної мембрани та відкривання ПКК. Стимулювання збільшення $[Ca^{2+}]_i$ в клітинах ГМ, обумовлене активацією іонотропних або метаботропних рецепторів, є фармакомеханічним спряженням [92, 93, 305-309]. Зручною і поширеною моделлю для активації процесів фармакомеханічного спряження збудження-скорочення в умовах експериментів *in vitro* є застосування агоністів мускаринових ацетилхолінових рецепторів. Активація метаботропних рецепторів, спряжених з $G_{q/11}$ -білками, призводить до фосфоліпаза $C\beta$ -активованого синтезу ІТФ та ДАГ; у свою чергу, ІТФ індукує вивільнення іонів Ca^{2+} з СР. Ці процеси спричиняють початкове збільшення $[Ca^{2+}]_i$, яке далі може бути посилене за рахунок процесу Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} (КІВК) з СР через ріанодинові рецептори. Втім, процес виходу Ca^{2+} через РР може також належати до електромеханічного спряження: у частині СР, яка розташовується у безпосередній близькості до кавеол; процес КІВК індукований ПКК у цих ділянках зареєстровано для вісцеральних і мезентеріальних ГМ [305].

Суттєве зростання $[Ca^{2+}]_i$ призводить до активації Ca^{2+} /кальмодулін-залежної кінази легких ланцюгів міозину (КЛЛМ). Цей ензим є серин-треоніновою протеїнкіназою, яка фосфорилує регуляторні легкі ланцюги міозину (РЛЛМ); їх фосфорилування призводить до перебудови скорочувального апарату, робить можливим взаємодію молекул актину та міози нових головок, призводячи до скорочувальної реакції ГМК. Скорочувальна реакція закінчується після дефосфорилування РЛЛМ фосфатазою легких ланцюгів міозину (ФЛЛМ). Співвідношення активностей цих двох ензимів у ГМК визначатиме ступінь фосфорилування РЛЛМ і, врешті, силу скорочувальної реакції м'язу. Дійсно, варіювання активності ФЛЛМ (стимулювання або пригнічення) при постійних значеннях активності КЛЛМ і $[Ca^{2+}]_i$ спричиняє відповідно сенситизацію та десенситизацію ГМ, які супроводжуватимуться збільшенням і зменшенням рівнів фосфорилування РЛЛМ та сили скорочення [310-317].

ФЛЛМ – гетеротримерний білок, який складається з каталітичної фосфатазної субодиниці типу 1 (PP1 δ , молекулярна маса 38 кДа), міозин-зв'язувальної субодиниці (MYPT1, молекулярна маса 110–130 кДа) і субодиниці з молекулярною масою 20 кДа для якої не доведено регуляторну або каталітичну функцію. Специфічне фосфорилування цього ензиму призводить до його інгібування. Фосфорилування ФЛЛМ здійснює кіназа ROK (RhoA/Rho-асоційована кіназа); у випадку ФЛЛМ щура – по залишкам треоніну T855 та/або T697 в субодиниці MYPT1. Інший шлях, який спричиняє пригнічення активності ФЛЛМ – активація протеїну CPI-17 (cytosolic phosphatase inhibitor protein), фосфорилуванням протеїнкіназою C (по залишку треоніну T38); активований CPI-17 зв'язується та інактивує каталітичну субодиницю PP1 δ ФЛЛМ.

Електроmechanічне спряження збудження-скорочення містить Ca^{2+} -залежний та Ca^{2+} -незалежний компоненти. У випадку Ca^{2+} -залежного компонента мова йде за процеси модуляції надходження іонів кальцію з позаклітинного середовища через ПКК; що до Ca^{2+} -незалежних механізмів

електромеханічного спряження, то вони стосуються регуляції ензиматичної активності ФЛЛМ. Зокрема відомо, що деполяризація плазматичної мембрани ГМК при аплікаванні ГКР спричиняє сенситизацію білків скорочувального апарату внаслідок активації RhoA і ROK [92, 299, 300]. Так, науковою групою проф. Т. Бурдиги і колег [92, 299] доведено, що кіназа ROK відіграє важливу роль в індукованих потенціалами дії фазних скороченнях та Ca^{2+} -транзієнтах ГМ сечоточника щурів, а її інгібування в цьому випадку призводить до зниження рівня фосфорилування РЛЛМ, амплітуди фазних скорочень, збільшення швидкості розслаблення. Цими дослідниками також встановлено, що кіназа ROK не впливає на показники рівня фосфорилування РЛЛМ і сили скорочувальної відповіді ГМ сечоточника щурів, індукованої карбахоліном в безкальцієвому розчині [92]. Тонічні (але не фазні) компоненти скорочень, активованих за шляхами як електромеханічного, так і фармакомеханічного спряження збудження-скорочення, суттєво залежать від ROK-залежного фосфорилування MYPT1, яке призводить до інгібування ФЛЛМ та підвищення рівня фосфорилування РЛЛМ [92]. Крім того, активність кінази ROK в значній мірі визначає також швидкість розслаблення ГМ після генерування фазних скорочувальних відповідей [299].

1.3. Каліксарени як супрамолекулярні наноефектори біофізичних і біохімічних процесів.

Синтез, систематика і структурна організація. Супрамолекули формуються з двох складників: молекули-«Господаря» (рецептора) і молекули-«Гостя» (субстрата), та у дві стадії: розпізнавання і самоорганізації. Каліксарени є синтетичними супрамолекулярними молекулами-«Гостями», тоді як «Господарями» можуть бути різноманітні молекули та іони. Таким чином, вони здатні з надвисокою селективністю розпізнавати і зв'язувати за рахунок нековалентних взаємодій у комплекси «Гість-Господар» окремі іони, нейтральні молекули і біологічні молекули [318-325].

Калік[n]сарени – це макроциклічні сполуки, які сформовані як ліпофільна чаша з n бензольних фрагментів (переважно $n=4, 5, 6$ і 8), яка може бути функціоналізована по верхньому і/або нижньому вінцях, а також середньому поясі [325]. Вони легко синтезуються реакцією *p*-*трет*-бутил-фенолу і формальдегіду у присутності лугу (NaOH, KOH). Особливий інтерес для дослідників являють собою калікс[4]сарени, оскільки, по-перше, їх легко отримати і модифікувати по верхньому (функціоналізація фенольних фрагментів) і нижньому (функціоналізація гідроксильних груп) вінцях, та, по-друге, вони мають унікальні конформаційні властивості (Рис. 1.5).

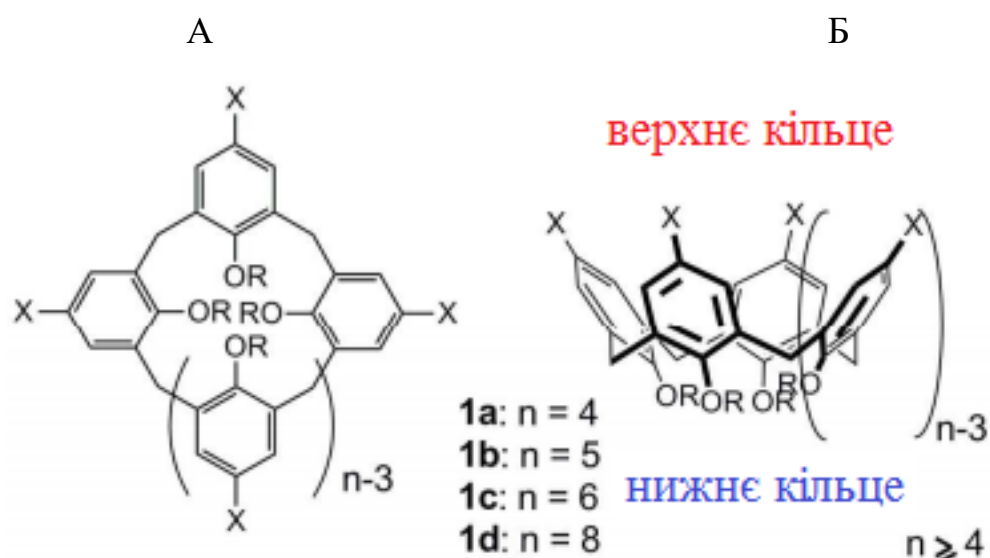


Рис. 1.5. Загальна схема структури калікс[n]арена: А – планарне представлення, Б – тривимірне представлення. Адаптовано з [326]

Синтез каліксаренів здійснюють за методом Гютше, який полягає у конденсації *пара*-заміщених фенолів формальдегідом у присутності гідроксидів лужних металів. Формування *трет*-бутилкалікс[n]арену з різним значенням n відбувається залежно від температури, розчинника і природи основи (NaOH або KOH). Далі *трет*-бутильні групи видаляються дією безводного $AlCl_3$ з утворенням незаміщених калік[n]саренів [327]. Гідроксильні групи нижнього вінця макроциклу функціоналізують реакціями естерифікації і естерифікації. Переважно здійснюють алкілування: це дозволяє закріпити необхідну конформацію макроциклу. Також через алкільний

спенсер можна вводити функціональні групи [327]. Функціоналізацію верхнього вінця в *пара*-положеннях бензольних кілець здійснюють реакцією електрофільного заміщення атомів водню.

Сучасну номенклатуру каліксаренів було затверджено ІЮПАК у 2002 році. Вона базується на подвійній нумерації циклофанового скелету: спочатку великими цифрами позначають номери кілець (1, 3, 5, 7) та метиленових містків (2, 4, 6, 8), а потім малими цифрами (як верхні індекси) нумерують атоми у кожному бензольному кільці [327].

Переважно у науковій літературі використовується номенклатура каліксаренів, запропонована Гютше. Для формування найменування каліксарену початково його молекулу розміщують гідроксильними групами донизу. Кількість ароматичних кілець у циклі позначають в квадратних дужках між «калікс» і «арен». Нумерацію атомів представлено на рис. 1.6 [327].

Біологічна активність. Дослідженнями останніх декількох десятиріч напрацьовано значний масив даних, який беззаперечно доводить, що калікс[*n*]сарени (особливо з $n=4, 6$ та 8) є надзвичайно перспективною основою для розробки різноманітних біотехнологічних і лікарських препаратів. Так, ці сполуки проявляють біологічну активність проти бактерій, вірусів, грибів, мають протипухлинну, антифіброзну і антитромботичну активність, здатні формувати трансмембранні канали з відносною вибірковістю іонного струму; також каліксарени здатні зв'язувати ксенобіотики, зокрема іони важких металів і токсичні речовини [325, 328-339].

Дослідами *in vitro* та *in vivo* встановлено, що окремі каліксарени мають низьку токсичність, або є взагалі нетоксичними [340]. Так, дослідженнями Sharma N. і колег встановлено, що *p*-трет-бутилкалікс[4]арени не здатні проникати трансдермально, а у випадку їх застосування в умовах *invitro* (культура фібробластів людини) не проникають до клітини і не виявляють цитотоксичності [341].

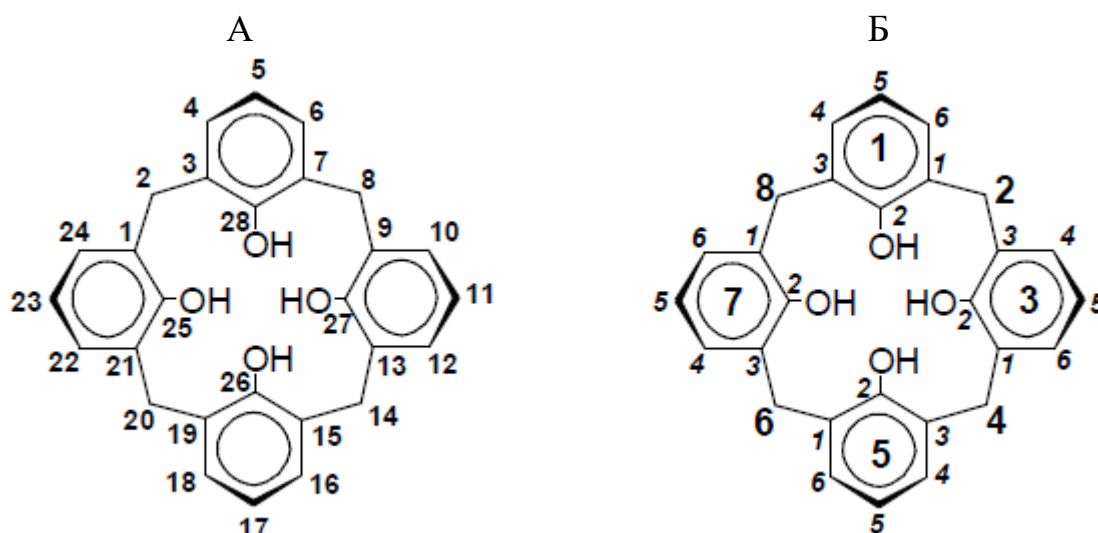


Рис. 1.6. Нумерація вуглецевих атомів та бензольних кілець калікс[4]аренів за Гютше (А) та рекомендацією ІЮПАК 2002 року. Адаптовано з [327].

Біологічна активність каліксаренів, функціоналізованих по нижньому вінцю. Калікс[4]арени, функціоналізовані по нижньому вінцю похідними іміноцукрів, володіють антиангіогенною активністю, і таким чином є перспективними сполуками для терапії пухлин [325, 337, 342]. Каліксплатин (каліксарен, функціоналізований чотирма центрами Pt(II)) має доведену антикарциномну активність [343, 344]. Дослідженнями наукової групи під керівництвом В.І. Кальченка встановлено, що каліксарени, функціоналізовані гідроксиметилбісфосфеновою і метиленбісфосфеновою кислотами володіють інгібіторною активністю щодо ряду тирозинфосфатаз (1B, TC-PTP, PTPβ, LAR, CD45) [345].

1.4. Нанорозмірний матеріал TiO₂: фізико-хімічні властивості та біологічні ефекти

Одиним з головних напрямків сучасної нанотехнології є розробка методів синтезу і дослідження фізико-хімічних та біологічних властивостей наноматеріалів, зокрема наночастинок оксидів металів, з метою їх ефективного використання у різноманітних галузях промисловості, зокрема біосенсорики, біотехнологій, фармакології, косметології тощо. За

визначенням Європейської комісії (EU - European Commission Recommendation on the definition of nanomaterial, 2011 p.), наноматеріали – природний або штучно виготовлений матеріал, який містить частинки в незв’язаному стані, у вигляді агрегатів або агломератів, де не менше, ніж 50% часток мають розмір у діапазоні 1-100 нм [346-352]. Фізико-хімічні властивості наночастинок (НЧ) суттєво залежать від їх розмірів, адже НЧ з меншим розміром мають відносно більшу кількість атомів на поверхні частинки [353-356]. Це визначає поверхневі властивості НЧ: енергетичний рівень, електронну структуру, реакційну активність; таким чином, розмір НЧ визначає їх біологічні властивості.

Титан (Ti) достатньо широко розповсюджений в земній корі; оскільки він має велику спорідненість до оксисену та інших елементів, в металічному стані у природі він не існує. Найбільш звичайним окисним станом Ti є $+4$, хоча також існують стани $+3$ та $+2$. У промисловості використовують Ti у формі металу, оксиду (TiO_2) і хлориду (TiCl_4). У промисловості переважає оксид титану TiO_2 (інші синоніми: кислий ангідрид титану, ангідрид титану, Ti білий). TiO_2 – негорючий, без запаху порошок з молекулярною масою 79,9 г/моль; його точка кипіння становить 2972°C , точка плавлення становить 1843°C , відносна густина при 25°C дорівнює $4,26\text{ г/см}^3$. Промислове виробництво TiO_2 передбачає його напращування у двох розмірних категоріях: «fine» (середній розмір часток 0,1-2,5 мкм) та «nanosize» (середній розмір первинних часток $<0,1\text{ мкм}$) [355, 357].

Наночастинки TiO_2 можуть існувати в трьох поліморфах: анатаз, рутил і брукіт; причому переважають перші дві структури. Зазвичай порошок TiO_2 є сумішшю рутилу і анатазу [354, 357, 358]. Найвищою хімічною активністю володіє анатаз; при його опроміненні ультрафіолетом відбувається генерування активних форм кисню (АФК), причому при звичайних світлових умовах утворення АФК не можливе. Рутил вважається хімічно інертною формою TiO_2 , хоча окремі дані свідчать про токсичні ефекти наноматеріалу діоксиду титану цієї кристалічної структури [359]. Фізико-хімічні властивості

НЧ TiO_2 визначаються сукупністю факторів: формою, розміром, характеристиками поверхні та внутрішньою структурою. У випадку зменшення розміру НЧ TiO_2 не залежно від поліморфу посилюють (або набувають) токсичних властивостей.

Наноматеріал TiO_2 – найбільш вживаний (обсяг виробництва і використання понад 10 млн. тонн на рік) промисловий барвник білого кольору. Зокрема, він широко використовується для надання забарвлення харчовим продуктам, косметичним і гігієнічним засобам, наномедичним реактивам, фармацевтичним засобам (добавка з шифром E171); близько 36% TiO_2 харчового призначення має розмір <100 нм [360, 361]. Раніше вважалось, що TiO_2 є нетоксичним, хімічно і біологічно інертним матеріалом, таким чином його тривалий час використовували в якості негативного контролю при проведенні токсикологічних досліджень. Натепер накопичено величезний масив даних, отриманих дослідженнями *in vitro* та *in vivo*, які беззаперечно вказують на цитотоксичність НЧ TiO_2 . Міжнародна агенція з дослідження канцерогенезу класифікувала TiO_2 до групи канцерогенів 2В: можливо канцерогенні для людини.

У світі існують стандарти і норми надходження TiO_2 в організм людини (і його взаємодії з організмом). Так, Американською конференцією урядових індустріальних гігієністів (American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH) було затверджено пороговий граничний показник (threshold limit value, TLV) кількості анатазу TiO_2 на рівні 10 мг/м^3 як середньозважений по часу - для 8 годинного робочого дня при 40 годинному робочому тижню. Припустима межа впливу (permissible exposure limit, PEL) – для зазначеного часу Управлінням по безпеці і гігієні праці (Occupational Safety & Health Administration, OSHA) встановлена на рівні 15 мг/м^3 ; Американським інститутом безпеки і гігієни праці (the United States National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH) було запропоновано показник рекомендованої межі впливу (recommended exposure limit, REL) для НЧ суміші рутилу і анатазу TiO_2 на рівні $0,3 \text{ мг/м}^3$ та для

анатазу на рівні 3 мг/м³. За нормуванням Організації розвитку індустріальних технологій Японії прийнятна питома концентрація НЧ TiO₂ (суміші рутилу і анатазу, в умовах 40-годинного робочого тижня) становить 1,2 мг/м³.

Численними дослідженнями *in vivo* показано, що наночастинки TiO₂ здатні проникати в організм декількома шляхами: інтрадермально, через дихальні шляхи, через травний тракт, а також при інтраперитоніальному та інтравенозному ін'єктуванні [363]. При інтрагастральному введенні НЧ TiO₂ здатні транслокуватись через епітелій тонкого і товстого кишечника. При гострому та субхронічному введенні, за даними Guo і колег [364], наночастинки діоксиду титану викликають порушення бар'єрної функції ендотелію тонкого кишечника, зменшуючи абсорбтивні клітини мікроворсинок та пригнічуючи їх ензиматичну активність.

Надходження наноматеріалу TiO₂ в організм людини натепер набуло значних обсягів. Так, наприклад, за даними Weir A. і колег [365], цукерки і жувальна гумка містить 0,01-1мг TiO₂ на одиницю, тому з харчовими продуктами діти до 10 років вживають 1-2 мг TiO₂/кг ваги/добу, більш дорослі люди – близько 0,2-0,7 мг TiO₂/кг ваги/добу. За даними Powell J. I колег [366], у Великобританії середньостатистичне надходження НЧ TiO₂ в організм людини складає 5 мг/добу (близько 100 НЧ TiO₂/добу). Подолання ендотеліального бар'єру при проходженні НЧ через ШКТ відбувається декількома шляхами. Головним чином НЧ і мікрочастинки (принаймні до 200-500 нм у діаметрі) транспортуються через спеціальні ендотеліоцити (М-клітини) Пейєрових бляшок; так питома швидкість транспорту (на прикладі часток з діаметром 460 нм) становить близько 10⁵ часток за 45 хв одним таким лімфоїдним фолікулом [366]. Також деяка частина наноматеріалу може потрапляти у внутрішнє середовище організму шляхами ендоцитозу і персорбції. Припускають, що достатньо дрібні НЧ здатні проникати в клітини глибокі шари стінки ШКТ парацелюлярним транскитозом через щільні контакти [367]. Як свідчать дані наукової групи під керівництвом Bettini S. [368], тижневе вживання водної суспензії наночастинок TiO₂ (10

мг/кг ваги) щурами лінії Вістар спричиняло проникнення TiO_2 в тканини ендотелію і Пейєрових бляшок кишечника, а також печінки тварин. Клінічними і патоморфологічними дослідженнями встановлена здатність до накопичення наночастинок TiO_2 у клітинах Пейєрових бляшок кишечника людини та передбачається кореляція між віком, величиною такої акумуляції з розвитком патологій ШКТ, зокрема, хвороби Крона та коліту [369, 370].

Загалом, у організмі людини ймовірно, відбувається суттєве накопичення TiO_2 , принаймні теоретично розраховано Freedman і колегами [363], що при систематичному звичайному їх надходженні організм містить близько 100 г наноматеріалів, які складаються з 12 000 «зерен».

Після надходження досередини організму, нано- і мікророзмірні ксенобіотики потрапляють до клітин ендоцитозом, механізми якого визначаються розміром частинок. За даними Cai K. і колег [371], у клітинах культури остеобластів ендоцитоз наноматеріалу TiO_2 з малим середнім діаметром (14 нм) здійснюється через кавеоло-опосередкований шлях, тоді як частинки більшого розміру (74 та 196 нм) переважно надходять в цитоплазму шляхом клатрин-опосередкованого ендоцитозу. Через 24 год. інкубації наночастинки, надходячи до клітин, утворюють там кластери, які найчастіше розташовуються в цитоплазмі і лізосомах (ендосомах) та іноді – поблизу ядра [371]. На культурі гліоцитів людини (U373) і щурів (C6) показано [372], що процес ендоцитозу наночастинок TiO_2 відбувається в дуже короткий період часу (близько 30 хв. для клітин лінії C6 та близько 2 год. – для клітин лінії U373) та супроводжується формуванням псевдоподій і внутрішньоклітинних везикул. Натепер поширеною гіпотезою щодо механізмів рецептор-опосередкованого ендоцитозу TiO_2 є реалізація цього процесу внаслідок попереднього формування навколо частинок «корони» з протеїнів, іонів Ca^{2+} та PO_4^- , що забезпечує полегшене зв'язування цього комплексу на позаклітинних доменах трансмембранних білків та швидку індукцію його інтерналізації [373, 374]; для сукупності процесів того захоплення клітинами-господарями наночастинок використовуються терміни «Trojan horse

mechanism» та «Trojan-Like internalization». Зокрема, показано [374], що зв'язування таких біокомплексів TiO_2 з поверхневими клітинними глікопротеїнами посилює процеси їх поглинання.

Запальні процеси в тканинах, індуковані TiO_2 та їх механізми.

Присутність в клітині наночастинок TiO_2 призводить, перш за все, до активації генерування АФК (гідроксильних радикалів, супероксидів, перекису водню, синглетного кисню) і окисного стресу, які у свою чергу спричиняють апоптоз і зміни потенціалу на внутрішній мембрані мітохондрій, а також пошкодження молекул ДНК. Хоча ці процеси значно посилюються за опромінення ультрафіолетом (УФ), численними дослідженнями показано, без і дії УФ-світла та в темряві наночастинок TiO_2 здатні спричиняти генерацію АФК та класичний оксидативний стрес клітин з пошкодженням ДНК, перекисним окисненням ліпідів та формуванням мікроядер [373, 375]. Зокрема, такі ефекти виявлені на клітинах лінії BEAS-2B (культура епітеліальних клітин бронхів людини) для часток у формі анатазу з середнім розміром 10 і 20 нм); ймовірно так здатність поліформу анатазу залежить від розміру, оскільки за відсутності освітлення цитотосичність не характерна для частинок з середнім розміром ≥ 200 нм [375]. Також варто відзначити, що дослідженнями Gurr J.R. і колег [375] показана здатність НЧ з розміром 200 нм у формі рутилу в темряві спричиняти окисний стрес в клітинах лінії BEAS-2B; використання суміші анатазу і рутилу супроводжувалось посиленням до АФК-індукованого пошкодження ДНК порівняно із використанням аналогічних кількостей чистих поліморфів.

Численними дослідженнями останніх років накопичено значний масив даних, який свідчить про те, що наноматеріали металів та їх оксидів, зокрема і діоксиду титану, при потраплянні в організм, виявляють прозапальну дію [376, 377]. Зокрема, як було показано Nogueira С.М. і колегами, відносно нетривале (10 діб) інтрагастральне введення суспензії TiO_2 мишам викликає запальні процеси в кишечнику, які супроводжуються підвищенням рівня

прозапальних факторів: інтерлейкінів (ІЛ 1 β , 4, 6, 8, 10, 12, 13, 17, 23), фактора некрозу пухлин α (TNF- α) та інтерферону γ ; також у стінках кишечника виявляли підвищений рівень інфільтрації лімфоцитами Т (CD4⁺) [378]. На противагу цьому, за даними Bettini S [368], хронічне вживання невисоких концентрацій суспензії наночастинок TiO₂ (портягом 100 діб, у кількості 200 мг/добу) щурами лінії Вістар супроводжувалось підвищенням рівня лише окремих прозапальних цитокінів (ІЛ-6, TNF- α , ІЛ-8 и ІЛ-10) у слизовій оболонці товстого кишечника. Виживаність клітин в умовах інкубації з наночастинками TiO₂ залежить від рівня експресії в цих клітинах детоксикаційних і антиоксидантних ензимів [379, 380].

Як свідчать дані літератури [381, 382], серед ефектів дії *in vivo* наночастинок діоксиду титану спричиняють розвиток порушень з боку серцево-судинної системи. Зокрема, за цих умов спостерігається зниження ендотелій-залежного розслаблення судин мікроциркуляторного русла; такі ефекти були зареєстровані, зокрема, для судин легень, скелетних м'язів та матки [383, 384]. Найбільш універсальним механізмом, який забезпечує порушення судинної функції, є зниження біодоступності NO (що синтезується в нормі ендотеліальною синтазою (NOS) і підтримує тонус судинних стінок на оптимальному рівні) внаслідок його взаємодії з вільними радикалами, потужне зростання рівня яких індукує TiO₂ [385].

Дані геномних та протеомних досліджень свідчать, що в умовах тривалого впливу TiO₂ в організмі змінюється рівень експресії окремих генів та, відповідно, синтез їх білкових продуктів. Так, дослідженнями Mauger M.M. і колег було виявлено, що діоксид титану (середній розмір частинок 21 нм) при його інгаляційному надходженні в організм щурів, відбувається достовірна зміна кількості 38 протеїнів, пов'язаних з трьома сигнальними шляхами: гострої фази запалення, активації рецепторів LXR/RXR (рецепторів х печінки / ретиноїдних X рецептрів) та FXR/RXR (фарнезоїдних X рецепторів / ртиноїдних х рецепторів); отримані результати вказують на три головні значущі функції, які модулюються наночастинками: синтез активних

форм кисню, коагуляція крові та пошкодження тканин печінки [386]. Дані наукової групи під керівництвом Ze Y. Свідчать [387], що інгалювання мишей НЧ (2,5-10 мг/кг ваги тварин) упродовж трьох місяців призводить до суттєвих нейротоксичних ефектів, які супроводжуються достовірними змінами еспресії 249 генів.

Особливості впливу НЧ TiO_2 на організм в умовах *in vivo* залежать від віку. Так, дослідженнями наукової групи під керівництвом Wang [388] показано, що при субхронічному введенні щурам високих концентрацій TiO_2 (10, 50 та 100 мг/кг) в молодих тварин спостерігається враження серця і печінки, неалергічна активація макрофагів у тканині шлунку; в дорослих тварин за тих же умов розвивається лише незначне враження нирок і печінки, знижується проникність стінок кишечника та знижується вміст молібдену в крові. Не залежно від віку тварин високі концентрації TiO_2 спричиняють окисний стрес: у плазмі крові спостерігається підвищення показника співвідношення відновленого і окисненого глутатіону (GSH/GSSG), яке, однак розвивається за різними механізмами. Так, у молодих тварин його підвищення зумовлювалось підвищеним рівнем GSH, тоді як у дорослих – зниженням GSSG. У молодих щурів також спостерігалось пов'язане з окисним стресом підвищення рівня глюкози в плазмі крові; як вважають дослідники [388], ці результати з невеликими обмеженнями можна перенести на популяцію людей та рекомендувати більш жорстке нормування присутності нано TiO_2 в продуктах дитячого харчування.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт і предмет досліджень

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

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

Досліди проводили на нелінійних білих щурах популяції віварію Київського національного університету імені Тараса Шевченка, а також щурах лінії Wistar популяції віварію Інституту фармакології та токсикології НАМН України. Тварин евтаназували із використанням ефірного наркозу або пропофолу; у окремих випадках використовували гільйотинізацію. Усі дослідження проводились у відповідності до Гельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по біоетиці та правах людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою в 1997 році в м. Ов'єдо (Іспанія) та підписаною Верховною Радою України у 2002 році, Закону України № 3447 IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" [38-43].

2.2. Тензометричні експерименти

2.2.1. Розчини для тензометричних експериментів.

Склад вихідного фізіологічного розчину – нормального розчину Кребса, а також основних позаклітинних розчинів, які виготовляли на його основі і використовували для дослідження скорочувальної активності гладеньких м'язів у різних умовах, наведені в табл. 2.1; рН всіх розчинів доводили до 7,3-7,4 за допомогою HCl або NaOH.

Для досягнення конкретної мети ми використовували блокатори чи активатори різних іон-транспортувальних систем ПМ і мембран внутрішньоклітинних органел, які додавали до відповідних розчинів залежно від поставленої мети у концентраціях, наведених у табл. 2.2.

Таблиця 2.1

Склад основних розчинів, використаних для тензометричного дослідження гладеньких м'язів (мМ)

Назва розчину	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	NaH ₂ PO ₄	NaHCO ₃	Глю-коза	Холін ⁺	LiCl
Нормальний розчин Кребса	120,4	5,9	2,5	1,2	1,2	15,5	11,2		
Гіперкалієві розчини	86,3	40	2,5	1,2	1,2	15,5	11,2		
	76,3	50	2,5	1,2	1,2	15,5	11,2		
	66,3	60	2,5	1,2	1,2	15,5	11,2		
	46,3	80	2,5	1,2	1,2	15,5	11,2		
Гіпонатрієві розчини	25,0	5,9	2,5	1,2	1,2	15,5	11,2	112,4	
	25,0	5,9	2,5	1,2	1,2	15,5	11,2		112,4
Номінально безкальцієвий розчин	120,4	5,9	0	3,7	1,2	15,5	11,2		
Гіпермагнієві розчини	120,4	5,9	2,5	5 або 10	1,2	1,2	15,5		

2.2.2. Вивчення скорочувальної активності багатоклітинних препаратів вісцеральних гладеньких м'язів.

Механокінетичні властивості ГМ ШКТ досліджували на препаратах вісцеральних ГМ нелінійних білих щурів та щурів лінії Wistar. Усі експерименти за участі тварин проводили у відповідності до законодавства

України та норм Європейського Співтовариства щодо гуманного поводження з лабораторними тваринами. Умертвіння щурів здійснювали із використанням ефірного наркозу або пропофолу (виробництво «Sigma»).

Для дослідження скорочувальної активності використовували тензометричне устаткування виробництва майстерень Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, яке передбачало можливість реєстрації скорочувальної активності одночасно двох м'язових препаратів: у ізометричному та ізотонічному режимах реєстрації (Рис. 2.1).

Препаративні підготовчі процедури підготовки багатоклітинних препаратів (смужок) вісцеральних ГМ залежали від їх приналежності до окремих органів. М'язи травного тракту (антрального відділу шлунку, сліпої кишки, дистального відділу ободової кишки) попередньо під бінокулярним мікроскопом за допомогою мікроінструментів для очних операцій очищували від слизової оболонки та нарізали у потрібному напрямку розміщення м'язових волокон (зазвичай та якщо не вказано окремо, експерименти проводили на кільцевих м'язах) на смужки потрібного розміру (зазвичай та якщо не вказано окремо, середній розмір складав 2 x 10 мм).

Скорочувальну активність ГМ рогів матки досліджували на препаратах, для приготування яких роги матки розрізали у поздовжньому напрямку на смужки середнього розміру 2 x 10 мм, залишаючи ендотеліальний шар інтактним; у випадку необхідності вивчення спонтанних скорочень перевагу віддавали фрагментам рогів з боку яєчників.

Для дослідження спонтанної і викликанної скорочувальної активності препарати ГМ поміщали в робочу камеру (ефективний об'єм 2,0 мл) тензометричного устаткування (Рис. 2.1) з проточним розчином Кребса (швидкість протікання - 5 мл/хв.) та залишали на 1 годину до стабільної відтворюваності скорочень. Термостатування робочої камери здійснювали за допомогою рідинного термостату на рівні $(37.5 \pm 0,3) ^\circ\text{C}$.

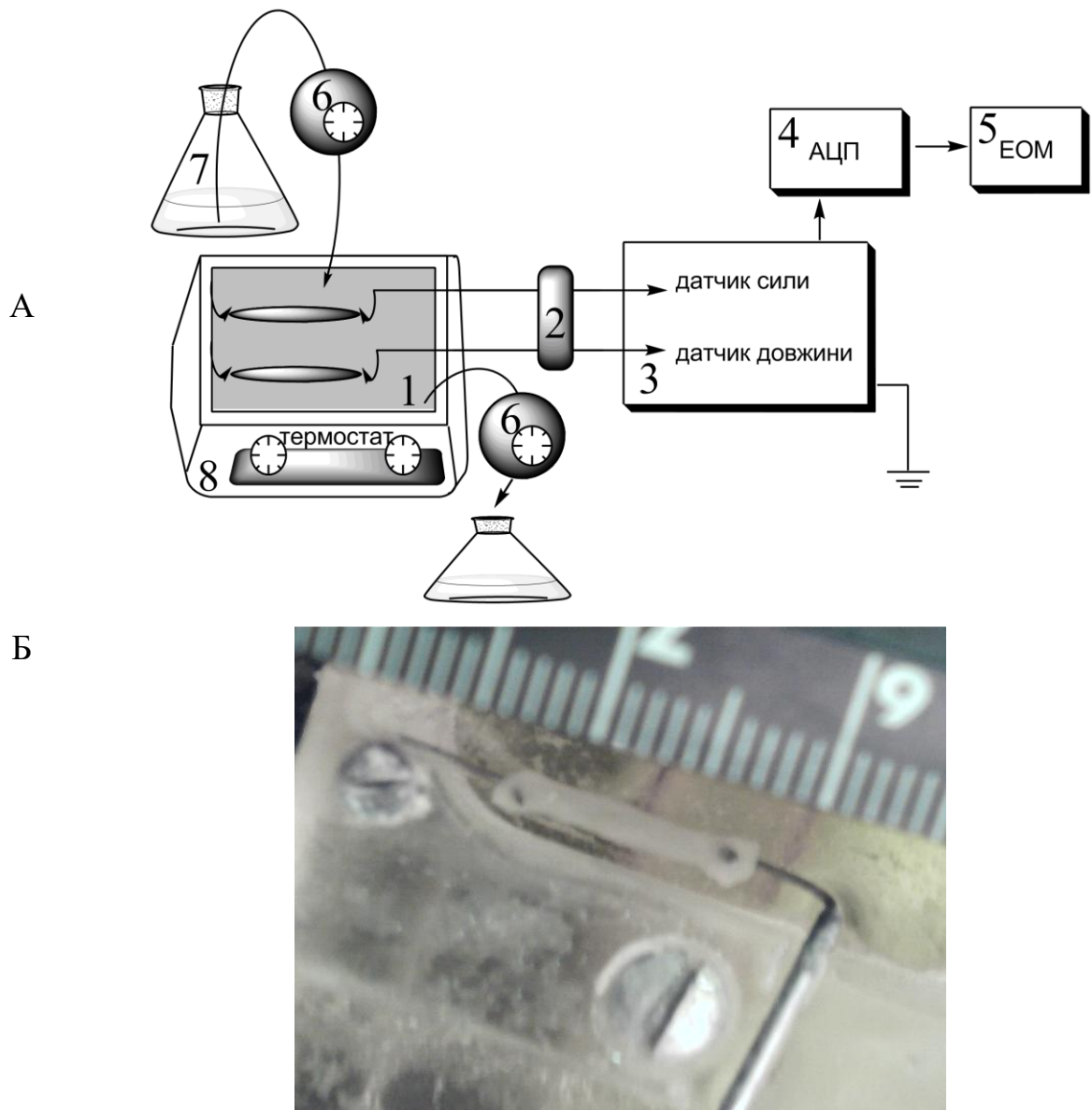


Рис. 2.1. А - Блок-схема устаткування для тензометричних експериментів на багатоклітинних препаратах гладеньких м'язів: 1 - робоча камера, заповнена робочим розчином, з гладеньком'язовими препаратами, які закріплено на гачках; 2 - датчики сили (за умови реєстрації в ізометричних умовах) та переміщення (за умови реєстрації в ізотонічних умовах); 3 - підсилювач; 4 - аналого-цифровий перетворювач (АЦП); 5 - комп'ютер (ЕОМ); 6 - перестальтичні насоси; 7 - набір робочих розчинів; 8 - рідинний термостат. Б - фото розташованого в робочій камері м'язового препарату.

Таблиця 2.2

Перелік речовин, які використовувались у дослідженнях

Речовина, виробництво	Тип речовини	Концентрації
Метоксиверапаміл (D600), Honeywell Fluka	блокатор потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів	10^{-13} - 10^{-4} М
Ніфедипін, Sigma	блокатор потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів	10^{-13} - 10^{-4} М
Тапсигаргін, Sigma	блокатор Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулуму	1 мкМ
Кофеїн, Sigma	агоніст ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів	20 мМ
Окситоцин, ЗАТ «Біолік», м. Харків	агоніст окситоцинових рецепторів	0,1 МО
Ацетилхолін, Sigma	агоніст ацетилхолінових рецепторів	10^{-9} - 10^{-3} М
Нікотин, Sigma	агоніст нікотинових ацетилхолінових рецепторів	10^{-7} і 10^{-3} М
Гістамін, Sigma	агоніст гістамінових рецепторів	10^{-5} М
Брадикінін (БК), Sigma	агоніст брадикінінових рецепторів	10^{-5} М
γ -аміномасляна кислота (ГАМК), Sigma	агоніст ГАМК-рецепторів	10^{-8} - 10^{-5} М
Атропін, ПрАТ «Дарниця», м. Київ	антагоніст ацетилхолінових мускаринових рецепторів	10^{-5} М
Нітропрусид натрію (НПН), Sigma	донор NO	10^{-4} М
N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), Sigma	блокатор NO-синтаз	10^{-4} М
Убаїн, Honeywell Fluka	блокатор Na^{+} , K^{+} -АТРази плазматичної мембрани	10^{-5} і 10^{-4} М
CCCP, Sigma	протонофор внутрішньої мембрани мітохондрій	2 мкМ
NaN_3 , Sigma	блокатор дихального ланцюга мітохондрій	0,1 мМ
Діазоксид, Sigma	активатор АТФ-чутливих K^{+} -каналів	10^{-5} М
Глібенкламід, Sigma	блокатор АТФ-чутливих K^{+} -каналів плазматичної мембрани	10^{-5} М
5-гідроксидеканоат (5-HD), Sigma	блокатор АТФ-чутливих K^{+} каналів мітохондрій	$2 \cdot 10^{-4}$ М
Натрієва сіль аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ), Sigma	агоніст пуринових рецепторів	0,1 мМ

У окремих випадках (зазначено у відповідних розділах) та залежно від мети дослідження, термостатування робочої камери і проточного розчину змінювали від 22 до 48 °С.

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

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

Усі калікс[4]арени були синтезовані і охарактеризовані методами ЯМР і ІЧС у відділі хімії фосфоранів в Інституті органічної хімії НАН України під керівництвом акад. НАН України, проф. Кальченка В.І. та люб'язно надані нам для досліджень. Структурні формули зазначених сполук наведено на рис. 2.2.

При використанні оуабаїну, ніфедипіну, D-600, калікс[4]аренів С-99, С-107, С-716, С-90 та фрагменту М-3 попередньо готували маточний розчин в диметилсульфоксиді (ДМСО) з розрахунку внесення 0,25-1% зазначеної речовини в кінцевий об'єм.

2.2.3. Дослідження термодинаміки вискоеластичної деформації гладеньких м'язів.

При дослідженні термомеханокінетичних властивостей вискоеластичної деформації ГМ, реєстрації скоротливої активності здійснювали в ізотонічному режимі. В експериментах використовували препарати кільцевих м'язів антрального відділу шлунку (*gaster, antrum*), дистального відділу ободової кишки (*colon*), сліпої кишки (*caecum*).

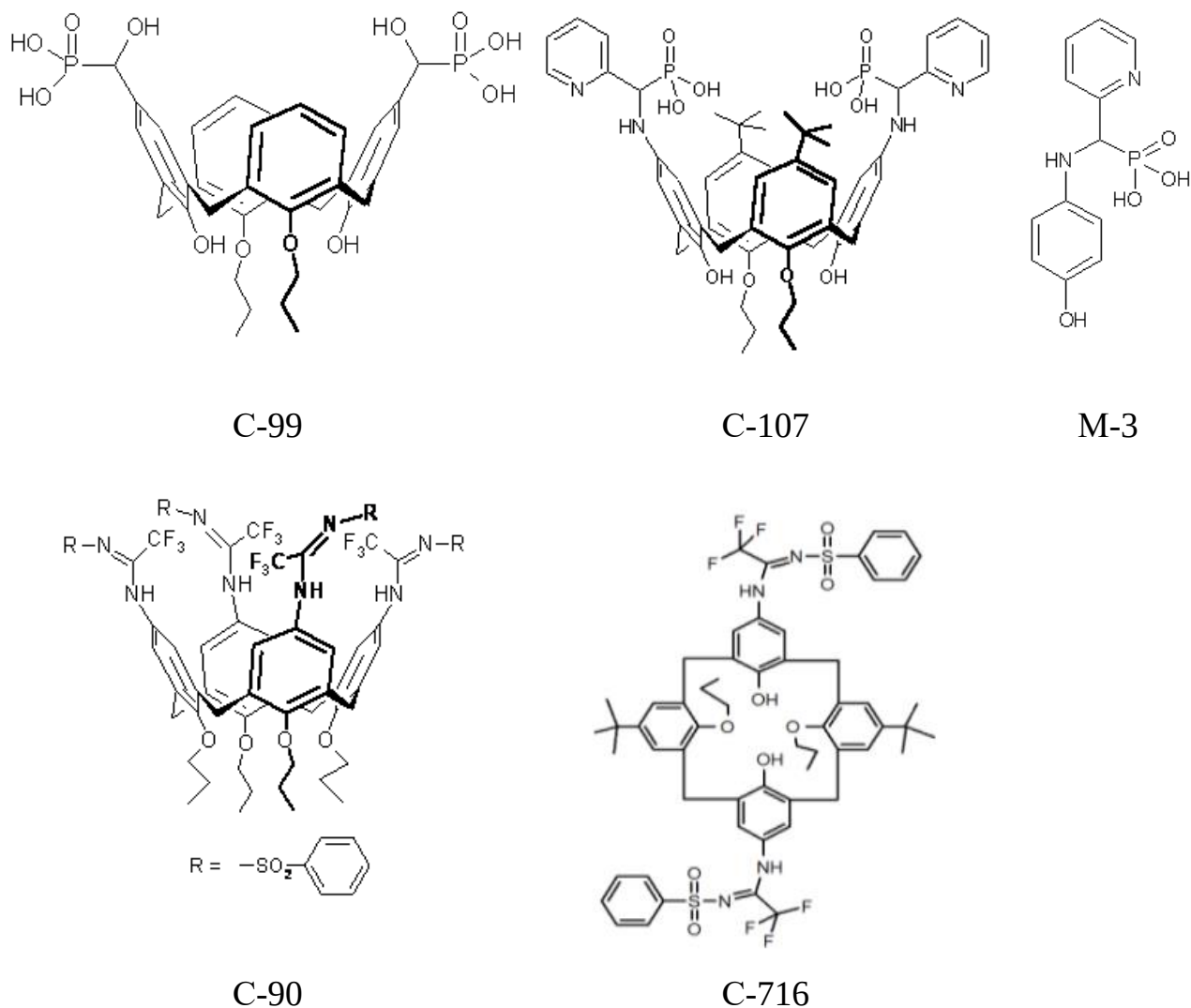


Рис. 2.2. Структурні формули калікс[4]аренів та сполуки М-3, дія яких була досліджена в роботі.

Залежно від мети дослідження, термостатування робочої камери і проточного розчину змінювали від 22 до 48 °С; попередня інкубація препаратів при фіксованій температурі тривала 10-15 хв.

Залежно від мети експерименту, мультиклітинному препарату ГМ надавали змінний натяг від 0 до 50 мН. Зазвичай, у випадку градуйованих навантажень збільшення вантажу здійснювали з кроком 5 мН, після досягнення препаратом рівноважного значення довжини ($\Delta L = \text{const}$). В окремих дослідках, для послідовного навантаження препаратів було обрано також фіксований час - 1 хв. За цих умов, по-перше, розтяг препаратів виходив на субстаціонарний рівень (близько 75% від максимального

значення $\Delta L_{\max}$), а по-друге, при субфізіологічних температурах (понад 34 °C і більше) м'язові смужки не встигали почати генерацію спонтанних скорочень.

Реєстрацію сигналів проводили, використовуючи електричний потенціометр НЗЗ9. Величину відносної деформації представляли як відношення: $[(L - L_p)/L_p]$, де L_p – значення довжини препарату ГМ у ненавантаженому стані, L – поточне значення довжини препарату.

2.3. Модель пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази в умовах хронічної дії на організм *in vivo*

Хронічну дію підвищених концентрацій убаїну і каліксарену С-107 (та у порівняльному аспекті – сполуки М-3) досліджували на нелінійних білих щурах популяції віварію біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка. За основу було взято протокол дослідження, який було розроблено раніше для убаїну [389].

Експериментальні групи формували зі щурів-самців віком 6 – 8 тижнів. Тварин випадковим чином ділили на 5 груп:

- ~ група № 1 – інтактні щури;
- ~ група № 2 – щури, яким ін'єктували фізіологічний розчин (0,9% NaCl) із вмістом неполярного розчинника диметилсульфоксиду (ДМСО);
- ~ група № 3 – щури, яким ін'єктували розчин убаїну, який було попередньорозведено в фізіологічному розчині;
- ~ група № 4 – щури, яким ін'єктували розчин каліксарену С-107, який було попередньо розведено в фізіологічному розчині;
- ~ група № 5 – щури, яким ін'єктували розчин сполуки фрагмент М-3, яку було попередньо розведено в фізіологічному розчині.

Усі ін'єкційні розчини (групи тварин №№ 2 - 5) готували так, щоб вони містили ДМСО у концентрації 1% (оскільки каліксарен С-107 та фрагмент М-3 є нерозчинними у воді, тому їх маточні розчини й готували в ДМСО).

Ін'єкції здійснювали внутрішньом'язово (об'єм одноразової ін'єкції – 50-100 мкл). Сумарна дія зазначених речовин тривала 6.5 місяців.

Першого дня тваринам груп №№ 3, 4 і 5 було введено речовини у дозах (розрахованих на 1 кг ваги тварини): убаїн - 34 мкг/кг, каліксарен С-107 - 46.3 мкг/кг, сполука М-3 - 23.7 мкг/кг (у випадках усіх трьох груп використовували еквімолярні концентрації зазначених речовин, що відповідало значенню 45,8 нмоль/г ваги тварини) [389]. Надалі щурам щодня протягом десяти тижнів вводили речовини у дозах відповідно 27.8, 37.9 та 19.4 мкг/кг (еквімолярні концентрації – 36,3 нмоль/г ваги тварини). Наступні чотири місяці усім тваринам три рази на тиждень ін'єктували речовини у концентрації першого дня.

2.4. Модель навантаження організму щурів нанорозмірним матеріалом TiO_2 в умовах хронічної дії на організм *in vivo*

Хронічну дію нанорозмірного матеріалу TiO_2 досліджували на щурах лінії Вістар популяції віварію ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Щурів утримували на стандартному харчовому раціоні та при стандартних умовах: температура 20 ± 2 °С, відносна вологість повітря 50-70%, світловий режим – світло:темрява = 12:12 годин. За основу було взято протокол дослідження, який було розроблено раніше [390] на основі даних щодо середньостатистичного надходження наночастинок TiO_2 з продуктами харчування у Великобританії (0,1 мг/кг щодобово).

Для експериментів були відібрані щури обох статей віком 6 тижнів. Тварин однієї статі випадковим чином ділили на 3 групи:

- ~ група № 1 – інтактні щури;
- ~ група № 2 – щури, яким щодня протягом 30 діб інтрагастрально вводили суспензію наночастинок TiO_2 із розрахунку 0,1 мг/кг;
- ~ група № 3 – щури, щодня протягом 100 діб інтрагастрально вводили суспензію наночастинок TiO_2 із розрахунку 0,1 мг/кг.

Для адекватного розрахунку кількості TiO_2 вагу тварин контролювали кожні 4-6 діб.

Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України „Про захист тварин від жорстокого поводження” Умертвіння щурів здійснювали під ефірним наркозом або введенням летальної дози (20 мг/кг) пропофолу («Sigma», США).

Безпосередньо після умертвіння щурів групи №1 здійснювали забір тканин і органів (сліпа кишка, матка, шлунок, нирки, легені та печінка) та промивання їх одноразово від залишків крові у фізіологічному розчині. Фрагменти м'язової стінки товстого кишечника (сліпої кишки) і шлунку із використанням біноккулярного мікроскопу за допомогою мікроножиць обережно звільняли від слизової оболонки. Фрагменти тканин, які планували для подальшого елементного аналізу за допомогою мас-спектрометра висушували за допомогою фільтрувального паперу та зважували.

Частину ГМ з антрального відділу шлунку, сліпої кишки та рогів матки використовували для дослідження скорочувальної активності. Вільні від слизової оболонки препарати ГМ, ізольованих з ШКТ, а також поздовжні смужки рогів матки (усередньому - 2 x 10 мм) поміщали в камеру тензометричного устаткування та досліджували їх скорочення в ізометричному режимі.

2.5. Препаративні процедури

ПМ клітин печінки з підвищеним вмістом фракції мембран жовчних протоків виділяли методом ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози [391] з деякими модифікаціями. Препаративні процедури (Рис. 2.3) передбачали використання розчинів такого складу: середовище А (мМ): 20 трис- HCl (рН 7,4 8°C), 250 сахароза, 2 ЕДТА, 600 KCl ; середовище В (ммоль/л): 20 трис- HCl (рН 7,4 8°C), 150 KCl .

Початково тканину печінки обережно промивали фізіологічним розчином, подрібнювали ножицями та гомегізували на льоду в гомогенізаторі Поттера у середовищі А. Гомогенат центрифугували 18 хв. при 6000g та відбирали надосадову рідину, яку нашаровували на ступінчастий градієнт сахарози у такому порядку і співвідношенні: 30 % сахароза, 0,6 М КСl : 15% сахароза, 0,6 М КСl : надосадова рідина = 6: 5: 20. Далі здійснювали центрифугування протягом 90 хв. при 105 000g та при температурі 8 °С. Після центрифугування фракцію ПМ збирали в зоні 15% та розводили охолодженим (4 °С) бідистилятом до 2.5% сахарози. Далі суспензію знову центрифугували протягом 60 хв. при 105 000 g та при температурі 8 °С. Збирали осад, який ресуспендували в середовищі В та зберігали у скрапленому азоті при 197 °С.

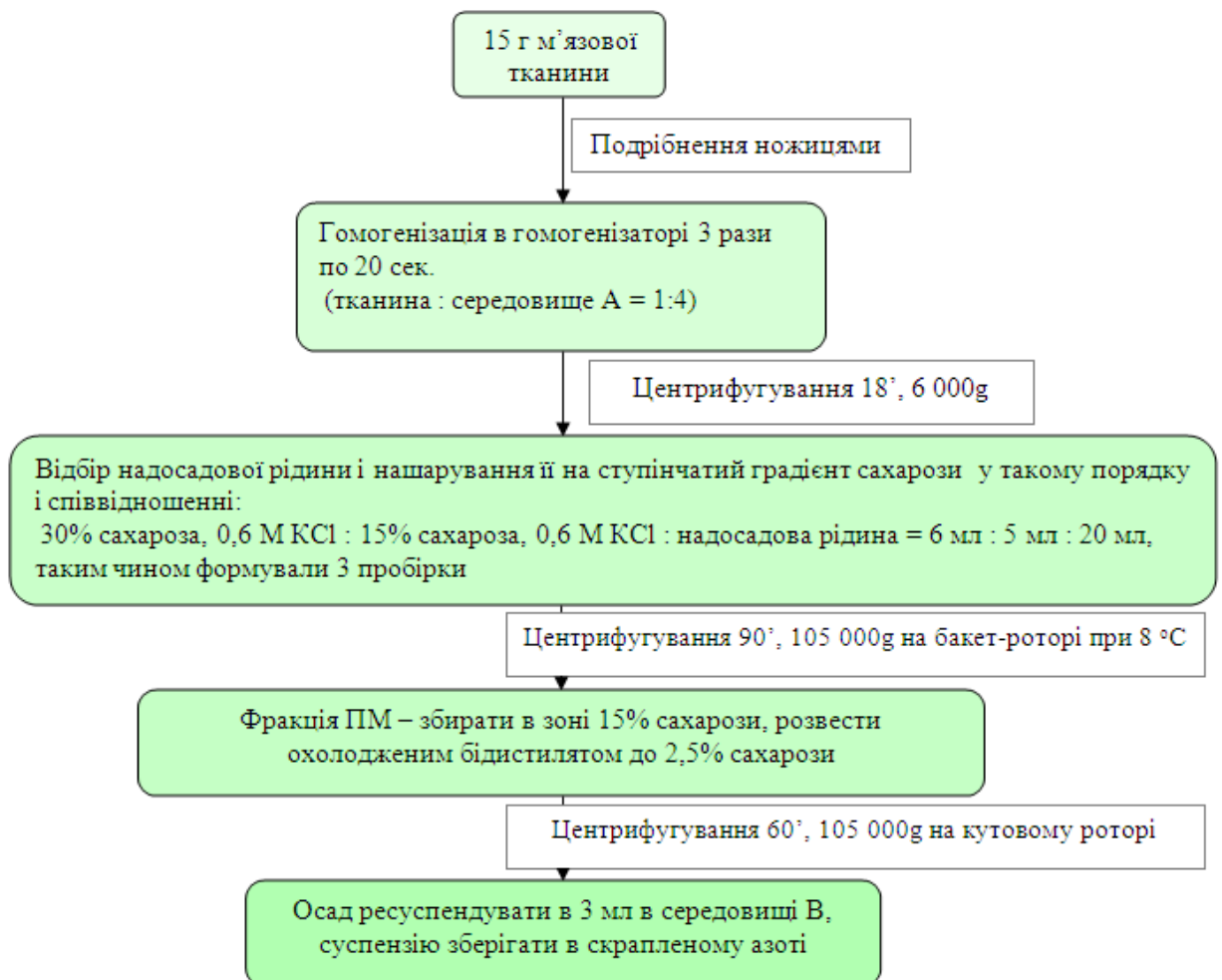


Рис. 2.3. Схема препаративних процедур при виділенні та очищенні препаратів фракції плазматичних мембран гепатоцитів щурів.

Препарати актоміозину і мозину з ГМ шлунку свині, серцевого м'язу бика і скелетних м'язів кроля отримували за загальноприйнятими методиками [392]. Чистоту препаратів контролювали методом електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію. Суперпреципітацію скорочувальних білків визначали в середовищі такого складу: 0.1 мг/мл натуральний актоміозин, 0.1 мМ CaCl_2 , 1 мМ MgCl_2 , 150 мМ KCl , 0.1 мМ EGTA, 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5 та температура 25 °C). Реакцію ініціювали внесенням АТФ (0.1 мМ) та реєстрували з використанням спектрофотометра SPECORD M40 (Германія) на довжині хвилі 450 нм.

2.6. Визначення АТФ-гідролазних активностей

Концентрацію білка у препаратах визначали за методом Lowry et al. [393].

Концентрацію ПМ у середовищі інкубації доводили до 20 мкг білка на 0,4 мл середовища інкубації. Na^+, K^+ -АТФ-азну активність ПМ визначали за різницею між загальною $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азною і базальною Mg^{2+} -АТФ-азною активностями. Останню визначали в присутності убаїну (10^{-3} М). Середовище інкубації препаратів ПМ у випадку загальної АТФ-азної активності містило (мМ): 100 NaCl, 20 KCl, 5 MgCl_2 , 0.5 EGTA, $5 \cdot 10^{-4}$ SDS, 20 Hepes-Tris-буфер (pH 7.4), 1 NaN_3 , 5 АТФ, pH 7.4. Кількість неорганічного фосфату, що виділився підчас реакції, визначали за методом Rathbun, Betlach [394]. Контролем на неферментативний гідроліз АТФ слугувало середовище інкубації, аналогічне за складом, але за відсутності в ньому фрагментів ПМ. Для контролю на кількість ендogenous $\text{P}_\text{н}$ використовували водний розчин ПМ. Загальну АТФ-азну активність обчислювали як різницю між кількістю $\text{P}_\text{н}$, що утворився в середовищі інкубації у присутності й за відсутності ПМ. При цьому було враховано поправку на вміст ендogenous $\text{P}_\text{н}$ в мембранному препараті. Ензиматичну активність виражали у [нмоль $\text{P}_\text{н}$ /хв $\cdot$ мг білка]. Тривалість інкубації препаратів ПМ при 37°C становила 4 хв. Ферментативну

реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (20-30 мкл) суспензії ПМ (8 °C), а зупиняли шляхом додаванням до інкубаційної суміші 1 мл розчину трихлороцетової кислоти (10%).

2.7. Визначення середнього розміру наночастинок методом електронної мікроскопії

У дослідженнях використовували комерційні препарати НЧ TiO_2 (PlasmaChem GmbH, D-12489 Berlin, Germany) у формі нанопорошку (суміш рутилу і анатазу), питома поверхня (50 ± 10) $\text{м}^2/\text{г}$; чистота $> 99.5\%$, вміст $\text{Al}_2\text{O}_3 < 0.3$ мас.%; $\text{SiO}_2 < 0.2$ мас. %.

Для визначення середнього розміру НЧ TiO_2 було застосованого метод електронної мікроскопії. Для приготування зразків TiO_2 нанопорошок ресуспендували в бідистиляті до концентрації 1 мг/мл, наносили в кількості 15 мкл на стерильні підложки та висушували. Вимірювання розмірів частинок проводили у автоматичному режимі із використанням скануючого електронного мікроскопу TescanMira 3 LMU (наданого для використання компанією "НаноМедТех", м. Київ). Було встановлено, що середній розмір наночастинок складає (21 ± 5) нм. (Рис. 2.4).

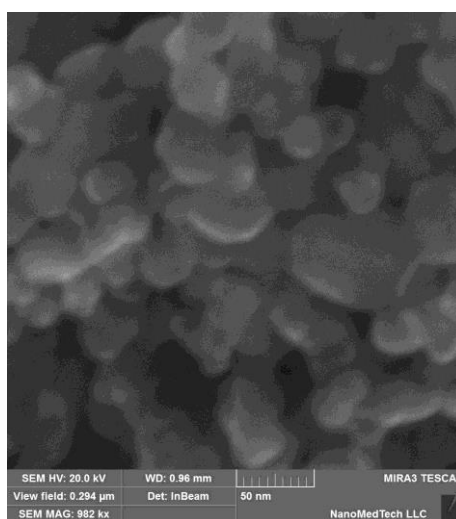


Рис.2.4. Електронномікроскопічна фотографія наночастинок діоксиду титану TiO_2 (PlasmaChem GmbH, D-12489 Berlin, Germany). Зображення одержано за допомогою скануючого електронного мікроскопу TescanMira 3 LMU ("НаноМедТех", м. Київ).

2.8. Визначення дзета-потенціалу наночастинок діоксиду титану

Нанопорошок TiO_2 для приготування більш якісної суспензії попередньо ресуспендували в диметилсульфоксиді з розрахунку присутності 0,25% ДМСО в кінцевому об'ємі. Для руйнування агрегатів застосовували ультразвукову обробку суспензії в ультразвуковій ванні.

Дзета-потенціал суспензії наночастинок TiO_2 вимірювали із використанням обладнання "Zetasizer Nano ZS" виробництва Malvern (люб'язно наданий компанією "НаноМедТех", м. Київ). Було встановлено, що дзета-потенціал TiO_2 з середнім розміром (21 ± 5) нм, який ресуспендували в розчині Кребса, у середньому становив $-7,93$ мВ.

2.9. Визначення елементного складу тканин методом атомно-емісійної спектроскопії

Якісний та кількісний елементний аналіз тканин щурів, зокрема з метою визначення включення наноматеріалу TiO_2 в тканинах ГМ ШКТ і матки, а також нирок, легень та печінки, здійснювали методом атомно-емісійної спектроскопії із використанням атомно-емісійного спектрометра AES Shimadzu ICPE-9000 (базується на ICP-MS - атомно-емісійній мас-спектрометрії індуктивно-зв'язаної плазми) (люб'язно наданий компанією "НаноМедТех", м. Київ). Технічні характеристики приладу: одночасне кількісне визначення 67 елементів у діапазоні концентрацій від 5 мг/л до декількох г/л; - чутливість 1-10 ppb; стабільність $\pm 0.3\%$; спектральний діапазон 167 - 800 нм.

Для приготування зразків (їх мінералізації) дослідження наважки препаратів тканин і органів поміщали у PTFE (політетрафторетилен) – рукав високого тиску. До наважок-препаратів додавали 10 мл HNO_3 65%. Потім препарати нагрівали до 200°C у мікрохвильовому дегістері CEM MAPS 5 впродовж 20 хв. Після охолодження об'єм мінералізованих зразків доводили водою I класу (її опір становив 18МОм/см) до 100 мл³. Елементний склад

отриманих розчинів проводили із використанням атомно-емісійного спектрометра. Умови запису спектру становили:

- ~ Ignition Mode: Normal(Water),
- ~ Attached Instruments: Mini Torch,
- ~ Radio Frequency Power: 1.20 kW,
- ~ Plasma Gas: 10.00 L/min,
- ~ Auxiliary Gas: 0.60 L/min,
- ~ Carrier Gas: 0.70 L/min,
- ~ Exposure Time: 30 sec,
- ~ Condition: Wide Range.
- ~ Instrument name: B41844700444.

2.10. Аналіз кінетичних параметрів спонтанної скоротливої активності гладеньких м'язів

Реєстрацію спонтанної скоротливої активності з метою її аналізу та порівняння даних здійснювали не раніше, ніж через 60 хв. після вміщення препарату ГМ у термостатовану при $(37 \pm 0,2)$ °C камеру тензометричного устаткування та надання йому навантаження.

Про ефективність спонтанної скоротливої діяльності вісцеральних ГМ судили за наступними показниками (Рис. 2.5): тривалістю скорочень, пауз між ними, тривалістю окремих фрагментів скорочень (наростання сили – фаз скорочення, та спаду сили – фаз розслаблення), коефіцієнтом асиметрії (відношення тривалості фази скорочення до тривалості фази розслаблення), скоротливим циклом (тривалість скорочення та паузи після нього), індексом активності скорочень (відношення тривалості скорочень до тривалості пауз між ними) [395].

Також визначали середню швидкість наростання скорочення (F_{max}/t – відношення амплітуди скорочення до часу її досягнення); диференціюванням фрагментів механограм скорочувальних відповідей встановлювали максимальні швидкості наростання сили скорочення ($V_{max, c}$) та її спаду при розслабленні ($V_{max, r}$) [395]. Таким чином, за співвідношеннями відповідних

максимальних швидкостей до і після дії фізико-хімічного ефектора можна судити про ефективність його дії на процеси транспортування Ca^{2+} у ГМК.

Врешті, для кількісного визначення змін ефективності сумарної скорочувальної активності ГМ використовували показники скоротливих індексів в одиницях Монтевідео (MU, його розраховували як добуток середньої амплітуди і частоти скорочень за 10 хв.) та Олександрійських одиниць (AU, його розраховували як добуток MU і середньої тривалості скорочень за 10 хв.). Ці показники початково було впроваджено в аналіз спонтанної скорочувальної активності ГМ матки, однак надалі їх вдало використовували також і для аналізу ритмокативності інших вісцеральних ГМ [396, 397].

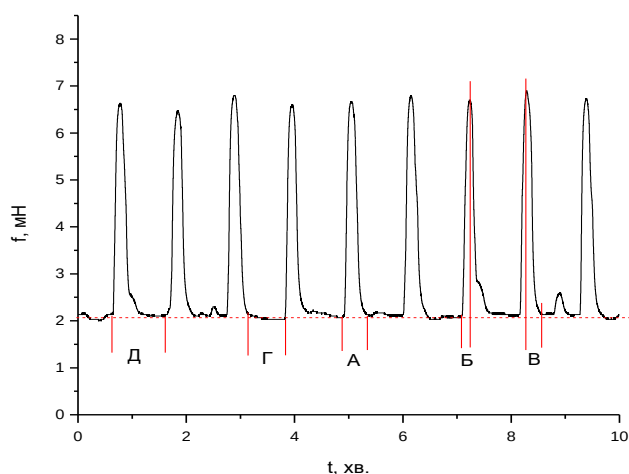


Рис. 2.5. Схематичне представлення способу визначення окремих параметрів спонтанної скоротливої активності вісцеральних ГМ (відповідно до [395]): А – тривалість скорочення; Б – тривалість фази скорочення, В – тривалість фази розслаблення, Г – тривалість паузи між скороченнями, Д – тривалість скоротливого циклу. Наведено типову механограму спонтанних скорочень поздовжніх ГМ матки щурів.

2.11. Механокінетичний аналіз процесів скорочення та розслаблення гладеньких м'язів

Аналіз кінетичних закономірностей процесів скорочення та розслаблення ГМ препаратів проводили окремо на рівні фаз скорочення та

розслаблення повної механокінетичної кривої із використанням модифікованого методу С.О. Костеріна та Ф.В. Бурдиги [398]. Даний метод постулює, що фрагмент механограми поодинокого скорочення, а саме фаза розслаблення (Рис. 2.6), може бути задовільно описаний емпіричним рівнянням:

$$f = f_m \frac{\tau^n}{\tau^n + t^n} \quad (2.1)$$

де: f – миттєва сила скорочувальної відповіді ГМ (в момент часу t);
 f_m – максимальна сила фазного скорочення ГМ;
 τ – характеристичний час скорочувальної відповіді (момент часу, в яких миттєва сила розслаблення м'язу дорівнює половинному значенню максимальної сили: $f = 0,5 f_m$);
 n – логарифмічний декремент крутизни механокінетичної кривої, тобто $n = d\{\ln[(f_m-f)/f]\}/dt$.

Час, у який досягається f_m , приймають за початкову точку відліку фази розслаблення $t = 0$ (Рис. 2.6), тоді як поточному значенню часу t відповідає значення миттєвої сили f .

Лінеаризованою формою рівняння (2.1) є наступна:

$$\ln\left(\frac{f_m - f}{f}\right) = n \ln t - n \ln \tau \quad (2.2)$$

Тоді за рівнянням (2.2) фазу розслаблення можна лінеаризувати у координатах $\left\{ \ln\left(\frac{f_m - f}{f}\right); \ln t \right\}$; з неї визначаються параметри: τ та n .

Значення n і τ використовували для розрахунку нормованої максимальної швидкості фази розслаблення (V_n):

$$V_n = \frac{(n-1)^{\frac{n-1}{n}} \cdot (n+1)^{\frac{n+1}{n}}}{4n\tau}. \quad (2.3)$$

Важливо відмітити, що параметр нормованої максимальної швидкості (2.3) не залежить від амплітуди, тому може бути надзвичайно корисним для

порівняння даних, отриманих на різних препаратах тощо. Даний метод дозволяє розраховувати механокінетичні параметри, які характеризують спонтанні або викликані скоротливі відповіді та не залежать від амплітуди.

Нами було здійснено вдалу апробацію застосування даного методу також і до фази скорочення [398, 400]. Детальна інформація щодо застосування методу Ф.А. Бурдиги та С.О. Костеріна [398] до аналізу механокінетики процесу скорочення наведена в Розділі 4.

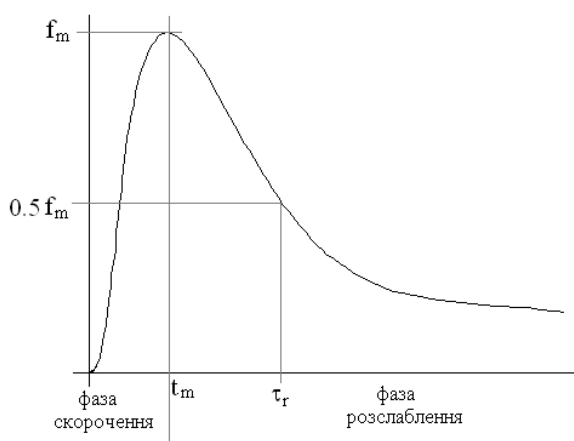


Рис. 2.6. Схема ідеалізованої скоротувальної відповіді ГМ: показано її поділ на фази скорочення та розслаблення. Тут: f_m – максимальна сила фазного скорочення гладенького м'язу, τ_r – характеристичний час процесу розслаблення.

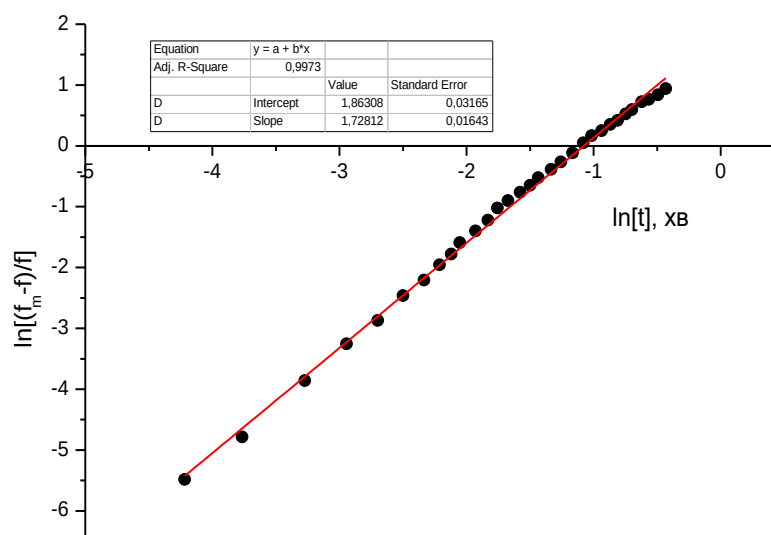


Рис. 2.7. Лінеаризація фази розслаблення механокінетичної кривої. Як видно, лінеаризація вдала, а коефіцієнт детермінації R^2 дорівнює 0,997. Наведено типовий графік лінеаризації.

2.12. Комп'ютерне моделювання наноматеріалів TiO₂, а також їх взаємодії з метаботропними рецепторами

Для комп'ютерних експериментів було проведено конструювання тривимірної структури НЧ TiO₂; за основу взято дані та методологію наукової групи під керівництвом Qazi Mohd. S. J. [401]. Структуру наночастинки сконструйовано та вдосконалено за допомогою програмного забезпечення DiscoveryStudioVisualizer версій 2.0 та 2.5 (AccelrysSoftwareInc. - <http://accelrys.com/>) з урахуванням даних кристалографії поліморфу анатазу. Параметри елементарної комірки TiO₂ складалі: $A = B = 3.785 \text{ \AA}$; $C = 9.514 \text{ \AA}$, де A , B , C – довжини кристалічної ґратки. $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, де α , β , γ – розміри кутів кристалу. Просторова група симетрії (сукупність перетворень симетрії, властивих атомній структурі кристалів) діоксиду титану I4(1)/amd [402, 403].

Просторову структуру мускаринового ацетилхолінового рецептора M₂-підтипу було взято з бази даних Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), запис 4MQS. Цей запис не є повним; він містить дані кристалографічного дослідження фрагментів поліпептидного ланцюга з 19 по 215 та з 377 по 456 амінокислотних залишки.

Пошук і аналіз сайтів взаємодії M₂-холінорецептора з наночастинкою TiO₂ здійснювали за допомогою PatchDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>), алгоритм молекулярного докінгу на основі геометрії. Даний алгоритм передбачає здійснення докінгу у три етапи: Molecular Shape Representation, Surface Patch Matching та Filtering and Scoring; з огляду на дві молекули, PatchDock обчислює тривимірні перетворення однієї з молекул по відношенню до іншої з метою максимізації комплементарності форми поверхні, мінімізуючи кількість стеричних зіткнень. Візуалізацію та аналіз контактних поверхонь здійснювали за допомогою програмного забезпечення Discovery Studio Visualizer версій 2.0 та 2.5.

2.13. Статистична обробка результатів

Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики із використанням програм OriginPro8 та Statistica 7.0 [404]. Перевірку вибірок на їх приналежність до нормально розподілених генеральних сукупностей здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка.

Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами двох вибірок, для яких було підтверджено приналежність до нормально розподілених сукупностей, використовували t-критерій Стюдента для залежних або незалежних груп даних.

У випадку одночасного порівняння понад двох вибірок застосовували однофакторний дисперсійний аналіз. Застосування параметричного однофакторного дисперсійного аналізу здійснювали після підтвердження нормального розподілу усіх груп даних тестом Шапіро-Уїлка, а також підтвердження рівності дисперсій груп тестом Левена. Для апостеріорного аналізу використовували тести Шеффе і Тьокі.

Аналіз достовірності апроксимації даних лінійною функцією здійснювали із використанням F-тесту Фішера; коефіцієнт кореляції Пірсона (r) був не нижчим від 0,95 та детермінації (R^2) був не нижчим від 0,9.

У всіх випадках достовірними вважали результати за умови значення ймовірності p , менше 5% ($p < 0.05$); в окремих випадках множинного порівняння застосовували поправку Бонферроні. Результати представлені як середнє арифметичне $\pm$ стандартна похибка середнього ($M \pm m$), n – кількість дослідів.

РОЗДІЛ 3

КІНЕТИЧНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ ПРОЦЕСІВ СКОРОЧЕННЯ ТА РОЗСЛАБЛЕННЯ ВІСЦЕРАЛЬНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ

3.1. Кінетичні закономірності скорочення-розслаблення ГМ товстого кишечника

3.1.1. Кінетичний аналіз спонтанних скорочень

Фундаментальним явищем, яке лежить в основі підтримання оптимального функціонування порожнистих органів травного тракту, є здатність до скорочення і розслаблення їх гладеньком'язових стінок. Скоординована скорочувальна активність функціонального синцитію ГМК забезпечується регуляцією з боку нейронів інтрамуральної нервової системи та ICC [54].

У товстому кишечнику щурів переважають пейсмейкерні клітини двох типів – ICC-SM (розташовані вздовж підслизової поверхні кільцевих м'язів у Мейснеровому сплетенні) та ICC-MY (містяться між кільцевим та поздовжнім м'язовими шарми в Ауербаховому сплетенні). Відомо [74, 456, 457], що кожний тип пейсмейкерів незалежно генерує власний патерн ритмоактивності: ICC-MY обумовлює низькоамплітудні скорочення з високою частотою (10-15 скорочень за хвилину), а ICC-SM – високоамплітудні з низькою частотою (0,5-1,5 скорочень за хвилину). Варто відзначити, що своїми властивостями товстий кишечник щурів, порівняно з іншими тваринними моделями, подібний до кишечника людини, тому дані отримані на тканині щурів можуть бути використані для інтерпретації результатів по вивченню моторики товстого кишечника людини.

Кільцеві гладенькі м'язи сліпої кишки (*caecum*) щурів генерують спонтанні скорочення, зразок типової механограми яких наведено на рис. 3.1.

У повній мірі механокінетику спонтанної скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів можна охарактеризувати за 14 параметрами, які оптимально визначати на фрагменті механограми за 10 хв. Ці параметри:

- ~ кількість скорочень впродовж 10 хв.;
- ~ середня амплітуда;
- ~ тривалість циклу скорочення-розслаблення (скоротливого акту);
- ~ тривалість пауз між скоротливими актами;
- ~ тривалість фаз скорочень;
- ~ тривалість фаз розслаблень;
- ~ коефіцієнт асиметрії (відношення тривалості фази скорочення до тривалості фази розслаблення);
- ~ скоротливий цикл (тривалість скоротливого акту та паузи після нього);
- ~ індекс активності скорочень (відношення тривалості скоротливого акту до тривалості пауз між ними);
- ~ середня швидкість наростання фази скорочення (f_{max}/t);
- ~ максимальна швидкість наростання сили скорочення ($V_{max, c}$);
- ~ максимальна швидкість спаду сили при розслабленні ($V_{max, r}$);
- ~ показник скоротливого індексу в одиницях Монтевідео (MU – добуток середньої амплітуди та на середньої частоти скорочень за 10 хв.);
- ~ показник скоротливого індексу в Олександрійських одиницях (AU – добуток MU на середню тривалість циклу скорочення-розслаблення).

Характер скорочувальної активності ГМ *саесит* (Рис. 3.1.) дозволив використати окремі кількісні характеристики спонтанних скорочень цих м'язів, за виключенням показників тривалості скоротливого циклу та індексу активності скорочень (Табл. 3.1.).

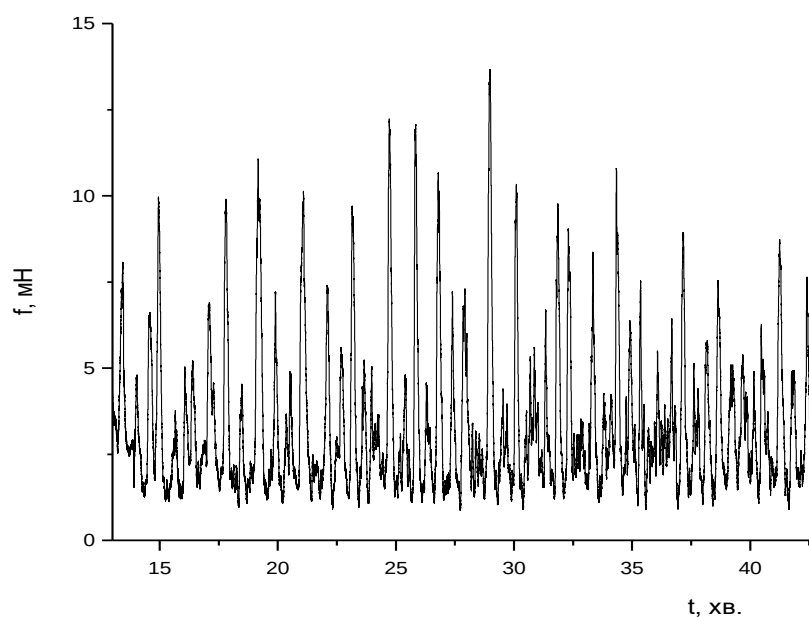


Рис. 3.1. Спонтанна скорочувальна активність кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки (*caecum*) щурів. Наведено типову механограму.

Таблиця 3.1.

Кінетичні параметри спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки (*caecum*) щурів, $n=12$

Параметр спонтанних скорочень	$M \pm m$
Кількість скорочень/10 хв.	$44,0 \pm 1,8$
Амплітуда, мН	$3,53 \pm 0,36$
Тривалість циклу скорочення-розслаблення, с.	$12,5 \pm 0,7$
Тривалість фази скорочення, с.	$5,2 \pm 0,4$
Тривалість фази розслаблення, с.	$6,95 \pm 0,40$
Коефіцієнт асиметрії	$1,20 \pm 0,07$
Середня швидкість наростання сили фази скорочення (f_{max}/t), мН/хв.	$53,53 \pm 8,56$
Середня швидкість спаду сили фази розслаблення (f_{max}/t), мН/хв.	$49,83 \pm 8,69$
Індекс скоротливої активності в одиницях Монтевідео, ум.од.	$155,3 \pm 12,6$
Індекс скоротливої активності в Олександрійських одиницях, ум.од.	$1887,1 \pm 96,9$

Також із застосуванням частотного аналізу зустрічності амплітуд спонтанних скорочень встановлено наявність двох виражених максимумів: з високою амплітудою (враховували скорочення з максимальною силою понад 6,5 мН) і низькою частотою, а також з низькою амплітудою і високою частотою. Високоамплітудні спонтанні скорочення *саесит* характеризувались показниками: середня амплітуда $9,28 \pm 0,71$ мН, частота $1,11 \pm 0,35$ хв⁻¹. Низькоамплітудні скорочення мали середні показники: середня амплітуда $2,39 \pm 0,19$ мН і частота $5,45 \pm 0,37$ хв⁻¹.

3.1.2. Кінетичний аналіз викликаних скорочень інтактних м'язів.

Закономірності механокінетичних параметрів скорочувальної активності ГМ товстого кишечника досліджували із використанням активаторів скорочень з різними механізмами дії, зокрема, в умовах деполяризації ПМ ГМК гіперкалієвим розчином (80 мМ) та активації мускаринових холінорецепторів агоністом ацетилхоліном (10^{-5} М). Аналіз кінетичних закономірностей процесів скорочення-розслаблення проводили окремо на рівні фаз скорочення та розслаблення повної механокінетичної кривої із використанням модифікованого методу Костеріна С.О. та Бурдиги Ф.В. (його опис наведено в розділі «Матеріали і методи») [398].

Фаза зростання м'язового напруження («фаза скорочення») у випадку скорочень, викликаних деполяризацією гіперкалієвим розчином, добре лінеаризувались в координатах $\{\ln[(f_m - f)/f]; \ln t\}$ ($r = 0,96 - 0,99$) з гарною відтворюваністю параметрів n і τ (Табл. 3.2). Наприклад, для типової механограми K⁺-індукованої скорочувальної відповіді ГМ *саесит* (Рис. 3.3, А) при амплітуді фазного скорочення 15,6 мН, лінеаризація фази скорочення характеризувалась коефіцієнтом кореляції $r = 0,98$ ($p < 0,001$) (Рис. 3.3, Б), а показники n і τ , відповідно, становили: 3,17 і 0,10 хв.; значення ж нормованої максимальної швидкості скорочення V_{nc} складало 8,51 хв⁻¹.

При лінеаризації фази спаду м'язового напруження («фази розслаблення») у координатах $\{\ln[(f_m - f)/f]; \ln t\}$, у випадку скорочувальних

відповідей, викликаних деполяризацією ПМ гіперкалієвим розчином, було отримано гарні лінійність ($r = 0,98 - 0,99$, $p < 0,001$) та відтворюваність параметрів n і τ (Табл. 3.2). Так, наприклад, для механограми наведеної на (Рис. 3.3, А), лінеаризація фази розслаблення характеризувалась коефіцієнтом кореляції ($r = 0,99$), а показники n і τ відповідно складали: 1,93 і 0,25 хв.; значення V_{nr} складало $2,54 \text{ хв}^{-1}$.

Також нами було показано можливість застосування зазначеного методу для аналізу скорочень кільцевих ГМ сліпої кишки, активованих аплікуванням нейромедіатора ацетилхоліну (10^{-5} M). Так, не зважаючи на наявність осциляцій напруження на тоничній складовій скорочувальних відповідей (в нашому випадку це частина фази розслаблення) було отримано лінеаризацію, яка характеризувалась коефіцієнтом детермінації $R^2 \geq 0,9$ ($p < 0,001$) [458]. Наприклад, для скорочення, наведеного на рис. 3.4, амплітуда якого становила 14,1 мН, розраховані параметри n , τ та V_n для фази скорочення приймали значення, відповідно, 3.14, 0.07 хв. і $12,43 \text{ хв}^{-1}$ ($r = 0,98$). Для фази розслаблення показники n , τ та V_n дорівнювали, відповідно, 1.04, 0.61 хв. і $1,42 \text{ хв}^{-1}$ ($r = 0,96$).

Усереднені значення кінетичних параметрів викликаних активацією збудження агоністам мускаринових холінорецепторів ацетилхоліном (10^{-5} M) та деполяризацією ПМ ГМК гіперкалієвим розчином (80 мМ) для кільцевих м'язів *saesut* щурів наведено в табл. 3.2.

У ГМ товстого кишечника щурів експресуються гістамінові рецептори H_1 , та H_2 та H_3 типів [459-462]. Метаботропні H_1 -рецептори спряжені з $G_{q/11}$ -білками та при їх активації, як і M_3 -холінорецептори забезпечують ІТФ-залежну мобілізацію іонів Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо. Гістамінові H_2 -та H_3 -рецептори, розташовуючись пресинаптично, опосередковують ефект через модуляцію вивільнення нейромедіаторів з ентєральних нейронів [459-461]. Нами було встановлено, що параметри скорочень кільцевих ГМ *saesut*, індукованих гістаміном (10^{-5} M) у середньому становили: амплітуда ($3 \pm 0,3$) мН ($n=7$), V_{nc} ($6,23 \pm 0,54$) хв^{-1} ($n = 7$) та V_{nr} ($3,73 \pm 0,32$) хв^{-1} ($n = 7$).

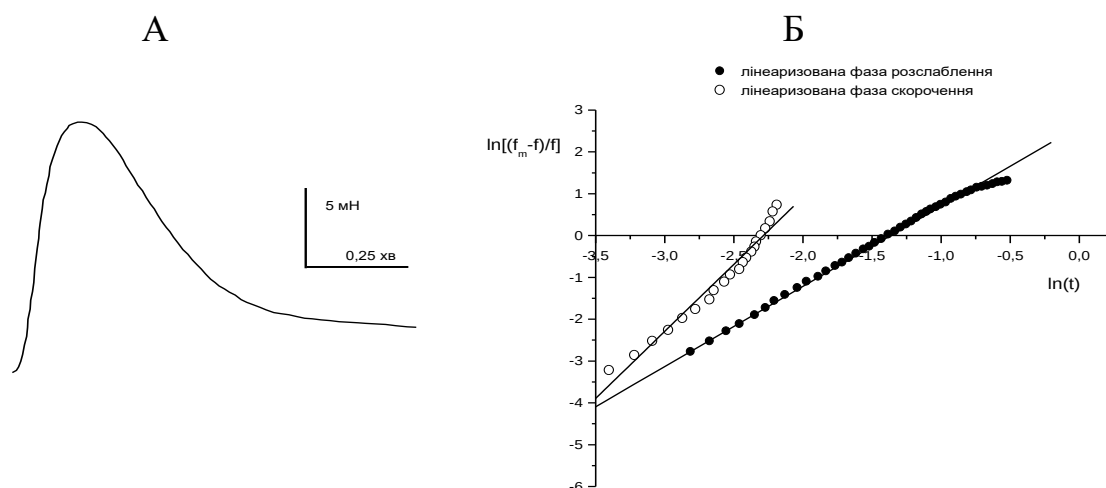


Рис. 3.3. Типова механограма скорочення кільцевих ГМ *саесит* щурів, викликаного деполяризацією гіперкалієвим розчином (80 мМ) (А) та лінеаризовані в координатах $\{\ln[(f_m - f)/f]; \ln t\}$ криві окремо фаз скорочення (порожні кола) та розслаблення (зафарбовані кола) (Б). Коефіцієнти при проведенні кореляційного і регресійного аналізів: $r = 0,98-0,99$ ($p < 0,001$).

Таблиця 3.2.
Кінетичні параметри викликаних аплікацією гіперкалієвого розчину (80 мМ) та ацетилхоліну (10^{-5} М) скорочень кільцевих гладеньких м'язів *саесит* щурів, $n=25$

Активатор скорочення	Параметр скорочення	$M \pm m$
Гіперкалієвий розчин (80 мМ)	Максимальна нормована швидкість фази скорочення V_{nc} , хв.^{-1}	$6,93 \pm 0,37 \text{ хв.}^{-1}$
	максимальна нормована швидкість фази розслаблення V_{nr} , хв.^{-1}	$2,26 \pm 0,08 \text{ хв.}^{-1}$
Ацетилхолін (10^{-5} М)	Максимальна нормована швидкість фази скорочення V_{nc} , хв.^{-1}	$10,36 \pm 0,61 \text{ хв.}^{-1}$
	максимальна нормована швидкість фази розслаблення V_{nr} , хв.^{-1}	$1,88 \pm 0,10 \text{ хв.}^{-1}$

В умовах пресинаптичної модуляції цих скорочувальних реакцій нікотинном (10^{-7} М) спостерігались достовірні зміни показників: амплітуда ($5,32 \pm 0,42$) мН, ($n=7$), V_{nc} ($4,35 \pm 0,37$) хв. $^{-1}$ ($n = 7$) та V_{nr} ($1,52 \pm 0,16$) хв. $^{-1}$ ($n = 7$) ($p < 0,05$); які, ймовірно, опосередковуються додатковим вивільненням нейромедіаторів з інтрамуральних нейронів стінки кишечника [463 - 465].

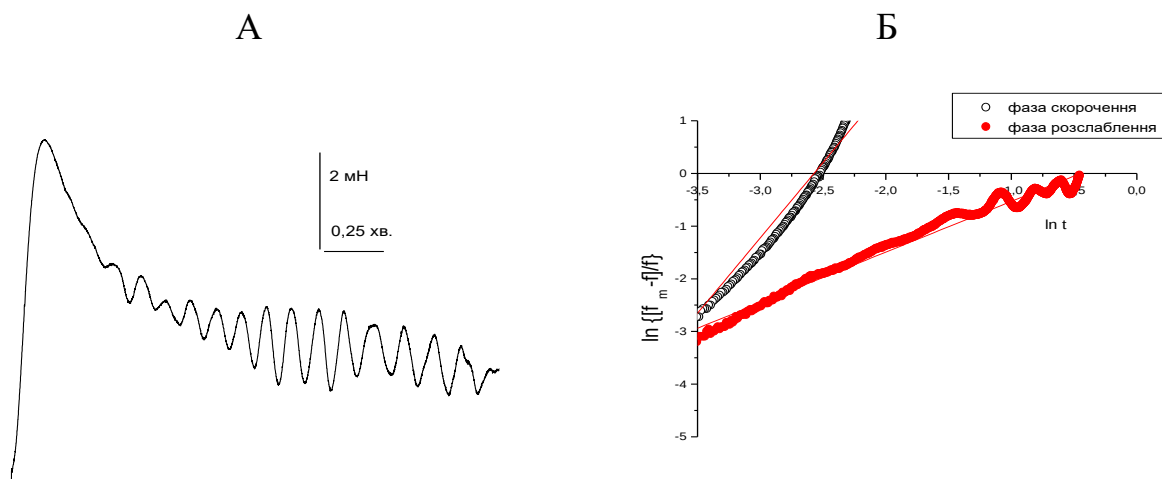


Рис. 3.4. Типова механограма скорочення кільцевих гладеньких м'язів *саесит* щурів, викликаного аплкуванням ацетилхоліну (10^{-5} М) (А) та лінеаризація її фрагментів (Б) у координатах $\{\ln[(f_m - f)/f]; \ln t\}$. Фрагменти механограми: фаза скорочення (порожні кола) та розслаблення (зафарбовані кола). Коефіцієнти кореляції при проведенні кореляційного і регресійного аналізів становили $r = 0,96-0,97$ ($p < 0,01$).

3.2. Кінетичні закономірності спонтанних і викликаних скорочень ГМ шлунку

3.2.1. Аналіз спонтанних скорочень.

Спонтанну скорочувальну активність кільцевих ГМ антрального відділу шлунку щурів характеризували аналогічно даних, представлених у п. 3.1. Як і у випадку спонтанних скорочень *саесит*, препарати м'язів шлунку генерували скорочення з чітко вираженими двома амплітудними максимумами: низькоамплітудні високочастотні: з середньою амплітудою 4

мН і відсноною частотою $(21,4 \pm 1,6)\%$ та високоамплітудні низькочастотні – з середньою амплітудою 11,5 мН і відсноною частотою $(14,3 \pm 0,9)\%$. Аналогічно, скорочення м'язових препаратів з низькою амплітудою зустрічались з достовірно вищою частотою, ніж скорочення з високою амплітудою, що вказує на наявність декількох популяцій ІСС [466]. Ймовірно, що за генерування цих двох патернів ритмоактивності відповідають різні популяції ІСС. Усереднені значення кінетичних параметрів спонтанної скорочувальної активності кільцевих ГМ антрального відділу шлунку щурів зведено в табл. 3.3.

3.2.2. Аналіз викликаних скорочень.

Як було показано в п. 3.1, аналіз механокінетики скорочення-розслаблення препаратів ГМ дозволяє отримувати ряд кількісних показників, що можуть бути вдало використані надалі для передбачення окремих ланок впливу різних фармакологічних факторів і ксенобіотиків на ці тканини. Тому у наступній серії експериментів нами було досліджено механокінетичні параметри скорочень кільцевих ГМ шлунку щурів із використанням активаторів скорочень з різними механізмами дії: деполяризації ПМ ГМК гіперкалієвим розчином (80 мМ), активації мускаринових холінорецепторів агоністом ацетилхоліном (10^{-5} М), брадикінінових рецепторів брадикініном (10^{-5} М), а також гістамінових рецепторів гістаміном (10^{-5} М) та в умовах модуляції гістамінових і ацетилхолінових скорочень агоністом нікотинних холінорецепторів нікотинном (10^{-7} М).

Встановлено, що препарати кільцевих ГМ *antrum* шлунку щурів в умовах K^{+} -деполяризації деполяризації (80 мМ) розвивають скорочувальну відповідь, амплітуда фазної складової якої у середньому становить $(19,6 \pm 1,3)$ мН, тонічної складової – $(18,5 \pm 0,6)$ мН ($n=10$). Із застосуванням механокінетичного аналізу [398] скорочувальних реакцій виявлено, що нормована максимальна швидкість фази скорочення V_{nc} у середньому

становить $(5,69 \pm 0,47) \text{ хв}^{-1}$ ($n=10$) та розслаблення $V_{nr} - (1,33 \pm 0,11) \text{ хв}^{-1}$ ($n=10$).

Таблиця 3.3.

Кінетичні параметри спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів, $n=12$

Параметр спонтанних скорочень	$M \pm m$
Кількість скорочень/10 хв.	$12,0 \pm 0,6$
Амплітуда, мН	$12,0 \pm 1,0$
Тривалість циклу скорочення-розслаблення, с.	$48,0 \pm 3,4$
Тривалість фази скорочення, с.	$16,2 \pm 0,9$
Тривалість фази розслаблення, с.	$31,8 \pm 1,7$
Коефіцієнт асиметрії	$0,53 \pm 0,03$
Середня швидкість наростання сили фази скорочення (f_{max}/t), мН/хв.	$46,9 \pm 4,7$
Середня швидкість спаду сили фази розслаблення (f_{max}/t), мН/хв.	$23,3 \pm 2,6$
Індекс скоротливої активності в одиницях Монтевідео, ум.од.	$143,8 \pm 7,2$
Індекс скоротливої активності в Олександрійських одиницях, ум.од.	$6900,5 \pm 483,0$

Викликані аплікуванням ацетилхоліну (10^{-5} М) в нормальному розчині Кребса скорочення кільцевих ГМ антрального відділу шлунку характеризувались амплітудою фазної складової з середнім значенням $(14 \pm 1,2) \text{ мН}$, а її відношенням до тонічного компонента - $(1,25 \pm 0,05)$ ($n = 10$). Показники нормованих максимальних швидкостей цих скорочень у середньому складали: $V_{nc} (7,65 \pm 0,6) \text{ хв}^{-1}$ ($n = 10$) та $V_{nr} (2,13 \pm 0,2) \text{ хв}^{-1}$ ($n = 10$). У випадку аплікування ацетилхоліну (10^{-5} М) в номінально безкальцієвому розчині Кребса кінетичні показники скорочувальних реакцій V_{nc} і V_{nr} не виявляли достовірних відмінностей щодо параметрів у Ca^{2+} -вмісному середовищі і становили, відповідно $V_{nc} (7,1 \pm 0,65) \text{ хв}^{-1}$ ($n = 6$) та $V_{nr} (1,78 \pm 0,21) \text{ хв}^{-1}$ ($n = 6$) ($p > 0,05$).

Кінетичні параметри скорочень кільцевих ГМ *antrum*, індукованих гістаміном (10^{-5} М) у середньому складали: $V_{nc} (4,75 \pm 0,54) \text{ хв}^{-1}$ ($n = 6$) та $V_{nr} (2,27 \pm 0,31) \text{ хв}^{-1}$ ($n = 6$). В умовах пресинаптичної модуляції цих

скорочувальних реакцій нікотинном (10^{-7} М) спостерігалось достовірне зниження обох показників: V_{nc} ($2,62 \pm 0,44$) хв. $^{-1}$ ($n = 6$) та V_{nr} ($1,13 \pm 0,25$) хв. $^{-1}$ ($n = 6$) ($p < 0,05$).

Також нами було проаналізовано кількісні характеристики викликаних аплікуванням брадикініну (10^{-5} М) скорочень кільцевих ГМ фундального відділу шлунку щурів. Було встановлено, що в умовах прекоonstrикції м'язових препаратів аплікування брадикініну спричиняє двофазну реакцію: початкове розслаблення з наступною скорочувальною реакцією (Рис. 3.5.).

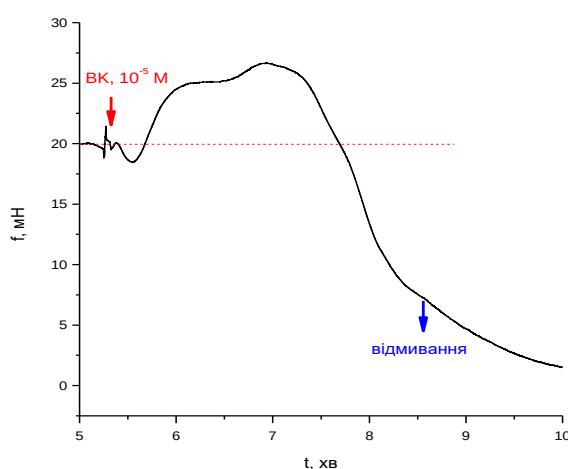


Рис. 3.5. Реакція кільцевих гладеньких м'язів фундального відділу шлунку на аплікування брадикініну (ВК, 10^{-5} М) в умовах прекоonstrикції. Наведено типову механограму.

Скорочувальні ВК-індуковані реакції аналізували методом [398]. Показники нормованих максимальних швидкостей цих скорочень у середньому складали: V_{nc} ($0,61 \pm 0,11$) хв. $^{-1}$ ($n=6$) і V_{nr} ($1,21 \pm 0,30$) хв. $^{-1}$ ($n=6$) [467].

3.3. Кінетичні закономірності скорочення-розслаблення поздовжніх гладеньких м'язів міометрія: спонтанні і викликані скорочення

3.3.1. Аналіз спонтанних скорочень.

Маткові труби містять ділянки з джерелами спонтанної активності в цервікальному і оваріальному відділах. Як встановлено науковою групою

Казаряна К.В. і колег [89-92], головним джерелом ритму в маткових трубах є оваріальний відділ. Головний утеротонічний гормон окситоцин сприяє реалізації домінування оваріального відділу та скоординованому функціонуванню всіх ритмогенних ділянок міометрія [92]. Контроль збудливості та скорочувальної активності ГМ матки забезпечує підтримання фертильності, а також здатності виношування плоду та проходження пологів [468, 469]. За статистикою, принаймні половина випадків загибелі новонароджених у світі пов'язана саме з передчасними пологами, клітинною основою яких є порушення регуляції напруження ГМ і процесів скорочення-розслаблення міометрія.

Отримані нами усереднені дані спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів лінії Wistar (вік 3-5 місяців) наведено в табл. 3.4. Нами було також застосовано кінетичний аналіз циклів скорочення-розслаблення спонтанних скорочень. Показники нормованих максимальних швидкостей цих скорочень у середньому складали: V_{nc} ($8,42 \pm 0,39$) хв.⁻¹ ($n = 28$) та V_{nr} ($3,13 \pm 0,18$) хв.⁻¹ ($n = 37$).

3.3.2. Аналіз викликаних скорочень.

У наступній серії експериментів нами було досліджено механокінетичні параметри скорочень міометрія щурів із використанням активаторів скорочень з різними механізмами дії: деполяризації ПМ ГМК гіперкалієвим розчином (80 мМ), активації окситоцинових рецепторів утеротоніком окситоцином (0,1 МО) та мускаринових холінорецепторів нейротрансмітером ацетилхоліном (10^{-5} М). Варто відзначити, що у цій тканині обива зазначені агоністи активують рецептори, спряжені з $G_{q/11}$ -білками, і викликають скорочення за ІТФ-залежним шляхом [470].

Встановлено, що препарати міометрія в умовах K^{+} -деполяризації деполяризації (80 мМ) розвивають скорочувальну відповідь, кінетичні параметри якої у середньому становлять: нормована максимальна швидкість фази скорочення V_{nc} ($4,03 \pm 0,54$) хв.⁻¹ ($n = 7$); нормована максимальна швидкість фази розслаблення V_{nr} ($0,52 \pm 0,06$) хв.⁻¹ ($n = 7$).

Таблиця 3.4.

Кінетичні параметри спонтанних скорочень поздовжніх гладеньких м'язів
міометрія щурів, n=12

Параметр спонтанних скорочень	M±m
Кількість скорочень/10 хв.	13,0±0,7
Амплітуда, мН	7,2±0,6
Тривалість маткового циклу, с.	47,2±1,7
Тривалість циклу скорочення-розслаблення, с.	25,2±1,0
Тривалість фази скорочення, с.	9,07±0,36
Тривалість фази розслаблення, с.	15,80±0,95
Тривалість пауз між скороченнями, с.	22,0±1,4
Коефіцієнт асиметрії	0,57±0,05
Середня швидкість наростання сили фази скорочення (f_{max}/t), мН/хв.	47,7±3,5
Середня швидкість спаду сили фази розслаблення (f_{max}/t), мН/хв.	27,6±1,1
Індекс скоротливої активності в одиницях Монтевідео, ум.од.	94,1±6,0
Індекс скоротливої активності в Олександрійських одиницях, ум.од.	2364,3±94,5

Скорочення препаратів міометрія, індуковані окситоцином (0,1 МО), можна у середньому охарактеризувати такими кінетичними параметрами: швидкість фази скорочення V_{nc} ($3,31 \pm 0,59$) хв⁻¹ (n=9); швидкість фази розслаблення V_{nr} ($0,23 \pm 0,05$) хв⁻¹ (n=9). Викликані аплікуванням ацетилхоліну (10^{-5} М) в нормальному розчині Кребса скорочення міометрія характеризувались такими кінетичними параметрами: швидкість фази скорочення V_{nc} ($3,67 \pm 0,47$) хв⁻¹ (n=6); швидкість фази розслаблення V_{nr} ($0,24 \pm 0,13$) хв⁻¹ (n=6).

3.4. Модуляція фізико-хімічними та метаболічними факторами механокінетики скорочення-розслаблення вісцеральних гладеньких м'язів

Фізико-хімічні параметри суттєво впливають на скорочувальну активність вісцеральних ГМ [471-474], змінюючи її кінетику.

3.4.1. Вивчення ролі іонів Na^+ в реалізації процесів скорочення-розслаблення вісцеральних гладеньких м'язів.

Відомо, що іони Na^+ є одними з визначальних для підтримання функціональної здатності збудливих тканин, зокрема і ГМ. По-перше, вони надходять до міоцитів через неселективні катіонні канали (НСКК) при активації мускаринових ацетилхолінових рецепторів, забезпечуючи таким чином значний вклад в розвиток збудження. По-друге, трансмембранний градієнт іонів Na^+ , що підтримується Na^+ , K^+ -АТФ-азою плазматичної мембрани, створює рушійну силу для забезпечення вторинного активного транспорту, яким переносяться через мембрану інші іони, зокрема Ca^{2+} , глюкоза, амінокислоти. Так, наприклад, при порушенні градієнту іонів Na^+ спостерігається перехід системи $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника у реверсний режим роботи, що спричиняє замість виведення кальцію з клітин їх додаткове закачування. Також трансмембранний градієнт іонів Na^+ є важливим регулятором функціонування внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо, принаймні ІТФ-чутливого пулу СР.

Відомо, що зниження концентрації іонів Na^+ в омиваючому ГМ розчині спричиняє швидке зниження концентрації цих іонів в міоцитах. Так, дослідженнями наукової групи під керівництвом Bulbring E. показано [475], що інкубація препаратів ГМ упродовж 20 – 30 хв. у середовищі зі зниженим вмістом Na^+ , дозволяє викликати падіння внутрішньоклітинної концентрації цих катіонів з близько 12 мМ до величини <1 мМ.

Нами було досліджено механокінетику процесів скорочення-розслаблення ацетилхолін-індукованих скорочувальних відповідей кільцевих ГМ *saesit* щурів за часткової заміни іонів Na^+ в омиваючому препараті розчині на непроникні для ПМ міоцитів іон холін⁺ або Li^+ таким чином, що остаточна концентрація Na^+ становила 25 мМ (відносно звичайної концентрації в нормальному розчині Кребса 137 мМ).

Після витримування 30 хв. ГМ в гіпонатрієвому середовищі спостерігалось значне пригнічення скоротливих відповідей на аплікацію

ацетилхоліну (10^{-5} M): амплітуда фазної складової скорочень знижувалась до $(17,6 \pm 7,0)\%$ ($n = 7$, $p < 0,01$) порівняно з контролем, прийнятим за 100%. За цих умов спостерігалось також уповільнення наростання напруження препаратів так, що відбувалось достовірне збільшення показника часу досягнення амплітудного значення сили скорочення t_m до $(141,7 \pm 4,1)\%$ ($n = 7$, $p < 0,05$). Кінетичним аналізом за методом [398] було встановлено, що в умовах часткової заміни Na^+ холін⁺ відбувається суттєве зниження параметрів швидкостей фаз розслаблення (V_{nr}) та скорочення (V_{nc}) відповідно до $(75,7 \pm 12,4)\%$ ($n = 7$, $p < 0,05$) і $(64,8 \pm 7,4)\%$ ($n = 7$, $p < 0,05$). Аналогічні результати щодо змін амплітудних характеристик та нормованих максимальних швидкостей V_{nr} і V_{nc} ацетилхолінових скорочень було отримано при проведенні часткової заміни іонів Na^+ (залишкова концентрація 25 мМ, low- Na^+) в нормальному розчині Кребса на іони Li^+ .

Отже, отримані нами дані, по-перше, дозволяють підтвердити корисність застосування механокінетичного аналізу для встановлення кількісних змін скорочувальних відповідей та, то-друге, підтверджують важливість іонів Na^+ для реалізації ацетилхолін-індукованих скорочень інтестинальних ГМ [458, 476].

3.4.2. Встановлення закономірностей модуляції скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів іонами Mg^{2+} .

Поряд з іонами Na^+ , K^+ та Ca^{2+} , іони Mg^{2+} відіграють надзвичайно важливу роль у підтриманні функціональної активності клітин організму, регулюючи ензиматичну активність, метаболічні процеси та іонний транспорт. Так, понад 300 ензимів клітини є Mg^{2+} -залежними, зокрема і ензими первинного і вторинного активного транспорту іонів в ПМ міоцитів. Сульфат магнію достатньо широко використовується у медичній практиці як токолітичний засіб при патологічному протіканні вагітності (за необхідності зняти стан гіпертонус матки), що при відносно невеликій ефективності має порівняно з іншими токолітиками незначні побічні ефекти щодо організмів матері і плоду. Відомо, що у випадку застосування сульфату магнію,

токолітичною активністю володіють саме іони магнію, виконуючи роль антагоністів до Ca^{2+} [477]. Дослідженнями М. Phillippe [478] показано, що Mg^{2+} має декілька напрямків дії на ГМК, які призводять до пригнічення скорочувальної функції міометрія: зокрема, це ПКК ПМ та канали ІТФ-опосередкованого вивільнення іонів Ca^{2+} з СР. Разом з тим, не можна виключати ймовірність пригнічення скоротливості міометрія за рахунок модуляції іонами Mg^{2+} функціонування інших важливих іон-транспортувальних систем клітини, зокрема Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ, оскільки нещодавно біохімічними експериментами Apell H.J. і колег встановлена здатність до модуляції іонами Mg^{2+} функціонування Na^+, K^+ -АТФ-ази [479]. У зв'язку з цим, нами було проведено дослідження впливу підвищених концентрацій іонів магнію (5 та 12 мМ на противагу концентрації Mg^{2+} у нормальному фізіологічному розчині Кребса 1.2 мМ) на фармакомеханокінетику скорочення-розслаблення міометрія щурів за умови блокування Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ.

Заміна нормального розчину Кребса на гіпермагнієвий (концентрація іонів Mg^{2+} 5 мМ) супроводжувалось тимчасовим пригніченням спонтанних скорочень ГМ, які поступово відновлювались і через 20 хв після початку інкубації практично досягли контрольного рівня (Рис. 3.7.). Варто відзначити, що за цих умов спостерігалось також зростання швидкості V_{nc} у півтора рази порівняно з контролем, тоді як цей параметр фази розслаблення (V_{nr}) не зазнавав значущих змін (Рис. 3.9.). Разом з тим, головні параметри, які відображають продуктивність функціонування міометрія, - у Олександрійських одиницях та одиницях Монтевідео, були на рівні контролю (Рис. 3.8.). Отже можна зробити висновок, що помірне (у 4,2 рази) збільшення концентрації іонів Mg^{2+} у позаклітинному середовищі не спричиняє суттєвої перебудови фазної скорочувальної активності поздовжніх ГМ рогів матки щурів.

Внесення в гіпермагнієве середовище (концентрація іонів Mg^{2+} 5 мМ) блокатора Na^+, K^+ -АТФ-ази убаїну (10^{-4} М) спричиняло зниження середньої

амплітуди фазних скорочень міометрія, у той час як їх частота не змінювалась (Рис. 4.9.). За цих умов окремі параметри скорочувальної активності зазнавали значущих змін порівняно з контролем (Рис. 3.9.). Так, тривалість фази скорочення знижувалась з $(0,153 \pm 0,014)$ хв. в контролі, досягаючи $(0,126 \pm 0,010)$ хв. ($p < 0.05$, $n=7$); тривалість фази розслаблення зростала з $(0,159 \pm 0,02)$ хв. до $(0,187 \pm 0,04)$ хв. ($p < 0.05$, $n=7$), а асиметрія поодиноких скорочень (співвідношення між тривалостями фаз скорочення та розслаблення) знижувалась у середньому на 40% до $(0,672 \pm 0,05)$ ум.од. ($p < 0.05$, $n=7$). Індекс скоротливої активності зростав з $(3,12 \pm 0,7)$ ум.од. (у контролі) до $(5,37 \pm 0,37)$ ум.од. ($p < 0.05$, $n=7$).

Додавання убаїну (100 мкМ) до гіпермагнієвого розчину також спричинило вірогідні відносно контролю та відносно ефекту лише підвищеної позаклітинної концентрації іонів Mg^{2+} зменшення показників ефективності скоротливості міометрія: коефіцієнт в Олександрійських одиницях знижувався з $(3963,1 \pm 291,2)$ ум.од. в контролі (та $(4423,5 \pm 312,5)$ ум.од. при дії гіпермагнієвого середовища) до $(2562,1 \pm 184,2)$ ум.од. ($p < 0.05$, $n=7$); коефіцієнт у одиницях Монтевідео зменшувався з $(212,1 \pm 20,7)$ ум.од. в контролі ($(225,3 \pm 22,8)$ ум.од. при дії гіпермагнієвого розчину) до $(136,4 \pm 14,2)$ ум.од. ($p < 0.05$, $n=7$).

Наступна заміна омиваючого препарати гіпермагнієвого розчину (концентрація $MgCl_2$ 5 мМ) з убаїном на нормальний розчин Кребса (концентрація $MgCl_2$ 1,2 мМ) з убаїном (100 мкМ) супроводжувалась відносною активацією фазних скорочень міометрія (Рис. 3.7.). Кількісно це відобразилось у тенденціях до збільшення амплітуди скорочень з $(5,46 \pm 0,72)$ мН до $(6,26 \pm 0,24)$ мН ($p > 0.05$, $n=7$). Частота скорочень залишалась на рівні контролю, а тривалість фаз скорочення і розслаблення вірогідно підвищеними (відповідно, $(0,116 \pm 0,004)$ хв. і $(0,199 \pm 0,007)$ хв., $p < 0.05$, $n=7$) порівняно з контролем (Рис. 3.6.). Показник асиметрії складав $(0,591 \pm 0,01)$ ум.од. Тривалість скоротливого циклу залишалась на рівні попередніх показників та становила $(0,41 \pm 0,01)$ хв. Індекс активності скорочень, який

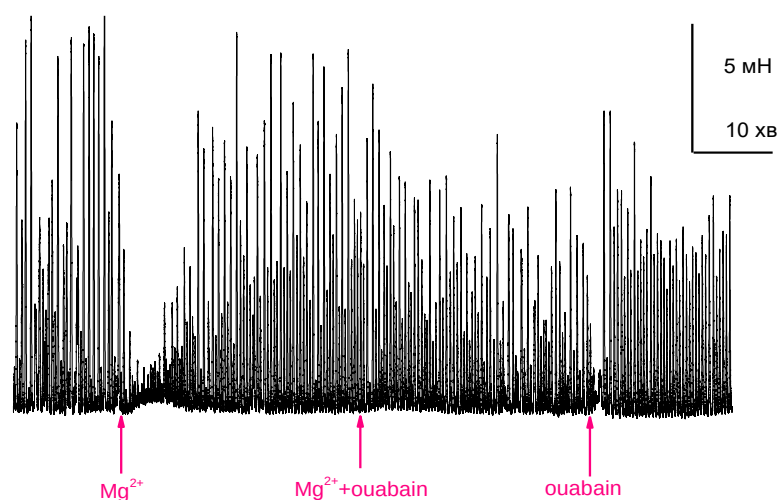


Рис. 3.7. Спонтанна скорочувальна активність поздовжніх гладеньких м'язів міометрія щурів в умовах гіпермагнієвого омиваючого середовища (Mg^{2+} , 5 мМ) та її модуляція у присутності інгібітора Na^+ , K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани убаїну (ouabain, 100 мкМ). Наведено типову механограму.

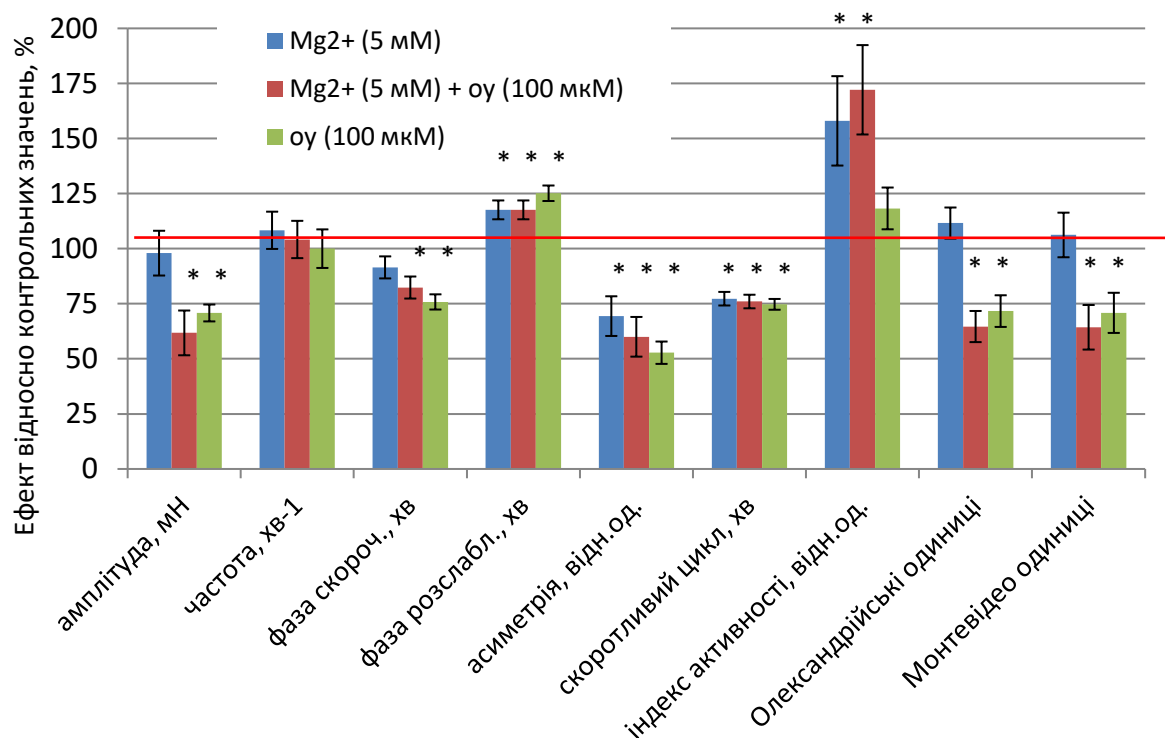


Рис. 3.8. Зміни параметрів спонтанних скорочень міометрія щурів в умовах гіпермагнієвого середовища (5 мМ) та їх модуляція убаїном [Mg^{2+} (5 мМ) + оу (100 мкМ)], а також використання нормального розчину Кребса з убаїном (10^{-4} М) [оу (100 мкМ)]. За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі (вісь ординат). * - $p < 0.05$ – різниця достовірна щодо контролю.

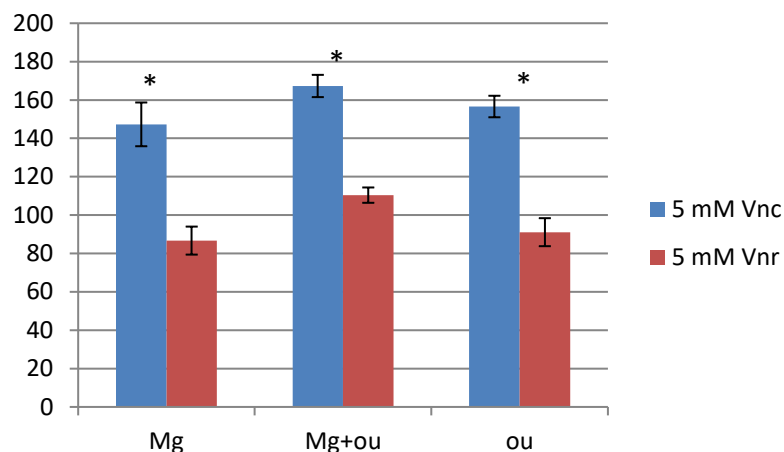


Рис.3.11. Зміни параметрів спонтанних скорочень міометрія щурів в умовах дії гіпермагнієвого середовища (5 мМ) та їх модуляція при додаванні убаїну [Mg^{2+} (5 мМ) + ou (100 мкМ)], а також використання нормального розчину Кребса з убаїном (100 мкМ) [ou (100 мкМ)]: нормовані максимальні швидкості фази скорочення (V_{nc}) та фази розслаблення (V_{nr}); $n=7$. * - $p<0.05$ – різниця достовірна відносно контролю.

розраховували як відношення тривалості скорочень до пауз між ними, повернувся до контрольного рівня і склав $(3,69 \pm 0,35)$ ум.од. Показники скоротливих індексів в одиницях Монтевідео та Олександрійських одиницях залишались зниженими відносно контролю ($(2840,0 \pm 204,1)$ ум.од. і $(150,3 \pm 13,7)$ ум.од., відповідно, $p<0.05$, $n=7$) (Рис. 3.8.).

На фоні підвищеної концентрації Mg^{2+} (5 мМ) внесення в омиваючий ГМ розчин інгібітора Na^+, K^+ -АТФ-ази убаїну (10^{-4} М) супроводжувалось пригніченням спонтанної скорочувальної активності (Рис. 3.9): спостерігалось зниження амплітуди скорочень без зміни їх частоти. Кінетичним аналізом встановлено, що за цих умов нормована максимальна швидкість V_{nc} збільшувалась у середньому до 167% порівняно з контролем (це на 20% більше, порівняно з активацією V_{nc} лише гіпермагнієвим розчином). Швидкість V_{nr} була близькою до контрольних значень (Рис.3.9.).

Наступна заміна омиваючого ГМ середовища на нормальний розчин Кребса (з концентрацією іонів Mg^{2+} 1.2 мМ) з убаїном (10^{-4} М) супроводжувалась активацією спонтанних скорочень (Рис. 3.7.). За цих умов

нормована максимальна швидкість фази скорочення залишилась підвищеною, а відповідний показник фази розслаблення був на рівні контролю (Рис. 3.9.). Варто відзначити, що такі кінетичні параметри окремих спонтанних скорочень загалом відповідали показникам, отриманим при вивченні закономірностей впливу убаїну на скорочувальну активність міометрія (дані наведено у пункті 3.3.).

У наступній серії експериментів було досліджено спонтанну скорочувальну активність міометрія при значному підвищенні концентрації іонів Mg^{2+} (12 мМ) в омиваючому розчині. Оскільки ці іони за функціональним спрямуванням є антагоністами іонів Ca^{2+} , десятикратне збільшення їх концентрації супроводжувалось значним пригніченням фазних скорочень (Рис. 3.10.). Заміна нормального розчину на гіпермагнієвий супроводжувалась незворотнім зниженням амплітуди скорочень з $(17,6 \pm 1,09)$ мН в контролі до $(4,93 \pm 1,6)$ мН ($p < 0.05$, $n = 6$); також суттєво зменшувалась їх частота (Рис. 3.10.). За цих умов окремі характеристики спонтанних скорочень не зазнавали вірогідних змін. Так, параметри тривалості фаз скорочення і розслаблення, а також їх співвідношення (асиметрія) не мали значних відмінностей порівняно з контролем. Також кінетичні характеристики цих фрагментів фазних скорочень були частково нечутливими до рівня позаклітинної концентрації іонів Mg^{2+} : швидкість V_{nc} не змінювалась, а швидкість V_{nr} достовірно зростала на чверть (Рис. 3.11.).

Оскільки значне підвищення концентрації позаклітинного магнію спричинило суттєве зниження не лише амплітуди, але й частоти фазних скорочень, це відобразилось у підвищенні тривалості скоротливого циклу (Рис. 3.10.). Також зазначені причини обумовили суттєве (в середньому у п'ять разів) зменшення низки параметрів: індексу скоротливої активності та показників скоротливих індексів в одиницях Монтевідео і Олександрійських одиницях.

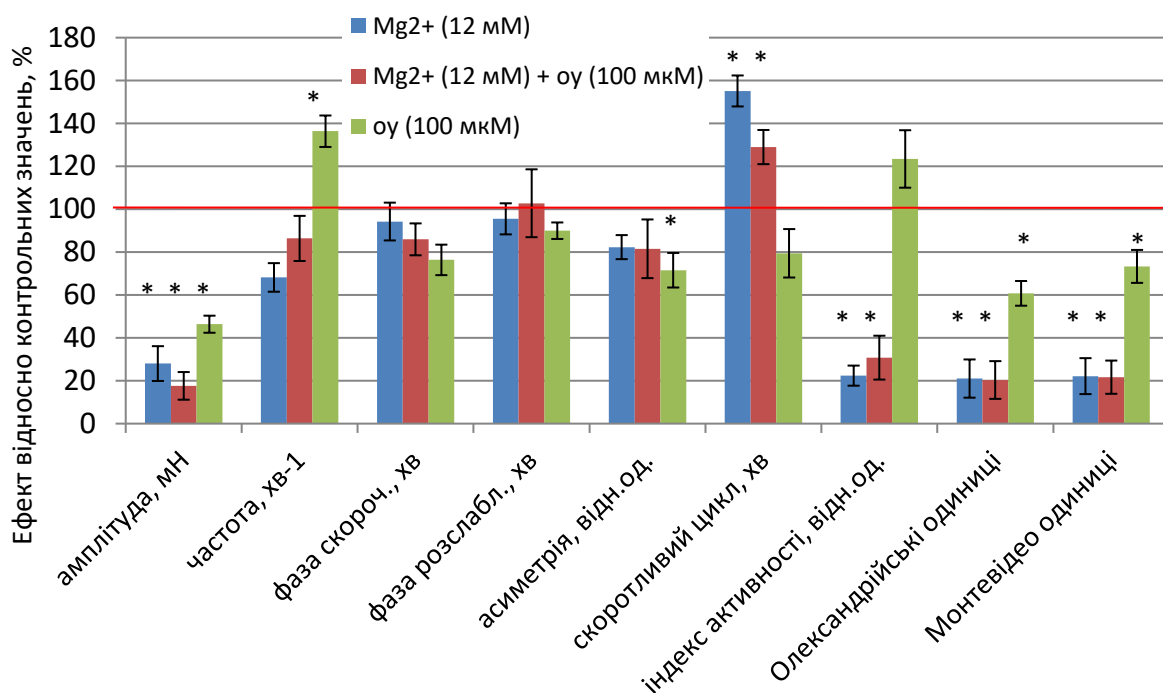


Рис. 3.10. Зміни параметрів спонтанних скорочень міометрія щурів в умовах дії гіпермагнієвого середовища (12 мМ) та їх модуляція уабаїном [Mg²⁺ (12 мМ) + ou (100 мкМ)], а також використання нормального розчину Кребса з уабаїном (100 мкМ) [ou (100 мкМ)]. За 100% прийнято відповідні показники в контролі (вісь ординат). * - p<0.05 – різниця достовірна щодо контролю.

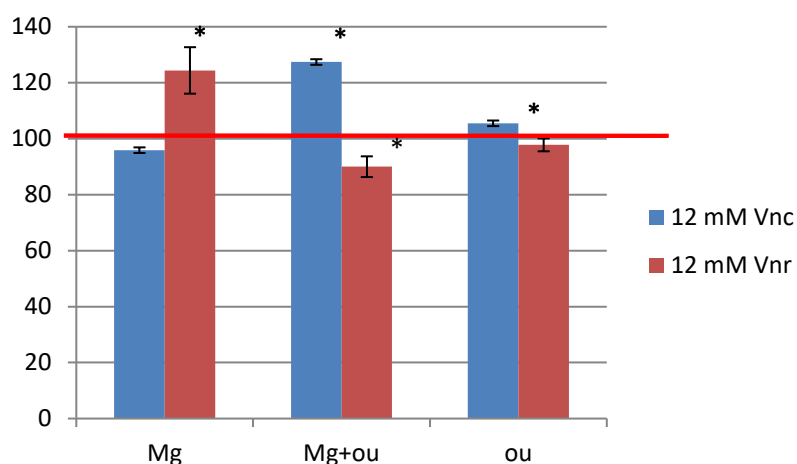


Рис. 3.11. Зміни параметрів спонтанних скорочень міометрія щурів в умовах дії гіпермагнієвого середовища (12 мМ) та їх модуляція при додаванні уабаїну [Mg²⁺ (12мМ) + ou (100 мкМ)], а також використання нормального розчину Кребса з уабаїном (100 мкМ) [ou (100 мкМ)]: нормовані максимальні швидкості фази скорочення (V_{nc}) та фази розслаблення (V_{nr}); n=5.
* - p<0.05 – різниця достовірна відносно контролю.

Внесення до гіпермагнієвого середовища інкубації (12 мМ) інгібітора Na^+, K^+ -АТФ-ази уабаїну (10^{-4} М) викликало подальше пригнічення спонтанної скорочувальної активності препаратів ГМ (Рис. 3.10): амплітуда скорочень мала тенденції до зниження, тоді як частота – тенденції до зростання порівняно зі скороченнями препаратів в умовах лише гіпермагнієвого розчину (таким чином, частота досягла значень, які статистично відповідали контролю). Параметри тривалості фаз скорочення і розслаблення, а також асиметрії скорочень були на рівні контролю, а показник тривалості скоротливого циклу мав тенденції до відновлення. Ряд параметрів: індекс скоротливої активності та показники скоротливих індексів в одиницях Монтевідео і Олександрійських одиницях залишались суттєво зниженими (близько п'ятої частини відносно контрольних значень). За цих умов спонтанні скорочення характеризувались підвищеною швидкістю фази скорочення $V_{\text{нс}}$, тоді як кінетика розслаблення відповідала контрольному рівню (Рис. 3.11.).

Заміна гіпермагнієвого оуабаїн-вмісного середовища інкубації на нормальний розчин Кребса з уабаїном (100 мкМ) супроводжувалась відносною активацією спонтанної скорочувальної активності ГМ (Рис. 3.10.): амплітуда скорочень зростала порівняно з гіпермагнієвим середовищем, а частота була вірогідно вищою відносно контролю. Показники: тривалості фаз скорочення і розслаблення, асиметрії скорочень, тривалості скоротливого циклу були нижчими за контрольні. Індекс скоротливої активності досягнув контрольного значення. Показники скоротливих індексів в одиницях Монтевідео і Олександрійських одиницях хоча залишились нижчими відносно контрольних, однак були вірогідно вищими порівняно зі значеннями, характерними для гіпермагнієвого середовища. Обидві нормовані максимальні швидкості спонтанних скорочень (як $V_{\text{нс}}$, так і $V_{\text{нр}}$) за цих умов відповідали контрольним показникам (Рис. 3.11.).

Можемо міркувати про механізми, які лежать в основі досліджених ефектів. Отримані нами результати цілком узгоджується з даними інших

дослідників, отриманими на інших гладеньких м'язах (сфінктер сечового міхура, брижові артерії) [480-482]. Так, Т.Като з колегами показано, що підвищення концентрації іонів Mg^{2+} до 5 мМ супроводжується пригніченням скорочень гладеньких м'язів сфінктера, а її зростання до 30 мМ повністю унеможлиблює скорочення [480, 481], причому такі ефекти посилюються при блокуванні ПКК ПМ верапамілом і навпаки – інгібуються додаванням активатора цих каналів Bay-K8644, що свідчить про безпосереднє пригнічення іонами Mg^{2+} саме цих каналів. Також на препаратах брижової артерії встановлено, що у пригнічення скорочувальної активності гіпермагнієвого розчину роблять внесок посилення синтезу оксиду азоту та активація Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів великої провідності (BK_{Ca}) [482]. Отже, ймовірно, що отримане нами пригнічення амплітуди і частоти спонтанних скорочень під дією гіпермагнієвого середовища переважно спричинене інгібуванням входу іонів Ca^{2+} через ПКК ПМ.

Разом з тим, звертає на себе увагу неоднорідна дія гіпермагнієвих розчинів на кінетику розвитку спонтанних скорочень: за присутності 5 мМ Mg^{2+} нормована максимальна швидкість фази скорочення зростає, а при 12 мМ залишається на рівні контролю. З огляду на широкий спектр “мішеней” магнію в клітині, ймовірно, ми маємо справу з сумою різноспрямованих ефектів цього катіону на різні клітинні процеси. Так, іони магнію активують АТФ-азну активність актоміозину [483], стимулюють системи активного транспорту іонів Ca^{2+} тощо [477]. Таким чином, можна припустити, що відмінність у дії гіпермагнієвого розчину з різною концентрацією іонів Mg^{2+} пов'язана з переважанням окремих ефектів цих катіонів: у випадку 5 мМ розчину, ймовірно відносно великий внесок у розвиток скорочення робить активація актоміозину, так що наростання сили скорочення відбувається відносно швидше порівняно з контролем; при дії 12 мМ розчину, можливо передбачити посилення відносного внеску ефектів інгібування Ca^{2+} -каналів та активації викачування Ca^{2+} з внутрішньоклітинного простору.

Використання селективного інгібітора Na^+, K^+ -АТФ-ази убаїну (10^{-4} М) дозволило відокремити внесок цього ензиму в функціонування гладеньких м'язів [484]. За цієї концентрації убаїну за даними літератури спостерігається пригнічення активності понад 80% ензиму ПМ клітини. Використання убаїну на фоні підвищеної концентрації іонів Mg^{2+} призводило до подальшого пригнічення спонтанної скорочувальної активності міометрія, яке, ймовірно може бути пояснено убаїн-викликаним порушенням трансмембранного градієнту іонів Na^+ та K^+ . За цих умов зростання концентрації натрію в клітині мало спричинити активування реверсної роботи $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника ПМ (закачування іонів кальцію в міоцити), яке, ймовірно, мало додатково активувати VK_{Ca} -канали.

3.4.3. Кінетика суперпреципітації скорочувальних білків

Адекватною моделлю для вивчення закономірностей функціонування м'язів на рівні білків скорочувального апарату (актинових і міозинових філаментів) є реакція суперпреципітації. На молекулярному рівні процес відбувається як ущільнення агрегатів міозину з фібрилярним актином; він індукується гідролізом АТФ, а кінетика його проходження в цілому відповідає перебудовам білків актоміозинового комплексу під час скорочення. При розгляді динаміки процесу формування комплексу актину і міозину є важливим використання параметрів, які б кількісно характеризували не тільки початковий етап проходження реакції суперпреципітації (параметр початкової швидкості цього процесу v_0), але й характеризували весь процес актин-міозинової взаємодії. Тому разом з параметрами (часу досягнення напівмаксимального значення оптичної густини $\tau_{1/2}$ та швидкості v_0) ми здійснювали розрахунки нормованої (на стаціонарне максимальне значення оптичної густини D_{max}) максимальної швидкості процесу суперпреципітації (v_n); розрахунок v_n здійснювали за модифікованим методом Костеріна-Бурдиги [398]. Для кривих суперпреципітації було отримано лінеаризацію, яка характеризувалась

коефіцієнтом детермінації $R^2 \geq 0,9$ ($p < 0,001$) (Рис. 3.12.). На прикладі даних реакції суперпреципітації актоміозину в нормі та за присутності окремих іонів важких металів, температури і рН середовища нами було показано, що параметр v_n є високочутливим до дії фізико-хімічних факторів. Також, що є важливим, дані кінетичного аналізу суперпреципітації добре узгоджувались зі змінами АТФ-гідролазної активності, які були нами зареєстровані на препаратах нативного актоміозину і міозину [485, 486].

Отже, разом з дослідженням змін АТФ-азної активності, кінетичний аналіз проходження процесу суперпреципітації актоміозину дозволяє в повній мірі проаналізувати вплив різних факторів (фармакологічних або фізико-хімічних) безпосередньо на скорочувальні білки м'язів, а параметр v_n може бути застосований для детального аналізу молекулярних механізмів функціонування скорочувального комплексу ГМК та впливу на них різних ефекторів [485, 486].

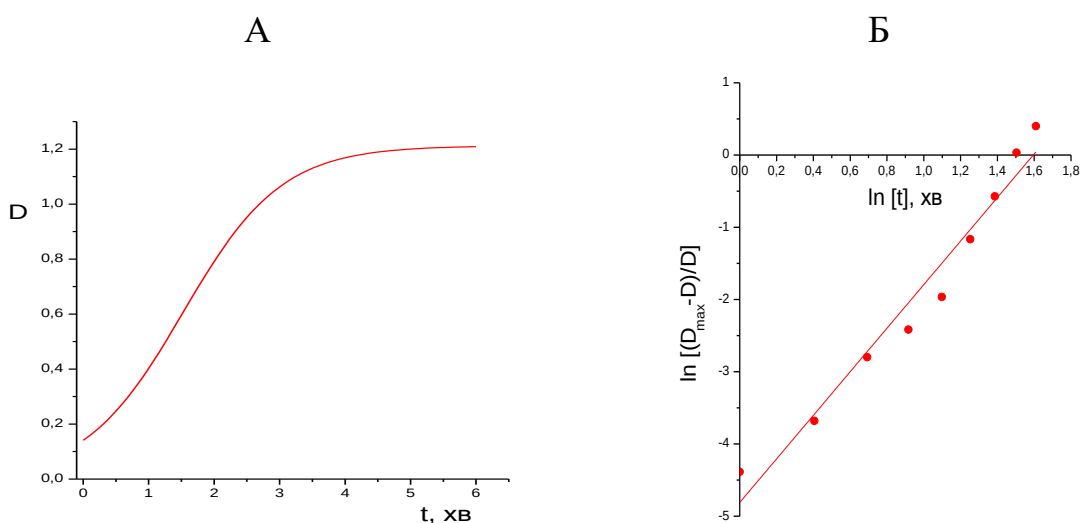


Рис. 3.13. Типова крива суперпреципітації актоміозину (А) та її лінеаризація (Б) відповідно до методу [398] в координатах $\{\ln [(D_{\max} - D)/D]; \ln[t]\}$ (коефіцієнт детермінації $R^2 = 0,96$).

3.4.4. Кінетичний аналіз процесів скорочення-розслаблення гладеньких м'язів в умовах блокування Ca^{2+} -каналів.

Головним джерелом іонів Ca^{2+} при активації збудження в міоцитах є їх надходження в цитоплазму з позаклітинного середовища через потенціалкеровані Ca^{2+} -канали. У тканині вісцеральних ГМ експресуються ПКК L- і T-типу [123-125]. Втім, канали T-типу виконують пейсмейкерну функцію, забезпечуючи специфічний, підвищений рівень збудливості в ІСС, але за загальним рівнем струму іонів Ca^{2+} вони мають відносно незначний внесок порівняно з каналами L-типу [123, 487].

Натепер значного поширення набули лікарські засоби проти ряду захворювань серцево-судинної системи (зокрема, гіпертензії, тахікардії, фібриляції передсердь), а також терапії передчасних пологів, головною діючою речовиною яких є блокатори Ca^{2+} -каналів L-типу [488-490]. За хімічною будовою та розташуванням сайту зв'язування зі структурою каналу блокатори цих каналів поділяють на 3 групи: дигідропіридини, бензотіазепіни і фенілалкіламіни. Сайти зв'язування дигідропіридинів і бензотіазепінів мають позаклітинне, а фенілалкіламінів – внутрішньоклітинне розташування.

Нами для дослідження було обрано 2 речовини, які належать до різних класів блокаторів: ніфедипін (дигідропіридин) та метоксиверапаміл (інше позначення – D600, належить до фенілалкіламінів). Ці сполуки у високих концентраціях здатні також блокувати Ca^{2+} -канали T-типу; так, дослідженнями Stengel W. та колег показано, що інгібування нікардипіном іонних струмів через канали T-типу характеризується IC_{50} 2,5 мкМ, тоді як через канали L-типу – IC_{50} 75 нМ (для ніфедипіну ці значення відповідно становлять 39 мкМ і 75 нМ) [490, 491].

З метою визначення закономірностей модуляції механокінетики скорочувальної активності ГМ *saesum*, було досліджено кумулятивну дію ніфедипіну і метоксиверапамілу (у концентраціях 10^{-13} – 10^{-4} М, тривалість преінкубації у присутності кожної з концентрацій складала 10 хв.), на

параметри ацетилхолін-викликаних скорочень (10^{-5} М). За присутності в омиваючому ГМ розчині низьких концентрацій ніфедипіну і метоксиверапамілу (10^{-13} – 10^{-10} М) не спостерігалось достовірних змін амплітуди скорочень; подальше підвищення концентрацій концентратів блокторів спричиняло прогресуюче пригнічення скорочувальної активності м'язів. Варто відзначити, що ефективність інгібування скорочень достовірно відрізнялась за присутності концентрацій блокторів $>10^{-8}$ М: ніфедипін (IC_{50} $2,68 \cdot 10^{-8}$ М, коефіцієнт Хілла $n_H = 0,34$, $n=9$) мав вірогідно вищу активність порівняно з метоксиверапамілом (IC_{50} $1,19 \cdot 10^{-6}$ М, $n_H = 0,26$, $n=7$, $p<0,05$), викликаючи повне пригнічення скорочень при концентрації 10^{-5} М. Кінетичний аналіз виявив, що як фаза скорочення, так і фаза розслаблення ацетилхолінових скорочень дозо-залежно змінюється в умовах кумулятивної дії блокторів Ca^{2+} -каналів. Як видно з Рис. 3.13. А, при зростанні концентрації блокторів V_{nc} збільшується: достовірні зміни мали місце, починаючи з концентрацій 10^{-7} М для ніфедипіну та 10^{-6} М метоксиверапамілу, досягає свого максимуму при концентрації обох блокторів 10^{-6} М, після чого достовірно знижується.

Аналогічна концентраційна залежність обох блокторів спостерігалась для параметра нормованої максимальної швидкості фази розслаблення V_{nr} (Рис. 3.13. Б). Разом з тим, параметр V_{nr} виявив вищу чутливість до дії ніфедипіну: найбільше його зростання (майже в 3 рази порівняно з контролем, обидва блоктори) мало місце за присутності 10^{-7} М ніфедипіну і 10^{-5} М метоксиверапамілу.

Отже, дослідження кумулятивної дії блокторів потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів L-типу на викликані нейромедіатором ацетилхоліном скорочення виявило достовірно вищу активність представника класу дигідропіридинів щодо їх амплітуди (показник IC_{50} за дії ніфедипіну та метоксиверапамілу відрізнявся майже в сто разів) та нормованої максимальної швидкості розслаблення V_{nr} [476]. Отримані нами результати узгоджуються з даними досліджень наукової групи під керівництвом Dacquet

С. щодо концентраційних залежностей впливу різних блокаторів каналів L-типу на спонтанну і викликану скорочувальну активність портальної вени щурів [492, 493]. Також варто зазначити, що дигідропіридини володіють вищою селективністю щодо Ca^{2+} -каналів L-типу. Зокрема, як показано дослідженнями Lebrun P. і колег [494], блокатори Ca^{2+} -каналів групи фенілалкіламінів, на відміну від дигідропіридинових похідних, здатні також інгібувати АТФ-чутливі K^{+} -канали ПМ.

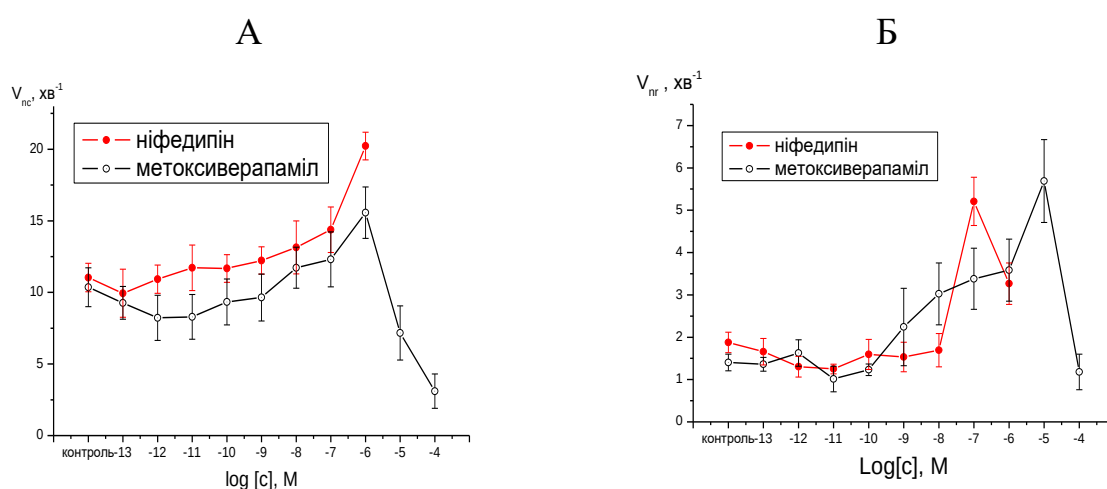


Рис. 3.13. Концентраційна залежність впливу блокаторів потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів ніфедипіну ($M \pm m$, $n = 9$) та метоксиверапамілу ($M \pm m$, $n = 7$) на нормовані максимальні швидкості скорочень кільцевих ГМ *саесит*, викликаних ацетилхоліном (10^{-5} M): А - швидкість скорочення (V_{nc}); Б - швидкість розслаблення (V_{nr}).

3.4.5. Вивчення температурної чутливості механокінетики викликаних скорочень інтестинальних гладеньких м'язів.

Для дослідження температурної чутливості викликаних скорочень було обрано кільцеві ГМ товстого кишечника (*саесит*) щурів; індукторами збудження були: деполяризація гіперкалієвим розчином (80 мМ) та нейротрансмітер ацетилхолін (10^{-5} M). Діапазон зміни температури омиваючого розчину становив 20 – 45 °C (крок зміни 5°C).

Було виявлено, що амплітудні параметри (максимум фазного скорочення f_m) скорочень не залежно від природи стимулу мали куполоподібний тренд з максимумом в діапазоні фізіологічних температур. Також звертає на себе увагу права частина температурних залежностей обох вищезазначених показників (за температур понад фізіологічних): у цьому діапазоні відбувається достовірно суттєвіша інактивація K^+ -індукованих скорочувальних відповідей. Кінетичним аналізом встановлено, що, як і у випадку f_m , температурні залежності нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення (V_{nc}) та розслаблення (V_{nr}) мали куполоподібний тренд з максимумом за фізіологічної температури (Рис. 3.14.).

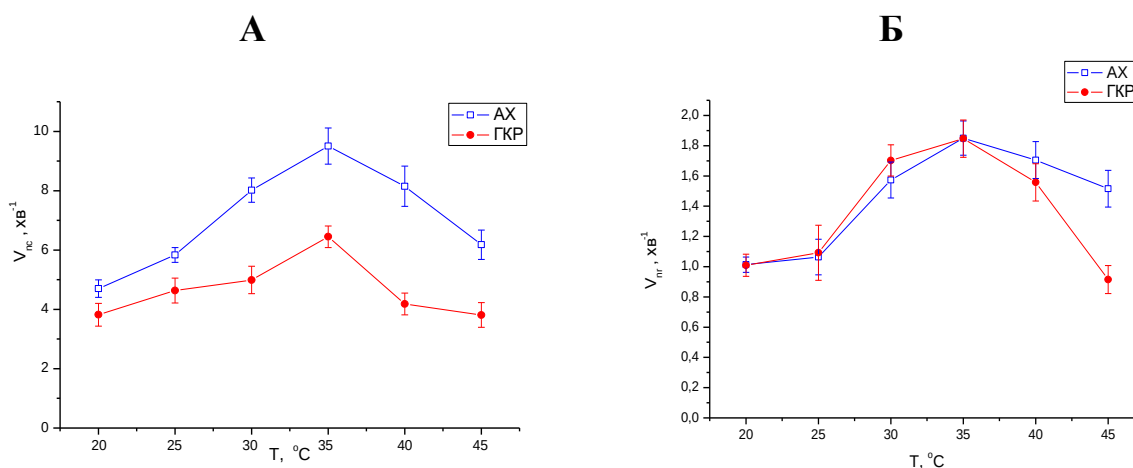


Рис. 3.14 Вплив температури на механокінетичні параметри скорочень ($M \pm m$, $n=7$) кільцевих ГМ *saesit* щурів, індуковані аплікацією ацетилхоліну (АХ, 10^{-5} М) та гіперкалієвого розчину (ГКР, 80 мМ): А – нормована максимальна швидкість скорочення (V_{nc}); Б – нормована максимальна швидкість розслаблення (V_{nr}).

Слід відмітити важливі особливості температурної залежності процесу наростання м'язового напруження: показник V_{nc} ацетилхолінових скорочень виявився достовірно більш чутливим порівняно з даними для K^+ -індукованих скорочень; також кожен крок зміни температури на 5°C призводила до суттєвих змін цього параметра (Рис. 3.14 А) [476].

Температурна залежність кінетики фази розслаблення також у значній мірі залежала від способу активації скорочувальних відповідей ГМ. Так, значення параметра V_{nr} за температур (20 – 40)°C не виявляли залежності від індуктора скорочень, однак підвищення температури до 45°C вірогідно сильніше знижувало V_{nr} у випадку K^+ -викликаних скорочень (Рис. 3.14 Б).

3.4.6. Кінетичний та фармакокінетичний аналіз дії інгібіторів брадикінінових рецепторів на гладенькі м'язи.

Калікреїн-кінінова система (ККС) – це внутрішній метаболічний каскад, активація якого призводить до вивільнення вазоактивних кінінів. ККС складається з багатьох білків тканин і плазми крові, головними з яких є фактор XII, прекалікреїн та високомолекулярний кініноген. Кініни (брадикінін-подібні пептиди) – фармакологічно активні, прозапальні пептиди, які опосередковують численні реакції з боку серцево-судинної системи, а також больову чутливість у випадку пошкодження тканин. Загалом, кініни залучені в регуляцію артеріального тиску та функціонування серцево-судинної і видільної систем, а також ШКТ [495-499].

Кініни синтезуються з двох типів кініногенів за участі двох типів активаторів – тканинного калікреїну і калікреїну плазми. До кінінів належать: брадикінін – нонапептид (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), калідин – декапептид (Lys-BK) та їх С-кінцеві des-Arg метаболіти; в організмі щурів виявлено також Т-кінін (Ile-Ser-BK) та Met-T-kinin.

BK-рецептори належать до надродини рецепторів, спряжених з G-білками: вони опосередковують свою клітинну відповідь G_q -опосередкованою ФЛС, підвищенням синтезу ІТФ і ДАГ [500]. У ГМК здатні експресуватися два підтипи BK-рецепторів. BK_2 -рецептори є конститутивними, тоді як BK_1 -рецептори в переважній більшості є індукцибельними. Деякі ГМ, зокрема портальна вена, шлунок і *duodenum* щурів, а також проксимальна частина ободової кишки собаки, експресують

обидва підтипи рецепторів конститутивно, однак найчастіше експресія VK_1 -рецепторів має бути індукована.

У ГМ травного тракту (наприклад, *taenia coli* мурчаків, де присутні VK_2 -рецептори) брадикінін спричиняє двофазний ефект: початкову гіперполяризацію і розслаблення, та наступну деполяризацію і скорочення; обидва ці етапи супроводжуються підвищеною внутрішньоклітинною концентрацією іонів Ca^{2+} . Брадикінін спричиняє активацію ПКК L-типу (їх внесок у VK -викликане скорочення складає близько 70-75 %) з наступною активацією апамін-чутливих Ca^{2+} -активованих K^+ -каналів ПМ, яка, власне і обумовлює гіперполяризацію і розслаблення м'язів. Скоротлива реакція має крім Ca^{2+} - внесок Na^+ -струму і є чутливою до наявності трансмембранного градієнту цих іонів (їх внесок у VK -викликане скорочення складає близько 30%). Ймовірно, що цей Na^+ -струм переноситься через неселективні катіонні канали, відкривання яких стимулює також і ПКС (активована ДАГ). На фоні блокування Ca^{2+} -каналів L-типу ніфедипіном залишкове VK -скорочення на 60% інгібується блокатором Ca^{2+} -помпи СР та на 30% – блокатором рецептор-керованих катіонних каналів; сумарна дія блокування цих структур призводить до пригнічення близько 80% ніфедипін-нечутливого компоненту VK -скорочення [497, 501].

На препаратах кільцевих ГМ фундального відділу шлунку щурів, нами було досліджено дію нових, непептидних антагоністів VK -рецепторів, похідних 3-алкокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів, які були синтезовані і люб'язно надані для досліджень кандидатом хімічних наук В.І. Павловським (Фізико-хімічний інститут ім. А.В. Богатського НАН України).

Аплікування VK (10^{-6} М) індукувало двофазну реакцію ГМ шлунку: початкове розслаблення, після якого розвивалась скоротлива відповідь. Кумулятивне аплікування VK супроводжувалось дозо-залежним підвищенням сили скорочень, яке досягало субмаксимальних значень при аплікуванні VK у концентрації 1 мкМ (Рис. 3.15.). Напівмаксимальне значення (EC_{50}) сили скорочень спостерігалось у присутності VK у

концентрації $(1.78 \pm 0.14) \cdot 10^{-8}$ М; що загалом узгоджується з даними Д. Кабріні і колег, одержаними на аналогічному об'єкті досліджень [502].

Для аналізу ймовірної антагоністичної активності щодо ВК-рецепторів, серед речовин групи 1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-інів було обрано сім сполук (коди МХ-1827, МХ-1829, МХ-1906, МХ-1909, МХ-1925, МХ-2012 та МХ-2055). Для первинного скринінгу ефективності речовини використовували у концентрації 10^{-6} М. У всіх випадках проводили попередню інкубацію препаратів ГМ шлунку в присутності обраної сполуки впродовж 1 години, після чого реєстрували криву «концентрація-ефект». Було виявлено, що сполуки з кодами МХ-1827 і МХ-1829 не виявляли інгібіторної дії на ВК-скорочення, тоді як речовина МХ-1909 за даної концентрації пригнічувала скоротливі відповіді ГМ у середньому на 15%. Приблизно з такою ж ефективністю знижувала ВК-скорочення сполука МХ-2055, але вона також володіла потужною здатністю пригнічувати спонтанну скоротливу активність. Сполука МХ-1925 інгібувала брадикінін-викликані скорочення у середньому на 26 % (Рис. 3.16.).

Досить ефективними інгібіторами ВК-рецепторів можна вважати сполуки МХ-1906 і МХ-2012. Так, сполука МХ-1906 у концентрації 1 мкМ знижувала ВК-скорочення у середньому на 41 % (Рис. 3.17 Б), але в умовах попередньої інкубації також призводила до підвищення тонуусу ГМ шлунку, яке супроводжувалось пригніченням спонтанних скорочень (Рис. 3.17 А).

Додавання 10^{-6} М сполуки 3-пропокси-7-бром-5-(2'-хлор)фенил-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-ону (шифр МХ-2011) до омиваючого розчину, спричиняла незначну активацію спонтанної скорочувальної активності з незначним зниженням їх базального напруження (Рис. 3.18.). Тобто, ймовірно, на відміну від сполуки МХ-1906, речовина з кодом МХ-2011 не мала суттєвої побічної дії на інші, крім ВК-рецепторів, системи гладеньком'язової тканини [467, 503].

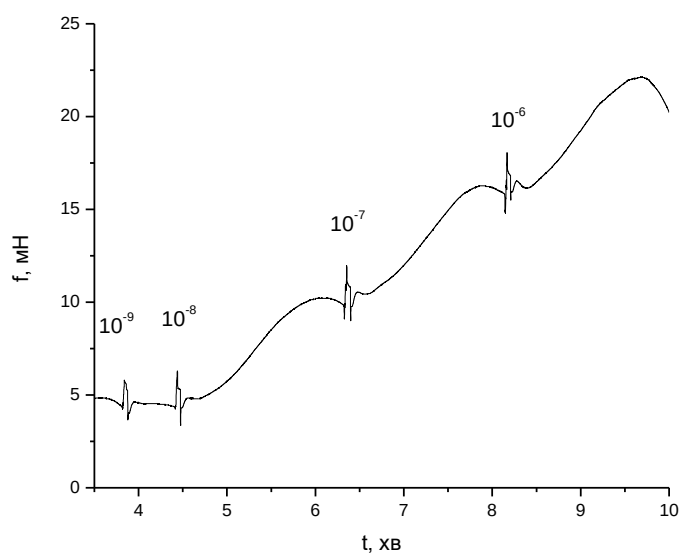


Рис. 3.15. Скорочення кільцевих гладеньких м'язів фундального відділу шлунку щурів, індуковані кумулятивною аплікацією брадикініну (10^{-9} - 10^{-6} M). Наведено типову механограму.

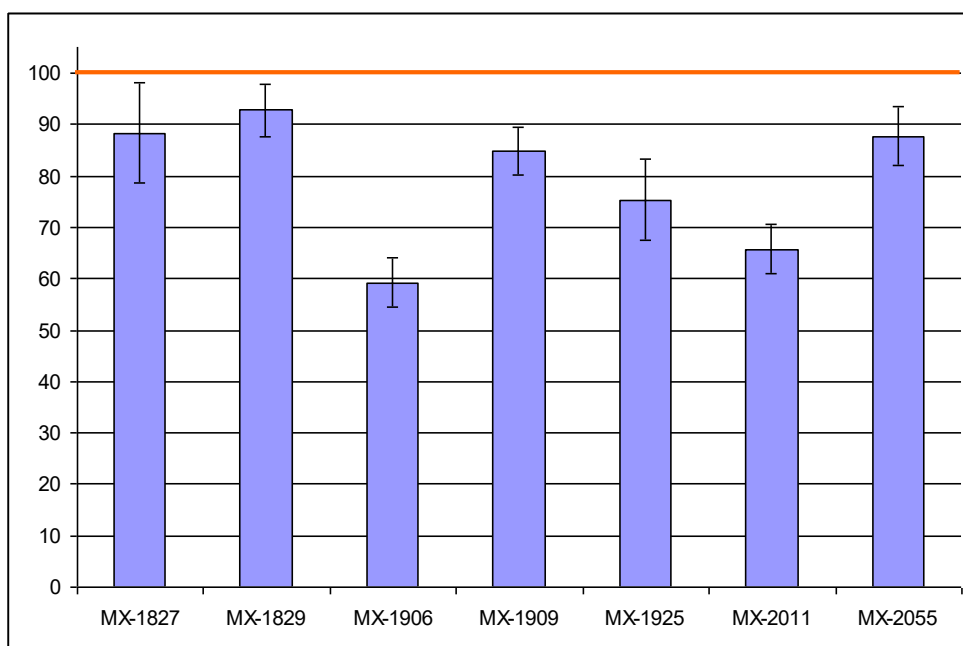


Рис. 3.16. Пригнічення брадикінінових (10^{-5} M) скорочень кільцевих ГМ фундального відділу шлунку щурів сполуками (10^{-6} M) групи 1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-інів (коди сполук: MX-1827, MX-1829, MX-1906, MX-1909, MX-1925, MX-2012 та MX-2055). За 100% прийнято контрольні значення; (n=3-6).

У наступній серії експериментів було здійснено реєстрацію кумулятивних кривих «концентрація-ефект» за присутності 1, 10 та 50 мкМ сполуки MX-2011 (Рис. 3.19 А). Для встановлення характеру взаємодії досліджуваної речовини з брадикініновими рецепторами використовували рівняння регресії Шілда [504]: антагоніст-індукований паралельний зсув кривих «концентрація-ефект» визначали як співвідношення еквіефективних концентрацій (CR , спричиняють 50% від максимального скорочення) агоніста в контролі та за присутності MX-2011. Афінність MX-2011 (pK_B) визначали з рівняння: $pK_B = \lg [CR - 1] - \lg [\text{концентрація MX-2011}]$. Було побудовано графік Шілда (нахил 1,28, коефіцієнт детермінації $R^2 = 0,93$), з якого визначено величину афінності цієї сполуки: $pK_B = 6,41$.

Проведення кінетичного аналізу ВК-викликаних скорочень в умовах преінкубації з MX-2011 показало, що сполука не впливає на показник швидкості фази наростання сили і уповільнює процес розслаблення м'язових препаратів: параметри V_{nc} та V_{nr} становили, відповідно $(101,7 \pm 7,7)\%$ ($n=6$, $p>0,05$) і $(85,7 \pm 5,6)\%$ ($n=6$, $p<0,05$) порівняно з контрольними значеннями.

Оскільки величина нахилу отриманого нами графіка Шілда була наближена до одиниці, можна передбачити конкурентний антагонізм MX-2011. Також на користь припущення про превалювання конкурентного механізму інгібування ВК-рецепторів сполукою MX-2011 свідчать дані кінетичного аналізу: так як параметри нормованих максимальних швидкостей (особливо, V_{nc}) були близькими до контрольних, можна припустити, що в умовах дії цього антагоністу лише зменшується кількість «активних» рецепторів. Варто також відзначити, що показник спорідненості сполуки MX-2011 до ВК-рецепторів ($pK_B = 6,41$) знаходиться на вищому рівні показників афінностей окремих відомих антагоністів. Так, для *taenia caesi* мурчаків pK_B пептидів D-Arg-[Hyp³,D-Phe⁷]-BK, D-Arg-[Hyp³,Thi^{5,8},D-Phe⁷]-BK були відповідно 5,89 і 5,81 [505]. Однак, порівняно з даними щодо відомих селективних антагоністів ВК₁- та ВК₂-рецепторів des-Arg⁹-NPC 17761 та NOE 140 відповідно [503], афінність MX-2011 є суттєво нижчою.

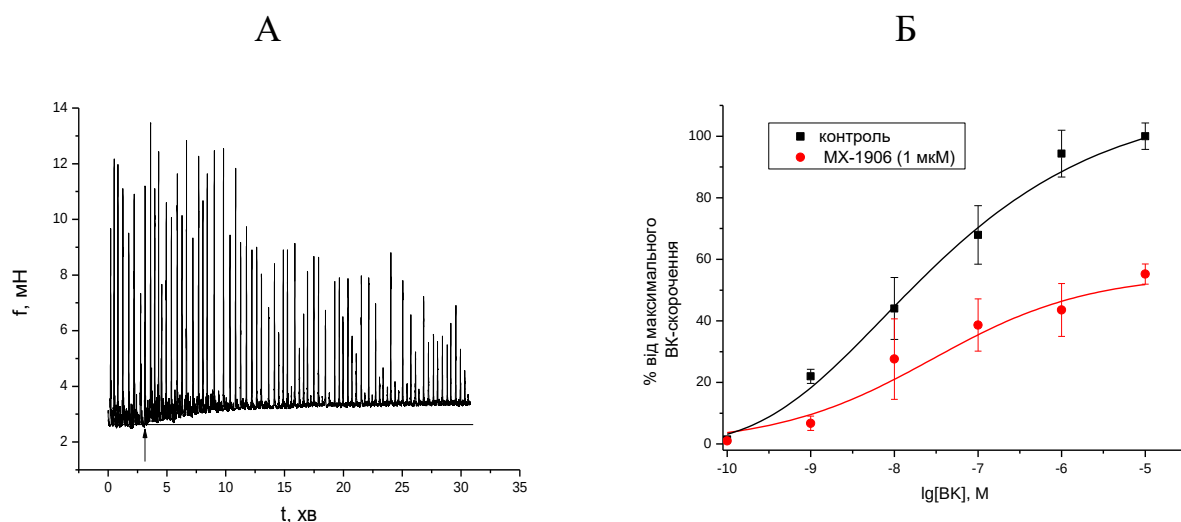


Рис. 3.17. Вплив сполуки MX-1906 (10^{-6} M) на кільцеві ГМ фундального відділу шлунку щурів: А – ефект аплікування MX-1906 на базальне напруження і спонтанні скорочення препаратів; Б – кумулятивні криві «концентрація-ефект» брадикінінових скорочень (0,1 нМ – 10 мкМ). Результати подані як $M \pm m$ ($n=4$).

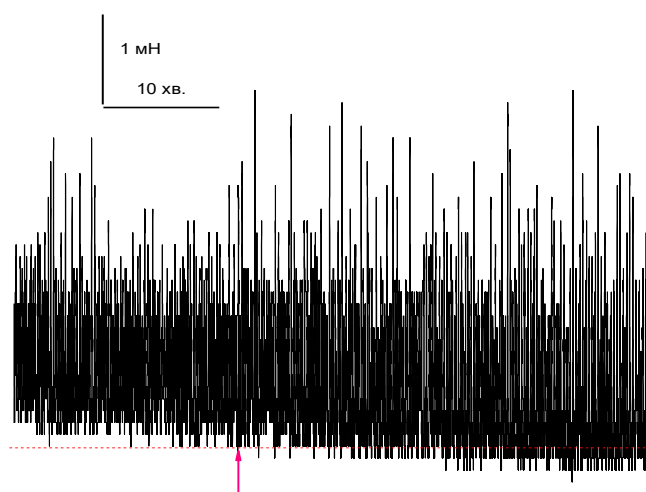


Рис. 3.18. Вплив сполуки 3-пропокси-7-бром-5-(2'-хлор)фенил-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону (MX-2111) на базальне напруження і спонтанні скорочення кільцевих ГМ фундального відділу шлунку щурів. Наведено типову механограму.

* * * * *

У розділі наведено дані механокінетичного аналізу і кількісно охарактеризовано спонтанні та викликані (K^+ -індукованою деполяризацією, нейромедіаторами і фармакологічно-активними речовинами: ацетилхоліном, гістаміном, нікотинном, брадикініном) скорочення кільцевих ГМ шлунку і товстого кишечника, а також спонтанні і викликані (K^+ -індукованою деполяризацією, нейромедіатором ацетилхоліном і утеротонічним гормоном окситоцином) скорочення поздовжніх ГМ міометрія. Також у даному розділі на скороченнях мультиклітинних препаратів вісцеральних ГМ здійснено апробацію методу механокінетичного аналізу Костеріна С.О. і Бурдиги Ф.В. [398], з розрахунком незалежних від амплітуди скорочувальних відповідей і реакції СПП нормованих максимальних швидкостей V_{nc} , V_{nr} і V_n . Вивчено закономірності впливу (а також модуляції кінетичних параметрів) за дії фізико-хімічних і фармакологічних факторів (зміни концентрації іонів Na^+ і Mg^{2+} , температури, блокування ПКК L-типу і Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ, брадикінінових рецепторів) на агоніст-викликані скорочення кільцевих ГМ шлунку і товстого кишечника.

Результати, викладені у розділі, опубліковані у наступних роботах: [399, 400, 458, 463, 467, 471, 472, 473, 474, 476, 484, 485, 486, 503].

РОЗДІЛ 4

ТЕРМОДИНАМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ВИСОКОЕЛАСТИЧНОЇ ДЕФОРМАЦІЇ ВІСЦЕРАЛЬНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ

4.1. Механокінетика високоеластичної деформації гладеньких м'язів травного тракту за фізіологічної температури

ГМ формують стінки багатьох внутрішніх органів і систем (судинного русла, шлунково-кишкового тракту, сечового міхура і сечових шляхів, матки, дихальних шляхів тощо), а у основі їх функціонування лежить здатність змінювати довжину у відповідь на збудливі (скорочуватись) або гальмівні (розслаблятись) стимули, активно модулюючи при цьому напруження всередині порожнин [405, 406]. З іншого боку, проходження твердих або рідких мас по ним викликає деформацію м'язових стінок і створює відповідне напруження; таке пасивне підвищення тиску пов'язане з виконанням фізичної роботи над м'язовим шаром [407-409].

Одними із найбільш важливих прикладів внутрішніх органів, функціонування яких напряму залежить від механічних властивостей їх м'язового шару, є шлунок та кишечник. Так, головними функціями шлунку є зберігання, перемішування, кислотоутворення і перетравлювання їжі, причому останні не можуть повноцінно здійснюватись без нормального виконання перших двох. Аналогічно, також і у кишечнику відбувається перемішування, перетравлювання та транзит харчових мас [405]. Залежно від їх кількості ймовірною є різна величина деформації цих органів [410]. Варто також зазначити, що якість, зокрема, температура їжі, яка надходить в шлунок, може варіювати в досить широких межах (від досить прохолодного до гарячого), і це також впливає локальну реакцію м'язів на механічну деформацію [411-413]. Поряд з цим, крім суто механічних, в'язкоеластичних властивостей м'язової тканини, існує ряд фармакологічно-детермінованих реакцій на розтяг і зміну температури. Їх забезпечують термо- та

механорецептори ПМ ГМК, а також співлокалізованих тут нейрональних, ендотеліальних та пейсмеркерних клітин [414-416].

Головними характеристиками, які описують механічні властивості біологічних тканин, є податливість (compliance), модуль пружності та залежність «навантаження-деформація» [406]. Для отримання цих характеристик використовують базові дослідницькі процедури зі встановлення механокінетичних залежностей напруження, деформації (розтягу) та віскоеластичності м'язів. Напруження (з точки зору біомеханіки) – це сила, прикладена до експериментального зразка; найчастіше її співвідносять до площі поперечного перерізу (N/m^2). Під терміном «розтяг» розуміють деформацію матеріалу, яка зазвичай розраховується як частка від початкової довжини (відношення L/L_0 або $(L - L_0)/L_0$). Криві «навантаження-розтяг» як для поперечно-посмугованих (серцевий та скелетні м'язи), так і для ГМ у стані спокою мають деякі особливості: по-перше, прикладання зовнішнього навантаження призводить до швидкого розтягування м'язу, яке потім уповільнюється (повзучість або кріп); по-друге, на цій кривій, побудованій при розтягуванні м'язу, кожній довжині відповідає більше значення напруження, ніж на кривій, яка відповідає оберненому процесу скорочення м'язу (явище гістерезису). Щодо останнього, то у цьому випадку часто застосовують прекодиціювання, проводячи декілька послідовних циклів навантаження-розвантаження і, таким чином, отримуючи другу та третю петлі гістерезису, які, зазвичай, співпадають [417, 418]. Модуль пружності (модуль Юнга) – це константа, яка розраховується як коефіцієнт пропорційності між напруженням і деформацією. Застосування модуль Юнга для опису механічних властивостей м'язів, однак, має значні обмеження, оскільки лінійний зв'язок між навантаженням і розтягом тут існує лише на невеликій ділянці координатної площини (зазвичай, при деформації не більше 20-30% від L_0) [406, 419].

Насьогодні, значного поширення серед медичних діагностичних методів набули балонокінематографічний та манометричний, які, базуючись

на вимірюванні тиску в кишкових порожнинах, дозволяють встановити дисфункційні порушення моторики ШКТ [420].

Отже, термомеханокінетичні властивості ГМ ШКТ, зокрема, шлунку, у значній мірі визначатимуть нормальне функціонування травної системи і потребують детального дослідження. Тому нами було здійснено дослідження термомеханокінетичних властивостей високоеластичної деформації багатоклітинних гладеньком'язових препаратів травного тракту (шлунку та товстого кишечника) щурів.

4.1.1. Механічні властивості гладеньких м'язів травного тракту. Криві деформація-навантаження, зареєстровані при фізіологічній температурі та в режимі сталого навантаження.

Для дослідження механічних властивостей ГМ ШКТ було обрано кільцеві смужки антрального відділу шлунку, а також товстого кишечника (дистального відділу *colon* та *caecum*) щура. Оскільки у процесі харчування температура і об'єм їжі можуть змінюватись у досить широких межах, що, ймовірно, позначатиметься на їх функціонуванні, нас цікавили механокінетичні властивості цих ГМ, зокрема їх термо- та механочутливість.

Початково за фізіологічної температури (37 °C) було вивчено пружну та високоеластичну деформацію м'язів. Для цього було здійснено реєстрацію ізотонічного збільшення довжини смужок ГМ в умовах різних навантажень (від 5 до 40 мН із кроком 5 мН). З кривих зміни довжини препаратів (ΔL) визначали максимальний (рівноважний) розтяг препаратів та час, за який він досягався (Рис. 4.1).

Варто відзначити, що загалом графічна залежність зміни ΔL в часі описується сумою двох експонент ($R^2=0.99$) (4.1), перша з яких відповідає швидкій (ймовірно, описує пружну деформацію м'язу) та друга – повільній (ймовірно, описує високоеластичну деформацію м'язу) складовим процесу деформації:

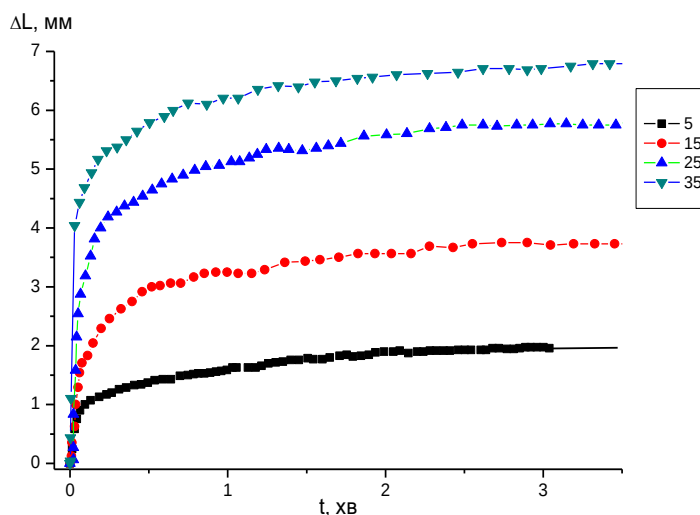


Рис. 4.1. Криві високоеластичної деформації препаратів кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів під дією поодиноких градуїзованих навантажень (на рисунку представлено для 5, 15, 25 та 35 мН) за температури 37 °С. Наведено типові механограми.

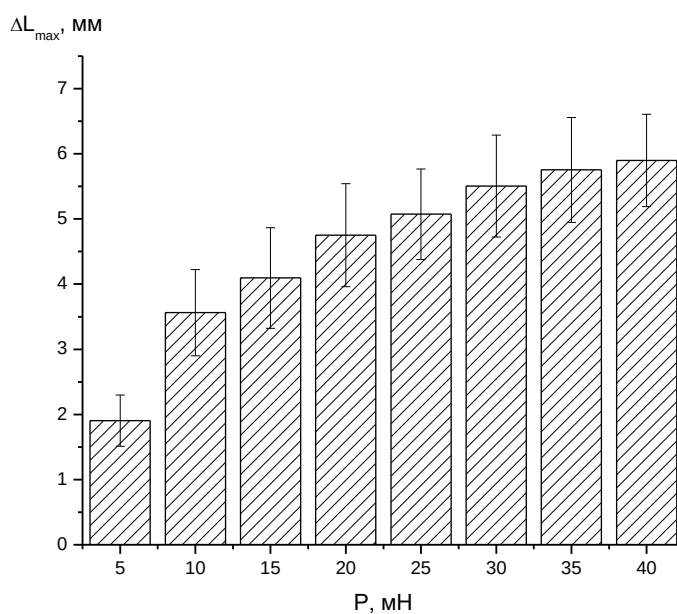


Рис. 4.2. Залежність показника максимальної (рівноважної) деформації препаратів ($\Delta L_{\max}$) кільцевих гладеньких м'язів шлунку щурів від навантаження (за температури 37 °С). За нуль прийнято довжину гладеньком'язових смужок у ненавантаженому стані. Дані представлені як $M \pm m$, $n = 5$.

$$\Delta L = A_1 \cdot (1 - e^{-t/s_1}) + A_2 \cdot (1 - e^{-t/s_2}) \quad (4.1)$$

де: A_1 та A_2 – амплітудні константи відповідно швидкого та повільного процесів зміни довжини;
 t – поточне значення часу;
 s_1 та s_2 – часові константи відповідно швидкого та повільного процесів зміни довжини.

Виявилося також, що залежність показників рівноважного розтягу препаратів ΔL від навантаження апроксимувались експоненційною функцією ($R^2=0.99$) (Рис. 4.2). Час встановлення постійної довжини препаратів при поодинокому навантаженні (τ) був у зворотній залежності від величини вантажу. Так, при невеликих навантаженнях (5-15 мН) рівновага встановлювалась усередньому через 2.5 хв, тоді як навантаження понад 20 мН зменшувало цей показник τ майже вдвічі (Рис. 4.3).

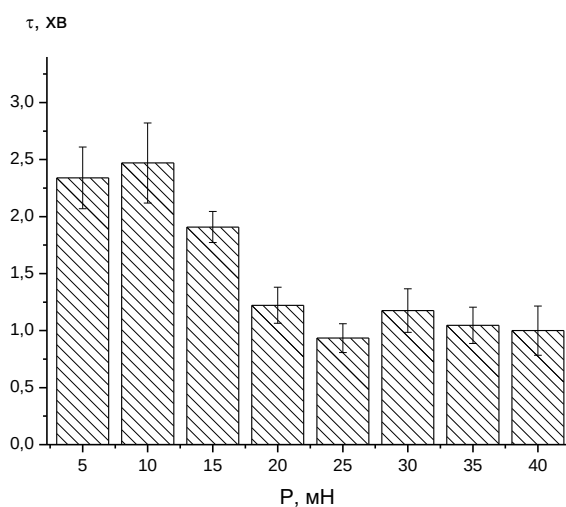


Рис. 4.3. Залежність значення часу досягнення препаратами рівноважного значення довжини (τ) кільцевих гладеньких м'язів шлунку щурів від навантаження (P), за температури 37 °С. За нуль прийнято довжину гладеньком'язових смужок у ненавантаженому стані. Дані представлені як $M \pm m$, $n = 5$.

При постійній температурі 37 °С послідовне навантаження м'язових препаратів (діапазон 5-50 мН, зміна навантаження із кроком 5 мН) супроводжувалось збільшенням довжини препаратів, причому за даних умов сумарне значення ΔL достовірно не відрізнялось від величини розтягу у

випадку поодиноких навантажень. Отже, кінетика зміни довжини м'язових препаратів антрального відділу шлунку залежить від величини навантаження та апроксимується сумою двох експонент: «швидкою», що, ймовірно, відповідає пружній деформації ГМС, та «повільною», головний внесок в яку найімовірніше робить високоеластична деформація м'язу [421].

4.1.2. Високоеластична деформація гладеньких м'язів за різних умов навантаження. Ізотерми високоеластичної деформації.

На даному етапі досліджень початково здійснювали аналіз впливу температури (діапазон 22 – 48 °С, із кроком 3 °С) на кінетичні характеристики високоеластичної деформації ГМС за умови прикладання фіксованого навантаження 5 мН. Як видно з рис. 4.4, при незначній деформації м'язів спостерігався температуро-залежний ефект: мінімальні значення відносної деформації $[(L - L_p)/L_p]$ мали місце за низьких температур, а найбільші – при наближених до внутрішньої температури в організмі. Таким чином, на вантажі, які відповідають фізіологічним, та при температурах, наближених до внутрішньої температури організму, ГМ відповідають максимальною здатністю до високоеластичної деформації. В цілому ж можна стверджувати, що високоеластична деформація ГМ шлунку є температурозалежною. За умови послідовного ступінчатого навантаження ГМ шлунку у діапазоні 5-50 мН (із кроком 5 мН) мав місце температуро-залежний ефект зміни високоеластичної деформації. Так, загалом, у діапазоні температур від 22 до 31 °С спостерігалось зміщення ізотерм деформації у бік більших значень $[(L - L_p)/L_p]$, а далі за температур понад 31°C – протилежний ефект (Рис. 4.5). Загалом, за умови помірного охолодження м'язів їх жорсткість є вищою, ніж за температур, наближених до значень внутрішнього середовища організму. При температурах понад 40°C значення відносної деформації знижується, що, ймовірно, пов'язано із розвитком теплової денатурації білків, а також наявністю за цих умов температурного екстремуму АТФ-гідролазної активності міозину ГМ (45 °С) [422].

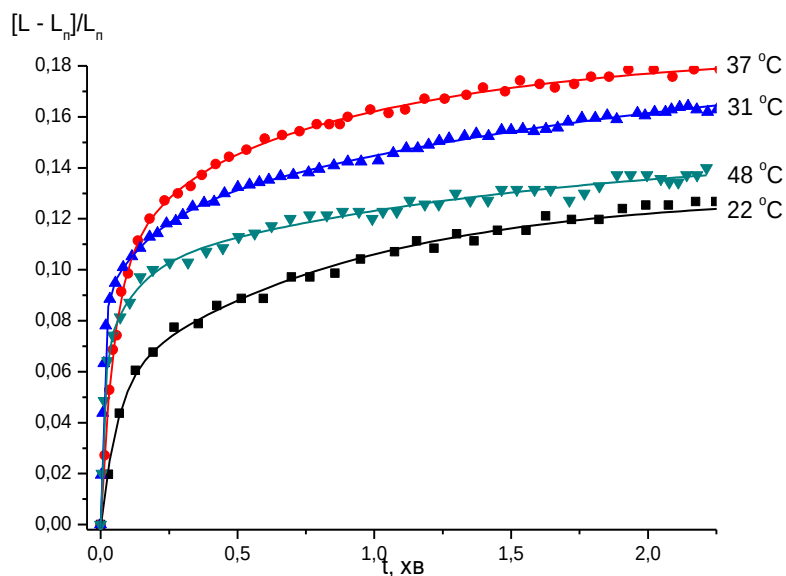


Рис. 4.4. Кінетичні графіки високоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунку щура при постійному навантаженні 5 мН, що були зареєстровані при 22, 31, 37 та 48 °С. На рисунку подані типові тренди.

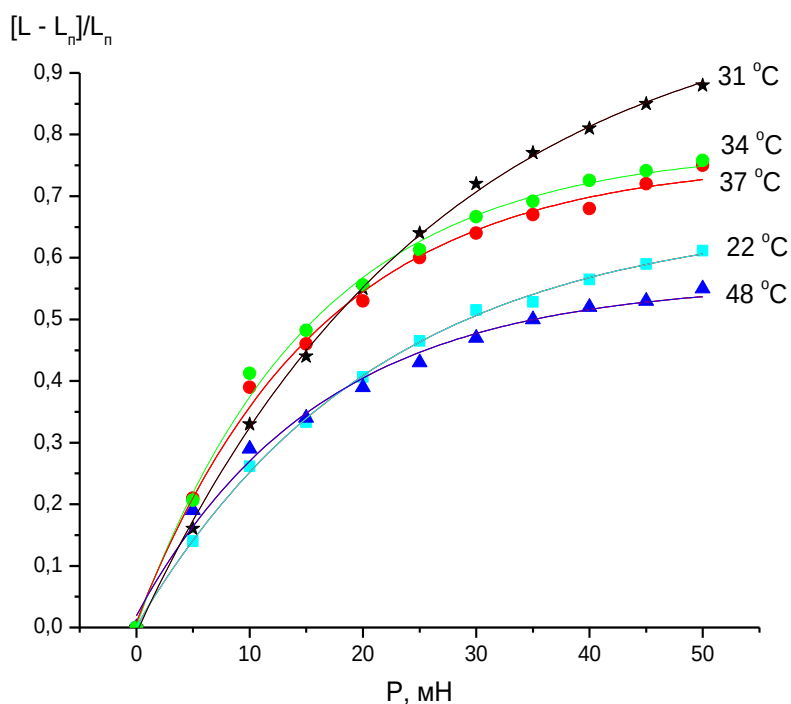


Рис. 4.5. Ізотерми високоеластичної деформації кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів. На рисунку подані усереднені тренди ($n=5-9$).

4.1.3. Гістерезисні кінетичні ефекти у випадку поодинокого навантаження і розвантаження м'язів за фізіологічної температури.

Важливим аспектом термомеханокінетичних властивостей ГМ ШКТ тракту є їх здатність не лише деформуватись у відповідь на навантаження, але й відновлювати свою довжину після зняття вантажу. Тож на наступному етапі було досліджено ефективність відновлення довжини м'язових препаратів після досягнення стаціонарного значення ΔL при поодинокому навантаженні. Для цього препарату швидко надавали фіксованого навантаження, а після виходу $[(L - L_p)/L_p]$ на постійний (рівноважний) рівень навантаження миттєво знімали і реєстрували укорочення смужки. Так, за фізіологічних умов (температура 37 °С, помірне навантаження 5 і 10 мН), як уже зазначалось, препарати ГМ виходили на субстаціонарний рівень довжини за період τ близько 3 хв. Після швидкого вилучення навантаження, реєстрували укорочення препаратів із наступним виходом на постійне значення довжини, яке, складало близько 40-50 % відносно $[(L - L_p)/L_p]$ за час 4-6 хв. (у випадку навантаження 5 - 10 мН) (Рис. 4.6А). Варто відмітити, що більші навантаження викликали такі деформації препаратів, після яких зняття вантажу призводило до відновлення довжини із приблизно однаковою ефективністю: усередньому на третину відносно $[(L - L_p)/L_p]$ за час 3-5 хв (це проілюстровано на рис. 4.6 Б; у якості прикладу обрано навантаження і розвантаження препарату вантажем 35 мН). Таким чином, еластичні властивості тканини ГМ дозволяють достатньо добре адаптуватись до різних навантажень при фізіологічних температурах.

4.1.4. Гістерезисні кінетичні ефекти при градуйованих навантаженнях і розвантаженнях гладеньких м'язів за фізіологічної температури.

Оскільки під час харчування здійснюється постійне зростання, а потім так само зниження деформації ГМ ШКТ, наближеною моделлю цих процесів може бути градуйоване збільшення і зменшення ваги, прикладеної до м'язу. Так, у людини об'єм шлунку натщесерце становить у середньому 0,5 л та

підчас харчування збільшується до 1-1,5 л (максимально 4 л); у щурів ці показники становлять 1,1 мл та 5-20 мл (за іншими даними 3-5 мл) [423, 424]. Для адаптації тканини шлунку до таких суттєвих деформацій в умовах інтактного організму спрацьовує вагальний рефлекс шлункової акомодатії, який полягає у зниженні тонуусу шлунку і збільшенні податливості тканин його стінок після прийняття їжі.

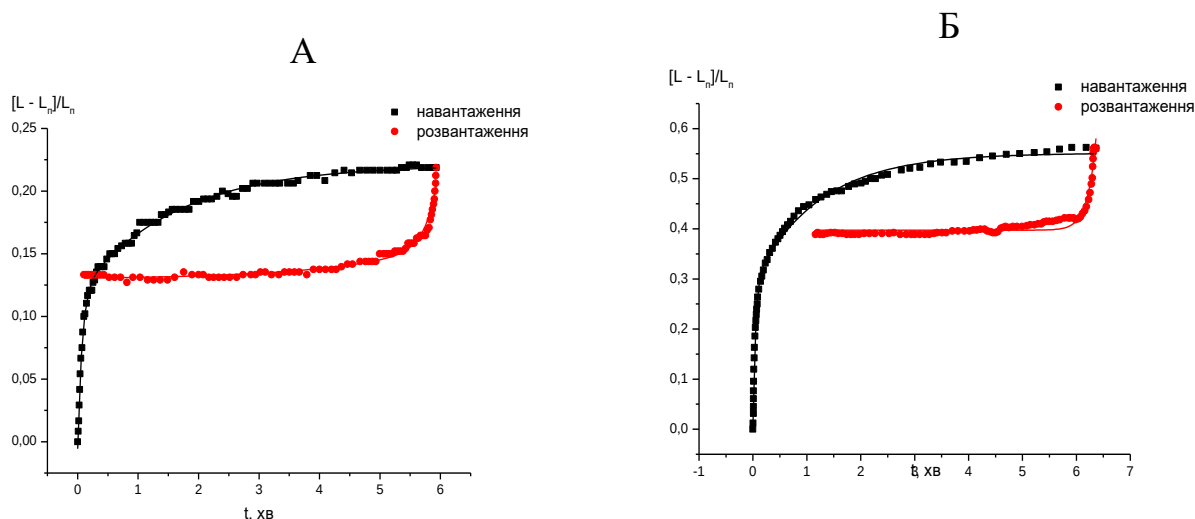


Рис. 4.6. Кінетичні криві гістерезису у випадку напруження (навантаження) і релаксації (розвантаження) гладеньком'язових препаратів шлунку щура. На рисунку наведено приклад типових кривих для навантажень: А – 10 мН, Б – 35 мН.

Тож м'язові препарати піддавали послідовному навантаженню від 5 до 50 мН із кроком у 5 мН, збільшуючи навантаження після досягнення часу встановлення рівноваги τ . Потім вагу так само ступінчато знімали, переходячи на наступний крок після наочної стабілізації довжини препарату. Як і у вищевикладених даних, при релаксації довжина препарату не поверталась в повній мірі до початкового стану. Таким чином, крива залежності “навантаження P – відносна деформація $[(L - L_n)/L_n]$ ” утворювала петлю гістерезису (Рис. 4.7). Варто відмітити, що при навантаженнях понад 30 мН за умови, що напруження препарату досягало рівноважних значень (час навантаження не менше τ), наступне ступінчате зняття вантажу не тільки не призводило до укорочення препарату, а навпаки у більшості випадків

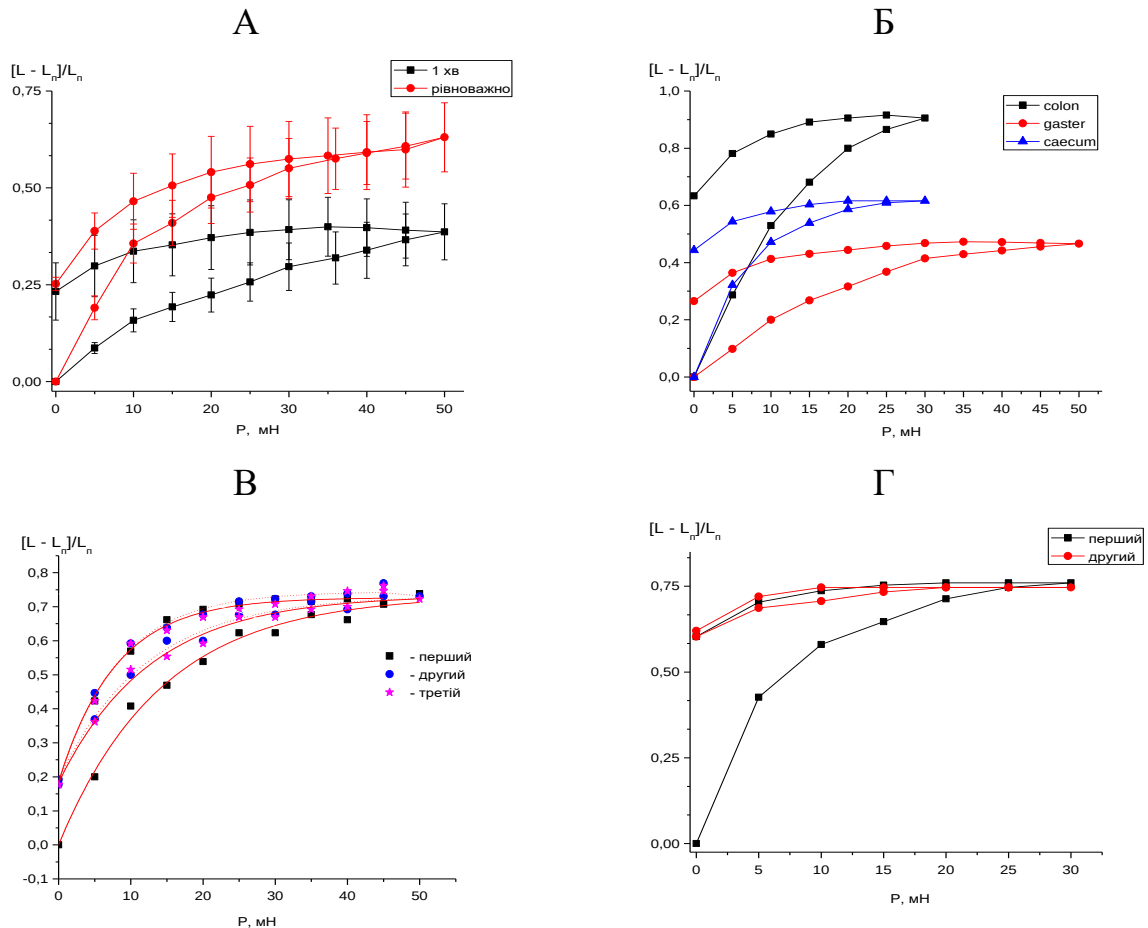


Рис. 4.7. Криві гістерезису вантаж-деформація у випадку ступінчатого навантаження та розвантаження гладеньком'язових препаратів шлунково-кишкового тракту щурів: А – гістерезис препаратів шлунку (*gaster*) при різній тривалості прикладання навантажень (рівноважні значення τ та фіксований час 1 хв); Б – криві гістерезису для різних гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щура: ободової кишки – *colon*, сліпої кишки – *caecum* та шлунку – *gaster* (фіксований час прикладання навантажень 1 хв); В – потрійний гістерезис гладеньких м'язів шлунку щурів, типовий запис (точками наведено дані вимірювань, лінії побудовано як результат розрахунків фрагментів кривої гістерезису за рівняннями 3.2 та 3.3); Г – подвійний гістерезис препаратів *caecum*, типовий запис.

спостерігалось незначне подальше збільшення ΔL . Як видно з рис. 4.7А, цей ефект був виражений значно більш яскраво, коли за тих самих умов при послідовних навантаженнях препаратів кожен вагу прикладали на фіксований час, менший за τ (1 хв). Разом з тим, у обох випадках кінцеві значення залишкової деформації ΔL_0 після повного розвантаження препаратів складали 60% порівняно з максимальним значенням деформації з вантажем 50 мН.

Оскільки у випадку суттєвих механічних деформацій м'язу не відбувається швидкого відновлення його початкової довжини, що свідчить про порушення в ньому внутрішньо- та міжмолекулярних взаємодій, цікавим було дослідити властивості подвійного та потрійного гістерезису (так зване прекондиціювання препаратів, коли третя і наступні петлі гістерезису співпадають з другою). При повторному циклі навантажень ГМ шлунку та *саесит* спостерігалось формування нової петлі гістерезису, яка накладалась на тренд першого розвантаження препарату, тобто зсувалась вправо, а її площа була значно меншою від первинної петлі (Рис. 4.7 В та 4.7Г). Отже, ймовірно, площа петлі гістерезису залежить від фізико-хімічних властивостей м'язового волокна і може бути інформативним кількісним показником, що пов'язаний з функціонуванням гладеньких м'язів. З метою порівняння даних, одержаних на м'язових препаратах зі шлунку, аналогічні криві (час навантаження 1 хв) гістерезису були зареєстровані для кільцевих ГМ *саесит* та проксимальної частини *colon*. Кільцевий шар м'язів цих частин товстого кишечника щурів добре розвинутий, тому дослідження проводили на смужках, препаратів у напрямку кільцевих м'язів. Як видно з рис. 4.7 Б, м'язи *саесит* і особливо *colon* були здатні до значно більшої деформації порівняно зі шлунковими. Надалі нами було здійснено кількісний аналіз одержаних результатів. Фрагменти кривої гістерезису добре апроксимуються рівняннями (4.2) та (4.3) (R^2 не менше 0.95). При цьому емпіричне рівняння (4.2) відповідає механокінетичній кривій за умов навантаження ГМС, а емпіричне рівняння (4.3) – за умов розвантаження:

$$\Delta L = \Delta L_{\max} (1 - e^{-k_1 \cdot P}) \quad (4.2)$$

$$\Delta L = \Delta L_0 + (\Delta L_{\max} - \Delta L_0) \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot P}) \quad (4.3)$$

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

Фрагменти гістерезису, які описуються рівняннями (4.2) і (4.3) можна лінеаризувати відповідно до рівнянь (4.4) і (4.5):

$$\ln \left[\frac{\Delta L_{\max} - \Delta L}{\Delta L_{\max}} \right] = -k_1 \cdot P \quad (4.4)$$

$$\ln \left[\frac{\Delta L_{\max} - \Delta L}{\Delta L_{\max} - \Delta L_0} \right] = -k_2 \cdot P \quad (4.5)$$

Таким чином, здійснивши лінеаризацію згідно з рівняннями (4.4) та (4.5) у координатах $\left[\ln \left[\frac{\Delta L_{\max} - \Delta L}{\Delta L_{\max}} \right]; P \right]$ та $\left[\ln \left[\frac{\Delta L_{\max} - \Delta L}{\Delta L_{\max} - \Delta L_0} \right]; P \right]$ (Рис. 4.8), можна визначити силові константи k_1 і k_2 відповідно.

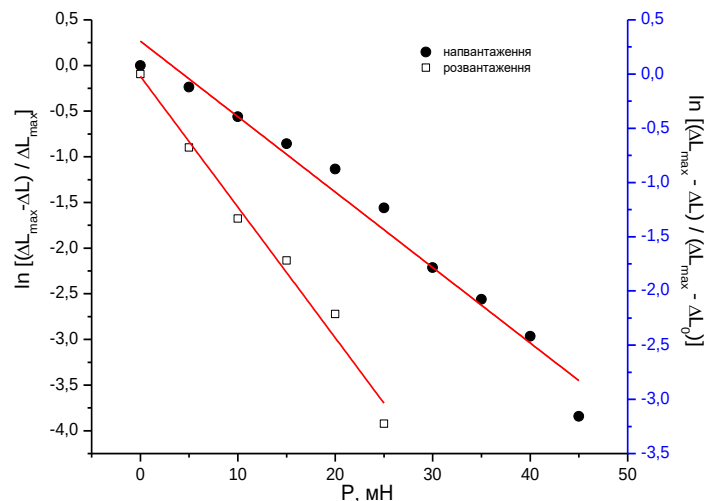


Рис. 4.8. Лінеаризація петлі гістерезису кривої навантаження-розвантаження препарату кільцевих ГМ шлунку щурів. Оригінальний запис гістерезису наведено на рис 3.7 Б; тут $r = 0.96-0.97$.

Іншими кількісними параметрами, які характеризують вискоеластичні властивості м'язових препаратів, є показники навантаження $P_{1/2}$, які відповідно спричиняють напівмаксимальну деформацію у випадку фази наростання деформації та супроводжують розвантаження. Визначимо показник навантаження $P_{1/2}$, який спричиняє напівмаксимальну деформацію для наростання деформації (навантаження) відповідно до рівняння (3.2); прийmemo до уваги, що за цих умов $\Delta L = \Delta L_{\max}/2$, тому:

$$\frac{\Delta L_{\max}}{2} = \Delta L_{\max} (1 - e^{-k_1 \cdot P_{1/2}})$$

Отже

$$P_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1}, \quad (4.6)$$

Аналогічно, визначимо показник $P_{1/2}$, який спричиняє напівмаксимальну деформацію для розвантаження препарату, відповідно до рівняння (4.3). Маємо:

$$\frac{\Delta L_{\max}}{2} = \Delta L_0 + (\Delta L_{\max} - \Delta L_0) \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot P_{1/2}})$$

Отже

$$P_{1/2} = \frac{\ln \left[2 \left(1 - \frac{\Delta L_0}{\Delta L_{\max}} \right) \right]}{k_2} \quad (4.7)$$

Для розрахунку кінетичних параметрів кривої гістерезису відповідно до рівнянь (4.4) і (4.5) було здійснено лінеаризацію кривих гістерезису навантаження-релаксація гладеньком'язових препаратів (у всіх випадках $r = 0.95 - 0.99$, рис. 4.9). Встановлено, що коефіцієнти k_1 та k_2 є тканиноспецифічними. Так, за ідентичних умов (температура 37 °C і розмір м'язових препаратів 8 x 2 мм) силова константа k_1 для гістерезису *gaster*, *colon* та *saecum*, (оригінальні записи наведено на рис. 4.7Б) складали, відповідно 75.2, 122.7 і 175.0 Н⁻¹.

Силова константа k_2 , що пов'язана із крутизною спаду напруження при розвантаженні гладеньком'язових препаратів, також значно відрізнялась для *gaster*, *colon* та *caecum*; для механограм, наведених на записи наведено на рис. 4.7Б вона складала, відповідно 120.1, 195.5 та 175.0 Н⁻¹.

Варто відзначити, що у випадку м'язів *caecum* обидві константи співпали; дійсно, при нормуванні петлі гістерезису спостерігалось практично повне співпадіння частин петлі, які відповідали навантаженню і розвантаженню. Для інших досліджених нами гладеньких м'язів (*gaster* та *colon*) коефіцієнти відрізнялись: коефіцієнт для фази спаду деформації – силова константа k_2 була вищою, ніж силова константа k_1 (Табл. 4.1).

Також гістерезис цих тканин характеризувався різними показниками $P_{1/2}$ для фаз навантаження і розвантаження (рівняння 3.6 та 3.7, відповідно). Для частини петлі, яка відповідала деформації препаратів *gaster*, *colon* та *caecum* вони відповідно становили 9.2, 5.7 та 3.9 мН, а для розвантаження знаходився у зворотній залежності – відповідно 1.2, 2.6 та 3.3 мН.

Розрахунок різниці інтегралів $\int_0^{P_{\max}} \Delta L(P) dP$ між кривими навантаження і розвантаження (відповідно, рівнянь 4.3 та 4.2) дозволяє знайти площу петлі гістерезису:

$$\Delta\Theta = \Theta_2 - \Theta_1. \quad (4.8)$$

Для цього послідовно визначимо площі під кривими навантаження (Θ_1) і розвантаження (Θ_2).

Спочатку визначимо площу під кривою навантаження S_1 .

$$\Theta_1 = \int_0^{P_{\max}} \Delta L(P) dP,$$

де

$$\Theta_1 = \int_0^{P_{\max}} \Delta L_{\max} (1 - e^{-k_1 P}) dP;$$

Отже, можемо записати рівняння для площі Θ_1 :

$$\Theta_1 = \Delta L_{\max} \left[P_{\max} + \frac{1}{k_1} (e^{-k_1 P_{\max}} - 1) \right] \quad (4.9)$$

Аналогічно, визначимо площу під кривою розвантаження Θ_2 .

$$\Theta_2 = \int_0^{P_{\max}} \Delta L(P) dP,$$

де

$$\Theta_2 = \int_0^{P_{\max}} [\Delta L_0 + (\Delta L_{\max} - \Delta L_0)(1 - e^{-k_2 P})] dP;$$

Отже

$$\Theta_2 = \Delta L_{\max} P_{\max} + \frac{\Delta L_{\max} - \Delta L_0}{k_2} (e^{-k_2 P_{\max}} - 1) \quad (4.10)$$

Тоді, підставивши у рівняння (3.8) вирази (3.9) і (3.10), отримаємо формулу для розрахунку площі петлі гістерезису (3.11):

$$\Delta\Theta = \frac{\Delta L_{\max} - \Delta L_0}{k_2} (e^{-k_2 P_{\max}} - 1) - \frac{\Delta L_{\max}}{k_1} (e^{-k_1 P_{\max}} - 1) \quad (4.11)$$

Біофізичний сенс параметру $\Delta\Theta$ полягає у наступному. По суті, площа петлі гістерезису у системі навантаження-деформація є енергетичним показником тимчасової незворотності процесу повернення довжини розтягнутого гладеньком'язового препарату до своєї первинної довжини (ΔL_n), тобто до значення $\Delta L = 0$. Біофізичний сенс цього параметру $\Delta\Theta$, який має енергетичну розмірність, полягає у кількісній термодинамічній характеристиці зазначеного процесу незворотності механічної релаксації ГМ.

Відповідно до рівняння (4.11) було розраховано площі гістерезисних кривих, наведених на рис. 3.7 Б. Вони становили для гладеньком'язових препаратів шлунку – 0.049 ммН, а у випадку товстого кишечника: *colon* – 0.075 ммН та *caecum* 0.033 ммН. Тобто різні гладенькі м'язи кишково-шлункового тракту відрізняються показниками параметру $\Delta\Theta$.

Таблиця 4.1

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

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

Отже, високоеластична деформація м'язів, крім загальноприйнятих показників (як, наприклад, коефіцієнт жорсткості, податливість або модуль Юнга), може бути кількісно охарактеризована наступними параметрами: силовою константою k_1 та показником навантаження, яке спричиняє напівмаксимальну деформацію ($P_{1/2}$), - у випадку деформації, індукованої градуйованим навантаженням. Для укорочення м'язів при послідовному зменшенні вантажу аналогічними параметрами є: силова константа k_2 та показник навантаження, яке спричиняє половинне відновлення довжини ($P_{1/2}$) після зняття вантажу [425]. Повний цикл гістерезису зручно характеризувати площею петлі гістерезису ($\Delta\Theta$), розрахованою згідно з рівнянням (4.11).

4.2. Термомеханокінетика високоеластичної деформації гладеньких м'язів травного тракту: гістерезис у випадку градуйованих навантажень-розвантажень при різних температурах

Оскільки від здатності шлунку ефективно відновлюватись від деформацій, що спричиняються у процесі харчування (при змінній температурі їжі), залежить нормальне функціонування шлунково-кишкового тракту, важливим було встановити закономірності розвитку гістерезису ГМ шлунку за умови варіювання температури.

Криві гістерезису, одержані за різних температур, відповідно до рівнянь (4.4) і (4.5), лінеаризували і здійснювали подальші розрахунки

силових констант k_1 і k_2 , та напівмаксимальних значень $P_{1/2}$ для навантаження і розвантаження препаратів, а також площі гістерезисних кривих (Рис. 4.9, 4.10 та 4.11 відповідно). Було встановлено, що на дослідженому діапазоні температур (22 - 48 °C) константа k_1 характеризувалась одним відносним максимумом при фізіологічній температурі 37°C, який, однак, був підтверджений статистично не для всіх досліджених температур (Рис. 4.9 А). Разом з тим, коефіцієнт k_2 , що пов'язаний із відновленням довжини препаратів при знятті вантажу, не мав чітко вираженого екстремуму, скоріше, його максимальні значення локалізовані в діапазоні температур 31-40°C (ймовірніше, зсунуті в бік вищих температур).

За рівняннями (4.6) і (4.7) були розраховані напівмаксимальні значення $P_{1/2}$ для фаз кривої гістерезису, які відповідають навантаженню і розвантаженню препаратів. Оскільки $P_{1/2}$ для фази навантаження перебуває у зворотному зв'язку з силовою константою k_1 , його температурна залежність характеризувалась екстремумом-мінімумом, який відповідав температурі 37°C. Така особливість може вказувати на спроможність м'язу за фізіологічної температури максимально ефективно фіксувати свою довжину у відповідь на зростаючу градуйовану деформацію.

На відміну від $P_{1/2}$ для фази навантаження, значення $P_{1/2}$ для розвантаження ГМС (як і силова константа k_2) не мали чіткого максимуму в дослідженому діапазоні температур (Рис. 4.10). Що стосується площі петлі гістерезису, то цей параметр мав зворотну залежність від температури, загалом зменшуючись із її зростанням (Рис. 4.11).

Гладеньком'язовий шар формує структурно-функціональну основу органів травної системи і його механокінетичні властивості у значній мірі визначають повноцінну роботу ШКТ. У випадку здорового кишечника, його стінкам властива здатність адекватно реагувати на механічні та інші стимули, змінюючи еластичність, тоді як такі множинні патологічні стани органів травного тракту (зокрема, ахалазія, пухлини, кишкова непрохідність, стриктури, а також структурні зміни, індуковані системними хворобами,

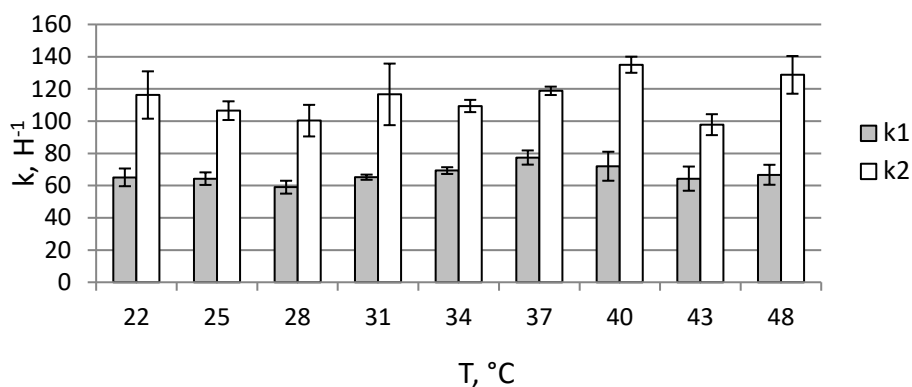


Рис. 4.9. Температурна залежність силових констант k_1 та k_2 (H^{-1}) гістерезису, розрахованих для ступінчатого навантаження і розвантаження (5-50 мН, крок 5 мН) препаратів кільцевих ГМ шлунку щурів ($M \pm m$, $n=5-9$).

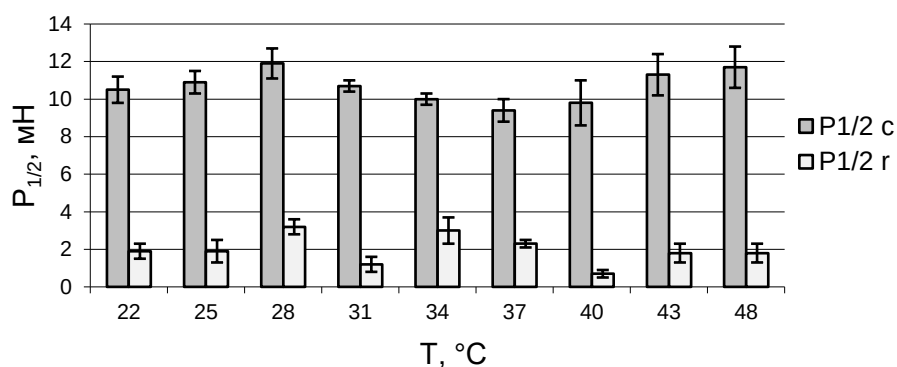


Рис. 4.10. Температурна залежність показників навантаження, які спричиняють напівмаксимальну деформацію фаз наростання деформації ($P_{1/2c}$, мН) та розвантаження ($P_{1/2r}$, мН), розрахованих для ступінчатого навантаження і розвантаження (від 5 до 50 мН, крок 5 мН) кільцевих ГМ шлунку щурів ($M \pm m$, $n=5-9$).

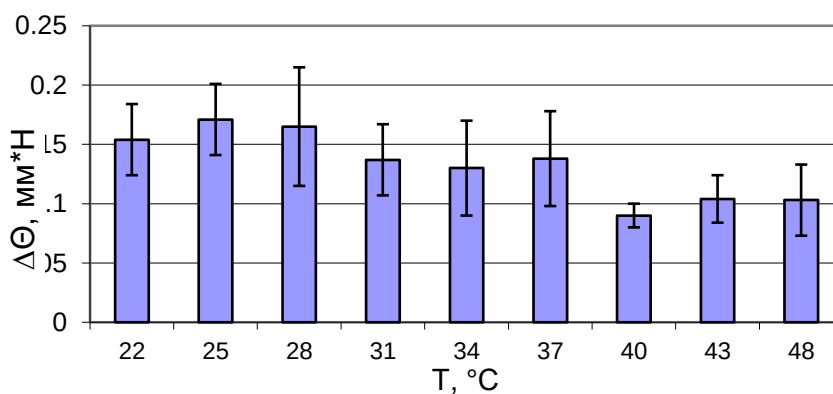


Рис. 4.11. Температурна залежність площі петлі гістерезису (параметр $\Delta\Theta$, мм·Н), розрахованої для ступінчатого навантаження і розвантаження (від 5 до 50 мН, крок 5 мН) препаратів кільцевих ГМ шлунку щурів ($M \pm m$, $n=5-9$).

зокрема, гіпертензією та діабетом) супроводжуються порушеннями механічних властивостей м'язової стінки [407 - 409]. Значна кількість сучасних клінічних досліджень пацієнтів із захворюваннями ШКТ, проводиться манометрично та тензометрично. Результати таких дослідів мають не тільки прикладне значення, але також дозволяють виявляти фундаментальні закономірності нормального функціонування або патогенезу в живих системах [425].

Використання в якості модельної системи мультиклітинних препаратів дозволяє досить адекватно відтворити складну структуру ГМ на рівні, близькому до *in situ*. Загалом, механічні властивості таких композитних систем визначаються багатьма факторами, серед яких, зокрема, кількісне представлення різних складників; механічні властивості цих складників; відносне розташування складників у системі та їх взаємодія між собою. Зокрема, важливу роль у формуванні еластичних властивостей шлунку і кишечника відіграють присутні тут у великій кількості сполучнотканинні елементи, зокрема колаген, концентрація якого тут приблизно втричі переважає таку у серцевому та скелетних м'язах [426]. Також на еластичність ГМ впливають фізико-хімічні фактори середовища та генетично детерміновані процеси: концентрація Ca^{2+} , температура (зниження супроводжується збільшенням коефіцієнту жорсткості ГМ трахеї та портальної вени), напруження кисню (гіпоксія порівняно з нормоксією підвищує жорсткість препаратів трахеї), а також вікові та фенотипові зміни (як, зокрема, показано для відносного складу і міжкомпонентних зв'язків в тканинах аорти вівці у віковому аспекті або до- та післяпологових змін в матці щурів) [426-428].

Загалом, вплив температури на функціонування м'язів розкриває ряд фундаментальних закономірностей. Аналіз термомеханічних властивостей живих систем дає змогу встановити, які реакції лежать в основі температура-пертурбованих реакцій – активні (хімічні процеси, термочутливі, зі значенням температурного коефіцієнту Q_{10} близько 2) або пасивні (фізичні

процеси, відносно термонечутливі, з Q_{10} , наближеним до одиниці). Так, численними роботами встановлено, що, наприклад, функціонування ензимів, розвиток активного механічного напруження м'язу в процесі скорочення та АТФ-азна реакція скоротливих білків є температурно-чутливими процесами зі значеннями Q_{10} близько 2 і більше [429, 430]. У же той час, як показано для різних типів м'язів (серцевий, скелетні та гладенькі: із трахеї, порталної вени та *taenia coli*), їх пасивні механічні реакції мають невелику температурну чутливість [430-432].

Отже, наші дослідження з термомеханокінетики деформаційних процесів тканин ШКТ загалом свідчать, що всі параметри вискоеластичної деформації відносно мало залежать від температури [421, 425]. Одержані нами результати узгоджуються із даними інших досліджень, відповідно до яких для зміни жорсткості ГМ температурний коефіцієнт Q_{10} варіює в межах 0.7-1,2 [424, 431-433].

Такі ефекти змін температури можуть бути пов'язані, зокрема, з властивостями колагенових волокон, жорсткість яких перебуває у зворотній залежності від цього фізичного фактора [434]. Разом з тим, відомі реакції ГМ, зокрема, шлунку і кишечника на температурні стимули (за умови їх швидкого прикладання): м'язи шлунку скорочуються у відповідь на холодову стимуляцію та розслабляються при нагріванні. На рівні інтактного ШКТ це має фізіологічне обґрунтування, активуючи залежно від точки прикладання стимулу крім ентерогастральних також гастрогастральні рефлекси [435]. На рівні ізольованих гладеньком'язових препаратів було встановлено, що їх скоротлива реакція, викликана охолодженням, не пов'язана з вивільненням нейромедіаторів, але забезпечується температуро-залежними механізмами транслокації іонів Ca^{2+} в міоцитах (зокрема, Ca^{2+} -помпою СР); швидке (до хвилини) значне, на 10-15°C, зниження температури призводить до розвитку скоротливої відповіді м'язових препаратів [436-438]. Варто також згадати роботи по встановленню ефектів швидкого помірного охолодження та механізмів їх реалізації в ГМ сечоточника мурчаків та щурів [413]. Як було

показано, зниження температури до 22-27 °C спричиняє достовірне підвищення тривалості потенціалів дії та Ca^{2+} -транзієнтів, потенціювання Ca^{2+} -активованих Cl^- -струмів. Яскраво виражене уповільнення розслаблення (Q_{10} складало 5.1 для сечоточника мурчаків та 3.9 – для сечоточника щурів) цих ГМ у випадку охолодження головним чином пов'язано з потужним інгібуванням фосфатази легких ланцюгів міозину (Q_{10} складало 5.3) [413]. Для ГМ трахеї мурчаків, у випадку швидкого (20 с) помірного охолодження, властива двофазна реакція – початкове скорочення (амплітудою пропорційне величині перепаду температури), яке змінюється повільною релаксацією; суттєве охолодження (менше 22°C) супроводжується лише розслабленням. Як показано, ці ефекти опосередковувались модуляцією функціонування електрогенної натрієвої помпи ПМ ГМК, та зміною продукування інгібіторних простагландинів [438].

Клінічні перспективи використання аналізу вискоеластичної деформації ГМ ШКТ (наприклад методом ультразвукової діагностики) добре розкриті в огляді за авторством Н.Gregersen та С.Kassab, де, зокрема, зазначено, що зміна функціонування м'язової стінки органів травного тракту тісно пов'язане зі зміною їх механічних властивостей, а такі поширені патології як хвороба Гіршпрунга (врожена аномалія іннервації товстого кишечника), ульцеративні коліти, цукровий діабет і системний склероз супроводжуються їх морфологічними та біомеханічними змінами [406].

4.3. Робота з вискоеластичної деформації ГМ шлунку

На наступному етапі досліджень нами було визначено закономірності температурної чутливості розтягування ΔL кільцевих ГМантрального відділу шлунку під дією сили P . Реєстрували величину деформації м'язових смужок за умови прикладання градуйованих навантажень в діапазоні значень P 5 – 50 мН (з кроком 5 мН). Умовою кожного наступного збільшення величини навантаження було досягнення препаратом рівноважного (у часі) значення

довжини $\Delta L \approx \text{const}$, яке відбувалось протягом часу $\tau_{\text{рівн}}$ (у середньому – близько 3-5 хв) (Рис. 3.5). Навантаження препаратів проводили в умовах змінної температури середовища (омиваючого розчину) у фізіологічно обґрунтованому температурному діапазоні (від 22 до 48°C) [439, 440].

Як було встановлено, процес поступового розтягування ГМ, залежного від величини прикладеної сили P , добре апроксимується рівнянням (4.2) (Рис. 4.8 та 4.12); з лінеаризованого графіка визначали силову константу $k = \text{tg}\alpha$. Величини максимальної деформації препаратів ΔL_{max} та силової константи k_1 виявляли температурну залежність (Рис.4.14, криві 1 та 2 відповідно).

Робота деформації ΔA при розтягуванні м'язової смужки з початковою довжиною L_0 на довжину ΔL силою P , із врахуванням функції (4.2), може бути описана рівнянням (4.12):

$$\frac{\Delta L}{\Delta L_{\text{max}}} = 1 - e^{-k_1 \cdot P};$$

$$P = \frac{1}{k_1} \ln \frac{\Delta L_{\text{max}}}{\Delta L_{\text{max}} - \Delta L};$$

Тоді:

$$d\Delta A = -\frac{1}{k_1} \ln \frac{\Delta L_{\text{max}}}{\Delta L_{\text{max}} - \Delta L} d\Delta L$$

$$\Delta A = -\frac{1}{k_1} \int_0^{\Delta L} \ln \frac{\Delta L_{\text{max}}}{\Delta L_{\text{max}} - \Delta L} d\Delta L \quad (4.12)$$

Із виразу (4.12) визначимо роботу деформації м'язу:

позначимо

$$I = \int_0^{\Delta L} \ln \frac{\Delta L_{\text{max}}}{\Delta L_{\text{max}} - \Delta L} d\Delta L = (\ln \Delta L_{\text{max}}) \Delta L$$

та

$$II = -\int_0^{\Delta L} \ln(\Delta L_{\text{max}} - \Delta L) d\Delta L$$

Тоді

$$I + II = (\Delta L_{\text{max}} - \Delta L) \ln \left(\frac{\Delta L_{\text{max}} - \Delta L}{\Delta L_{\text{max}}} \right) + \Delta L$$

Отже, повна робота по деформації м'язів визначатиметься рівнянням (4.13):

$$\Delta A = -\frac{1}{k_1} \left[(\Delta L_{\max} - \Delta L) \ln \left(\frac{\Delta L_{\max} - \Delta L}{\Delta L_{\max}} \right) + \Delta L \right] < 0 \quad (4.13)$$

Знак «-» в рівнянні (4.13) вказує на те, що робота виконується над системою (відповідно до теплотехнічного правила знаків у технічній термодинаміці для роботи ΔA позитивною вважають роботу, що здійснюється системою, а негативною - що здійснюється над системою).

Керуючись рівнянням (4.13), було здійснено розрахунки величини роботи по деформації ГМ шлунку (Рис. 4.15). Проаналізуємо температурну чутливість роботи ΔA із деформації ГМ шлунку. Загалом, у діапазоні температур 22-48 °С (в умовах однакової деформуючої сили Р) цей показник був найбільшим при фізіологічно значущих температурах (28-37 °С), зменшуючись при помірному охолодженні і нагріванні.

Варто відзначити закономірності температурної чутливості роботи ΔA при постійних ($\Delta L = \text{const}$) деформаціях ГМ. При незначних деформаціях м'язів ($\Delta L / \Delta L_{\text{п}} < 30\%$) абсолютна величина ΔA практично не залежала від температури. В умовах досить великих постійних деформацій ($\Delta L / \Delta L_{\text{п}} \approx 40-50\%$) вона дзвіноподібно змінювалась при варіюванні температури, маючи максимум на краях температурного діапазону і досягаючи мінімальних значень при 31-40 °С. Таким чином, при різних температурах для забезпечення значної деформації м'язів необхідно виконати різну роботу, і в цьому випадку абсолютне значення ΔA варіює в межах 30-40%.

Характеристичною величиною, яка вказує на чутливість системи до холодних і теплових впливів, є напівмаксимальна робота $\Delta A_{1/2}$. $\Delta A_{1/2}$ – робота, яку необхідно виконати, щоб спричинити напівмаксимальне розтягування ГМ смужки ($\Delta L_{\max} / 2$). З рівняння (4.13) визначимо показник половинного значення роботи по деформації м'язів $\Delta A_{0,5}$ (4.14):

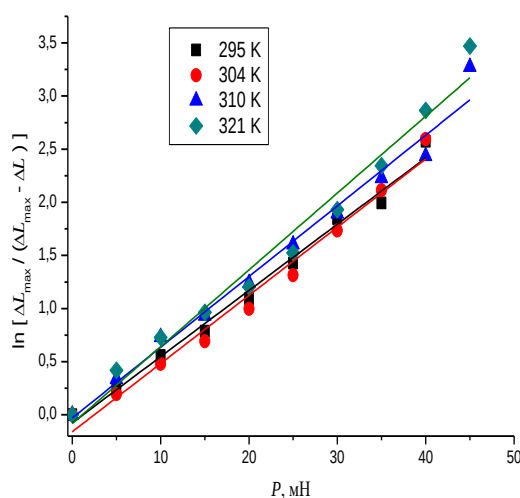


Рис. 4.12. Лінеаризація усереднених ізотермічних кривих (наведених на рис. 3.5) розтягування ΔL кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів під дією навантаження P . Для всіх випадків $r=0.97-0.99$.

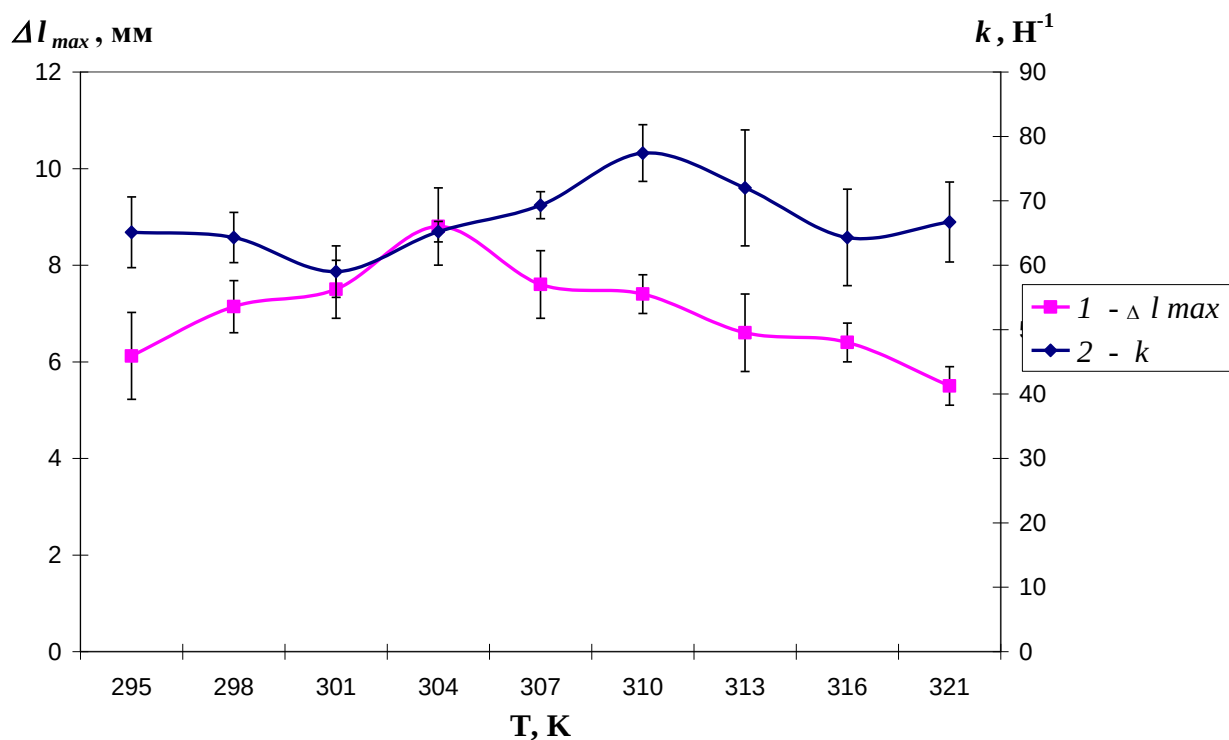


Рис. 4.14. Температурна залежність рівноважних механокінетичних параметрів, визначених для ступінчатого навантаження (від 5 до 50 мН із кроком 5 мН) препаратів кільцевих гладеньких м'язів шлунку щурів: 1 – показники максимальної деформації $\Delta L_{\max}$ (мм); 2 – силова константа k (H^{-1}). Дані представлені як $M \pm m$ ($n=5-9$).

$$\Delta A_{0,5} = -\frac{1}{k_1} \left[\left(\Delta L_{\max} - \frac{\Delta L_{\max}}{2} \right) \ln \left(\frac{\Delta L_{\max} - \frac{\Delta L_{\max}}{2}}{\Delta L_{\max}} \right) + \frac{\Delta L_{\max}}{2} \right].$$

Отже,

$$\Delta A_{0,5} = -0,16 \frac{\Delta L_{\max}}{k_1} \quad (4.14)$$

Із урахуванням рівняння (4.2) ми можемо визначити зв'язок між напівмаксимальною деформацією м'язових препаратів $\frac{1}{2}(\Delta L_{\max})$ та силою, прикладання якої її спричиняє ($P_{0,5}$):

$$\frac{\Delta L_{\max}}{2} = \Delta L_{\max} \left(1 - e^{-k_1 \cdot P_{0,5}} \right).$$

Тоді:

$$k_1 \cdot P_{0,5} = \ln 2$$

Отже, силу $P_{0,5}$, яка, діючи на м'язи, буде спричиняти виконання половинного значення роботи по деформації м'язів $\Delta A_{0,5}$, можна визначити з рівняння (4.15):

$$P_{0,5} = \frac{0,69}{k_1} \quad (4.15)$$

Із урахуванням рівнянь (4.14) і (4.15), можна записати рівняння для половинного значення роботи по деформації м'язів $\Delta A_{0,5}$ у наступному вигляді:

$$\Delta A_{0,5} = -0,23 P_{0,5} \cdot \Delta L_{\max} \quad (4.16)$$

Температурна чутливість напівмаксимальної роботи $\Delta A_{1/2}$, яку розраховували за рівнянням (4.14), виявляла, загалом, такі ж тенденції, які спостерігались у випадку роботи при прикладанні інших фіксованих значень деформуючої сили P : максимальні значення абсолютної величини $\Delta A_{1/2}$ спостерігались у діапазоні температур 28-31 °С, зменшуючись при відхиленні вправо і вліво (Рис. 4.16).

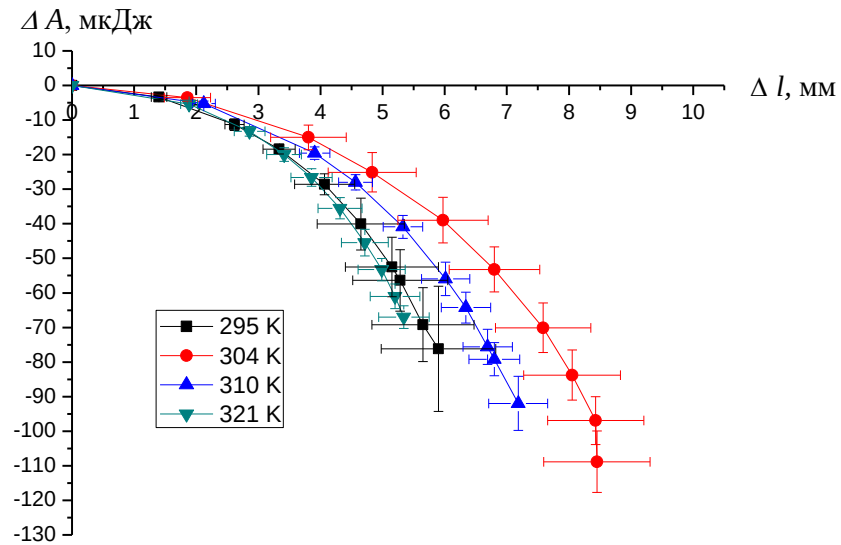


Рис. 4.15. Ізотерми залежності роботи по високоеластичній деформації ΔA , розрахованої за рівнянням (3.13), при розтягуванні ΔL гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів. Дані представлені як $M \pm m$ ($n=5-9$).

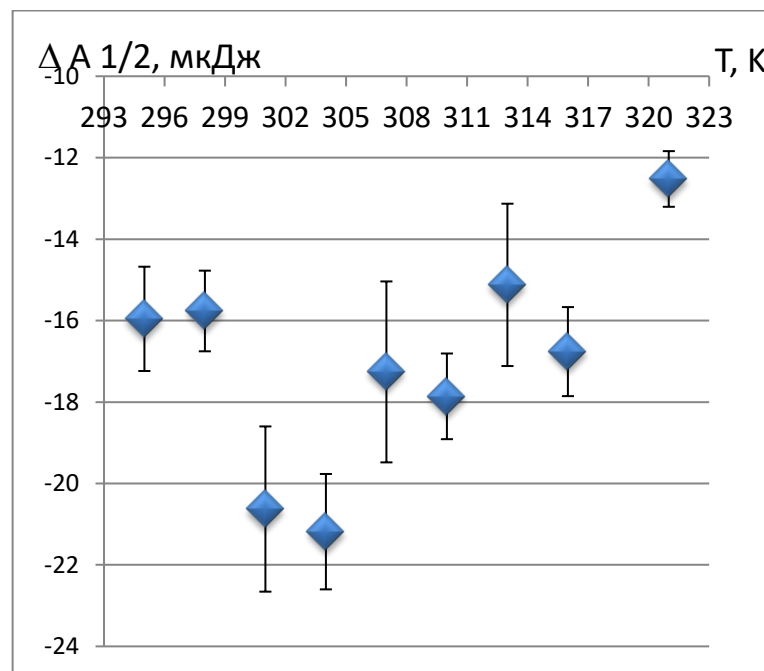


Рис. 4.16. Температурна залежність напівмаксимальної роботи $\Delta A_{1/2}$ по високоеластичній деформації гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів, розрахованої за рівнянням (3.14). Дані представлені як $M \pm m$ ($n=5-9$).

Можна міркувати про функціональну роль температурної чутливості термодинамічних функцій, зокрема, роботи по розтягуванню ГМ шлунку. Як уже згадувалось, шлунок належить до частини травного тракту, еволюційно адаптованої до функціонування в умовах змінної температури. Так, фізіологічно обґрунтованим (щодо харчового раціону) температурним діапазоном для людини є 21 – 43°C (термічні впливи понад 48-52°C активують ноціцептори, спричиняючи больові відчуття) [441, 442]. При різних температурах в ГМК, які формують стінку шлунку, активуються терморецептори – катіонні канали TRPM8 і TRPV2 [443, 444]. Канали TRPM8 експеруються в міоцитах; вони активуються при зниженні температури менше 25 °C (за деякими даними 28 °C) і практично інактивуються при досягненні 30 °C [445, 446]. Канали TRPV2 експресуються лише в ICC і активуються при значному нагріванні – понад 52 °C, тобто не можуть обумовлювати одержані нами ефекти [444]. У той же час, як показано багатьма дослідженнями, зокрема і на ГМ фундального відділу шлунку щурів, їх холодове скорочення опосередковується саме TRPM8 (за механізмом TRPM8-викликаної активації кінази Rho) [447]. Таким чином, роль цих каналів ймовірна в ефектах, виявлених в нашому дослідженні: досить потужне ($\approx 25\text{-}30\%$) збільшення ΔA при підвищенні температури з 25°C до 28-31°C може бути пов'язане саме з різним внеском TRPM8 в формування базального тону ГМ. Ефект зниження абсолютного значення роботи ΔA , при підвищенні температури понад 43°C, ймовірно, пов'язаний з тепловою деструкцією м'язових білків.

Оскільки нами були вивчені температурні ефекти при вискоеластичному розтягуванні ГМ, яке фізично є пасивним процесом, не можна також нехтувати внеском у сумарний результат сполучнотканинних елементів (зокрема, колагену і еластину), що складають близько половини від загальної кількості білку в ГМ. Відомо, що температурна залежність еластичності колагену і еластину протилежна: в області низьких температур колаген має знижену еластичність (і, відповідно, вищу жорсткість), тоді як

еластичність еластину зменшується з нагріванням [434, 436]. У ефективності пасивного розтягування м'язових смужок шлунку при кожній з температур середовища, таким чином, відбиватимуться відносний вміст цих білків і їх відносні значення еластичності. Це дозволяє припустити, що разом зі зміною провідності каналів TRPM8, температуро-залежна модуляція механічних властивостей сполучнотканинних білків можуть створювати передумови до транзйентної зміни моторної і евакуаторної функцій шлунку, яка спостерігається зокрема при вживанні прохолодної їжі [441, 442].

Отже, нами було встановлено, що при деформуванні ГМ антрального відділу шлунку щурів найбільша робота виконується в межах фізіологічно значущих температур (28-37°C), досягаючи максимального абсолютного значення в області помірного охолодження (28-31°C). У лівій (22-25°C) та правій (40-48°C) частинах температурного діапазону прикладання аналогічних величин деформуючої сили Р спричиняє виконання над системою відносно меншої (до 40%) роботи і, таким чином, є менш термодинамічно вигідним. Тож найбільш ефективним (з точки зору виконання роботи) є функціонування м'язової системи в діапазоні температур від невеликого охолодження до норми (28-37°C) [448].

4.4. Застосування рівняння Віганда-Снайдера до термодинамічної інтерпретації високоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунку

Температура – фізичний фактор, який в значній мірі визначає функціональні властивості біологічних систем, зокрема і скоротливу активність міоцитів [449, 450]. Так, помірне охолодження здатне викликати як інгібування регуляторних ензимів скоротливого апарату – кінази та фосфорилази легких ланцюгів міозину (загалом це відображається у зниженні амплітуди, а також швидкостей наростання та спаду сили скоротливих відповідей), так і сенситизувати скоротливі білки до Ca^{2+} [413, 451]. Підвищення ж температури понад фізіологічний рівень до деякої межі (до виникнення термоіндукованого порушення структури білків)

супроводжується зростанням сили скорочення [452]. ГМ окремих органів фізіологічно адаптовані до значної варіабельності різноманітних фізичних параметрів. Так, функціонування верхніх відділів травної системи (зокрема, стравоходу і шлунку) супроводжуються, по-перше, постійними змінами тиску на стінки порожнин травного тракту, що створюється різними об'ємами харчових мас, і, по-друге, досить значно варіюючими показниками температури (зазвичай, від 20°C – при вживанні охолоджених до 4°C продуктів, до близько 50 °C як, зокрема, при споживанні гарячих напоїв) [411, 443]. Тому цілком зрозумілим є важливість дослідження термомеханокінетичних та термодинамічних властивостей ГМ, які формують стінки верхніх відділів ШКТ, і особливо шлунку.

Тому на наступному етапі нами було проаналізовано термодинамічні властивості розтягування кільцевих ГМ антрального відділу шлунку щурів. Мультиклітинному препарату надавали зростаючий натяг, який відповідав діапазону зміни сили від 0 до 50 мН (з кроком 5 мН), збільшуючи навантаження після досягнення препаратом рівноважного значення довжини ($\Delta L = \text{const}$). Величину відносної деформації препаратів розраховували як ΔL ($\Delta L = L - L_{\text{п}}$), де $L_{\text{п}}$ – значення довжини препарату в ненавантаженому стані, L – поточне значення довжини препарату.

Термодинамічний аналіз процесу розтягування гладеньком'язової смужки проводили відповідно до уявлень, викладених в [453]. Повну роботу деформації dA при розтягуванні м'язу під дією сили P на довжину $d\Delta L$ можна записати у вигляді:

$$dA = -Pd\Delta L - \pi d\Delta W \quad (4.17)$$

де: ΔA – повна робота деформації (розтягування) м'язу,
 ΔL – величина деформації м'язового препарату,
 P – сила, яка спричиняє деформацію (розтягування) м'язу,
 π – атмосферний тиск,
 ΔW – зміна об'єму м'язу.

Значення виразу (4.17) для роботи розтягування - dA береться зі знаком «-», бо робота виконується над системою, а не системою.

Будемо вважати, що при розтягуванні й скороченні м'язу його об'єм, якщо і змінюється, то дуже незначно (реально співвідношення цих величин відрізняться не менше, ніж на три порядки: $P \cdot d\Delta L / \pi \cdot d\Delta W \approx 10^3 - 10^4$). Тоді рівняння (4.17) набуде вигляду:

$$dA = -Pd\Delta L \quad (4.18)$$

Із урахуванням рівняння (4.18), відповідно для зміни внутрішньої енергії dU можемо записати:

$$dU = dQ - dA = T \cdot dS + P \cdot d\Delta L \quad (4.19)$$

де: dU – зміна внутрішньої енергії при деформації (розтягуванні) м'язу,
 dQ – тепловий ефект,
 dS – зміна ентропії,
 ΔL – величина деформації м'язового препарату,
 P – сила, яка спричиняє деформацію (розтягування) м'язу,
 T – абсолютна температура (°K).

Диференціюючи співвідношення (4.19) по величині ΔL за ізотермічних умов ($T = \text{const}$), будемо мати:

$$P = \left(\frac{\partial \Delta U}{\partial \Delta L} \right)_T - T \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial \Delta L} \right)_T \quad (4.20)$$

Рівняння (4.20) в узагальненому вигляді характеризує зміну стану м'язового волокна при його деформації: змінюється як внутрішня енергія ΔU , так і ентропія ΔS системи.

Встановимо залежність деформуючої сили P від температури T . Для вільної енергії Гельмгольца ΔF маємо, з урахуванням (4.19):

$$d\Delta F = d(\Delta U - T\Delta S)$$

Тоді,

$$d\Delta F = P \cdot d\Delta L - \Delta S \cdot dT.$$

Звідси маємо:

$$P = \left(\frac{\partial \Delta F}{\partial \Delta L} \right)_T ;$$

$$-\Delta S = \left(\frac{\partial \Delta F}{\partial T} \right)_L .$$

Для м'язової системи справджується рівність

$$\left(\frac{\partial \Delta P}{\partial T}\right)_L = -\left(\frac{\partial \Delta S}{\partial \Delta L}\right)_T. \quad (4.21)$$

Підставляючи співвідношення (4.21) в рівняння (4.20), маємо остаточно:

$$P = \left(\frac{\partial \Delta U}{\partial \Delta L}\right)_T + \left(\frac{\partial \Delta P}{\partial T}\right)_{\Delta L} \cdot T. \quad (4.22)$$

Рівняння (4.20) та (4.22) – це рівняння Віганда-Снайдера [453], які дозволяють експериментально встановити зміну як внутрішньої енергії ΔU , так і ентропії (див. співвідношення (4.21)) при розтягуванні м'язу. По-суті, єдине, що потрібно знати для розрахунку термодинамічних параметрів - це кілька значень рівноважного навантаження P для кількох температур при сталій деформації ΔL волокна.

З графіків, наведених на рис. 4.12, можна одержати температурні залежності сили P у випадку різних значень ΔL . Так, на рис. 4.17 маємо хід двох таких графіків при невеликих ($\Delta L/L_{\pi} \approx 20\%$) (графік 1) та відносно великих ($\Delta L/L_{\pi} \approx 50\%$) (графік 2) величинах розтягування.

Відповідно до рівняння Віганда-Снайдера (4.20) та одержаних експериментальних результатів (рис. 4.17, табл. 4.2) нами було проаналізовано термодинамічний ефект, що спостерігається при вискоеластичному розтягуванні ГМ шлунку. Як можна бачити (рис. 4.17, графік 1; табл.4.2), при малих розтягуваннях зміна внутрішньої енергії dU на одиницю довжини смужки ΔL є величиною постійною та позитивною ($\left(\frac{\partial U}{\partial \Delta L}\right)_T \approx 5,5 \text{ мН}$), тобто зі збільшенням ΔL величина ΔU зростає лінійно (22-48 °C). У той же час, збільшення довжини препарату ΔL не супроводжується зміною ентропії ΔS (бо $\left(\frac{\partial S}{\partial \Delta L}\right)_T = 0$). Отже, при малих деформаціях при всіх досліджених температурах має місце збільшення внутрішньої енергії ГМ, що у подальшому (після зняття навантаження) може забезпечувати ефекти релаксації м'язової напруги щодо її повернення до

початкового стану ($\Delta L = 0$, $L = L_{\pi}$). Важливо, що за таких умов, ймовірно, не мають місце порушення структурованості ($(\partial S / \partial \Delta L)_T = 0$) ГМ.

Значно більш складними є термодинамічні ефекти, які спостерігаються у випадку суттєвих розтягувань ($\Delta L / L_{\pi} \approx 50\%$) (рис. 4.17, графік 2; табл. 4.2). При температурах $< 31^{\circ}\text{C}$, зміна внутрішньої енергії на одиницю (зміни) довжини смужки ΔL є позитивною та дуже значною: $(\partial U / \partial \Delta L)_T \approx 525$ мН. Тобто при значних розтягуваннях за умов знижених температур ($22\text{--}30^{\circ}\text{C}$) збільшення ΔU із величиною ΔL є лінійним. У той же час, у зв'язку з тим, що тангенс кута нахилу «лівого плеча» температурної залежності сили P є від'ємним, то $(\partial S / \partial \Delta L)_T > 0$, відповідно до рівняння (4.22). Отже, за зазначених температур при розтягуванні величина зміни ентропії $(\partial S / \partial \Delta L)_T$ препарату буде зростати, тобто має місце збільшення неупорядкованості ГМ.

У діапазоні температур $> 30^{\circ}\text{C}$ і $< 40^{\circ}\text{C}$ за умов суттєвих розтягувань маємо, що $(\partial U / \partial \Delta L)_T \approx \text{const} = 20,5$ мН, тобто внутрішня енергія ΔU тензометричної системи лінійно збільшується із зростанням деформації. Однак, за цих умов зміна ентропії практично не відбувається ($\Delta S = 0$).

І нарешті, при температурах понад 37°C маємо наступне. Зміна внутрішньої енергії ΔU лінійно спадає зі збільшенням розтягування: $(\partial U / \partial \Delta L)_T \approx -856$ мН. Такий ефект спостерігається на тлі зменшення ΔS при збільшенні деформації ΔL (бо маємо, відповідно до рівняння Віанда-Снайдера (2), позитивний тангенс кута нахилу у випадку “правої” гілки температурної залежності сили P), тобто $(\partial S / \partial \Delta L)_T < 0$. Тобто, в цьому випадку має місце збільшення впорядкованості ГМ.

Можемо міркувати про підґрунтя таких термодинамічних ефектів у фізіологічних механізмах регуляції функціонування травного тракту. Звичайно, використання ізольованих препаратів ГМ (з відсутніми слизовою

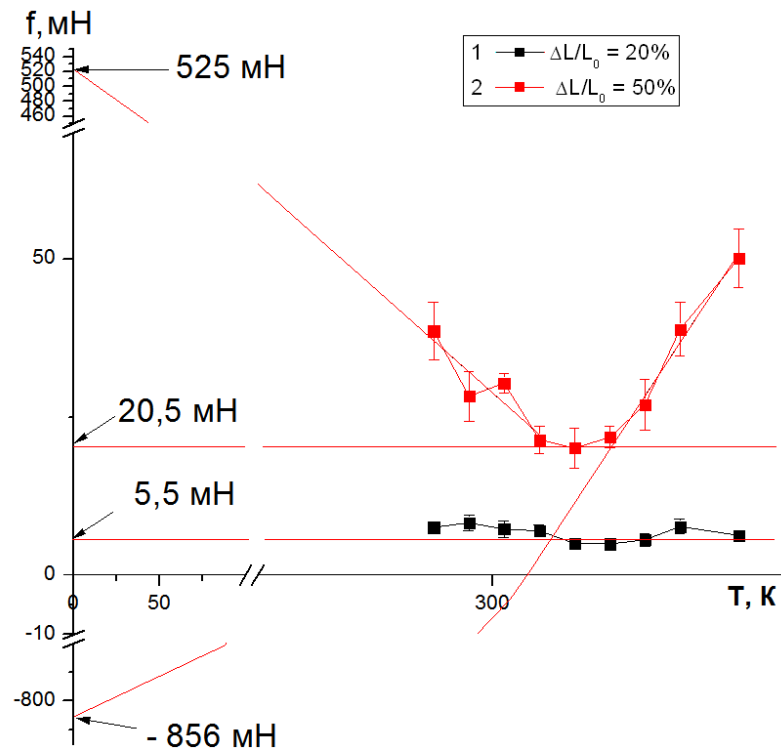


Рис. 4.17. Термодинамічна інтерпретація використання рівняння Віганда-Снайдера (3.22) з метою експериментального тлумачення високоеластичного рівноважного ($\tau = 3-5$ хв) розтягування гладеньком'язових смужок *antrum* щурів під дією сили P ; дані представлено у вигляді $M \pm m$ ($n=5-9$): 1 – відносна деформація $\Delta L/L_{\pi}=20\%$; 2 – відносна деформація $\Delta L/L_{\pi}=50\%$.

Таблиця. 4.2

Термодинамічні ефекти (за температур 22 – 48 °С), що супроводжують високоеластичну деформацію кільцевих ГМ *antrum* щурів за умов малих і великих деформацій (згідно з рівнянням (4.22) Віганда-Снайдера).

Температура, °С	Напрямок зміни вільної енергії ΔU	Напрямок зміни ентропії ΔS
Малі деформації ($\Delta L/L_{\pi} \approx 20\%$)		
22 – 48	$(\partial U / \partial \Delta L)_T = \text{const} > 0$	$(\partial S / \partial \Delta L)_T = 0$
Великі деформації ($\Delta L/L_{\pi} \approx 50\%$)		
< 30	$(\partial U / \partial \Delta L)_T > 0$	$(\partial S / \partial \Delta L)_T > 0$
31 – 37	$(\partial U / \partial \Delta L)_T = \text{const} > 0$	$(\partial S / \partial \Delta L)_T = 0$
> 37	$(\partial U / \partial \Delta L)_T < 0$	$(\partial S / \partial \Delta L)_T < 0$

оболонкою, яка містить велику кількість терморецепторів, а також із втраченими терморецепторами блукаючого нерва) накладає значні обмеження щодо можливості прямого перенесення наших результатів на рівень *in vivo*. Не зважаючи на певні протиріччя у літературних даних щодо впливу їжі зі зниженою і підвищеною температурою на моторну, і зокрема, евакуаторну функцію шлунку, наші дані узгоджуються з результатами інших дослідників. Так, за даними В. Сан з колегами [433] існує тісний лінійний зв'язок ($r=0.98$) між внутрішньошлунковою температурою і швидкістю спорожнення шлунку у випадку великих об'ємів напоїв зі зниженою і нормальною температурами (на відміну від випадку надходження рідин з нормальною і підвищеною температурами). Отже, виявляються подібності в проявах реагування на різноспрямовані термічні впливи м'язів шлунку як на рівні наших модельних досліджень (ізолювані гладеньком'язові смужки), так і цілісного організму. Зниження значень змін внутрішньої енергії ΔU та ентропії ΔS , за умови харчування продуктами з надмірною температурою, ймовірно, пов'язано з різними діапазонами термоіндукованої деструкції білків гладеньких м'язів.

На підставі аналізу одержаних нами експериментальних результатів (рис. 4.12, 4.17; табл.4.1) можна прийти до наступних висновків. Малі ($\Delta L/L_{\pi} \approx 20\%$) розтягування гладеньком'язових смужок шлунку щурів (діапазон температур 22-48 °C) не супроводжуються змінами у впорядкованості тензометричної системи ($(\partial S / \partial \Delta L)_T = 0$). Аналогічний ефект маємо і у випадку значних розтягувань ($\Delta L/L_{\pi} \approx 50\%$), але у більш вузькому діапазоні температур: $>30^{\circ}\text{C}$ і $< 40^{\circ}\text{C}$. При великих розтягуваннях гладеньком'язових смужок шлунку ($\Delta L/L_{\pi} \approx 50\%$), як при відносно низьких (22-30 °C), так і при відносно великих (понад 37 °C) температурах мають місце суттєві структурні зміни у тензометричній системі. За цих умов спостерігається інверсія знаку

ентропійних ефектів: $\left(\frac{\partial S}{\partial \Delta L}\right)_T > 0$ при температурах менших від 31°C та $\left(\frac{\partial S}{\partial \Delta L}\right)_T < 0$ при температурах понад 37 °C [454, 455].

* * * * *

Функціонування травної системи в значній мірі обумовлюються механічними та термомеханічними властивостями ГМ, які формують стінки органів ШКТ.

Для встановлення термомеханокінетичних властивостей ГМ травного тракту нами було здійснено кількісний аналіз температурних ефектів на механокінетичних кривих «деформація-час» (за фіксованих навантажень) та кривих «навантаження-деформація» (при постійному та градуально зростаючому навантаженні) кільцевих ГМ шлунку щура.

1. Встановлено, що при малих оборотних деформаціях м'язів ШКТ показники максимальної (ΔA) та напівмаксимальної ($\Delta A_{1/2}$) роботи не залежать від температури, а при великих деформаціях вони куполоподібно змінюються, досягаючи мінімуму при 31-40 °C.
2. Із застосуванням рівняння Віганда-Снайдера встановлено, що оборотні малі деформації (не залежно від температур) та значні деформації (у діапазоні температур 31-40 °C) ГМ шлунку не супроводжуються змінами у впорядкованості тензометричної системи; при великих деформаціях за низьких та підвищених температур спостерігається інверсія знаку ентропійних ефектів.

Результати, викладені у розділі, опубліковані у наступних роботах: [421, 425, 448, 454, 455].

РОЗДІЛ 5

ФАРМАКОМЕХАНІЧНІ ЕФЕКТИ ТА МЕХАНІЗМИ ДІЇ НАНОРОЗМІРНОГО МАТЕРІАЛУ ДІОКСИДУ ТИТАНУ НА ВІСЦЕРАЛЬНІ ГЛАДЕНЬКІ М'ЯЗИ В УМОВАХ *in vitro*

TiO_2 – найбільш вживаний промисловий барвник білого кольору. Зокрема, він широко використовується для надання забарвлення харчовим продуктам, косметичним і гігієнічним засобам, наномедичним реактивам, фармацевтичним засобам (добавка з шифром E171); близько 36% TiO_2 харчового призначення має розмір <100 нм [346-350]. Раніше вважалось, що TiO_2 є нетоксичним, хімічно і біологічно інертним матеріалом, таким чином його тривалий час використовували в якості негативного контролю при проведенні токсикологічних досліджень. Натепер накопичено величезний масив медико-біологічних даних, отриманих дослідженнями *in vitro* та *in vivo*, які беззаперечно вказують на цитотоксичність наночастинок TiO_2 . Відомо, що при внутрішньоклітинному впливу TiO_2 спричиняє значне посилення напрацювання активних форм кисню (АФК) та генотоксичний ефект (пошкодження макромолекул ДНК) [354]. Міжнародна агенція з дослідження канцерогенезу класифікувала TiO_2 до групи канцерогенів 2В: можливо канцерогенні для людини.

Фізико-хімічні властивості НЧ TiO_2 визначаються сукупністю факторів: формою, розміром, характеристиками поверхні та внутрішньою структурою. НЧ TiO_2 можуть існувати в трьох поліморфах: анатаз, рутил і брукіт; причому в навколишньому середовищі переважають перші дві структури. Зазвичай в промисловому виробництві використовують порошок TiO_2 , який є сумішшю рутилу і анатазу. Дані багатьох досліджень вказують на те, що найвищою хімічною активністю володіє анатаз. Саме він індукує утворення АФК, особливо при його опроміненні ультрафіолетом. Рутил вважається хімічно інертною формою TiO_2 . Втім, у випадку зменшення

розміру наночастинок TiO_2 не залежно від поліморфу посилюються (або набувають) їх токсичні властивості.

Отже, надзвичайно важливо було здійснити комплексні дослідження закономірностей та механізмів дії на вісцеральні ГМ НЧ TiO_2 різних розмірних груп та з різним співвідношенням у суміші поліморфів рутилу і анатазу, в режимах гострого навантаження великими концентраціями та при кумулятивному їх збільшенні.

Тому для вирішення у даному розділі було поставлено наступні задачі:

- ~ дослідити ефекти аплікування (в умовах кумулятивного збільшення концентрацій) наночастинок TiO_2 з різними фізико-хімічними параметрами: 1-3 нм (рутил), 4-8 нм (анатаз) та 21 ± 5 нм (фотокаталітичний стандарт P25, співвідношення рутил:анатаз=1:4), на спонтанну і викликану скорочувальну активність ГМ ШКТ і міометрія;
- ~ вивчити ефекти некумулятивного аплікування високих концентрацій нано- TiO_2 з розміром 21 ± 5 нм (співвідношення рутил:анатаз=1:4), на спонтанну і викликану скорочувальну активність ГМ ШКТ і міометрія;
- ~ встановити окремі механізми впливу нано- TiO_2 з розміром 21 ± 5 нм (співвідношення рутил:анатаз=1:4) на функціонування ГМ ШКТ.

5.1. Спонтанна скорочувальна активність вісцеральних гладеньких м'язів в умовах дії *in vitro* наночастинок TiO_2 різного розміру та різного співвідношення поліморфів

Ефекти, залежні від концентрації, розмірів та співвідношення поліморфів НЧ TiO_2 . Відомо, що властивості суспензій нанорозмірних систем у значній мірі варіюють при зміні розміру їх поодиноких частинок. Тому початково було досліджено закономірності впливу НЧ TiO_2 трьох розмірних груп: 1-3 нм, 4-8 нм та 21 ± 5 нм, на базальне напруження та спонтанну скорочувальну активність кільцевих ГМ антрального відділу

шлунку щурів. У різних експериментах використовували суспензії TiO_2 з концентраціями 10^{-7} - $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл.

Внесення в омиваючий ГМ розчин НЧ TiO_2 з середнім розміром 1-3 нм (у концентрації 10^{-4} мг/мл) не спричиняло достовірних змін базального напруження препаратів, однак протягом 3-5 хв. індукувало зміни частоти і амплітуди спонтанних скорочень (Рис. 5.1). Для аналізу використовували фрагменти механограм після 15-20 хв передінкубації у присутності НЧ. еханокінетичним аналізом було виявлено наступні закономірності спонтанної скорочувальної активності м'язових препаратів (Рис. 5.2). По-перше, TiO_2 спричиняв достовірне пригнічення амплітуди скорочень у середньому на 26,6%, тоді як їх частота мала тенденції до зростання і становила $(114,3 \pm 8,9)\%$ відносно контролю. По-друге, змінювався характер окремих спонтанних скорочень: тривалість фази скорочення збільшувалась, тоді як фаза розслаблення навпаки дещо укорочувалася. Такі особливості співвідношення тривалостей фаз скорочення і розслаблення закономірно призвели до того, що загальна тривалість скорочувального акту залишалась в межах контрольних параметрів. По-третє, індекс скоротливої активності м'язових препаратів за присутності суспензії TiO_2 достовірно зріс у середньому на 40%. Врешті, параметри коефіцієнтів скоротливості у Олександрійських одиницях та одиницях Монтевідео за впливу наночастинок зменшувались у середньому на 12,5% та 14% відповідно. Отже, за присутності в омиваючому розчині нано- TiO_2 (10^{-4} мг/мл) з середнім розміром 1-3 нм спостерігається пригнічення спонтанних скорочень з тенденціями до зниження загальної продуктивності м'язів.

В умовах кумулятивного збільшення концентрації НЧ TiO_2 (10^{-7} - 10^{-4} мг/мл) з середнім розміром 1-3 нм (рутил) на усьому діапазоні концентрацій спостерігалось пригнічення амплітуди скорочень відповідно до $(70,0 \pm 4,3)$, $(64,8 \pm 4,8)$, $(64,5 \pm 5,3)$ та $(62,4 \pm 4,0) \%$ (у всіх випадках $n = 10$, $p < 0,05$). Також за цих умов відбувалось збільшення частоти скорочень, яке становило, відповідно: $(118 \pm 8,9)$, $(110,0 \pm 10,3)$, $(126,7 \pm 9,8)$ та $(125,0 \pm 7,7) \%$, у всіх

випадках $n=10$. При цьому, однак, не змінювався характер поодиноких спонтанних скорочень: не спостерігалось достовірних змін тривалості фаз скорочення і розслаблення.

Варто відзначити, що в умовах кумулятивного зростання концентрацій частинок TiO_2 (середній розмір 1-3 нм, поліморф рутил) спостерігалось дозо-незалежне зниження загальної ефективності скорочувальної діяльності м'язів. Так, за дії концентрацій 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} та 10^{-4} мг/мл показники скорочувального індексу в одиницях Монтевідео становили: $(76,1 \pm 4,4)$, $(80,0 \pm 2,3)$, $(76,1 \pm 5,3)$ та $(78,2 \pm 4,7)$ % (у всіх випадках $n = 10$, $p < 0,05$); в Олександрійських одиницях: $(84,0 \pm 6,5)$, $(80,1 \pm 6,0)$, $(74,2 \pm 5,1)$ та $(78,3 \pm 6,2)$ % (у всіх випадках $n = 10$, $p < 0,05$).

У наступній серії експериментів досліджували спонтанну скорочувальну активність ГМ *antrum* щурів за присутності в омиваючому розчині суспензії TiO_2 з середнім розміром частинок 4-8 нм (їх концентрацію кумулятивно збільшували в межах 10^{-7} - 10^{-4} мг/мл). Як видно з рис. 5.3, TiO_2 у мінімальній використаній концентрації (10^{-7} мг/мл) спричиняв достовірне пригнічення скорочень, причому наступне ступінчате збільшення концентрації НЧ в суспензії до 10^{-5} мг/мл не супроводжувалось суттєвими змінами механічної активності. Варто відзначити також, що TiO_2 у концентраціях 10^{-7} - 10^{-5} мг/мл не впливав на базальний тонус м'язових препаратів. Підвищення концентрації НЧ в омиваючому розчині до 10^{-4} мг/мл супроводжувалось подальшим пригніченням амплітуди скорочень та зниженням базального тону м'язів.

Кількісний аналіз спонтанної скорочувальної активності кільцевих ГМ *antrum* щурів в умовах кумулятивного збільшення концентрації TiO_2 з середнім розміром наночастинок 4-8 нм, дозволив виявити ряд закономірностей. На усьому діапазоні концентрацій TiO_2 спричиняв пригнічення амплітуди, зниження тривалості фази скорочення, а також – загальної тривалості поодиноких скорочень (рис. 5.4).

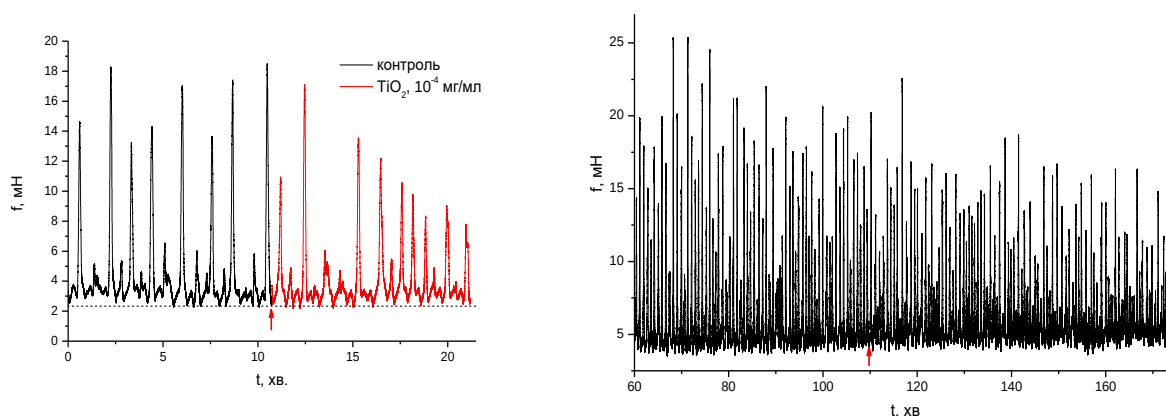


Рис. 5.1. Модуляція суспензією наночастинок TiO_2 (середній розмір 1-3 нм, поліморф рутил, концентрація 10^{-4} мг/мл) спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів. Наведено типові механограми.

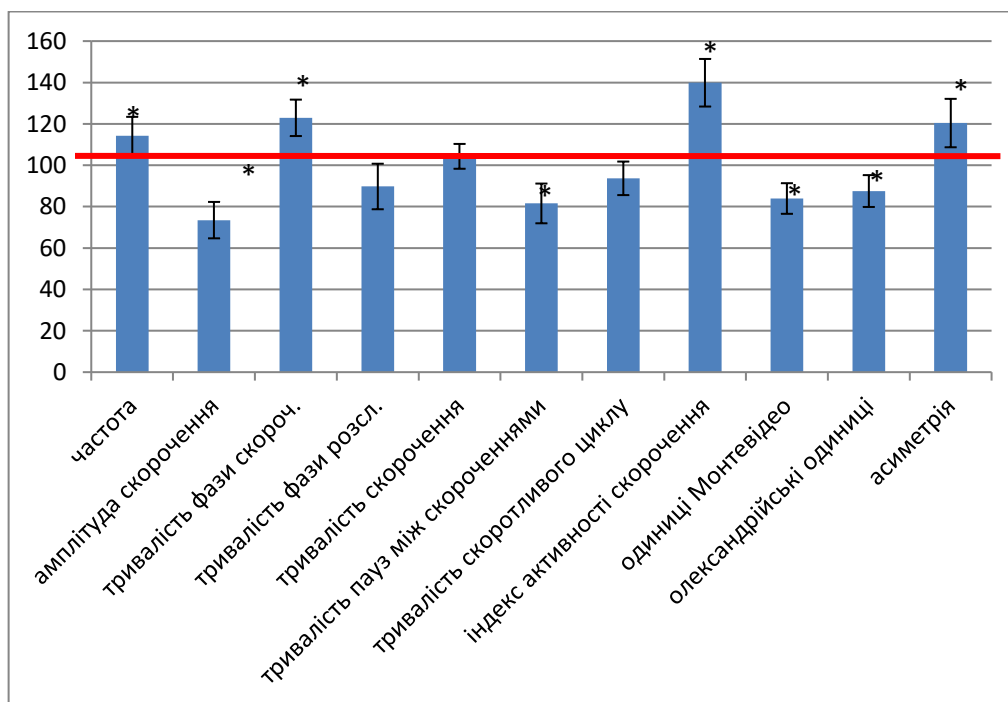


Рис. 5.2. Відносні зміни параметрів спонтанної скоротливої активності кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів у присутності наночастинок TiO_2 (середній розмір 1-3 нм, концентрація 10^{-4} мг/мл): частота, амплітуда, тривалість фази скорочення і розслаблення, асиметрія скоротливого акту (асиметрія), тривалість скоротливого циклу, індекс скоротливої активності (індекс активності скорочення), ефективність скорочувальної активності в одиницях Монтевідео і Олександрійських одиницях. За 100% прийнято відповідні показники в контролі (вісь ординат); дані наведено як $M \pm m$ ($n=7$); * - $p < 0.05$ – різниця достовірна відносно контролю.

Кумулятивне підвищення концентрацій TiO_2 з 10^{-7} до 10^{-5} мг/мл супроводжувалось зростанням частоти спонтанних скорочень, тоді як у присутності 10^{-4} мг/мл спостерігались тенденції її повернення до контрольних значень. У всіх випадках показники ефективності (у Олександрійських одиницях та одиницях Монтевідео) загальної скорочувальної активності м'язів були суттєво знижені у середньому вдвічі щодо контролю.

У наступній серії експериментів було досліджено вплив TiO_2 з середнім розміром наночастинок 21 ± 5 нм на спонтанну скорочувальну активність кільцевих ГМ *antrum* щурів. Експерименти стосувались вивчення ефектів при кумулятивному збільшенні концентрацій 10^{-6} - 10^{-3} мг/мл, а також одномоментного їх додавання до концентрації 10^{-3} мг/мл. Кумулятивне підвищення концентрації TiO_2 супроводжувалось дозо-залежним пригніченням амплітуди скорочень (рис. 5.5), яке досягало у середньому 80,4% за дії НЧ у концентрації 10^{-3} мг/мл. Варто відзначити, що частота спонтанних скорочень не зазнавала вірогідних змін на усьому діапазоні досліджених концентрацій TiO_2 . Також присутність НЧ TiO_2 не впливала на базальне напруження м'язових препаратів.

Дослідження кінетичних характеристик окремих спонтанних скорочень дозволило виявити закономірності впливу нано- TiO_2 з середнім розміром 21 ± 5 нм на м'язи *antrum*. Як і у випадку частинок з розміром 4-8 нм, тривалість фази скорочення була вірогідно знижена порівняно з контролем (Рис. 5.6). Навпаки, тривалість фази розслаблення у присутності низьких концентрацій TiO_2 (10^{-6} та 10^{-5} мг/мл) не змінювалась, а при подальшому підвищенні концентрацій достовірно збільшувалась відносно контролю. Таким чином, параметр асиметрії поодиноких скорочень був вірогідно знижений на усьому діапазоні досліджених концентрацій TiO_2 (це свідчить про зростання потужності окремих скорочень), а показник їх тривалості – залишався на контрольному рівні.

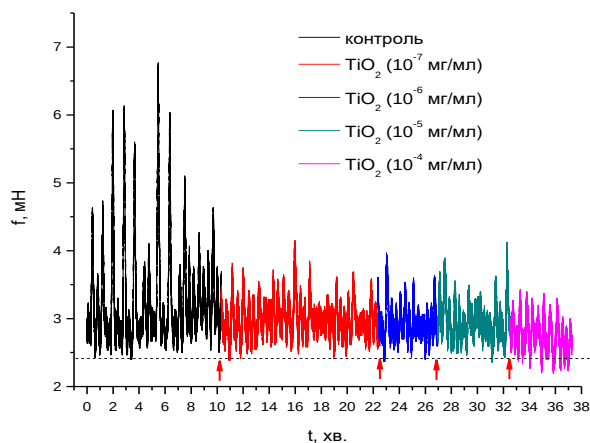


Рис. 5.3. Спонтанна скорочувальна активність кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів в умовах кумулятивного збільшення концентрації наночастинок TiO_2 (середній розмір 4-8 нм) з 10^{-7} до 10^{-4} мг/мл. Наведено типову механограму.

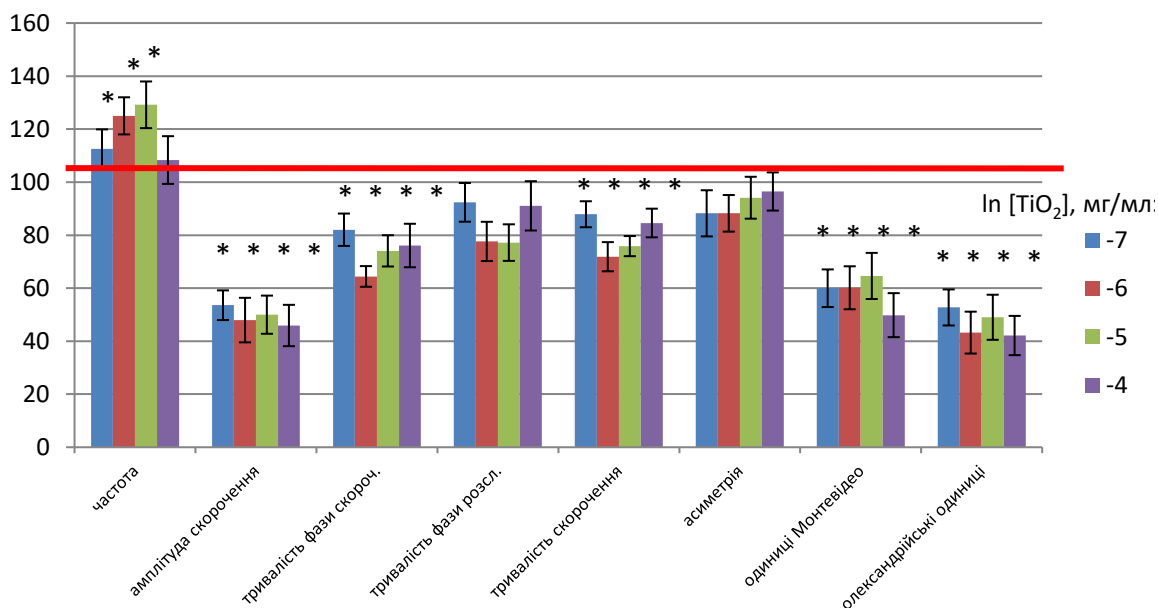


Рис. 5.4. Відносні зміни параметрів спонтанної скоротливої активності кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів, викликані кумулятивним підвищенням концентрації наночастинок TiO_2 (середній розмір 4-8 нм, поліморф анатаз, діапазон концентрацій 10^{-7} - 10^{-4} мг/мл): частота, амплітуда, тривалість фаз скорочення і розслаблення, асиметрія скоротливого акту (асиметрія), тривалість скорочення, ефективність скорочувальної активності в одиницях Монтевідео та Олександрійських одиницях. За 100% прийнято відповідні показники в контролі (вісь ординат); дані наведено як $M \pm m$ ($n=7$); * - $p < 0.05$ – різниця достовірна відносно контролю.

Також, за дії TiO_2 (середній розмір частинок 21 ± 5 нм, діапазон концентрацій 10^{-6} - 10^{-3} мг/мл) не спостерігалось змін тривалості скоротливого циклу, тоді як індекс скорочувальної активності, який розраховували як співвідношення тривалості скорочень до пауз між ними, у присутності високих концентрацій НЧ вірогідно зростає (Рис. 5.6).

Варто відзначити, що TiO_2 спричиняє дозо-залежне пригнічення загальної ефективності скорочувальної активності ГМ шлунку, про що свідчить суттєве (за присутності найвищої концентрації НЧ – у середньому втричі порівняно з контролем, табл. 5.1) зниження індексів у одиницях MU та AU. Також нано- TiO_2 спричиняли дозо-залежне зниження кінетичних параметрів спонтанних скорочень м'язів *antrum* (табл. 5.1): в умовах дії TiO_2 спостерігалось зменшення абсолютних значень максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення ($V_{\max,c}$ та $V_{\max,r}$ відповідно), та середньої швидкості наростання фази скорочення ($f_{\max}/t$).

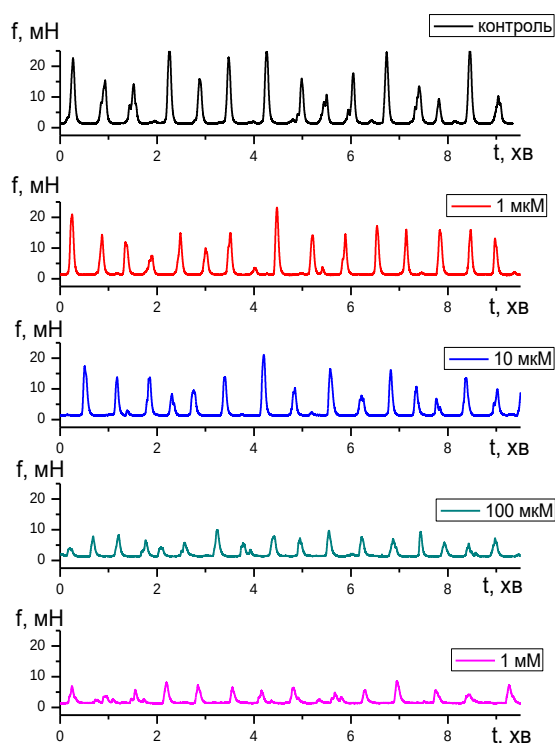


Рис. 5.5. Спонтанна скорочувальна активність кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів в умовах кумулятивного збільшення концентрації наночастинок TiO_2 (середній розмір 21 ± 5 нм) з 10^{-6} до 10^{-3} мг/мл. Наведено типові механограми.

Таблиця 5.1.

Відносні зміни кінетичних параметрів спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів за кумулятивної дії наночастинок TiO_2 (21 ± 5 нм, концентрації 10^{-6} - 10^{-3} мг/мл); дані представлені у % щодо контролю, прийнятого за 100%; $M \pm m$ (n=5)

Параметр спонтанних скорочень	TiO_2 , мг/мл			
	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
Частота скорочень	100,0 $\pm$ 8,7	114,7 $\pm$ 9,9	126,7 $\pm$ 11,3*	113,3 $\pm$ 14,2
Амплітуда скорочень	78,8 $\pm$ 6,8*	65,8 $\pm$ 7,4*	34,0 $\pm$ 15,8*	19,6 $\pm$ 12,0*
Тривалість скоротливого циклу	102,2 $\pm$ 4,5	98,7 $\pm$ 3,9	89,6 $\pm$ 5,2	90,2 $\pm$ 8,5
Тривалість фази скорочення	62,8 $\pm$ 5,5*	63,7 $\pm$ 5,1*	77,9 $\pm$ 4,4*	72,6 $\pm$ 18,6*
Тривалість фази розслаблення	99,7 $\pm$ 0,6	105,4 $\pm$ 1,1	114,9 $\pm$ 3,1*	129,9 $\pm$ 6,7*
Тривалість пауз між скороченнями	130,6 $\pm$ 9,5*	110,6 $\pm$ 10,4	78,8 $\pm$ 15,7*	72,8 $\pm$ 18,9*
Тривалість процесу скорочення-розслаблення	83,9 $\pm$ 26,8	91,5 $\pm$ 19,1	95,4 $\pm$ 23,3	101,1 $\pm$ 26,7
Коефіцієнт асиметрії	68,9 $\pm$ 8,5*	67,5 $\pm$ 8,1*	67,0 $\pm$ 5,0*	44,7 $\pm$ 10,9*
Середня швидкість наростання сили фази скорочення ($f_{\max}/t$)	116,0 $\pm$ 12,1	85,9 $\pm$ 14,1	41,3 $\pm$ 16,1*	27,3 $\pm$ 14,4*
Максимальна швидкість спаду сили фази скорочення ($V_{\max}$, с)	113,6 $\pm$ 4,9*	91,4 $\pm$ 5,8	58,2 $\pm$ 7,6*	41,5 $\pm$ 6,9
Максимальна швидкість спаду сили фази розслаблення ($V_{\max}$, г)	85,4 $\pm$ 4,9*	74,2 $\pm$ 5,1*	41,3 $\pm$ 4,5*	30,1 $\pm$ 5,2*
Індекс скоротливої активності в одиницях Монтевідео	78,8 $\pm$ 5,9*	67,1 $\pm$ 6,2*	43,0 $\pm$ 7,1*	22,2 $\pm$ 6,9*
Індекс скоротливої активності в Олександрійських одиницях	66,2 $\pm$ 6,8*	53,9 $\pm$ 5,9*	41,5 $\pm$ 6,8*	22,4 $\pm$ 6,7*

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

Для порівняння з попередніми результатами щодо кумулятивної дії TiO_2 , було досліджено вплив одноразового аплікування наночастинок у концентрації $2 \cdot 10^{-3}$ мг/мл. Було встановлено, що за цих умов спостерігається пригнічення спонтанних скорочень без зміни базального напруження м'язових препаратів, досягаючи стаціонарного рівня у середньому через 15 хв. від початку аплікування (Рис. 5.6).

Як видно з Рис. 5.7, у випадку одноразового внесення суспензії TiO_2 до омиваючого препарати розчину Кребса у значній концентрації ($2 \cdot 10^{-3}$ мг/мл), на 15 хв. інкубації відбувались достовірні зміни лише окремих параметрів скорочувальної активності. Так, мало місце суттєве (у середньому на 45%) пригнічення амплітуди, а також безпосередньо пов'язаних з нею показників ефективності скорочувальної активності: індекс в одиницях Монтевідео у середньому зменшувався на 40%, а у Олександрійських одиницях – на 45%.

Розмір- і поліморф-залежні ефекти нано- TiO_2 . З метою встановлення закономірностей впливу TiO_2 на ритмоактивність вісцеральних ГМ, було здійснено порівняння ефектів НЧ з середнім розміром 4-8 нм та 21 ± 5 нм та концентрацією 10^{-4} мг/мл, яку досягали кумулятивно. Як видно з рис. 5.8, суттєві розбіжності спостерігаються у випадку параметрів тривалості фази розслаблення та пов'язаної з нею асиметрії скорочень.

Ефекти, залежні від швидкості досягнення високої концентрації нано- TiO_2 . Варто відзначити, що особливості внесення (кумулятивне та одномоментне) значної концентрації TiO_2 ($2 \cdot 10^{-3}$ мг/мл) в значній мірі визначають ефекти цих наночастинок на скорочувальну активність ГМ шлунку (Рис. 5.9), та, ймовірно відрізняється за механізмами розвитку ефектів. Так, в умовах тривалого зростання концентрації TiO_2 , спостерігається зміна параметрів скорочувального акту: зменшується тривалість фази скорочення і збільшується тривалість фази розслаблення, а також змінюється пов'язаний з ними показник асиметрії; в умовах

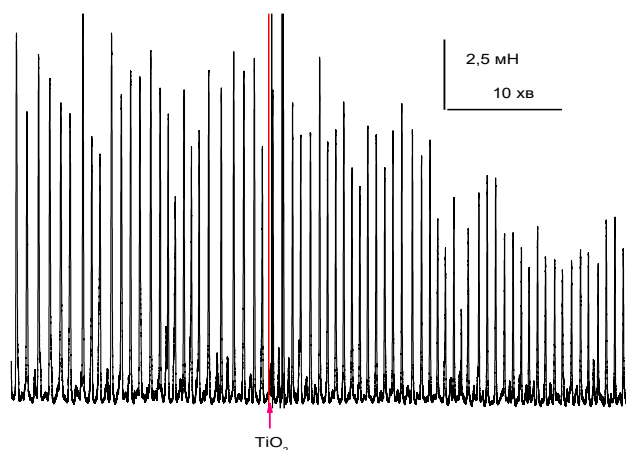


Рис. 5.6. Модуляція суспензією нано- TiO_2 (середній розмір 21 ± 5 нм, концентрація $2 \cdot 10^{-3}$ мг/мл) спонтанної скоротувальної активності кільцевих гладеньких м'язів *antrum* шурів. Наведено типову механограму.

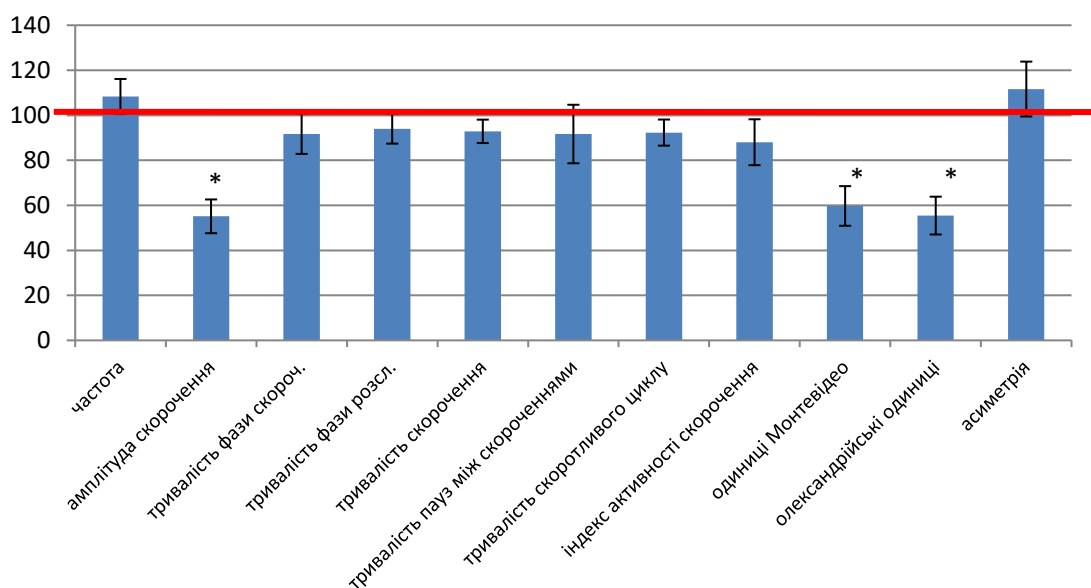


Рис. 5.7. Відносні зміни параметрів спонтанної скоротливої активності кільцевих ГМ *antrum* шурів у присутності нано- TiO_2 (середній розмір 21 ± 5 нм, концентрація $2 \cdot 10^{-3}$ мг/мл). За 100% прийнято відповідні показники в контролі (вісь ординат); $M \pm m$ ($n=5$); * - $p < 0.05$ – різниця достовірна відносно контролю.

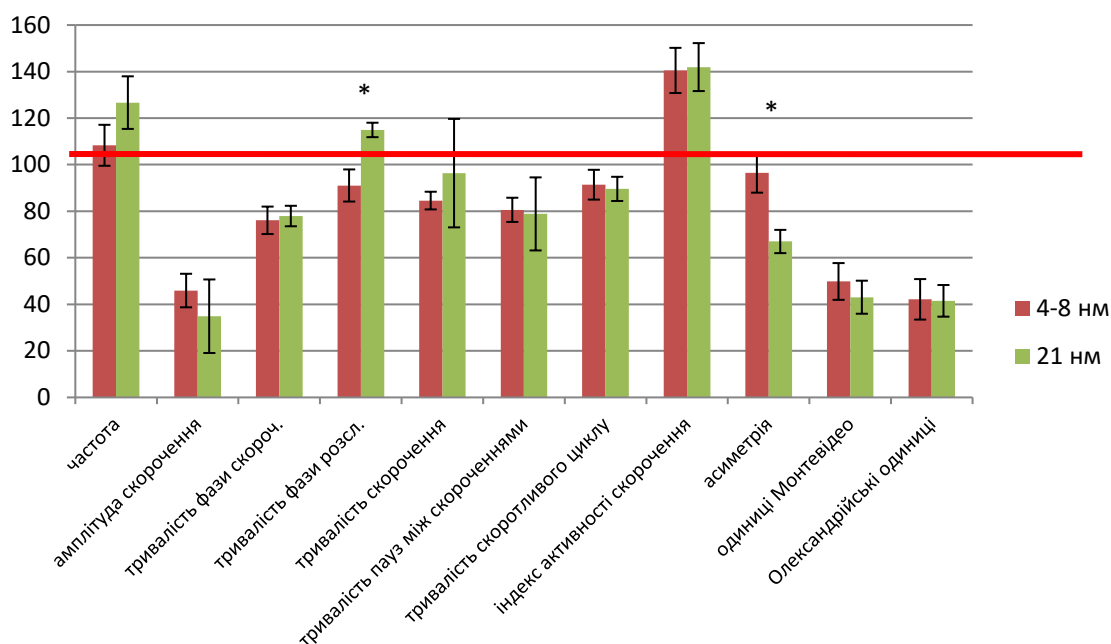


Рис. 5.8. Відносні зміни параметрів спонтанної скоротливої активності кільцевих ГМ *antrum* щурів у присутності нано-TiO₂ з розміром 4-8 нм (червоні стовпці) і 21±5 нм (зелені стовпці) (концентрація в обох випадках становила 10⁻⁴ мг/мл і досягалась кумулятивно). За 100% прийнято відповідні показники в контролі (вісь ординат); M±m (n=5-7); * - p<0.05 –достовірно щодо дії TiO₂ розміру 21нм.

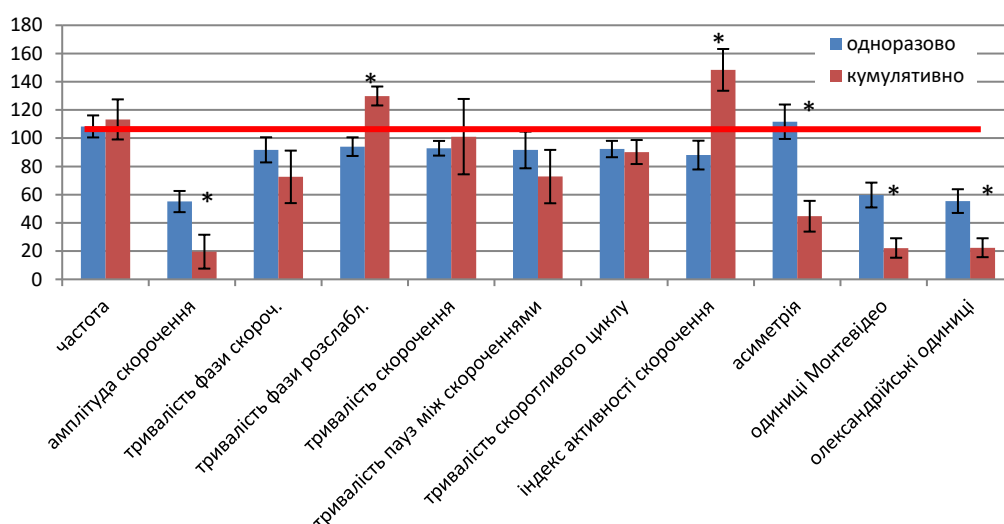


Рис. 5.9. Відносні зміни параметрів спонтанної скоротливої активності кільцевих ГМ *antrum* щурів у присутності нано-TiO₂ (розмір 21±5 нм, концентрація 2·10⁻³ мг/мл) залежно від способу досягнення концентрації (одноразово або шляхом кумулятивного збільшення протягом 1 год.). За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі (вісь ординат); (M±m, n=5-7); * - p<0.05 – різниця достовірна щодо кумулятивної дії.

одномоментного додавання TiO_2 ці показники відповідають контрольним. Такі зміни значень тривалостей фаз скорочення і розслаблення, ймовірно, вказують модуляцію нано- TiO_2 механізмів енергонезалежного і енергозалежного транспорту іонів Ca^{2+} . Якщо здійснити їх нормування амплітуду скорочення, то суттєвою виявиться головним чином зміна фази розслаблення, пов'язана з енергозалежним викачуванням Ca^{2+} з міоплазми [211, 271, 272]. Також у обох випадках частота скорочень не відрізнялась від контрольної, що ймовірно свідчить про нечутливість до дії даних частинок пейсмейкерних механізмів [506, 507]. Звертає на себе увагу суттєва відмінність у ступеню пригнічення амплітуди скорочувальних відповідей, а також безпосередньо пов'язане з цим показником зниження ефективності скорочувальної активності (індексів у Олександрійських одиницях і одиницях Монтевідео). Оскільки амплітуда скорочень цілком визначається ступенем активації скорочувального апарату [508, 509], такі результати свідчать про часо-залежні ефекти пригнічення процесів спряження збудження-скорочення наночастинками TiO_2 .

Спонтанну скорочувальну активність ГМ ШКТ, яка забезпечується пейсмейкерною активністю ICC, можна охарактеризувати двома головними параметрами: амплітудою і частотою. Відомо [506, 507], що саме функціонування ICC та їх зв'язок з нейронами інтрамурального сплетення, є ключовими факторами, які визначають частоту генерації провідних хвиль деполяризації і, як наслідок, - спонтанних скорочень м'язової стінки травного тракту. Генерація повільних хвиль деполяризації ICC обумовлюється концертним, узгодженим функціонуванням трьох клітинних компонентів (пейсмейкерної одиниці): ПМ, СР і мітохондрій [74, 510]. У стінці антрального відділу шлунку щурів присутні дві популяції ICC: ICC-SM (розташовані між гладеньком'язовими волокнами) і ICC-MY (клітини Кахаля в міоентеральному нервовому плевті). Амплітуда спонтанних скорочень переважно залежить від функціонального стану ГМК – внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} та стану системи Ca^{2+} -незалежної активації

скорочувальних білків. Отже, оскільки нашими дослідженнями встановлено, що ефект НЧ TiO_2 , перш за все, проявляється зниженням амплітуди спонтанних скорочень без суттєвої зміни їх частоти, ймовірно передбачити, що переважно дія НЧ спрямована на часо-залежну (Рис. 5.9) модуляцію (пригнічення) процесів спряження збудження-скорочення в ГМК [511, 512]. Варто також відзначити, що вплив НЧ TiO_2 з розміром 21 нм супроводжується значним збільшенням максимальної швидкості фази розслаблення (Табл. 5.1) спонтанних скорочень, що може вказувати на пригнічення процесів енергозалежного транспорту (екструзії) іонів Ca^{2+} у ГМК.

5.2. Вплив наноматеріалу TiO_2 різного розміру на механокінетичні параметри викликаних скорочень за дії впливу *in vitro*

Відомо, що двома переважаючими загальними шляхами, якими відбувається активування скорочення в гладеньких м'язах, є електромеханічний (в умовах деполяризації ПМ ГМК) та фармакомеханічний (при активації збудження ГМК агоністами, без зміни мембранного потенціалу ПМ). Звичайно, за фізіологічних умов *in vivo* їх неможливо розмежувати, оскільки процес активації, наприклад, ацетилхолінових метаботропних рецепторів передбачає активацію іонних каналів, вхідний натрієвий і кальцієвий струми, деполяризацію ПМ з наступним відкриванням ПКК. З іншого боку, деполяризація вісцеральних ГМ спричиняє не лише потенціал-залежний вхід іонів Ca^{2+} у ГМК, але й вивільнення нейромедіаторів з інтрамуральних нейронів, які активують фармакомеханічну складову розвитку скорочувальної реакції м'язів.

Оскільки можливим було передбачити вплив нано- TiO_2 на процеси генерації спонтанних скорочень через окремі іон-транспортні системи ПМ і внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо, у наступній серії експериментів нами було вивчено процеси, які обумовлюються деполяризацією ПМ ГМК

гіперкалієвим розчином (80 мМ) та ацетилхоліном, в умовах присутності у омиваючому розчині суспензії наночастинок TiO_2 .

5.2.1. Ацетилхолін-викликані скорочення за дії наночастинок TiO_2 різного розміру в умовах *in vitro*

5.2.1.1. Кумулятивна дія TiO_2

Перш за все, було проведено дослідження впливу суспензії НЧ TiO_2 різного розміру на ацетилхолінові (10мкМ) скорочення кільцевих ГМ антрального відділу шлунку щурів. Було встановлено, що при кумулятивному збільшенні концентрації TiO_2 ефект залежав від розмірів частинок. Так, за присутності низьких концентрацій TiO_2 (10^{-7} мг/мл) НЧ найбільшого діаметру (21 ± 5 нм) спричиняли пригнічення скорочень; НЧ з діаметром 4-8 нм їх не змінювали, тоді як 1-3 нм їх активували (Рис. 5.10).

Кумулятивне збільшення концентрації TiO_2 до 10^{-6} мг/мл супроводжувалось активацією фазних ацетилхолінових скорочень у випадку частинок з середнім розміром 1-3 нм, тоді як частинки більших діаметрів (4-8 нм і 21 ± 5 нм) вірогідно їх пригнічували. Подальше кумулятивне збільшення концентрації TiO_2 (10^{-5} та 10^{-4} мг/мл) характеризувалось пригніченням амплітуди скорочень у присутності частинок з середніми розмірами 21 ± 5 і 4-8 нм; водночас, у присутності НЧ 1-3 нм амплітуда фазних ацетилхолінових скорочень була на рівні контрольних (Рис. 5.11).

Було проведено кінетичний аналіз ацетилхолін-викликаних скорочувальних відповідей ГМ *antrum* щурів в умовах впливу НЧ TiO_2 різного розміру. Встановлено, що у діапазоні досліджених концентрацій нано- TiO_2 трьох розмірних груп (1-3 нм, 4-8 нм і 21 ± 5 нм) спостерігається активація показника V_{nc} ; втім, величина ефектів та їх концентраційний тренд суттєво відрізняються (Рис. 5.12). Так, найвищою активністю без враженої концентраційної залежності щодо цього показника володіли НЧ з середнім розміром 4-8 нм; наприклад, за присутності 10^{-4} мг/мл V_{nc} зростала у середньому до 191%. Вірогідна дозо-залежна активація фази скорочення

відбувалась за дії нано-TiO₂ з розміром 21 ± 5 нм; вона досягала максимуму у присутності 10^{-4} мг/мл і V_{nc} зростала становила у середньому 163% порівняно

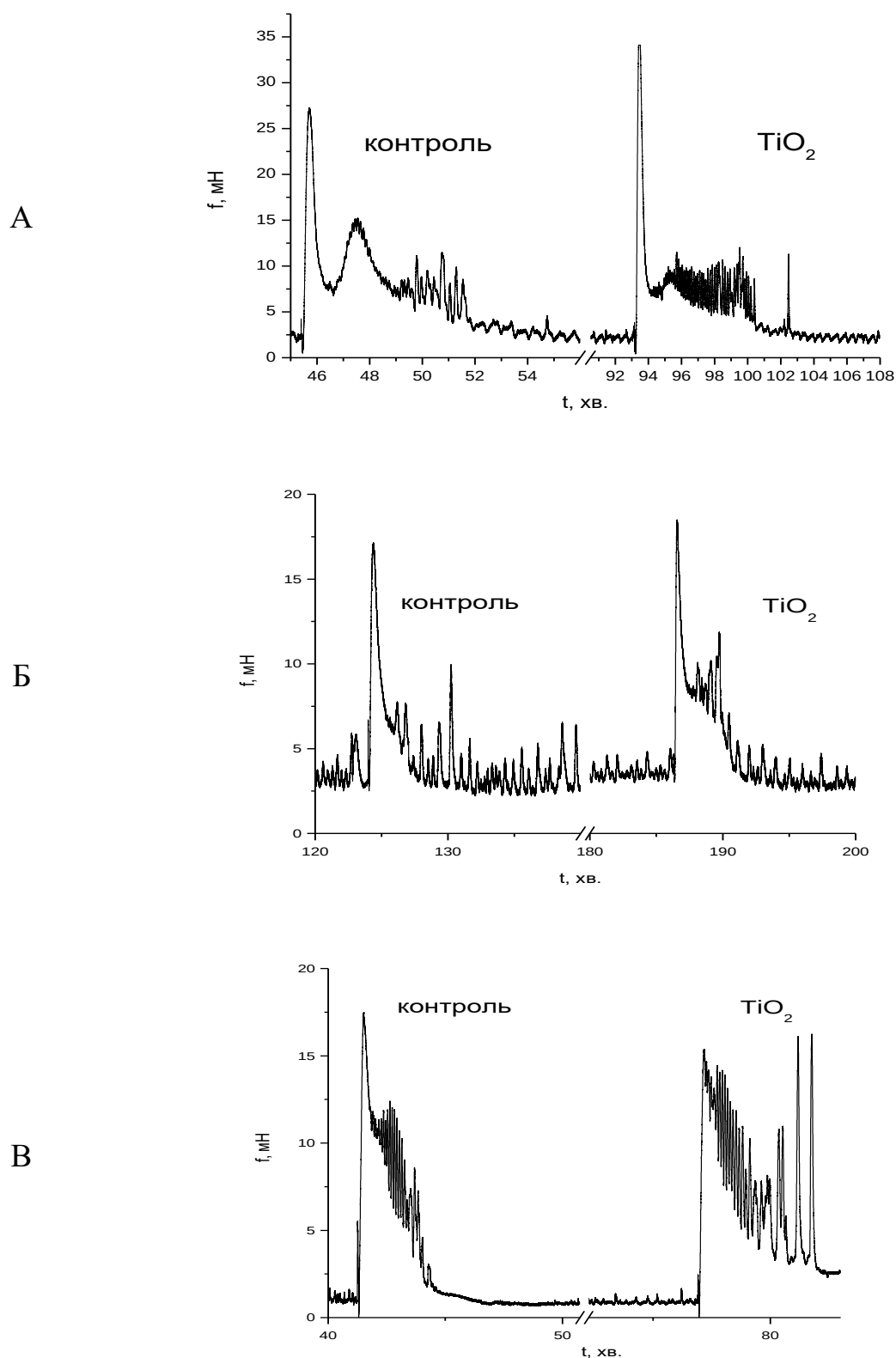


Рис. 5.10. Порівняння викликаних ацетилхоліном (10 мкМ) скорочень кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів у контролі та в умовах

передінкубації (20-30 хв.) у присутності суспензії наночастинок TiO_2 (10^{-7} мг/мл) різного розміру: А – 1-3 нм; Б – 4-8 нм; В – 21 ± 5 нм. Наведено типові механограми.

з контролем, прийнятим за 100%. Відносно інших розмірних груп найменшою відносно активаторною здатністю щодо V_{nc} володіли наночастинок з середнім розміром 1-3 нм.

Можемо міркувати про ймовірні процеси в ГМ, які опосередковують ефекти наночастинок TiO_2 в умовах коротко часової дії *in vitro*. Кінетика наростання сили фазної скорочувальної відповіді на аплікування ацетилхоліну переважно пов'язана з клітинними процесами активації мускаринових рецепторів ГМК. Як вже зазначалось, початковими ланками активаційних процесів за цих умов, є стимулювання М3-холінорецепторів з наступним синтезом ІТФ та активацією відповідних рецепторів СР [138]. Тож можна передбачити, що за дії нано- TiO_2 відбувається прискорення цих процесів. Втім, оскільки амплітуда ацетилхолінових скорочень під дією TiO_2 суттєво пригнічена, ймовірно величина ІТФ-залежного викиду іонів Ca^{2+} зменшується.

На противагу показнику V_{nc} , швидкість V_{nr} ацетилхолінових скорочувальних відповідей, зареєстрованих в умовах преінкубації з нано- TiO_2 різного розміру, проявляла не лише концентраційну залежність, але також варіабельність напрямку ефектів (активація та інгібування) залежно від середнього розміру НЧ у суспензії (Рис. 5.13). Так, за присутності нано- TiO_2 з середнім розміром 1-3 нм спостерігалось незначне прискорення процесу розслаблення ГМ, а максимальний ефект на рівні $(150,0 \pm 18,4)\%$ ($p < 0.05$) спостерігався у присутності 10^{-6} мг/мл TiO_2 .

Дія частинок з середнім розміром 4-8 нм супроводжувалась незначним дозо-незалежним (у середньому до 86,4% порівняно з контролем, $p < 0.05$), зниженням показника V_{nr} : такий ефект спостерігався у присутності 10^{-6} - 10^{-4} мг/мл TiO_2 (Рис. 5.13). Дія мінімальної дослідженої концентрації (10^{-7} мг/мл) TiO_2 не спричиняла змін кінетики фази розслаблення.

Присутність в омиваючому ГМ розчині нано- TiO_2 21 ± 5 нм супроводжувалась достовірним підвищенням швидкості розслаблення ацетилхолінових скорочень (Рис. 5.13). Цей ефект не залежав від концентрації частинок в суспензії і у середньому складав 166,3% відносно контрольного показника $V_{\text{пр}}$ ($p < 0.05$).

Механічні зміни підчас фази розслаблення фактично являють собою результат накладання принаймні двох протилежно спрямованих комплексних процесів: по-перше, на підвищення напруження м'язів працюють механізми сенситизації скорочувального апарату ГМК, по-друге – електромеханічні процеси енергонезалежного надходження іонів Ca^{2+} до міоплазми та фармакомеханічні механізми продовження дії ацетилхоліну переважно опосередковано активації M2-типу мускаринових холінорецепторів. Та, по-третє, на цьому фрагменті механокінетичної кривої зниження напруження забезпечується системами енергозалежного викачування іонів Ca^{2+} через ПМ і до внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо.

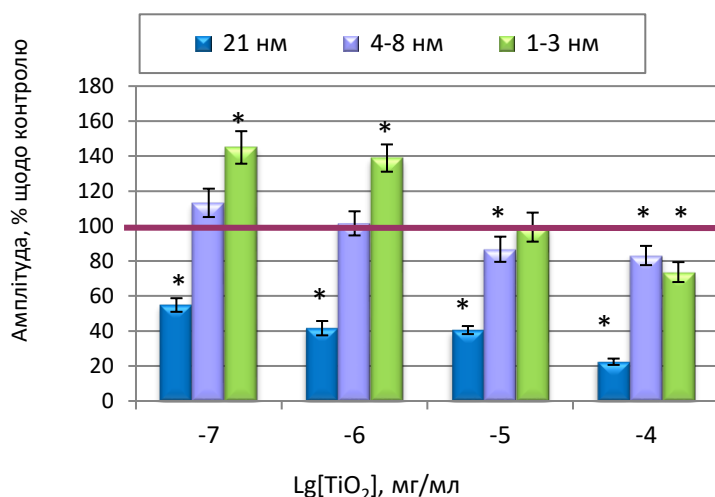


Рис. 5.11. Відносні зміни амплітуди фазних скорочень кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів, індукованих ацетилхоліном (10 мкМ) в умовах кумулятивного зростання концентрації нано- TiO_2 з середнім діаметром 1-3 нм, 4-8 нм і 21 ± 5 нм. За 100% прийнято відповідні показники в контролі (вісь ординат); дані наведено як $M \pm m$ ($n=5-10$);

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

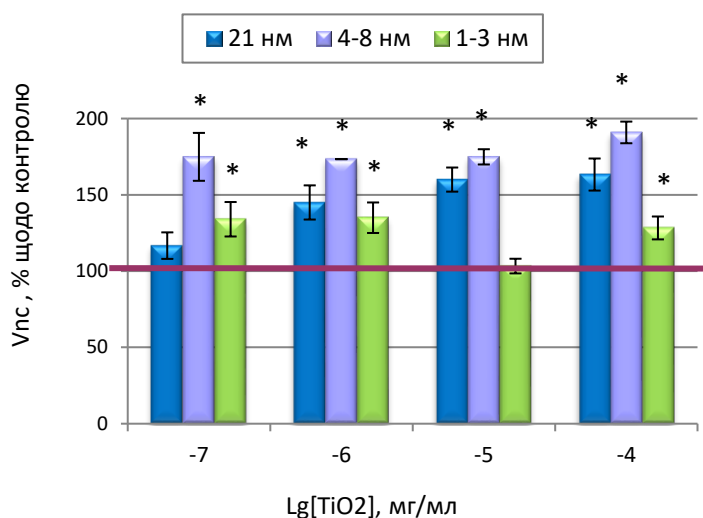


Рис. 5.12. Відносні зміни нормованої максимальної швидкості фази скорочення (V_{nc}) скорочень кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів, індукованих ацетилхоліном (10 мкМ) в умовах кумулятивного зростання концентрації наночастинок TiO_2 з середнім діаметром 1-3 нм, 4-8 нм і 21 ± 5 нм. За 100% прийнято відповідні показники в контролі (вісь ординат); ($M\pm m$, $n=10$);
* - $p<0.05$ – різниця достовірна відносно контролю.

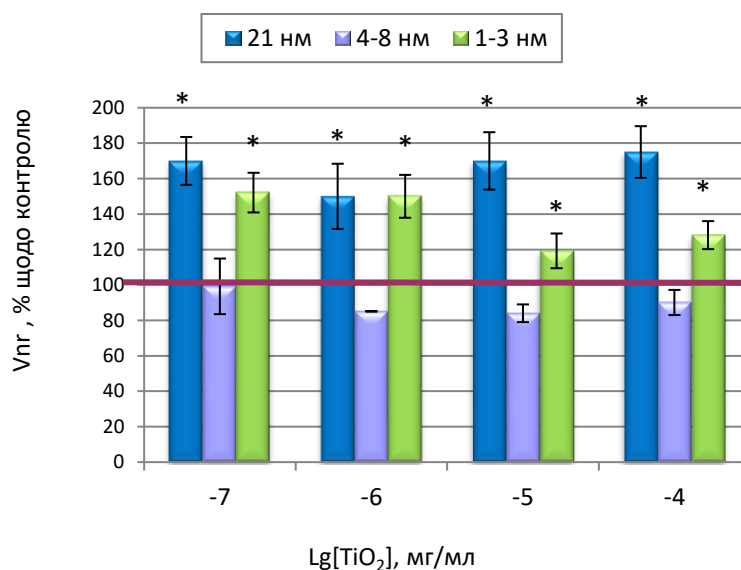


Рис. 5.13. Відносні зміни нормованої максимальної швидкості фази скорочення (V_{nr}) скорочень кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів, індукованих ацетилхоліном (10 мкМ) в умовах кумулятивного зростання концентрації наночастинок TiO_2 з середнім діаметром 1-3 нм, 4-8 нм і 21 ± 5 нм. За 100% прийнято відповідні показники в контролі (вісь ординат); ($M\pm m$, $n=10$);
* - $p<0.05$ – різниця достовірна відносно контролю.

5.2.1.2. Некумулятивна дія підвищених концентрацій TiO_2

Також з метою встановлення закономірностей впливу TiO_2 на моторну функцію травного тракту досліджували ефекти його некумулятивної, короткочасової дії (час попередньої інкубації препаратів ГМ антрального відділу шлунку щурів з суспензією TiO_2 становив 30 хв.) підвищених концентрацій (10^{-3} мг/мл, $2.5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл і $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) наночастинок з розміром 21 ± 5 нм.

Було виявлено, що TiO_2 в концентрації 10^{-3} мг/л спричиняв достовірне зниження амплітуди фазних ацетилхолін-індукованих скорочень у середньому на 21,2 % ($n=5$, $p<0.05$). На противагу цьому, присутність в омиваючому гладеньком'язові препарати розчині суспензії TiO_2 у вищих концентраціях ($2.5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл і $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) супроводжувалась достовірною активацією фазних ацетилхолінових скорочень. Так, зокрема, $5 \cdot 10^{-2}$ мг/л TiO_2 спричиняв підвищення амплітуди скорочень у середньому на 27,4 % ($n=5$, $p<0.05$) (Рис. 5.15). Разом з тим, тонічна складова ацетилхолін-викликаних скорочень, а також їх кінетичні параметри (V_{nc} і V_{nr}) в умовах дії TiO_2 не зазнавали суттєвих змін.

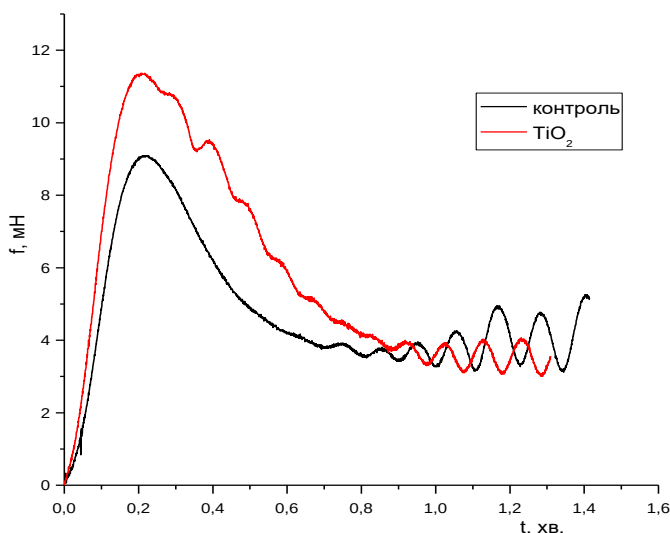


Рис. 5.15. Порівняння викликаних ацетилхоліном (10^{-5} моль/л) скорочень кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів у контролі та в умовах преінкубації (20 хв.) у присутності суспензії ($5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) наночастинок TiO_2 з середнім розміром 21 ± 5 нм. Наведено типові механограми.

5.2.2. Індуковані K^+ -деполяризацією ПМ ГМК скорочення за дії нано- TiO_2 різного розміру в умовах *in vitro*

Як і у випадку агоніст-викликаних скорочень, ефекти нано- TiO_2 на індуковані K^+ -деполяризацією (80 мМ) ПМ ГМК *antrum* щурів вивчали за кумулятивного (10^{-7} - 10^{-4} мг/мл, час преінкубації 20-30 хв.) і некумулятивного (10^{-3} мг/мл, $2.5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл і $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) зростання концентрації.

5.2.2.1. Кумулятивна дія TiO_2

Вплив TiO_2 на K^+ -індуковані скорочення визначався як концентрацією, так і розміром НЧ. Так, додавання частинок з середнім розміром 21 ± 5 нм спричиняло суттєве, дозо-залежне пригнічення амплітуди скорочень. Зокрема, за присутності TiO_2 10^{-7} мг/мл фазне скорочення зменшувалось у середньому на 45,1% ($n = 10$, $p < 0,05$), тоді як кумулятивне збільшення концентрації цих НЧ до 10^{-4} мг/мл спричиняло пригнічення амплітуди у середньому на 77,6 % ($n = 10$, $p < 0,05$) (Рис. 5.16).

Ефект НЧ TiO_2 меншого розміру (4-8 нм, поліморф анатаз) на K^+ -індуковані скорочення кільцевих ГМ *antrum* можна було вважати двофазним відносно їх концентрації (Рис. 5.16). Так, у присутності частинок 4-8 нм у концентрації 10^{-7} мг/мл мало місце невелике зниження амплітуди скорочення (у середньому на 13,3%, $n = 10$, $p < 0,05$). На фоні збільшення концентрації до 10^{-6} мг/мл скорочення залишались на рівні контролю. Подальше зростання концентрації НЧ до 10^{-5} та 10^{-4} мг/мл супроводжувалось невеликою, але достовірною активацією скорочень у середньому на 13,3% та 16,8% ($n = 10$, $p < 0,05$) відповідно.

Більш виражений двофазний ефект щодо амплітуди K^+ -індукованих скорочень *antrum* щурів спричиняло внесення в омиваючий розчин НЧ розміру 1-3 нм. За дії найменшої концентрації TiO_2 (10^{-7} мг/мл) відбувалась активація цих скорочень у середньому на 44,9% ($n = 10$, $p < 0,05$); при збільшенні концентрації НЧ на порядок також спостерігалась активація (у середньому на 38,9%, $n = 10$, $p < 0,05$). Внесення суспензії TiO_2 у

концентрації 10^{-5} мг/мл супроводжувалось поверненням амплітуди до контрольних значень (Рис. 5.16); подальше підвищення концентрації до 10^{-4} мг/мл спричиняло їх вірогідне пригнічення у середньому на 26,3% порівняно з контролем ($n = 10$, $p < 0,05$).

Скорочувальні відповіді аналізували щодо їх механокінетичних параметрів. Було встановлено, що усі типи НЧ TiO_2 змінювали кінетичні показники нормованих максимальних швидкостей V_{nc} і V_{nr} . Так, частинки розміру 21 ± 5 нм на усьому діапазоні досліджених концентрацій знижували V_{nc} (Рис. 5.17): за дії частинок у концентраціях 10^{-7} - 10^{-5} мг/мл ефекти між собою достовірно не відрізнялися, складаючи у середньому 32,7%, тоді як у присутності 10^{-5} мг/мл швидкість фази скорочення різко пригнічувалась, а зниження V_{nc} досягало близько 75% ($n = 10$, $p < 0,05$).

Нано- TiO_2 з середнім розміром 4-8 нм також спричиняли уповільнення фази скорочення; втім, між ефектами частинок з розмірами 20 нм і 4-8 нм спостерігались суттєві відмінності. По-перше, пригнічення V_{nc} за дії TiO_2 4-8 нм не мало дозової залежності, та, по-друге, ефект був значно слабкішим (його максимальне значення становило у середньому 20,5%) і він спостерігався починаючи з 10^{-6} мг/мл (Рис. 5.17).

На противагу ефектам НЧ TiO_2 більших розмірів, частинки 1-3 нм спричиняли збільшення нормованої максимальної швидкості фази скорочення V_{nc} зі зворотною дозовою залежністю (Рис. 5.17). Так за присутності мінімальної застосованої концентрації 10^{-7} мг/мл цей параметр у середньому зростав на 56,8%, тоді як при кумулятивному збільшенні концентрації TiO_2 до 10^{-4} мг/мл активація складала у середньому 36,8% (в обох випадках $n = 10$, $p < 0,05$).

Також суттєві розмір- і дозо-залежні ефекти були виявлені при дослідженні параметра нормованої максимальної швидкості фази розслаблення (Рис. 5.18). Як і у випадку швидкості фази скорочення, TiO_2 21 нм на усьому діапазоні досліджених концентрацій спричиняли дозо-залежне

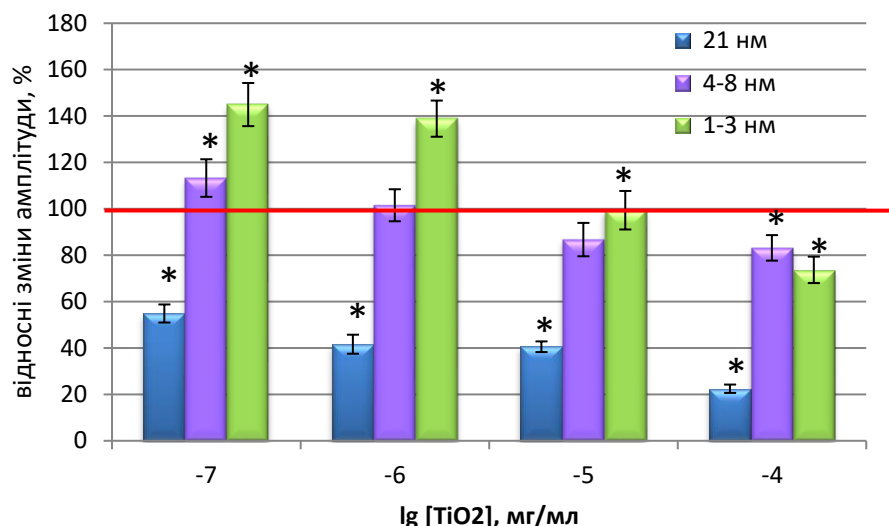


Рис. 5.16. Відносні зміни амплітуди фазних скорочень кільцевих ГМ *antrum*, індукованих гіперкалієвим розчином (80 мМ) в умовах кумулятивного зростання концентрації нано-TiO₂ з розміром 1-3 нм, 4-8 нм і 21 нм. За 100% прийнято відповідні показники в контролі (вісь ординат); ($M \pm m$, $n=10$);
* - $p < 0.05$ – різниця достовірна відносно контролю.

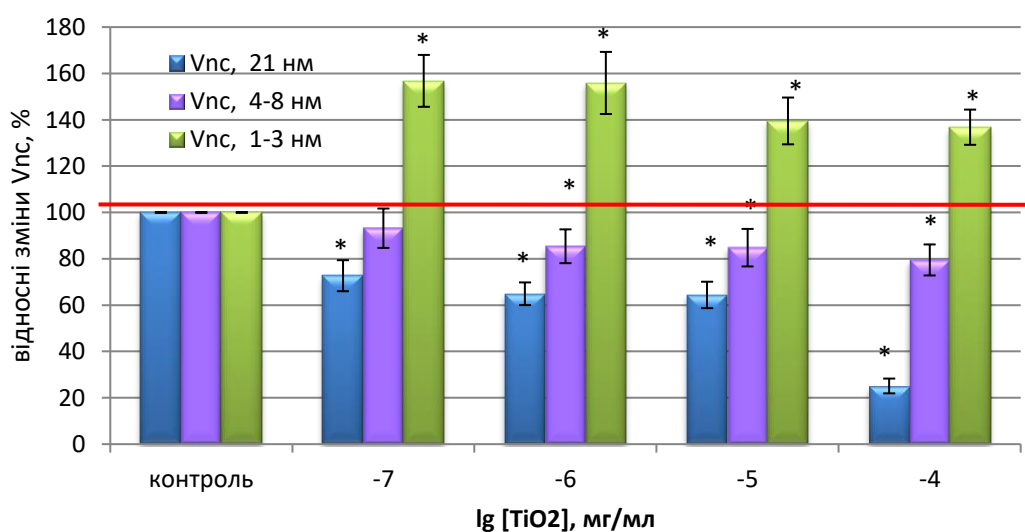


Рис. 5.17. Відносні зміни нормованої максимальної швидкості фази скорочення (V_{nc}) скорочень кільцевих ГМ *antrum* щурів, індукованих гіперкалієвим розчином (80 мМ) в умовах кумулятивного зростання концентрації наночастинок TiO₂ з середнім діаметром 1-3 нм, 4-8 нм і 21 нм. За 100% прийнято відповідні показники в контролі (вісь ординат); ($M \pm m$, $n=10$);
* - $p < 0.05$ – різниця достовірна відносно контролю.

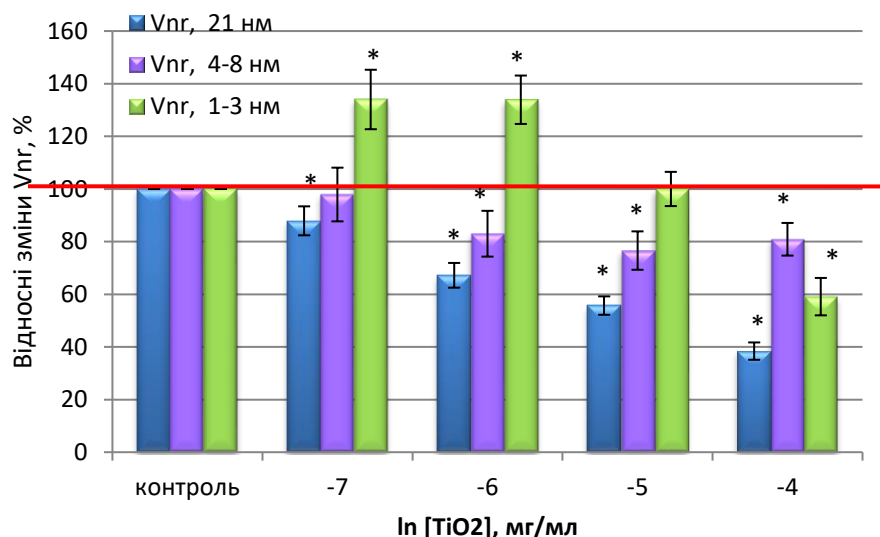


Рис. 5.18. Відносні зміни нормованої максимальної швидкості фази розслаблення (V_{nr}) скорочень кільцевих ГМ *antrum* щурів, індукованих гіперкалієвим розчином (80 мМ) в умовах кумулятивного зростання концентрації нано- TiO_2 з середнім розміром 1-3 нм, 4-8 нм і 21 нм. За 100% прийнято відповідні показники в контролі (вісь ординат); ($M \pm m$, $n=10$); * - $p < 0.05$ – різниця достовірна відносно контролю.

зниження V_{nr} , зокрема за дії 10^{-4} мг/мл цей параметр знижувався у середньому на 61,6% ($n = 10$, $p < 0,05$).

Дія НЧ з розміром 4-8 нм на параметр V_{nr} також була аналогічною до тенденцій зміни фази скорочення: мінімальною ефективною концентрацією, яка спричинила достовірне пригнічення V_{nr} , була 10^{-6} мг/мл (ефект у середньому складав 17,0%, $n = 10$, $p < 0,05$). Також величина інгібувального ефекту TiO_2 за цих умов не мала дозової залежності (Рис. 5.18).

НЧ з середнім розміром 1-3 нм спричиняли виражені дозо-залежні зміни параметра V_{nr} . За присутності невеликих концентрацій частинок TiO_2 (10^{-7} та 10^{-6} мг/мл) відбувалось достовірне його підвищення у середньому на 34% ($n = 10$, $p < 0,05$). Кумулятивне збільшення концентрації TiO_2 до 10^{-5} мг/мл супроводжувалось поверненням нормованої максимальної швидкості фази розслаблення до контрольного рівня. Подальше збільшення концентрації TiO_2 до 10^{-4} мг/мл спричиняло вірогідне уповільнення фази розслаблення у середньому на 40,9% ($n = 10$, $p < 0,05$).

Отже, результати проведених досліджень показали, що суспензія TiO_2 трьох розмірних груп (1-3 нм, 4-8 нм і 21 ± 5 нм) за умов кумулятивної дії спричиняє дозо-і розмір-залежний модулюючий вплив на скорочення, як індуковані деполяризацією ПМ ГМК гіперкалієвим розчином, так і агоністом мускаринових рецепторів ацетилхоліном [512, 513].

5.2.2.2. Некумулятивна дія підвищених концентрацій TiO_2

Некумулятивний вплив TiO_2 розміром частинок 21 ± 5 нм (час преінкубації 20-30 хв.) на K^+ -індуковані скорочення кільцевих ГМ *antrum* щурів залежав від концентрації НЧ в омиваючому розчині: за присутності TiO_2 у концентрації 10^{-3} мг/мл спостерігалось пригнічення K^+ -індукованих скорочень (80 мМ), тоді як їх аплікування у вищих концентраціях ($2,5 \cdot 10^{-2}$ та $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) супроводжувалось їх вірогідною активацією. Так, дія TiO_2 в концентрації $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл супроводжувалась підвищенням як фазного, так і тонічного компонентів скорочувальної відповіді у середньому на 20,8 % та 39,3 % ($n=5$, $p<0.05$), відповідно (Рис. 5.19). Кінетичний аналіз показав, що за цих умов змінювалась також кінетика скорочувальних відповідей, що відображалось у підвищенні швидкості фази скорочення (V_{nc}) на $43,7 \pm 20,5$ % порівняно з контролем ($n=5$, $p<0.05$); нормована швидкість розслаблення (V_{nr}) практично не відрізнялась від контрольних показників і становила $(108,7 \pm 3,9)\%$ відносно контролю, прийнятого за 100% ($n=5$, $p<0.05$).

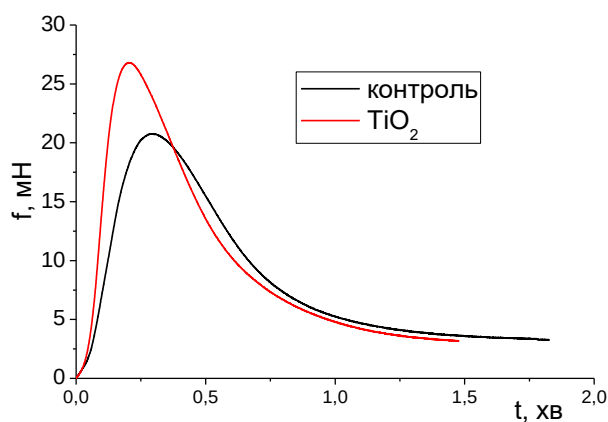


Рис. 5.19. Порівняння викликаних гіперкалієвим розчином (80 мМ) скорочень кільцевих ГМ *antrum* щурів у контролі та за дії нано- TiO_2 ($5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл, розмір 21 нм). Наведено типові механограми.

5.3 Встановлення механізмів дії наночастинок TiO_2 на вісцеральні гладенькі м'язи в умовах *in vitro*

5.3.1 Вивчення функціонування внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо в умовах дії наночастинок TiO_2

Як свідчать наведені вище результати, інкубація багатоклітинних гладеньком'язових препаратів у присутності суспензії нанорозмірного матеріалу TiO_2 з різним діаметром НЧ, супроводжується дозо-залежними, розмір-залежними та часо-залежними змінами їх спонтанної та викликані різними (відносно клітинних механізмів активації збудження) ефектами скорочувальної активності.

Саркоплазматичний ретикулум. Оскільки у регуляції скорочення вісцеральних ГМ (як їх пейсмейкерної активності, так і регуляції генерування напруження/сили) одне з чільних місць займає здатність до мобілізації іонів Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо, нами було досліджено ефективність функціонування ІТФ- та ріанодин-чутливого пулів СР в умовах дії нано- TiO_2 .

Відомо, що фазні ацетилхолін-викликані скорочення опосередковуються вивільненням іонів Ca^{2+} з СР через канали, що активуються ІТФ [61, 118]. Тому перевірку можливого внеску ІТФ-чутливого пулу СР в ефекти TiO_2 здійснювали, реєструючи ацетилхолін-викликані скорочення в безкальцієвому розчині за присутності блокатора ПКК L-типу вератридину (10^{-5} М). За цих умов НЧ TiO_2 (середній розмір частинок 21 ± 5 нм та концентрація в суспензії $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) не спричиняли вірогідних змін скорочень: за їх дії амплітуда фазного компоненту складала $(91.9 \pm 6.7)\%$, порівняно з контролем, прийнятим за 100% ($n=5$, $p>0.05$).

У якості тесту на здатність вивільняти іони Ca^{2+} через ріанодин-чутливі Ca^{2+} -канали СР було використано реєстрацію кофеїн-індукованих скорочень в умовах безкальцієвого середовища та при попередній інкубації гладеньком'язових препаратів у суспензії НЧ TiO_2 (концентрація частинок у суспензії $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл; їх середній розмір 21 нм) упродовж 20-30 хв. За цих

умов сила скорочень, індукованих кофеїном (20 мМ), не зазнавала вірогідних змін у присутності TiO_2 і становила $(94,7 \pm 8,1)\%$ відносно контролю, прийнятого за 100% ($n=5$, $p>0.05$).

Таким чином, результати наших експериментів вказують на те, що НЧ TiO_2 не змінюють мобілізацію іонів Ca^{2+} з СР ГМК [511, 513].

Мітохондрії. Разом з СР, іншим важливим внутрішньоклітинним Ca^{2+} -депо є мітохондрії. Ці органели залучені до підтримання кальцієвого гомеостазу в скорочувальних і пейсмейкерних клітинах ГМ, накопичуючи іони Ca^{2+} та векторно їх вивільняючи поблизу мембран СР; таким чином формуються функціональні Ca^{2+} -вивільнюючі одиниці [514]. Оскільки здатність накопичувати і вивільняти іони кальцію мітохондріями залежить від їх енергетичної функції, а з іншого боку – ензими гліколізу, циклу трикарбонових кислот і дихального ланцюга є Ca^{2+} -залежними [515], нами було вивчено закономірності скорочувальної функції кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів в умовах преінкубації з суспензією наночастинок TiO_2 (концентрація частинок у суспензії $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл, їх середній розмір 21 нм) при блокуванні дихального ланцюга мітохондрій азиду натрію (NaN_3). Передінкубація ГМ *antrum* у Ca^{2+} -вмісному розчині Кребса (30 хв.), який містив NaN_3 (0,1 мМ) усувала ефект активації TiO_2 ($5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) скорочень, викликаних ацетилхоліном (Рис. 5.20 А) та гіперкалієвим розчином: вони становили $(111.7 \pm 5,9)\%$ і $(97.6 \pm 6,0)\%$ ($n=5$, $p>0.05$) порівняно з контролем.

5.3.2. Вивчення потенціалкерowanego входу іонів Ca^{2+} через плазматичну мембрану в умовах дії наночастинок TiO_2

Як було відмічено вище (підпункти 5.2.1.2. і 5.2.2.2.), високі концентрації TiO_2 ($2.5 \cdot 10^{-2}$ і $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) за їх не кумулятивного впливу спричиняли вірогідне підвищення амплітуди фазних ацетилхолін- та K^+ -викликаних скорочень. Оскільки за фізіологічних умов вхід іонів Ca^{2+} з позаклітинного простору має найбільший внесок у підвищення концентрації цих іонів при збудженні ГМК, нами було досліджено закономірності дії

TiO₂ (концентрація $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл, середній розмір частинок 21 нм) на викликані ацетилхоліном скорочення в умовах модуляції роботи ПКК L-типу. Встановлено, що попереднє блокування Ca²⁺-каналів D-600 (10^{-5} М) у значній мірі усувала активаційний ефект НЧ (Рис. 5.20 Б).

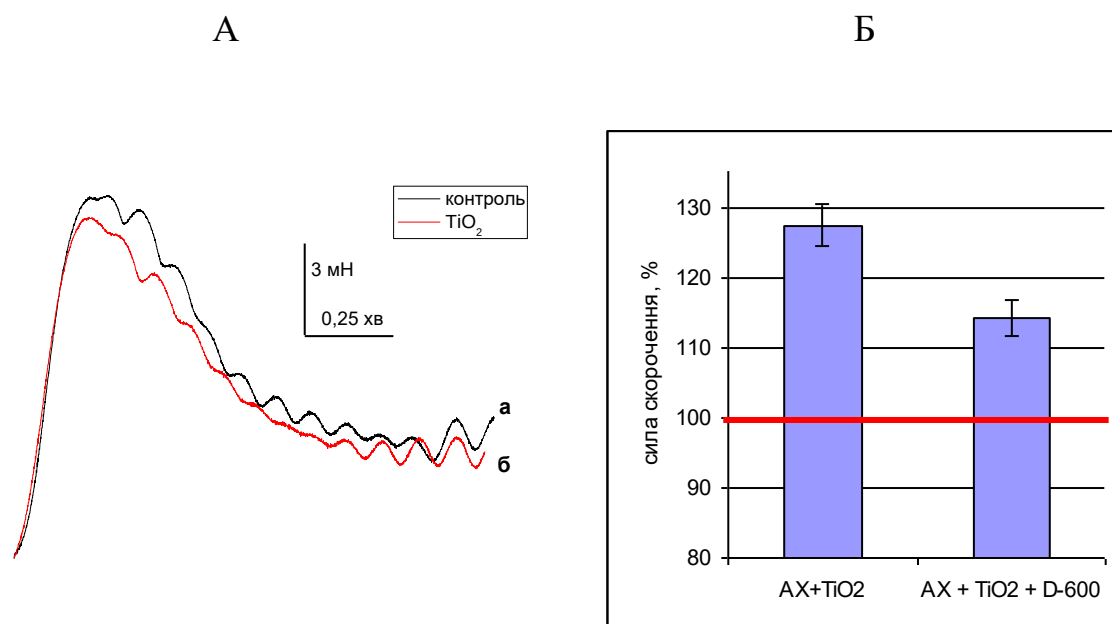


Рис. 5.20. Викликані ацетилхоліном (10^{-5} М) скорочення кільцевих ГМ *antrum* щурів за умов попередньої інкубації (30 хв.) з блокатором дихального ланцюга мітохондрій NaN₃ (10^{-4} М) (А, а), а також NaN₃ (10^{-4} М) і наночастинок TiO₂ ($5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл, розмір 21 ± 5 нм) (А, б); Б - модуляція TiO₂ сили фазного ацетилхолінових скорочень за умов передінкубації препаратів з блокатором Ca²⁺-каналів D-600 (10 мкМ), (n=5). Наведено типові механограми. За 100% прийнято відповідні показники в контролі; * - $p < 0.05$.

Такі результати вказують на те, що за присутності високих концентрацій НЧ TiO₂ має місце активація надходження іонів Ca²⁺ через ПМ через ПКК [511, 513]. На користь цієї гіпотези свідчать дані Е. Chen з колегами [516], щодо активації Ca²⁺-каналів L-типу ПМ клітин макрофагів у присутності високих концентрацій TiO₂ (0,1-1 мг/мл).

5.3.3. Вивчення ефективності активації мускаринових холінорецепторів ендogenousним ацетилхоліном в умовах дії наночастинок TiO₂

Ефективність процесів активації мускаринових холінорецепторів вивільненням ацетилхоліну з холінергічних нейронів інтрамурального

нервовго плетива *antrum* в умовах некумулятивної дії високих концентрацій TiO_2 була нами досліджена із використанням блокатора цих рецепторів атропіну. Встановлено, що передінкубація гладеньком'язових препаратів (30 хв.) з атропіном (10^{-5} М) не усувала активаційної дії TiO_2 на K^+ -індуковані скорочення (Рис. 5.21). Це свідчить про відсутність впливу наночастинок на процеси спряження збудження-скорочення, які індукуються ендogenous ацетилхоліном, принаймні за умови активації його вивільнення деполяризацією тканини ГМ.

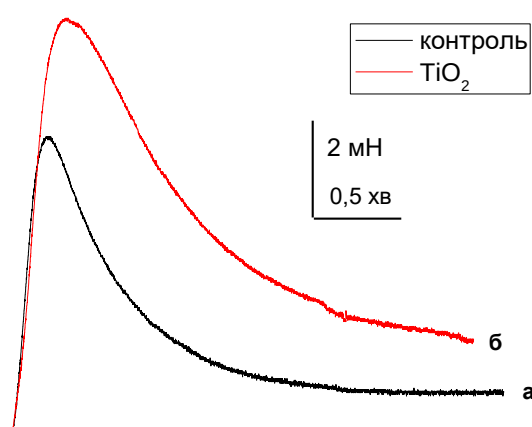


Рис. 5.21. Скорочення кільцевих ГМ *antrum* щурів, активовані гіперкалієвим (80 мМ) розчином в умовах попереднього блокування мускаринових ацетилхолінових рецепторів атропіном (10^{-5} М) в контролі (а) та за некумулятивної дії наночастинок TiO_2 (б, концентрація $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл, середній розмір частинок 21 ± 5 нм). Наведено типові механограми.

Брадикінінові скорочення. Відомо, що в кільцевих ГМ шлунку щурів експресуються ВК-рецептори В2 типу [497, 498]. В2-рецептори належать до надродини метаботропних рецепторів та, як і мускаринові ацетилхолінові рецептори, опосередковують свої внутрішньоклітинні ефекти через $G_{q/11}$ -білки [498-500]. Тому нами було також досліджено брадикінін-індуковані скорочення кільцевих ГМ антрального відділу шлунку щурів в умовах некумулятивної дії високих концентрацій TiO_2 . Встановлено, що НЧ TiO_2 (концентрація $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл, середній розмір частинок 21 ± 5 нм) за умови преінкубації впродовж 20-30 хв. призводять до суттєвого пригнічення

брадикінінових (10^{-7} М) скорочень: у середньому до $(33,9 \pm 4,7)$ % ($n=5$, $p < 0.05$), порівняно з контролем, прийнятим за 100 %. Цей ефект не залежав від ацетилхолін-опосередкованих процесів та не усувався за передінкубації м'язових препаратів з атропіном (10^{-5} М).

Отже, ми можемо передбачити, що ефекти високих концентрацій TiO_2 щодо агоніст-викликаних скорочень ГМ шлунку не залежать від внутрішньоклітинного сигнального шляху, який активується через окремі метаботропні рецептори, та є рецептор-специфічними [511, 513].

5.3.4. Вивчення ефективності неадренергічного нехолінергічного розслаблення в умовах дії наночастинок TiO_2

5.3.4.1. Оксид азоту

Оксид азоту (NO) синтезується в тканинах ГМ ШКТ ізоформами NO-синтаз е та н: nNOS переважно локалізується в закінченнях інтрамуральних нейронів, а eNOS в основному міститься в ГМК [517]. Оскільки NO, (разом з вазоактивним інтестинальним пептидом) спричиняє розвиток повільного компонента неадренергічного нехолінергічного розслаблення (non-adrenergic non-cholinergic (NANC) relaxation) [518, 519], можна було припустити його участь в реалізації ефектів нано- TiO_2 . Тому нами було досліджено дію на ГМ шлунку TiO_2 в умовах неселективного інгібування синтаз оксиду азоту сполукою N_ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). Було встановлено, що L-NAME (10^{-4} М, час передінкубації 30 хв.) не змінював активаторних ефектів TiO_2 (концентрація $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл, середній розмір частинок 21 ± 5 нм) на скорочення кільцевих ГМ *antrum*, активовані гіперкалієвим розчином (80 мМ) та ацетилхоліном (10^{-5} М) (Рис. 5.22). Наші результати добре узгоджуються з даними А. Lefebvre і колег [520] та вказують на те, що система NO-ергічного гальмування важлива для регуляції пресинаптичних процесів регуляції скорочувальної активності ГМ шлунку, однак вона, ймовірно, не відіграє суттєвої ролі у розвитку процесів збудження-скорочення на постсинаптичному рівні.

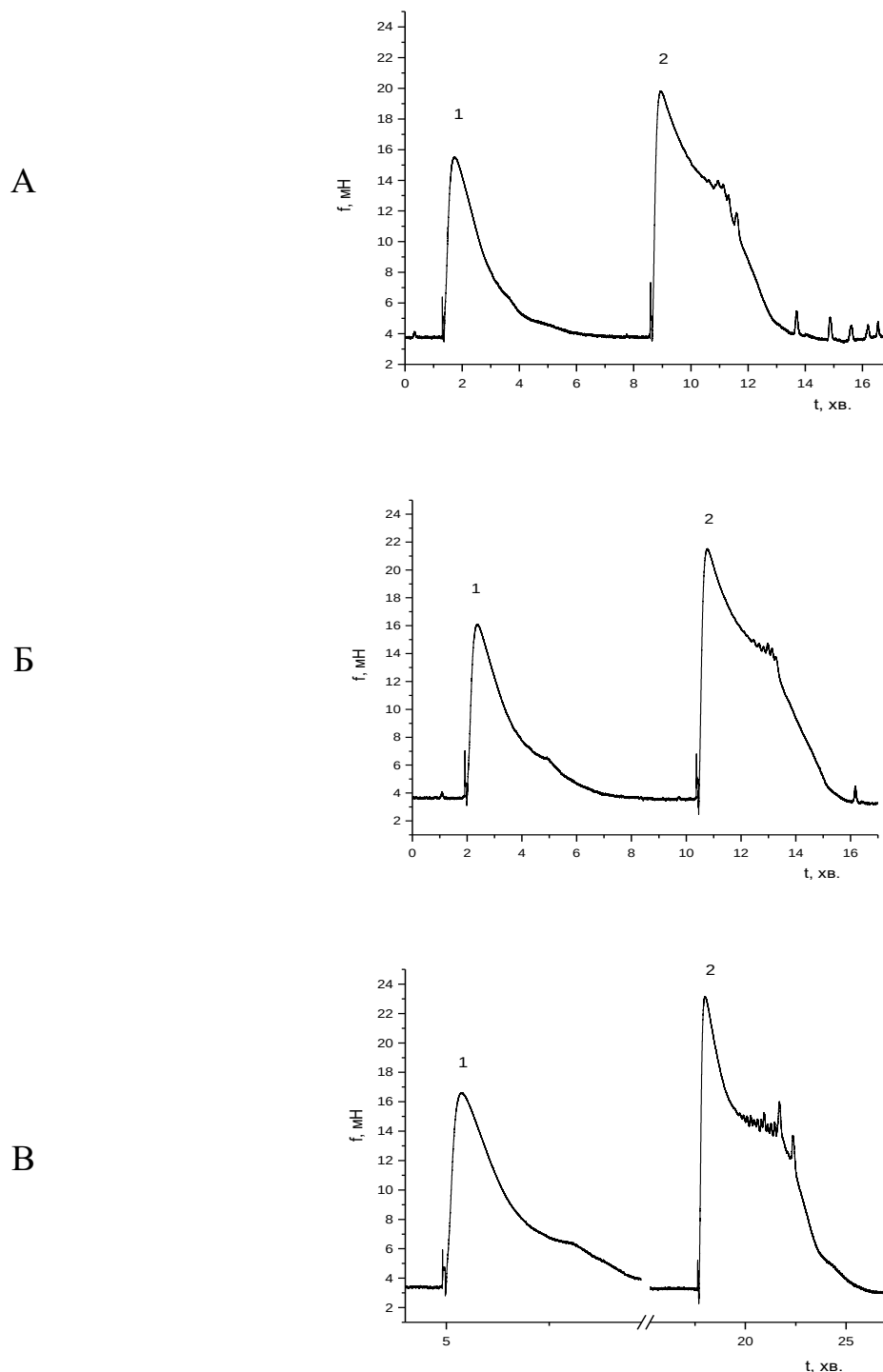


Рис. 5.22. Порівняння викликаних гіперкалієвим розчином (80 мМ, механограма 1) та ацетилхоліном (10 мкМ, механограма 2) скорочень кільцевих ГМ *antrum* щурів у контролі (А), в умовах блокування синтаз оксиду азоту L-NAME (10^{-4} М, час преінкубації 30 хв.) (Б) та передінкубації (30 хв.) у присутності суспензії наночастинок TiO_2 (концентрація $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл, середній розмір частинок 21 ± 5 нм) (В). Наведено типові механограми.

Також проведений кінетичний аналіз процесів скорочення та розслаблення показав НЧ впливу як L-NAME, так і на його фоні внесення наночастинок TiO_2 на показники нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення у випадку ацетилхолінових і K^+ -викликаних скорочувальних відповідей.

Таким чином, можна передбачити, що система повільного компонента NANC не відіграє суттєвої ролі у розвитку процесів збудження-скорочення на постсинаптичному рівні: індукованих деполяризацією ГМ гіперкалієвим розчином та активацією мускаринових холінорецепторів екзогенною аплікацією їх агоніста. Також, ймовірно, що вона не залучена у реалізацію ефектів нано- TiO_2 щодо скорочень ГМ *antrum*.

5.3.4.2. Пуринергічне гальмування.

Відомо, що в ГМ ШКТ швидкий компонент NANC переважно опосередковується проведенням сигналу через активацію пуринорецепторів нейротрансмітером АТФ, який вивільняється з нейронів інтрамурального нервового сплетення поряд, зокрема, з норадреналіном, ВІП і глутаматом [519]. Тому нами було досліджено ефект АТФ на модуляцію функціонування ГМ шлунку НЧ TiO_2 . Як видно з рис. 5.23, аплікування АТФ на тонічному компоненті K^+ -індукованого (80 мМ) скорочення, призводило до зниження напруження м'язових препаратів. У контролі АТФ-індукованого розслаблення (Рис. 5.23 А, В) добре лінеаризувався в координатах $\left\{ \ln \left(\frac{f_m - f}{f} \right); \ln t \right\}$ (коефіцієнт детермінації $R^2 \geq 0,98$) та характеризувався нормованою максимальною швидкістю $0,69 \pm 0,03 \text{ хв}^{-1}$ ($n=7$).

У випадку преінкубації гладеньком'язових препаратів *antrum* у присутності суспензії нано- TiO_2 (концентрація 10^{-7} мг/мл, середній розмір частинок 21 ± 5 нм) аплікування АТФ на тонічній складовій K^+ -скорочення супроводжувалось більш повним (порівняно з контролем та відносно базального напруження м'язів) розслабленням (Рис. 5.23 В).

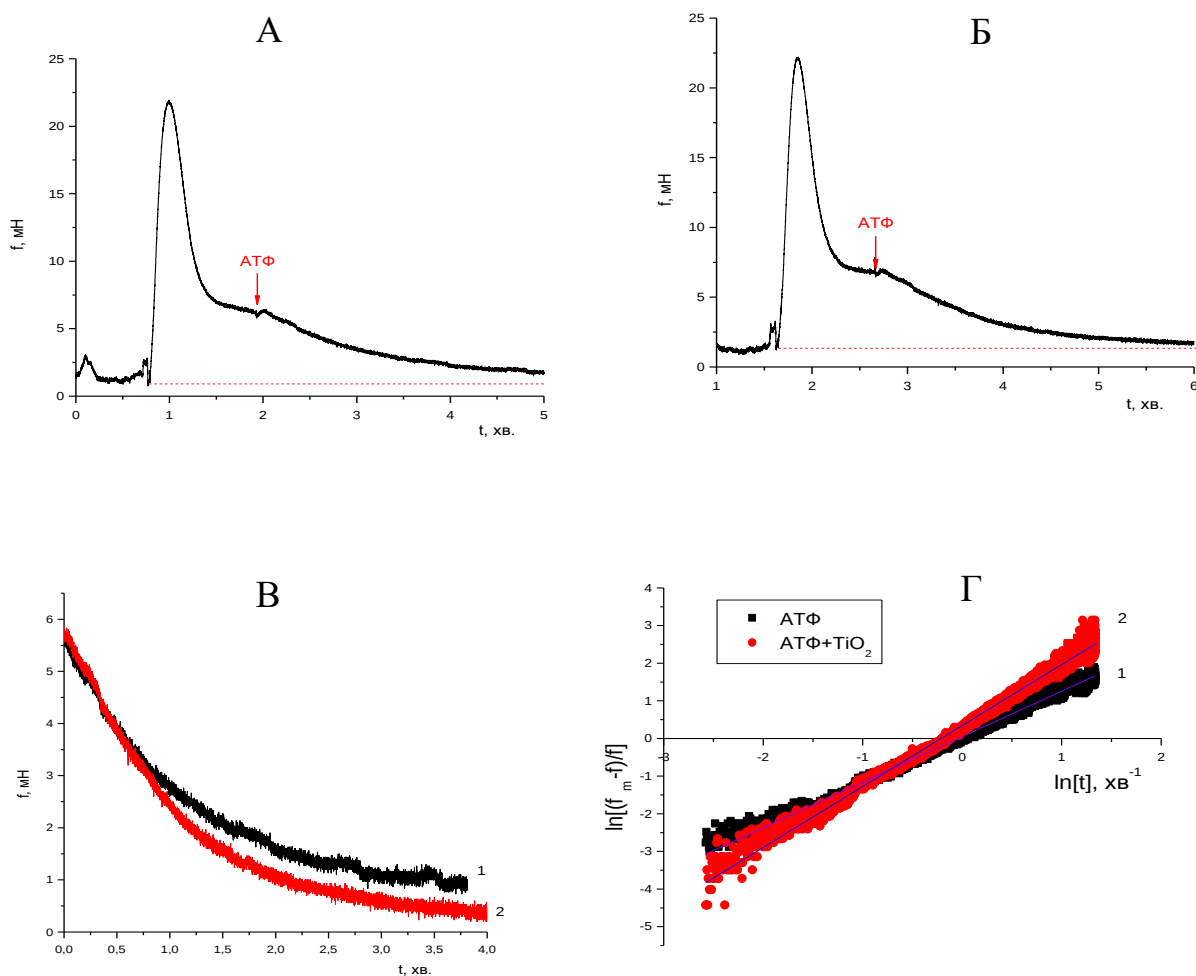


Рис. 5.23. Порівняння ефекту аплікування аденозинтрифосфornoї кислоти АТФ (10^{-5} М) на тонічному K^{+} -викликаному скороченні (80 мМ) кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів:

А – контроль; Б – на 30 хв. преінкубації у присутності суспензії наночастинок TiO_2 (концентрація 10^{-7} мг/мл, середній розмір частинок 21 ± 5 нм); В – порівняння фрагментів механограм за дії АТФ: 1 – у контролі та 2 – у присутності TiO_2 ; Г – лінеаризація механограм, наведених на В (застосовано метод [398], в обох випадках $R^2=0.99$).

Наведено типові механограми.

застосування механокінетичного аналізу [398] виявило, що в умовах дії TiO_2 цей процес відбувається із нормованою максимальною швидкістю $0,75 \pm 0,04 \text{ хв}^{-1}$ ($n=7$); відмінність з контрольним показником незначуща ($p>0,05$).

Отже, хоча за присутності наночастинок TiO_2 спостерігались тенденції до посилення процесів АТФ-викликаного гальмування-розслаблення кільцевих ГМ *antrum*, ймовірно, що система швидкого компонента NANC не відіграє суттєвого значення у розвитку ефектів цих НЧ [513, 521].

5.3.5. Вивчення ефективності пресинаптичної модуляції процесів збудження та гальмування гладеньких м'язів за дії наночастинок TiO_2

В умовах *in vivo* у ГМ ШКТ суттєвий/визначальний вплив на скорочувальну активність мають процеси регуляції вивільнення нейромедіаторів з нейронів інтрамурального нервового сплетення [522]. Зокрема, важливим регуляторним чинником цих процесів є модуляція вивільнення нейромедіаторами пресинаптично розташованими нікотиновими ацетилхоліновими рецепторами та гістаміновими рецепторами підтипу H_2 [522, 523, 524].

Гістамінергічний контроль моторики ШКТ реалізується подвійним шляхом: через нейрональні впливи та внаслідок безпосереднього впливу на скоротливість ГМ. В ШКТ представлені обидва класичні підтипи рецепторів гістаміну H_1 і H_2 , а також H_3 рецептори. Гістамінові H_1 -рецептори розташовані в основному на ГМК та опосередковують скорочувальну реакцію через $G_{q/11}$ -білки та IP_3 -опосередковане вивільнення іонів Ca^{2+} з СР. Гістамінові рецептори підтипів H_2 і H_3 експресуються у нейронах інтрамурального сплетення. H_2 -рецептори опосередковують нейрогенні скорочення через посилення холінергічної та збуджувальної нехолінергічної нейропередачі в інтрамуральних нейронах [459-462]. Обумовлена гістаміном релаксація ГМ можлива лише в кільцевому гладеньком'язовому шарі сфінктерів. Рецептори H_3 -підтипу в ГМ ШКТ спричиняють пригнічення вивільнення різних нейромедіаторів із закінчень інтрамуральних нейронів.

Відомо, що у ентеральних нейронах кишечника нікотиніві холінорецептори локалізуються в соматодендритній облсті нейрона, де вони забезпечують швидку збуджувальну нейропередачу. Разом з тим встановлено, що ці рецептори також локалізуються на нервових закінченнях, де спричиняють вивільнення нейромедіаторів: агоністи діють на ці рецептори, спричиняючи вивільнення нейромедіаторів за Ca^{2+} -залежним, але не залежним від потенціалу дії механізмом [563-565].

Тому в даному підпункті представлено наші результати дослідження впливу НЧ TiO_2 на процеси пресинаптичної (гістамінергічної та нікотинергічної) модуляції вивільнення нейромедіаторів з терміналей нейронів інтрамурального нервового сплетення у ГМ антрального відділу шлунку та товстого кишечника щурів.

Як видно з рис. 5.24А, внесення гістаміну (10^{-5} М) спричиняло скорочення ($(2,8 \pm 0,5)$ мН, $n=5$) кільцевих ГМ *saesit*, з наступним виходом реакції на плато. Додавання на тонічній складовій гістамінового скорочення активатора нікотинових ацетилхолінових рецепторів нікотину (10^{-5} М) супроводжувалось зниженням тону ГМ. Відносні ефекти гістаміну і нікотину оцінювали, розраховуючи параметр R; у контролі за даних концентрацій агоністів він становив $(22 \pm 2)\%$ ($n=7$).

$$R = \frac{A_1}{A_2} 100\%$$

де: A_1 – величина реакції гладеньком’язового препарату на аплікування нікотину;

A_2 – величина реакції гладеньком’язового препарату на аплікування гістаміну (амплітуда скорочення).

У випадку передінкубації (20 хв.) гладеньком’язових препаратів *saesit* з суспензією НЧ TiO_2 (середній розмір часток 21 нм, концентрація 10^{-3} мг/мл) спостерігалось збільшення тонічної складової гістамін-індукованого (10^{-5} М) скорочення на $(32,3 \pm 2,7)\%$ ($n=7$, $p<0,05$), тоді як наступне розслаблення м’язів під дією нікотину (10^{-5} М) за цих умов зменшувалось (Рис. 5.24).

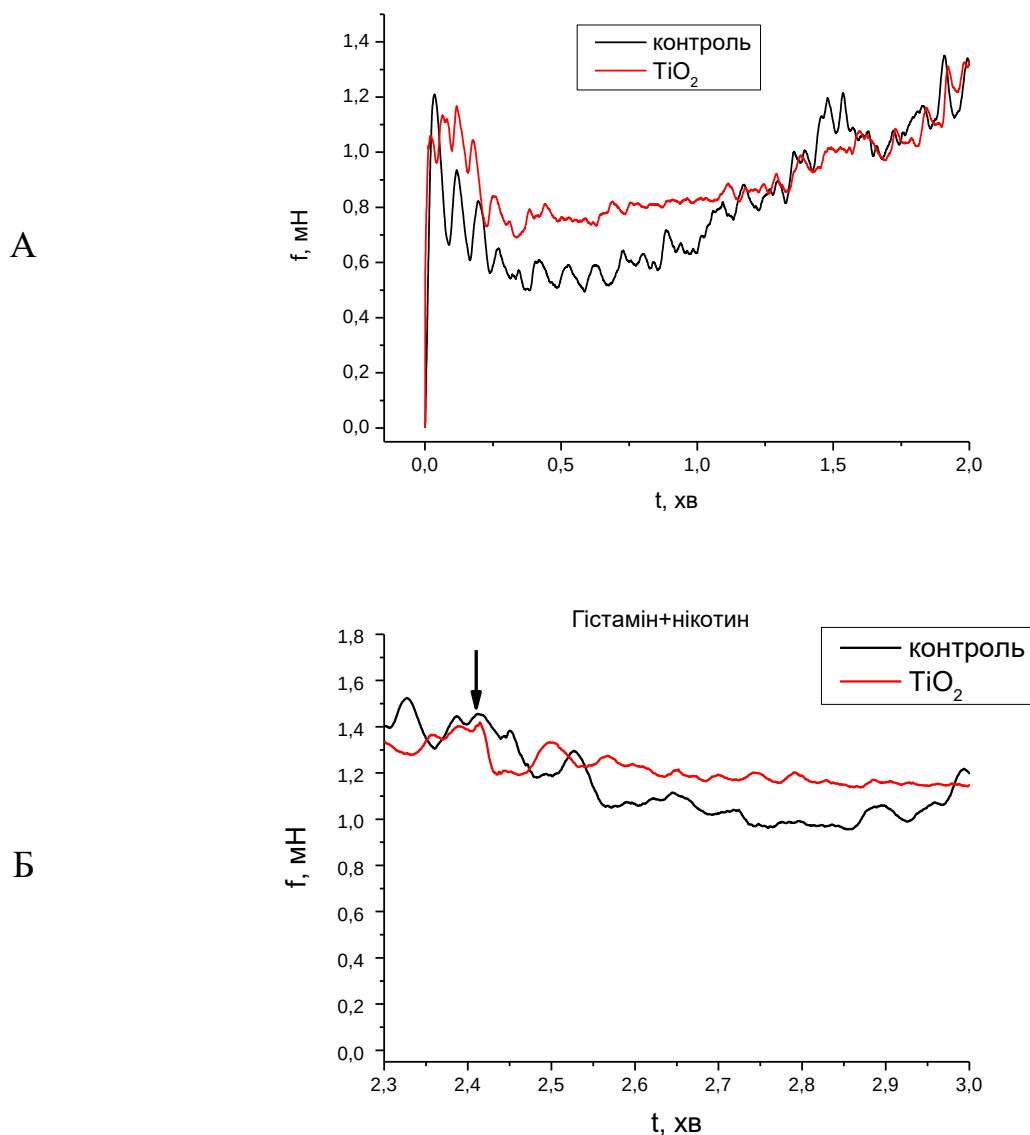


Рис. 5.24. Ефекти гістаміну (10^{-5} М) (А) та нікотину (10^{-5} М) (Б) на кільцеві гладенькі м'язи *саесит* щурів, а також їх модуляція нано- TiO_2 (середній розмір 21 ± 5 нм, концентрація 10^{-3} мг/мл). Наведено типові механограми.

Відомо [563-565], що ефекти нікотину як агоніста нікотинових холінорецепторів на окремі нейрони інтрамурального нервового сплетення мають відносно диференційовану концентраційну залежність: за низьких концентрацій нікотин переважно спричиняє вивільнення збуджувальних нейромедіаторів (зокрема, ацетилхоліну), тоді як у присутності його високих концентрацій домінує ефект активації вивільнення гальмівних нейромедіаторів. Таким чином, отримані нами данні вказують на те, що нано-

TiO₂ не має вираженого впливу на процеси неадренергічного нехолінергічного гальмування у вісцеральних ГМ, що узгоджується з нашими попередньо висунутими (у підпункті 5.3.4) припущеннями.

Надалі наші дослідження стосувались вивчення можливих ефектів нано-TiO₂ на модуляцію гістамінових (10⁻⁵ М) скорочень м'язів *саесит* зниженою концентрацією нікотину (10⁻⁷ М); за цієї концентрації нікотин активує скорочувальну активність ГМ товстого кишечника [563-565]. За даних умов показник R у контролі становив (177,0±12,6)% (n=7). Передінкубація (20 хв.) м'язових препаратів у присутності суспензії TiO₂ (середній розмір 21 нм, концентрація 10⁻³ мг/мл) супроводжувалась зниженням нікотин-індукованого (10⁻⁷ М) скорочення, яке викликали на тонічній складовій гістамінових (10⁻⁵ М) скорочень. Таким чином, це відобразилось у певному зниженні показника R, який в умовах впливу нано-TiO₂ становив (85,1±5,6)% (n=7, p<0,05).

Для встановлення закономірностей та механізмів впливу TiO₂ на процеси вивільнення нейромедіаторів з нейронів інтрамурального сплетення в ГМ *саесит*, було здійснено вивчення кумулятивної дії цих НЧ (діапазон концентрацій 10⁻⁶ – 10⁻⁴ мг/мл) на нікотин-індуковані (10⁻⁷ М) скорочення, які індукували на тонічній складовій гістамінових (10⁻⁵ М) скорочень (Рис. 5.25 А). В умовах преінкубації (20 хв.) м'язових препаратів з мінімальною концентрацією TiO₂ (середній розмір 21 нм, концентрація 10⁻⁶ мг/мл) спостерігалось пригнічення гістамінових скорочувальних відповідей, тоді як аплікування нікотину на тонічній складовій цих скорочень не змінювало рівень м'язового напруження. Подальше кумулятивне підвищення концентрації TiO₂ до 10⁻⁵ мг/мл спричиняло модуляцію як гістамін-, так і нікотин-індукованих скорочень; так, за даних умов хоча і спостерігалась скорочувальна реакція на аплікування нікотину, втім вона була достовірно знижена на (78,2±6,5)%, (n=7, p<0,05) порівняно з контролем, а параметр R складав (50,3±4)% (n=7, p<0,05). За підвищення в омиваючому препараті

розчині концентрації частинок TiO_2 до 10^{-4} мг/мл також супроводжувалось пригніченням як гістамін-, так і нікотин-індукованих скорочень (Рис. 5.25А).

Аналогічні ефекти нано- TiO_2 на гістамін-, так і нікотин-індуковані скорочення спостерігались у випадку ГМ *antrum* (Рис. 5.25 Б). Встановлено, що TiO_2 на усьому діапазоні досліджених концентрацій спричиняє достовірне дозо-залежне пригнічення як фазних, так і тонічних скорочень. Також цей наноматеріал суттєво, дозо-залежно знижує показники нормованих максимальних швикостей V_{nc} та V_{nr} гістамін-індукованих скорочень, а також V_{nc} у випадку суміші гістаміну і нікотину. Що стосується параметра V_{nr} , для скорочувальних відповідей на дію суміші гістаміну і нікотину відбувалась інверсія напрямку зміни цього параметра від суттєвого пригнічення низькими концентраціями TiO_2 (10^{-7} - 10^{-6} мг/мл) до активації у присутності 10^{-4} мг/мл.

Також нами було досліджено вплив нано- TiO_2 (середній розмір 21 нм) на скорочення, індуковані ацетилхоліном (10^{-5} М) в умовах їх модуляції нікотинном (10^{-7} М). У контролі аплікування ацетилхоліну супроводжувалось скорочувальною реакцією з амплітудою фазної складової ($18 \pm 1,2$) мН, та співвідношенням фазної і тонічної складових на рівні ($1,6 \pm 0,1$) ($n=6$); в умовах комбінування агоністів мускаринових і нікотинових холінорецепторів скоротлива реакція м'язів *saesit* характеризувалась пригніченням фазного компонента ацетилхолінового скорочення та підвищенням тонічного (Рис. 5.26), що відобразилось на достовірному зниженні їх співвідношення, яке у середньому становило ($1,07 \pm 0,08$) ($n=6$, $p < 0,05$). Ймовірно, такий ефект нікотину можна пояснити його пресинаптичною дією, адже фізіологічною функцією нікотинових ацетилхолінових рецепторів є модуляція вивільнення нейротрансмітерів з синаптичних закінчень нейронів інтрамурального нервового сплетення [520-523].

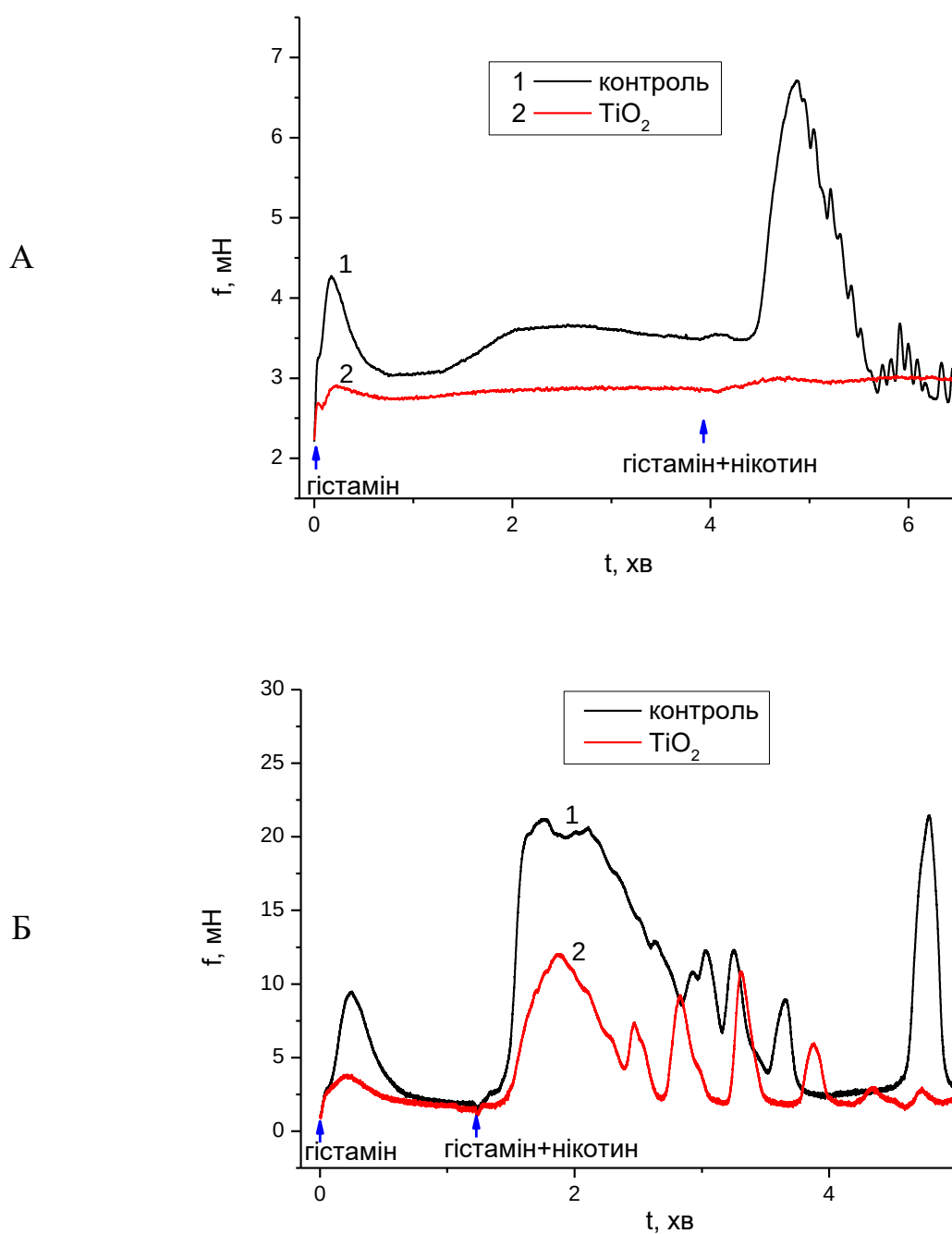


Рис. 5.25. Дія гістаміну (гістамін, 10^{-5} М) та нікотину (нікотин, 10^{-7} М) на тонус кільцевих гладеньких м'язів *caecum* (А) і *antrum* (Б) щурів у контролі (механограми 1) та їх модуляція 10^{-4} мг/мл нано- TiO_2 (середній розмір 21 ± 5 нм, суміш поліморфів рутил:анатаз=1:4). (механограми 2).

Наведено типові механограми.

В умовах кумулятивної дії TiO_2 (концентрації 10^{-7} - 10^{-4} мг/мл, час попередньої інкубації 20 хв.) відбувались суттєві зміни скорочень *saesut* на аплікування агоністів мускаринових і нікотинових холінорецепторів. Так, попри відсутність ефекту на амплітуду скорочень на всьому діапазоні досліджених концентрацій діоксиду титану, спостерігалось суттєве дозозалежне збільшення тонічного компонента. Це призвело до достовірного підвищення параметра R; зокрема, для скорочення в присутності 10^{-4} мг/мл TiO_2 цей показник складав $(1,65 \pm 0,12)$ ($n=6$, $p<0,05$), тобто статистично потрапив у діапазон контрольних значень цього параметра для ацетилхолін-викликаного скорочення (Рис. 5.26 Б). Для встановлення кількісних закономірностей впливу TiO_2 на агоніст-викликані скорочення інтестинальних м'язів, нами було розраховано нормовані максимальні швидкості процесів наростання і спаду (V_{nc} та V_{nr} , відповідно) м'язового напруження (Рис. 5.27). Параметри V_{nc} скорочень індукованих лише ацетилхоліном та ацетилхоліном в поєднанні з нікотиним суттєво зростають на усьому діапазоні досліджених концентрацій TiO_2 ; аналогічні тренди мали місце також і у випадку показників V_{nr} .

Можемо міркувати про механізми, за якими наночастинки TiO_2 пригнічують тонічне скорочення скорочувальних реакцій *saesut* на аплікування суміші агоністів ацетилхолінових рецепторів (ацетилхоліну та нікотину) [436, 511, 513]. По-перше, такі результати можуть бути зумовлені модулюванням вивільнення ендогенних нейромедіаторів з синаптичних закінчень інтрамуральних нейронів [517-519]. По-друге, подібні ефекти можна отримати при дії на ланки сигнального каскаду, який запускається активацією M_2 -холінорецепторів [315, 525, 526]. Також модуляція тонічної складової скорочень може спостерігатись в умовах змін у функціонуванні систем екструзії (активного транспорту) іонів Ca^{2+} з міоплазми [272, 273]; втім, ймовірно, що в даному випадку цей ефект не має місця.

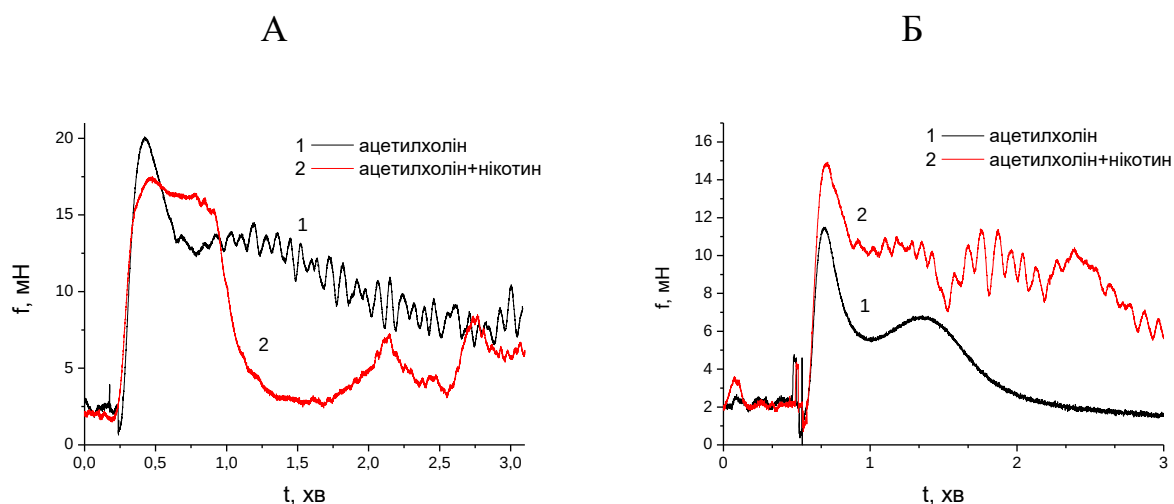


Рис. 5.26. Скорочення кільцевих гладеньких м'язів *саесит* щурів, викликані ацетилхоліном (механограми 1, 10^{-5} М), а також ацетилхоліном з нікотиним (механограми 2, ацетилхолін+нікотин, у концентраціях 10^{-5} та 10^{-7} М, відповідно) у контролі (А) та за дії TiO_2 (середній розмір часток 21 нм, концентрація 10^{-4} мг/мл) (Б). Наведено типові механограми.

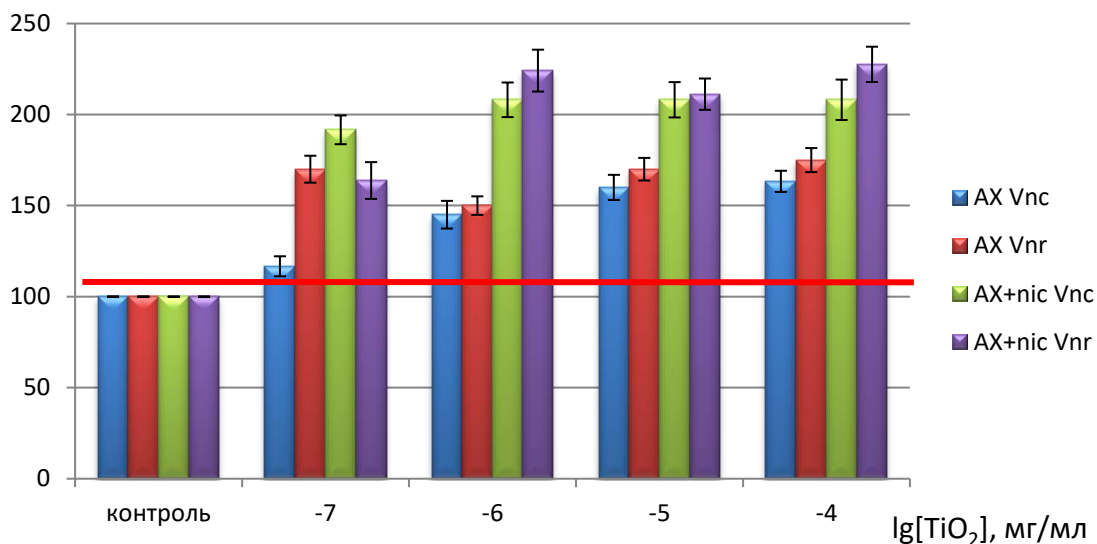


Рис. 5.27. Параметри нормованих максимальних швидкостей скорочення (V_{nc}) та розслаблення (V_{nr}) скорочувальних відповідей кільцевих ГМ *саесит*, активованих ацетилхоліном (АХ) (10^{-5} М) та ацетилхоліном (10^{-5} М) у поєднанні з нікотиним (ніс) (10^{-7} М), у контролі та за кумулятивної дії нано- TiO_2 (середній розмір 21 нм, концентрації 10^{-7} - 10^{-4} мг/мл).

5.3.6. Вивчення АТФ-залежної K^+ провідності плазматичної і мітохондріальної мембран гладеньких м'язів за дії наночастинок TiO_2

Оскільки, як показано на ГМ шлунку, ймовірною ключовою ланкою, задіяною у розвиток клітинних ефектів TiO_2 , є енерго/АТФ-залежні процеси, нами було досліджено окситоцин-викликані (0,1 МО) скорочення міометрія в умовах модуляції (активації та блокування) АТФ-чутливих K^+ -каналів ПМ і мітохондрій. Блокування АТФ-чутливих K^+ -каналів ПМ здійснювали передінкубацією (20 хв.) м'язових препаратів з глібенкламідом ($10^{-5}M$), а їх активацію – діазоксидом (200 мкМ). Блокування АТФ-чутливих K^+ -каналів мембран мітохондрій спричиняли попередньою інкубацією ГМ з 5-гідроксидеканоатом ($2 \cdot 10^{-4} M$).

Було встановлено, що передінкубація міометрія у присутності блокаторів АТФ-чутливих K^+ -каналів супроводжується тенденціями до збільшення в однаковій мірі фазного і тонічного компонентів окситоцинового скорочення (Рис. 5.28 А). Кінетичним аналізом [398] було виявлені достовірні зміни нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення V_{nc} та розслаблення V_{nr} : ці показники відповідно становили $(83,6 \pm 7,1)\%$ ($n=6$, $p<0,05$) і $(163,9 \pm 8,9)\%$ ($n=6$, $p<0,05$) (відносно контрольних значень, прийнятих за 100%). Наноматеріал TiO_2 (10^{-5} мг/мл) усував ефекти блокування АТФ-чутливих K^+ -каналів ПМ і мітохондрій: на фоні його дії окситоцинові скорочення повертались до контрольного рівня; зокрема, параметри V_{nc} та V_{nr} відповідно становили: $(88,0 \pm 6,5)\%$ ($n=6$, $p>0,05$) і $(113,9 \pm 7,4)\%$ ($n=6$, $p>0,05$).

Також нами було досліджено окситоцинові (0,1 МО) скорочення міометрія в умовах комбінованої дії активатора АТФ-чутливих K^+ -каналів ПМ діазоксиду ($2 \cdot 10^{-4} M$) та блокатора АТФ-чутливих K^+ -каналів мітохондрій 5-гідроксидеканоату ($2 \cdot 10^{-4} M$) (Рис. 5.28 Б). У контролі ці сполуки спричиняли зниження кінетичних показників V_{nc} та V_{nr} відповідно до $(85,0 \pm 6,8)\%$ ($n=6$, $p<0,05$) і $(66,7 \pm 4,2)\%$ ($n=6$, $p<0,05$) (відносно контролю, прийнятого за 100%). В умовах нетривалого впливу (час передінкубації

становив 20 хв.) суспензії TiO_2 (у концентрації 10^{-5} мг/мл) відбувалось суттєве зростання швидкості V_{nc} до $(194,7 \pm 11,1)\%$ ($n=6$, $p<0,05$) та повернення V_{pr} в межі контролю: $(91,7 \pm 7,2)\%$ ($n=6$, $p>0,05$).

Таким чином, модуляція функціонування АТФ-чутливих K^+ -каналів ПМ і мітохондрій суттєво нівелювала ефекти TiO_2 на ГМ міометрія, що, підтверджує попередньо висунуте передбачення про те, що важливою мішенню дії цих НЧ є енерго/АТФ-залежні процеси в міозитах [513, 524].

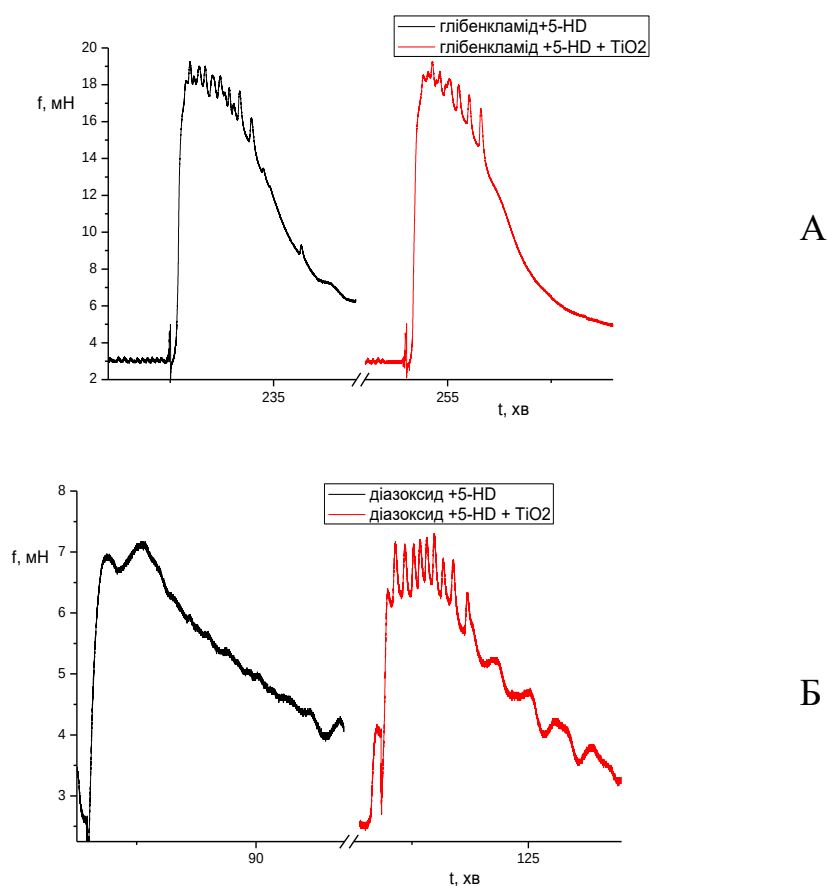


Рис.5.28. Викликані окситоцином (0,1 МО) скорочення поздовжніх гладеньких м'язів міометрія щурів за присутності активатора АТФ-чутливих K^+ -каналів плазматичної мембрани діазоксиду (200 мкМ, час передінкубації 20 хв), блокатора АТФ-чутливих K^+ -каналів плазматичної мембрани глібенкламіду (10^{-5} М) та мітохондрій 5-гідроксидекааноату ($2 \cdot 10^{-4}$ М, час передінкубації 20 хв) в контролі та за присутності суспензії TiO_2 (середній розмір частинок 21 нм (тривалість передінкубації 20 хв., концентрація 10^{-5} мг/мл). Наведено типові механограми.

5.4. Молекулярний докінг нано-TiO₂ з метаботропними рецепторами

Наведені вище результати наших досліджень вказують на те, що НЧ TiO₂ в різній мірі здатні модулювати проведення сигналу через рецептори, спряжені з одним і тим самим типом G-білків (G_{q/11}), зокрема, мускаринові M₃-типу, H₁-гістамінові, B₁-брадикінінові та окситоцинові. Тож для встановлення молекулярних механізмів взаємодії нано-TiO₂ з різними GPCRs проводили молекулярний докінг фрагменту наночастинки (кристалічна структура поліморфа анатаз, розміри: (18.925 × 3.785 × 19.028) Å³) з позаклітинними частинами метаботропних рецепторів.

По-перше, нами було здійснено аналіз ймовірних взаємодій TiO₂ з холінорецептором M₂-типу. Відомо [525], що неактивований холінорецептор M₂-типу містить у позаклітинній частині велику кишеню, розміщену над сайтом зв'язування ортостеричних агоністів; вона забезпечує алостеричну модуляцію рецептора за рахунок зв'язування сполук-модуляторів, зокрема LY2119620. Як відомо [525, 526], у процесі активації GPCRs родини A (родопсиноподібних рецепторів) відбуваються суттєві переорієнтації трансмембранних α-спіральних сегментів TM5, TM6 і TM3. Зокрема, для M₂-холінорецептора встановлено, що у процесі його активації за рахунок руху TM6-сегменту відбуваються суттєві перебудови обох сайтів зв'язування агоністів [525].

Тому нами було досліджено сайти взаємодії алостеричного модулятора LY2119620 і ортостеричних агоністів ацетилхоліну і ірехоро з M₂-холінорецептором. Встановлено, що зв'язування ортостеричного агоніста ірехоро забезпечується з наступними амінокислотними залишками: неполярний (Trp400), полярні незаряджені (Tyr104, Tyr403, Asn404, Tyr426, Cys429) та полярний заряджений (Asp103); їх співвідношення становлять 0,14:0,71:0,14 та розподіл вільної енергії Гіббса (кДж/моль): (-0,45); (-0,85); (-0,15).

Зв'язування ацетилхоліну з M_2 -холінорецептором забезпечують наступні амінокислотні залишки (Рис. 5.29 А): неполярні (Trp155, Ala194, Trp400), полярні незаряджені (Tyr104, Ser107, Asn108, Tyr403, Asn404, Cys429, Tyr430) та полярний заряджений (Asp103); їх співвідношення становлять 0,27:0,64:0,09 і розподіл вільної енергії Гіббса (кДж/моль): (-1,67); (-1,31); (-0,15).

Взаємодія алостеричного модулятора LY2119620 з M_2 -холінорецептором здійснюється за участі амінокислотних залишків, які за фізико-хімічними властивостями можна поділити на три групи: неполярний (Trp422), полярні незаряджені (Tyr80, Tyr83, Tyr177, Asn410, Asn419, Tyr426), полярний заряджений (Glu172); їх співвідношення складають 0,125:0,75:0,125 та розподілом вільної енергії Гіббса (кДж/моль): (-0,45); (-0,9); (-0,27).

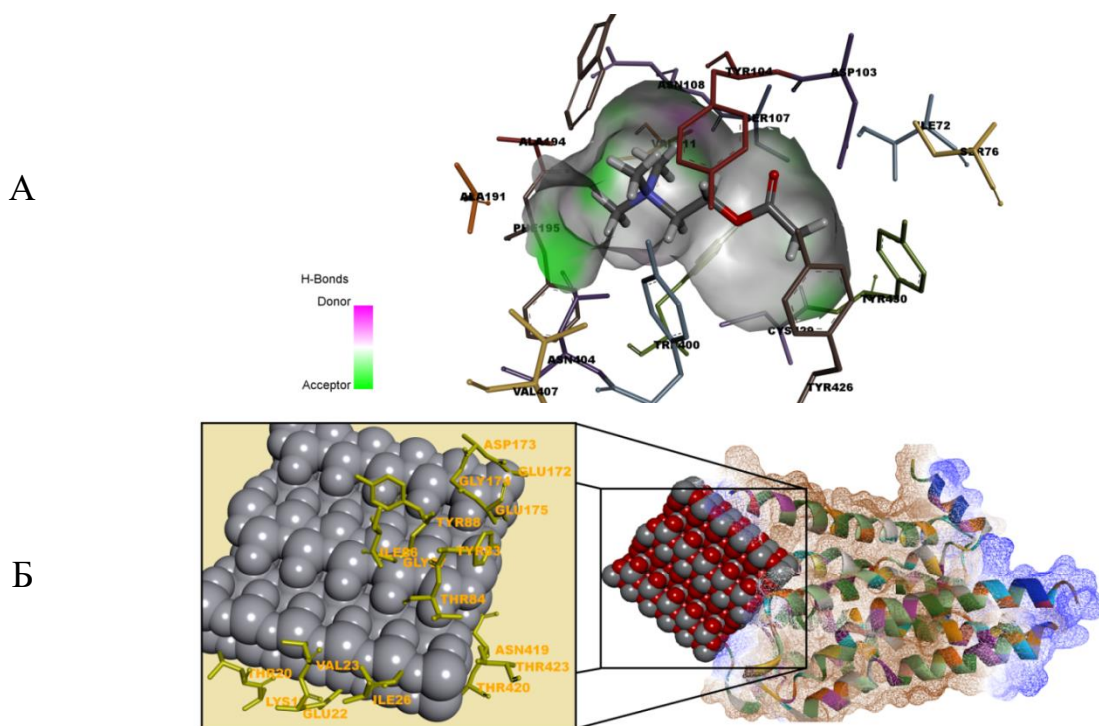


Рис. 5.29. Сайти зв'язування ацетилхоліну (PubChem CID: 187) (А) (параметри: Score = 3648, Area = 384.20 Å², ACE = -132.89) та нано-TiO₂ (Б) (параметри: Score = 7538, Area = 955.40, ACE = - 53.46) з M_2 -мускариновим холінорецептором; дані веб-серверу PatchDock.

Розрахунки взаємодії нано-TiO₂ з M₂-холінорецептором показали, що найвищу афінність зв'язування має сайт, сформований 17 амінокислотними залишками (Рис.5.29 Б). Серед амінокислот сайту: неполярні амінокислотні залишки (Val23, Ile26, Ile86, Gly87, Gly174), полярні незаряджені (Thr20, Tyr83, Thr84, Tyr88, Asn419, Thr420, Thr423), полярні заряджені (Lys19, Glu22, Glu172, Asp173, Glu175) знаходяться у співвідношеннях 0,29:0,41:0,29 та відповідним розподілом вільної енергії Гіббса (кДж/моль): (-0,73); (-0,6); (-1,61). У даному сайті серед полярних заряджених амінокислот переважають амінокислотні залишки з негативно зарядженими радикалами. Сайт характеризувався наступними характеристиками: geometric shape complementarity score (Score) = 7538, Approximate interface area (Area) = 955.40 Å², Atomic Contact energy (ACE) = (- 53.46).

Встановлено, що сайт зв'язування нано-TiO₂ з M₂-холінорецептором формується чотирма групами послідовно розташованих амінокислотних залишків. Так, перша група амінокислот: Lys19, Thr20, Glu22, Val23, Ile26; друга група амінокислот: Tyr83, Thr84, Ile86, Gly87, Tyr88; третя група амінокислот: Glu172, Asp173, Gly174, Glu175; четверта група амінокислот: Asn419, Thr420, Thr423, відстані між якими становлять 57, 84 і 244 амінокислотні залишки, відповідно.

Порівняння властивостей сайтів зв'язування нано-TiO₂, LY2119620 та ірехого з M₂-холінорецептором свідчить, що їх структура побудована за однаковим принципом: в них відносні внески неполярних і полярних заряджених амінокислотних залишків співпадають. Виявлено, що серед проаналізованих нами сайтів найвище значення сумарної енергії Гіббса амінокислотних залишків має сайт зв'язування нано-TiO₂. Варто відзначити також певну подібність сайтів зв'язування нано-TiO₂ і алостеричних лігандів: для обох є спільними три амінокислотні залишки (два полярні незаряджені Tyr83 і Asn419, та полярний Glu172); втім, сайти зв'язування TiO₂ та ацетилхоліну не мали спільних амінокислотних залишків.

Дослідженнями за допомогою веб-серверу PatchDock нами було встановлено, що сайт зв'язування нейромедіатора ацетилхоліну з М₃-холінорецептором містить 9 амінокислотних залишків (Рис.5.30 А): неполярні Ala238 і Trp503; полярні незаряджені Tyr148, Ser151, Asn152, Tyr506, Tyr529 і Cys532; полярний заряджений Asp147. Стехіометрія цих груп амінокислотних залишків знаходяться становить 0,22:0,67:0,11, а розподіл вільної енергії Гіббса (кДж/моль) складає (-1,22); (-1,2); (-0,15).

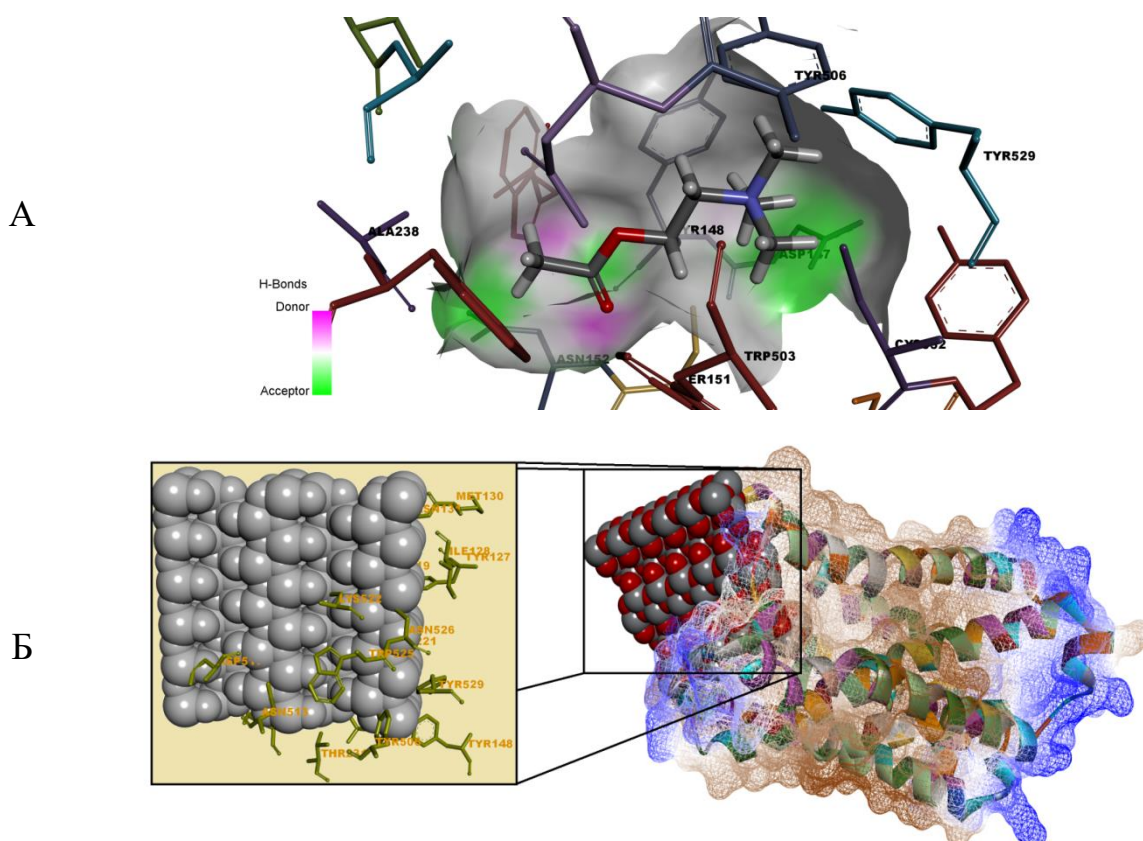


Рис. 5.30. Сайти зв'язування ацетилхоліну (параметри: Score = 7538, Area = 955.40 Å², ACE = - 53.46) (А) та нано-TiO₂ (Б) (параметри: Score = 9284, Area = 1368,10 Å², ACE = 260,01) з М₃-мускариновим холінорецептором; дані веб-серверу PatchDock.

Найбільш афінний сайт зв'язування М₃-холінорецептора з нано-TiO₂ (Рис. 5.30 Б) був сформований 19 амінокислотними залишками, об'єднаних у три послідовно розміщених кластери: перший Tyr127, Ile128, Met130, Asn131; другий Glu219, Phe221, Leu225, Ser226, Glu227, Pro228, Thr231; третій Asn513, Asp517, Lys522, Trp525, Asn526, Tyr529; та окремо

локалізовані залишки тирозину (148 і 506). За фізико-хімічними властивостями амінокислотні залишки можна об'єднати у три групи: неполярні (Ile128, Met130, Phe221, Leu225, Pro228, Trp525), полярні незаряджені (Tyr127, Asn131, Tyr148, Ser226, Thr231, Tyr506, Asn513, Asn526, Tyr529) і полярні заряджені (Glu219, Glu227, Asp517, Lys522); їхні стехіометрія і розподіл вільної енергії Гіббса (кДж/моль) складають: 0,32:0,47:0,21 та (0,79); (-1,43); (-1,34), відповідно.

Варто відзначити, що, сайти зв'язування ацетилхоліну і нано- TiO_2 на мускаринових холінорецепторах M_3 -типу, на відміну від M_2 -холінорецепторів, мають спільні амінокислотні залишки: це три залишки тирозину (148, 506 і 529). Такі дані вказують на те, що взаємодія наночастинок TiO_2 з рецепторами M_3 -типу може спричиняти перебудови у структурі цих рецепторів, сприятливі для їх активації. Також можна передбачити, що відмінності у ефектах TiO_2 , пов'язаних з активацією різних типів холінорецепторів (фазні і тонічні компоненти ацетилхолін-викликаних скорочень), принаймні частково обумовлюються відмінностями молекулярних механізмів взаємодії цих наночастинок з білками рецепторів [512, 527].

У наступній серії експериментів нами було проведено аналіз ймовірних сайтів взаємодії нано- TiO_2 з позаклітинною частиною мономеру GAMK_{B1a} гетеродимерного GAMK_B -рецептора. За допомогою веб-серверу PatchDock було виявлено чотири сайти зв'язування нано- TiO_2 і GAMK_{B1a} з гарними показниками спорідненості *geometric shape complementarity score* (відповідно, 12562, 10746, 10370 та 10204) і площі контактної поверхні *Area* (відповідно, Area 1949.80, 1273.20, 1261.10 та 1170.30 Å²) (Рис. 5.31).

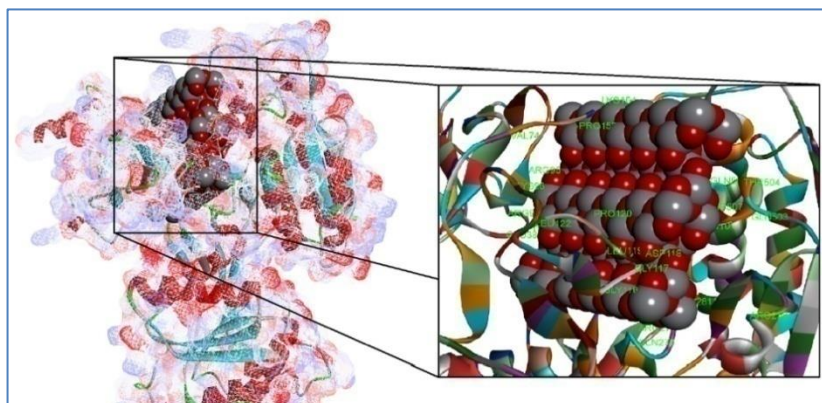
Сайт GAMK_{B1a} з найвищою спорідненістю до анатазу TiO_2 (Рис. 5.340 А) сформований 31 амінокислотним залишком (Trp37, Glu38, Val74, Thr92, Arg95, Cys96, Arg98, Gly116, Gly117, Asp118, Leu119, Pro120, Leu122, Pro153, Lys154, Pro155, His156, Arg258, Arg277, Gln278, Pro281, Gln503,

Thr504, Asp507, Gln508, Tyr510, Arg511, Asn514, Asp528, Ala529, Ser530). Варто відзначити присутність у цьому сайті великої кількості залишків позитивно заряджених діаміномонокарбонових (Arg95, Arg9, Lys154, His156, Arg258, Arg277, Arg511) і негативно заряджених моноамінодикарбонових (Glu38, Asp118, Asp507, Asp528) амінокислот; це, ймовірно, свідчить про значний внесок електростатичних взаємодій у стабілізацію нано-TiO₂ на поверхні рецептора. Можна передбачити, що крім електростатичних взаємодій між ГАМК_{B1a}-рецептором і наночастинкою суттєвий внесок роблять водневі зв'язки за рахунок полярних незаряджених амінокислотних залишків: Thr92, Cys96, Gln278, Gln503, Thr504, Gln508, Tyr510, Asn514 і Ser530. Також у переліку амінокислот, які формують сайт взаємодії з нано-TiO₂, присутні гідрофобні залишки: Val74, Gly116, Gly117, Leu119, Pro120, Leu122, Pro153, Lys154, Pro155, Pro281 і Ala529.

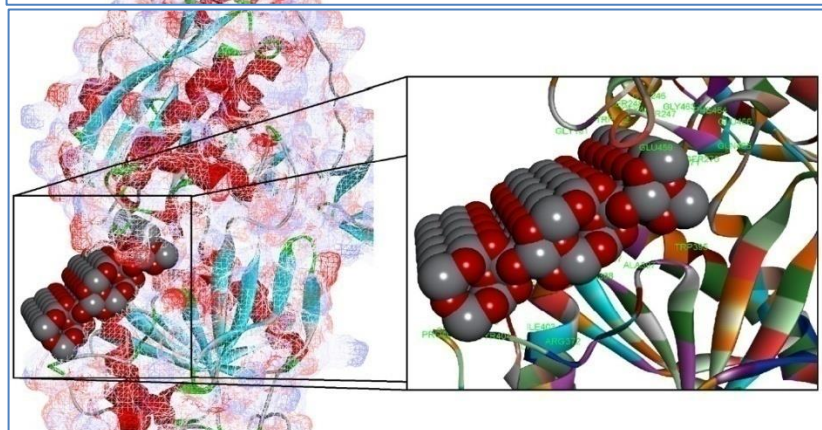
Сайт ГАМК_{B1a}-рецептора з дещо меншою спорідненістю до нано-TiO₂ (Рис. 5.30 Б) утворений 29 амінокислотними залишками: Gly181, Trp182, Cys246, Ser247, Ser248, Ser270, Ser271, Gln314, Thr316, Val318, Ser345, Tyr367, Glu368, Thr369, Arg372, Lys373, Trp395, Ala397, Ile403, Tyr404, Asp405, Pro406, Ser407, Glu459, Gly462, Gly463, Phe464, Gln465, Glu466. У даному випадку внесок електростатичних взаємодій в утримання наночастинки відносно слабкий і забезпечується двома діаміномоновими (Arg372 і Lys373) та чотирма моноамінодикарбоновими (Glu368, Asp405, Glu459 і Glu466) амінокислотними залишками. Ймовірно, значний внесок у формування контакту відіграють водневі зв'язки за участі полярних незаряджених амінокислотних залишків: Cys246, Ser247, Ser248, Ser270, Ser271, Gln314, Thr316, Ser345, Tyr367, Thr369, Tyr404, Ser407, Gln465. Можна передбачити деякий внесок гідрофобних взаємодій (Gly181, Trp182, Val318, Trp395, Ala397, Ile403, Pro406, Gly462, Gly463 і Phe464).

На третьому місці за величиною спорідненості до нано-TiO₂ сайт ГАМК_{B1a}-рецептора утворений 23 амінокислотними залишками: Tyr171,

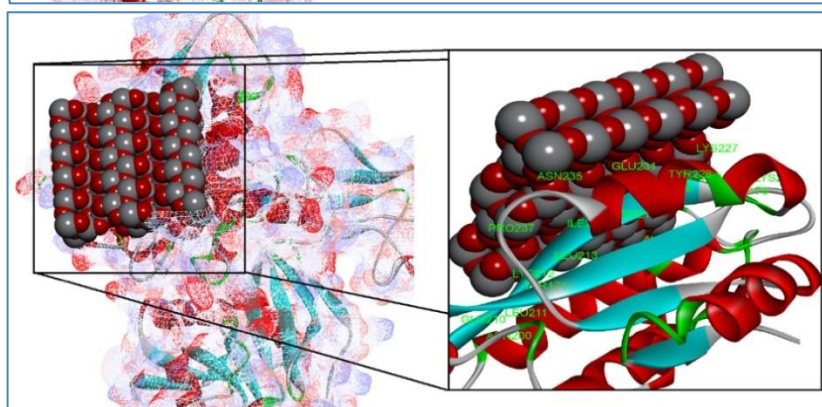
А



Б



В



Г

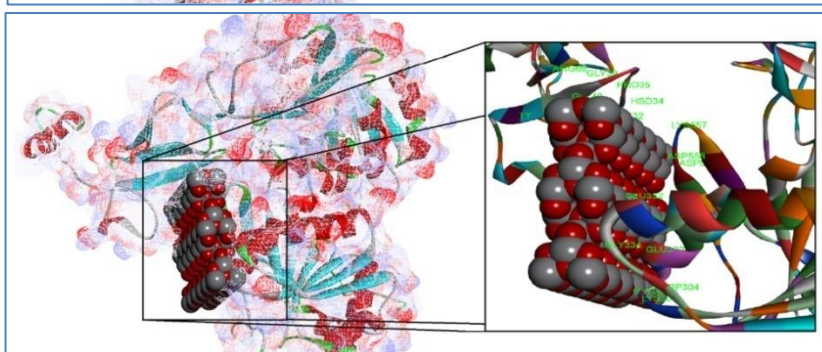


Рис. 5.31. Докінг нано- TiO_2 (анатаз) з позаклітинним доменом субодиниці GAMK_{B1a} GAMK_{B} -рецептора: А-Г – чотири передбачені сайти зв'язування (параметри: Score = 12562, 10746, 10370 і 10204, Area = 1949,80; 1273,20; 1261,10 та 1170,30 $\text{\AA}^2$, ACE = 362,92; 173,93; 340,63 і 224,61); дані веб-серверу PatchDock.

Met178, Gln189, Pro190, Glu193, Asn200, Glu210, Leu211, Lys212, Leu213, Ile214, His215, His216, Asp217, Lys219, Lys227, Tyr228, Glu231, Asn235, Pro237, Arg453, Leu454, Arg456 (Рис. 5.34 В). Як видно з цього переліку, для цього сайту суттєву роль відіграють електростатичні взаємодії за участі діаміномонокарбонових (Lys212, His215, His216, Lys219, Lys227, Arg453 і Arg456) та моноамінодикарбонових (Glu193, Glu210, Asp217 і Glu231) амінокислот. Можна передбачити, що деякий внесок у стабілізацію контакту вносять водневі зв'язки від залишків полярних незаряджених амінокислот (Met178, Gln189, Asn200 і Asn235), а також гідрофобні взаємодії (Tyr171, Pro190, Leu211, Lys212, Leu213, Ile214, Tyr228 і Leu454).

Четвертий передбачений нами сайт взаємодії ГАМК_{Blα}-рецептора з нано-TiO₂ також був утворений 23 амінокислотними залишками: Ile32, His34, Pro35, Gly39, Gly40, Ile41, Tyr43, Ala53, Asn55, Arg68, Lys299, Glu302, Lys303, Trp304, Gly305, Lys307, Glu332, Ala333, Gly334, Lys557, Asp558, Asp559, Trp562. Суттєвий внесок електростатичних взаємодій у його формування забезпечують діаміномонокарбонові (His34, Arg68, Lys299, Lys303, Lys307, Lys557) та моноамінодикарбонові (Glu302, Glu332, Asp558 і Asp559) амінокислоти. Здатна формувати водневі зв'язки лише одна амінокислота (Asn55), тоді які інші з переліку здатні формувати гідрофобні контакти.

* * * * *

У даному розділі представлені результати досліджень, направлених на встановлено закономірності та розкриття окремих механізмів дії на ГМ травного тракту НЧ TiO₂ трьох розмірних груп, які крім того являли собою різні співвідношення сумішей поліморфів рутилу і анатазу: 1-3 нм (рутил), 4-8 нм (анатаз) та 21±5 нм (співвідношення рутил:анатаз=1:4).

1. Встановлено, що суспензії НЧ TiO₂ трьох розмірних груп, які містять різні співвідношення сумішей поліморфів рутилу і анатазу: 1-3 нм (рутил), 4-8 нм (анатаз) та 21 нм (співвідношення рутил:анатаз=1:4) за

умов некумулятивної ($5 \cdot 10^{-2}$, 10^{-5} мг/мл) та кумулятивної дії (10^{-7} – 10^{-4} мг/мл), є ефективними модуляторами спонтанної і викликанної скорочувальної активності вісцеральних ГМ. Зокрема, TiO_2 модулює пресинаптичні і постсинаптичні механізми регуляції скорочення гладеньких м'язів ШКТ за участі ацетилхолінових, гістамінових, а також ГАМК-рецепторів. Дослідженнями *in silico* передбачені сайти взаємодії наночастинок TiO_2 з позаклітинною частиною метаботропних ГАМК_B- та M_2 - і M_3 - ацетилхолінових рецепторів.

2. Показано відсутність впливу НЧ TiO_2 на процеси спряження збудження-скорочення, які індукуються ендogenousним ацетилхоліном за умови активації його вивільнення деполяризацією тканини ГМ. Водночас виявлено модуляцію цим наноматеріалом скорочень, активованих екзогенним ацетилхоліном та пригнічення їх тонічної складової агоністом іонотропних ацетилхолінових рецепторів ніотином.
3. Виявлено, що попереднє блокування Ca^{2+} -каналів L-типу у значній мірі усуває активаційний ефект високими концентраціями TiO_2 ацетилхолінових скорочень, що вказує на індуковану НЧ активацію надходження іонів Ca^{2+} через ці канали.
4. Встановлено, що блокування роботи дихального ланцюга мітохондрій усуває ефекти TiO_2 на ацетилхолін-викликані скорочення ГМ шлунку. У м'язах міометрія TiO_2 усуває ефекти блокування АТФ-чутливих K^{+} -каналів, тож мішенню дії TiO_2 є енерго/АТФ-залежні процеси в міоцитах.

Результати, викладені у розділі, опубліковані у наступних роботах: [436, 511, 512, 513, 524, 527].

РОЗДІЛ 6

ФАРМАКОМЕХАНІЧНІ ЕФЕКТИ НАНОРОЗМІРНОГО МАТЕРІАЛУ ДІОКСИДУ ТИТАНУ НА ВІСЦЕРАЛЬНІ ГЛАДЕНЬКІ М'ЯЗИ ПРИ ЙОГО ТРИВАЛОМУ ВВЕДЕННІ В ОРГАНІЗМ

Численними дослідженнями *in vivo* показано, що НЧ TiO_2 здатні проникати в організм декількома шляхами: інтрадермально, через дихальні шляхи, через травний тракт, а також при інтравенозному ін'єктуванні; втім, на тепер доведено, що мікро- і нанофрагменти TiO_2 з'являються в організмі людей з артроімплантами внаслідок їх часткового руйнування в процесі експлуатації [363]. При інтрагастральному введенні НЧ TiO_2 здатні транслокуватись через епітелій тонкого і товстого кишечника. При гострому та субхронічному введенні, за даними Guo і колег [364], наночастинки діоксиду титану викликають порушення бар'єрної функції ендотелію тонкого кишечника, зменшуючи абсорбтивні клітини мікроворсинок та пригнічуючи їх ензиматичну активність.

У попередньому розділі нами було встановлено закономірності та розкрито механізми дії на ГМ травного тракту НЧ TiO_2 трьох розмірних груп, які крім того являли собою різні співвідношення сумішей поліморфів рутилу і анатазу. Подальші дослідження, результати яких наведені в даному розділі, стосувались вивчення накопичення та розвитку впливу цих НЧ (для проведення експериментів було обрано найбільш промислово поширені частинки з розміром 21 ± 5 нм, фотокаталітичний стандарт P25, співвідношення рутил:анатаз=1:4) при їх тривалому (30 діб і 100 діб) інтрагастральному введенні, на вісцеральні ГМ (шлунку, товстого кишечника і міометрія).

Для проведення досліджень ефектів наноматеріалу TiO_2 за умов навантаження організму *in vivo* нами було обрано частинки з середнім розміром 21 нм. Щоденна доза для інтрагастрального введення становила 0,1

мг/кг маси тварин; вона відповідає середньодобовому надходженню TiO_2 з харчовими продуктами у Великій Британії [391].

Отже, у даному розділі було вирішено наступні задачі:

- ~ досліджено закономірності накопичення в різних тканинах і органах щурів НЧ TiO_2 з розміром 21 нм (фотокаталітичний стандарт P25, співвідношення рутил:анатаз=1:4) в умовах *in vivo* навантаження організму НЧ впродовж 30 діб;
- ~ встановлено закономірності модуляції спонтанної і викликанної скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів щурів в умовах тривалого (30 діб та 100 діб) *in vivo* навантаження організму НЧ TiO_2 ;
- ~ розкрито окремі механізми впливу наночастинок TiO_2 з розміром 21 нм (фотокаталітичний стандарт P25, співвідношення рутил:анатаз=1:4) в умовах тривалої (30 діб і 100 діб) дії *in vivo*, на функціонування вісцеральних ГМ.

6.1. Встановлення закономірностей накопичення наночастинок TiO_2 в організмі щурів за дії *in vivo*

З метою визначення закономірностей надходження, розподілу та накопичення в різних органах і тканинах наноматеріалу TiO_2 , нами було проведено елементний аналіз мікро- та макро-елементів у тканинах щурів, навантажених суспензією нанорозмірного матеріалу TiO_2 (середній розмір часток 21 нм, співвідношення рутил:анатаз=1:4) (концентрація в суспензії 0,1 мг/мл) впродовж 30 діб (при вазі щурів (170 ± 6) г та за умови середньодобового споживання однією твариною суспензії TiO_2 в об'ємі 22 мл). Керуючись дизайном досліджень Kreyling W.G. і колег [528], для дослідження вилучали зразки легень, нирки, печінки, матки, а також вільних від слизової оболонки ГМ шлунку і сліпої кишки.

Було встановлено, що за умов інтрагастрального введення НЧ TiO_2 проникають в тканини тварин та нерівномірно накопичуються в різних

органах (табл. 6.1). Варто відзначити, що найбільшу кількість Ті акумулювати тканини вісцеральних ГМ та нирок. Так, найвищу питому концентрацію (у середньому 11,15 мг/кг ваги тканини) титану серед досліджених зразків детектували в тканині ГМ шлунку. На другому місці за накопиченням титану були тканини товстого кишечника (3,97 мг/кг). Досить високий вміст згаданого елементу було ідентифіковано у зразках, отриманих з матки і нирок; також зафіксована наявність Ті у легенях та печінці, але в значно менших концентраціях.

Значне накопичення Ті у ГМ шлунку і товстого кишечника є цілком закономірним процесом, з огляду на тривале знаходження TiO_2 разом з харчовими масами в порожнинах травного тракту. Підвищений вміст цього елементу в нирках дозволяє передбачити, що наночастинки TiO_2 , проникаючи в судинне русло організму розносяться з кровотоком, накопичуючись при фільтрації в тканині ниркових каналців та здатні до часткової екскреції з сечею.

Таблиця 6.1.

Результати елементного аналізу з вмісту Ті у зразках тканин і органів щурів, за умов інтрагастрального введення впродовж 30 діб суспензії нанорозмірного матеріалу TiO_2 (середній розмір часток 21 нм, концентрація суспензії 0,1 мг/мл)

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

За результатами елементного аналізу наших досліджень тканини легень і печінки містили відносно невелику і подібну кількість Ті. Як свідчать результати Geraets L. і колег [529], токсикокінетика розподілу TiO_2 в

організмі щурів така: початково (протягом першої доби після надходження в організм) ці НЧ вибірково накопичуються в печінці (практично повністю), нирках і легенях; надалі НЧ досить швидко перерозподіляються в інших тканинах і органах.

Цікаві і показові результати, отримані нами свідчать, що значна кількість Ti накопичується в тканині матки. Результати нашого дослідження узгоджуються з даними Kreyling W.G. і колег [528], якими було виявлено, що накопичення наночастинок титану (внаслідок інтрагастрального вживання наночастинок TiO_2 протягом 7 діб) серед досліджених тканин формувало ряд: печінка < легені < нирки < мозок < підшлункова залоза < матка < кістки скелету; тобто порівняно з іншими дослідженими м'якими тканинами матка накопичувала максимальну кількість наноматеріалу; також ці автори встановили, що головним шляхом виведення TiO_2 з організму є ШКТ. Також за даними Stapleton P.A. і колег [530] у випадку інгалятивного потрапляння нано TiO_2 (з фізико-хімічними параметрами наноматеріалу аналогічними до використаного нами) в організм самиць щурів спостерігається індуковане НЧ порушення мітохондріального дихання в тканинах міокарду і міометрія. Загалом натеper накопичений достатній масив даних, щоб стверджувати про накопичення TiO_2 у тканинах репродуктивних органів та індуковані ним зміни на клітинному рівні, які призводять до порушень гормонального балансу і репродуктивної функції, а також індукують патології плоду під час вагітності [531].

Таким чином, отримані нами результати елементного аналізу з визначення накопичення НЧ TiO_2 свідчать, що в умовах нетривалого, але рівноважного їх надходження в організм, головним чином вони накопичуються в тканинах вісцеральних ГМ [513, 524].

6.2. Модуляція термодинамічних параметрів вискоеластичної деформації м'язів антрального відділу шлунку за дії TiO_2 в умовах *in vivo*

Нами було досліджено термодинамічні властивості гладеньком'язової тканини антрального відділу шлунку, за умови тривалої дії нанорозмірного

матеріалу TiO_2 на організм щурів (упродовж 30 діб). Встановлено окремі відмінності параметрів кривої гістерезису відносно даних контрольної групи: значення силової константи k_1 було достовірно підвищеним практично на усьому діапазоні досліджених температур крім діапазону помірною охолодження (22-28 °C); у випадку константи k_2 спостерігалось відносно варіювання показників (підвищення константи мало місце при 22, 31, 34, 43 і 48 °C). Як і у випадку контрольних значень, температурна залежність силових констант не мала чітко виражених екстремумів. Пов'язані з силовими константами показники сили, яка спричиняє напівмаксимальну деформацію ГМ (при навантаженні та розвантаженні) $P_{1/2}$ у випадку м'язів тварин, оброблених TiO_2 , загалом мали аналогічні до контрольних тренди температурних залежностей [421, 425, 448].

У випадку параметра площі петлі гістерезису ($\Delta\Theta$) гладеньких м'язів шлунку щурів, оброблених TiO_2 , також загалом спостерігалось збільшення цього параметра (особливо за знижених температур 22-25 °C) (Рис. 6.1 А).

Абсолютні значення показника напівмаксимальної роботи за дії TiO_2 були суттєво збільшені за низьких температур (22-28 °C); на всьому іншому температурному діапазоні (31-48 °C) $A_{1/2\max}$ було на рівні контролю (Рис 6.1 Б).

Із застосуванням рівняння Віганда-Снайдера для аналізу термодинамічних ефектів при навантаженні ГМ було встановлено, що при малих деформаціях ($\Delta L/L_{\pi} \approx 20\%$) ГМ після дії TiO_2 поведуть себе аналогічно до контрольних м'язів: зміна внутрішньої енергії dU на одиницю довжини смужки ΔL є величиною постійною та позитивною ($\approx 4,2$ мН, що є дещо меншим, ніж у контролі) (Рис. 6.2). Також деформація ГМ не впливає на показник зміни ентропії ΔS системи на одиницю довжини ГМ ΔL (Табл. 6.2).

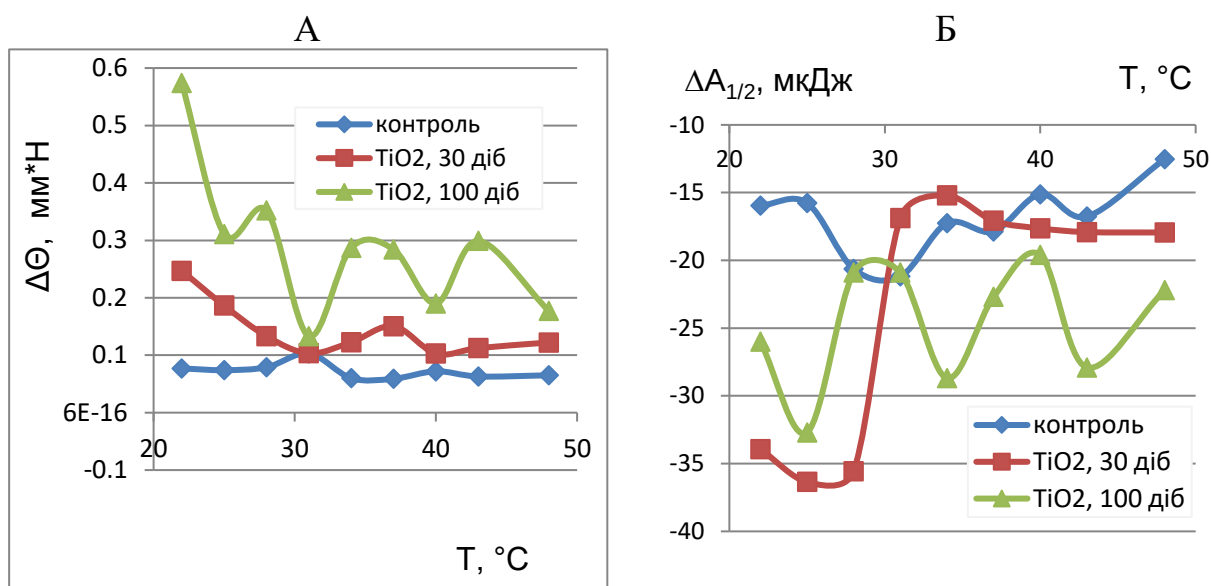


Рис. 6.1 Зміна термодинамічних параметрів високоеластичної деформації кільцевих ГМ *antrum* щурів за дії TiO₂ в умовах *in vivo* (упродовж 30 і 100 діб): А – площа петлі гістерезису ($\Delta\Theta$, $\text{мм}\cdot\text{H}$), Б – напівмаксимальна робота ($\Delta A_{1/2}$, мкДж). Наведено типові тренди.

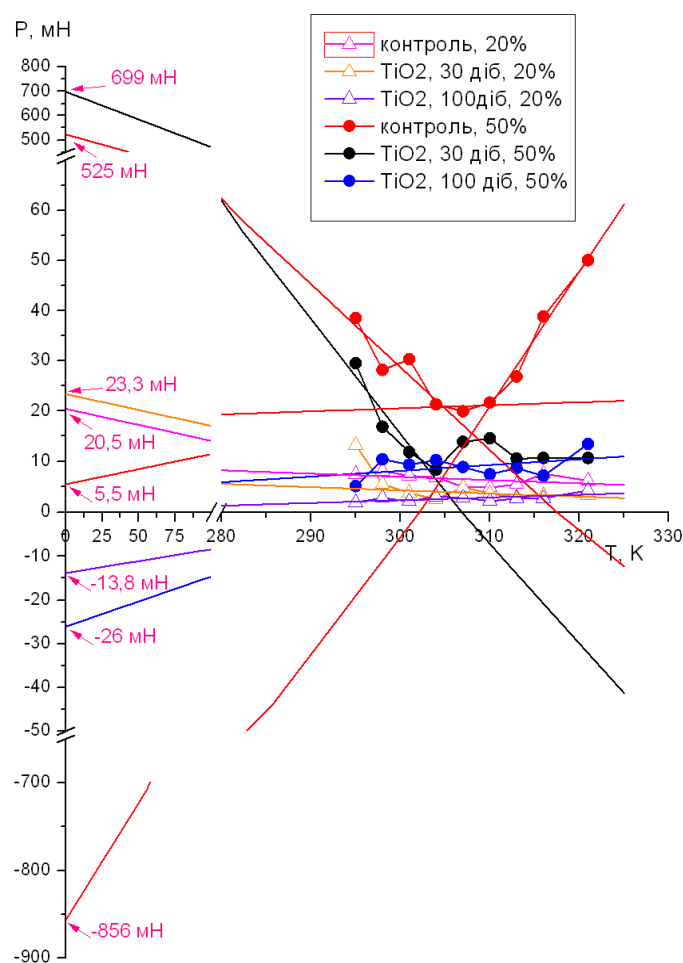


Рис. 6.2. Температурна залежність відносних деформацій ГМ *antrum* щурів та її інтерпретація відносно рівняння Віганда-Снайдера (3.22) у контролі та за дії TiO₂ в умовах *in vivo* (упродовж 30 і 100 діб).

Разом з тим, при суттєвих деформаціях ($\Delta L/L_p \approx 50\%$) термодинамічні ефекти після дії TiO_2 відрізняються від контрольних. Так, порівняно з контролю, при дії TiO_2 на тлі низьких температур ($< 28^\circ\text{C}$) зміна внутрішньої енергії на одиницю зміни довжини ΔL є позитивною ($(\partial U / \partial \Delta L)_T \approx 1924 \text{ мН} > 0$) та перевищує контрольний показник у понад 3,5 рази. За температур $> 28^\circ\text{C}$ тангенс кута нахилу температурної залежності сили P є від'ємним ($\approx -3,8 \text{ мН}$), тобто за цих умов при розтягуванні величина зміни ентропії ΔS на одиницю зміни довжини ΔL ГМ знижується ($(\partial S / \partial \Delta L)_T < 0$) (Рис. 6.2, табл. 6.2). Тож за дії TiO_2 в умовах великих навантажень (на відміну від контролю) відсутній інтервал температур, для якого б не була характерною зміна $(\partial S / \partial \Delta L)_T$ (табл. 6.2) [454].

Таблиця 6.2

Термодинамічні ефекти (за температурного діапазону $22\text{--}48^\circ\text{C}$), що супроводжують вискоеластичну деформацію ГМ *antrum* щурів (за дії TiO_2 в умовах *in vivo* впродовж 30 і 100 діб) в умовах малих і великих деформацій (згідно з рівнянням Віганда-Снайдера (3.22))

Відносна деформація м'язів		Температура, $^\circ\text{C}$	Напрямок зміни вільної енергії ΔU	Напрямок зміни ентропії ΔS
Малі деформації ($\Delta L/L_p \approx 20\%$)	контроль	22 – 48	$(\partial U / \partial \Delta L)_T = \text{const} > 0$	$(\partial S / \partial \Delta L)_T \approx 0$
	TiO_2 , 30 діб	22 – 48	$(\partial U / \partial \Delta L)_T = \text{const} > 0$	$(\partial S / \partial \Delta L)_T \approx 0$
	TiO_2 , 100 діб	22 – 48	$(\partial U / \partial \Delta L)_T = \text{const} > 0$	$(\partial S / \partial \Delta L)_T \approx 0$
Великі деформації ($\Delta L/L_p \approx 50\%$)	контроль	< 30	$(\partial U / \partial \Delta L)_T > 0$	$(\partial S / \partial \Delta L)_T > 0$
		31 – 37	$(\partial U / \partial \Delta L)_T = \text{const} > 0$	$(\partial S / \partial \Delta L)_T = 0$
		> 37	$(\partial U / \partial \Delta L)_T < 0$	$(\partial S / \partial \Delta L)_T < 0$
	TiO_2 , 30 діб	< 28	$(\partial U / \partial \Delta L)_T > 0$	$(\partial S / \partial \Delta L)_T > 0$
		28 – 48	$(\partial U / \partial \Delta L)_T < 0$	$(\partial S / \partial \Delta L)_T < 0$
	TiO_2 , 100 діб	22 – 48	$(\partial U / \partial \Delta L)_T = \text{const} < 0$	$(\partial S / \partial \Delta L)_T \approx 0$

6.3. Спонтанна скорочувальна активність вісцеральних гладеньких м'язів щурів в умовах різної тривалості дії *in vivo* наночастинок TiO_2

Оскільки, як свідчать дані наших досліджень (п. 6.1), у тканинах вісцеральних ГМ суттєво накопичуються наночастинок TiO_2 , це може позначитись на їх моториці. Тому наші подальші експерименти були спрямовані на вивчення спонтанних і викликаних скорочень м'язів шлунку, товстого кишечника та міометрія, після тривалого (30 діб і 100 діб) інтрагастрального введення суспензії наночастинок TiO_2 з розміром 21 ± 5 нм (співвідношення рутил:анатаз=1:4) у кількості 0,1 мг/кг ваги тіла.

У випадку спонтанної скорочувальної активності кільцевих ГМ *саесит* щурів (група 2), які упродовж 30 діб вживали суспензію TiO_2 , спостерігались суттєві частотно-амплітудні зміни порівняно з контролем (група 1) (Рис. 6.3.). Так, мало місце значне збільшення частоти і практично повне пригнічення амплітуди (у середньому на 75,0% та на 68,6% відповідно). Також ці зміни суттєво позначились на показниках окремих спонтанних скорочень та загальної ефективності моторики (табл. 6.3.). Зокрема, тривалість поодиноких циклів «скорочення-розслаблення» зменшувалась втричі, як і тривалість фази скорочення, а тривалість фази розслаблення – майже в п'ять разів. Варто відзначити, що за цих умов також драматично знижувалась сумарна ефективність скорочувальної активності ГМ товстого кишечника, що відобразилось на зниженні показників скоротливих індексів; зокрема скоротливий індекс, який виражався в Олександрійських одиницях зменшувався щодо контролю майже у шість разів.

Вживання щурами суспензії TiO_2 упродовж 100 діб (група 3), супроводжувалось частковим відновленням ефективності спонтанної скорочувальної активності ГМ *саесит* порівняно з даними групи 2 (Рис. 6.3.). Так, хоча частота спонтанних скорочень надалі збільшувалась і спостерігалось подальше пригнічення амплітуди скорочень (табл. 6.3.), показник скоротливого індексу в Олександрійських одиницях зростав щодо

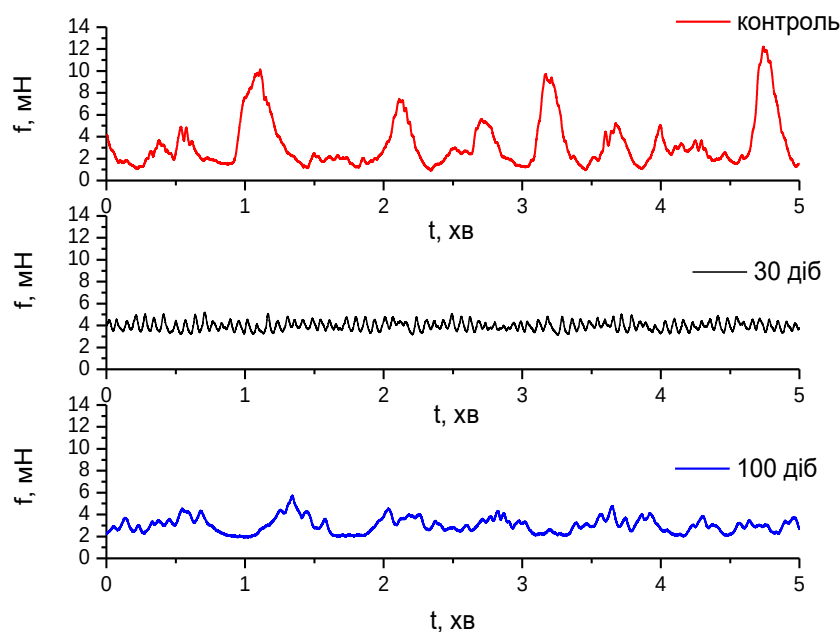


Рис. 6.3. Спонтанна скорочувальна активність кільцевих ГМ *саесит* щурів контрольної групи (контроль) та груп щурів, навантажених суспензією TiO_2 (середній розмір частинок 21 нм (співвідношення рутил:анатаз=1:4) упродовж 30 діб (1 місяць) та 100 діб (3,5 місяці). Наведено типові механограми.

Таблиця 6.3.

Кінетичні параметри спонтанних скорочень кільцевих ГМ *саесит* щурів контрольної групи, а також навантажених суспензією TiO_2 (21 нм, рутил:анатаз=1:4) упродовж 30 діб (група 2) та 100 діб (група 3), $n=12$;

Параметр спонтанних скорочень	Контроль	Група 2	Група 3
Кількість скорочень/10 хв.	$44 \pm 1,8$	$77,0 \pm 5,8^*$	$90,0 \pm 7,9^*$
Амплітуда, мН	$3,53 \pm 0,36$	$1,11 \pm 0,09^*$	$0,8 \pm 0,1^*$
Тривалість циклу скорочення-розслаблення, с.	$12,5 \pm 0,7$	$3,4 \pm 0,5^*$	$6,8 \pm 0,54^*$
Тривалість фази скорочення, с.	$5,2 \pm 0,4$	$1,49 \pm 0,1^*$	$3,2 \pm 0,2^*$
Тривалість фази розслаблення, с.	$6,95 \pm 0,4$	$1,91 \pm 0,04^*$	$3,6 \pm 0,12^*$
Коефіцієнт асиметрії	$1,20 \pm 0,07$	$0,87 \pm 0,06^*$	$1,4 \pm 0,1$
Середня швидкість наростання сили фази скорочення ($f_{\max}/t$), мН/хв.	$53,53 \pm 8,56$	$44,7 \pm 4,2$	$20,9 \pm 1,7^*$
Середня швидкість спаду сили фази розслаблення ($f_{\max}/t$), мН/хв.	$49,83 \pm 8,69$	$34,9 \pm 3,1^*$	$13,3 \pm 0,8^*$
Індекс скоротливої активності в одиницях Монтевідео, ум.од.	$155,3 \pm 12,6$	$85,4 \pm 7,9^*$	$72,0 \pm 3,5^*$
Індекс скоротливої активності в Олександрійських одиницях, ум.од.	$1887,1 \pm 96,9$	$290,3 \pm 37,8^*$	$489,4 \pm 26,0^*$

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

групи 2 майже на 70% (хоча і був меншим відносно контролю у чотири рази). Також спостерігались тенденції до відновлення показників тривалості фаз скорочень і розслаблень.

Нами також було досліджено спонтанну скорочувальну активність кільцевих ГМантрального відділу шлунку щурів 2 і 3 груп. Було встановлено, що для м'язів *antrum*, як і у випадку *caecum*, є характерним зниження амплітуди і підвищення частоти спонтанних скорочень (Рис. 6.4.). Так, введення упродовж 30 діб (група 2) щурам суспензії TiO_2 супроводжувалось тенденціями до підвищення амплітуди скорочень, а їх частота достовірно збільшувалась у середньому на 54,1% (Табл. 6.4). Також для цих м'язів було характерним зменшення параметрів тривалості скоротливого циклу, фази скорочення і фази розслаблення. Варто також відзначити, що за цих умов суттєво знижувалась сумарна ефективність скорочувальної активності ГМ, що відобразилось на зниженні показників скоротливих індексів: так, скоротливий індекс, який виражався в одиницях Монтевідео, зменшувався у середньому на 45%, тоді як індекс в Олександрійських одиницях - на 64,2%.

Вживання упродовж 100 діб (група 3) суспензії TiO_2 щурами, супроводжувалось подальшим пригніченням окремих параметрів моторики гладеньких м'язів шлунка, порівняно з даними групи 2 (Рис. 6.4.). Так, хоча частота спонтанних скорочень надалі збільшувалась (майже на 60% порівняно з контролем), та спостерігалось подальше пригнічення амплітуди скорочень (табл. 6.4.). Втім, пригнічення показників скоротливих індексів у Олександрійських одиницях та одиницях Монтевідео не виявляли вірогідних відмінностей порівняно з цими показниками в групі 2. Також звертає на себе увагу зниження середніх швидкостей наростання/спаду сили фази скорочення/розслаблення: обидва показники були достовірно меншими порівняно з контролем, але особливо (у два рази) уповільнювалась фаза скорочення [524]. Такий ефект може бути пов'язаний з порушенням процесів енергонезалежного транспорту Ca^{2+} в міоцитах, та/або зі зниженням ефективності міжклітинної координації в ГМ [533-535].

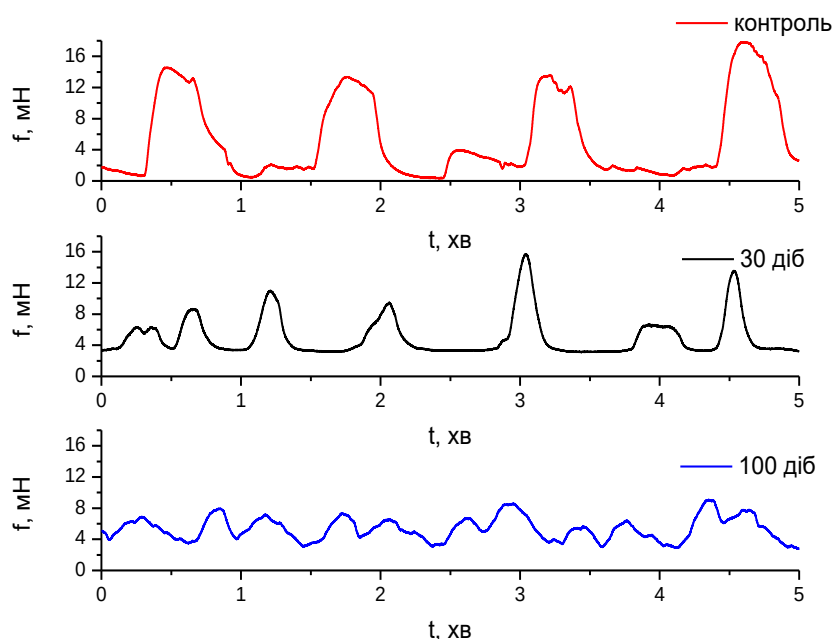


Рис. 6.4. Спонтанна скорочувальна активність кільцевих ГМ *antrum* щурів контрольної групи (контроль, група 1) та груп, навантажених TiO_2 (21 нм, рутил:анатаз=1:4) впродовж 30 діб (30 діб, група 2) та 100 діб (100 діб, група 3). Наведено типові механограми.

Таблиця 6.4.

Кінетичні параметри спонтанних скорочень кільцевих ГМ *antrum* щурів у контрольній групі 1, а також навантажених суспензією TiO_2 (21 нм, рутил:анатаз=1:4) впродовж 30 діб (група 2) та 100 діб (група 3), $n=12$

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

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

Ми можемо передбачати клітинні механізми, які лежать в основі встановлених ефектів наноматеріалу TiO_2 щодо спонтанної скорочувальної активності ГМ травного тракту. Як відомо, водіями ритму в цій тканині є ІСС, частота повільних хвиль деполяризації ПМ яких обумовлює відповідну частоту скорочень. Відомо, що початковий компонент деполяризації при генерації спонтанної хвилі пов'язаний з вивільненням іонів Ca^{2+} з ІТФ-чутливої частини СР та їх захопленням мітохондріями [536-583]. Дослідженнями наукової групи під керівництвом Satoshi Yoneda було встановлено [539, 540], що повільні хвилі деполяризації є результатом спряжених процесів: активації ПКК L-типу, вивільненням іонів Ca^{2+} з ІТФ-чутливої частини СР та їх закачуванням цих катіонів в мітохондрії. Хоча критичними ланками активації ІСС є усі вищеназвані структури, процес мобілізації Ca^{2+} з СР і перерозподіл їх в мітохондрії визначає частоту спонтанної активності (інгібується при інгібуванні ІТФ-чутливих каналів 2-аміноетоксидифеніл боратом або при інгібуванні Ca^{2+} -помпи саркоплазматичного ретикулуму циклопіазонієвою кислотою). Амплітуда скорочень визначається Ca^{2+} -залежними (і частково Ca^{2+} -залежними) процесами в робочих міоцитах. Тож можемо передбачити, що НЧ TiO_2 , проникаючи в клітини м'язової стінки травного тракту з одного боку змінюють функціонування ІСС і ГМК (з огляду на наші результати попереднього розділу, а також дані інших дослідників [534-543], ймовірно, мітохондріально-залежним шляхом), та координації між ними у тканині м'язу.

Оскільки із використання метода атомно-емісійної спектроскопії нами було виявлено значне накопичення Ті в тканині ГМ матки щурів, у наступній серії експериментів ми дослідили спонтанну скорочувальну активність цих ГМ, отриманих з тварин після тривалого (30 діб, група 2) та субхронічного (100 діб, група 3) інтрагастрального введення суспензії наночастинок TiO_2 з розміром 21 нм (співвідношення рутіл:анатаз=1:4).

Було виявлено, що тривале введення НЧ TiO_2 в організм щурів супроводжувалось змінами спонтанної скорочувальної активності ГМ міометрія (Рис. 6.5, Табл. 6.5.). Так, за цих умов відбувалось зменшення частоти (близько 30%) і суттєве зростання амплітуди скорочень (майже в 3,5 рази порівняно з контролем). Це відобразилось у значному (у понад 4,5 рази) підвищенні ефективності моторики м'язів. Що стосується кінетики фази скорочення і розслаблення, то, загалом, тривалість обох цих фрагментів зростала вдвічі, тому показник асиметрії не мав вірогідних відмінностей щодо контролю; показники середньої швидкості фаз скорочення і розслаблення збільшувались у середньому на 70% відносно контролю.

Тривале упродовж 100 діб навантаження організму щурів НЧ TiO_2 також супроводжувалось суттєвим пригніченням спонтанної скорочувальної активності ГМ матки (Табл. 6.5., Рис. 6.5). Зокрема, це виражалось у тенденціях до зменшення амплітуди скорочень та достовірного зменшення їх частоти щодо контролю. Також ці скорочення характеризувались значним збільшенням тривалості фази розслаблення, тоді як тривалість фази скорочення залишалась в межах контролю. Параметри середньої швидкості фаз скорочення і розслаблення знижувались. Також суттєво зменшувались індекси скоротливої активності в одиницях MU та AU.

Тож тривале (30 діб) і субхронічне (100 діб) навантаження організму щурів НЧ TiO_2 спричиняє неоднорідний вплив на спонтанну скорочувальну активність міометрія порівняно з часо-залежними пригніченням моторики м'язів ШКТ. Втім, як уже згадувалось, процеси активації спонтанних скорочень у цих вісцеральних м'язах суттєво різняться. Механізм активації спонтанних скорочень в міоцитах матки натепер в повній мірі не розкритий; передбачається, що за генерування ритмоактивності відповідають або Kit-негативні пейсмейкерні клітини, або самі міоцити [544]. Відомо, що до пейсмейкерних механізмів залучено процеси входу позаклітинних іонів Ca^{2+} через ПКК L- і T-типів (для T-каналів доведений зв'язок з частотою, але не

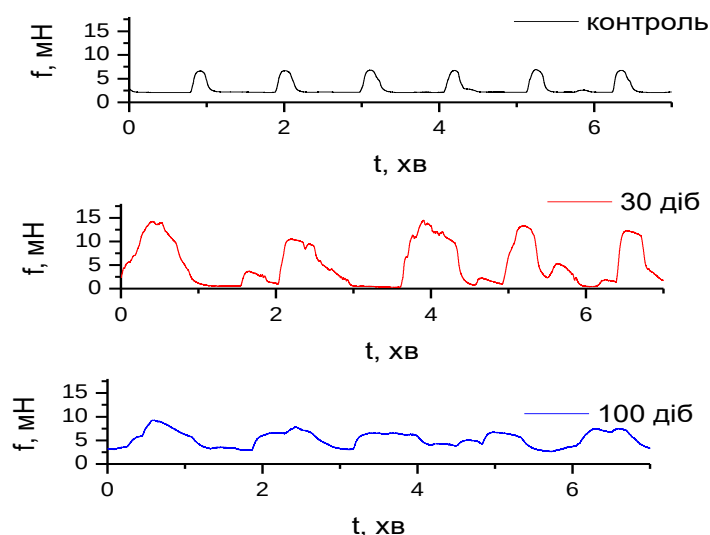


Рис. 6.5. Спонтанна скорочувальна активність міометрія щурів контрольної групи (контроль, група 1) та груп, навантажених TiO_2 (21 нм, рутил:анатаз=1:4) впродовж 30 діб (30 діб, група 2) та 100 діб (100 діб, група 3). Наведено типові механограми.

Таблиця 6.5.

Кінетичні параметри спонтанних скорочень поздовжніх ГМ міометрія щурів у контрольній групі, а також навантажених суспензією TiO_2 (21 нм, рутил:анатаз=1:4) впродовж 30 діб (група 2) та 100 діб (група 3), $n=12$

Параметр спонтанних скорочень	Контроль	Група 2	Група 3
Кількість скорочень/10 хв.	$13,0 \pm 0,7$	$9,0 \pm 0,5^*$	$8,0 \pm 0,32^*$
Амплітуда, мН	$7,2 \pm 0,6$	$24,96 \pm 2,2^*$	$6,42 \pm 4,7$
Тривалість циклу скорочення-розслаблення, с.	$47,2 \pm 1,7$	$50,1 \pm 3,0$	$34,6 \pm 2,0^*$
Тривалість пауз між скороченнями, с.	$25,2 \pm 1,0$	$22,9 \pm 1,6$	$2,0 \pm 0,12^*$
Тривалість фази скорочення, с.	$9,07 \pm 0,36$	$18,0 \pm 0,9^*$	$10,5 \pm 0,6$
Тривалість фази розслаблення, с.	$15,8 \pm 0,95$	$32,1 \pm 1,3^*$	$24,0 \pm 1,6^*$
Коефіцієнт асиметрії	$22,0 \pm 1,4$	$0,65 \pm 0,04^*$	$0,7 \pm 0,23^*$
Середня швидкість наростання сили фази скорочення ($f_{\max}/t$), мН/хв.	$0,57 \pm 0,05$	$83,2 \pm 6,7^*$	$36,7 \pm 2,5^*$
Середня швидкість спаду сили фази розслаблення ($f_{\max}/t$), мН/хв.	$47,7 \pm 3,5$	$46,7 \pm 3,1$	$16,1 \pm 1,2^*$
Індекс скоротливої активності в одиницях Монтевідео, ум.од.	$94,1 \pm 6,0$	$224,6 \pm 15,7^*$	$51,3 \pm 3,0^*$
Індекс скоротливої активності в Олександрійських одиницях, ум.од.	$2364,3 \pm 94,5$	$11254,9 \pm 562,7^*$	$1775,0 \pm 124,8^*$

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

амплітудою скорочень) [545-547], Ca^{2+} -активовані Cl^- -канали [544], а також внутрішньоклітинними депо, зокрема мітохондріями, які впливають і на амплітуду, і на частоту спонтанних скорочень [548]. Тож і молекулярні механізми ритмоактивності міометрію, і вплив на них НЧ потребують подальшого вивчення, втім, з огляду на результати наших досліджень *in vitro*, не можна виключити, що модуляція спонтанних скорочень в умовах тривалої і хронічної дії нанорозмірного матеріалу TiO_2 пов'язана з їх АФК-опосередкованим порушенням функціонування мітохондрій [511].

6.4. Викликана скорочувальна активність вісцеральних гладеньких м'язів шурів в умовах різної тривалості дії *in vivo* наночастинок TiO_2

У наступній серії експериментів нами було досліджено механокінетичні властивості індукованих гіперкалієвим розчином (80 мМ) скорочень кільцевих ГМ *саесит* шурів, після тривалого (30 діб, група 2) навантаження суспензією TiO_2 (розмір частинок 21 нм). Було встановлено, що за даних умов відбувається збільшення амплітуди фазних скорочень у середньому на $(31,8 \pm 1,8)\%$ ($n=12$, $p<0,05$) порівняно з даними контрольної групи (Рис. 6.6). Співвідношення фазного і тонічного складових K^+ -індукованих скорочень також достовірно зросло з $1,07 \pm 0,1$ ($n=12$) в контролі до $1,6 \pm 0,2$ ($n=12$, $p<0,05$). На фоні зазначених змін амплітудних параметрів, у групі 2 також спостерігались суттєві зміни кінетики скорочень. Так, нормована максимальна швидкість V_{nc} збільшувалась у понад 2.5 рази (з $(6,7 \pm 0,8) \text{ хв.}^{-1}$ у контролі до $(17 \pm 1,5) \text{ хв.}^{-1}$, $n=12$, $p<0,05$). Аналогічно, втричі зростала швидкість фази розслаблення (V_{nr}): з $(1,38 \pm 0,2) \text{ хв.}^{-1}$ у контролі до $(4,2 \pm 0,5) \text{ хв.}^{-1}$ $n=12$, $p<0,05$).

В умовах навантаження тварин суспензією TiO_2 упродовж 100 діб (група 3) спостерігалась подальша модуляція амплітудних та кінетичних характеристик гіперкалієвої контрактури *саесит*: суттєве і однорідне пригнічення амплітуди як фазного, так і тонічного компонентів. Таким

чином, фазна відповідь була заінгібована практично вдвічі порівняно з контролем ($53,3 \pm 3,6\%$), $n = 12$, $p < 0,05$), а співвідношення фазного і тонічного компонентів знаходилось в межах контрольних значень (Рис. 6.3.). Із застосуванням кінетичного аналізу з'ясовано, що максимальна швидкість наростання сили (V_{nc}) не мала достовірної різниці щодо контролю, тоді як швидкість її спаду (V_{nr}) перевищувала контрольні значення вдвічі. Отже, ефект тривалих навантажень суспензією TiO_2 на гіперкалієві скорочення м'язів товстого кишечника значно залежав від часу дії *in vivo* цього ксенобіотика, змінюючись від активації до суттєвого інгібування.

На відміну від ефектів, отриманих на *saesum*, K^+ -індуковані (80 мМ) скорочення кільцевих ГМ *antrum* щурів групи 3 (100 діб навантаження суспензією TiO_2) характеризувались амплітудою на рівні контролю, а співвідношення фазної і тонічної складових цих скорочень суттєво зменшувалося (з $1,3 \pm 0,08$ в контролі до $1,05 \pm 0,05$, $n = 12$, $p < 0,05$) (Рис. 6.7.А). Разом з тим, зміни механокінетичних параметрів м'язів шлунку не були подібними до даних моторики товстого кишечника: швидкість фази розслаблення V_{nr} суттєво зростала (з $1,8 \pm 0,31$) хв.⁻¹, $n = 12$ в контролі до $(2,98 \pm 0,03)$ хв.⁻¹, $n = 12$, $p < 0,05$).

Для аналізу механізмів дії НЧ на вісцеральні ГМ в умовах *in vivo*, нами були досліджені ефекти ГАМК в умовах її кумулятивного аплікування на тонічній складовій K^+ -індукованого скорочення ГМ *antrum* (Рис. 6.7 Б-Г). При кумулятивному аплікуванні ГАМК (10^{-8} - 10^{-5} М) на тонічній складовій K^+ -викликаного скорочення на всьому діапазоні досліджених концентрацій спостерігалось зростання тонічного напруження ГМ, тоді як нерегулярні фазні коливання були відсутні. У випадку некумулятивного аплікування ГАМК (10^{-8} - 10^{-5} М) на тонічній складовій K^+ -скорочень також мало місце збільшення тонічного скорочення із виходом на плато (Рис. 6.8 А-Г).

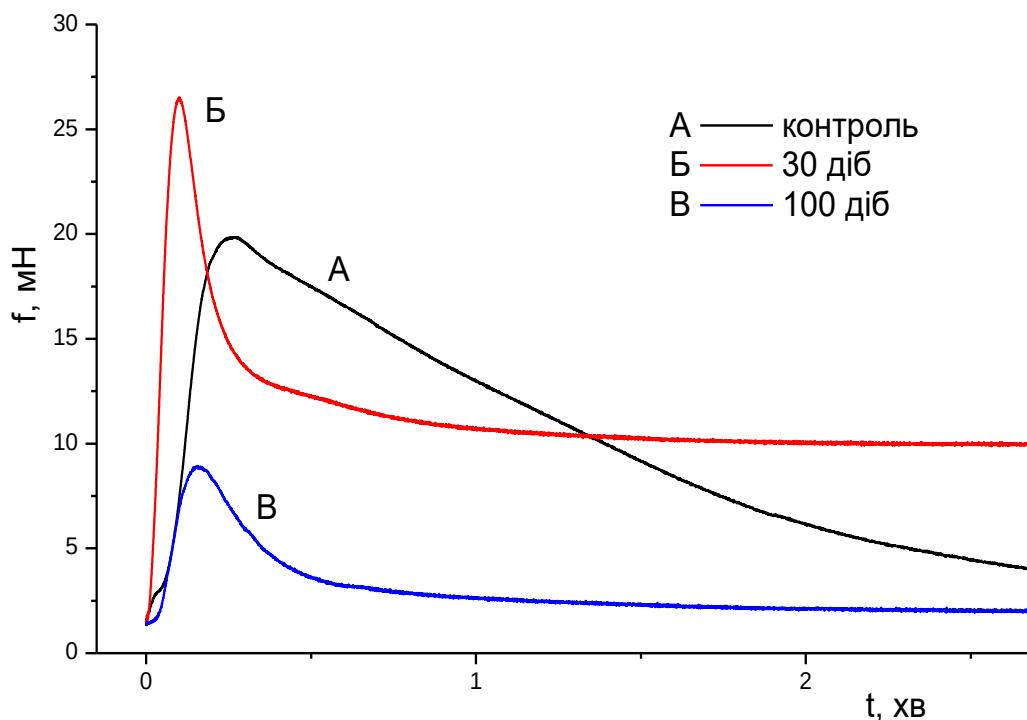


Рис.6.6. K^+ -індуковані (80 мМ) скорочення кільцевих гладеньких м'язів *saesum* щурів контрольної групи (А) та групи щурів, навантажених суспензією TiO_2 (середній розмір частинок 21 нм (співвідношення рутил:анатаз=1:4) упродовж 30 діб (Б) та 100 діб (В). Наведено типові механограми.

Таким чином, у ГМ ШКТ тривала дія TiO_2 в умовах *in vivo* супроводжувалась суттєвими змінами механокінетики розслаблення K^+ -викликаних скорочень [524]. Як відомо [549, 550], фазна складова цих скорочень переважно обумовлюється надходженням до ГМК іонів Ca^{2+} через ПКК L-типу, а їх тонічна складова являє собою наслідок сумісної дії декількох процесів: крім (1) потенціал-залежного надходження Ca^{2+} тут також мають місце (2) процеси Ca^{2+} -залежного вивільнення цих катіонів з СР; (3) механізми Ca^{2+} -залежної і Ca^{2+} -незалежної сенситизації скоротливих білків; (4) процеси, індуковані вивільненням нейромедіаторів внаслідок деполяризації інтрамуральних нейронів; (5) робота енергозалежних систем викачування з міоплазми іонів Ca^{2+} ПМ і внутрішньокілітинних депо. Тож без додаткових досліджень не можна виключити модуляцію жодного з цих процесів під дією накопиченого в умовах *in vivo* нано- TiO_2 .

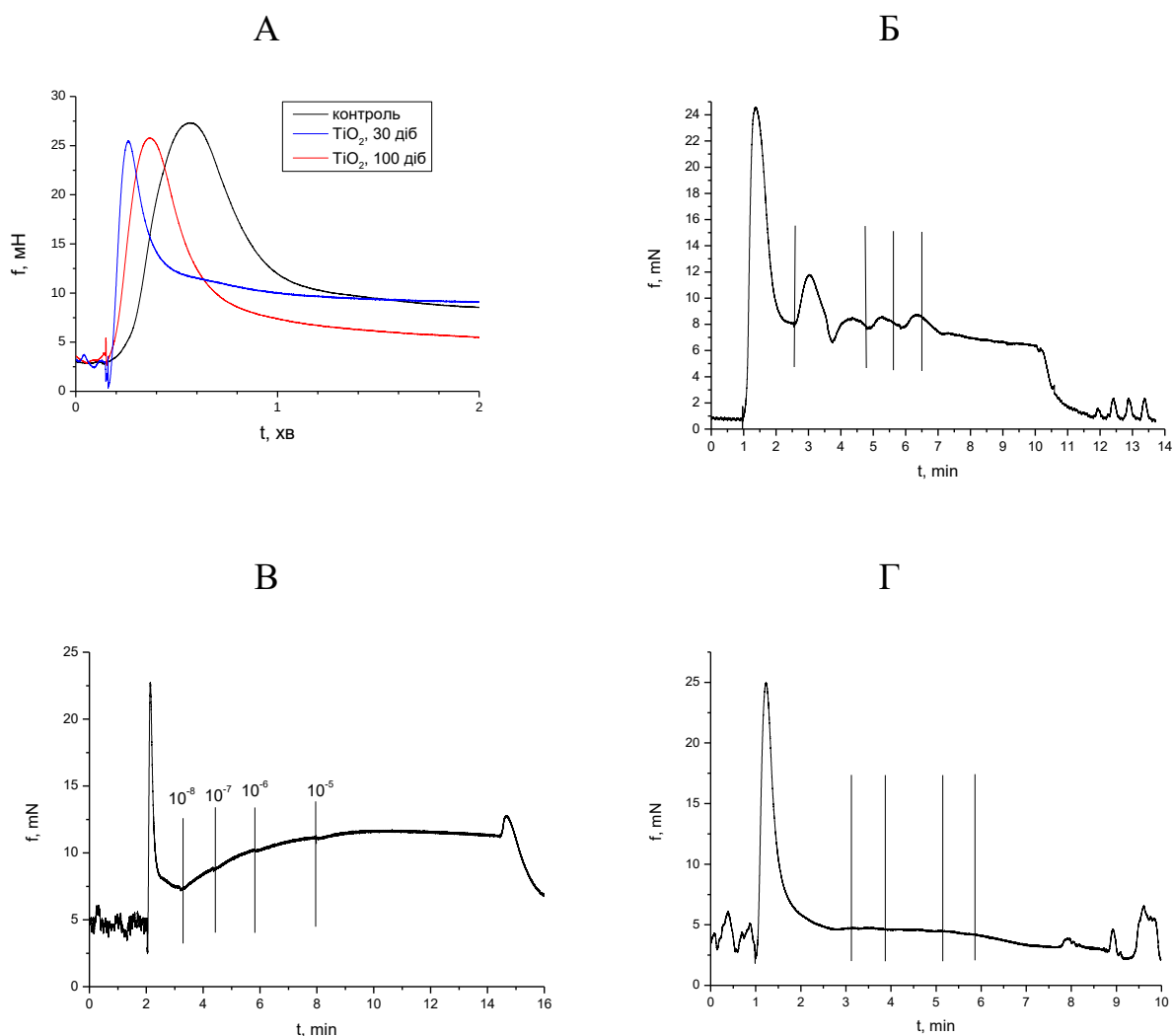


Рис.6.7 K^+ -індуковані (80 мМ) скорочення кільцевих ГМ *antrum* щурів контрольної групи (А) та щурів, навантажених суспензією TiO_2 (21 нм) упродовж 30 та 100 діб (А); ці ж скорочення при аплікації на тонічній складовій ГАМК у концентраціях 10^{-8} - 10^{-5} М (Б – контроль, В – 30 діб, Г – 100 діб). Наведено типові механограми.

Ацетилхолін-викликані скорочення. У наступній серії експериментів нами було вивчено закономірності ацетилхолін-індукованих (10^{-5} М) скорочень кільцевих ГМ товстого кишечника і шлунку щурів в умовах тривалого (30 діб і 100 діб) впливу НЧ TiO_2 (середній розмір частинок 21 нм (співвідношення рутіл:анатаз=1:4) (Рис. 6.9). Показано, що скорочення ГМ *saecum* в умовах тривалої дії TiO_2 (група 2) характеризуються суттєвим підвищенням амплітуди фазних складових (у середньому на $(70 \pm 5) \%$, $n=12$, $p<0,05$); зниженням тонічних складових, яке призвело до зменшення співвідношення фазного і тонічного складових скорочення з $(1,5 \pm 0,1)$ у

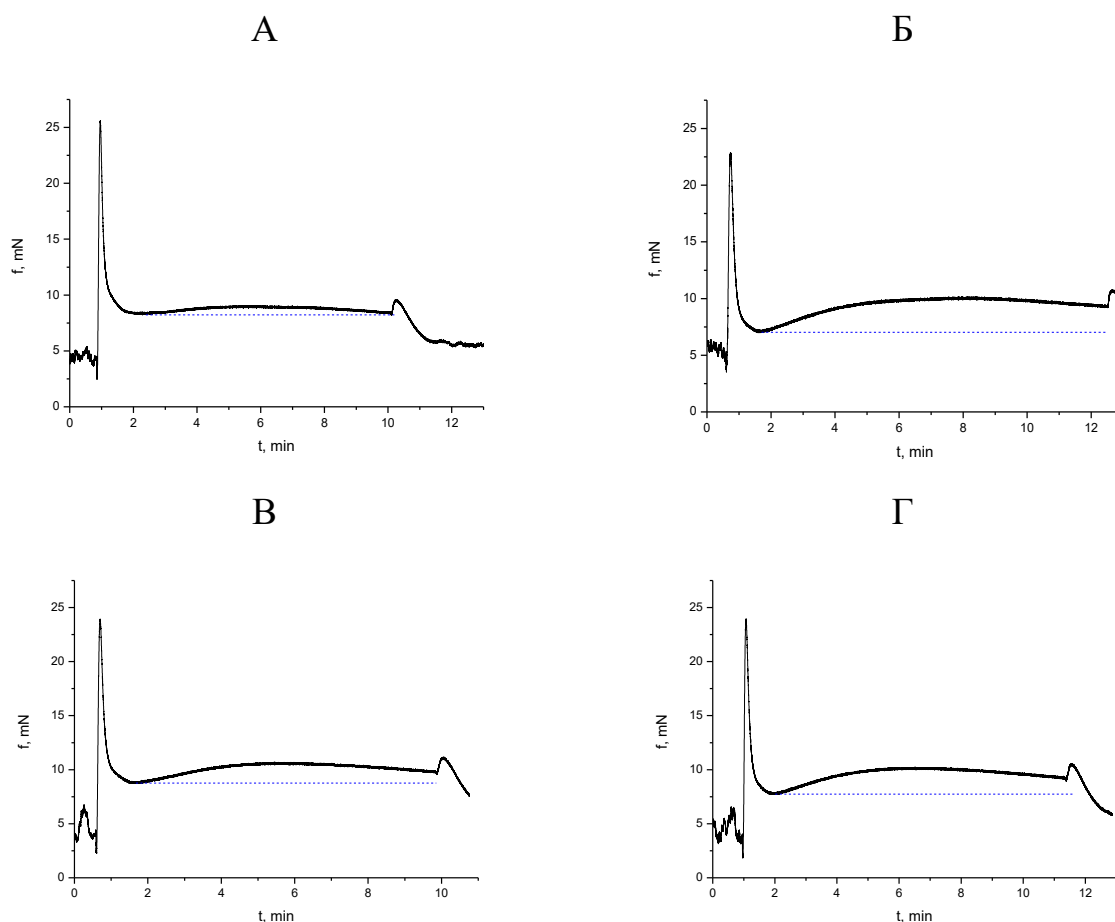


Рис. 6.8. K^+ -індуковані (80 мМ) скорочення кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів, навантажених суспензією TiO_2 (середній розмір частинок 21 нм упродовж 30 діб при некумулятивному аплікуванні на тонічний складовій γ -аміномасляної кислоти у концентраціях 10^{-8} - 10^{-5} М. Пунктирною лінією позначено рівень тонічної складової K^+ -скорочень. Наведено типові механограми.

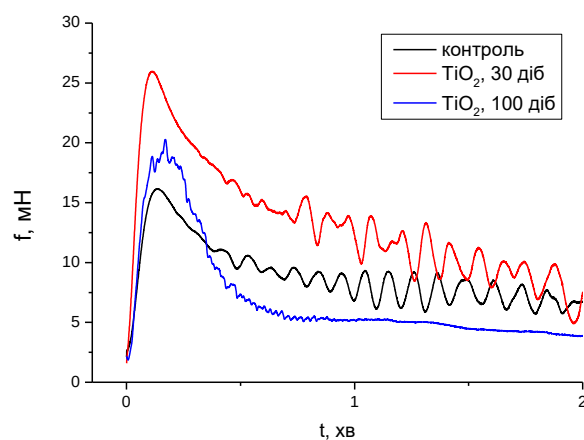


Рис. 6.9. Індуковані ацетилхоліном (10^{-5} М) скорочення кільцевих гладеньких м'язів *saecum* щурів контрольної групи та щурів, навантажених суспензією TiO_2 (середній розмір частинок 21 нм) упродовж 30 і 100 діб. Наведено типові механограми.

контролі до $(1,1 \pm 0,08)$, $n=12$, $p<0,05$ (Рис. 6.9). Нормовані максимальні швидкості V_{nc} та V_{nr} скорочень залишались на рівні контрольних значень.

Дія TiO_2 упродовж 100 діб супроводжувалась окремими змінами ацетилхолін-викликаних скорочень *saesut*. Так, за цих умов амплітуда фазного компонента залишалась на рівні контролю, тонічного – суттєво зростала (Рис. 6.9). Нормована максимальна швидкість скорочення (V_{nc}) була в межах контрольних показників, тоді як швидкість розслаблення (V_{nr}) зростала у середньому втричі. Також варто відзначити, що на тонічній складовій ацетилхолінових скорочень практично повністю були відсутні осциляції; це може бути обумовлено, зокрема, порушенням процесів вивільнення іонів Ca^{2+} з СР [111, 551].

Аналогічні дослідження ацетилхолінових скорочень були проведені на гладеньких м'язах антрального відділу шлунку. Було встановлено, що в умовах субхронічного впливу TiO_2 (група 3) ці скорочення характеризуються амплітудою фазного і тонічного компонентів на рівні контролю (Рис. 6.10.). Відповідно, також і показники нормованих максимальних швидкостей (V_{nc} і V_{nr}) залишались в межах контрольних значень цих скорочень. Як і у випадку м'язів *saesut*, спостерігалось пригнічення фазних осциляцій напруження на тонічній складовій ацетилхолінових скорочень.

γ -аміномасляна кислота (ГАМК) – нейромедіатор центральної і периферійної нервової системи. Вона синтезується ензимом L-глутаматдекарбоксилазою (L-glutamate decarboxylase, GAD), який експресується у нейронах інтрамурального нервового сплетення та в ендокрино-подібних клітинах слизової оболонки кишечника [552-554]. У інтрамуральному нервовому сплетенні ГАМК-ергічні нейрони складають 5-7% від загальної кількості; це переважно інтернейрони. ГАМК-ергічні нейрони локалізовані в Ауербаховому і підслизовому сплетеннях гладеньком'язової стінки, де вони виконують роль модулятора (активатора та інгібітора) нейрональної активності. Біологічні ефекти ГАМК опосередковуються її дією на трансмембранні рецептори, які належать до

надродини ліганд-керованих іонних каналів (ГАМК_А і ГАМК_С) та надродини метаботропних рецепторів (ГАМК_В). Метаботропні ГАМК_В рецептори спряжені з G₅-білками. У товстому кишечнику щурів ідентифіковано рецептори до ГАМК двох типів: бікукулін-чутливі ГАМК_А-рецептори і факлофен-чутливі ГАМК_В-рецептори [553, 554].

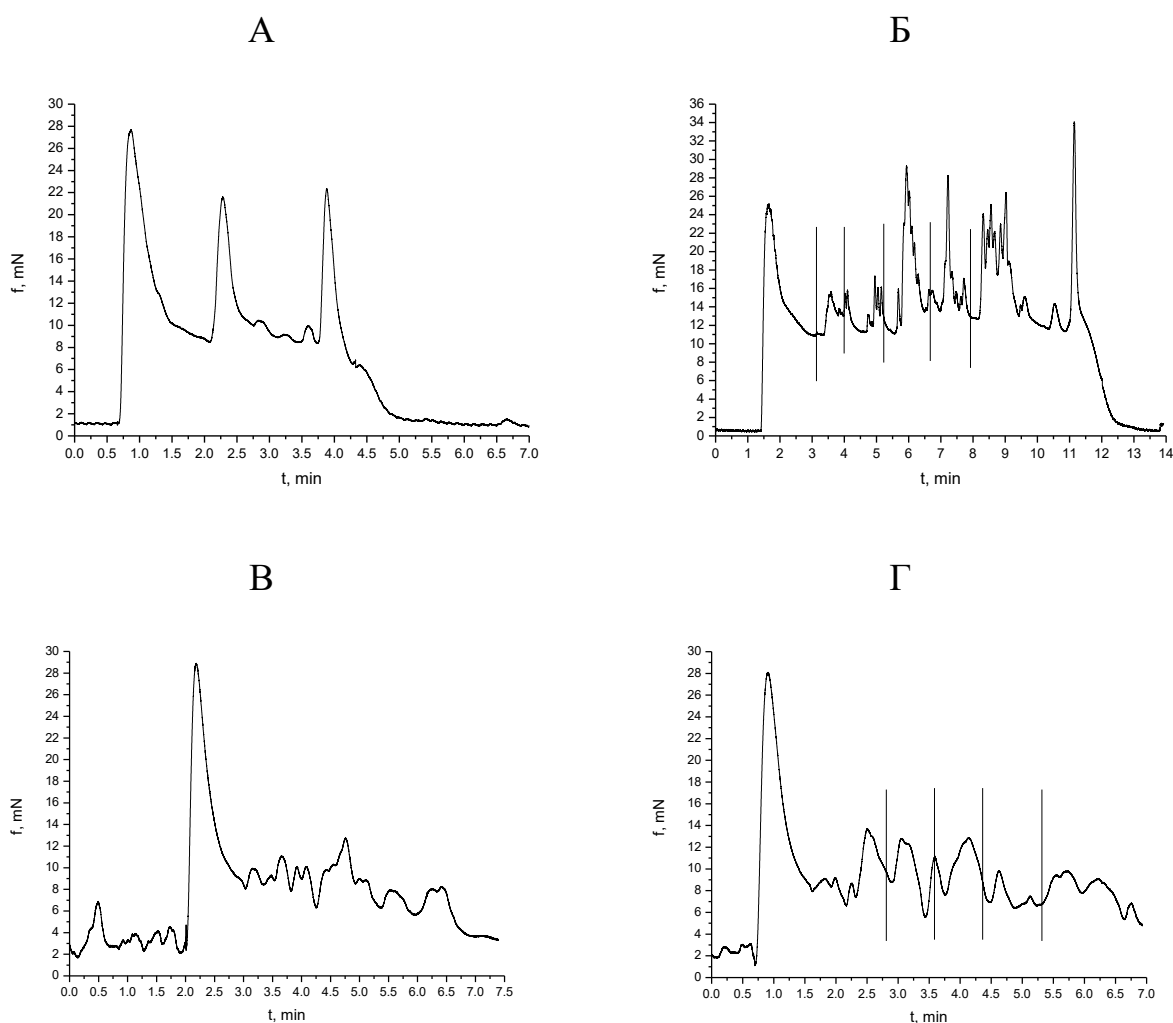


Рис. 6.10. Індуковані ацетилхоліном (10^{-5} М) скорочення кільцевих ГМ антрального відділу шлунку щурів контрольної групи (А, група 1) та групи щурів, навантажених суспензією TiO_2 (середній розмір частинок 21 нм (співвідношення рутіл:анатаз=1:4) впродовж 100 діб (В, група 3); ці ж скорочення при аплікації на тонічній складовій γ -аміномасляної кислоти у концентраціях 10^{-8} - 10^{-5} М (Б – група 1, Г – група 3). Наведено типові механограми.

Сумарні ефекти γ -аміномасляної кислоти в гладеньких м'язах травного тракту визначаються сукупністю ефектів а різних рівнях регуляції

моторики. У випадку ізольованих м'язів різних відділів ШКТ щурів доведено, що домінуючими ефектами є: у шлунку – ГАМК_A-залежна модуляція ВІП- і NO-викликаного розслаблення; у дванадцятипалій кишці – ГАМК_A-залежна модуляція пуринаергічного розслаблення; в порожній кишці – ГАМК_A-залежна модуляція ВІП-, NO- і пуринорецептор-активованого розслаблення; у клубовій кишці – ГАМК_A- і ГАМК_B-залежна модуляція (збуджувальний ефект) холінергічного скорочення і нехолінергічного неадренергічного розслаблення; у товстому кишечнику (ободовій кишці) – ГАМК_A-залежна модуляція нехолінергічного неадренергічного, ВІП-, PACAP- (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) і NO-викликаного розслаблення (інтернейронами і мотонейронами). Отже, загалом, у м'язовій стінці ШКТ ГАМК виконує роль модулятора вивільнення інших нейромедіаторів з нейронів інтрамурального нервового сплетення [552-555].

У наших дослідженнях *in silico* було встановлено, що нанорозмірний матеріал TiO₂ здатний взаємодіяти з різною спорідненістю із декількома сайтами позаклітинної частини ГАМК_B-рецептора (Рис. 5.31). Також дослідженнями ін'єктування TiO₂ у ядра довгастого, залучених у контроль серцево-судинної системи було отримано модулюючі ефекти цього наноматеріалу на регуляцію артеріального тиску щурів [556]. Тож ймовірно було припустити, що, принаймні частково, ефекти хронічної дії TiO₂ на моторику м'язів товстого кишечника і шлунка можуть бути обумовлені впливом цих наночастинок на ГАМК-ергічну систему [524, 556]. У зв'язку з цим, у наступній серії експериментів нами було досліджено закономірності кумулятивної дії ГАМК (використані концентрації 10⁻⁸ – 10⁻⁵ М), аплікованої на тонічній складовій K⁺-викликаних (80 мМ) скорочень м'язів *saecum* та *antrum*.

У контролі кумулятивне і некумулятивне аплікування ГАМК на тонічній складовій K⁺-скорочення вісцеральних гладеньких м'язів (*saecum* та *antrum*) супроводжувалось скорочувальними реакціями (Рис. 6.6. Б і 6.7 Б). У випадку повторення цього експерименту на м'язах шлунку щурів групи 3

(протягом 100 діб навантаження суспензією TiO_2) не було зареєстровано жодних скорочувальних реакцій на аплікування ГАМК (Рис. 6.6. Г). У випадку м'язів *saesum* щурів групи 2 мало місце зростання тону (Рис. 6.10).

Аналогічно, кумулятивне аплікування ГАМК на тонічній складовій ацетилхолінового скорочення ГМ антрального відділу шлунку індукувало суттєві скорочувальні реакції (Рис. 6.10). У випадку повторення цього експерименту на м'язах шлунку щурів групи 3 (протягом 100 діб навантаження суспензією TiO_2) не спостерігалось суттєвих відмінностей коливань тонічної складової скорочення у присутності ГАМК (Рис. 6.10). Подібні ефекти спостерігались також на ГМ *saesum*.

Таким чином, ми можемо зробити висновок, що в умовах тривалого навантаження організму наноматеріалом TiO_2 відбувається послаблення та/або з часом усунення модулюючої дії нейромедіатора ГАМК на ГМ травного тракту.

Окситоцинові скорочення міометрія. З огляду на виявлене елементним аналізом суттєве накопичення Ti в тканині матки (Табл. 6.1), а також індуковані тривалим навантаженням *in vivo* наноматеріалом TiO_2 зміни спонтанної скорочувальної активності міометрія (Табл. 6.5.), наступною задачею ми обрали встановлення закономірностей викликаних утеротонічним гормоном окситоцином (0,1 МО) скорочень міометрія в умовах впливу *in vivo* НЧ TiO_2 .

В умовах тривалого впливу *in vivo* (30 діб, група 2) наночастинок TiO_2 спостерігались деякі зміни окситоцинових скорочень міометрія: за відсутності змін амплітуди фазних скорочень суттєво зменшувалась їх тонічна складова (Рис. 6.11). Це позначилось на достовірному збільшенні співвідношення фазного і тонічного скорочень: з $(1,3 \pm 0,8)$ в контролі до $(4,9 \pm 0,3)$, $n=12$, $p<0,05$). Значних змін також набули механокінетичні параметри окситоцинових скорочень: нормована максимальна швидкість скорочення (V_{nc}) зростає з $(6,4 \pm 0,5) \text{ хв.}^{-1}$ у контролі до $(11,0 \pm 0,7) \text{ хв.}^{-1}$ у групі

2; швидкість розслаблення $V_{\text{пр}}$ у групі 2 збільшилась у чотири рази (з $(1,3 \pm 0,3) \text{ хв.}^{-1}$ у контролі до $(5,2 \pm 0,6) \text{ хв.}^{-1}$, $n=12$, $p<0,05$).

Зміни окситоцин-індукованих скорочень, які спостерігались в групі 2, зі збільшенням терміну впливу TiO_2 прогресували: в умовах субхронічної дії частинок амплітуда фазних скорочень на аплікування окситоцину та параметр $V_{\text{пс}}$ знижувались у середньому вдвічі відносно контролю (Рис. 6.11). Навпаки, суттєвого відносного зростання набув тонічний компонент скорочень; такі його зміни призвели до суттєвого (в п'ять разів порівняно з контролем) зниження показника $V_{\text{пр}}$.

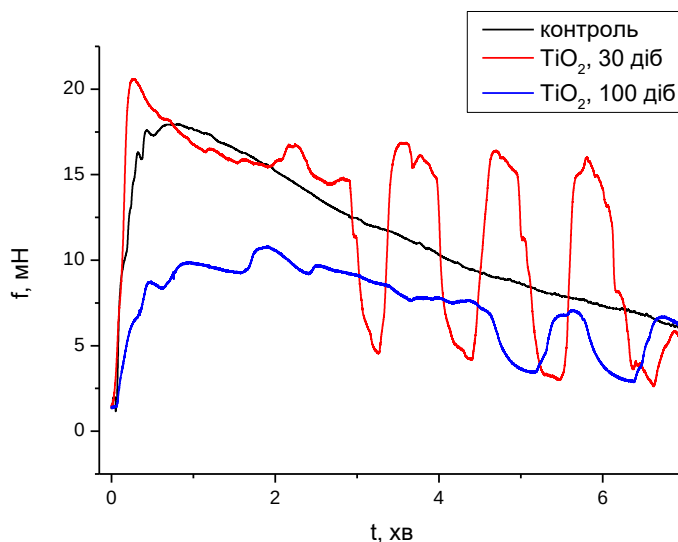


Рис. 6.11. Індуковані окситоцином (0,1 МО) скорочення міометрія щурів контрольної групи та щурів, навантажених суспензією TiO_2 (середній розмір частинок 21 нм (співвідношення рутил:анатаз=1:4) впродовж 30 та 100 діб. Наведено типові механограми.

* * * * *

Дослідження, результати яких наведені в даному розділі, стосуються вивчення накопичення та розвитку впливу НЧ TiO_2 (для проведення експериментів було обрано найбільш промислово поширені частинки з розміром 21 нм, фотокаталітичний стандарт Р25, співвідношення рутил:анатаз=1:4) при їх тривалому (30 і 100 діб) інтрагастральному

введенні, на вісцеральні ГМ (шлунку, товстого кишечника і міометрія). Розкрито окремі механізми впливу НЧ TiO_2 в умовах тривалої дії *in vivo*, на функціонування вісцеральних ГМ.

1. Елементним аналізом показано, що за умов інтрагастрального введення *in vivo* щурам наноматеріал TiO_2 проникає в тканини та нерівномірно накопичується у різних органах: найбільшу кількість Ti накопичують тканини вісцеральних ГМ (шлунок > товстий кишечник > матка) та нирок.
2. Термодинамічним аналізом виявлено, що в умовах хронічної дії TiO_2 спричиняє суттєві зміни процесів високоеластичної деформації у гладеньком'язовій тканині шлунку за великих деформацій ($\Delta L/L_0 \approx 50\%$).
3. Тензометричними дослідженнями та механокінетичним аналізом встановлено, що хронічне (30 і 100 діб) навантаження організму *in vivo* щурів TiO_2 спричиняє неоднорідний (часо-залежний і тканино-залежний) вплив на спонтанну і викликану скорочувальну активність вісцеральних ГМ.

Результати, викладені у розділі, опубліковані у наступних роботах: [421, 425, 448, 454, 513, 524].

РОЗДІЛ 7

**МЕХАНІЗМИ МОДУЛЯЦІЇ КАЛІКС[4]АРЕНАМИ-
ІНГІБІТОРАМИ НАТРІЄВОЇ ПОМПИ ФУНКЦІОНУВАННЯ
ВІСЦЕРАЛЬНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ В УМОВАХ *IN VITRO***

Na^+, K^+ -АТФ-аза – білковий комплекс ПМ, який виконує подвійну роль: по-перше, підтримує гомеостаз іонів Na^+ і K^+ , а також трансмембранний градієнт потенціалу і, по-друге, виступає в якості трансдуктора сигналів і регулятора експресії багатьох ключових генів.

Натрієва помпа має важливе значення для регуляції внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} . Початково вважали, що її блокування кардіостероїдами при терапії серцевої недостатності, забезпечує збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ внаслідок індукування реверсної роботи $\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}$ -обмінника підвищенням рівня Na^+ в клітинах. Насьогодні відомо, що між Na^+, K^+ -АТФ-азою (ймовірно, переважно її кавеоларним пулом), $\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}$ -обмінником та ендоплазматичним ретикуломом в багатьох тканинах існує прямий, механічний зв'язок [557, 558]. Блауштейн з колегами знайшли підтвердження, що фізичний контакт між цими Ca^{2+} -транспортними структурами формує структурно-функціональний комплекс, який отримав назву кальцій-сигнальний мікродомен (calcium-signaling microdomain), властивий, зокрема, для серцевого і гладеньких м'язів [557]. Важливо, що ймовірними учасниками кавеоларних комплексів є також рецептори нейромедіаторів, зокрема, - пуринорецептори, мускаринові ацетилхолінові рецептори (зокрема, спряжені з $G_{q/11}$), брадикінінові B_2 -рецептори. Підтвердженням цьому були експерименти, в яких нокаут Na^+, K^+ -АТФ-ази супроводжувався значним послабленням ІТФ-залежного збільшення рівня Ca^{2+} в цитоплазмі [559]. Тож натеper залишається актуальним питання встановлення закономірностей і механізмів модуляції роботи натрієвої помпи не лише як фундаментального питання, але й, перш за все, з метою створення

засобів для спрямованої корекції ряду патологічних станів організму з можливістю уникнення побічних ефектів.

Перспективною основою для створення фармакологічних речовин нового покоління зі спрямованою дією є калікс[4]арени – макроциклічні сполуки, які одержують прецизійною циклоконденсацією пара-заміщених фенолів і формальдегіду. Для цих речовин доведена здатність розпізнавати катіони, аніони та нейтральні молекули та зв'язувати їх у стійкі комплекси типу "гість-господар", а також розділяти близькі за властивостями іони та нейтральні молекули. Відомо, що окремі калікс[4]арени специфічно модифікують іон-транспортні системи плазматичної мембрани і внутрішньоклітинних органел. Так, дослідженнями академіка НАН України С.О. Костеріна і колег було показано, що калікс[4]арени з шифрами С-97, С-99 та С-107 здатні більш ефективно, порівняно з убаїном, пригнічувати активність Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ ГМК міометрія свині, але не змінювали базальну Mg^{2+} -АТФ-азну активність, а структурний фрагмент калікс[4]арену С-107 – сполука МЗ практично не впливала на активність Na^+, K^+ -АТФ-ази [560-562]. Також дослідженнями акад. НАН України С.О. Костеріна і колег встановлено кількісні закономірності інгібування убаїном та калікс[4]ареном С-99 препаратів Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ ГМК міометрія свині: для дії оубаїну значення $I_{0,5}$ становило 21 ± 5 мкМ, а для калікс[4]арену С-99 – 98 ± 8 нМ [560-564]; за присутності 10 мкМ С-99 і убаїну залишкова активність ензиму становила у середньому 22,0 і 30,0 % відповідно, а при збільшенні концентрації сполук на один порядок – у середньому 15 % і 12,3 % відповідно; практично повне блокування активності ензиму обидві речовини спричиняли у концентрації 1 мМ. Цікаво, що, за даними цих авторів, у наномолярних і мікромолярних концентраціях калікс[4]арен С-107 володів значно вищою інгібіторною активністю щодо Na^+, K^+ -АТФ-ази порівняно з перерахованими вище речовинами: у концентрації 10 нМ залишкова ензиматична активність становила у середньому 56 %, у концентрації 100 нМ – у середньому 25,0 %, у концентрації 1 мкМ – у

середньому 10,0 %, а 10 мкМ калікс[4]арену C-107 спричиняло практично повне інгібування цього ензиму [563, 564].

Відомо, що аплікування убаїну на ГМ в умовах *in vitro* та *in situ* призводить до деполяризації ПМ (у середньому на 6-7 мВ), а також до збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів Na^+ ; спектроскопічними дослідженнями було також виявлене убаїн-викликане підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} , яке, ймовірно, є наслідком входу Ca^{2+} через ПМК і реверсної роботи $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника ПМ [565-567].

Отже, надзвичайно важливо було здійснити комплексні дослідження закономірностей та механізмів дії окремих калікс[4]аренів (представників групи сполук з доведеною біохімічними дослідженнями [560-564] здатністю інгібувати ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ) на вісцеральні ГМ.

Тому для вирішення у даному розділі було поставлено наступні задачі:

- ~ у порівняльному аспекті дослідити дію відомого блокатора Na^+, K^+ -АТФ-ази серцевого глікозиду убаїну та калікс[4]арену C-99 на спонтанну і викликану скорочувальну активність вісцеральних ГМ (товстого кишечника і міометрія);
- ~ встановити окремі механізми впливу речовин-інгібіторів натрієвої помпи (на прикладі калікс[4]арену C-99) на функціонування вісцеральних ГМ.

7.1. Вивчення закономірностей впливу калікс[4]аренів-модуляторів Na^+, K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани на скорочувальну активність гладеньких м'язів міометрія

7.1.1. Спонтанна скорочувальна активність гладеньких м'язів міометрія при блокуванні натрієвої помпи

Відомо, що короткочасове в умовах *in vitro* блокування Na^+, K^+ -АТФ-ази спричиняє деполяризацію і порушення трансмембранних іонних градієнтів в ГМК, призводячи до модуляції їх функціонування [565, 567].

Тому початково нами було досліджено кінетичні і концентраційні закономірності впливу речовин-інгібіторів натрієвої помпи (уабаїну та калікс[4]арену С-99) на спонтанну скорочувальну активність міометрія щурів.

Попередня інкубація ГМ препаратів (впродовж 20-30 хв.) як з уабаїном, так і з калікс[4]ареном С-99 (обидві сполуки використовували в концентрації 10 мкМ) призводила до активації спонтанних скорочень (підвищення амплітуди і зростання частоти), яка проявлялась з перших хвилин дії речовин; при цьому рівень тонуусу не зазнавав змін (Рис. 7.1 А і Б).

Було проведено кількісний аналіз впливу речовин-інгібіторів натрієвої помпи на спонтанну скорочувальну активність міометрія. Встановлено, що за присутності уабаїну і С-99 частота спонтанних скорочень у середньому збільшувалась на $(29,3 \pm 12,4)\%$ ($n=6$) та $(37,2 \pm 14,1)\%$ ($n=7$), відповідно. Амплітуда скорочень за цих умов зростала на $(19,9 \pm 7,8)\%$ ($p < 0,05$, $n=6$, у присутності уабаїну) і $(26,2 \pm 7,6)\%$ ($p < 0,05$, $n=7$, у присутності калікс[4]арену).

Аналіз закономірностей розвитку окремих спонтанних скорочень не виявив статистично значущих змін нормованих максимальних швидкостей фази скорочення та розслаблення (відповідно V_{nc} і V_{nr}) у присутності уабаїну. У аналогічних умовах каліксарен С-99 спричиняв достовірне збільшення нормованої максимальної швидкості фази скорочення на $(22,4 \pm 9,7)\%$ ($p < 0,05$, $n=7$) порівняно з контролем, тоді як максимальна швидкість фази розслаблення не зазнавала вірогідних змін $((114,8 \pm 7,1)\%$ порівняно з контролем, прийнятим за 100 %).

Варто відзначити, що за дії блокаторів натрієвої помпи спостерігались зміни окремих параметрів спонтанної скорочувальної активності міометрія, у той час як інші показники залишались без змін (Рис. 7.2). Так, показники тривалості фаз скорочення і розслаблення залишались на рівні контрольних показників, тоді як показник асиметрії скорочень за дії уабаїну і калікс[4]арену С-99 в однаковій мірі мав тенденції до зниження. Тривалість

скорочувального циклу за присутності 10 мкМ убаїну достовірно зростала у середньому на 38,5%, тоді як С-99 не впливав на цей параметр.

Навпаки, індекс скорочувальної активності, який розраховували як співвідношення тривалості скорочень до пауз між ними, у присутності С-99 збільшувався, а при дії убаїну залишався без змін. Такий ефект калікс[4]арену корелює з підвищеною за його дії частотою спонтанних скорочень та свідчить про відносну активацію механічної активності ГМ. Також обидві сполуки спричиняли достовірне зростання показників ефективності функціонування м'язів, які виражали в Олександрійських одиницях і одиницях Монтевідео, однак ефект калікс[4]арену С-99 був вірогідно вищий порівняно з таким убаїну (Рис. 7.2).

Отже, дія калікс[4]арену С-99 на спонтанні скорочення міометрія хоча за більшістю показників є аналогічною до такої класичного інгібітора Na^+, K^+ -АТФ-ази, виявляє суттєві відмінності щодо загальної ефективності скорочувальної активності (достовірне зростання скоротливих індексів в одиницях Монтевідео та Олександрійських одиницях відносно контролю та відносно групи убаїну), а також щодо кінетичних показників (достовірне відносно контролю та відносно групи убаїну зростання нормованої максимальної швидкості фази скорочення V_{nc}). Такі особливості впливу С-99 порівняно з убаїном можуть бути спричинені як відносно більш високою інгібіторною здатністю калікс[4]арену (у застосованій концентрації 10 мкМ ефективність С-99 вища у середньому на 8% [561, 562]) щодо Na^+, K^+ -АТФ-ази, так і наявністю в тканині міометрія інших мішеней калікс[4]арену, крім натрієвої помпи ПМ.

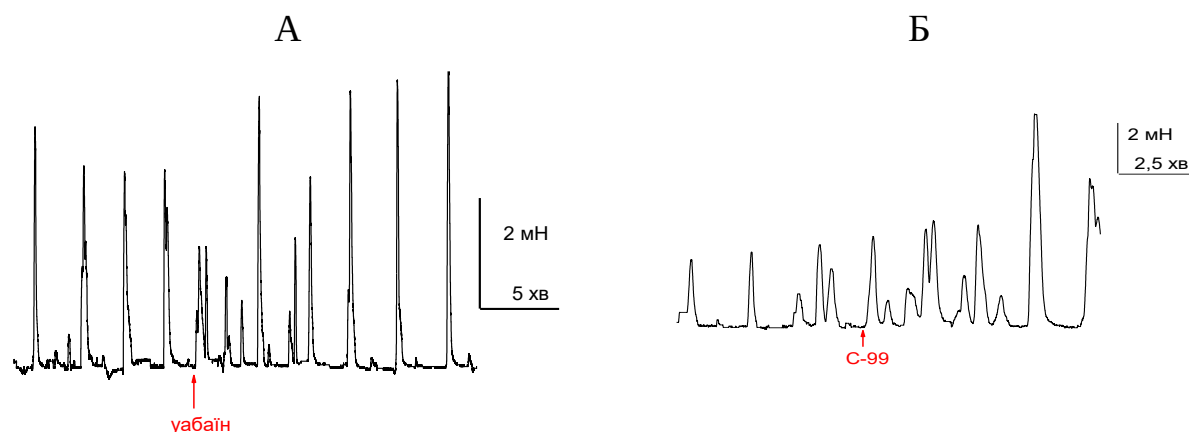


Рис. 7.1. Вплив уабаїну (А) і калікс[4]арену C-99 (Б) (обидві сполуки в концентрації 10 мкМ) на спонтанні скорочення міометрія щурів. Наведено типові механограми.

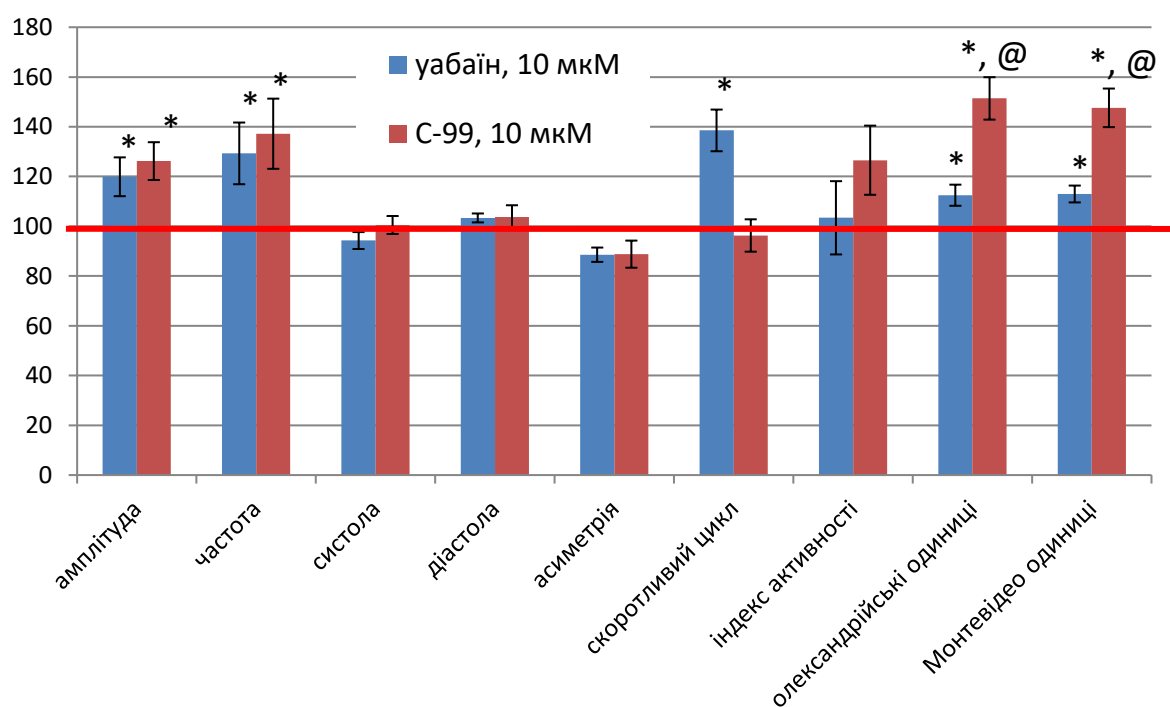


Рис. 7.2. Відносні зміни параметрів спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів за присутності уабаїну і калікс[4]арену (обидві сполуки в концентрації 10 мкМ).

За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі (вісь ординат); дані наведено як $M \pm m$ ($n=6-7$);

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

@ - $p < 0.05$ – різниця достовірна відносно дії уабаїну.

7.1.2. Викликані скорочення міометрія при блокуванні натрієвої помпи

У наступній серії експериментів було проведено вивчення в умовах дії убаїну і калікс[4]арену C-99 (обидві сполуки у концентраціях 10 мкМ) закономірностей скорочень поздовжніх ГМ міометрія щурів, спричинених за двома різними шляхами спряження збудження-скорочення: електромеханічними і фармакомеханічним. Електромеханічне спряження моделювали аплікуванням гіперкалієвого розчину Кребса (концентрація іонів K^+ становила 80 мМ), переважним шляхом активації скорочення ГМК якого є K^+ -деполяризація ПМ і вхід іонів Ca^{2+} через ПКК L-типу [299].

Фармакомеханічне спряження вивчали, активуючи скорочення нейромедіатором парасимпатичної вегетативної нервової системи ацетилхоліном (10 мкМ) і гормоном-утеротоніком окситоцином (10 мкМ). Варто відмітити, що рецептори окситоцину спряжені з $G_{q/11}$ -білками і їх стимулювання головним чином призводить до посилення синтезу вторинних посередників ІТФ і ДАГ [103-105]. У ГМ міометрія щурів експресується мРНК M_2 -, M_3 - і M_5 -типів мускаринових ацетилхолінових рецепторів [470, 471], причому реальне значення в забезпеченні їх скорочувальної функції у відповідь на ацетилхолін мають M_2 - і M_3 -типи рецепторів [471]. За різними даними співвідношення експресії M_2 і M_3 холінорецепторів в ГМ матки щурів коливається від (30-40)%:(60-70)% [472] до 20%:80% [571]. Рецептори M_3 -типу, як і окситоцинові, спряжені з $G_{q/11}$ -білками, тоді як M_2 -рецептори взаємодіють з $G_{o/i}$ -білками.

Скорочувальну активність ГМ реєстрували після передінкубації (20-30 хв) у присутності відповідної речовини-блокатора натрієвої помпи.

Скорочення, активовані гіперкалієвим розчином. Було встановлено, що скорочення, які активувались K^+ -деполяризацією, не зазнавали вірогідних змін як за присутності убаїну, так і калікс[4]арену C-99 (10 мкМ). Так, обидві речовини не лише не змінювали силу скоротливих відповідей, але й не впливали на характер наростання і спаду скорочень: показники нормованих

максимальних швидкостей фаз скорочення V_{nc} та розслаблення V_{nr} залишались на контрольному рівні (Рис. 7.3).

Ацетилхолін-викликані скорочення. У наступній серії експериментів було досліджено вплив блокаторів Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ на закономірності розвитку скорочувальної активності міометрія, яка індукувалась фармакомеханічним шляхом спряження збудження-скорочення нейромедіатором ацетилхоліном (10 мкМ).

Обидві досліджені речовини спричиняли зниження амплітуди ацетилхолін-викликаних скорочень: у випадку убаїну на $(12,6 \pm 1,6)\%$ ($p < 0,05$, $n=7$) та калікс[4]арену С-99 на $(13,2 \pm 3,8)\%$ ($p < 0,05$, $n=9$).

Кінетичний аналіз показав, що за присутності в інкубаційному середовищі як убаїну, так і С-99 має місце прискорення розвитку скоротливих відповідей, яке відобразилось у зростанні нормованих максимальних швидкостей V_{nc} на $(36,8 \pm 7,0)\%$ ($p < 0,05$, $n=7$) та $(12,3 \pm 9,8)\%$ ($p < 0,05$, $n=9$), відповідно. Однак, варто відмітити, що прискорення наростання ацетилхолін-активованих скорочувальних відповідей під дією убаїну і ацетилхоліну мало достовірні розбіжності: убаїн спричиняв більш потужний ефект (Рис. 7.3). Навпаки, в цих умовах розслаблення м'язових препаратів відбувалось повільніше порівняно з контролем: у випадку убаїну V_{nr} знижувалась на $(19,4 \pm 15,0)\%$ ($p < 0,05$, $n=7$) та в присутності каліксарену С-99 – на $(12,7 \pm 9,3)\%$ ($p < 0,05$, $n=9$). Таким чином, калікс[4]арен С-99 справляв вплив на усі параметри ацетилхолін-викликаних скорочень (силу скорочення, нормовані максимальні швидкості V_{nc} і V_{nr}) аналогічну дію до класичного інгібітора натрієвої помпи убаїну [568].

ГМ жіночої сечостатевої системи (сечоводів, сечового міхура, матки і маткових труб), як і шлунково-кишкового тракту, іннервуються парасимпатичною частиною вегетативної нервової системи, головним нейромедіатором якої є ацетилхолін [470]. Хоча в ГМК міометрія і секреторних клітинах ендотелію матки щурів експресуються мускаринові ацетилхолінові рецептори М5- (у незначних, слідових кількостях), М2- і М3-

типів, головним функціональним представником є рецептори М3-типу [470-477]. Так, за даними Ф. Абдалла і колег [470, 471], ацетилхолін здатний спричинити активацію скорочення міометрія щурів, діючи на М3-холінорецептори. На гладеньком'язових препаратах маткових труб мишей зі спрямованим нокаутом окремих типів мускаринових рецепторів було доведено, що активація скорочення карбахоліном (нечутливий до дії ацетилхолінестерази аналог ацетилхоліну) спричиняється лише активацією М3-холінорецепторів, тоді як опосередковано М2-холінорецепторів відбувається її посилення [474].

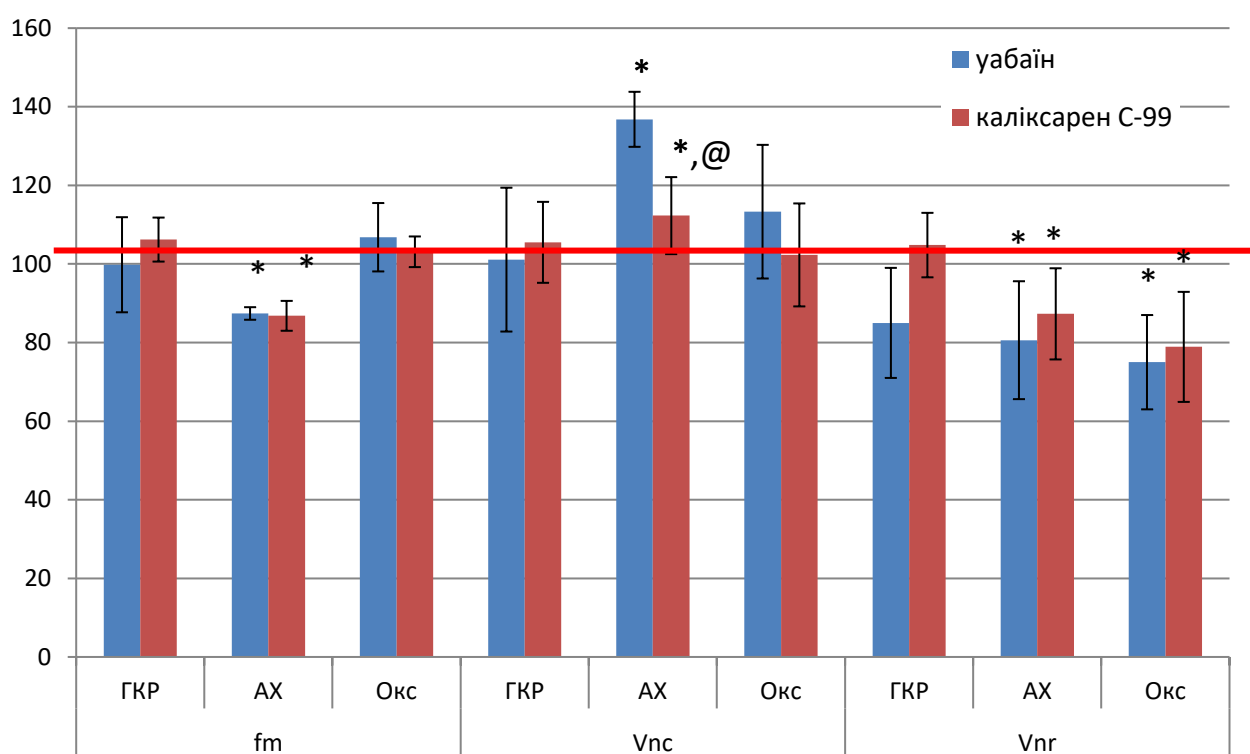


Рис. 7.3. Усереднені дані щодо впливу убаїну та калікс[4]арену (обидві сполуки в концентрації 10 мкМ) на максимальну силу (f_m) та нормовані максимальні швидкості фаз скорочення (V_{nc}) і розслаблення (V_{nr}) скорочень ГМ міометрія щурів. Скорочення були викликані аплікуванням ацетилхоліну (АХ, 10 мкМ), окситоцину (Окс, 0,1 МО) та гіперкалієвого розчину (ГКР, 80 мМ). За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі (вісь ординат); дані наведено як $M \pm m$ ($n=6-9$);

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

@ - $p < 0.05$ – різниця достовірна відносно убаїну.

Тож можна припустити, що вплив серцевого глікозиду убаїну і калікс[4]арену С-99 на силові і кінетичні параметри скорочувальних відповідей на аплікування ацетилхоліну загалом є ідентичним і, йовірно, пов'язаний із спричиненими блокуванням Na^+ , K^+ -АТФ-ази ПМ порушеннями трансмембранних іонних градієнтів (Na^+ та Ca^{2+}) і мембранного потенціалу.

Окситоцин-викликані скорочення. У випадку окситоцин-активованих скорочень (0,1 МО) за дії калікс[4]арену С-99 і убаїну (обидві сполуки використовували в концентрації 10 мкМ), нами не було виявлено статистично значущих змін амплітуди максимального напруження та показника нормованої максимальної швидкості наростання сили скорочення (V_{nc}). Але обидві ці речовини в однаковій мірі уповільнювали процес розслаблення, спричиняючи вірогідне зниження показника V_{nr} усередньому на $(25,0 \pm 11,9)\%$ (убаїн) та $(21,1 \pm 14,0)\%$ (калікс[4]арен С-99).

Процеси в ГМК, які запускаються при активації окситоцинових рецепторів, натеper у суттєвій мірі продовжують привертати увагу дослідників. Відомо, що окситоцин, зв'язуючись з рецептором, мпричиняє активацію $G_{q/11}$ -білка, який, у свою чергу активує фосфоліпазу С- β , що гідролізує фосфатидилінозитолдифосфат, призводить до напрацювання вторинних посередників: ІТФ і ДАГ. ІТФ спричиняє вивільнення іонів Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулуму, а ДАГ активує протеїнкіназу С. За натеper нез'ясованим механізмом, активований $G_{q/11}$ -білок спричиняє відкривання потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів і вхід іонів Ca^{2+} з позаклітинного простору. Іони Ca^{2+} в клітині, зв'язуючись з кальмодуліном формують комплекс, який активує кіназу легких ланцюгів міозину. Цей фермент, активує білки скорочувального апарату ГМК, запускаючи скорочення міометрія. Разом з тим, інший вторинний посередник – ДАГ, через ПКС активує МАПК-каскад, який призводить до активації фосфоліпази A_2 , синтезу простагландинів і, як наслідок, робить свій внесок в розвиток скорочення. З іншого боку, ПКС фосфорилує CPI-17, яка активує Rho-A, призводячи до активування кінази ROCK. Обидва білки (CPI-17 та ROCK) інгібують фосфатазу легких ланцюгів

міозину, таким чином призводячи до сенситизації білків скорочувального апарату міоцитів до іонів Ca^{2+} [475, 476].

Таким чином, ймовірно, що дані наших досліджень, які виявили відсутність впливу убаїну і калікс[4]арену C-99 на швидкість наростання сили і амплітуду окситоцинових скорочень, вказують на нечутливість первинних етапів окситоцин-активованого сигнального каскаду в клітинах міометрія [568]. Можна передбачити, що безпосередньо синтез ІТФ та індуковане ним вивільнення іонів Ca^{2+} з СР не чутливі до порушень трансмембранних іонних і зарядових градієнтів за дії блокаторів Na^+ , K^+ -АТФ-ази убаїну і калікс[4]арену C-99.

Одержані нами результати щодо впливу убаїну на скоротливість міометрію щурів загалом узгоджуються з даними інших дослідників [566, 567, 572]. Так, на препаратах міометрія вагітних жінок показано, що аплікування убаїну ($3 \cdot 10^{-7}$ М) призводить до активації спонтанних скорочень. Також дослідженнями Р. Ausina з колегами встановлено, що убаїн за Ca^{2+} -залежним шляхом спричиняє пригнічення окситоцинових і ацетилхолінових скорочень, змінюючи при цьому як їх максимальну силу фазної скорочувальної відповіді, так і середню амплітуду наступного осциляторного компонента [572]. Разом з тим, K^+ -індуковані скорочення міометрія щурів були нечутливими навіть до високих концентрацій (0,3 мМ) убаїну.

7.2. Вивчення закономірностей та механізмів впливу калікс[4]аренів-модуляторів натрієвої помпи на гладенькі м'язи товстого кишечника в умовах *in vitro*

7.2.1. Спонтанна скорочувальна активність гладеньких м'язів

Спонтанна скорочувальна активність за дії різних концентрацій убаїну. Як і у випадку міометрія, блокатор натрієвої помпи убаїн у концентрації 10 мкМ спричиняв активуючу дію на спонтанну скорочувальну активність ГМ *саесит*. Так, додавання убаїну до омиваючого

гладеньком'язові препарати розчину супроводжувалось зростанням базального напруження м'язів, а також збільшенням амплітуди і частоти їх спонтанних скорочень (Рис. 7.4).

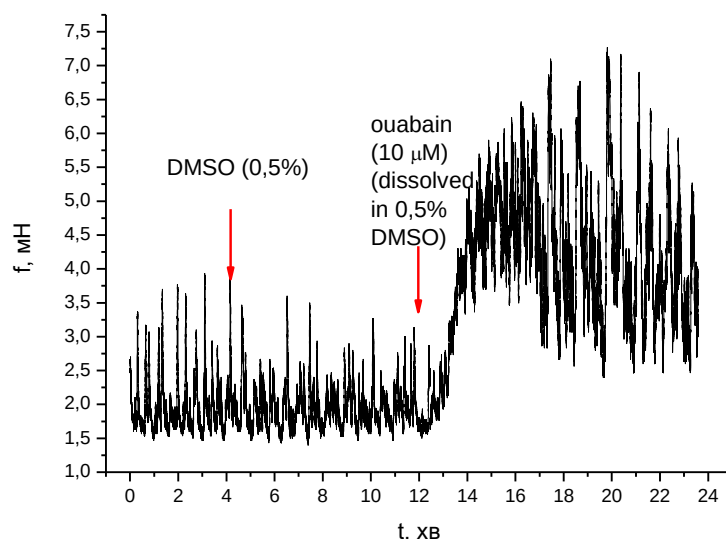


Рис. 7.4. Модуляція спонтанної скорочувальної активності кільцевих ГМ *саесит* щурів в умовах дії неполярного розчинника диметилсульфоксиду (DMSO, 0.5%) та убаїну (ouabain, 10 мкМ, розчинений в DMSO). Наведено типову механограму.

Таким чином, суттєве пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази (у випадку 10 мкМ убаїну відповідає блокуванню близько 70% молекул ензиму в умовах *in vitro* [561, 562]) спричиняє порушення трансмембранного градієнту іонів Na^+ , K^+ та як наслідок і Ca^{2+} , яке відображається загальними змінами (полегшенням збудження) скорочувальної функції вісцеральних ГМ.

У наступній серії експериментів досліджували впливу убаїну у концентрації 100 мкМ; варто відзначити, що за даними літератури така концентрація відповідає блокуванню у середньому близько 88% молекул Na^+ , K^+ -АТФ-ази в умовах *in vitro* [561, 562].

Було встановлено, що додавання 100 мкМ убаїну до омиваючого гладеньком'язові смужки розчину супроводжується підвищенням базального напруження препаратів, а також збільшенням амплітуди і частоти їх спонтанних скорочень (Рис. 7.5 А) [573]. Так, на 10 хв. дії убаїну амплітуда

спонтанних скорочень у середньому досягала $132,5 \pm 5,3\%$ ($p < 0.05$, $n=5$) порівняно з контролем, тоді як частота становила $126,8 \pm 6,9\%$ ($p < 0.05$, $n=5$); такі результати цілком узгоджуються з даними літератури [572].

Наступне кумулятивне підвищення концентрації убаїну до 200 мкМ не спричиняло вірогідних змін спонтанної скорочувальної активості (амплітуда скорочень складала $94,6 \pm 4,7\%$, а частота – $106,5 \pm 7,4\%$ (в обох випадках $p > 0.05$, $n=5$) відносно параметрів скорочень у присутності 100 мкМ убаїну) (Рис.7.5 Б).

Ритмічні спонтанні скорочення гладеньком'язової стінки органів травного тракту ссавців забезпечуються специфічними пейсмеркерами – ICC. Для цих тканин відомо чотири типи ICC, які відрізняються між собою специфічним розташуванням та амплітудно-часовими характеристиками активності. В товстому кишечнику щурів переважають пейсмеркерні клітини двох типів – ICC-SM (розташовані вздовж підслизової поверхні кільцевих м'язів у Мейснеровому сплетенні) та ICC-MY (містяться між кільцевим та поздовжнім м'язовими шарми в Ауербаховому сплетенні). Відомо [456, 575], що кожний тип пейсмеркерів незалежно генерує власний патерн ритмоактивності: ICC-MY обумовлює низькоамплітудні скорочення з високою частотою (10-15 скорочень за хвилину), а ICC-SM – високоамплітудні з низькою частотою (0,5-1,5 скорочень за хвилину). Варто відзначити, що своїми властивостями товстий кишечник щурів, порівняно з іншими тваринними моделями, подібний до кишечника людини, тому дані отримані на тканині щурів можуть бути використані для інтерпретації результатів по вивченню моторики товстого кишечника людини.

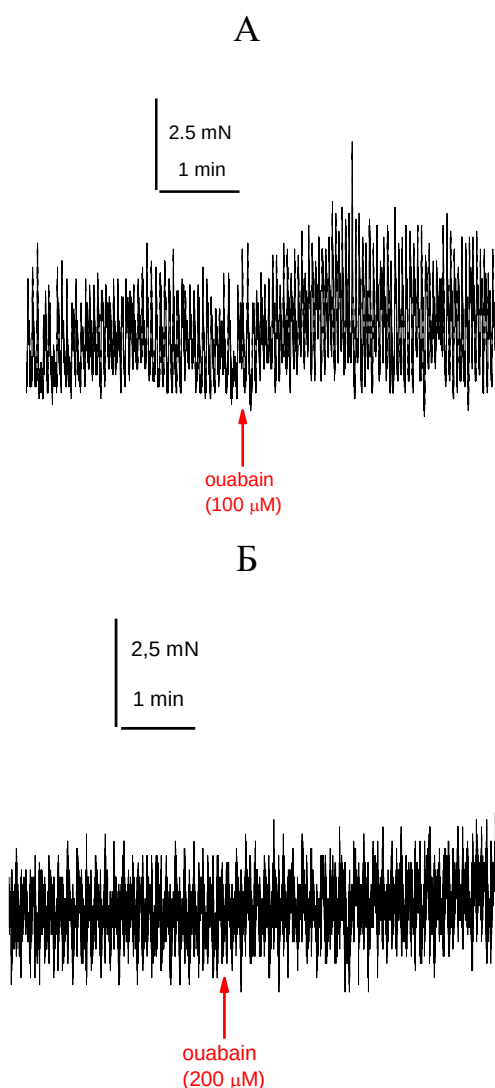


Рис. 7.5. Модуляція спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів *саесит* уабаїном: А - 100 мкМ уабаїну, Б - 200 мкМ уабаїну на фоні попередньої 30-хвилинної інкубації з 100 мкМ уабаїну. Наведено типові механограми.

Відомо, що високі концентрації серцевого глікозиду уабаїну ($10^{-5} - 10^{-3}$ М) спричиняють деполяризацію ПМ клітин, підвищення базального напруження ГМ та активацію їх спонтанної скорочувальної активності [565-567]. Як відомо, уабаїн, зв'язуючись з α -субодиницею натрієвої помпи, спричиняє її блокування, що призводить до підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів Na^+ , а це, в свою чергу обумовлює роботу $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника (ці дві трансмембранні структури і колокалізовані, і функціонально спряжені) в реверсному режимі [576]. Тому збуджувальну дію уабаїну переважно пов'язують з підвищенням концентрації іонів Ca^{2+} в

міоплазмі. Разом з тим, дані С. Barajas-Lopes з колегами [566, 577] вказують на те, що головним чинником зазначених збуджувальних ефектів убаїну є блокування K^+ -каналів ПМ ГМК іонами Na^+ , внутрішньоклітинна концентрація яких підвищується при інгібуванні роботи натрієвої помпи. На кільцевих ГМ трахеї мурчаків показано, що дія убаїну крім активації реверсної роботи Na^+/Ca^{2+} -обмінника, залежить від активності Ca^{2+} -помпи СР, супроводжується активацією ПМК L-типу та посиленням вивільнення ацетилхоліну з нервових закінчень [567]. Таким чином, можна передбачити, що отримане нами посилення спонтанних скорочень в умовах дії убаїну пов'язане зі зростанням внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} в клітинах *саесит*, а також додатковим вивільненням ацетилхоліну з нервових терміналей інтрамурального нервового сплетення гладеньком'язових смужок.

Спонтанна скорочувальна активність за дії калікс[4]арену С-99.

Аналогічно до убаїну (Рис. 7.3), калікс[4]арен С-99 в концентраціях 10 мкМ і вище, справляв активуючу дію на спонтанну скорочувальну активність ГМ товстого кишечника (Рис. 7.6).

Вплив каліксаарену С-99 на спонтанну скорочувальну активність саесит при попередньому блокуванні натрієвої помпи убаїном.

Оскільки науковою групою під керівництвом академіка НАН України С.О. Костеріна було встановлено [560-564], що в умовах *in vitro* калікс[4]арен С-99 здійснює селективне (відносно інших систем активного іонного транспорту ПМ, СР і мітохондрій) інгібування Na^+ , K^+ -АТФ-ази ПМ, нами було досліджено скорочувальну активність ГМ товстого кишечника в умовах попереднього блокування цього ензиму убаїном.

Як видно з рис. 7.7, додавання калікс[4]арену С-99 (100 мкМ) в омиваючий гладеньком'язові смужки розчин зі 100 мкМ убаїну не призводило до зміни їх базального напруження. Разом з тим, на відміну від аналогічних експериментів з убаїном (Рис. 7.5), калікс[4]арен С-99 спричиняв суттєве збільшення амплітуди і частоти спонтанних скорочень

(відповідно, до $(207,2 \pm 11,7)\%$ та $(131,8 \pm 7,9)\%$, ($n=5$, $p<0.01$) (Рис. 7.8). Отримані нами дані свідчать, що в стаціонарних умовах блокування натрієвої помпи убаїном, калікс[4]арен С-99 здатний додатково активувати спонтанну скорочувальну активність ГМ товстого кишечника щурів [573, 578].

Активаційний ефект калікс[4]арену С-99 на спонтанні скорочення інтестинальних ГМ може бути пояснений його ймовірною дією на пейсмерні клітини. Як показано дослідженнями останніх років, в основі генерації спонтанної деполяризації пейсмерних ІСС лежать процеси перерозподілу іонів Ca^{2+} між внутрішньоклітинними депо (так звані кальцієві мікродомени): Ca^{2+} , вивільняючись з саркоплазматичного ретикулуму (СР), захоплюється мітохондріями, і саме це зниження концентрації Ca^{2+} призводить до активації пейсмерних катіонних струмів у ПМ ІСС [574, 575, 579].

Робота Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій є потенціал-залежною: при деполяризації внутрішньої мембрани мітохондрій депонування відбувається з меншою ефективністю і супроводжується пригніченням спонтанної активності гладеньких м'язів, і навпаки при її фармакологічній гіперполяризації спонтанна активність ІСС посилюється [580]. Разом з тим, на ізольованих міоцитах матки щурів було встановлено, що окремі калікс[4]арени, зокрема і С-99, на фоні дії убаїну спричиняють суттєву поляризацію внутрішньої мітохондріальної мембрани [581]. Таким чином, є усі підстави припустити, що саме вплив на потенціал внутрішньої мембрани мітохондрій лежить в основі зазначеної активаторної дії калікс[4]арену С-99 на спонтанну скоротливу активність ГМ *саесит* в умовах попереднього блокування натрієвої помпи убаїном.

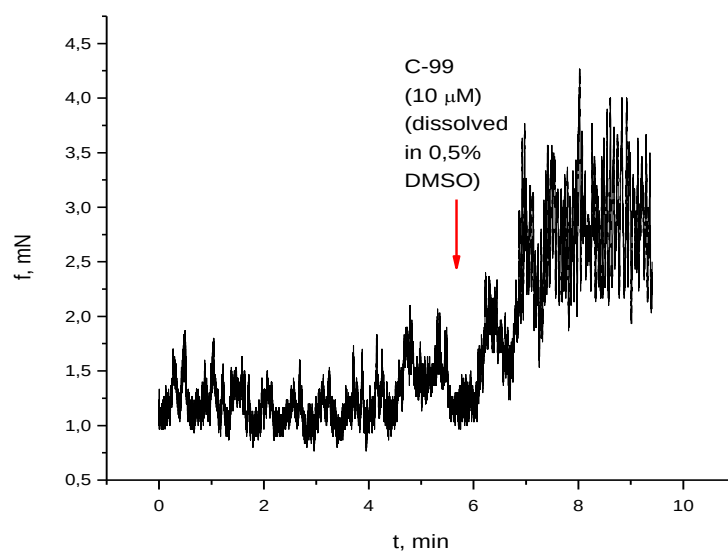


Рис. 7.6. Модуляція спонтанної скорочувальної активності кільцевих ГМ *саесит* в умовах дії калікс[4]арену C-99 (10 мкМ, розчинений в DMSO). Наведено типову механограму.

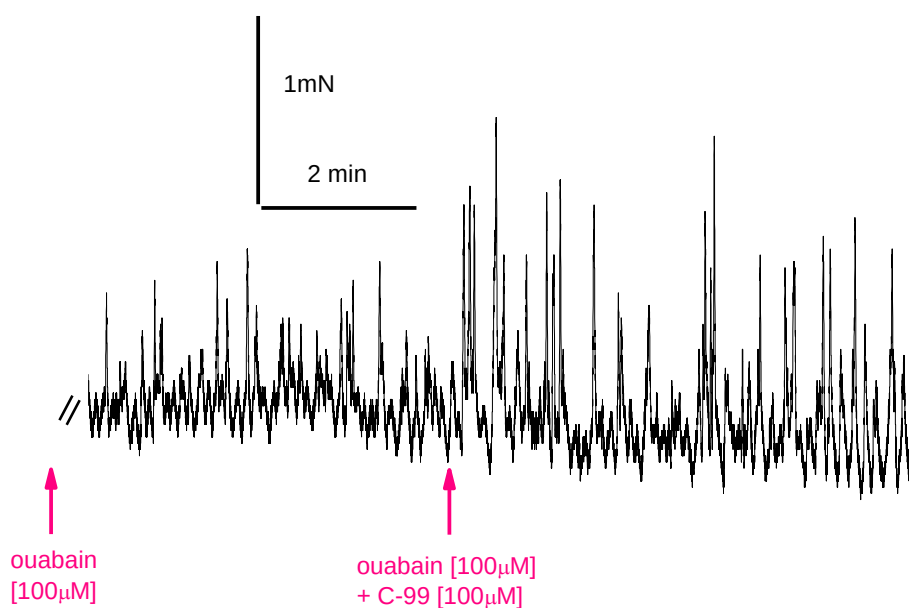


Рис. 7.7. Модуляція спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів *саесит* 100 мкМ калікс[4]арену C-99 на фоні попередньої 30-хвилинної інкубації з 100 мкМ убаїну. Наведено типову механограму.

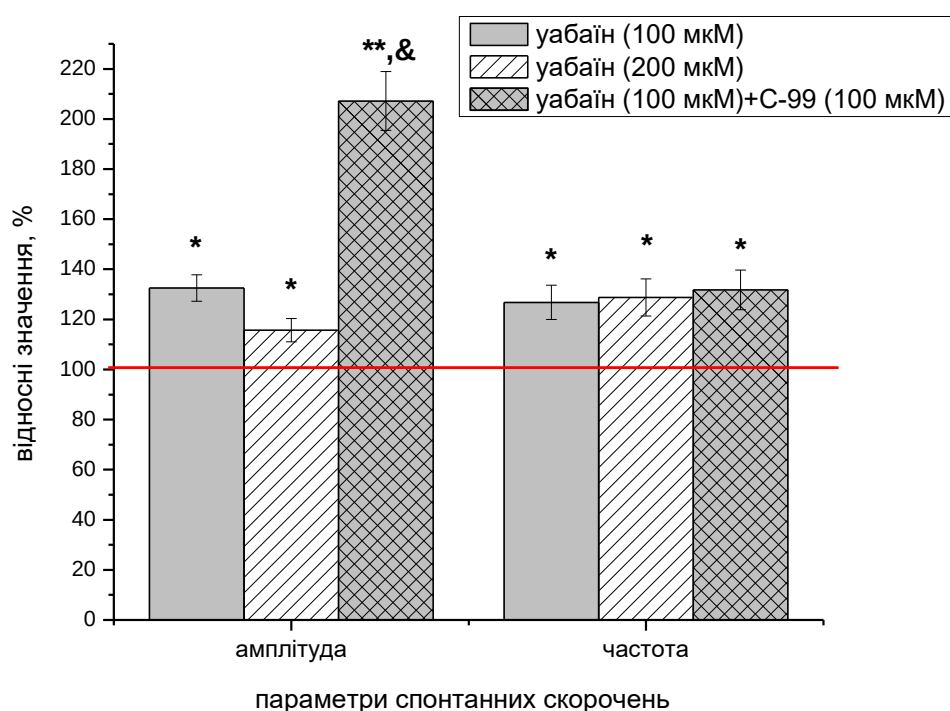


Рис. 7.8. Модуляція спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів *saesum* уабаїном та калікс[4]ареном С-99: статистичні дані зміни амплітуди і частоти спонтанних скорочень, параметри виражені у % відносно контролю, прийнятого за 100% (усереднення з 5 повторів).

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

7.2.2. Викликані скорочення гладеньких м'язів *saesum* в умовах *in vitro* блокування натрієвої помпи (уабаїном та калікс[4]аренами С-99 і С-107)

У порівняльному аспекті було досліджено вплив інгібіторів натрієвої помпи ПМ (відомого серцевого глікозиду - уабаїну, а також калікс[4]аренів С-99 і С-107) на силові характеристики та кінетичні параметри скорочувальних відповідей ГМ *saesum* щурів.

Було обрано робочі концентрації цих речовин 10, 100 та 200 мкМ. Відомо, що уабаїн та зазначені калікс[4]арени у високих концентраціях (100 мкМ) спричиняють інгібування Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ приблизно в однаковій мірі (близько 90%) [561, 562]. Відповідні речовини додавали до омиваючого гладеньком'язові препарати розчину Кребса та інкубували їх в проточній системі не менше 20 хв. перед початком реєстрації викликаних скорочень.

Дослідження часових і концентраційних ефектів убаїну на динаміку K^+ -викликаних скорочень гладеньких м'язів *saesum*.

Класичною моделлю у вивченні ефективності електромеханічного шляху спряження при скороченні в ГМ є гіперкалієва контрактура. Відомо, що фізіологічний розчин зі збільшеною концентрацією іонів K^+ викликає деполяризацію ПМ ГМК і, як наслідок, вхід в міоцити позаклітинного Ca^{2+} через ПКК (у ГМ ШКТ це переважно канали L-типу).

Початкові дослідження були проведені із використанням убаїну в концентрації 10 мкМ. Як відомо з досліджень в умовах *in vitro*, ця концентрація алкалоїда пригнічує ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ приблизно на 70% [561, 562].

За присутності убаїну в концентрації 10 мкМ спостерігалось вірогідне пригнічення фазних скорочень на аплікацію гіперкалієвого розчину (80 мМ) (Рис. 7.9). Так, їхня амплітуда знижувалась на $36,15 \pm 3,53\%$ ($n=6$, $p<0,05$) порівняно з контролем, прийнятим за 100%; також спостерігались тенденції до підвищення тонічної складової скорочень. Під дією убаїну відбувались зміни кінетики скорочувальних відповідей: уповільнювалась фаза скорочення, що відображалось у достовірному зменшенні показника максимальної нормованої швидкості V_{nc} (у середньому на $38,62 \pm 11,50\%$, $n=6$, $p<0,05$) та тенденціях до зниження максимальної нормованої швидкості розслаблення V_{nr} (у середньому на $14,10 \pm 5,94\%$, $n=6$, $p>0,05$).

Таким чином, значне, однак неповне інгібування функціональної здатності Na^+, K^+ -АТФ-ази в ПМ супроводжується пригніченням сили та зміною кінетики індукованих K^+ -деполяризацією скорочень ГМ товстого кишечника. Одержані результати добре узгоджуються з даними інших дослідників, що були отримані на препаратах ГМ *ileum* та *taenia coli* мурчаків [568, 582].

У наступній серії експериментів було досліджено закономірності скорочувальної активності кільцевих ГМ *saesum* на в умовах практично повного блокування натрієвої помпи (за впливу 100 мкМ та 200 мкМ

уабаїну, відповідно на 90% і 95% від загальної активності ферменту за даними [561, 562]).

В умовах наступного збільшення концентрації уабаїну (100 мкМ) відбувались аналогічні зміни скоротливих відповідей *саесит* на аплікацію гіперкалієвого розчину (Рис. 7.10). Зокрема, зниження сили фазного скорочення складало у середньому $(86,6 \pm 5,2)\%$ ($p < 0.05$, $n=10$) порівняно з контролем, прийнятим за 100%; мали місце тенденції до зростання тонічної складової скорочень (до $(115,6 \pm 8,3)\%$, $p > 0.05$, $n=10$). Разом з тим, зазначені зміни сили гіперкалієвих скорочень не відобразились на кінетиці розвитку скоротливих відповідей: нормовані максимальні швидкості як V_{nc} , так і V_{nr} залишались на рівні контрольних показників [578].

За умови збільшення концентрації уабаїну в омиваючому гладеньком'язові смужки розчині до 200 мкМ спостерігалось подальше пригнічення K^+ -викликаних скорочень (Рис. 7.10). Фазний компонент скоротливої відповіді знижувався у середньому до $(67,8 \pm 3,9)\%$ ($p < 0.05$, $n=5$), причому вірогідні відмінності виявлено не лише з порівняно групою контролю, але й за дії уабаїну в концентрації 100 мкМ. Тонічне скорочення гіперкалієвої контрактури у присутності 200 мкМ уабаїну зростало до $(154,9 \pm 11,1)\%$ ($p < 0.05$, $n=5$). Також зміни фазного компонента K^+ -викликаних скорочень супроводжувались зниженням нормованої максимальної швидкості фази скорочення (V_{nc}) до $(70,2 \pm 9,7)\%$ ($p < 0.05$, $n=5$). Кінетичні параметри фази розслаблення залишались без змін $(104,7 \pm 8,1\%$, $n=5$, $p > 0.05$).

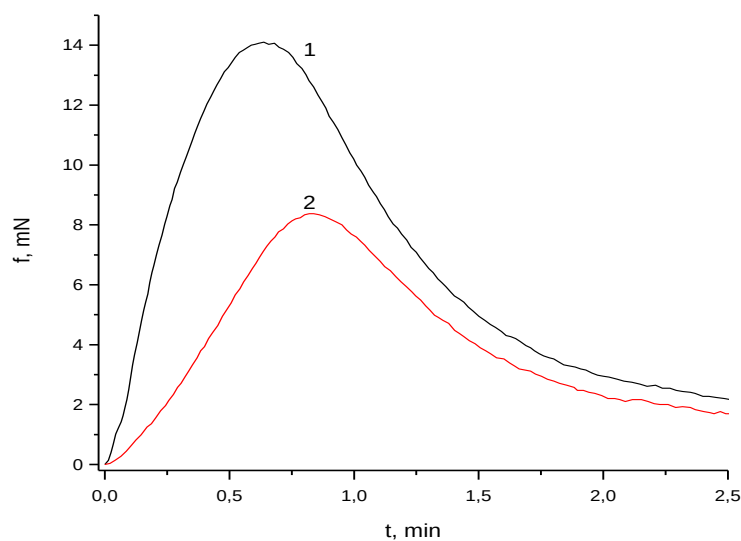


Рис. 7.9. Викликані K^+ -деполяризацією (80 mM) скорочення кільцевих гладеньких м'язів *саесит* щурів у контролі (1) та в умовах попередньої інкубації з калікс[4]ареном С-99 (10 мкМ) (2). Час попередньої аплікації С-99 становив 20-30 хвилин. Наведено типові механограми.

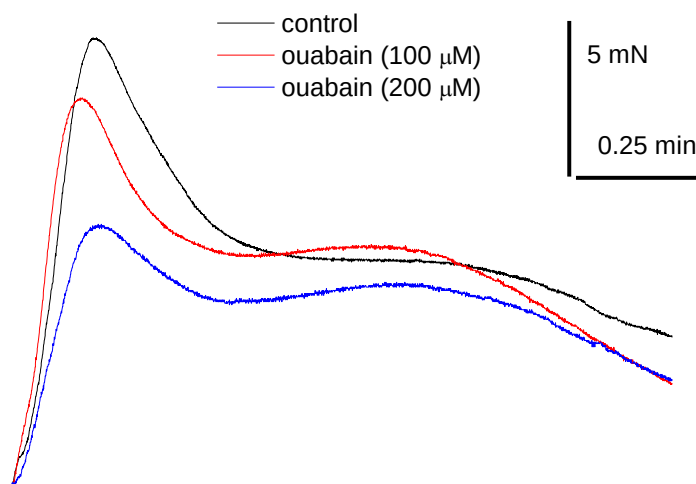


Рис. 7.10. Викликані гіперкалієвим розчином (80 mM) скорочення кільцевих гладеньких м'язів *саесит* щурів в контролі та в умовах кумулятивної дії інгібітора натрієвої помпи плазматичної мембрани убаїну (100 і 200 мкМ). Наведено типові механограми.

Одержані ефекти узгоджуються з нашими попередніми результатами, а також даними досліджень інших авторів [568, 582]. Так, за даними К. Shimizu і колег порушення трансмембранного іонного гомеостазу при дії убаїну на ГМ супроводжується пригніченням K^+ -викликаних скорочень, однак, інформація щодо переважання його інгібіторного впливу на фазну або тонічну складову різноспрямована [568, 580]. Дані С. Barajas-Lopez та J. Huizinga свідчать, що пригнічення убаїном гіперкалієвих скорочень повністю залежать від концентрації іонів Na^+ цілком усувається вилученням цих катіонів з омиваючого ГМ розчину [566].

Вивчення ефектів та механізмів дії калікс[4]арену С-99 на динаміку K^+ -викликаних скорочувальних відповідей гладеньких м'язів саесит. Аплікування гіперкалієвого розчину (80 мМ) після 20-30 хв попередньої інкубації препаратів в розчині Кребса з калікс[4]ареном С-99 (10 мкМ) супроводжувалось достовірним зниженням амплітуди скорочень у середньому на 29 % порівняно з контролем, прийнятим за 100% (табл. 7.1).

Як показав кінетичний аналіз, в умовах дії 10 мкМ калікс[4]арену С-99 значення швидкості V_{nc} достовірно зменшувалось на $(33,4 \pm 11,1)\%$ ($n=6$, $p<0,05$) щодо контролю; показник V_{nr} під впливом калікс[4]арену С-99 знижувався у меншій мірі (на $(15,1 \pm 10,4)\%$, $n = 6$, $p<0,05$). Отже, убаїн та каліксаарен С-99 загалом спричиняють односпрямовану зміну K^+ -індукованих скорочень кільцевих ГМ саесит.

Таблиця 7. 1

Вплив калікс[4]арену С-99 (10 мкМ) на показники амплітуди (f_m) та максимальних нормованих швидкостей фаз скорочення (V_{nc}) і розслаблення (V_{nr}) скоротливих відповідей ГМ саесит, викликаних аплікацією гіперкалієвого розчину (ГКР, 80 мМ) та ацетилхоліну (АХ, 10 мкМ) ($n=5-6$)

	f_m , мН		V_{nc}		V_{nr}	
	контроль	С-99	контроль	С-99	контроль	С-99
ГКР	$17,56 \pm 2,61$	$11,25 \pm 1,46$	$6,71 \pm 0,34$	$4,47 \pm 0,99$	$1,85 \pm 0,09$	$1,57 \pm 0,16$
АХ	$20,2 \pm 2,8$	$15,2 \pm 2,6$	$10,36 \pm 0,61$	$12,14 \pm 0,78$	$1,88 \pm 0,10$	$1,05 \pm 0,08$

У наступній серії експериментів було досліджено ефекти калікс[4]арену С-99 за умови попередньої інкубації ГМ у присутності повного блокування натрієвої помпи ПМ убаїном.

Дія 100 мкМ калікс[4]арену С-99 за умови попередньої інкубації ГМ *saesut* з 100 мкМ убаїну супроводжувалась суттєвими змінами K^+ -викликаних скорочень як порівняно з контролем, так і відносно відповідних ефектів убаїну (Рис. 7.11). Так, порівняно з контролем їх фазний компонент знижувався до $(58,4 \pm 6,8)\%$ ($n=5$, $p<0.05$), а відносний внесок тонічного скорочення навпаки зростав до $(207,1 \pm 12,5)\%$ ($n=5$, $p<0.01$).

Кінетичним аналізом було встановлено, що в умовах комбінованої дії 100 мкМ убаїну і 100 мкМ каліксарену С-99 обидві нормовані максимальні швидкості (V_{nc} та V_{nr}) знижувались приблизно в однаковій мірі: відповідно до $(46,9 \pm 14,3)\%$ і $(56,8 \pm 13,1)\%$, $n=5$, $p<0.05$ порівняно з контрольними показниками. Таким чином, використання калікс[4]арену С-99 на фоні підвищеної концентрації убаїну виявило зниження швидкості наростання та амплітуди фазного скорочення, але, разом з тим – потужне зростання відносного внеску тонічного компоненту в гіперкалієве скорочення та спряжене з ним уповільнення нормованої максимальної швидкості фази розслаблення. Індуковане калікс[4]ареном пригнічення сили фазного скорочення і нормованої максимальної швидкості V_{nc} при K^+ -деполяризації плазматичної мембрани статистично не відрізнявся від ефекту використання 200 мкМ убаїну (Рис. 7.12). Однак, зміни тонічної складової і параметра V_{nr} не можна пояснити лише ланцюгом подій, який запускається при блокуванні натрієвої помпи ПМ.

Відомо, що тонічний компонент K^+ -скорочень товстого кишечника не лише обумовлюється входом іонів Ca^{2+} через ПМК ПМ, але й значно визначається внеском внутрішньоклітинних депо. Зокрема, на препаратах ГМ *taenia coli* показано [580], що аплікування рутенієвого червоного супроводжується потужним зниженням саме тонічної складової гіперкалієвої контрактури, тоді як фазне скорочення при цьому інгібується у значно

меншій мірі. Відомо, що рутенієвий червоний неспецифічно пригнічує функцію Ca^{2+} -транспортувальних систем: блокує TRPA1-канали ПМ (в нашому випадку не є актуальним, бо ці канали активуються при температурах нижче 17 °C), блокує роботу Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій і RyR-каналів СР [583]. Вплив рутенієвого червоного на механокінетику гіперкалієвих скорочень опосередковується його деполаризцією внутрішньої мембрани мітохондрій, тому ймовірно, що підвищення різниці потенціалів на внутрішній мембрані цих органел повинно спричиняти збільшення тонічної складової скоротливих відповідей.

Отже, можна припустити, що зазначені особливості впливу калікс[4]арену С-99 на параметри K^{+} -скорочень, як і у випадку спонтанної скорочувальної активності, зумовлені його гіперполяризуючою дією на внутрішню мембрану мітохондрій. З іншого боку, не можна було виключити вплив калікс[4]арену С-99 на вивільнення іонів Ca^{2+} з ріанодин-чутливого пулу СР, тому також було проведено перевірку цієї гіпотези (результати досліджень наведені нижче).

Вивчення впливу калікс[4]арену С-107 на динаміку K^{+} -викликаних скорочувальних відповідей гладеньких м'язів саесит. Відомо, що калікс[4]арени – макроциклічні сполуки, властивості яких в значній мірі обумовлюються функціоналізацією верхнього і нижнього вінців макроциклу різними групами. Тому для подальшого вивчення закономірностей впливу пригнічення натрієвої помпи калікс[4]аренами на функціонування вісцеральних ГМ нами було вивчено дію калікс[4]арену С107 (здатен ефективно інгібувати натрієву помпу [563, 564]) та його структурної частини фрагменту М3 (ефекторна дія на натрієву помпу не виявлена).

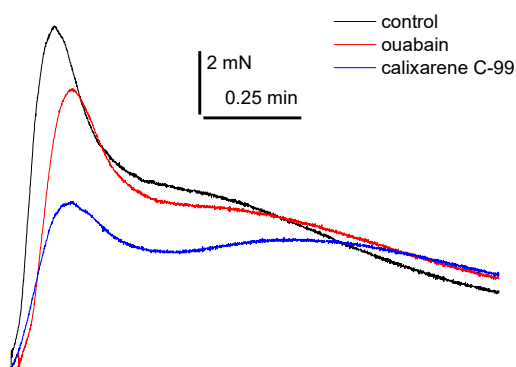


Рис. 7.11. Викликані гіперкалієвим розчином (80 мМ) скорочення кільцевих ГМ *саесит* щурів у контролі та за преінкубації з інгібітором натрієвої помпи убаїном (100 мкМ) та при сукупній дії убаїну (100 мкМ) та калікс[4]арену С-99 (100 мкМ). Наведено типові механограми.

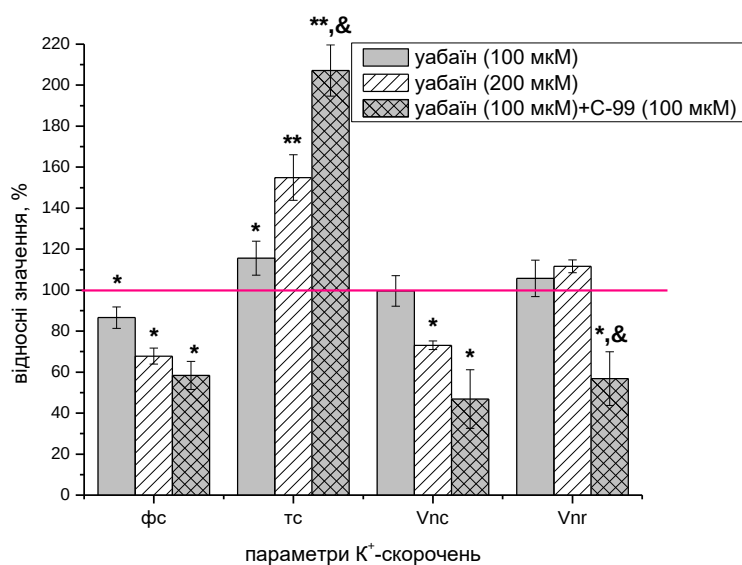


Рис. 7.12. Зміни механокінетичних параметрів скоротливих відповідей, індукованих гіперкалієвим розчином, кільцевих ГМ *саесит* в умовах преінкубації з убаїном (100 та 200 мкМ) та при сукупній дії убаїну (100 мкМ) та калікс[4]арену С-99 (100 мкМ): ФС – фазний компонент скорочення, ТС – відносний внесок тонічного компонента у скоротливу відповідь, V_{nc} – нормована максимальна швидкість фази скорочення, V_{nr} – нормована максимальна швидкість фази розслаблення. Всі параметри виражені у % відносно контролю, прийнятого за 100%., ($M \pm m$; $n=5-7$).
 * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ - зміни вірогідні відносно контролю,
 & - $p < 0.05$ - зміни вірогідні відносно дії 200 мкМ убаїну.

Було встановлено, що як калікс[4]арен С-107, так і його структурний фрагмент М3 вірогідно знижували амплітуду K^+ -індукованих скорочень, (Рис. 7.13), їх ефект був практично однаковим: амплітуда скорочень у присутності С-107 становила $(78,3 \pm 4,6)\%$ ($n=6$, $p<0.05$), у присутності М3 – $(80,0 \pm 4,0)\%$ ($n=6$, $p<0.05$) стосовно контролю, прийнятого за 100 %. Субстанції не змінювали час, в який скорочення досягали максимальної сили, t_m ; це відобразилось у незмінності порівняно з контролем показників нормованих швидкостей фаз скорочення: у присутності С-107 і М-3 вони становили $(99,4 \pm 2,8)\%$ ($n=6$, $p>0.05$) та $(102,3 \pm 4,3)\%$ ($n=6$, $p>0.05$) відповідно.

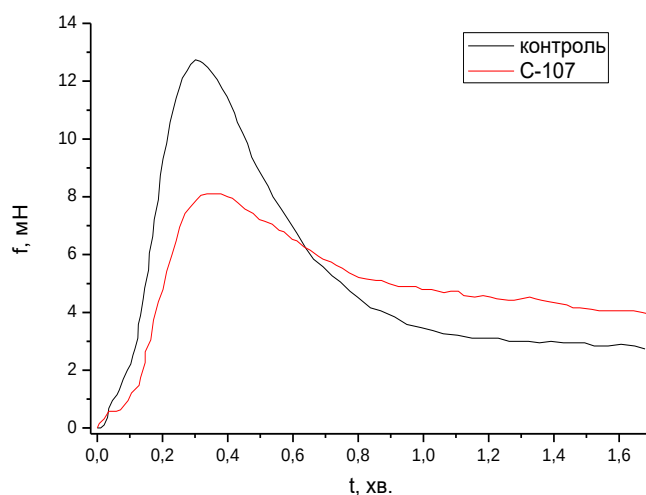


Рис. 7.13. Викликані гіперкалієвим розчином (80 мМ) скорочення кільцевих ГМ *saesut* в контролі, а також за дії калікс[4]арену С-107 (10 мкМ). Наведено типові механограми.

Обидві зазначені сполуки, як і калікс[4]арен С-99, уповільнювали розслаблення ГМ; це супроводжувалось достовірним зниженням показника максимальної нормованої швидкості фази розслаблення V_{nr} : у присутності С-107 і М-3 вони становили $(78,0 \pm 2,1)\%$ ($n=6$, $p<0.05$) і $74,6 \pm 4,6 \%$ ($n=6$, $p<0.05$) відповідно [476].

Дослідженнями наукової групи під керівництвом академіка НАН України С.О. Костеріна було встановлено, що калікс[4]арен С-107, як і калікс[4]арен С-99, здатний спричиняти поляризацію внутрішньої мітохондріальної мембрани, причому показано, що цей ефект напряду

залежить від функціоналізації калікс[4]аренової чаші по верхньому вінцю [560]. Хоча дані щодо можливості впливу фрагменту М-3 на трансмембранний потенціал в мітохондріях натеper відсутні, однак, співставляючи структури калікс[4]аренів С-99, С-107 та М-3, можна передбачити, що зазначена властивість пов'язана з наявністю в їх структурі залишку метилфосфонової кислоти. Тож можна припустити, що особливості впливу (відмінності відносно дії убаїну) не лише калікс[4]арену С-99, але й С-107 та фрагменту М-3 на параметри K^+ -скорочень, зумовлені його гіперполяризуючою дією на внутрішню мембрану мітохондрій.

Вивчення ефектів дії інгібіторів Na^+,K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани на динаміку ацетилхолінових скорочень ГМ товстого кишечника. У наступних серіях експериментів було досліджено вплив суттєвого та повного блокування Na^+,K^+ -АТФ-ази алкалоїдом убаїном, а також встановлено механізми впливу калікс[4]аренів-блокаторів натрієвої помпи (С-99 та С-107) на рецепторкеровані механізми регуляції внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} в ГМ *саесит* щурів. З цією метою реєстрували скорочувальні відповіді гладеньком'язових смужок під дією агоніста мускаринових рецепторів ацетилхоліну.

Як було встановлено, убаїн (концентрація 10 мкМ, час преінкубації 20-30 хв.) здійснював вірогідний пригнічуючий вплив в однаковій мірі на амплітуду як фазного, так і тонічного компоненту ацетилхолінових скорочень. Так, за присутності убаїну їх амплітуда знижувалась у середньому на $(36,3 \pm 8,1)\%$ ($n=6$, $p<0.05$). Варто відзначити, що суттєве блокування Na^+,K^+ -АТФази не відобразилось на кінетичних параметрах агоніст-активованих скорочень: за цих умов обидва параметри максимальних швидкостей не відрізнялись від контрольних значень (Табл 7.1).

Попереднє субмаксимальне блокування натрієвої помпи убаїном у концентрації 100 мкМ (тривалість преінкубації 20 хв.) також супроводжувалось достовірним зниженням фазного компонента

ацетилохолінових скорочень до $(84,1 \pm 7,8)\%$ ($n=10$, $p<0.05$). За цих умов тонічний компонент скорочень залишався без змін $(98,9 \pm 7,3\%$, $n=10$, $p>0.05$).

Варто відзначити, що на відміну від скорочувальних відповідей, індукованих гіперкалієвим розчином, фазні компоненти ацетилхолінових скорочень (агоніст використовували через 20 хв. та через 1 годину від початку дії убаїну) не зазнавали змін при подальшому кумулятивному збільшенні концентрації убаїну до 200 мкМ (Рис. 7.14). За цих умов відносний внесок тонічного компоненту в скоротливу відповідь залишався без змін $(116,8 \pm 9,2$; $n=5$, $p>0.05$). Убаїн не змінював також кінетику ацетилхолінових скорочувальних відповідей ГМ *saesut*: нормовані максимальні швидкості як фази скорочення, так і фази розслаблення залишались на контрольному рівні.

Численним дослідженнями встановлено, що в ГМ товстого кишечника щурів експресуються ацетилхолінові рецептори M_2 - і M_3 -підтипів [150, 151, 513, 525, 569, 571]. Фазний компонент ацетилхолінових скорочень ГМ кишечника обумовлюється активацією M_3 -холінорецепторів (спряженими з G_q -білками), які запускають ланцюг подій: активація фосфоліпази $C\beta$ – синтез ІТФ; у цьому випадку переважним джерелом Ca^{2+} є ІТФ-чутливе депо СР. Тонічний компонент ацетилхолінового скорочення розвивається переважно внаслідок стимулювання агоністами M_2 -холінорецепторів, спряжених з $G_{i/o}$ -білками, що призводить до ланцюга подій: активація катіонної провідності ПМ (вхід іонів Na^+ і Ca^{2+} через неселективні катіонні канали) – деполяризація – активація ПКК L-типу і вхід іонів Ca^{2+} , а також вивільнення кальцію з ріанодин-чутливого (RyR) депо СР.

З даних літератури відомо, що убаїн пригнічує ацетилхолінові скорочення вісцеральних гладеньких м'язів, причому спостерігається переважне інгібування фазного компоненту скорочувальних відповідей [570, 572]. Дослідженнями S. Usune і колег встановлено, що така дія убаїну залежить від внутрішньоклітинної концентрації іонів Na^+ і усувається у присутності блокатора Na^+ -каналів амілориду [573]. На рівні індукованого

карбахоліном (агоністом ацетилхолінових рецепторів, який не розщеплюється ацетилхолінестеразою) зростання внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} , убаїн також суттєво пригнічує фазну складову Ca^{2+} -сигналу. Також у роботі N. Tajima з і колегами показано, що у присутності убаїну відбувається суттєве пригнічення струму через Ca^{2+} -активовані K^{+} -канали великої провідності (BK_{Ca} -канали) [584]. Оскільки в клітинах гладеньких м'язів активація BK_{Ca} -каналів відбувається при RyR -вивільненні іонів Ca^{2+} і супроводжується зниженням напруження м'язів при тонічному скороченні, отримане нами відносне збільшення тонічного компоненту ацетилхолінових скорочень за попереднього блокування натрієвої помпи убаїном може бути пов'язане з пригніченням витоку іонів K^{+} через BK_{Ca} -канали.

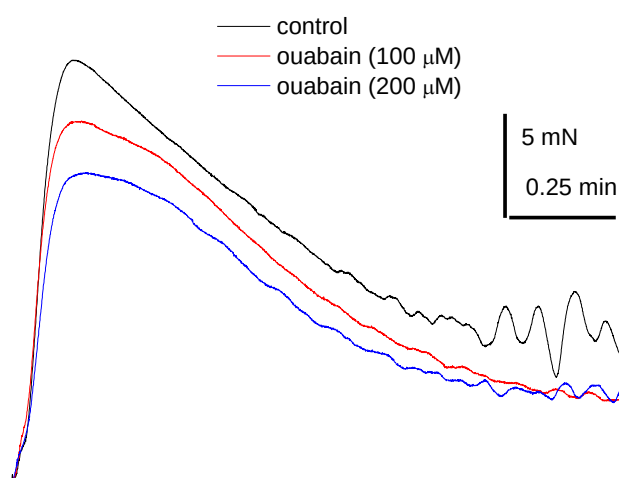


Рис. 7.14. Викликані аплікацією ацетилхоліну (10 мкМ) скорочення кільцевих гладеньких м'язів *saesut* в контролі та в умовах кумулятивної дії інгібітора натрієвої помпи плазматичної мембрани убаїну (100 і 200 мкМ). Наведено типові механограми.

Вивчення ефектів впливу калікс[4]арену С-99 за умови попереднього блокування натрієвої помпи убаїном на динаміку ацетилхолінових скорочень ГМ саесит. Агоніст-викликані скорочення виявились чутливими до дії калікс[4]арену С-99 (100 мкМ) в умовах попереднього блокування Na^+, K^+ -АТФази убаїном (100 мкМ) (Рис. 7.15). Так, амплітуда фазного скорочення знижувалась у середньому до $(48,3 \pm 10,4)\%$ ($n=5$, $p<0.05$) порівняно з контролем, а відносний внесок тонічної складової в ацетилхолінове скорочення в присутності обох речовин зростав до $(206,9 \pm 20,2)\%$ ($n=5$, $p<0.01$).

Розрахунок нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення та розслаблення показав, що V_{nc} мала тенденції до зниження відносно контролю $(76,1 \pm 14,4\%$, $n=5$, $p>0.05$) та не змінилась порівняно з показником в умовах дії лише убаїну, тоді як V_{nr} зменшилась до $(66,4 \pm 10,1)\%$ ($n=5$, $p<0.05$). Порівняно з дією 100 мкМ убаїну, після додавання 100 мкМ С-99 вірогідно знизилась амплітуда фазного ацетилхолінового скорочення, а також збільшились тонічне скорочення та V_{nr} (Рис. 7.16).

Вивчення фармакологічних параметрів дії каліксарену С-99 на ацетилхолінові скорочення ГМ товстого кишечника. З метою розкриття механізмів участі каліксаренів-блокаторів натрієвої помпи в модуляції скорочувальної функції ГМ товстого кишечника, було досліджено закономірності впливу каліксарену С-99 (постійна концентрація 10 мкМ, час попередньої інкубації 20-30 хв) на дозові криві ацетилхолінових скорочень (10^{-9} – 10^{-3} М) препаратів саесит.

За присутності каліксарену С-99 мало місце стабільне вірогідне (у середньому на 30-35%) пригнічення амплітуди скорочень на усьому діапазоні використаних концентрацій агоніста: за низьких концентрацій (10^{-9} – 10^{-7} М) на фоні С-99 не спостерігалось скорочувальних реакцій. Мінімальна ефективна концентрація становила 10^{-6} М. Також показник EC_{50} (концентрація ацетилхоліну, яка спричиняла напівмаксимальне скорочення), під впливом каліксарену С-99 зростала втричі порівняно з контролем.

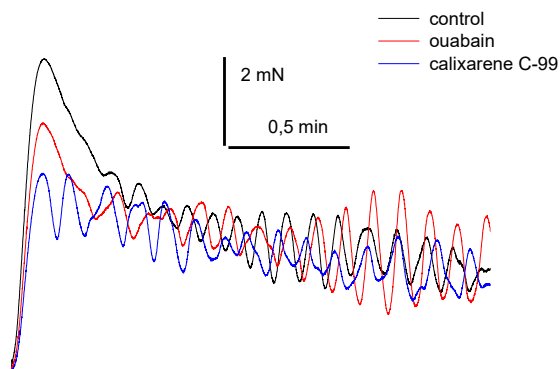


Рис. 7.15. Викликані ацетилхоліном (10 мкМ) скорочення кільцевих ГМ саесит в контролі та за преінкубації з уабаїном (100 мкМ) та при сукупній дії уабаїну (100 мкМ) і каліксарену С-99 (100 мкМ). Наведено типові механограми.

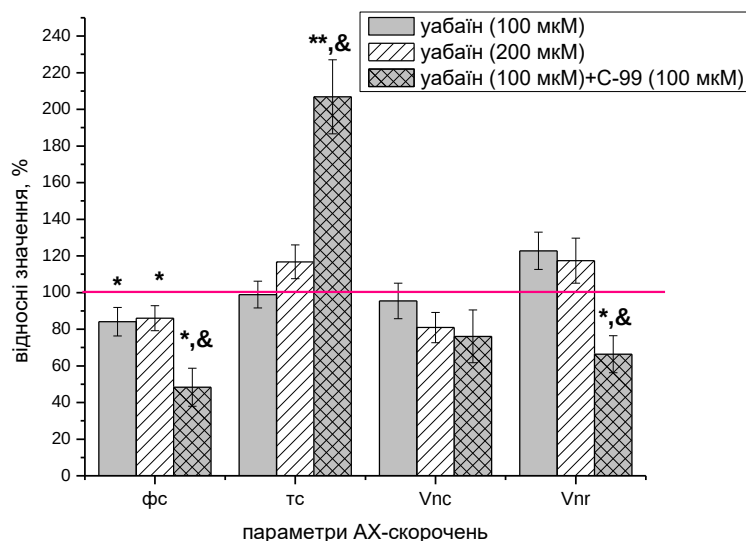


Рис. 7.16. Зміни механокінетичних параметрів ацетилхолінових (10 мкМ) скорочень кільцевих ГМ саесит за преінкубації з уабаїном (100 мкМ – сірі стовпці, 200 мкМ – білі стовпці зі штрихуванням) та при сукупній дії уабаїну (100 мкМ) та каліксарену С-99 (100 мкМ) (сірі стовпці зі штрихуванням): ФС – фазний компонент скорочення, ТС – відносний внесок тонічного компонента у скоротливу відповідь, V_{nc} – нормована максимальна швидкість фази скорочення, V_{nr} – нормована максимальна швидкість фази розслаблення. Всі параметри виражені у % відносно контролю, прийнятого за 100%. Дані усереднені щонайменше з 5 повторів.
 * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ - зміни вірогідні відносно контролю,
 & - $p < 0.05$ - зміни вірогідні відносно дії 200 мкМ уабаїну.

Для встановлення уявної константи інгібування ($I_{0.5}$) та коефіцієнту Хілла (n_H), різницеві значення амплітуди фазних скорочень у контролі (A_0) та за присутності каліксарену С-99 (A) лінеаризували в координатах Хілла ($\lg(A_0 - A)/A$; $\lg[ACh]$). Ці величини для каліксарену С-99 у концентрації 10 мкМ становили: $n_H = (0.63 \pm 0.04)$ та $I_{0.5} = (4.55 \pm 0.23)$ мкМ. Отже, каліксарен С-99 вірогідно пригнічує скоротливі відповіді у всьому діапазоні використаних концентрацій ацетилхоліну, а кількісними показниками ефективності цього процесу є константа інгібування і коефіцієнт Хілла [573].

Також для усього масиву скорочувальних реакцій на ацетилхолін (у контролі та за дії С-99) було визначено показники максимальних нормованих швидкостей V_{nc} та V_{nr} . У випадку фази наростання сили скорочень параметр V_{nc} в контролі логарифмічно зменшувався зі зростанням концентрації нейромедіатора, а його напівмаксимальне значення досягалось при концентрації ефектора (94.6 ± 4.6) мкМ. У випадку присутності в омиваючому розчині 10 мкМ каліксарену С-99 кінетика наростання сили ацетилхолінових скорочень та показник V_{nc} залишалися на рівні контрольних значень.

Як і у випадку показника V_{nc} контрольних скорочень, аналогічні тенденції виявляла залежність нормованої максимальної швидкості розслаблення V_{nr} , а її напівмаксимальне значення спостерігалось в присутності (31.6 ± 2.9) мкМ ацетилхоліну. Таким чином, каліксарен С-99 спричиняв повне пригнічення фази розслаблення гладеньких м'язів товстого кишечника на усьому діапазоні використаних концентрацій нейромедіатора ацетилхоліну (1 нМ – 1 мМ).

7.2.3. Закономірності мобілізації іонів Ca^{2+} з внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо в кільцевих ГМ товстого кишечника за дії каліксарену С-99

Відомо, що фазний компонент ацетилхолінового скорочення ГМ кишечника переважно визначається ефективністю вивільнення іонів з ІТФ-чутливого пулу СР, а у його тонічний компонент робить внесок викид іонів Ca^{2+} з р'янодин-чутливої частини цього депо. Тому ми перевіряли вплив

уабаїну та каліксарену С-99 (обидві речовини в концентрації 100 мкМ) на скорочувальні відповіді, обумовлені виходом кальцію з цих пулів. Для тестування ІТФ-залежного викиду кальцію з СР здійснювали реєстрацію ацетилхолінового скорочення в номінально безкальцієвому розчині.

Було встановлено, що преінкубація з С-99 протягом 30 хв спричиняла вірогідне пригнічення цих скорочень до $(67,3 \pm 9,4)\%$ ($n=5$, $p<0.05$). В аналогічних умовах уабаїн викликав зниження амплітуди скорочень до $(63,7 \pm 11,7)\%$ ($n=5$, $p<0.05$). Між групами різниця була статистично незначущою, отже зниження вивільнення Ca^{2+} з ІТФ-чутливого пулу в умовах дії каліксарену С-99 не може бути причиною описаних вище відмінностей між ацетилхоліновими скороченнями за преінкубації з 200 мкМ уабаїну та 100 мкМ уабаїну і 100 мкМ каліксарену С-99.

Також було встановлено, що каліксарен С-99 (10 мкМ) не змінював кофеїн-індуковані (20 мМ) скорочення ГМ *saesum* (їх амплітуда становила $(100,4 \pm 3,9)\%$; $n=5$, $p>0.05$). Отож каліксарен С-99 не впливає на мобілізацію іонів Ca^{2+} з ріанодин-чутливого пулу СР, тому таким шляхом не міг спричиняти зміну ні K^+ -індукованих, ні ацетилхолінових скорочень.

Таким чином, сукупність одержаних нами даних свідчать, що дія каліксаренів-інгібіторів Na^+ - K^+ -АТФ-ази ПМ, зокрема, каліксарену С-99 та С-107, не в повній мірі відтворює ефекти відомого блокатора цього ензиму уабаїну. Зазначені відмінності свідчать, що вплив каліксаренів на ГМ кишечника не обмежується блокуванням натрієвої помпи ПМ. За сукупністю результатів власних досліджень та даних літератури можна передбачити, що спостережені відмінності обумовлюються мітохондріальною ланкою модуляції внутрішньоклітинного гомеостазу іонів Ca^{2+} .

* * * * *

У розділі досліджено закономірності впливу речовин-інгібіторів натрієвої помпи (каліксаренів С-99 і С-107 та у порівняльному аспекті – відомого інгібітора цього ензиму алкалоїда уабаїну) на спонтанну і

викликану скорочувальну активність вісцеральних ГМ.

Встановлено, що убаїн та каліксарен С-99 (обидві сполуки у концентрації 10 мкМ) змінюють спонтанну скорочувальну активність, спричиняючи вірогідне підвищення амплітуди і частоти скорочень. Обидві сполуки в однаковій мірі спричиняють зниження сили оксиноцинових (0,1 МО) скорочень, викликаючи також пришвидшення наростання сили скорочувальних відповідей (це відобразилось у підвищенні параметра V_{nc}). Каліксарен С-99 і убаїн не змінюють максимальну силу ацетилхолінових (10 мкМ) та K^+ -викликаних (80 мМ) скорочень, не впливаючи на V_{nc} . Чутливість швидкості розслаблення ГМ за дії убаїну і каліксарену С-99 залежить від характеру стимулювання скоротливих відповідей: у випадку окситоцинових скорочень знижується, а для K^+ -викликаних скорочень – залишається без змін. Можна передбачити, що ефект каліксарену С-99 на функціонування ГМ міометрія щурів в начній мірі є подібним до дії убаїну і опосередковується інгібуванням Na^+ , K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани.

Як і у випадку ГМ міометрія, блокування натрієвої помпи убаїном і каліксареном С-99 (обидві сполуки у концентрації 10 мкМ) спричиняло активуючу дію на спонтанну скорочувальну активність гладеньких м'язів *саесит*. Встановлено, що додавання 100 мкМ убаїну до омиваючого гладеньком'язові смужки *саесит* розчину супроводжується підвищенням базального напруження препаратів, а також збільшенням амплітуди і частоти їх спонтанних скорочень; наступне кумулятивне підвищення концентрації убаїну до 200 мкМ не спричинє вірогідних змін (відносно параметрів скорочень у присутності 100 мкМ) спонтанної скорочувальної активності. У стаціонарних умовах блокування натрієвої помпи убаїном (100 мкМ), каліксарен С-99 (100 мкМ) здатний додатково активувати спонтанну скорочувальну активність ГМ *саесит*. Базуючись на власних результатах, а також даних літературних джерел, можна передбачити, що активаційний ефект каліксарену С-99 на спонтанні скорочення інтестинальних ГМ пов'язаний зймовірною дією на ІСС, зокрема на потенціал внутрішньої

мембрани мітохондрій цих клітин.

У порівняльному аспекті було досліджено вплив інгібіторів натрієвої помпи ПМ (відомого серцевого глікозиду - убаїну, а також каліксаренів С-99 і С-107) на силові характеристики та кінетичні параметри викликаних скорочень м'язів *saesum*. Встановлено, що убаїн та каліксарен С-99 (в концентрації 10 мкМ) загалом спричиняють односпрямовану зміну K^+ -індукованих скоротливих відповідей кільцевих м'язів *saesum*. Виявлено, що використання підвищеної концентрації каліксарену С-99 (100 мкМ) на фоні убаїну (100 мкМ) спричиняло зниження швидкості наростання та амплітуди фазного скорочення, але, разом з тим – потужне зростання відносного внеску тонічного компонента в гіперкалієве скорочення та спряжене з ним зниження V_{nr} . Індуковане С-99 пригнічення сили фазного скорочення і V_{nc} при K^+ -деполяризації не відрізнялись від ефекту використання 200 мкМ убаїну. Однак, зміни тонічної складової і параметра V_{nr} не можна пояснити лише ланцюгом подій, який запускається при блокуванні натрієвої помпи; ймовірно, що зазначені особливості впливу каліксарену С-99 на параметри K^+ -скорочень, як і у випадку спонтанних скорочень, зумовлені його гіперполяризуючою дією на внутрішню мембрану мітохондрій.

Встановлено, що убаїн (10 мкМ) здійснював вірогідне пригнічення амплітуди ацетилхолінових скорочень; обидва параметри нормованих максимальних швидкостей (V_{nc} та V_{nr}) не відрізнялись від контролю. Субмаксимальне блокування натрієвої помпи убаїном (100 мкМ) також супроводжувалось достовірним зниженням фазного компонента скорочень, тоді як тонічний компонент скорочень залишався без змін. На відміну від скорочувальних відповідей, індукованих гіперкалієвим розчином, фазні компоненти ацетилхолінових скорочень не зазнавали змін при подальшому кумулятивному збільшенні концентрації убаїну до 200 мкМ. За цих умов відносний внесок тонічного компонента в скоротливу відповідь був на контрольному рівні. Убаїн не змінював також кінетику ацетилхолінових скорочувальних відповідей ГМ *saesum*.

Агоніст-викликані скорочення виявились чутливими до дії каліксарену С-99 (100 мкМ) в умовах попереднього блокування Na^+, K^+ -АТФази убаїном (100 мкМ): порівняно з дією 100 мкМ убаїну, після додавання 100 мкМ С-99 вірогідно знизилась амплітуда фазного ацетилхолінового скорочення, а також збільшились тонічне скорочення та $V_{\text{пр}}$. Для тестування ІТФ-залежного викиду кальцію з СР здійснювали реєстрацію ацетилхолінового скорочення у безкальцієвому розчині. В обох випадках спостерігали пригнічення, втім між групами різниця була статистично незначущою, отже зниження вивільнення Ca^{2+} з ІТФ-чутливого пулу в умовах дії каліксарену С-99 не може бути причиною описаних вище відмінностей між ацетилхоліновими скороченнями за дії убаїну і каліксарену С-99.

З метою розкриття механізмів участі каліксаренів-блокаторів натрієвої помпи в модуляції скорочувальної функції ГМ товстого кишечника, було досліджено закономірності впливу каліксарену С-99 (10 мкМ, час попередньої інкубації 20-30 хв) на дозові криві ацетилхолінових скорочень ($10^{-9} - 10^{-3}$ М) препаратів *saesit*. Встановлено, що мінімальна ефективна концентрація цього агоніста зростала на 3 порядки порівняно з контрольними умовами експерименту (до 10^{-6} М). Також показник EC_{50} , під впливом каліксарену С-99 втричі зростала порівняно з контролем. Величини уявної константи інгібування ($I_{0.5}$) та коефіцієнту Хілла (n_H) для каліксарену С-99 у концентрації 10 мкМ становили відповідно: $n_H = (0,63 \pm 0,04)$ та $I_{0.5} = (4,55 \pm 0,23)$ мкМ. Каліксарен С-99 (10 мкМ) спричиняв повне пригнічення фази розслаблення ГМ товстого кишечника на усьому діапазоні використаних концентрацій нейромедіатора ацетилхоліну (1 нМ – 1 мМ).

Встановлено, що убаїн і каліксарен С-99 в однаковій мірі пригнічують мобілізацію іонів Ca^{2+} з ІТФ-чутливого пулу, але обидві ці сполуки не впливають на ріанодин-чутливий пул СР.

Результати, викладені у розділі, опубліковані у наступних роботах: [476, 513, 568, 578].

РОЗДІЛ 8

ЗАКОНОМІРНОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ВІСЦЕРАЛЬНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ В УМОВАХ ХРОНІЧНОГО ІНГІБУВАННЯ *IN* *VIVO* Na^+, K^+ -АТФ-ази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ

Наступний комплекс експериментів, результати яких наведені в даному розділі, стосувався встановлення (у порівняльному аспекті з убаїном) здатності каліксаренів-інгібіторів натрієвої помпи плазматичної мембрани (на прикладі каліксарену С-107) зберігати свою активність в організмі при хронічному надходженні: по-перше, безпосередньо щодо ензиму $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -АТФ-ази, та, по-друге, щодо механокінетики вісцеральних ГМ.

8.1. Порівняльне вивчення в дослідях *in vitro* та *in vivo* впливу убаїну, каліксарену С-107 та фрагменту М-3 на активність Na^+, K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани

8.1.1. Дослідження *in vitro*.

У цьому циклі дослідів було проведено перевірку здатності каліксарену С-107 та його фрагменту М-3 до блокування натрієвої помпи препаратів ПМ гепатоцитів щурів. Для цього було порівняно показники АТФ-азної активності у контролі та за умов додавання до середовища інкубації мембран класичного інгібітора Na^+, K^+ -АТФ-ази убаїну та зазначених речовин (всі речовини використовували у концентрації 1 мМ) (рис. 8.1).

При визначенні АТФ-азної активності препаратів ПМ печінки інтактних щурів виявилось, що загальна $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азна активність становить $(418,7 \pm 16,7)$ нмоль Φ_i /хв.·мг білка, а при додаванні 1 мМ убаїну ферментативна активність зменшується до $(331,5 \pm 12,4)$ нмоль Φ_i /хв.·мг білка; це – базальна (убаїн-нечутлива) Mg^{2+} -АТФ-азна активність ($n = 6$). Таким чином, усереднені показники убаїн-чутливої Na^+, K^+ -АТФ-азної активності становили близько 21% від загальної активності препаратів. У випадку заміни убаїну каліксареном С-107 в аналогічній концентрації (1мМ)

базальна (каліксарен-нечутлива) Mg^{2+} -АТФ-азна активність становила $(341,0 \pm 11,3)$ нмоль Φ_i /хв.·мг білка ($n = 6$), тобто у перерахунку на відсотки, коли прийняти базальну активність за 100%, каліксарен-чутлива Na^+, K^+ -АТФ-азна активність була на рівні 19% (рис. 8.1).

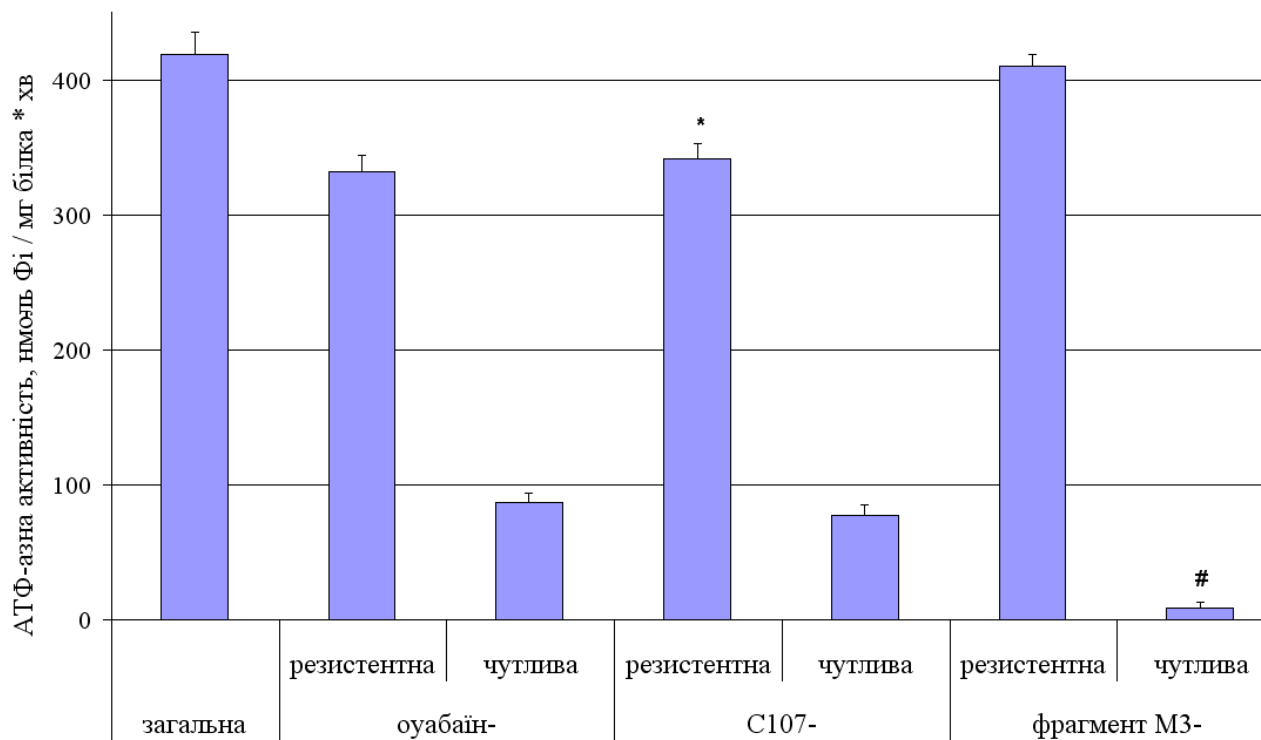


Рис. 8.1. Порівняльний аналіз дії уабаїну, каліксарену С-107 та його структурного фрагменту М-3 на активність загальної Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТФ-ази, базальної уабаїн- / каліксарен С-107- / фрагмент М-3-нечутливої Mg^{2+} -АТФ-ази та уабаїн- / каліксарен С-107- / фрагмент М-3-чутливої Na^+, K^+ -АТФ-ази *invitro* (нмоль Φ_i / мг білка * хв) у плазматичних мембранах гепатоцитів щурів ($M \pm m$; $n = 6$).

* - відмінності відносно загальної Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТФ-ази достовірні ($p < 0.05$),

- відмінності відносно уабаїн-чутливої Na^+, K^+ -АТФ-ази достовірні ($p < 0.05$).

Таким чином, можна відзначити, що поміж групами даних, одержаних після додавання уабаїну та каліксарену С-107, вірогідних відмінностей виявлено не було як для Na^+, K^+ -АТФ-азної, так і для Mg^{2+} -АТФ-азної активностей ($p > 0.05$). У випадку внесення у середовище інкубації за аналогічних умов 1 мМ розчину фрагменту М-3 значення АТФ-азної становило (410.1 ± 8.9) нмоль Φ_i /хв.·мг білка ($n=6$); статистичний аналіз не

виявив вірогідних відмінностей між показниками активностей у зазначеному випадку та у випадку контролю ($p > 0.05$) (рис. 8.1).

Отже, результати вищеописаних досліджень, що були одержані у дослідях *in vitro* на препаратах ПМ гепатоцитів щурів, повністю відтворюють тенденції результатів *in vitro*, які були одержані при використанні фракції ПМ міоцитів матки свині групою дослідників під керівництвом академіка НАН України С.О. Костеріна [563, 564].

8.1.1. Дослідження *in vivo*.

Порівняльний ефект хронічного ін'єктування (протягом 6,5 місяців) інгібіторів натрієвої помпи убаїну і каліксарену С-107 та його структурного фрагменту М-3 на активність Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ клітин печінки щура вивчали із використанням 5 груп тварин: інтактні щури (група № 1); щури, яким ін'єктували фізіологічний розчин (0,9% NaCl) (група № 2); та відповідні речовини, розведені в фізіологічному розчині: убаїн (група №3); каліксарен С-107 (група № 4); фрагмент М-3 (група № 5).

Розпочинаючи опис результатів досліджень *in vivo*, варто зупинитись на деяких моментах, які виявлялись на підготовчому етапі експериментів. За нашими спостереженнями тривале застосування убаїну (група тварин № 3) та еквімолярних кількостей каліксарену С-107 (група тварин № 4) і його фрагменту М-3 (група тварин № 5) у дослідях *in vivo* не викликало загибелі тварин. Разом з тим, щури, на яких вивчали дію каліксарену С-107 (група тварин № 4), і фрагменту М-3 (група тварин № 5), характеризувались підвищеним нервовим збудженням, яке виражалось у хаотичних рухах; також ці групи виявляли підвищений апетит. Разом з тим, тварини, яким ін'єктували розчини каліксарену С-107 (група тварин № 4) і фрагменту М-3 (група тварин № 5), мали знижену масу тіла (особливо остання група), а група щурів, до якої застосовували убаїн (група тварин № 3), мала деякі тенденції до зниження ваги.

Звертає на себе увагу обставина, що маса печінки різних груп тварин не мала достовірної різниці, а у випадку печінки щурів, яким ін'єктували каліксарен (група тварин № 4), візуально спостерігали пожовтіння цього органу. Також при проведенні препаративних процедур по виділенню фракції плазматичних мембран виявилися і деякі відмінності. Як згадувалось вище (див. розділ 2 «Матеріали і методи»), препарати плазматичних мембран клітин печінки отримували за методом Song [392], який передбачає центрифугування гомогенату печінки в градієнті щільності сахарози (відповідно 70,74%, 48,45% та 42,9% сахарози), причому фракція плазматичної мембрани міститься у зоні між другим та третім розчинами сахарози. У випадку гепатоцитів щурів з груп контролю (групи тварин № 1 та 2), а також тварин, ін'єктованих убаїном (група тварин №3) та фрагментом М-3 (група тварин № 5), локалізація фракції ПМ мала чіткі межі, тоді як у випадку препаратів печінки щурів, яким ін'єктовали розчин каліксарену С-107 (група тварин № 4), візуально відрізнялася розмитими межами.

Після хронічного ін'єктування щурам розчинів ДМСО, убаїну (група тварин № 3), С-107 (група тварин № 4) та М-3 (група тварин № 5) було проведено вимірювання загальної, убаїн/каліксарен-нечутливої базальної Mg^{2+} -АТФ-азної та убаїн/каліксарен-чутливої Na^+, K^+ -АТФ-азної активностей препаратів ПМ гепатоцитів.

У випадку ін'єктування ДМСО зазначені показники активностей не виявляли вірогідних відмінностей порівняно з групою інтактного контролю (групи тварин № 1 та 2) ($p > 0.05$), а убаїн-чутлива Na^+, K^+ -АТФ-азна активність становила $(85,5 \pm 7,4)$ нмоль Φ_i /хв. · мг білка ($n = 5$), тобто близько 20% відносно загальної АТФ-азної активності, прийнятої за 100%. Препарати плазматичних мембран клітин печінки щурів, яких тривалий час ін'єктували убаїном (група тварин № 3), характеризувались загальною АТФ-азною активністю на рівні контрольних значень $(424,1 \pm 11,2)$ нмоль Φ_i /хв. · мг білка, $n=5$); вірогідних відмінностей відносно контролів не було виявлено ($p > 0.05$). Убаїн-нечутлива базальна Mg^{2+} АТФ-азна активність характеризувалась

статистично достовірним зростанням порівняно з контролем (Рис. 8.2). Убаїн-чутлива Na^+, K^+ -АТФ-аза ПМ печінки щурів цієї групи, була вірогідно пригнічена і становила у середньому близько 15% відносно цього показника у тварин з груп 1 і 2 [585].

Також здійснювали аналіз ферментативної активності препаратів ПМ клітин печінки щурів після циклу ін'єктування каліксареном С-107 (група тварин № 4). Як згадувалось вище, фракція мембран при центрифугуванні візуально відрізнялась порівняно з іншими, що може свідчити про зміну фізико-хімічних властивостей ПМ гепатоцитів, обумовлену тривалим впливом каліксарену. Також зміни (порівняно з контролем, $p < 0.05$) були виявлені для показників убаїн-нечутливої базальної Mg^{2+} -АТФ-азної активності: у даному випадку вона становила $(220,3 \pm 6,1)$ нмоль $\Phi_i/\text{хв} \cdot \text{мг}$ білка, ($n=6$, порівняно з контролем $p < 0.05$). Що ж стосується убаїн-чутливої Na^+, K^+ -АТФ-азної активності, то вона була повністю пригнічена (Рис. 8.2). Таким чином, ефект каліксарену С-107 щодо блокування убаїн-чутливої натрієвої помпи, викликаний *in vitro*, відтворювався також в експериментах *in vivo*. Втім, відомо, що у ПМ гепатоцитів наявна також і убаїн-нечутлива натрієва помпа [18].

Препарати ПМ гепатоцитів, виділених зі щурів, ін'єктованих речовиною М-3, мали тенденцію до зниження загальної АТФ-азної активності $(390,0 \pm 29,2)$ нмоль $\Phi_i/\text{хв} \cdot \text{мг}$ білка, $n=5$) порівняно з контролем, яка однак не була підтверджена статистично ($p > 0.05$). Разом з тим, АТФ-азна активність у фракції плазматичних мембран зберігала чутливість до убаїну: Na^+, K^+ -АТФ-азна активність у даному випадку варіювала в межах $(85,3 \pm 8,2)$ нмоль $\Phi_i/\text{хв} \cdot \text{мг}$ білка, $n=5$. Ці показники, при їх нормалізації відносно загальної АТФ-азної активності, повторюють тенденції, властиві для контрольних параметрів. Отже, у випадку використання *in vivo*, фрагмент М-3, як і випадку *in vitro*, також не впливає на функціонування натрієвої помпи [585].

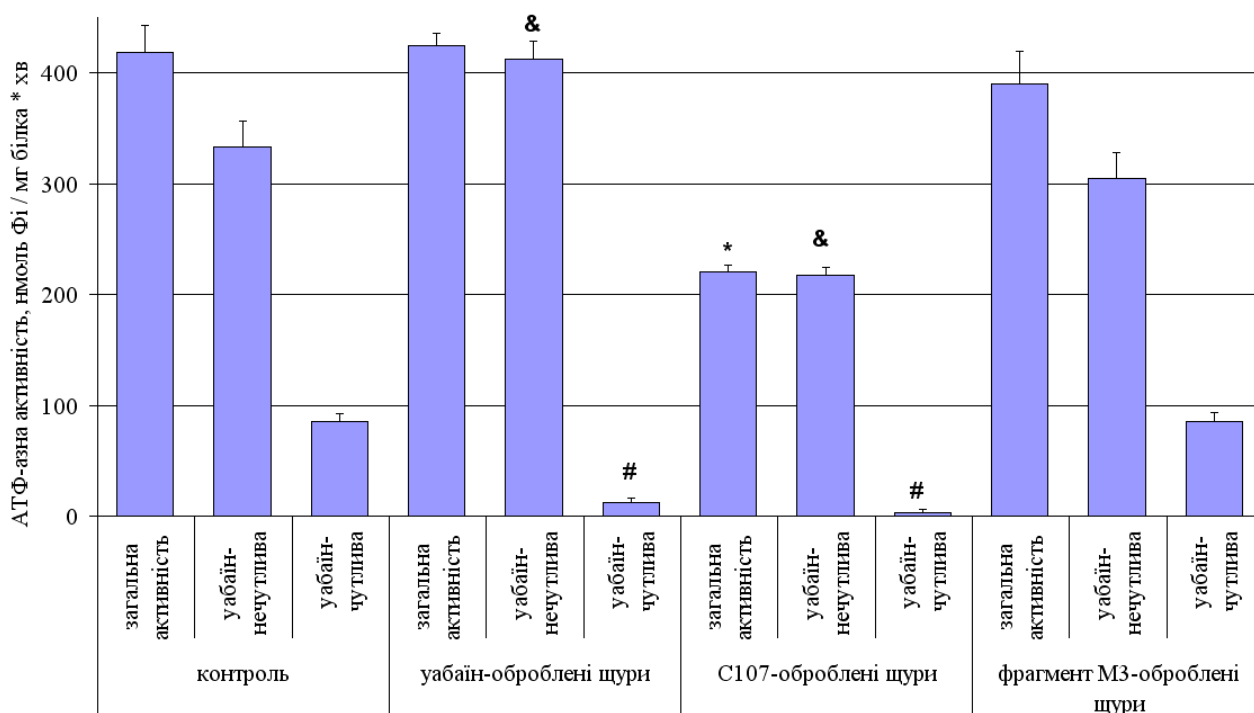


Рис. 8.2. Порівняльний аналіз активностей: загальної Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТФ-ази, базальної уабайн-нечутливої Mg^{2+} -АТФ-ази та уабайн-чутливої Na^+, K^+ -АТФ-ази (нмоль Φ_i / мг білка $\cdot$ хв) у плазматичних мембранах гепатоцитів щурів за умови хронічної дії уабайну (група №3), каліксарену С-107 (група №4) та його структурного фрагменту М-3 (група №5) *in vivo* ($M \pm m$; $n = 5-6$); за контроль прийнято показники в ДМСО-оброблених щурів (група №2).

* - відмінності стосовно загальної Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТФ-ази щурів групи 2 достовірні ($p < 0.05$),

& - відмінності стосовно базальної уабайн-нечутливої Mg^{2+} -АТФ-ази щурів групи 2 достовірні ($p < 0.05$),

- відмінності стосовно уабайн-чутливої Na^+, K^+ -АТФ-ази щурів групи 2 достовірні ($p < 0.05$).

Проаналізуємо вищенаведені експериментальні дані. Але, перш за все, варто звернути увагу на наступне. Як відомо, за останні декілька десятиріч роль уабайну була радикально переглянута після відкриття ендогенних уабайноподібних сполук, які на теперішній час прийнято класифікувати як стероїдні гормони [185]. Відомо, що ці речовини в організмі ссавців синтезуються в мозку та наднирниках. Ендогенний уабайн значно активніший порівняно з фармакологічним аналогом, а його фізіологічні концентрації становлять 0.3 – 0.9 нМ. Численними дослідженнями встановлено, що

підвищення рівня убаїну вище критичної межі супроводжується патологічними проявами, найбільш показовим з яких є розвиток гіпертензії за безпосередньої участі сигналом натрієвої помпи [205]. При цьому, за умови підвищеного рівня серцевих глікозидів Na^+, K^+ -АТФ-аза активність різних тканин змінюється різнонаправлено (активується, залишається без змін та пригнічується); також напрямок зміни активності цього ферменту в одних і тих же тканинах залежить від тривалості дії убаїну [586, 587].

Ми використовували концентрацію убаїну, яка, за умови тривалого введення в організм щурів [588], викликає розвиток гіпертензії. Що стосується печінки, то цей орган досить цікавий з точки зору функціонування натрієвої помпи. По-перше, транспорт жовчі тут частково спряжений з транспортом іонів Na^+ і, таким чином чутливий до функціонування натрієвої помпи [589]. По-друге, клітини печінки є унікальними порівняно з іншими тканинами відносно β -субодиниці (тут у великій кількості експресується β_3 -субодиниця) [590]. І врешті, по-третє, убаїн транспортується специфічним для клітин печінки (і для деяких інших тканин, зокрема, мозку і нирок) транспортером родини oatp [591, 592] у формі комплексів з компонентами жовчі [593]. Дослідами на ізольованій печінці показано, що при її інфузії убаїном спостерігається холерез і посилення екскреції електролітів з жовчу; при цьому убаїн концентрується в печінці (співвідношення концентрацій печінка / перфузат = 30) та в жовчі (співвідношення концентрацій жовч / печінка = 15) [593].

Варто зазначити, що у дослідах з хронічного ін'єктування щурів дігоксином було виявлено збільшення маси тіла тварин (такого ефекту в наших дослідженнях не спостерігалось), а також кількості Na^+, K^+ -АТФ-ази в мембранах гепатоцитів [594]. Однак, варто прийняти до уваги, по-перше, що дігоксин вважають антагоністом до убаїну: він має протилежний, антигіпертензивний ефект, тому не можна використовувати ці дані для інтерпретації отриманих нами результатів.

Отже, ефект пригнічення АТФ-азної активності ПМ гепатоцитів при ін'єктуванні убаїном може бути викликаний декількома факторами. По-перше, можливо у такому режимі введення убаїну дійсно має місце блокування натрієвої помпи підвищеними концентраціями цієї речовини. На користь цієї гіпотези, зокрема, свідчать результати експериментів [595, 596], згідно з якими активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази різних тканин щура (зокрема, і печінки) вірогідно (з різницею амплітуд активностей у два рази) варіює протягом доби і це пов'язано з такими ж ритмами зростання рівня ендогенного убаїну в судинному руслі. Тобто фізіологічне коливання концентрації ендогенного убаїну викликає пригнічення натрієвої помпи принаймні у два рази. По-друге, ймовірно, проведений цикл тривалого ін'єкування тварин режим викликав зміни співвідношення експресії різних ізоформ субодиниць цього ферменту, і такі зміни могли також відбутись в тканинах печінки. Врешті, ймовірно, що у процесі препаративних процедур значні концентрації убаїну, які повинні були міститись в гомогенаті, могли внести значний вклад у пригнічення Na^+ , K^+ -АТФ-ази.

Також можна припустити, що при хронічному використанні підвищених концентрацій убаїну виникав гіпертонічний ефект (на жаль, у процесі проведення експерименту ми не мали змогу реєструвати тиск у тварин). За цих умов убаїн через сигналосоми повинен спричиняти підвищення рівня ендотеліну-1 в плазмі крові, тому, як наслідок, міг призводити до зниження кровопостачання печінки та поглинання кисню її клітинами [591, 597, 598]. Відомо, що при гіпоксичних станах в мембранах гепатоцитів значно пригнічується активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази аж до повної її втрати (але без зміни мембранного потенціалу) [599]. Таким чином, не можна виключати, що часткове пригнічення Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності за даних умов могло спричинятись такими гіпоксичними ефектами.

Разом з тим, для убаїн-оброблених щурів (група 3) варто відмітити деяке підвищення рівня базальної Mg^{2+} -АТФ-азної активності, яке, можливо, в клітинах печінки має адаптаційний характер. Варто також згадати про

наявність у ПМ багатьох тканин щура K^+ - і убаїн-нечутливої Na^+ -АТФ-ази, що транспортує іони Na^+ симпортно з Cl^- з клітини, активність якої становить близько 25 % від активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази [595]; як згадувалось вище, вона виконує адаптаційну функцію при добових коливаннях ендогенних убаїноподібних речовин. Можна припустити, що зміна кількості та/або активності цього чутливого до внутрішньоклітинної концентрації іонів Na^+ фермента, у випадку блокування Na^+ , K^+ -АТФ-ази, може компенсувати транспорт натрію і здійснювати вклад в рівень базальної Mg^{2+} -АТФ-азної активності гепатоцитів.

Варта уваги особливість дії С-107: поряд із блокуванням натрієвої помпи ця речовина зумовлювала значне (в два рази) зниження загальної АТФ-азної активності фракції ПМ гепатоцитів. Такий ефект може бути пов'язаний, зокрема зі здатністю багатьох каліксаренів взаємодіяти з ліпідами мембран [600]. Таким чином, можна припустити, що молекулярні механізми взаємодії та впливу досліджених речовин (убаїну та каліксарену С-107) на натрієву помпу в умовах *in vivo* не ідентичні. Але наші дослідження доводять, що каліксарен С-107 зберігає свої інгібіторні якості щодо Na^+ , K^+ -АТФ-ази в умовах цілісного організму.

8.2. Порівняльне вивчення в дослідах *in vivo* впливу убаїну, каліксарену С-107 та фрагменту М-3 на скорочувальну активність ГМ товстого кишечника

Для з'ясування особливостей хронічного впливу підвищених концентрацій убаїну та каліксарену С-107 на функціонування вісцеральних ГМ було обрано класичні ефектори, які ефективно моделюють пряження збудження-скорочення у ГМ: гіперкалієвий розчин (80 мМ) та нейромедіатор ацетилхолін (10^{-5} М).

Як видно з рис. 8.3, K^+ -індуковані скорочувальні відповіді гладеньком'язових препаратів, одержаних від тварин різних груп,

відрізнялись за окремими кінетичними параметрами. Кінетичні параметри скорочень препаратів, отриманих від щурів груп №1 та №2 (інтактні і тварини, яким вводили розчин ДМСО) не відрізнялись. Скорочення препаратів *saesum* щурів, яким вводили убаїн (група № 3), мали показники V_{nc} та V_{nr} , які статистично не відрізнялись від контрольних ($p > 0.05$). У випадку K^+ -викликаних скорочень препаратів від тварин групи №4 (оброблені каліксареном С-107), максимальна нормована швидкість фази скорочення V_{nc} мала тенденції до зниження, які не були підтвердженні статистично ($87,1 \pm 14,6 \%$, $n = 6$, $p > 0.05$), а відповідний показник для фази розслаблення вірогідно знижувався ($58,8 \pm 14,5 \%$, $n = 6$, $p < 0.05$). Присутність у організмі щурів фрагменту М-3 супроводжувалась вірогідним зниженням показників як V_{nc} так і V_{nr} на $(74,2 \pm 15,2)\%$ ($n = 6$, $p < 0.05$) та $(64,7 \pm 12,7)\%$ ($n = 6$, $p < 0.05$) відповідно.

Отже, такі результати в умовах хронічної дії речовин *in vivo* переважно відтворюють тенденції змін скорочувальної функції *saesum* при їх аплікуванні *in vitro* [476, 601].

Нормована максимальна швидкість V_{nc} ацетилхолін-індукованих скорочень препаратів, одержаних від тварин груп №3-5, не зазнавала змін порівняно з контролем (рис. 8.4).

Показники V_{nr} цих скоротливих відповідей достовірно варіювали у різних групах: в групі №3 вони залишались на рівні контролю ($85,7 \pm 16,7 \%$, $n = 6$, $p > 0.05$), а в групах №4 і 5 знижувались до $(64,3 \pm 8,3)\%$ ($n = 6$, $p < 0.05$) та $(82,1 \pm 8,7)\%$ ($n = 6$, $p < 0.05$) відповідно. Такий ефект досліджених речовин цілком повторює тенденції результатів наших дослідів по їх короткочасному аплікуванню на ізольованих смужках *saesum*.

Отже, якщо співставити результати дослідження *in vitro* з даними експериментів *in vivo*, то можна стверджувати, що обидві речовини (каліксарен С-107 та його фрагмент М-3) переважно (крім V_{nc} K^+ -індукованих скорочень групи №5) не впливають на показники нормованих максимальних швидкостей V_{nc} K^+ - і ацетилхолін-викликаних скорочень, але

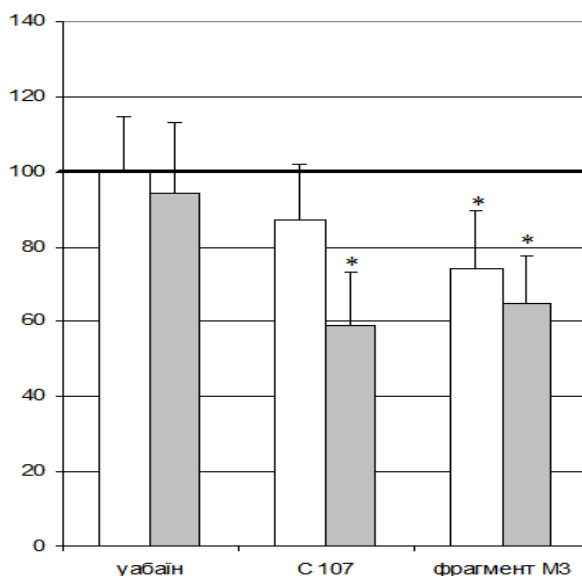


Рис. 8.3. Вплив уабаїну, каліксарену С-107 і його фрагменту М-3 в умовах *in vivo* на механокінетичні параметри викликаних гіперкалієвим розчином (80 мМ) скорочень кільцевих ГМ *саесит* щурів: білі стовпці - максимальна нормована швидкість фази скорочення (V_{nc}), сірі стовпці - максимальна нормована швидкість фази розслаблення (V_{nr}). Дані представлені як $M \pm m$ ($n=6$); за 100 % були прийняті контрольні значення відповідних параметрів;
* - відмінності стосовно загальної контролю достовірні ($p < 0.05$).

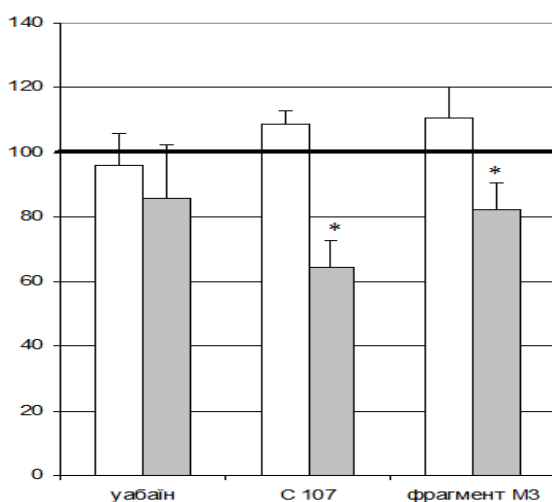


Рис. 8.4. Вплив уабаїну, каліксарену С-107 і його фрагменту М-3 в умовах *in vivo* на механокінетичні параметри викликаних ацетилхоліном (10 мкМ) скорочень кільцевих ГМ *саесит* щурів: білі стовпці - максимальна нормована швидкість фази скорочення (V_{nc}), сірі стовпці - максимальна нормована швидкість фази розслаблення (V_{nr}). Дані представлені як $M \pm m$ ($n=6$); за 100 % були прийняті контрольні значення відповідних параметрів;
* - відмінності стосовно загальної контролю достовірні ($p < 0.05$).

ефективно пригнічують V_{nr} . Тож як каліксарен С-107, так і його структурна частина М-3 зберігають свій специфічний, відмінний від убаїну, ефект на гладеньком'язові смужки *saesum*.

* * * * *

У даному розділі здійснено тестування здатності інгібіторів натрієвої помпи ПМ (на прикладі каліксарену С-107 та в порівняльному аспекті - убаїну) зберігати свою активність в організмі при хронічному надходженні.

1. Показано, що калікс[4]арен С-107 зберігає свої інгібіторні якості щодо Na^+, K^+ -АТФ-ази в умовах цілісного організму. Встановлено, що цей калікс[4]арен в умовах хронічного впливу *in vivo* (6,5 місяців) спричиняє пригнічення убаїн-чутливої Na^+, K^+ -АТФ-азної активності препаратів плазмалеми гепатоцитів щурів. У випадку використання *in vivo*, структурний фрагмент калікс[4]арену С-107 (сполука М-3), як і у випадку *in vitro*, також не впливає на функціонування натрієвої помпи.
2. З використанням механокінетичного аналізу викликаних K^+ -деполяризацією і ацетилхоліном скорочень встановлено, що результати в умовах хронічної дії *in vivo* убаїну, калікс[4]арену С-107 та фрагменту М-3 переважно відтворюють тенденції змін скорочувальної функції *saesum* при аплікуванні цих сполук *in vitro*.

Результати, викладені у розділі, опубліковані у наступних роботах: [476, 513, 607].

РОЗДІЛ 9

МЕХАНОКІНЕТИЧНІ ЕФЕКТИ ТА ОКРЕМІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ КАЛІКСАРЕНІВ-ІНГІБІТОРІВ КАЛЬЦІЄВОЇ ПОМПИ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ НА ВІСЦЕРАЛЬНІ ГЛАДЕНЬКІ М'ЯЗИ

Кальцієва помпа є конститутивною структурою ПМ клітин, яка виконує функцію високоафінної (K_M для Ca^{2+} становить 0,2-0,5 мкМ) системи по виведенню іонів Ca^{2+} з цитоплазми, забезпечуючи тривале підтримання базальної концентрації цих катіонів у стані спокою. ПМКА належить до родини іон-транспортних АТФ-аз Р-типу (підклас Р2В). Стехіометрія транспортованих іонів Ca^{2+} та гідролізованих при цьому молекул АТР складає 1:1. На відміну від Na^+ , Ca^{2+} -обмінника, вона має високу спорідненість до іонів Ca^{2+} .

Відомо 4 ізоформи ПМКА, які завдяки альтернативному сплайсингу формують значно більше різноманіття цього ензиму (близько 30 різновидів). Ізоформи 1 та 4 ПМКА експресуються практично у всіх тканинах організму, тоді як ПМКА2 і ПМКА3 ідентифіковані в клітинах обмеженої кількості тканин (зокрема, в мозку, посмугованих м'язах і молочній залозі). Так, ПМКА2 в значній кількості присутня в спеціалізованих клітинах: нейронах Пуркінє мозочка, волоскових клітинах завитки, лактуючих клітинах молочної залози; також цією ізоформою збагачені плазматичні мембрани клітин матки [602].

В гладеньких м'язах невагітного міометрія експресуються дві ізоформи ПМКА: ПМКА1b, ПМКА4a та ПМКА4b [274, 603]; під час вагітності спостерігається посилення експресії ПМКА1 ізоформи (ПМКА1a та ПМКА1b) [604, 605].

Велика кількість досліджень, які активно проводяться різними лабораторіями світу впродовж останніх двадцяти років вказують на те, що ПМКА тканино- та ізоформо-специфічно є однією з ключових мембранних

структур з Ca^{2+} -транспортувальною та сигналінговою функціями та пов'язана з розвитком багатьох патологій (наприклад, гіпертензією, гіпертрофією міокарду, нейрональних порушеннях, чоловічим безпліддям тощо); це вказує на значний терапевтичний потенціал ПМКА [272].

Натепер не існує задовільних засобів фармакологічної корекції функції ПМКА. Так, хоча можна відзначити два класи речовин зі здатністю інгібувати ПМКА (неселективні інгібітори іон-транспортних систем клітини: ванадат, еозин і лантан; калоксіни – селективні інгібітори ПМКА з невеликою спорідненістю: константа інгібування ензиму з тіней еритроцитів людини для різних калоксінів варіює від 86 до 1000 мкМ), залишається надзвичайно актуальним питання розробки, синтезу та дослідження на різних моделях сполук зі спрямованою дією на ПМКА [213, 214].

Роботи по встановленню ролі ПМКА у підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу та скоротливої активності вісцеральних гладеньких м'язів були виконані Liu L. та колегами [272, 273] із використанням моделей абляції генів, які кодують ізоформи ПМКА1 і ПМКА4 (*Pmca1*^{+/−}, *Pmca4*^{+/−}, *Pmca4*^{−/−}, та *Pmca1*^{+/−}*Pmca4*^{−/−}). Дослідженнями скорочувальної активності та Ca^{2+} -сигналів, індукованих деполяризацією плазматичної мембрани та агоністом мускаринових рецепторів карбахоліном, гладеньких м'язів сечового міхура мишей з зазначеними випадками нокауту ізоформ ПМКА показано, що чутливими показниками до вибіркового нокауту цих ензимів є не лише фаза розслаблення, але (навіть відносно більшою мірою) і фаза скорочення [272]. Цікаво, що, за даними цих авторів, напівчас ($\tau_{1/2}$) розслаблення м'язових препаратів після відмивання гіперкалієвого розчину у випадку *Pmca1*^{+/−}-та *Pmca1*^{+/−}*Pmca4*^{−/−} у середньому складав 84% та 94% відповідно, порівняно з інтактними контролями. Також Liu L. і колеги показали, що в цій тканині за інгібування функціонування інших систем транспорту Ca^{2+} , спостерігались наступні ефекти: пригнічення Ca^{2+} -помпи саркоплазматичного ретикулума не супроводжувалось вірогідними змінами $\tau_{1/2}$ релаксації гладеньком'язових препаратів після відмивання гіперкалієвого розчину (середнє значення

становило 122,5% порівняно з інтактними об'єктами) [273]. Оскільки відомо, що гладеньком'язові клітини міометрія експресують ізоформи ПМКА1 і ПМКА4, дослідження Liu L. та колег [272, 273] є для нас корисними аби краще зрозуміти процеси, які мають місце в тканині міометрія при дії на неї каліксаренів-інгібіторів кальцієвої помпи.

Дослідженнями останніх років науковою групою під керівництвом академіка НАН України С.О. Костеріна встановлено, що окремі сполуки, що належать до класу каліксаренів, зокрема, калікс[4]арени з кодом С-90 та С-716 здатні вибірково інгібувати Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азу препаратів ПМ міометрія свині; зокрема, для С-90 показник напівмаксимального інгібування $I_{0,5}$ становив $34,6 \pm 6,4$ мкМ [606].

Каліксарен С-716 (5,17-di(trifluoro)methyl(phenylsulfonylimino)-methylamino-11,23-di-tert-butyl-25,27-dipropoxycalix[4]arene) має дві фенілсульфоніламідинові групи на верхньому вінці каліксаренової чаші у положенні. Як показано дослідженнями акад. С.О. Костеріна і колег [606, 607], при використанні С-716 в концентрації 100 мкМ, він спричиняє зниження активності Ca^{2+} -АТФ-азної активності препаратів ПМ міоцитів матки свині на 61,5% відносно контролю. За аналогічної концентрації каліксарен С-90 (5,11,17,23-tetra(trifluoro)methyl(phenylsulfonylimino)-methylamino-25,26,27,28-tetrapropoxycalix[4]arene, він містить чотири фенілсульфоніламідинові групи на верхньому вінці каліксаренової чаші) пригнічує Ca^{2+} -АТФ-азну активність препаратів ПМ на 75,0% [606].

У даному розділі представлені результати комплексного дослідження щодо для встановлення закономірностей і механізмів впливу каліксаренів С-90 і С-716, для яких відома здатність з високою активністю інгібувати кальцієву помпу ПМ.

9.1. Вплив каліксарену C-90 на спонтанну скорочувальну активність гладеньких м'язів міометрія

Початково було досліджено закономірності впливу кумулятивного підвищення концентрації каліксарену C-90 (10 нМ – 100 мкМ) на спонтанну скорочувальну активність міометрія щурів. Експерименти були побудовані за схемою: після 10 хвилин преінкубації з каліксареном C-90 (10 нМ) упродовж 10 хв. реєстрували спонтанні скорочення, після чого здійснювали кумулятивне підвищення концентрації C-90 (до 100 нМ) і преінкубували 20 хв., після чого знову впродовж 10 хв. реєстрували скорочення; таким чином, підвищення концентрації каліксарену C-90 проводили до 100 мкМ.

Про ефективність скорочувальної діяльності м'язів судили за тривалістю скорочень, пауз між ними, тривалістю окремих фрагментів скорочень (фаз скорочення і розслаблення), коефіцієнтом асиметрії, скоротливим циклом, індексом активності скорочень [395]. Також визначали середню швидкість наростання скорочення (F_{max}/t), максимальні швидкості наростання сили скорочення ($V_{max, c}$) та її спаду при розслабленні ($V_{max, r}$). По співвідношенню відповідних максимальних швидкостей до і після дії C-90 визначали ефективність дії наночастинок на процеси транспортування іонів Ca^{2+} через плазматичну мембрану та мембрани внутрішньоклітинних депо цих катіонів. Врешті, для кількісного визначення змін ефективності сумарної скорочувальної активності ГМС використовували показники скоротливих індексів в одиницях Монтевідео та Олександрійських одиницях; зазвичай вони застосовуються для аналізу скорочень ГМ матки, втім, є корисними і можуть бути використані у випадку ритмічної скорочувальної активності інших м'язів [396]. Розрахунок нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення та розслаблення (V_{nc} і V_{nr} відповідно) здійснювали згідно з методом [398].

Кумулятивне підвищення концентрації каліксарену C-90 з 10 нМ до 100 мкМ в омиваючому розчині супроводжувалось дозо-залежним

пригніченням спонтанної скоротливої активності гладеньком'язових препаратів (Рис. 9.1). Перш за все, це відображалось у зниженні амплітуди та частоти скорочень, достовірні зміни яких спостерігались у присутності високих концентрацій С-90 (10 та 100 мкМ). Зниження частоти скорочень обумовлювалось збільшенням тривалості маткового циклу, яка у випадку концентрацій С-90 у діапазоні 100 нМ – 10 мкМ у середньому складала 120%, а при дії 100 мкМ зростала до 133% порівняно з контролем.

Чутливим до дії каліксарену виявився показник індексу скоротливої активності м'язових препаратів, достовірні дозо-залежні зміни якого мали місце на усьому діапазоні досліджених концентрацій С-90. Так, за присутності каліксарену С-90 у концентрації 100 мкМ індекс скоротливої активності знижувався у середньому на 60% порівняно з контролем (Рис.9.2).

У присутності каліксарену С-90 спостерігалось значне дозо-залежне збільшення тривалості інтервалів між окремими скороченнями (Рис. 9.2), причому достовірні зміни мали місце на усьому діапазоні його концентрацій, досягаючи 202% при дії 100 мкМ С-90.

Хоча в умовах преінкубації гладеньких м'язів матки з каліксареном С-90 не змінювалась тривалість окремих спонтанних скорочень, його високі концентрації спричиняли зміну структури скоротливого акту. Так, мало місце збільшення часу наростання сили скорочення, тоді як абсолютні значення тривалості фази розслаблення не зазнавали статистично значущих змін (Рис. 9.3.). За цих умов каліксарен С-90 (100 мкМ) викликав підвищення показника асиметрії скоротливого акту (в середньому до 132% порівняно з контрольними скороченнями). Це свідчить про зниження під дією каліксарену С-90 потужності маткових скорочень.

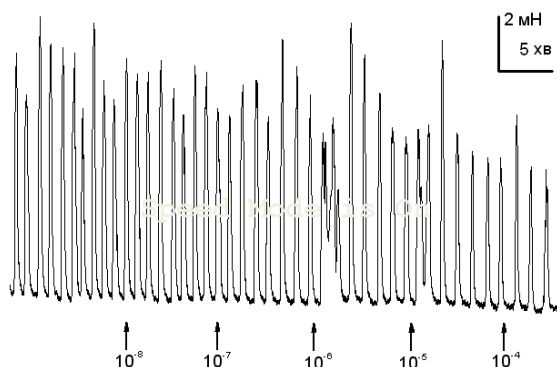


Рис. 9.1. Спонтанна скоротлива активність міометрія щурів в умовах кумулятивного збільшення концентрації каліксарену С-90 (10^{-8} - 10^{-4} М) в омиваючому гладеньком'язові препарати розчині. Наведено типову механограму.

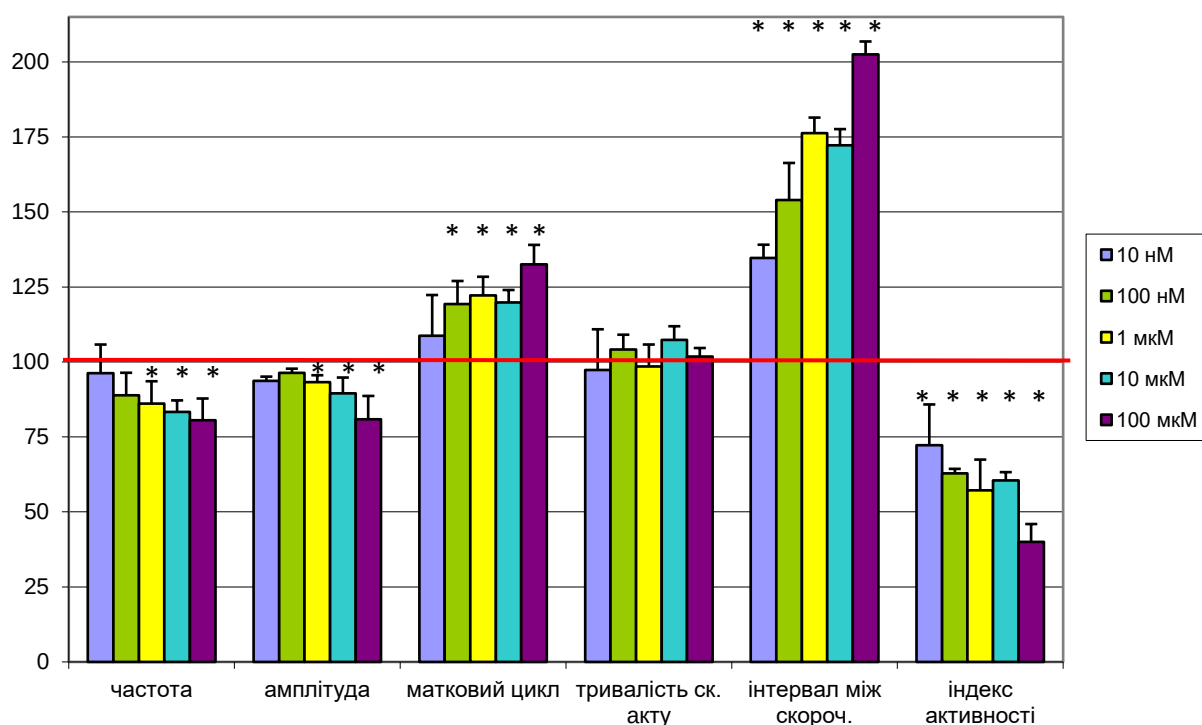


Рис. 9.2. Параметри спонтанної скоротливої активності міометрія щурів за умови кумулятивного збільшення концентрації (10 нМ – 100 мкМ) каліксарену С-90: частота, амплітуда, матковий цикл, тривалість скоротливого акту (тривалість ск. акту), інтервал між скороченнями (інтервал між скороч.), індекс скоротливої активності (індекс активності). За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі (вісь ординат).

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

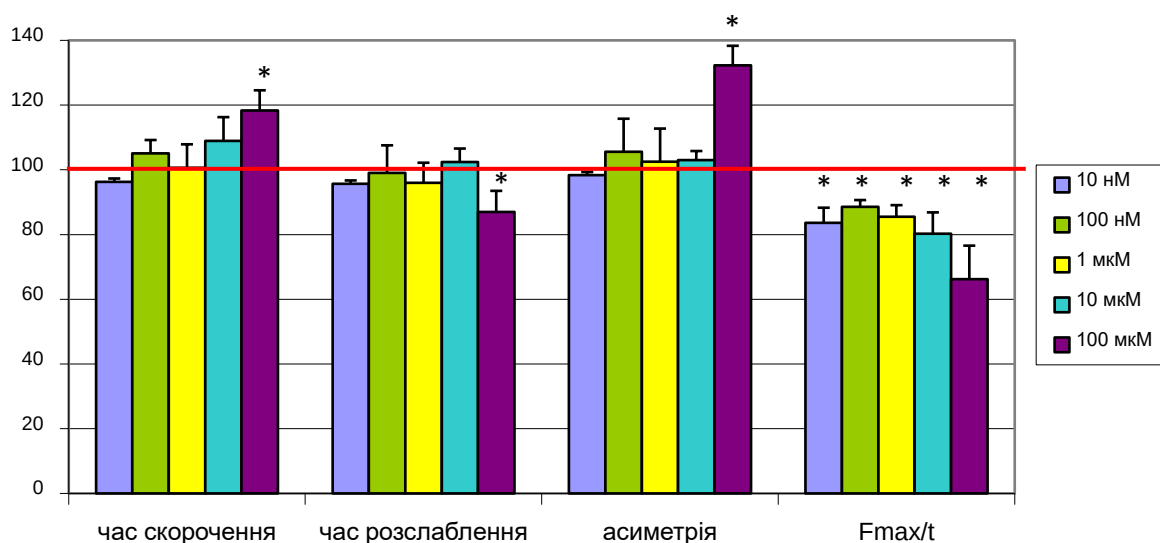


Рис. 9.3. Параметри спонтанної скоротливої активності міометрія щурів за умови кумулятивного збільшення концентрації (10 нМ – 100 мкМ) каліксарену С-90: час скорочення, час розслаблення, асиметрія скоротливого акту (асиметрія), середня швидкість наростання скорочення (F_{max}/t). За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі (вісь ординат).

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

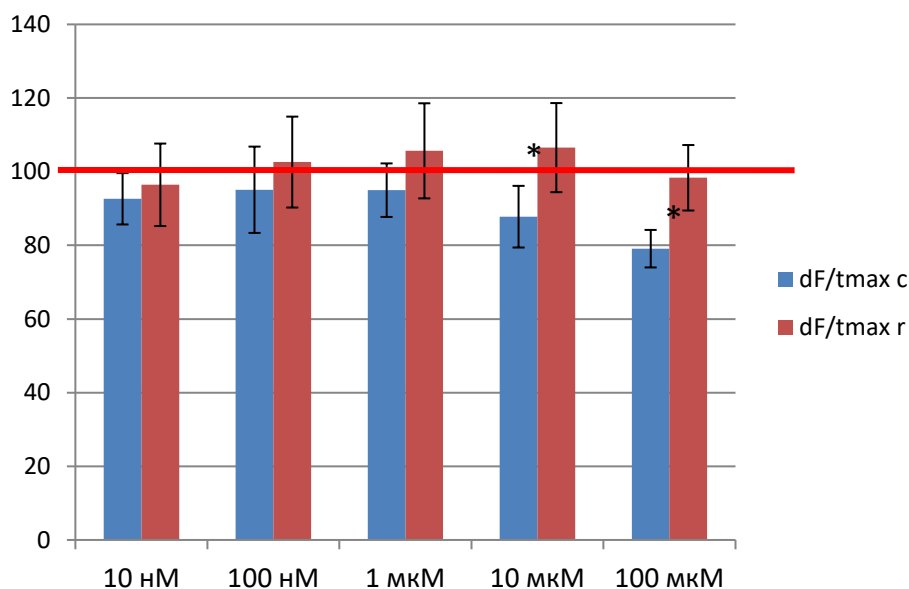


Рис. 9.4. Максимальні швидкості наростання скорочення і розслаблення (dF_{max}/t_{maxc} та dF_{max}/t_{maxr} відповідно) окремих спонтанних скорочень міометрія за умови кумулятивного збільшення концентрації (10 нМ – 100 мкМ) каліксарену С-90. За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі (вісь ординат).

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

Також збільшення тривалості фази скорочення з одночасним зниженням амплітуди скорочення обумовило зменшення показника середньої швидкості наростання скорочення ($F_{\max}/t$), який достовірно знижувався на усьому діапазоні досліджених концентрацій каліксарену С-90, а за його присутності у концентрації 100 мкМ становив у середньому 66% порівняно з контролем (Рис. 9.3).

Також було визначено максимальні швидкості наростання і спаду напруження ($dF_{\max}/t_{\max c}$ та $dF_{\max}/t_{\max r}$ відповідно) при спонтанній скорочувальній активності м'язових препаратів міометрія (Рис. 9.4).

На відміну від методу Костеріна і Бурдиги [398], у цьому випадку не передбачалось нормування показників швидкості на амплітуду скорочень. Було встановлено, що каліксарен С-90 не змінює максимальну швидкість наростання скорочень $dF_{\max}/t_{\max c}$, втім уповільнює процес розслаблення (достовірно знижує $dF_{\max}/t_{\max r}$ за присутності С-90 у концентраціях 10 і 100 мкМ). Важливо також відмітити, що аналогічні тенденції та статистичні висновки щодо дозових залежностей параметрів процесу розслаблення спонтанної скорочувальної активності препаратів міометрія цілком узгоджувались між собою (Рис. 9.4 та 9.5).

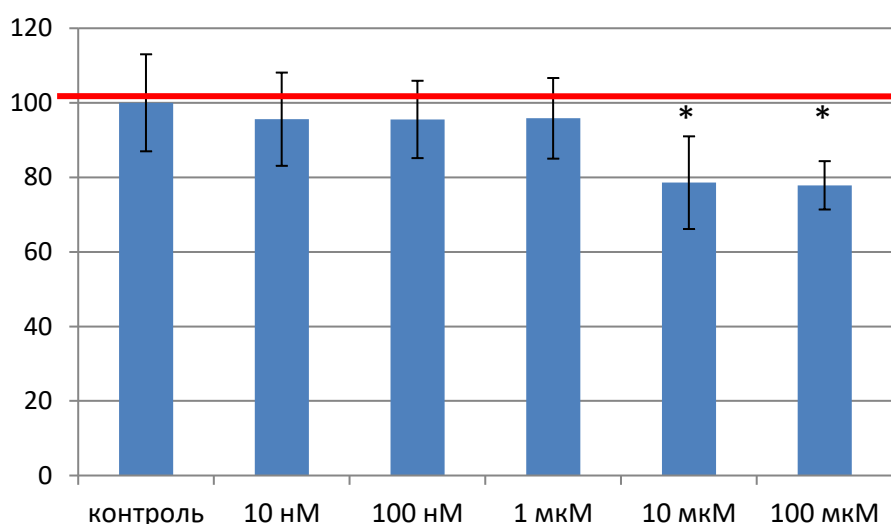


Рис. 9.5. Нормована максимальна швидкість фази розслаблення (V_{nr}) спонтанних скорочень міометрія щурів за умови кумулятивного збільшення концентрації (10 нМ – 100 мкМ) каліксарену С-90.

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

Як відомо, спонтанна скоротлива активність ГМ матки визначається циклічною зміною внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} у міоплазмі [413]. Отже отримані нами результати дослідження закономірностей функціонування гладеньких м'язів міометрію в умовах додавання до омиваючого розчину каліксарену С-90 свідчать, що ця сполука впливає на процеси, які приймають участь у регуляції внутрішньоклітинної концентрації цього катіону. Зокрема, на користь цього припущення свідчить неоднорідна зміна середньої та максимальних швидкостей фаз скорочення та розслаблення спонтанних скорочувальних відповідей. Отримані результати дають змогу передбачити, що каліксарен С-90 є перспективною речовиною для розробки фармакологічних засобів м'якої токолітичної дії.

9.2. Встановлення механізмів впливу каліксарену С-90 на міометрія

9.2.1. Аналіз спонтанної скорочувальної активності міометрія у присутності каліксарену С-90

Для детального аналізу закономірностей не кумулятивної дії С-90 на спряження збудження-скорочення і гальмування-розслаблення міометрія було обрано концентрацію 10 мкМ.

Початково було детально досліджено ефект присутності каліксарену С-90 (10 мкМ) на базальний тонус та спонтанну скорочувальну активність поздовжніх ГМ матки щурів. Внесення каліксарену С-90 в омиваючий ГМС розчин спричиняло підвищення базального тонусу препаратів. В окремих випадках спостерігалась початкова активація скоротливої активності, яка за деякий час переходила в тонічне скорочення (Рис. 9.6 А), або мало місце зниження сили скорочень при підвищеному тонусі (Рис. 9.6 Б). Загалом, за дії С-90 амплітуда скорочень знижувалась у середньому на 22,1 % ($p < 0.05$, $n = 9$), тоді як їх частота, хоча і мала тенденції до збільшення, не зазнавала статистично вірогідних змін. Варто відмітити закономірності зміни кінетики окремих спонтанних скорочень ГМ у присутності С-90: не змінювалась швидкість наростання сили, але уповільнювалось розслаблення (Рис. 9.7 А).

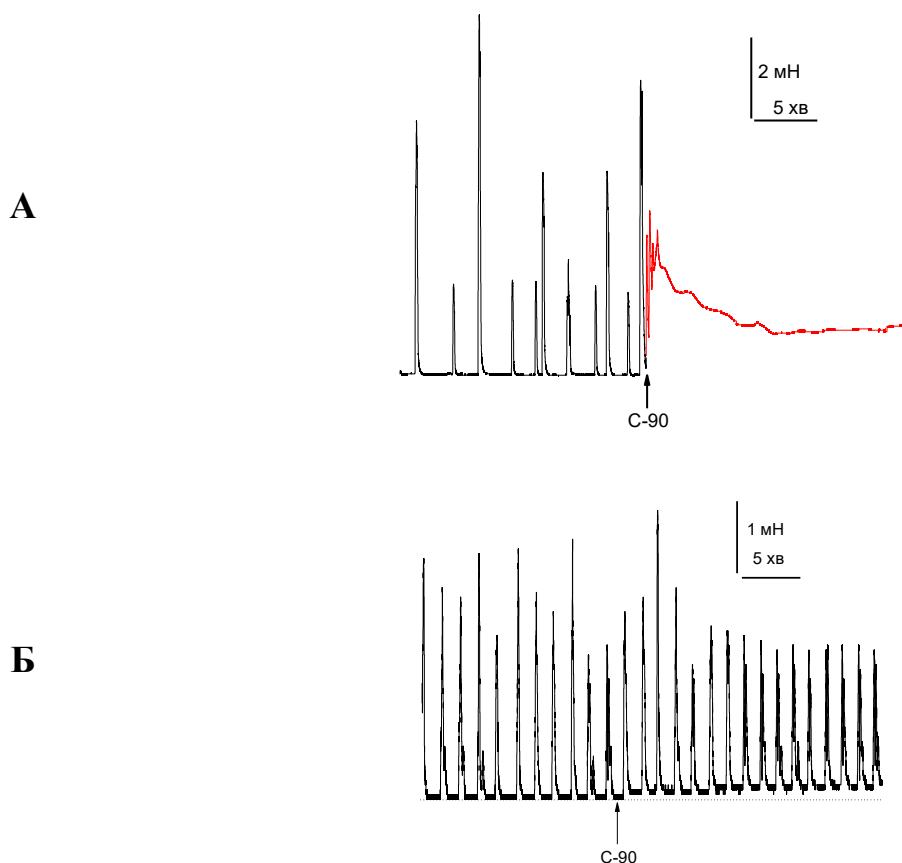


Рис. 9.6. Вплив каліксарену С-90 (10 мкМ) на спонтанні скорочення та базальне напруження гладеньком'язових препаратів матки щура: А і Б – наведено типові механограми.

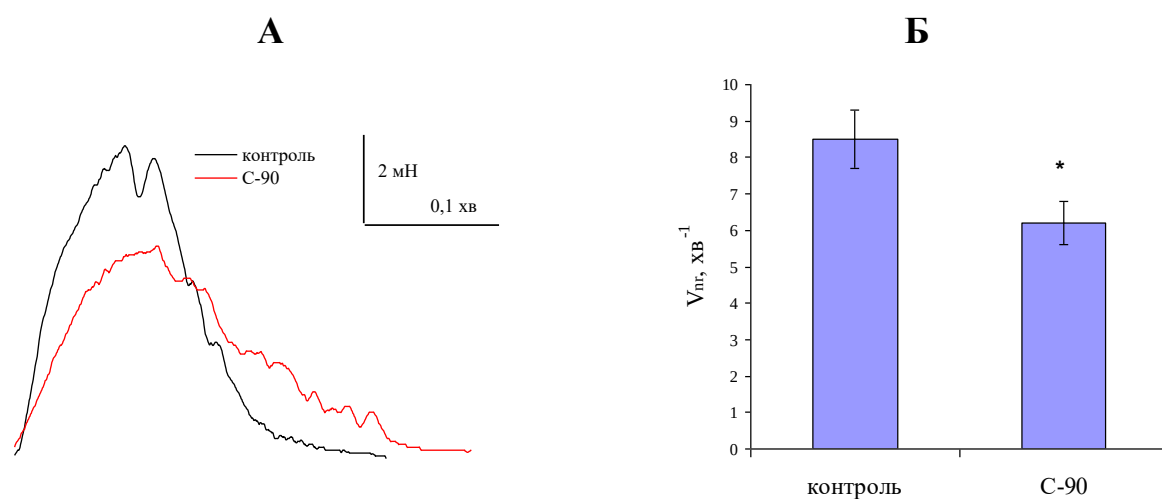


Рис. 9.7. Вплив каліксарену С-90 (10 мкМ) на кінетику спонтанних скорочень міометрію щурів: А – співставлення типових скорочень в контролі та за дії каліксарену С-90; Б – усереднені значення на нормованих максимальних швидкостях фази розслаблення ($M \pm m$, $n=7$). Наведено типові механограми.

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

Розрахунки кінетичних параметрів скорочень відповідно до методу [19] підтвердили, що в присутності каліксарену С-90 не відбувається змін у кінетиці наростання сили: нормована максимальна швидкість фази скорочення V_{nc} не виявляла статистично значущих змін порівняно з контролем (відповідно $(14,1 \pm 1,4)$ і $(15,4 \pm 1,7)$ $хв^{-1}$, $n=7$, $p>0,05$). На противагу цьому, нормована максимальна швидкість фази розслаблення спонтанних скорочень V_{nr} у випадку присутності в омиваючому розчині каліксарену С-90 вірогідно знижувалась у середньому на 27% (з $8,5 \pm 0,8$ $хв^{-1}$ у контролі до $(6,2 \pm 0,6)$ $хв^{-1}$ при дії С-90; $n=7$, $p<0,05$) (Рис. 9.7 Б) [607].

Спонтанні скорочення ГМ матки щурів ініціюються транзиторним зростанням $[Ca^{2+}]_i$, головним джерелом якого є вхід цих катіонів через ПКК [609-611]. В ПМ ГМК невагітної матки щурів це канали L-типу, тоді як у випадку людини доведено присутність і пейсмеркерну роль каналів Т-типу [612]. Зниження сили спонтанних скорочень міометрію забезпечується сукупністю процесів: по-перше, викачування Ca^{2+} за межі клітини через плазматичну мембрану (енергозалежний транспорт ПМКА і Na^+/Ca^{2+} -обмінника) і закачування у внутрішньоклітинні депо (Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій і Ca^{2+} -помпа СР) [87, 609]; по-друге, активація Ca^{2+} -чутливих K^+ -каналів [87, 613]; по-третє, посилення роботи Na^+ , K^+ -АТФ-ази [609].

Можна міркувати про механізми, які залучені у реалізації ефекту каліксарену С-90 на спонтанну скоротливу активність міометрія. Як згадувалось вище, для цієї сполуки доведена вибіркова (порівняно з іншими системами активного іонного транспорту) здатність інгібувати Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азу плазматичної мембрани та, водночас, активувати ензиматичну активність білків скоротливого апарату (так, використана нами концентрація С-90 10 мкМ спричиняє підвищення активності в середньому вдвічі) [506]. Що стосується останнього ефекту, то, ймовірно, наші експерименти на багатоклітинних препаратах ГМ вказують на те, що при дії на інтактнотканину каліксарен С-90 або не здатен проникати в міоцити, або, що більш ймовірно, його кількість в середині міоцитів (поблизу скорочувальних

білків) є незначною для того, щоб викликати суттєвий вплив на молекули міозину. Базуючись на даних біохімічного титрування препаратів ПМ міометрія свині, за використаної нами концентрації відповідна ензиматична активність повинна була знизитись у середньому на третину [506]. Отже, зміна скоротливої функції міометрія під впливом каліксарену С-90 може бути пов'язана зі здатністю цієї сполуки інгібувати ПМКА.

Одночасно варто приймати до уваги дані, одержані на моделях з порушеною експресією окремих ізоформ ПМКА [615, 272, 273]. Як показано у випадку використання моделей нокауту (миші з ПМКА4^{-/-}, ПМКА1^{+/-} та ПМКА1^{+/-}/4^{-/-}), амплітуда і кінетичні характеристики викликаних скорочень ГМ сечового міхура зазнають значних змін у випадку порушення експресії окремих ізоформ Ca²⁺-помпи ПМ [272]. Так, у випадку ПМКА4^{-/-} спостерігалось пришвидшення розвитку скоротливої відповіді карбахолін-викликаного скорочення, але фаза заростання сили гіперкалієвої контрактури залишалась без змін; для препаратів з ПМКА1^{+/-} та ПМКА1^{+/-}/4^{-/-} спостерігалось уповільнення розвитку скоротливої відповіді, спричиненої K⁺-деполяризацією, але пришвидшення - карбахолін-викликаного скорочення. У випадку фази розслаблення, то для карбахолін-викликаного скорочення швидкість зменшувалась практично вдвічі, тоді як для гіперкалієвої контрактури цей ефект був виражений значно слабкіше [272]. Разом зі змінами (уповільненням) кінетики скорочень, в ГМ сечового міхура мишей з ПМКА1^{+/-} і ПМКА1^{+/-}/4^{-/-} спостерігалось вірогідне пригнічення амплітуди карбахолін-викликаних скорочень [272, 273]. Аналогічно, інгібування калоксінами Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани супроводжувались ендотелій-залежним пригніченням скорочень ГМ судин [268].

Таким чином, одержане у випадку передінкубації гладеньком'язових препаратів міометрія щурів з каліксареном С-90 вірогідне зниження нормованої максимальної швидкості розслаблення V_{nr} може бути пов'язано саме зі спрямованим інгібуванням ПМКА.

Викачування Ca^{2+} поза межі ГМК здійснюється двома шляхами: крім ПМКА тут залучений також $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник (НКО), однак порівняно з ПМКА, НКО має відносно низьку афінність до Ca^{2+} (K_M для Ca^{2+} становить 0,2-0,5 мкМ та 1-10 мкМ відповідно) [609, 616]. До того ж, у міометрії співвідношення внеску ПМКА і НКО у транспортувальний процес складає у середньому 70% і 30% відповідно [271, 617]. Таким чином, ПМКА виконує роль високоафінної системи по виведенню іонів Ca^{2+} з цитоплазми, забезпечуючи тривале підтримання базальної концентрації цих катіонів у стані спокою. Тож, ймовірно, підвищення базального тонуусу гладеньком'язових препаратів під впливом каліксарену С-90 (Рис. 9.6, А і Б) пов'язане зі зростанням внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} в цитоплазмі ГМК.

Також, у сумарний процес зниження $[\text{Ca}^{2+}]_i$ після збудження ГМК роблять внесок внутрішньоклітинні депо: частина іонів Ca^{2+} закачується, зокрема, до СР за рахунок роботи SERCA [616]. Ймовірно, що при частковому блокуванні ПМКА каліксареном С-90 має відбуватись збільшення закачування Ca^{2+} в СР; таке підвищене секвестрування катіону має посилювати його векторний транспорт в примембранну область для наступного викиду транспортерами ПМ [616]. Тобто за дії каліксарену С-90 при зниженні кількості функціональних молекул ПМКА має локально зростати примембранна концентрація Ca^{2+} , що може спричинити активацію Ca^{2+} -активованих іонних каналів. Відомо, що у міометрії щурів експресуються (і відіграють значну роль у регуляції збудливості) Ca^{2+} -активовані K^+ канали, принаймні, малої і великої провідності (SK_{Ca} та BK_{Ca} відповідно) [618]. Тож, ми можемо припустити посилення виходу K^+ через SK_{Ca} та BK_{Ca} за дії каліксарену С-90, що матиме пригнічувальний ефект.

9.2.2. Аналіз участі NO в ефектах каліксарену С-90 на спонтанну скорочувальну активність міометрія

Як уже зазначалось, крім іон-транспортувальної ролі ПМКА залучена до формування кавеоларних сигнальних білкових комплексів, а численні

дослідження в різних клітинних системах доводять, що функціонально здатні молекули ПМКА блокують роботу синтаз оксиду азоту (принаймні, конститутивних ізоформ NOS) [246, 248, 616]. Тому нами було здійснено перевірку припущення, щодо можливого внеску NO у пригнічення амплітуди спонтанних скорочень міометрія щурів у присутності каліксарену C-90. У роботі було застосовано неселективний інгібітор NO-синтаз L-NAME (*N^w*-Nitro-L-arginine methyl ester).

Інкубація гладеньком'язових препаратів міометрію у присутності L-NAME (20 хвилин, 100 мкМ) не викликала змін амплітуди їх спонтанних скорочень (Рис. 9.8), однак спричиняла вірогідне зменшення нормованої максимальної швидкості фази розслаблення V_{nr} до $(6,6 \pm 0,3) \text{ хв}^{-1}$ ($n=4$, $p<0,05$). На фоні блокування NO-синтаз (L-NAME, 100 мкМ) каліксарен C-90 (10 мкМ) не знижував амплітуду спонтанних скорочень (Рис. 9.8). Розрахунок кінетичних параметрів показав, що одночасне пригнічення роботи NOS і ПМКА супроводжується поверненням швидкості фази розслаблення до контрольного рівня $(8,2 \pm 0,3 \text{ хв}^{-1}$; $n=4$, $p>0,05$) (Рис. 9.9).

Модуляція фази розслаблення (зменшення нормованої максимальної швидкості V_{nr}) спонтанних скорочень у присутності L-NAME може свідчити про ймовірну участь оксиду азоту в регуляції скоротливої активності гладеньких м'язів матки та цілком узгоджується з даними інших дослідників [9]. Загалом, інформація про роль NO у функціонуванні міометрія достатньо неоднорідна: в окремих роботах показано пригнічення скоротливості міометрія донорами NO, тоді як в інших – їх ефекту не виявлено [619]. Переважно дослідники сходяться на думці, що інгібувальний ефект NO в цих м'язах не опосередковується цГМФ, а забезпечується прямою модифікацією клітинних білків [620].

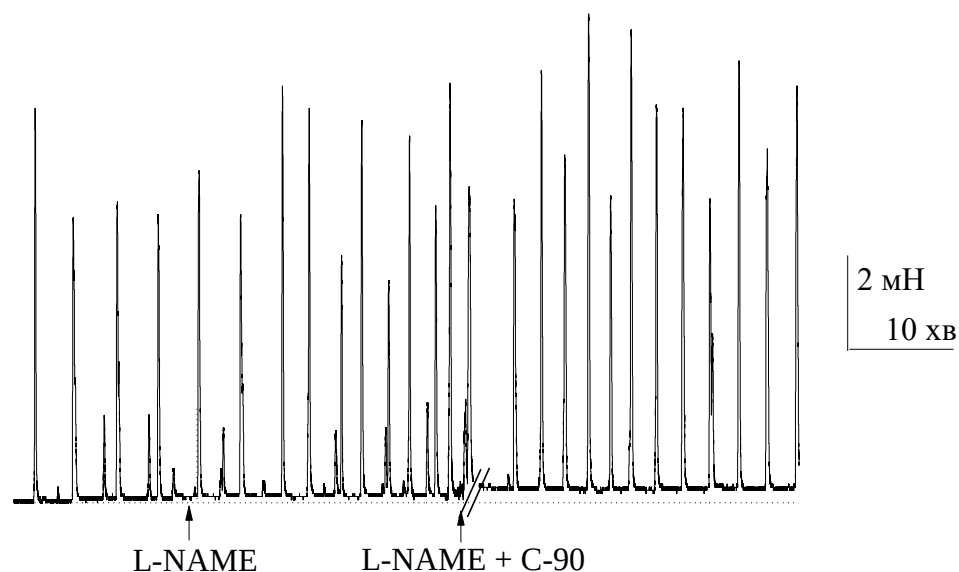


Рис. 9.8. Спонтанна скорочувальна активність поздовжніх ГМ міометрія щурів: порівняння типових скорочень в контролі, за умови попередньої інкубації в присутності неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME (100 мкМ) та сукупної дії L-NAME (100 мкМ) та каліксарену C-90 (10 мкМ). Наведено типові механограми.

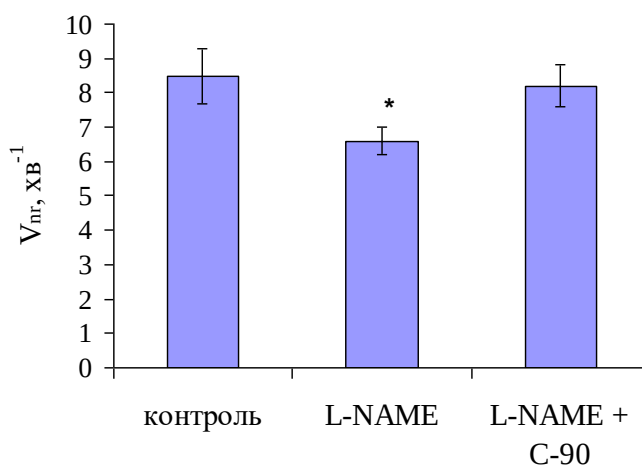


Рис. 9.9. Усереднені значення нормованих максимальних швидкостей фази розслаблення спонтанних скорочень поздовжніх ГМ міометрія щурів в контролі, за умови попередньої інкубації в присутності неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME (100 мкМ) та сукупної дії L-NAME (100 мкМ) та каліксарену C-90 (10 мкМ). Дані представлено як ($M \pm m$, $n=7$).

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

У зв'язку з цим, в наступній серії експериментів нами було досліджено вплив NO на механокінетичні параметри спонтанних та викликаних аплікуванням утеротонічного гормону окситоцину скорочень міометрія щурів.

Внесення донора оксиду азоту НПН (100 мкМ) в омиваючий розчин супроводжувалось зниженням тонузу гладеньком'язових препаратів, яке досягало свого стаціонарного рівня протягом 2-4 хв і далі було постійним (Рис. 9.10). На фоні зниженого тонузу також спостерігалось пригнічення спонтанної скорочувальної активності м'язів. За даних умов мало місце вірогідне зниження амплітуди спонтанних скорочень у середньому на 43 %, тоді як їх частота зменшувалась близько чверті.

Також під дією НПН зазнавав змін характер окремих спонтанних скорочень: відмічалось пришвидшення ходу фази розслаблення без зміни фази наростання сили (V_{nc} вірогідно не відрізнялась відносно контрольних значень). Проведений відповідно до методу [398] кінетичний аналіз дозволив виявити вірогідне підвищення нормованої максимальної швидкості фази розслаблення (V_{nr}) у середньому на 24%: (до $11,4 \pm 1,1 \text{ хв}^{-1}$ ($n=5$, $p<0,05$) (Рис. 9.11). НПН також спричиняв пригнічення окситоцин-викликаних (0,1 МО) скорочень. За даних умов спостерігались зниження амплітуди (у середньому на 32% порівняно контролем) та модуляція характеру розвитку скоротливої відповіді [621].

Проведення кінетичного аналізу показало, що як і у випадку спонтанних скорочень, НПН не змінював показник нормованої максимальної швидкості наростання сили (V_{nc}) окситоцинових скорочень (Рис. 9.12), але індукував значне зниження показника V_{nr} (з $0,34 \pm 0,06 \text{ хв}^{-1}$ у контролі до $0,11 \pm 0,03 \text{ хв}^{-1}$ у присутності НПН). Таким чином, внесення в омиваючий гладеньком'язові препарати розчин донора NO дозволило уповільнити їх розслаблення приблизно в три рази.

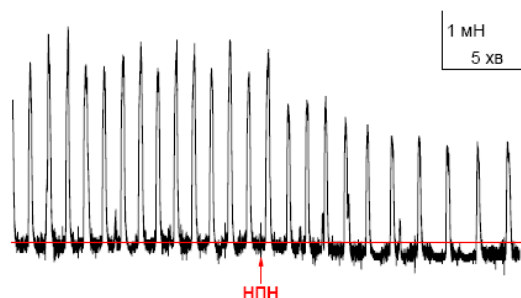


Рис. 9.10. Вплив донора NO нітропрусида натрію (НПН, 100 мкМ) спонтанні скорочення гладеньких м'язів міометрія щурів. Наведено типову механограму.

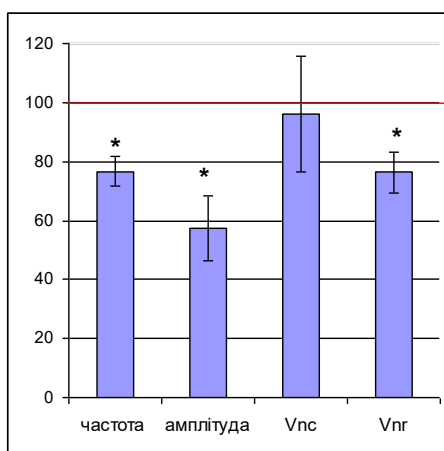


Рис. 9.11. Усереднені ефекти дії донора NO нітропрусида натрію (НПН, 100 мкМ) на спонтанну скорочувальну активність гладеньких м'язів міометрія щурів; $n=5$.

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

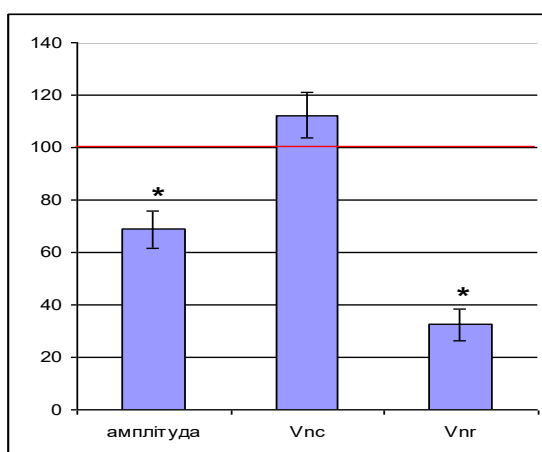


Рис. 9.12. Модуляція нітропрусидом натрію (100 мкМ) окситоцин-викликаних (0,1 МО) скорочень ГМ міометрія щурів: усереднені ефекти дії НПН на амплітуду і нормовані максимальні швидкості фази скорочення (V_{nc}) та розслаблення (V_{nr}) окситоцинових скорочень; $n=5$.

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

Варто відзначити, що підвищення концентрації НПН (500 мкМ) спричиняло модуляцію спонтанних і викликаних окситоцином скорочень на рівні, аналогічному до дії цієї сполуки в концентрації 100 мкМ, тоді як у випадку використання концентрації НПН 1 мМ спонтанна активність пригнічувалась практично повністю.

Можна міркувати про механізми, які задіяні у реалізації ефектів НПН на скорочувальну активність міометрія щурів. Відомо, що цих м'язах залежно від гормонального статусу і функціональної активності (невагітний стан або окремі періоди вагітності) у різному співвідношенні експресуються усі три ізоформи NO-синтаз (ендотеліальна, нейрональна та індукцибельна), регулюючи, таким чином, тонус і збудливість міометрія. Тому оксид азоту в м'язах матки відіграє фізіологічно значущу роль. Внутрішньоклітинна дія NO переважно не залежить від синтезу цГМФ, тобто полягає у безпосередній модифікації білків міоциту. Важливим шляхом, яким реалізується розслаблюючий ефект NO в ГМ, зокрема матки, є пряма активація $ВК_{Ca}$ [618]. Тому, ймовірно, що одержане у роботі зниження тонусу препаратів і пригнічення скорочень відбувається за участі цього механізму. Оскільки відомо, що ці канали практично не залучені до регуляції спонтанної активності в м'язах матки невагітних щурів, можна припустити, що саме із різною мірою активації $ВК_{Ca}$ пов'язана значна відмінність між показниками V_{nr} у випадку спонтанних і викликаних окситоцином скорочень.

Варто відзначити, що у роботі було використано донор оксиду азоту НПН, який здатен продукувати не тільки NO, але й його редокс-форми (зокрема, катіон NO^+). Відомо, що NO^+ в гладеньких м'язах матки здатен перетворюватись у високотоксичний іон нітрозонію (NO_2^+), який нітрозилує фенольні і сульфгідрильні групи білків [621]. Дійсно, відомо, що таким шляхом через взаємодію з суттєвими сульфгідрильними групами в активному центрі молекули індукується зниження ензиматичної активності скоротливого білка міозину [621]. Оскільки молекули NO здатні вільно

проникати в клітини, ймовірно, що цей шлях може бути залучений у пригнічення спонтанних і викликаних окситоцином скорочень.

9.2.3. Аналіз викликаних K^+ -деполяризацією і окситоцином скорочень міометрія у присутності каліксарену С-90

У роботі також було досліджено вплив каліксарену С-90 на викликані скорочення гладеньком'язових препаратів. В якості стимуляторів скоротливої активності було обрано гіперкалієвий розчин (80 мМ) і утеротонічний гормон окситоцин (0,1 МО). Як і у випадку спонтанної активності, присутність в омиваючому розчині каліксарену С-90 (10 мкМ) супроводжувалось вірогідним пригніченням сили викликаних скорочень (Рис. 9.13 та 9.14).

Так, каліксарен С-90 в однаковій мірі спричиняв зниження сили як агоніст-індукованих (окситоцин, 0,1 МО), так і викликаних деполяризацією плазматичної мембрани (гіперкалієвий розчин, 80 мМ) скорочень – на 25,7% ($p < 0.05$, $n=6$) і 24,4% ($p < 0.01$, $n=6$) відповідно. У обох випадках каліксарен С-90 не впливав на характер наростання сили скоротливих відповідей: нормовані максимальні швидкості фази скорочення залишались на рівні контрольних показників (в контролі та за дії С-90, відповідно $1,95 \pm 0,13 \text{ хв}^{-1}$ і $2,18 \pm 0,35 \text{ хв}^{-1}$, $p > 0.05$, $n=6$).

У інгібування окситоцин- і K^+ -викликаних відповідей міометрія під дією каліксарену С-90, ймовірно, можуть робити внесок декілька складників. По-перше, можливою є активація синтезу NO, індукована блокуванням ПМКА. Також, за умови підвищення концентрації в примембранній області і поблизу СР ймовірними є стимулювання Ca^{2+} -активованих K^+ -каналів та пригнічення депо-керованого входу Ca^+ внаслідок перевантаження СР.

Швидкість розслаблення гладеньком'язових препаратів була чутливою до дії С-90, однак вона зазнавала різноспрямованих змін залежно від характеру стимулювання скоротливих відповідей. Так, у присутності С-90 нормована максимальна швидкість фази розслаблення (V_{nr}) окситоцин-викликаних скорочень вірогідно знижувалась у середньому на 19% (з

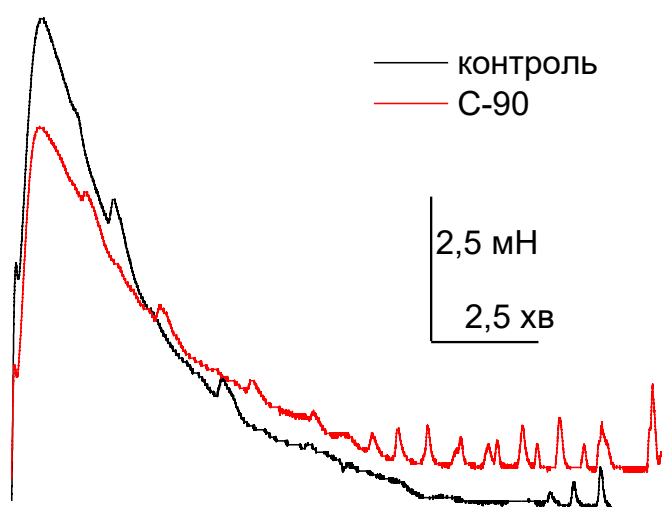


Рис. 9.13. Викликані окситоцином (0,1 МО) скорочення поздовжніх гладеньких м'язів міометрія щурів в контролі та за умови попередньої інкубації (20-30 хв.) каліксарену С-90 (10^{-5} М). Наведено типові механограми.

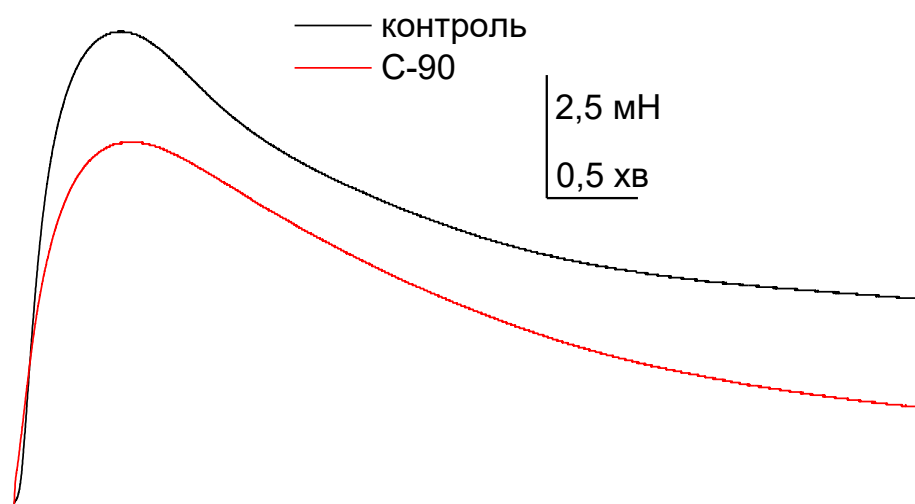


Рис. 9.14. Викликані гіперкалієвим розчином (80 мМ) скорочення поздовжніх гладеньких м'язів міометрія щурів в контролі та за умови попередньої інкубації (20-30 хв.) каліксарену С-90 (10^{-5} М). Наведено типові механограми.

$0,43 \pm 0,06 \text{ хв}^{-1}$ у контролі до $0,35 \pm 0,04 \text{ хв}^{-1}$ при дії С-90; $n=6$, $p<0,05$). За умови, коли скоротливі відповіді активувались гіперкалієвим розчином, каліксарен С-90 спричиняв зростання V_{nr} з $0,36 \pm 0,05 \text{ хв}^{-1}$ до $0,43 \pm 0,06 \text{ хв}^{-1}$ ($p<0.01$, $n=6$) [607].

Ми можемо міркувати про механізми, які лежать в основі різноспрямованого впливу каліксарену С-90 на кінетику розслаблення K^{+} - та окситоцин-викликаних скоротливих відповідей м'язових препаратів міометрія. Дані багатьох дослідників, у експериментах щодо блокування ПМКА із використанням неселективних інгібіторів ортованадату натрію і еозину [139, 615, 617, 622, 623], а також селективних інгібіторів калоксинів (тонкий кишечник і трахея [290], ацинарні клітини підшлункової залози [624]) вказують на те, що пригнічення роботи ПМКА супроводжується уповільненням фази зниження інтенсивності агоніст-викликаних Ca^{2+} -сигналів та скорочень. За зміною характеристичного часу затухання агоніст-активованих Ca^{2+} -транзіїнтів було визначено внесок ПМКА в процеси зниження концентрації іонів кальцію після стимуляції міометрія щурів на рівні близько 70% [615, 623]; аналогічні дані щодо внеску ПМКА у викачування Ca^{2+} в міоцитах матки мишей було отримано при дослідженні ПМКА4-нокаутних тварин [272, 273]. Таким чином, індуковане С-90 уповільнення фази розслаблення (зменшення V_{nr}) окситоцин-викликаних скорочень, ймовірно, може бути пояснено безпосередньо пригніченням роботи ПМКА під дією С-90.

Відомо, що головним джерелом, який спричиняє надходження Ca^{2+} до ГМК у разі застосування гіперкалієвого розчину, є активовані внаслідок деполяризації ПМ ПКК. За цих умов (на противагу кінетиці фази релаксації спонтанних і викликаних окситоцином скорочень) аплікація каліксарену С-90 супроводжувалась пришвидшенням розслаблення скоротливих відповідей міометрія. Гіпотетичним механізмом такої реакції може бути безпосереднє інгібування Ca^{2+} -каналів, яке спричиняється рядом факторів, зокрема підвищенням внутрішньоклітинної концентрації цих іонів (міометрій щурів)

[248, 610], та, можливо, оксидом азоту (але щодо модифікації Ca^{2+} -каналів NO існують достатньо різноспрямовані дані [621, 625]).

9.2.4. Закономірності впливу каліксарену C-90 на викликані скорочення гладеньких м'язів міометрія шурів в умовах блокування NO-синтаз

Оскільки каліксарен-індуковане пригнічення сили спонтанних скорочень виявилось чутливим до функціонування NO-синтаз, в роботі було проведено аналіз впливу інгібування синтезу NO також і на викликані скорочення міометрія шурів за дії C-90.

Попередня інкубація м'язових смужок в присутності L-NAME (100 мкМ) не змінювала амплітуду окситоцин-викликаних скорочень. Ці результати узгоджуються з даними M.Chaud і колег [626], які показали, що максимальна сила окситоцинових, на відміну від брадикінін-викликаних, скорочень міометрія шурів не чутлива до блокування синтезу NO.

Разом з тим, блокування синтезу NO в цих гладеньких м'язах супроводжувалось зміною механокінетичних параметрів окситоцин-індукованих скорочувальних відповідей. Так, у присутності L-NAME вірогідно зростала нормована максимальна швидкість фази скорочення V_{nc} (Рис. 9.15). Нормована максимальна швидкість фази розслаблення V_{nr} за даних умов також мала тенденції до збільшення, які, однак, не підтверджувались статистичним аналізом (Рис. 9.16).

Каліксарен C-90 (10 мкМ) на фоні дії L-NAME не викликав пригнічення максимальної сили окситоцин-викликаних скорочень, але спричиняв відносні зміни кінетичних параметрів скоротливих відповідей. У випадку фази скорочення максимальна швидкість V_{nc} залишалась підвищеною відносно контролю (але порівняно з показником в присутності лише L-NAME мала тенденції до зниження) (Рис. 9.15). У цей же час, при блокуванні NO-синтаз каліксарен C-90 викликав зниження V_{nr} , яке, втім, було такого ж порядку (близько 25 %), як і у випадку застосування лише C-90 (Рис. 9.16).

Варто також відзначити, що за умови попередньої інкубації гладеньком'язових препаратів міометрія у присутності L-NAME каліксарен C-90 не змінював амплітуду, але спричиняв уповільнення фази релаксації (зниження V_{nr}) K^+ -індукованих скорочень. Такі результати свідчать на користь гіпотези щодо активації синтезу NO під дією блокування ПМКА цим каліксареном.

Таким чином, блокування синтезу NO призводило до усунення інгібування як спонтанних, так і викликаних скорочень міометрія під дією каліксарену C-90 [607].

Загалом, ґрунтуючись на одержаних нами результатах та даних літератури можна передбачити, що зниження сили скорочень гладеньких м'язів міометрія під дією каліксарену C-90 відбувається за NO-залежним шляхом, тоді як уповільнення розслаблення (зменшення нормованої максимальної швидкості розслаблення V_{nr}) спричиняється саме пригніченням транспортувальної функції ПМКА.

9.3. Викликана скорочувальна міометрія в умовах дії каліксарену C-716: закономірності та механізми модуляції процесу розслаблення

Як відомо, процеси регуляції скорочувальної функції ГМ у значній мірі залежать від ефективності підтримання Ca^{2+} -гомеостазу внутрішньоклітинними депо (саркоплазматичним ретикулумом та мітохондріями). Тому з метою встановлення закономірностей участі окремих систем активного транспорту іонів кальцію, та, зокрема ПМКА, нами було здійснено вивчення ефектів блокування цих складників (Ca^{2+} -помпи СР, потенціал-залежних систем Ca^{2+} -транспорту мітохондрій та ПМКА).

У наступній серії було досліджено вплив каліксарену C-716 на кінетику розслаблення K^+ -індукованого напруження м'язів міометрія в умовах пригнічення систем активного транспорту іонів кальцію внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо.

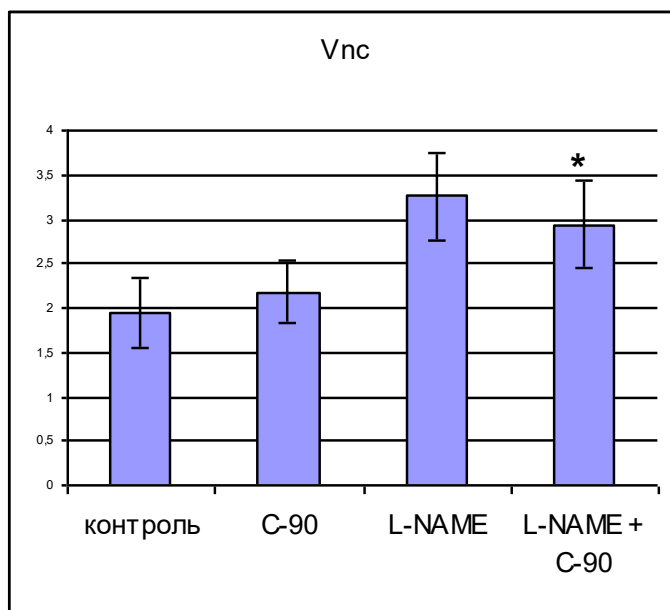


Рис. 9.15. Нормована максимальна швидкість фази скорочення V_{nc} (хв.⁻¹) окситоцин-викликаних (0,1 МО) скорочень в контролі, за умови дії окремо каліксарену C-90 (10 мкМ), L-NAME (0,1 мМ), а також при сумісній дії C-90 (10 мкМ) і L-NAME (0,1 мМ). Дані представлені як $M \pm m$ ($n=4-6$).

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

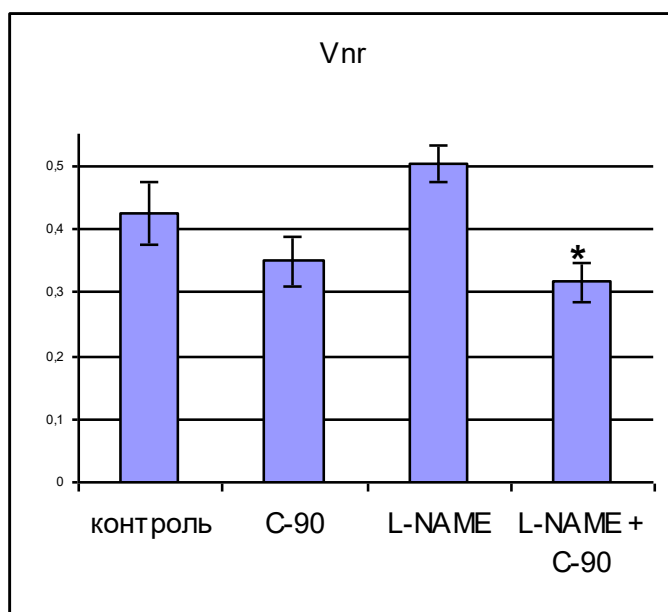


Рис. 9.16. Нормована максимальна швидкість фази розслаблення V_{nr} (хв.⁻¹) окситоцин-викликаних (0,1 МО) скорочень в контролі, за умови дії окремо каліксарену C-90 (10 мкМ), L-NAME (0,1 мМ), а також при сумісній дії C-90 (10 мкМ) і L-NAME (0,1 мМ). Дані представлені як $M \pm m$ ($n=4-6$).

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

Аплікування каліксарену С-716 (100 мкМ) на максимумі фазної складової K^+ -індукованого скорочення гладеньком'язових препаратів міометрія не змінювало процесу розслаблення: як видно з оригінальних записів механограм, а також після їх нормування (для більш зручного порівняння механограм) за значенням максимальної сили фазного скорочення (Рис. 9.17).

Проведення кінетичного аналізу довело відсутність впливу безпосереднього аплікування С-716 на показники нормованої максимальної швидкості фази розслаблення V_{nr} м'язів. Так, у контролі цей показник V_{nr} становив $0,23 \pm 0,03 \text{ хв}^{-1}$, а за дії каліксарену С716 – $0,26 \pm 0,03 \text{ хв}^{-1}$ ($n=6$, $p>0.05$). Аналогічно, не було виявлено змін параметра часу напівмаксимального розслаблення ($\tau_{1/2}$): він становив $1,54 \pm 0,28 \text{ хв.}$ у контролі та $1,44 \pm 0,27 \text{ хв.}$ при дії С-716 ($n=6$, $p>0.05$).

Визначення внеску блокування ПМКА в кінетичні параметри скорочувальної активності гладеньких м'язів міометрія. Оскільки мітохондрії є одними з ключових органел ГМК, які через потенціал-залежне формування Ca^{2+} -мікродоменів визначають ефективність скорочувальної активності [623, 625], у першій серії експериментів ми досліджували внесок цих органел у процес розслаблення поздовжніх ГМ міометрія.

Блокування Ca^{2+} -запасаючої функції мітохондрій застосуванням протонофору СССР (2 мкМ, 5 хв попередньої інкубації) спричиняло активацію спонтанної скорочувальної активності (Рис. 9.18).

Як видно з Рис. 9.19, аплікування СССР (2 мкМ) на максимумі фазного скорочення, спричиненого гіперкалієвим розчином, викликало декілька ефектів: по-перше, маємо початкове прискорення процесу розслаблення, яке переходить у другу фазу з низькою швидкістю. По-друге, за дії СССР спостерігається збільшення тонічної складової K^+ -індукованого скорочення [627].

У наступній серії експериментів було досліджено вплив пригнічення Ca^{2+} -запасаючої функції СР алкалоїдом тапсигаргіном.

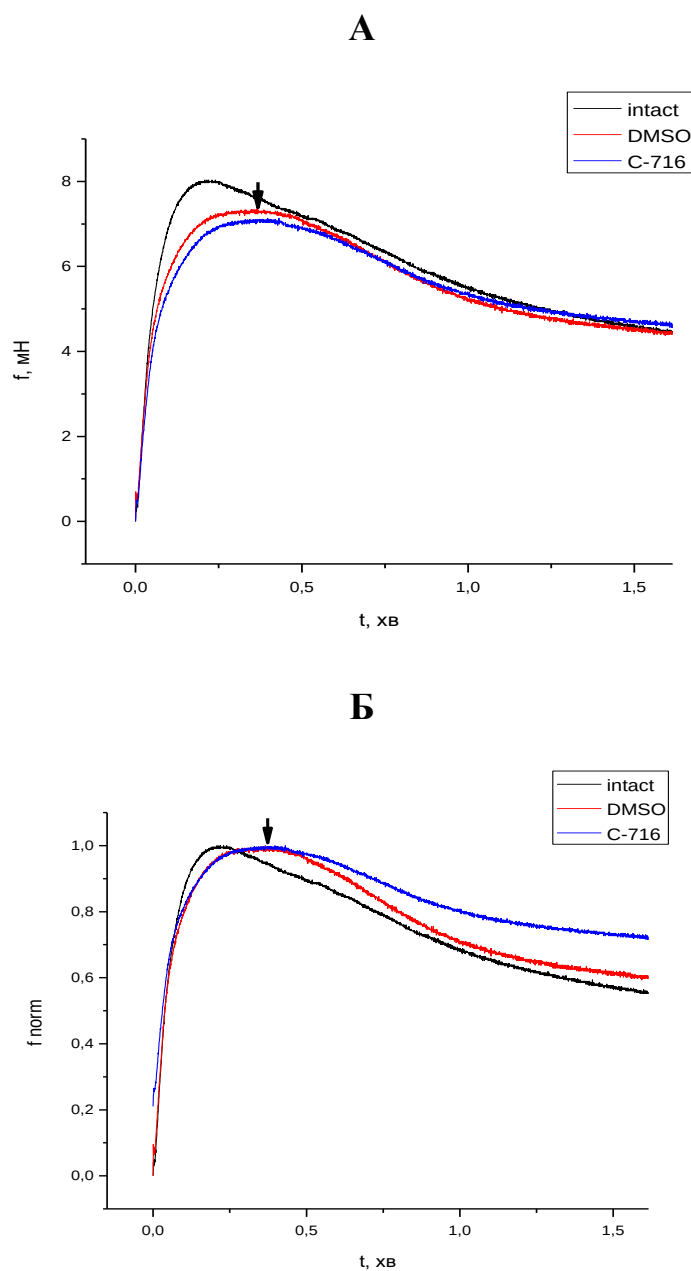


Рис. 9.17. Вплив на кінетику фази розслаблення K^+ -викликаного (80 мМ) скорочення каліксарену C-716 (100 мкМ) порівняно з контрольними трендами (intact – інтактний контроль, DMSO – аплікація органічного розчинника диметилсульфоксиду 0,5% в гіперкалієвому (80 мМ) розчині): А – оригінальні механограми; Б – нормовані в межах [0-1] осі ординат механограми. Стрілкою показано момент аплікування DMSO та каліксарену C-716. Наведено типові механограми.

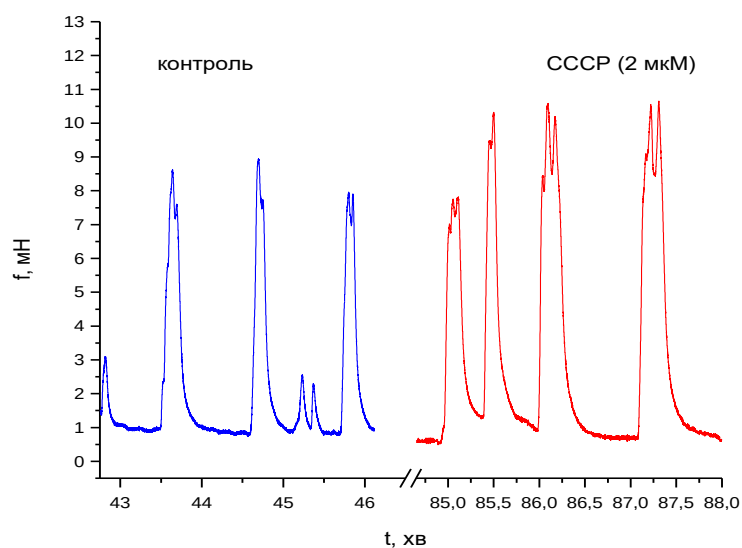


Рис. 9.18. Зміна спонтанної скоротливої активності ГМ міометрію щурів за впливу мітохондріального протонифору CCCP (2 мкМ, привалість попередньої інкубації 5 хв.). За контроль прийнято дію органічного розчинника диметилсульфоксиду (DMSO, 0,5%). Наведено типову механограму.

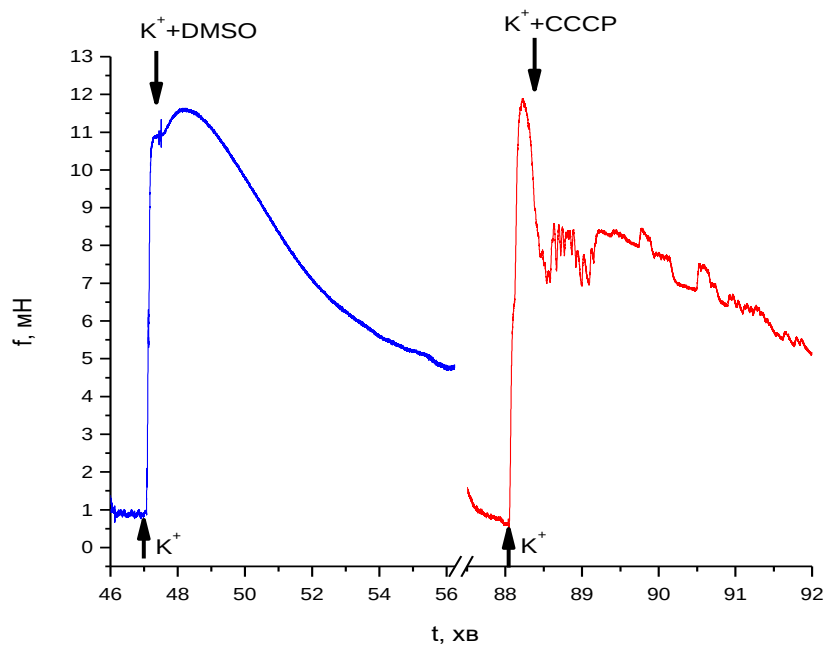


Рис. 9.19. Зміна скоротливої активності: Б - модуляція фази розслаблення K^+ -викликаного (80 мМ) скорочення ГМ міометрію щурів тапсигаргіном за впливу мітохондріального протонифору CCCP (2 мкМ, привалість попередньої інкубації 5 хв.). Наведено типові механограми.

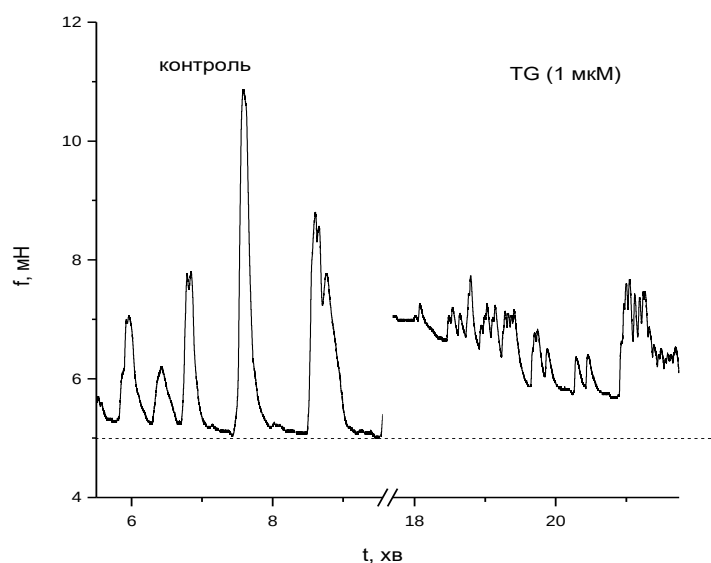


Рис. 9.20. Зміна спонтанної скорочувальної активності гладеньких м'язів міометрія шурів за блокування Ca^{2+} -кальцієвої помпи саркоплазматичного ретикулуму тапсигаргіном (TG, 1 мкМ, привалість попередньої інкубації 20 хв.). За контроль прийнято дію органічного розчинника диметилсульфоксиду (DMSO, 0,5%). Наведено типову механограму.

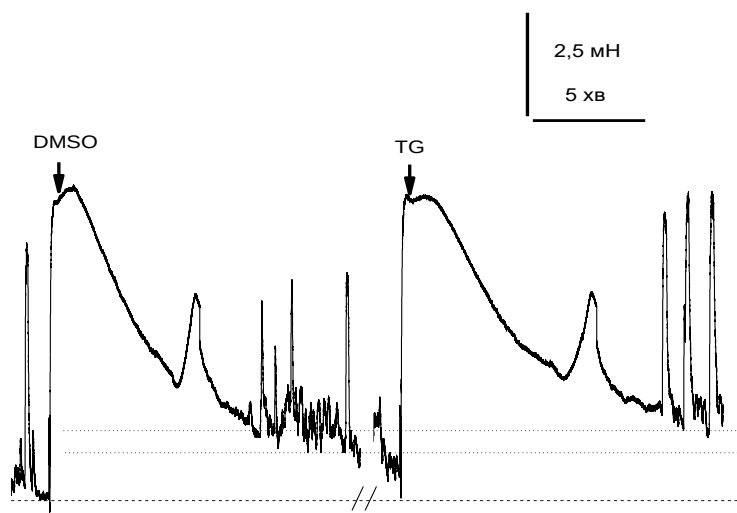


Рис. 9.21. Модуляція фази розслаблення K^{+} -викликаного (80 мМ) скорочення ГМ міометрія шурів за блокування Ca^{2+} -кальцієвої помпи саркоплазматичного ретикулуму тапсигаргіном (TG, 1 мкМ, привалість попередньої інкубації 20 хв.). За контроль прийнято дію органічного розчинника диметилсульфоксиду (DMSO, 0,5%). Стрілкою позначено момент додавання розчину ДМСО або ТГ. Наведено типові механограми.

Блокування кальцієвої помпи саркоплазматичного ретикулула (СРКА) тапсигаргіном (ТГ, 1 мкМ, 30 хв попередньої інкубації) спричиняло значне підвищення базального тону, відносне зниження амплітуди та значне підвищення частоти спонтанних скорочень (Рис. 9.20). За дії ТГ спостерігалось збільшення тонічної складової і уповільнення фази розслаблення скорочень ГМ, викликаних K^+ -деполяризацією (Рис. 9.21).

Аби відокремити внесок безпосередньо процесів викачування іонів Ca^{2+} з ГМК через систему ПМКА, у наступній серії експериментів здійснювали комбінування інактивації здатності акумулювати Ca^{2+} одночасно обома внутрішньоклітинними депо (СР і мітохондріями), застосовуючи комбінацію блокатора СРКА тапсигаргіну (1 мкМ) та протонатора мітохондрій CCCP (2 мкМ). Як видно з рис. 9.22, за цих умов процес релаксації K^+ -індукованого скорочення відбувався швидше (у середньому на 75%), але попри це тонічна складова гіперкалієвого скорочення була вірогідно підвищеною.

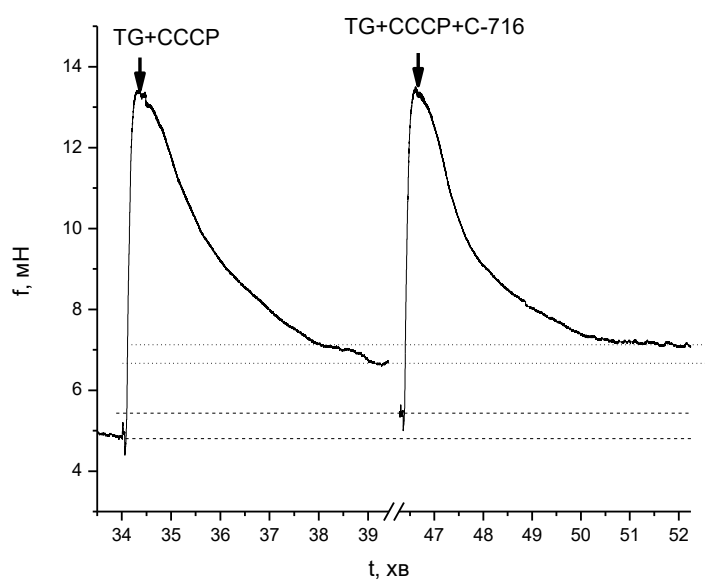


Рис. 9.22. Зміна фази розслаблення K^+ -викликаного (80 мМ) скорочення міометрія щурів за дії тапсигаргіну (ТГ, 1 мкМ, привалість попередньої інкубації 20 хв.) і CCCP (А) (2 мкМ, привалість попередньої інкубації 5 хв.) (А) та сукупної дії ТГ, CCCP і каліксарену С-716 (100 мкМ) (Б). Стрілкою позначено момент додавання ДМСО або С-716. Наведено типові механограми.

Роботи по встановленню ролі ПМКА у підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу та скоротливої активності вісцеральних гладеньких м'язів були виконані Liu L. та колегами [272, 273] із використанням моделей абляції генів, які кодують ізоформи ПМКА1 і ПМКА4 ($Pmca1^{+/-}$, $Pmca4^{+/-}$, $Pmca4^{-/-}$, та $Pmca1^{+/-}Pmca4^{-/-}$). Дослідженнями скорочувальної активності та Ca^{2+} -сигналів, індукованих деполяризацією плазматичної мембрани та агоністом мускаринових рецепторів карбахоліном, ГМ сечового міхура мишей з зазначеними випадками нокауту ізоформ ПМКА показано, що чутливими показниками до вибіркового нокауту цих ензимів є не лише фаза розслаблення, але (навіть відносно більшою мірою) і фаза скорочення [211]. Цікаво, що напівчас ($\tau_{1/2}$) розслаблення м'язових препаратів після відмивання гіперкалієвого розчину у випадку $Pmca1^{+/-}$ та $Pmca1^{+/-}Pmca4^{-/-}$ у середньому складав 84,1% та 94,2% відповідно, порівняно з інтактними контролями. У випадку інгібування функціонування інших систем транспорту Ca^{2+} , спостерігались наступні ефекти: пригнічення Ca^{2+} -помпи СР не супроводжувалось вірогідними змінами $\tau_{1/2}$ релаксації гладеньком'язових препаратів після відмивання гіперкалієвого розчину (середнє значення становило 122,5% порівняно з інтактними об'єктами) [272]. Оскільки ГМК міометрія експресують аналогічні ізоформи ПМКА, ми можемо використати матеріал досліджень [272, 273] аби краще зрозуміти процеси, які мають місце в міометрії при дії на неї макроциклічної сполуки – каліксарену С-716.

Таким чином, аплікування каліксарену С-716 на максимумі фазного K^{+} -індукованого скорочення в умовах блокування Ca^{2+} -запасаючої функції внутрішньоклітинних кальцієвих депо (що дозволило відокремити внесок плазматичної мембрани у Ca^{2+} -транспортувальні процеси) спричиняє збільшення швидкості процесу розслаблення міометрія на фоні підвищеної тонічної складової скорочувальної реакції [627].

* * * * *

У даному розділі представлені результати комплексного дослідження щодо для встановлення закономірностей і механізмів впливу каліксаренів С-90 і С-716, для яких відома здатність з високою активністю інгібувати ПМКА.

1. Підвищення тонічної складової K^+ -скорочення гладеньких м'язів міометрія під дією калікс[4]арену С-716 (за попереднього блокування обміну іонів Са у внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо) пов'язане з підвищеною концентрацією іонів Ca^{2+} в міоцитах, тоді як збільшення нормованої швидкості розслаблення за цих умов, ймовірно обумовлюється суттєвою активацією синтезу оксиду азоту конститутивними формами NO-синтаз.
2. Одержане у випадку передінкубації гладеньком'язових препаратів міометрія з калікс[4]ареном С-90 вірогідне зниження нормованої максимальної швидкості розслаблення V_{nr} спонтанних і викликаних окситоцином скорочень ймовірно пов'язане зі спрямованим інгібуванням ПМКА. На фоні дії блокатора синтаз оксиду азоту L-NAME калікс[4]арен С-90 не здатен до пригнічення сили фазних K^+ -і окситоцин-викликаних скорочень, але спричиняє зниження їх нормованої максимальної швидкості розслаблення V_{nr} . Отже, блокування синтезу NO призводить до усунення інгібування як спонтанних, так і викликаних скорочень ГМ міометрія під дією калікс[4]арену С-90.

Результати, викладені у розділі, опубліковані у наступних роботах: [513, 607, 621, 627].

РОЗДІЛ 10

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Гладеньком'язова тканина формує структурно-функціональну основу стінок багатьох внутрішніх органів і систем (судинного русла, шлунково-кишкового тракту, сечового міхура і сечових шляхів, матки, дихальних шляхів тощо). У основі її функціонування лежить здатність змінювати довжину у відповідь на збудливі (скорочуватись) або гальмівні (розслаблятись) стимули, активно модулюючи при цьому напруження всередині порожнин. Збудливість вісцеральних ГМ суттєво залежить не лише від нейрональних впливів з боку автономної і ентеральної нервової системи, але й значною мірою визначається фізико-хімічними і фармакологічними чинниками внутрішнього середовища.

У вивченні закономірностей і механізмів впливу на функціонування внутрішніх органів різних фізико-хімічних та фармакологічних чинників, особливо лікарських засобів на рівні доклінічних досліджень, та інших ксенобіотиків, однією з перших і найбільш актуальних задач є встановлення їх ефектів на тканину гладеньких м'язів, які формують стінки шлунково-кишкового тракту. Оскільки окремими мішенями дії цих факторів можуть бути процеси не лише в «робочих» міоцитах, але й нейронах, пейсмейкерних клітинах та міжклітинних контактах, такі дослідження повинні включати в себе експерименти, здійснені *in vivo*, *in vitro*, а також все частіше – і *in silico*. Масштабні і всебічні дослідження потребують додаткових методів кількісного аналізу, що забезпечуватимуть адекватне порівняння і співставлення результатів, отриманих різними дослідницькими групами, на різних об'єктах та із застосуванням модифікацій методик. Особливо цінними в цьому сенсі варто вважати методи кінетичного аналізу, що дозволяють здійснювати не лише точне кількісне співставлення результатів, але й передбачення клітинних і молекулярних механізмів дії досліджуваних

чинників. Тому така методологія на тепер активно розвивається і набуває широкого застосування у фармакологічних, медико-біологічних, фізіологічних і біофізичних дослідженнях.

Отож, з огляду на важливість встановлення кількісних закономірностей і механізмів регуляції напруження і скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів в умовах дії нанорозмірних матеріалів, у роботі представлені комплексні дослідження із залученням сукупності методичних підходів *in silico*, *in vitro* та *in vivo*.

У розділі 4 дисертації детально вивчено та встановлено кількісні закономірності механічних і термодинамічних властивостей ГМ, які формують стінки органів ШКТ (товстого кишечника і шлунку). Для встановлення зазначених властивостей ГМ травного тракту нами було здійснено кількісний аналіз температурних ефектів на механограмах «деформація-час» (за фіксованих навантажень) та «навантаження-деформація» (при постійному та градуально зростаючому навантаженні) кільцевих ГМ шлунку.

Також нами було проаналізовано термомеханокінетичні закономірності навантаження-індукованих деформації та релаксації (криві гістерезису) препаратів кільцевих ГМ шлунку та товстого кишечника (*colon* та *caecum*) щурів. Запропоновано та апробовано математичний феноменологічний опис кривих гістерезису м'язів із застосуванням кількісних параметрів: силових констант k_1 та k_2 (для навантаження та розвантаження відповідно); показників $P_{1/2,c}$ (таке значення навантаження, яке спричиняє напівмаксимальну деформацію препарату) та $P_{1/2,r}$ (значення залишкового навантаження, при якому спостерігається половинне відновлення довжини препаратів). Повний цикл гістерезису кількісно характеризується площею петлі гістерезису ($\Delta\Theta$), яка служить енергетичним показником тимчасової незворотності процесу повернення довжини деформованої ГМС до ненавантаженого стану. Із застосуванням вищезазначених кількісних

параметрів показано, що деформація гладеньких м'язів шлунку має незначну термочутливість і фізичному сенсі являє собою пасивний процес.

Визначено аналітичний вираз для розрахунку роботи деформації ΔA при розтягуванні м'язової смужки з початковою довжиною L_0 на довжину ΔL силою P , а також встановлено, що при деформуванні ГМ шлунку найбільша робота виконується в межах фізіологічно значущих температур (28-37°C), досягаючи максимального абсолютного значення в області помірного охолодження (28-31°C). У лівій (22-25°C) та правій (40-48°C) частинах температурного діапазону прикладання аналогічних величин деформуючої сили f спричиняє виконання над системою відносно меншої (до 40%) роботи і, таким чином, є менш термодинамічно вигідним. Отже, найбільш ефективним (з точки зору виконання роботи) є функціонування м'язової системи в діапазоні температур від невеликого охолодження до норми (28-37°C).

Отримані у наших дослідженнях ефекти безпосередньо пов'язані з фізіологічними властивостями м'язів. Так, відомо, що фізіологічно обґрунтованим (щодо харчового раціону) температурним діапазоном для людини є 21 – 43°C, тоді як термічні впливи понад 48-52°C активують ноціцептори, спричиняючи больові відчуття [435, 442, 628]. При різних температурах в клітинах гладеньких м'язів, які формують стінку шлунку, активуються терморецептори – катіонні канали TRPM8 і TRPV2 [439, 629]. Канали TRPM8 експресуються в міоцитах; вони активуються при зниженні температури менше 25 °C (за деякими даними ≤ 28 °C) і практично інактивуються при досягненні 30 °C [439, 630, 631]. Канали TRPV2 експресуються лише в пейсмерних клітинах Кахаля і активуються при значному нагріванні – понад 52 °C, тобто не можуть обумовлювати одержані нами ефекти [439, 631, 632]. У той же час, як показано багатьма дослідженнями, зокрема і на гладеньких м'язах фундального відділу шлунку щурів, їх холодове скорочення опосередковується саме TRPM8 (за механізмом TRPM8-індукованої активації кінази Rho) [447]. Отож, роль цих

каналів ймовірна в ефектах, виявлених нашими дослідженнями: досить потужне (близько 25-30%) збільшення ΔA при підвищенні температури з 25 °C до 28-31 °C може бути пов'язане саме з різним внеском TRPM8 в формування базального напруження м'язів шлунку.

На наступному етапі дослідження, нами із застосуванням рівняння Віганда-Снайдера здійснено термодинамічний аналіз високоеластичної деформації ΔL ГМ *antrum* шлунку. Показано, що малі ($\Delta L/L_{\pi} \approx 20\%$) розтягування гладеньком'язових смужок (діапазон температур 22-48 °C) не супроводжуються змінами у впорядкованості тензометричної системи ($\Delta S = 0$). Такий самий феномен маємо і у випадку значних розтягувань ($\Delta L/L_{\pi} \approx 50\%$), але у більш вузькому діапазоні температур: понад 30 °C і менших від 40 °C. При великих розтягуваннях м'язів ($\Delta L/L_{\pi} \approx 50\%$), як при відносно низьких (22-30 °C), так і при відносно великих (понад 37 °C) температурах мають місце суттєві структурні зміни у тензометричній системі. За цих умов спостерігається інверсія знаку ентропійних ефектів: $\Delta S > 0$ при температурах менших від 31°C та $\Delta S < 0$ при температурах понад 37 °C. Не зважаючи на певні протиріччя у даних різних дослідників [430, 433, 442, 632-634] щодо впливу їжі зі зниженою і підвищеною температурою на моторну, і зокрема, евакуаторну функцію шлунку, наші дані узгоджуються з результатами інших дослідників. Так, за даними В. Сан з колегами [433, 442], на рівні цілісного організму існує сильний прямий лінійний зв'язок між внутрішньошлунковою температурою і швидкістю спорожнення шлунку. Таким чином, можна припустити, що, значні деформації за зниженої температури (тобто вживання великого об'єму охолодженої їжі), є несприятливими, пригнічувальними для функціонування ШКТ. У той же час, вживання великих об'ємів теплої їжі (з температурою понад 32°C і принаймні до 40 °C), або вживання незначних об'ємів їжі незалежно від температури (22-48 °C), не передбачає ускладнень з боку травного тракту. Зниження внутрішньої енергії ΔU та ентропії ΔS , за умови харчування продуктами з надмірною температурою, ймовірно, пов'язано з різними діапазонами термоіндукованої деструкції білків ГМ:

зокрема, відомо, що при 40 °С спостерігається максимальне значення АТФ-азної активності гладеньком'язового актоміозину (а при температурах понад 40 °С, принаймні, до 45 °С, вона статистично не відрізняється від максимальної) [635], однак більшість інших клітинних ензимів при температурах понад 42 °С починають інактивуватись [431]. Тож встановлені нами термодинамічні ефекти пов'язані з фізіологічними механізмами регуляції функціонування травного тракту.

Як зазначалось вище, при дослідженнях впливу чинників, що впливають на функціонування м'язів, виникає нагальна необхідність застосування кількісних методів аналізу і порівняння отриманих даних, особливо важливою стає ця задача при співставленні результатів які статистично є незалежними вибірками. Тому нами (розділ 3) на спонтанних і викликаних скороченнях мультіклітинних препаратів вісцеральних гладеньких м'язів здійснено ґрунтовну апробацію методу механокінетичного аналізу (розробленого С.О. Костеріним та Ф.В. Бурдигіою), який зводиться до розрахунку незалежних від амплітуди скорочувальних реакцій нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення (відповідно, V_{nc} та V_{nr}). Метод був запропонований авторами лише для аналізу спаду м'язового напруження та зниження Ca^{2+} -сигналу суспензії міоцитів, із розрахунком V_{nr} . Із застосуванням статистичного аналізу, нами було доведено, що зазначений метод, який базується на лінеаризації окремих фрагментів механограм у координатах $\{\ln[(f_m - f)/f]; \ln t\}$, може в однаковій мірі використовуватись як до аналізу фази спаду, так і фази наростання напруження.

Даний метод аналізу нами було апробовано на численних прикладах механограм спонтанних і викликаних деполяризацією плазматичної мембрани та агоністами рецепторів скорочувальних відповідей вісцеральних гладеньких м'язів. Так, нашими дослідженнями із застосуванням механокінетичного аналізу проаналізовано та кількісно охарактеризовано викликані (K^+ -індукованою деполяризацією, нейромедіаторами і фармакологічно-активними речовинами: ацетилхоліном, гістаміном,

брадикініном, нікотинном та кофеїном) скорочення кільцевих ГМ шлунку і товстого кишечника, а також спонтанні і викликані (K^+ -індукованою деполяризацією, нейромедіатором ацетилхоліном і утеротонічним гормоном окситоцином) поздовжніх ГМ міометрія. Встановлено закономірності впливу на кінетику скорочення і розслаблення (V_{nc} та V_{nr}) окремих фізико-хімічних і фармакологічних факторів (зміни концентрації іонів Na^+ і Mg^{2+} , температури, блокування ПКК L-типу і Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ, брадикінінових рецепторів) на моторику вісцеральних ГМ.

На нашу думку, застосування методу механокінетичного аналізу за методом С.О. Костеріна і Ф.А. Бурдиги, є надзвичайно корисним для встановлення кількісних змін скорочувальних відповідей вісцеральних ГМ, а також для виявлення ймовірних ланок впливу на них фармакологічно-активних речовин і ксенобіотиків на субклітинному і клітинному рівнях. Тому виконання досліджень, результати яких наведено в розділах 5-9, передбачало активне використання зазначеного методу кінетичного аналізу.

Сучасні технології у медицині та різних галузях промисловості передбачають інтенсивну розробку та впровадження супрамолекулярних речовин і наноматеріалів. Відповідно, це створює передумови інтенсифікації проникнення, накопичення і включення в метаболізм цих сполук у організмі людини. Натепер накопичено великий обсяг даних медико-біологічних досліджень, спрямованих на перевірку і дослідження біологічної активності нанорозмірних матеріалів, зокрема, нанотрубок, фулеренів, каліксаренів, квантових точок, наночастинок оксидів металів тощо.

Серед ксенобіотиків, фармако-токсикологічне навантаження яких на організм людини в останні десятиріччя набуло загрозливих меж, одне з перших місць посідає наноматеріал діоксиду титану. TiO_2 – найбільш вживаний (обсяг виробництва і використання понад 10 млн. тонн на рік) промисловий барвник білого кольору. Зокрема, він широко використовується для надання забарвлення харчовим продуктам, косметичним і гігієнічним засобам, наномедичним реактивам, фармацевтичним засобам. Нанорозмірні

ксенобіотики можуть проникати в організм людини різними шляхами, втім головним з них є ШКТ. Тому, з огляду на важливість вивчення впливу TiO_2 на м'язові стінки порожнистих органів, нами було здійснено комплексні дослідження *invitro* закономірностей та механізмів дії наночастинок TiO_2 різних розмірних груп та з різним співвідношенням у суміші поліморфів рутилу і анатазу (1-3 нм (рутил), 4-8 нм (анатаз) та 21 нм – фотокаталітичний стандарт P25, зі співвідношенням рутил:анатаз=1:4), в режимах гострого навантаження великими концентраціями та при кумулятивному їх збільшенні.

Нами було досліджено ефекти аплікування (в умовах кумулятивного збільшення концентрацій в діапазоні 10^{-7} - 10^{-4} мг/мл) наноструктурованого матеріалу TiO_2 різних розмірних груп. Було встановлено, що НЧ TiO_2 з середнім розміром 1-3 нм спричиняють помірне (за дії 10^{-4} мг/мл TiO_2 спостерігалось пригнічення у середньому на 26,6%) пригнічення спонтанних скорочень *antrum*, з тенденціями до зниження загальної продуктивності м'язів. TiO_2 у формі анатазу (середній розмір частинок 4-8 нм) спричиняв виражений дозо-незалежний ефект з суттєвим (у середньому вдвічі) пригніченням амплітуди та показників ефективності скорочувальної активності в Олександрійських одиницях і одиницях Монтевідео. За кумулятивної дії НЧ TiO_2 з середнім розміром 21 нм (співвідношення поліморфів анатаз:рутил=4:1) суттєво та дозо-залежно пригнічували спонтанну скорочувальну активність м'язів *antrum*; наприклад, за максимальної застосованої концентрації суспензії амплітуда скорочень у середньому становила 19,6%, скорочувальний індекс в одиницях Монтевідео – 22,2%.

Таким чином, всі досліджені НЧ TiO_2 в умовах кумулятивної дії *in vitro* спричиняли пригнічення спонтанної скорочувальної активності ГМ товстого кишечника і шлунку щурів. Співставляючи закономірності ефектів TiO_2 на спонтанні скорочення *antrum*, можна відзначити, що найменшою відносною біологічною активністю володіють частинки у формі рутилу з середнім

розміром 1-3 нм. У випадку низьких концентрацій частинок (10^{-6} мг/мл) достовірно найбільш активними є частинки у формі анатазу з середнім розміром 4-8 нм. За кумулятивної дії високих концентрацій частинок (10^{-4} мг/мл) між ефектами часток розмірів 20 нм (анатаз:рутил=4:1) та 4-8 нм (анатаз) на амплітуду і показники скорочувальних індексів (в Олександрійських одиницях і одиницях Монтевідео) немає достовірних відмінностей, хоча тенденції дозволяють передбачити вищу активність часток 4-8 нм.

Також було встановлено, що суспензії наноматеріалу TiO_2 різних поліморфів зазначених розмірних груп спричиняють неоднорідний вплив на кінетичні властивості поодиноких спонтанних скорочень. Так, частинки у формі рутилу (з середнім розміром 1-3 нм) не змінювали показники тривалості фаз скорочення і розслаблення. За дії наночастинок 4-8 нм (анатаз) відбувалось зниження тривалості фази скорочення без достовірних змін кінетики фази розслаблення. В умовах кумулятивного зростання концентрації частинок TiO_2 середнього розміру 21 нм (співвідношення анатаз:рутил=4:1) спостерігались зміни параметрів скорочувального акту: зменшувалась тривалість фази скорочення і збільшувалась тривалість фази розслаблення, що призводило до зміни пов'язаного з ними показника асиметрії. Такі зміни абсолютних значень тривалостей фаз скорочення і розслаблення, ймовірно, вказують модуляцію НЧ TiO_2 механізмів енергонезалежного і енергозалежного транспорту іонів Ca^{2+} , відповідно [137, 138, 395].

Нами встановлено, що особливості внесення до розчину (кумулятивне та одномоментне), омиваючого ГМ, високих концентрацій TiO_2 ($2 \cdot 10^{-3}$ мг/мл; середній розмір 21 нм; співвідношення поліморфів анатаз:рутил=4:1) у значній мірі визначають ефекти цих НЧ на властивості поодиноких актів скорочення-розслаблення ГМ шлунку. В обох випадках частота скорочень не відрізнялась від контрольної, що ймовірно вказує на нечутливість до дії даних частинок пейсмейкерних механізмів в тканині м'язу. Спостерігалась

також суттєва відмінність у ступеню пригнічення амплітуди (на користь кумулятивного внесення суспензії НЧ) скорочувальних відповідей, а також безпосередньо пов'язане з цим показником зниження ефективності скорочувальної активності (індексів у Олександрійських одиницях і одиницях Монтевідео); це вказує на існування часо-залежного пригнічення процесів спряження збудження-скорочення наночастинками TiO_2 в ГМК.

Спонтанну скорочувальну активність ГМ ШКТ, яка забезпечується пейсмейкерною активністю ICC, можна охарактеризувати двома головними параметрами: амплітудою і частотою. Відомо [57-61], що саме функціонування ICC та їх зв'язок з нейронами інтрамурального сплетення, є ключовими факторами, які визначають частоту генерації провідних хвиль деполяризації і, як наслідок, - спонтанних скорочень м'язової стінки травного тракту. Генерація повільних хвиль деполяризації ICC обумовлюється концертним, узгодженим функціонуванням трьох клітинних компонентів (пейсмейкерної одиниці): ПМ, СР і мітохондрій. У стінці антрального відділу шлунку щурів присутні дві популяції ІКК: ICC-SM (розташовані між гладеньком'язовими волокнами) і ICC-MY (клітини Кахаля в міоентеральному нервовому плексі). Амплітуда спонтанних скорочень переважно залежить від функціонального стану ГМК – внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} та стану системи Ca^{2+} -незалежної активації скорочувальних білків. Отже, оскільки нашими дослідженнями встановлено, що ефект НЧ TiO_2 , перш за все проявляється зниженням амплітуди спонтанних скорочень без суттєвої зміни їх частоти, ймовірно передбачити, що переважно дія наночастинок спрямована на часо-залежну модуляцію (пригнічення) процесів спряження збудження-скорочення в ГМК. Варто також відзначити, що вплив наночастинок TiO_2 з середнім розміром 21 нм супроводжується значним зменшенням максимальної швидкості фази розслаблення спонтанних скорочень, що може вказувати на пригнічення процесів енергозалежного транспорту (екструзії) іонів Ca^{2+} в ГМК.

Оскільки виявлені нами ефекти нанорозмірного матеріалу TiO_2 на генерування спонтанної скоротливої активності ймовірно супроводжуються його дією на окремі системи іонного транспорту ПМ і внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо, у наступній серії експериментів нами було вивчено процеси, які обумовлюються деполяризацією ПМ ГМК гіперкалієвим розчином (K^+ -деполяризація, 80 мМ) та агоністами, в умовах присутності у омиваючому гладеньком'язові препарати розчині НЧ TiO_2 .

Нами встановлено, що при кумулятивному збільшенні концентрацій TiO_2 ефект частинок на ацетилхолінові скорочення залежав від їх розмірів і поліморфного складу. Так, за присутності низьких концентрацій TiO_2 (10^{-7} мг/мл) наночастинки середнього діаметру 21 нм (співвідношення поліморфів рутил:анатаз = 4:1) спричиняли дозо-залежне пригнічення скорочень; частинки з діаметром 4-8 нм (поліморф анатаз) їх не змінювали, тоді як 1-3 нм (поліморф рутил) їх активували. Із застосуванням кінетичного аналізу виявлено, що на діапазоні досліджених концентрацій наночастинок TiO_2 трьох розмірних груп (1-3 нм, 4-8 нм і 21 нм) спостерігається активація показника нормованої максимальної швидкості фази розслаблення (V_{nc}); втім, величина ефектів та їх концентраційний тренд вірогідно відрізняються. Найменшою відносно активаторною здатністю щодо V_{nc} володіли наночастинки з середнім розміром 1-3 нм. Такі результати, на нашу думку свідчать, що за дії НЧ TiO_2 відбувається прискорення процесів опосередкованого активацією M_3 -холінорецепторів збільшення концентрації іонів Ca^{2+} в міоплазмі ГМК; втім, оскільки амплітуда ацетилхолінових скорочень під дією НЧ суттєво пригнічена, ймовірно абсолютне значення ІТФ-залежного викиду іонів Ca^{2+} зменшується.

Нормована максимальна швидкість фази розслаблення (V_{nr}) ацетилхолінових скорочувальних відповідей, зареєстрованих в умовах преінкубації з НЧ TiO_2 різного розміру і складу поліморфів, проявляла не лише концентраційну залежність, але також варіабельність напрямку ефектів (активація та інгібування) залежно від середнього розміру частинок в

суспензії. Так, за присутності НЧ TiO_2 з середнім розміром 1-3 нм спостерігалось незначне прискорення процесу розслаблення препаратів; дія НЧ з середнім розміром 4-8 нм супроводжувалась незначним дозо-незалежним, проте достовірним зниженням показника $V_{\text{пр}}$; присутність в омиваючому ГМ розчині TiO_2 з середнім розміром наночастинок 21 нм супроводжувалась достовірним підвищенням швидкості процесу розслаблення ацетилхолінових скорочень. Механічні зміни підчас фази розслаблення фактично являють собою результат накладання принаймні двох протилежно спрямованих комплексних процесів: по-перше, на підвищення напруження м'язів працюють електромеханічні процеси енергонезалежного надходження іонів Ca^{2+} до міоплазми та фармакомеханічні механізми продовження дії ацетилхоліну переважно опосередковано активації M2-типу мускаринових холінорецепторів. По-друге, на цьому фрагменті механокінетичної кривої зниження напруження забезпечується системами енергозалежного викачування іонів Ca^{2+} ПМ і внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо. Тож, на нашу думку, зазначені ефекти щодо $V_{\text{пр}}$ можуть бути пов'язані з модулюванням під дією TiO_2 процесів надходження іонів Ca^{2+} шляхами електромеханічного спряження і опосередкованих активацією M2-холінорецепторів та/або енергозалежних процесів викачування цих катіонів з міоплазми, та/або процесів десенситизації скорочувальних білків у ГМК.

Вплив TiO_2 на K^+ -індуковані скорочення визначався як концентрацією, так і розміром та поліморфом ресуспендованих наночастинок. Так, додавання наночастинок з середнім розміром 21 нм спричиняло суттєве, дозо-залежне за величиною ефекту пригнічення амплітуди скорочень. Ефект наночастинок TiO_2 меншого розміру (4-8 нм, поліморф анатаз) на K^+ -індуковані скорочення кільцевих ГМ антрального відділу шлунку можна було вважати двофазним відносно їх концентрації: у присутності частинок 4-8 нм у концентрації 10^{-7} мг/мл мало місце невелике зниження амплітуди, за концентрації 10^{-6} мг/мл скорочення залишались на рівні контролю, а подальше зростання концентрації супроводжувалось

активацією скорочень. Аналогічний за трендом двофазний ефект щодо амплітуди K^+ -індукованих скорочень *antrum* щурів спричиняло внесення в омиваючий ГМ розчин НЧ розміру 1-3 нм. Із застосуванням кінетичного аналізу встановлено, що НЧ розміру 21 нм на усьому діапазоні досліджених концентрацій дозо-залежно знижували швидкість фази скорочення V_{nc} ; частинки з середнім розміром 4-8 нм дозо-незалежно і у відносно меншій мірі знижували V_{nc} . На протигагу ефектам НЧ TiO_2 великих розмірів, частинки 1-3 нм спричиняли збільшення нормованої максимальної швидкості фази скорочення V_{nc} зі зворотною дозовою залежністю. Також суттєві розмір-і дозо-залежні ефекти були виявлені при дослідженні параметра нормованої максимальної швидкості фази розслаблення (V_{nr}). Як і у випадку швидкості фази скорочення, частинки 21 нм на усьому діапазоні досліджених концентрацій спричиняли дозо-залежне зниження V_{nr} . Дія наночастинок з середнім розміром 4-8 нм на параметр V_{nr} також була аналогічною до тенденцій зміни V_{nc} : мінімальною ефективною концентрацією, яка спричинила достовірне пригнічення V_{nr} , була 10^{-6} мг/мл; вона також не виявляла дозової залежності. Наночастинки з середнім розміром 1-3 нм спричиняли виражені дозо-залежні зміни параметра V_{nr} з трендом, аналогічним до V_{nc} .

Некумулятивний вплив TiO_2 розміром частинок 21 нм (час преінкубації 20-30 хв.) на ацетилхолінові та K^+ -індуковані скорочення кільцевих ГМ антрального відділу шлунку щурів залежав від концентрації наночастинок в омиваючому розчині: за присутності TiO_2 у концентрації 10^{-3} мг/мл спостерігалось пригнічення, тоді як їх аплікування у вищих концентраціях ($2,5 \cdot 10^{-2}$ та $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) супроводжувалось вірогідною активацією (як фазного, так і тонічного компонентів) скорочень. Кінетичним аналізом виявлено підвищення V_{nc} та відсутність змін V_{nr} .

Нами було здійснено ряд досліджень, спрямованих розкриття окремих механізмів впливу НЧ TiO_2 (на прикладі частинок з середнім розміром 21 нм, співвідношення рутил:анатаз=1:4) на функціонування гладеньких м'язів

ШКТ. Встановлено, що наночастинки TiO_2 не змінюють мобілізацію іонів Ca^{2+} з ІТФ- і ріанодин-чутливих пулів СР ГМК. Також нами виявлено, що блокування роботи дихального ланцюга мітохондрій усуває ефекти TiO_2 на ацетилхолінові скорочення. Виявлено, що попереднє блокування Ca^{2+} -каналів галапамілом (10^{-5} М) у значній мірі усуває активаційний ефект високими концентраціями НЧ на ацетилхолінові скорочення, що вказує на те, що за присутності високих концентрацій НЧ TiO_2 має місце активація надходження іонів Ca^{2+} через ПМ за рахунок активації ПМК. Атропінізація (10^{-5} М) гладеньком'язових препаратів не усувала активаційної дії високих концентрацій TiO_2 на K^+ -індуковані скорочення. Це свідчить про відсутність впливу НЧ на процеси спряження збудження-скорочення, які індукуються ендогенним ацетилхоліном, принаймні за умови активації його вивільнення деполяризацією тканин ГМ.

Із використанням високих концентрацій TiO_2 (21 нм) нами було показано, що ефекти цього наноматеріалу щодо метаботропних рецепторів у гладеньких м'язах *antrum*, спряжених з $G_{q/11}$ -білками, є рецептор-специфічними. Так, як згадувалось вище, за даних умов спостерігалось підвищення фазного і тонічного компонента ацетилхолін-індукованих скорочень. В аналогічних умовах, некумулятивна дія високих концентрацій TiO_2 супроводжувалась суттєвим пригніченням брадикінінових (10^{-7} М) скорочень; цей ефект не залежав від ацетилхолін-опосередкованих процесів та не був чутливим до присутності атропіну (10^{-5} М). Також нами встановлено, що наноматеріал TiO_2 модулює пресинаптичні і постсинаптичні механізми регуляції скорочення ГМ травного тракту за участі гістамінових рецепторів (вони також належать до надродини метаботропних рецепторів та є спряженими з $G_{q/11}$ -білками).

Також нами було вивчено процеси, які реалізуються при активації нікотинових ацетилхолінових рецепторів у ГМ *antrum*, в умовах кумулятивної дії наноматеріалу TiO_2 . Отримані нами результати свідчать, що фазний компонент скорочення активованого екзогенною аплікацією

ацетилхоліну та модульованого нікотинном, не чутливий до дії TiO_2 , тоді як тонічний – пригнічується. На нашу думку, за умов модуляції нікотинном ацетилхолінових скорочень, TiO_2 відновлює холінергічні механізми регуляції надходження іонів Ca^{2+} у ГМК.

Нами було досліджено процеси неадрегергічного нехолінергічного гальмування у ГМ *antrum* в умовах присутності суспензії TiO_2 (21 нм) в омиваючому розчині. Отримані нами результати свідчать, що система повільного компонента NANC не відіграє суттєвої ролі у розвитку спонтанних скорочень (ці дані узгоджуються з результатами, отриманими Gangula P.R. і колегами [640]) та процесів збудження-скорочення на постсинаптичному рівні: індукованих деполяризацією гладеньких м'язів гіперкалієвим розчином та активацією мускаринових холінорецепторів екзогенною аплікацією їх агоніста. Також, ймовірно, що вона не залучена у реалізацію ефектів нано- TiO_2 щодо сили скорочувальних відповідей ГМ *antrum*. Крім того, за присутності наночастинок TiO_2 спостерігались незначні тенденції до посилення процесів АТФ-викликаного гальмування-розслаблення кільцевих ГМ *antrum*, тож ймовірно, що система швидкого компонента NANC не має суттєвого внеску в реалізацію ефектів цих наночастинок. Сумарна схема ймовірних механізмів впливу НЧ TiO_2 наведена на Рис. 10.1.

Оскільки натепер накопичено потужний масив даних [346-349, 351-353], які вказують на здатність частинок нанорозмірних матеріалів, зокрема і діоксиду TiO_2 , проникати в організм, накопичуватись у окремих органах і тканинах, та спричиняти в них окремі патологічні зміни, нами було здійснено комплексне вивчення закономірностей накопичення НЧ TiO_2 при їх тривалому (30 і 100 діб) інтрагастральному введенні. Для проведення експериментів було обрано найбільш промислово поширені частинки з середнім розміром 21 нм (фотокаталітичний стандарт Р25, співвідношення рутил:анатаз=1:4). Щоденну дозу для інтрагастрального введення нами було

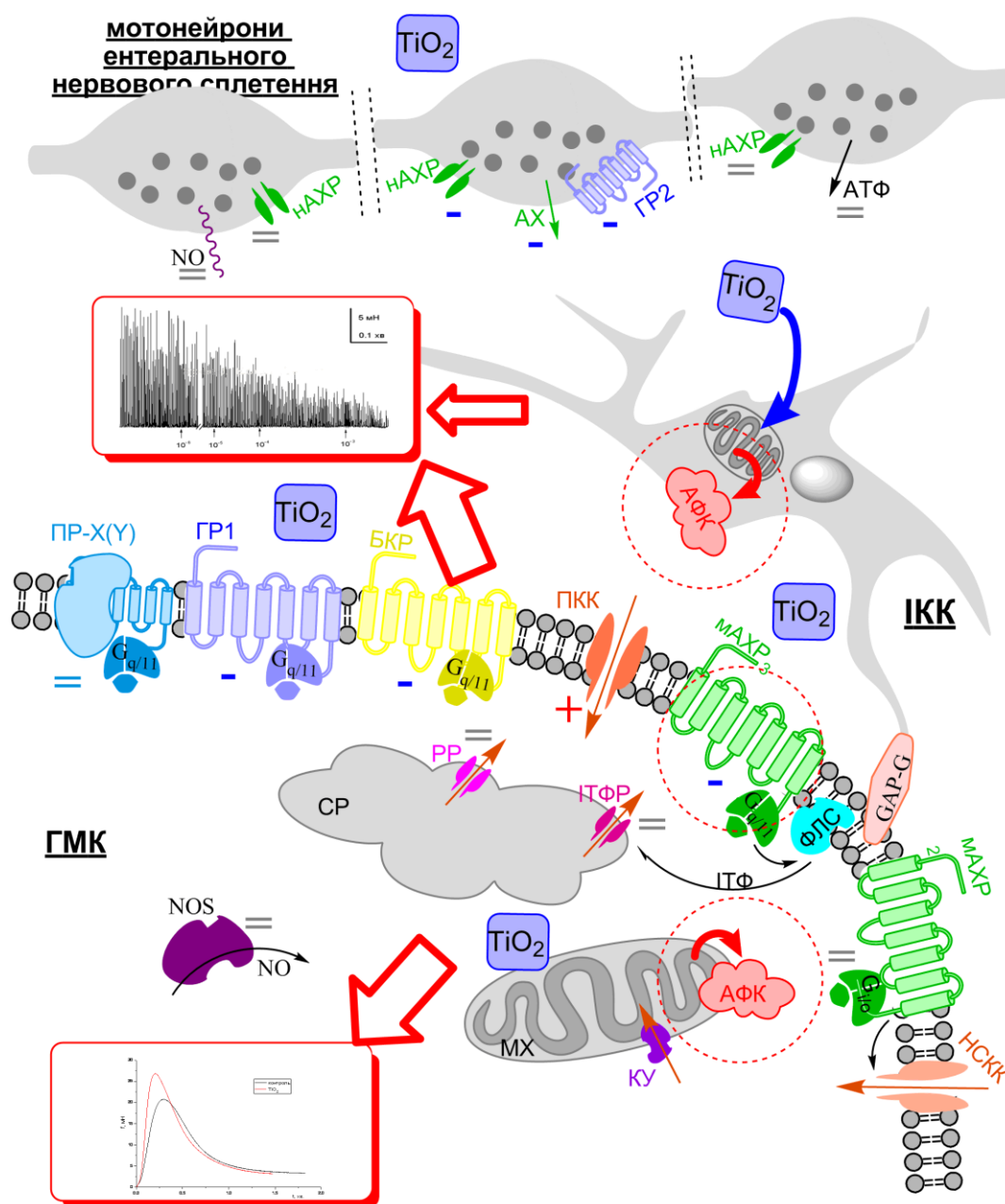


Рис.10.1 Схема механізмів дії *in vitro* наноматеріалу TiO_2 на тканину гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту. Позначення: ГМК – гладеньком'язова клітина; ІКК – інтерстиціальна клітина Кахаля; СР – саркоплазматичний ретикулум; МХ – мітохондрія; GAP-G – міжклітинні коннексонові канали; АФК – активні форми кисню; ПКК – потенціал керований Ca^{2+} -канал L-типу; НСКК – неселективний катіонний канал; КУ – Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій; РР – ріанодиновий рецептор; ІТФР – рецептор інозитол-1,4,5-трифосфату (ІТФ); ФЛС – фосфоліпаза С; ГР 1 і 2 – гістидинові рецептори типу 1 та 2; ПР-Х(У) – пуринорецептор Х (У) типу; БКР – брадикініновий рецептор; NOS – синтаза оксиду азоту (NO); нАХР – нікотинівий ацетилхоліновий рецептор; мАХР_{2/3} – мускариновий ацетилхоліновий рецептор типу 2 та 3.

обрано відповідно до середньодобового надходження TiO_2 з харчовими продуктами у Великій Британії: вона становила 0,1 мг / кг маси тварин [391].

Встановлено, що за умов інтрагастрального введення наноматеріал TiO_2 проникає в тканини організму та нерівномірно накопичується в різних органах. Елементним аналізом виявлено, що найбільшу кількість Ti накопичують тканини вісцеральних ГМ (шлунок > товстий кишечник > матка) та нирок.

Виявлено, що після тривалого (30 діб, група 2) інтрагастрального введення суспензії НЧ TiO_2 відбувається суттєве збільшення частоти і практично повне пригнічення амплітуди (у середньому на 75,0% та на 68,6% відповідно) спонтанних скорочень *саесит*. Також ці зміни суттєво позначились на показниках окремих спонтанних скорочень та загальної ефективності моторики. Зокрема, тривалість поодиноких циклів «скорочення-розслаблення» зменшувалась втричі, як і тривалість фази скорочення, а тривалість фази розслаблення – майже в п'ять разів. Варто відзначити, що за цих умов також драматично знижувалась сумарна ефективність скорочувальної активності ГМ товстого кишечника, що відобразилось на зниженні показників скоротливих індексів; зокрема скоротливий індекс, який виражався в Олександрійських одиницях зменшувався порівняно з контролем майже у шість разів.

Вживання упродовж 100 діб суспензії TiO_2 , супроводжувалось частковим відновленням ефективності спонтанної скорочувальної активності м'язів товстого кишечника, порівняно з даними групи 2. Так, хоча частота спонтанних скорочень надалі збільшувалась, та спостерігалось подальше пригнічення амплітуди скорочень, показник скоротливого індексу, який виражався в Олександрійських одиницях, збільшувався порівняно з даними групи 2 майже на 70%, хоча і залишався суттєво (у чотири рази) меншим відносно контролю (групи 1). Також спостерігались тенденції до відновлення показників тривалості фаз скорочень і розслаблень.

Для м'язів *antrum*, як і у випадку *caecum*, було характерним зниження амплітуди і підвищення частоти спонтанних скорочень. В умовах тривалого введення (протягом 30 діб, група 2) щурам суспензії TiO_2 спостерігались наступні зміни: тенденції до підвищення амплітуди, достовірне збільшення частоти, зменшення параметрів тривалості скоротливого циклу, фази скорочення і фази розслаблення, а також суттєве (у середньому вдвічі) зниження сумарної ефективності скорочувальної активності ГМ шлунку.

Введення упродовж 100 діб суспензії TiO_2 щурам, супроводжувалось подальшим пригніченням ефективності моторики ГМ шлунку, порівняно з даними групи 2. Так, хоча частота спонтанних скорочень надалі збільшувалась (майже на 60% порівняно з контролем), однак спостерігалось подальше пригнічення амплітуди скорочень. Втім, пригнічення показників скоротливих індексів у Олександрійських одиницях та одиницях Монтевідео не виявляли вірогідних відмінностей порівняно з цими показниками в групі 2. Також звертає на себе увагу зниження середніх швидкостей наростання/спаду сили фази скорочення/розслаблення: обидва показники були достовірно меншими порівняно з контролем, але особливо (у два рази) уповільнювалась фаза скорочення, що, на нашу думку, може бути пов'язано з пригніченням процесів мобілізації іонів Ca^{2+} та/або зниженням ефективності координації між міоцитами у стінці шлунку. Так, хоча детальні процеси, які обумовлюють генерацію спонтанної активності в м'язах ШКТ розкриті не в повній мірі, відомо, що початковий компонент деполяризації пов'язаний з вивільненням іонів Ca^{2+} з ІТФ-чутливої частини СР та їх захопленням мітохондріями [641]. Дослідженнями наукової групи під керівництвом Satoshi Yoneda було встановлено [457, 539], що повільні хвилі деполяризації є результатом спряжених процесів: активації потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів L-типу, вивільненням іонів Ca^{2+} з ІТФ-чутливої частини СР та їх закачуванням цих катіонів в мітохондрії. Хоча критичними ланками активації ІСС є усі вищеназвані структури, процес мобілізації Ca^{2+} з СР і перерозподіл їх в мітохондрії визначає частоту спонтанної активності (інгібується при

інгібуванні ІТФ-чутливих каналів 2-аміноетоксидифеніл боратом або при інгібуванні Ca^{2+} -помпи СР циклопіазонієвою кислотою). Амплітуда скорочень визначається Ca^{2+} -залежними (і частково Ca^{2+} -залежними) процесами в робочих міоцитах. Тож отримані результати вказують на те, що наночастинки TiO_2 , проникаючи в клітини м'язової стінки травного тракту з одного боку змінюють функціонування ІСС (ймовірно, мітохондріально-залежним шляхом), а також і скоротливих клітин ГМ та координації узгодженої діяльності між ними.

Оскільки нами, із використанням методу мас-спектрометрії, було встановлено значне накопичення TiO_2 в тканині матки, ми вивчали скорочувальні реакції міометрія, препарованого з тварин групи 1, 2 та 3. Встановлено, що тривале введення наночастинок TiO_2 в організм щурів супроводжувалось змінами спонтанної скорочувальної активності гладеньких м'язів міометрія: відбувалось зменшення частоти (близько 30%) і суттєве зростання амплітуди скорочень (майже в 3,5 рази порівняно з контролем). Це відобразилось у значному (у понад 4,5 рази) підвищенні ефективності моторики м'язів. Що стосується кінетики фази скорочення і розслаблення, то, загалом, тривалість обох цих фрагментів зростала вдвічі, тому показник асиметрії не мав вірогідних відмінностей щодо контролю; показники середньої швидкості фаз скорочення і розслаблення збільшувались у середньому на 70% відносно контролю.

Упродовж 100 діб навантаження організму щурів НЧ TiO_2 супроводжувалось суттєвим пригніченням спонтанної скорочувальної активності ГМ матки. Зокрема, це виражалось у тенденціях до зменшення амплітуди скорочень та достовірного зменшення їх частоти (в обох випадках – порівняно з контролем). Також ці скорочення характеризувались значним збільшенням тривалості фази розслаблення, тоді як тривалість фази скорочення залишалась в межах контролю. Параметри середньої швидкості фаз скорочення і розслаблення знижувались. Також суттєво зменшувались

індекси скоротливої активності в одиницях Монтевідео та Олександрійських одиницях.

Таким чином, тривале (30 і 100 діб) навантаження організму щурів НЧ TiO_2 спричиняє неоднорідний вплив на спонтанну скорочувальну активність гладеньких м'язів міометрія порівняно з часо-залежними пригніченням моторики м'язів ШКТ. Втім, як уже згадувалось, процеси активації спонтанних скорочень у цих вісцеральних м'язах суттєво різняться. Механізм активації спонтанних скорочень в міоцитах матки натеper в повній мірі не розкритий; відомо, що в цій тканині до пейсмейкерних механізмів залучені процеси входу позаклітинних іонів Ca^{2+} через ПКК L- і T-типів (для T-каналів доведений зв'язок з частотою, але не амплітудою скорочень), Ca^{2+} -активовані Cl^- -канали, а також вивільнення Ca^{2+} внутрішньоклітинними депо, зокрема мітохондріями, які впливають і на амплітуду, і на частоту спонтанних скорочень [80-85]. Тож і молекулярні механізми ритмоактивності міометрія, і вплив на них НЧ потребують подальшого вивчення, втім, з огляду на дані інших дослідників [86, 642, 643] та результати наших попередніх досліджень *in vitro* ймовірно, що модуляція спонтанних скорочень в умовах тривалої і хронічної дії нанорозмірного матеріалу TiO_2 пов'язана з їх АФК-опосередкованим порушенням функціонування мітохондрій.

Також ми дослідили закономірності індукованих K^+ -деполяризацією та агоністами скорочень вісцеральних ГМ, отриманих з тварин після тривалого навантаження нанорозмірним матеріалом TiO_2 . Виявлено суттєві зміни механокінетичних властивостей індукованих гіперкалієвим розчином (80 мМ) скорочень кільцевих ГМ *саесит* щурів, після тривалого (30 діб, група 2) навантаження суспензією TiO_2 : збільшення амплітуди фазних скорочень (у середньому на третину) та співвідношення фазного і тонічного складових; суттєве зростання нормованих максимальних швидкостей V_{nc} (у понад 2,5 рази) та V_{nr} (втричі відносно контролю). В умовах субхронічного (100 діб, група 3) навантаження тварин суспензією TiO_2 спостерігалось подальша

модуляція амплітудних та кінетичних характеристик гіперкалієвої контрактури *saesum*: спостерігалось суттєве і в однаковій мірі пригнічення амплітуди як фазного, так і тонічного компонентів. Таким чином, фазна відповідь була пригнічена вдвічі порівняно з контролем та співвідношення фазного і тонічного компонентів знаходилось в межах контрольних значень. Із застосуванням кінетичного аналізу з'ясовано, що максимальна швидкість наростання сили (V_{nc}) не мала достовірної різниці щодо контролю, тоді як швидкість її спаду (V_{nr}) перевищувала контрольні значення вдвічі.

На відміну від ефектів, отриманих на *saesum*, K^+ -індуковані (80 мМ) скорочення кільцевих ГМ *antrum* щурів групи 3 (100 діб навантаження суспензією TiO_2) характеризувались амплітудою на рівні контролю, а співвідношення фазної і тонічної складових скорочення суттєво зменшувалося. Разом з тим, зміни механокінетичних параметрів скорочень м'язів шлунку були подібними до даних товстого кишечника: не змінювалась нормована максимальна швидкість фази скорочення (V_{nc}), а швидкість фази розслаблення V_{nr} суттєво зростала майже вдвічі. Таким чином, у ГМ травного тракту тривала дія НЧ *in vivo* супроводжувалась суттєвими змінами механокінетики розслаблення викликаних гіперкалієвим розчином скорочень. Як відомо [549], фазна складова K^+ -викликаних скорочень переважно обумовлюється надходженням до ГМК іонів Ca^{2+} через ПКК L-типу; тонічна складова цих скорочень являє собою наслідок сумісної дії декількох процесів: крім потенціал-залежного надходження Ca^{2+} , тут також мають місце процеси Ca^{2+} -залежного вивільнення цих катіонів з СР; механізми Ca^{2+} -залежної і Ca^{2+} -незалежної сенситизації скоротливих білків; процеси, індуковані вивільненням внаслідок деполяризації інтрамуральних нейронів нейромедіаторів; робота енергозалежних систем викачування з міоплазми іонів Ca^{2+} ПМ і внутрішньокілітинних депо. Тож без додаткових досліджень не можна виключити модуляцію жодного з цих процесів під дією накопиченого в умовах *in vivo* наноматеріалу TiO_2 .

Нами також було досліджено окремі механізми модуляції НЧ TiO_2 за їх дії *in vivo* викликаних скорочень ГМ травного тракту. В рамках цієї задачі вивчали ефекти ГАМК в умовах її кумулятивного і некумулятивного аплікування на тонічній складовій K^+ -індукованого скорочення ГМ *саесит*. У випадку контрольної групи, аплікування 10^{-5} М ГАМК на тонічній складовій гіперкалієвого скорочення призводило до розвитку скорочувальної відповіді, з амплітудою на рівні близько $2/3$ від фазної складової гіперкалієвого скорочення. Слід відзначити, що це ГАМК-викликане скорочення було лише фазним і рівень напруження швидко повертався до початкового значення тонічної фази K^+ -скорочення. Показано, що в умовах субхронічного навантаження організму наноматеріалом TiO_2 відбувається послаблення та/або з часом усунення модулюючої дії нейромедіатора ГАМК на гладенькі м'язи травного тракту. На нашу думку, принаймні частково ефекти хронічної дії TiO_2 на моторику м'язів товстого кишечника і шлунка можуть бути обумовлені впливом цих наночастинок на ГАМК-ергічну систему. На користь цього припущення свідчать також наші дослідження *in silico*, якими встановлено, що нанорозмірний матеріал TiO_2 здатний взаємодіяти з різною спорідненістю із декількома сайтами позаклітинної частини метаботропних рецепторів: мускаринових ацетилхолінових M_2 -типу, гліцинових та ГАМК_B-рецепторів.

Також з метою з'ясування можливого впливу нано TiO_2 в умовах *in vivo* на процеси спряження збудження-скорочення у вісцеральних ГМ, нами було вивчено закономірності ацетилхолінових (10^{-5} М) скорочень кільцевих ГМ товстого кишечника і шлунку щурів в умовах тривалого (30 і 100 діб) впливу НЧ TiO_2 . Було встановлено, що ацетилхолінові скорочення ГМ *саесит* в умовах тривалої дії TiO_2 характеризуються суттєвим (у середньому на 70%,) підвищенням амплітуди фазних скорочень; зниженням тонічних скорочень, яке призвело до зменшення співвідношення фазного і тонічного скорочень з $(1,5 \pm 0,1)$ в контролі до $(1,1 \pm 0,08)$; нормовані максимальні швидкості V_{nc} та V_{nr} скорочень залишались на рівні контрольних значень.

Тривала дія TiO_2 упродовж 100 діб також супроводжувалась окремими змінами ацетилхолін-викликаних скорочень *saesut*. Так, за цих умов амплітуда фазного компонента залишалась на рівні контролю, тонічного – суттєво зростала. Нормована максимальна швидкість V_{nc} була в межах контрольних показників, тоді як швидкість розслаблення V_{nr} зростала у середньому втричі. Також варто відзначити, що на тонічні складовій ацетилхолінових скорочень практично повністю були відсутні осциляції; цей ефект, на нашу думку, може бути обумовлений, зокрема, порушенням процесів вивільнення іонів Ca^{2+} з CP [644, 645].

Аналогічні дослідження ацетилхолінових скорочень були проведені на ГМ антрального відділу шлунку. Було встановлено, що в умовах субхронічного впливу TiO_2 (100 діб) ці скорочення характеризуються амплітудою фазного і тонічного компонентів на рівні контролю. Відповідно, також і показники нормованих максимальних швидкостей (V_{nc} і V_{nr}) залишались в межах контрольних значень. Як і у випадку м'язів *saesut*, спостерігалось пригнічення осциляцій напруження на тонічній складовій ацетилхолінових скорочень.

З огляду на виявлене елементним аналізом суттєве накопичення Ti в тканині матки (Табл. 6.1), а також індуковані тривалим і субхронічним навантаженням TiO_2 зміни спонтанної скорочувальної активності м'язів міометрія (Табл. 6.5.), наступною задачею ми обрали вивчення закономірностей механокінетики викликаних утеротонічним гормоном окситоцином (0,1 МО) скорочень поздовжніх ГМ міометрія в умовах впливу *in vivo* наночастинок TiO_2 . Було встановлено, що в умовах тривалого впливу *in vivo* (30 діб) НЧ TiO_2 спостерігаються деякі зміни окситоцинових скорочень: за відсутності змін амплітуди фазних скорочень суттєво зменшувалась їх тонічна складова. Це позначилось на достовірному збільшенні співвідношення фазного і тонічного скорочень. Значних змін (збільшення) також набули механокінетичні параметри окситоцинових скорочень: нормована максимальна швидкість скорочення V_{nc} зросла у групі

2 майже вдвічі, а швидкість розслаблення V_{nr} збільшилась у чотири рази порівняно з контролем. Зазначені зміни окситоцин-індукованих скорочень, які спостерігались у групі 2, зі збільшенням терміну впливу наноматеріалу TiO_2 в умовах *in vivo* прогресували: так, у групі 3 амплітуда фазних скорочень на аплікування окситоцину та параметр V_{nc} знижувались у середньому вдвічі відносно контролю. Навпаки, в цій групі суттєвого відносного зростання набув тонічний компонент скорочень; такі його зміни призвели до суттєвого (в п'ять разів порівняно з контролем) зменшення показника V_{nr} .

З метою з'ясування механізмів розвитку змін окситоцинових скорочень міометрія та оскільки однією з можливих ланок, задіяних у розвитку клітинних ефектів TiO_2 , можуть бути АТФ-залежні процеси (зокрема, модуляція АТФ-чутливих K^+ -каналів ПМ і мітохондрій), нами було досліджено окситоцинові скорочення за попереднього блокування зазначених каналів глібенкламідом (10^{-5} М) і 5-гідроксидеканоатом ($2 \cdot 10^{-4}$ М), відповідно. Було встановлено, що передінкубація міометрія у присутності блокаторів АТФ-чутливих K^+ -каналів супроводжується тенденціями до збільшення в однаковій мірі фазного і тонічного компонентів окситоцинового скорочення; кінетичним аналізом було встановлено, що за даних умов мають місце достовірні зміни нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення V_{nc} (зменшення) та розслаблення V_{nr} (суттєве збільшення). В умовах нетривалого впливу (час передінкубації становив 20 хв.) суспензії TiO_2 (у концентрації 10^{-5} мг/мл) спостерігались тенденції до повернення окситоцинових скорочень до контрольного рівня.

Також нами було досліджено окситоцинові скорочення в умовах комбінованої дії активатора АТФ-чутливих K^+ -каналів ПМ діазоксиду ($2 \cdot 10^{-4}$ М) та блокатора АТФ-чутливих K^+ -каналів мітохондрій 5-гідроксидеканоату ($2 \cdot 10^{-4}$ М). У контролі ці сполуки спричиняли зниження кінетичних показників V_{nc} та V_{nr} ; в умовах нетривалого впливу *in vitro* (час передінкубації становив 20 хв.) суспензії TiO_2 (у концентрації 10^{-5} мг/мл) відбувалось суттєве (вдвічі) зростання нормованої максимальної швидкості

V_{nc} та повернення швидкості фази розслаблення V_{nr} в межі контрольної популяції даних. Оскільки передінкубація м'язів матки з TiO_2 усуває ефекти блокування АТФ-чутливих K^+ -каналів, на нашу думку, це свідчить про те, що мішенню дії наноматеріалу TiO_2 є енерго/АТФ-залежні процеси в міоцитах.

* * *

Перспективною основою для створення фармакологічних засобів нового покоління зі спрямованою, вибірковою і оборотною дією на окремі системи клітини, є каліксарени – нанорозмірні макроциклічні сполуки, які одержують прецизійною циклоконденсацією пара-заміщених фенолів і формальдегіду. Натепер світовими дослідницькими центрами накопичено великий обсяг даних щодо біологічної активності каліксаренів [291-294, 318-345, 560-564]. Зокрема, в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України під керівництвом академіка НАН України С.О. Костеріна проводяться комплексні дослідження молекулярних та клітинних механізмів взаємодії окремих каліксаренів з фізіологічно значущими ферментами та іон-транспортувальними білками ПМ і внутрішньоклітинних органел (системи активного транспорту іонів Ca^{2+} , Na^+ і K^+) клітин вісцеральних гладеньких м'язів. За цей час було детально досліджено близько сотні сполук-калікс[4]аренів та для окремих з них на моделях *in vitro* встановлена селективна, високоафінна дія щодо окремих фізіологічно значущих клітинних ензимів (зокрема, міозину) та іон-транспортувальних систем ПМ і внутрішньоклітинних органел: каліксарени з шифрами С-99, С-97, С-107 – на Na^+ , K^+ -АТФ-азу ПМ; С-90 і С-716 – на Ca^{2+} -АТФ-азу ПМ; С-91 – на Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій [291-294, 560-564, 607]. Втім, вищезгадані дані були отримані на препаратах фракції ПМ міоцитів та ізольованих міоцитах, тому нашою метою було комплексне дослідження закономірностей і механізмів дії цих калікс[4]аренів в умовах максимально близьких до фізіологічних – на інтактних багатоклітинних препаратах зі збереженими нейрональними структурами та пейсмейкерними клітинами.

Відповідно до поставлених задач, нами було досліджено (розділ 7) закономірності та механізми реалізації ефектів речовин-інгібіторів натрієвої помпи (каліксаренів С-99 і С-107 та у порівняльному аспекті – відомого інгібітора цього ензиму алкалоїда убаїну) на функціональну здатність вісцеральних ГМ (товстого кишечника і міометрія) щурів. Нами встановлено, що убаїн та каліксарен С-99 (обидві сполуки застосовували у концентрації 10 мкМ) змінюють спонтанну скоротливу активність, спричиняючи вірогідне підвищення амплітуди і частоти скорочень поздовжніх гладеньких м'язів міометрія щурів. Аналіз закономірностей розвитку окремих спонтанних скорочень не виявив статистично значущих змін нормованих максимальних швидкостей фази скорочення V_{nc} та розслаблення V_{nr} у присутності убаїну. У аналогічних умовах каліксарен С-99 спричиняв достовірне збільшення нормованої максимальної швидкості фази скорочення порівняно з контролем, тоді як максимальна швидкість фази розслаблення не змінювалась.

Встановлено, що за дії убаїну та каліксарену С-99 спостерігались зміни окремих параметрів спонтанної скорочувальної активності міометрія. Так, показники тривалості фаз скорочення і розслаблення залишались на рівні контрольних показників, тоді як показник асиметрії спонтанних скорочень за дії убаїну і каліксарену С-99 в однаковій мірі мав тенденції до зниження. Тривалість скорочувального циклу за присутності 10 мкМ убаїну достовірно зростала у середньому на 38,5%, тоді як каліксарен не впливав на цей параметр. Навпаки, індекс скорочувальної активності, який розраховували як співвідношення тривалості скорочень до пауз між ними, у присутності С-99 збільшувався, а при дії убаїну залишався без змін. Такий ефект каліксарену корелює з підвищеною за його дії частотою спонтанних скорочень та свідчить про підвищену (відносно ефектів убаїну) активність гладеньких м'язів. Також обидві сполуки спричиняли достовірне зростання показників ефективності функціонування м'язів, які виражали в Олександрійських одиницях і одиницях Монтевідео, однак ефект каліксарену С-99 був вірогідно вищий порівняно з таким убаїну.

Нами досліджено механокінетичні властивості скорочень поздовжніх ГМ міометрія за дії убаїну і каліксарену С-99 (обидві сполуки у концентраціях 10 мкМ). Встановлено, що в даних умовах амплітудні та кінетичні параметри скорочень, які активуються K^+ -деполяризацією плазматичної мембрани, залишаються без змін. Також встановлено, що убаїн і каліксарен С-99 в однаковій мірі спричиняють зниження амплітуди ацетилхолін-викликаних скорочень міометрія. Обидві сполуки викликали зростання V_{nc} , але убаїн зумовлював достовірно суттєвіший ефект. Загалом, каліксарен С-99 справляв вплив на усі параметри ацетилхолін-викликаних скорочень (силу скорочення, нормовані максимальні швидкості V_{nc} і V_{nr}) аналогічну дію до класичного інгібітора натрієвої помпи убаїну. Тож вплив серцевого глікозиду убаїну і каліксарену С-99 на силові і кінетичні параметри скорочувальних відповідей міометрія на аплікування ацетилхоліну загалом є ідентичними тому, на нашу думку, ефект С-99, пов'язаний із спричиненими блокуванням Na^+, K^+ -АТФ-ази порушеннями трансмембранних іонних градієнтів (Na^+ та Ca^{2+}) і мембранного потенціалу.

У випадку окситоцин-активованих скорочень за дії каліксарену С-99 і убаїну, нами не було виявлено статистично значущих змін амплітуди максимального напруження та показника V_{nc} . Обидві речовини в однаковій мірі уповільнювали процес розслаблення, спричиняючи вірогідне зниження показника V_{nr} .

Отже, отримані нами результати вказують на нечутливість первинних етапів окситоцин-активованого сигнального каскаду до пригнічення Na^+, K^+ -АТФ-ази (аплікування 10 мкМ убаїну спричиняє пригнічення близько 70% молекул ензиму в умовах *in vitro* [560-564, 607]) в клітинах міометрія. Можна передбачити, що безпосередньо синтез ІТФ та індуковане ним вивільнення іонів Ca^{2+} з СР не чутливі до порушень трансмембранних іонних і зарядових градієнтів за дії блокаторів Na^+, K^+ -АТФ-ази убаїну і каліксарену С-99.

Як і у випадку м'язів міометрія, блокування натрієвої помпи убаїном і каліксареном С-99 (обидві сполуки у концентрації 10 мкМ) спричиняло

активуючу дію на спонтанну скорочувальну активність ГМ *saesum*. Так, додавання убаїну або каліксарену С-99 до омиваючого розчину супроводжувалось зростанням базального напруження м'язів, а також збільшенням амплітуди і частоти їх спонтанних скорочень. Таким чином, значне пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази спричиняє порушення трансмембранного градієнту іонів Na^+ , K^+ та, як наслідок, - і Ca^{2+} , яке відображається загальними змінами (полегшенням збудження) скорочувальної функції вісцеральних ГМ [218, 646].

Нами було досліджено впливу убаїну у концентрації 100 мкМ; варто відзначити, що за даними літератури така концентрація відповідає блокуванню у середньому близько 88% молекул Na^+ , K^+ -АТФ-ази в умовах *in vitro* [560-564, 607]. За даних умов спостерігали підвищення базального напруження гладеньком'язових препаратів *saesum*, а також збільшення амплітуди і частоти їх спонтанних скорочень. Наступне кумулятивне підвищення концентрації убаїну до 200 мкМ не спричиняло вірогідних змін спонтанної скорочувальної активності (відносно параметрів скорочень у присутності 100 мкМ убаїну). Напротивагу цьому, аплікування 100 мкМ каліксарену С-99 в умовах попередньої інкубації гладеньком'язових смужок з убаїном (100 мкМ) спричиняло суттєву активацію спонтанних скорочень. Тож отримані нами дані свідчать, що в стаціонарних умовах блокування натрієвої помпи убаїном, каліксарен С-99 здатний додатково активувати спонтанну скорочувальну активність гладеньких м'язів товстого кишечника щурів. Активаційний ефект каліксарену С-99 на спонтанні скорочення інтестинальних гладеньких м'язів може бути пояснений його ймовірною дією на пейсмерні клітини. Як показано дослідженнями останніх років, в основі генерації спонтанної деполяризації пейсмерних ІСС лежать процеси перерозподілу іонів Ca^{2+} між внутрішньоклітинними депо (так звані кальцієві мікродомени): Ca^{2+} , вивільняючись з СР, захоплюється мітохондріями, і саме це зниження концентрації Ca^{2+} призводить до активації пейсмерних катіонних струмів у плазматичній мембрані ІСС. Робота Ca^{2+} -уніпортера

мітохондрій є потенціал-залежною: при деполяризації внутрішньої мембрани мітохондрій депонування відбувається з меншою ефективністю і супроводжується пригніченням спонтанної активності ГМ, і навпаки при її фармакологічній гіперполяризації спонтанна активність ІСС посилюється [580]. Разом з тим, на ізольованих міоцитах матки щурів було встановлено, що окремі каліксарени, зокрема і С-99, на фоні дії убаїну спричиняють суттєву поляризацію внутрішньої мітохондріальної мембрани [581]. Таким чином, є усі підстави припустити, що саме вплив на потенціал внутрішньої мембрани мітохондрій (поляризація) лежить в основі зазначеної активаторної дії каліксарену С-99 на спонтанну скоротливу активність ГМ *saesut* в умовах попереднього блокування натрієвої помпи убаїном.

У порівняльному аспекті було досліджено вплив інгібіторів натрієвої помпи ПМ (убаїну та каліксарену С-99) на силові характеристики та кінетичні параметри викликаних скорочень м'язів *saesut*. Встановлено, що убаїн та каліксарен (всі речовини аплікували у концентрації 10 мкМ) загалом спричиняють односпрямовану зміну K^+ -індукованих скоротливих відповідей кільцевих м'язів *saesut*.

Також нами було досліджено закономірності K^+ -індукованих скорочень кільцевих гладеньких м'язів *saesut* в умовах практично повного блокування натрієвої помпи (за впливу 100 мкМ та 200 мкМ убаїну) [560-564, 607]. В умовах збільшення концентрації убаїну до 100 мкМ спостерігалось зниження сили фазного скорочення м'язів *saesut*, втім, кінетичні параметри (V_{nc} та V_{nr}) залишались на рівні контрольних показників. За умови збільшення концентрації убаїну в омиваючому гладеньком'язові смужки розчині до 200 мкМ спостерігалось подальше пригнічення K^+ -викликаних скорочень *saesut*. Одержані ефекти узгоджуються з нашими попередніми результатами, а також даними досліджень інших авторів [568, 647-649]. Так, за даними К. Shimizu і колег порушення трансмембранного іонного гомеостазу при дії убаїну на гладенькі м'язи супроводжується пригніченням K^+ -викликаних скорочень, однак, інформація щодо переважання його

інгібіторного впливу на фазну або тонічну складову різноспрямована [279, 568]. Дані С. Barajas-Lopez та J. Huizinga свідчать, що пригнічення убаїном гіперкалієвих скорочень повністю залежать від концентрації іонів Na^+ цілком усувається вилученням цих катіонів з омиваючого ГМ розчину [566].

Аплікування каліксарену С-99 у концентрації 100 мкМ за умови попередньої інкубації гладеньких м'язів *saesut* з 100 мкМ убаїну спричиняло суттєві зміни K^+ -викликаних скорочень як порівняно з контролем, так і відносно відповідних ефектів убаїну: порівняно з даними щодо дії 200 мкМ убаїну їх фазний компонент знижувався (у середньому на 42,6%), а відносний внесок тонічного скорочення навпаки зростав (до 207,1%). Кінетичним аналізом було встановлено, що в умовах комбінованої дії 100 мкМ убаїну і 100 мкМ каліксарену С-99 нормована максимальна швидкість V_{nr} знижувались приблизно в двічі порівняно з дією 200 мкМ убаїну. Таким чином, використання підвищеної концентрації каліксарену С-99 на фоні значного (близько 90%) блокування Na^+ , K^+ -АТФ-ази убаїном спричиняло зниження швидкості V_{nc} та амплітуди фазного K^+ -індукованого скорочення, але, разом з тим – потужне зростання відносного внеску тонічного скорочення та спряжене з ним зниження нормованої максимальної швидкості фази розслаблення V_{nr} . Індуковане каліксареном пригнічення сили фазного скорочення і нормованої максимальної швидкості V_{nc} при K^+ -деполяризації ПМ статистично не відрізнявся від ефекту використання 200 мкМ убаїну. Однак, зміни тонічної складової і параметра V_{nr} не можна пояснити лише сукупністю ефектів блокування Na^+ , K^+ -АТФ-ази ПМ.

Відомо, що властивості каліксаренів в значній мірі обумовлюються функціоналізацією верхнього і нижнього вінців макроциклу різними групами [325-327]. Тому для подальшого встановлення закономірностей пригнічення натрієвої помпи каліксаренами, нами було здійснене дослідження каліксарену С-107, який за даними літератури, як і С-99 здатен ефективно інгібувати натрієву помпу [292-294, 563-564], та його структурної частини фрагменту М3 (ефекторна дія на натрієву помпу не виявлена [564]).

Встановлено, що як каліксарен С-107, так і його структурний фрагмент М3 (речовини застосовували у концентрації 10 мкМ) вірогідно знижували амплітуду K^+ -індукованих скорочень, причому обидві сполуки, як і каліксарен С-99, уповільнювали розслаблення гладеньком'язових препаратів; це супроводжувалось достовірним зниженням показника максимальної нормованої швидкості фази розслаблення V_{nr} .

Дослідженнями наукової групи під керівництвом академіка НАН України С.О. Костеріна було встановлено, що каліксарен С-107, як і каліксарен С-99, здатний спричиняти поляризацію внутрішньої мітохондріальної мембрани, причому показано, що цей ефект напряду залежить від функціоналізації каліксаренової чаші по верхньому вінцю [581]. Хоча дані щодо можливості впливу фрагменту М-3 на трансмембранний потенціал в мітохондріях натеper відсутні, однак, співставляючи структури каліксаренів С-99, С-107 та М-3, можна передбачити, що зазначена властивість пов'язана з наявністю в їх структурі залишку метилфосфонової кислоти. Тож можна припустити, що особливості впливу (відмінності відносно дії убаїну) не лише каліксарену С-99, але й С-107 та фрагменту М-3 на механокінетику скорочень (спонтанних і викликаних по шляху електромеханічного спряження збудження-скорочення) зумовлені їхньою гіперполяризуючою дією на внутрішню мембрану мітохондрій.

У наступній серії експериментів нами було досліджено закономірності реалізації фармакомеханічного спряження збудження-скорочення гладеньких м'язів товстого кишечника за інгібування Na^+ , K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани. Встановлено, що в умовах часткового блокування цього ензиму убаїном (10 мкМ) спостерігається вірогідний пригнічуючий вплив на амплітуду ацетилхолінових (10 мкМ) скорочень; в цьому випадку обидва параметри нормованих максимальних швидкостей (V_{nc} та V_{nr}) не відрізнялись від контрольних значень. Субмаксимальне блокування натрієвої помпи убаїном (100 мкМ) також супроводжувалось достовірним зниженням фазного компонента скорочень, тоді як їх тонічний компонент залишався без

змін. На відміну від скорочувальних відповідей, індукованих гіперкалієвим розчином, фазні компоненти ацетилхолінових скорочень не зазнавали змін при подальшому кумулятивному збільшенні концентрації убаїну до 200 мкМ; також за цих умов залишалися без змін тонічний компонент скорочень та нормовані максимальні швидкості (V_{nc} та V_{nr}).

Нами встановлено, що ацетилхолін-викликані скорочення в умовах попереднього блокування Na^+, K^+ -АТФази убаїном (100 мкМ) чутливі до дії каліксарену С-99 (100 мкМ): порівняно з даними щодо дії 100 мкМ убаїну, після додавання 100 мкМ С-99 вірогідно знизилась амплітуда фазного скорочення та зросли тонічне скорочення і нормована максимальна швидкість фази розслаблення V_{nr} .

Відомо, що фазний компонент ацетилхолінового скорочення гладеньких м'язів кишечника переважно визначається ефективністю вивільнення іонів з ІТФ-чутливого пулу СР, а у його тонічний компонент робить внесок викид іонів Ca^{2+} з ріанодин-чутливої частини цього депо [60, 70]. Тому, з метою розкриття механізмів участі каліксаренів-блокаторів натрієвої помпи в модуляції скорочувальної функції гладеньких м'язів товстого кишечника, було досліджено ІТФ-залежний викид кальцію з СР. Для цього ми здійснювали реєстрацію ацетилхолінового скорочення в номінально безкальцієвому розчині. В обох випадках (убаїн та С-99) спостерігали пригнічення амплітуди скорочень, втім між групами різниця була статистично незначущою. Підвищення концентрації блокаторів натрієвої помпи убаїну і каліксарену С-99 до 100 мкМ супроводжувались пригніченням амплітуди ацетилхолінових скорочень у безкальцієвому середовищі, причому в цьому випадку також різниця між групами була статистично незначущою. Тож отримані нами дані вказують на те, що зниження вивільнення Ca^{2+} з ІТФ-чутливого пулу в умовах дії каліксарену С-99 не може бути причиною описаних вище відмінностей між ацетилхоліновими скороченнями за передінкубації з 200 мкМ убаїну та 100 мкМ убаїну і 100 мкМ каліксарену С-99. Також нами було встановлено, що

каліксарен С-99 (10 мкМ) не змінює кофеїн-індуковані (20 мМ) скорочення гладеньком'язових препаратів *saesum*. Отож каліксарен С-99 не впливає на мобілізацію іонів Ca^{2+} з ріанодин-чутливого пулу СР.

З метою розкриття механізмів участі каліксаренів-блокаторів натрієвої помпи в модуляції процесів фармакомеханічного спряження збудження-скорочення у гладеньких м'язах товстого кишечника, ми дослідили закономірності впливу каліксарену С-99 (10 мкМ) на дозові криві ацетилхолінових скорочень ($10^{-9} - 10^{-3}$ М). Було встановлено, що за дії С-99 мінімальна ефективна концентрація цього агоніста зростала на 3 порядки порівняно з контрольними умовами експерименту (до 10^{-6} М). Також під впливом каліксарену С-99 втричі зріс порівняно з контролем показник EC_{50} . Величини уявної константи інгібування ($I_{0.5}$) та коефіцієнту Хілла (n_H) для каліксарену С-99 у концентрації 10 мкМ становили відповідно: $n_H = 0.63 \pm 0.04$ та $I_{0.5} = 4.55 \pm 0.23$ мкМ. Крім того, каліксарен С-99 спричиняв практично повне пригнічення фази розслаблення гладеньких м'язів товстого кишечника на усьому діапазоні використаних концентрацій нейромедіатора.

Отже, нами виявлено, що дія каліксаренів-інгібіторів Na^+ - K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани С-99 та С-107 на вісцеральні гладенькі м'язи в умовах, максимально наближених до інтактних (мультиклітинні препарати гладеньких м'язів зі збереженими інтрамуральними нейронами і пейсмейкерними клітинами), не обмежується блокуванням трансмембранного перенесення іонів Na^+ і K^+ . За сукупністю результатів власних досліджень та даних літератури можна передбачити, що ефекти зазначених каліксаренів також обумовлюються мітохондріальною ланкою модуляції внутрішньоклітинного гомеостазу іонів Ca^{2+} (Рис. 10.2).

На наступному етапі досліджень (розділ 8) нами було здійснено перевірку здатності каліксаренів-інгібіторів Na^+ - K^+ -АТФ-ази (на прикладі каліксарену С-107 та убаїну) зберігати свою активність в організмі при хронічному надходженні (6,5 місяців) *in vivo*. Встановлено, що препарати плазматичних мембран клітин печінки щурів, яких тривалий час ін'єктували

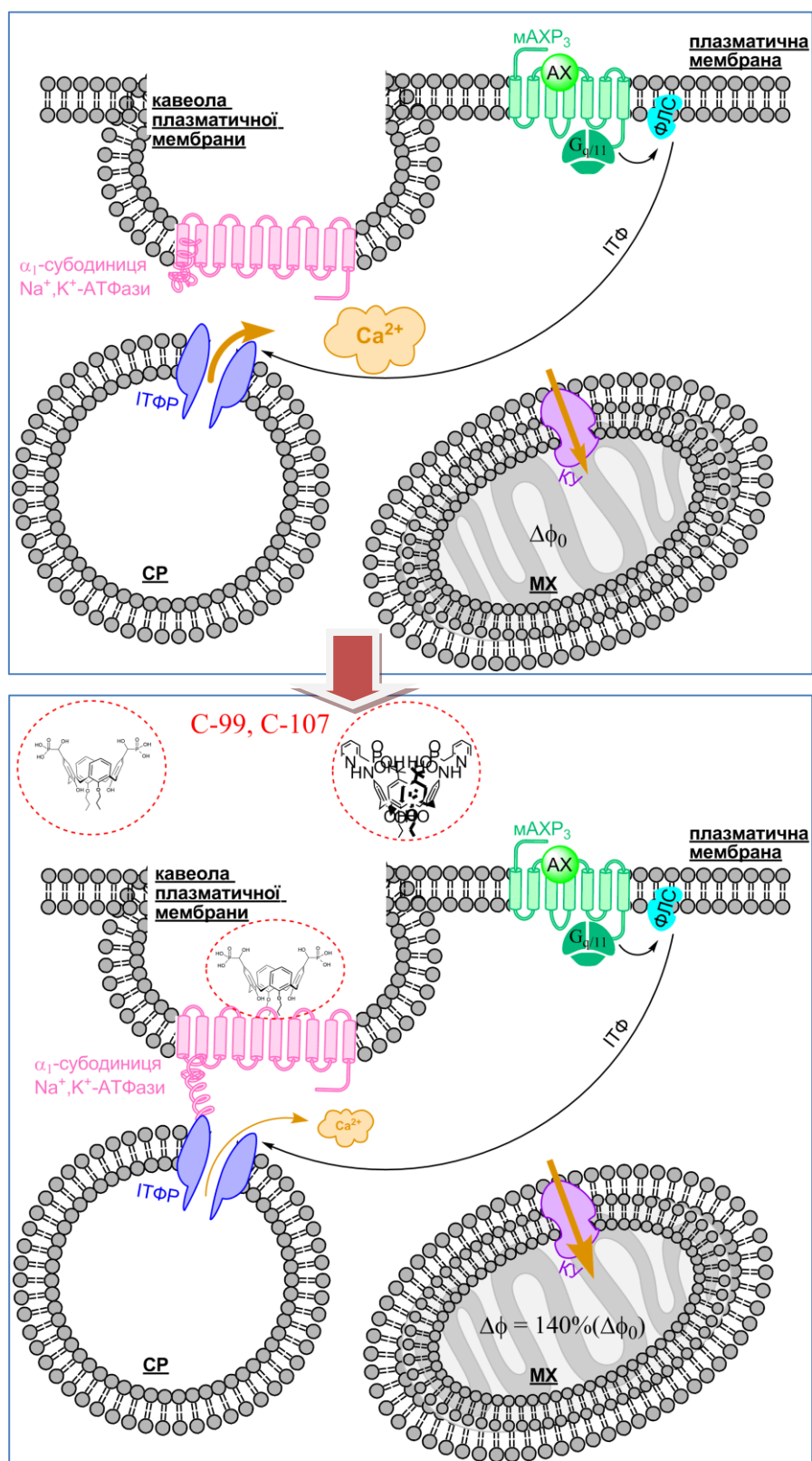


Рис. 10.2. Схема механізмів дії *in vitro* каліксаренів С-99 та С-107 на вісцеральні гладенькі м'язи. Позначення: СР – саркоплазматичний ретикулум; МХ – мітохондрія; КУ – Ca²⁺-уніпортер мітохондрій; РР – ріанодиновий рецептор; ІТФР – рецептор інозитол-1,4,5-трифосфату (ІТФ); ФЛС – фосфоліпаза С; mAChR₃ – мускариновий ацетилхоліновий рецептор типу 3.

уабаїном, характеризувались загальною АТФ-азною активністю на рівні контрольних значень, уабаїн-нечутлива базальна Mg^{2+} -АТФ-азна активність зростала, а уабаїн-чутлива Na^+, K^+ -АТФ-аза – була достовірно нижчою порівняно з контролем. Після ін'єктування С-107 уабаїн-нечутлива базальна Mg^{2+} -АТФ-азної активність препаратів була знижена, а уабаїн-чутлива Na^+, K^+ -АТФ-азної активність – повністю пригнічена. У випадку використання *in vivo*, фрагмент М-3, як і випадку *in vitro*, також не впливав на функціонування Na^+-K^+ -АТФ-ази ПМ гепатоцитів.

Тезометричними експериментами викликаних K^+ -деполяризацією і нейромедіатором ацетилхоліном скорочень встановлено, що результати в умовах хронічної дії *in vivo* уабаїну, каліксарену С-107 та фрагменту М-3 переважно відтворюють тенденції змін скорочувальної функції гладеньких м'язів товстого кишечника при їх аплікуванні *in vitro*.

Таким чином, ймовірно, молекулярні механізми взаємодії та впливу досліджених речовин (уабаїну та каліксарену С-107) на натрієву помпу в умовах *in vivo*, як і у випадку *in vitro*, не ідентичні. Але наші дослідження доводять, що каліксарен С-107 зберігає свої інгібіторні якості щодо Na^+, K^+ -АТФ-ази в умовах цілісного організму.

На наступному етапі досліджень відповідно до поставлених задач нами було досліджено (розділ 9) закономірності та механізми реалізації ефектів речовин-інгібіторів кальцієвої помпи ПМ (каліксаренів С-90 і С-716) на функціонування вісцеральних ГМ (товстого кишечника і міометрія) щурів.

Було виявлено, що за кумулятивного підвищення концентрації від 10 нМ до 100 мкМ каліксарен С-90 спричиняє дозо-залежне пригнічення спонтанної скоротливої активності гладеньком'язових препаратів міометрія, призводячи до зниження амплітуди і частоти скорочень, достовірні зміни яких спостерігались у присутності високих концентрацій С-90 (10 та 100 мкМ). За цих умов спостерігались зміни кінетики окремих спонтанних скорочень: збільшення тривалості фази скорочення з одночасним зниженням амплітуди скорочення обумовило зменшення показника середньої швидкості

наростання скорочення ($F_{\max}/t$), який достовірно знижувався на усьому діапазоні досліджених концентрацій каліксарену С-90, а за його присутності у концентрації 100 мкМ становив у середньому 66% відносно контролю. Було встановлено, що каліксарен С-90 не змінює максимальну швидкість наростання скорочень, втім суттєво уповільнює процес розслаблення.

Тож, на нашу думку, каліксарен С-90 впливає на процеси, які приймають участь у регуляції внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у міоцитах матки. Зокрема, на користь цього припущення свідчить неоднорідна зміна середньої та максимальних швидкостей фаз скорочення та розслаблення спонтанних скорочувальних відповідей. Отримані результати дають змогу передбачити, що каліксарен С-90 є перспективною речовиною для розробки фармакологічних засобів м'якої токолітичної дії.

Нами було досліджено закономірності некумулятивної дії С-90 (10 мкМ) на спряження збудження-скорочення і гальмування-розслаблення в гладеньких м'язах міометрія. Внесення каліксарену С-90 в омиваючий ГМС розчин спричиняло підвищення базального тону препарату; у окремих випадках спостерігалась початкова активація скоротливої активності, яка за деякий час переходила в тонічне скорочення, або мало місце зниження сили скорочень при підвищеному тонусі м'язів. Загалом, за дії С-90 амплітуда спонтанних скорочень знижувалась, тоді як їх частота, хоча і мала тенденції до збільшення, не зазнавала статистично достовірних змін. Аналіз механокінетики окремих спонтанних скорочень показав, що каліксарен С-90 не змінює нормовану максимальну швидкість фази скорочення V_{nc} , але суттєво знижує нормовану максимальну швидкість фази розслаблення спонтанних V_{nr} .

Як відомо, спонтанні скорочення ГМ матки щурів ініціюються транзиторним зростанням внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), головним джерелом якого є вхід цих катіонів через потенціалкеровані Ca^{2+} -канали [609-611]. В плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин невагітної матки щурів це канали L-типу, тоді як у

випадку людини доведено присутність і пейсмерну роль каналів Т-типу [612]. Зниження сили спонтанних скорочень міометрію забезпечується сукупністю процесів: по-перше, викачування Ca^{2+} за межі клітини через плазматичну мембрану (енергозалежний транспорт ПМКА і $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника) і закачування у внутрішньоклітинні депо (Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій і Ca^{2+} -помпа СР) [609, 611]; по-друге, активація Ca^{2+} -чутливих K^+ -каналів [610, 650]; по-третє, посилення роботи Na^+ , K^+ -АТФ-ази.

Можна міркувати про механізми, які залучені у реалізації ефекту каліксарену С-90 на спонтанну скоротливу активність гладеньких м'язів міометрія. Як згадувалось вище, для цієї сполуки доведена вибіркова (порівняно з іншими системами активного іонного транспорту) здатність інгібувати Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азу плазматичної мембрани та, водночас, активувати ензиматичну активність білків скоротливого апарату (так, використана нами концентрація С-90 10 мкМ спричиняє підвищення активності в середньому вдвічі) [560]. Що стосується останнього ефекту, то, ймовірно, наші експерименти на багатоклітинних препаратах гладеньких м'язів вказують на те, кількість молекул каліксарену С-90 у середині міоцитів (поблизу скорочувальних білків) є незначною для того, щоб викликати суттєвий вплив на молекули міозину. Отже, ймовірно, зміна скоротливої функції гладеньких м'язів міометрія під впливом каліксарену С-90 пов'язана безпосередньо зі здатністю цієї сполуки інгібувати ПМКА.

Ймовірно, що при частковому блокуванні ПМКА каліксареном С-90 має відбуватись збільшення закачування Ca^{2+} в СР; таке підвищене секвестрування катіону має посилювати його векторний транспорт в примембранну область для наступного викиду транспортерами плазматичної мембрани [609]. Тобто за дії каліксарену С-90 при зниженні кількості функціональних молекул ПМКА має локально зростати примембранна концентрація Ca^{2+} , що може спричинити активацію Ca^{2+} -активованих іонних каналів. Відомо, що у міометрії щурів експресуються (і відіграють значну роль у регуляції збудливості) Ca^{2+} -активовані K^+ канали, принаймні, малої і

великої провідності (SK_{Ca} та BK_{Ca} відповідно) [618]. Тож, ми можемо припустити посилення виходу K^+ через SK_{Ca} та BK_{Ca} за дії каліксарену C-90, що матиме пригнічувальний ефект.

Нами також серії було досліджено вплив каліксарену C-716 на кінетику розслаблення K^+ -індукованого напруження ГМ міометрія в умовах пригнічення систем активного транспорту іонів Ca^{2+} внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо. Аплікування каліксарену C-716 (100 мкМ) на максимумі фазної складової K^+ -індукованого скорочення гладеньком'язових препаратів міометрія не змінювало процесу розслаблення. Проведення кінетичного аналізу довело відсутність впливу безпосереднього аплікування C-716 на показники нормованої максимальної швидкості фази розслаблення V_{nr} м'язів. Встановлено, що аплікування каліксарену C-716 на максимумі фазного K^+ -індукованого скорочення в умовах блокування Ca^{2+} -запасаючої функції внутрішньоклітинних кальцієвих депо (що дозволило відокремити внесок ПМ у Ca^{2+} -транспортувальні процеси) спричиняє збільшення швидкості процесу розслаблення міометрія на фоні підвищеної тонічної складової скорочення.

Як відомо, крім іон-транспортувальної ролі ПМКА залучена до формування кавеоларних сигнальних білкових комплексів, а численні дослідження в різних клітинних системах доводять, що функціонально здатні молекули ПМКА блокують роботу синтаз оксиду азоту (принаймні, конститутивних ізоформ NOS) [248, 609, 651]. Тому нами було здійснено перевірку припущення, щодо можливого внеску NO у пригнічення амплітуди спонтанних скорочень гладеньких м'язів міометрія щурів у присутності каліксарену C-90. На фоні блокування NO-синтаз (L-NAME, 100 мкМ) каліксарен C-90 (10 мкМ) не знижував амплітуду спонтанних скорочень.

Каліксарен C-90 в однаковій мірі спричиняв зниження сили як агоніст-індукованих (окситоцин, 0,1 МО), так і викликаних деполяризацією плазматичної мембрани (гіперкалієвий розчин, 80 мМ) скорочень. Швидкість розслаблення гладеньком'язових препаратів за дії C-90 зазнає

різноспрямованих змін залежно від характеру стимулювання скоротливих відповідей: у випадку окситоцинових скорочень знижується, а для K^+ -викликаних скорочень – зростає. На фоні дії L-NAME каліксарен C-90 не здатен до пригнічення максимальної сили K^+ - і окситоцин-викликаних скорочень, але спричиняє відносні зміни кінетичних параметрів скоротливих відповідей (зниження V_{gr}). Таким чином, блокування синтезу NO призводить до усунення інгібування як спонтанних, так і викликаних скорочень гладеньких м'язів міометрія під дією каліксарену C-90.

На нашу думку, у інгібування спряження збудження-скорочення міометрія під дією каліксарену C-90, можуть робити внесок декілька складників. По-перше, ймовірною є зняття інактивації синтезу оксиду азоту, індуковане блокуванням ПМКА. Також, за умови підвищення концентрації іонів Ca^{2+} у примембранній області і поблизу СР ймовірними є активація Ca^{2+} -активованих K^+ -каналів та пригнічення депо-керованого входу Ca^{2+} внаслідок перевантаження СР. Схему ймовірних механізмів впливу каліксарену C-90 на вісцеральні ГМ наведено на рис. 10.3.

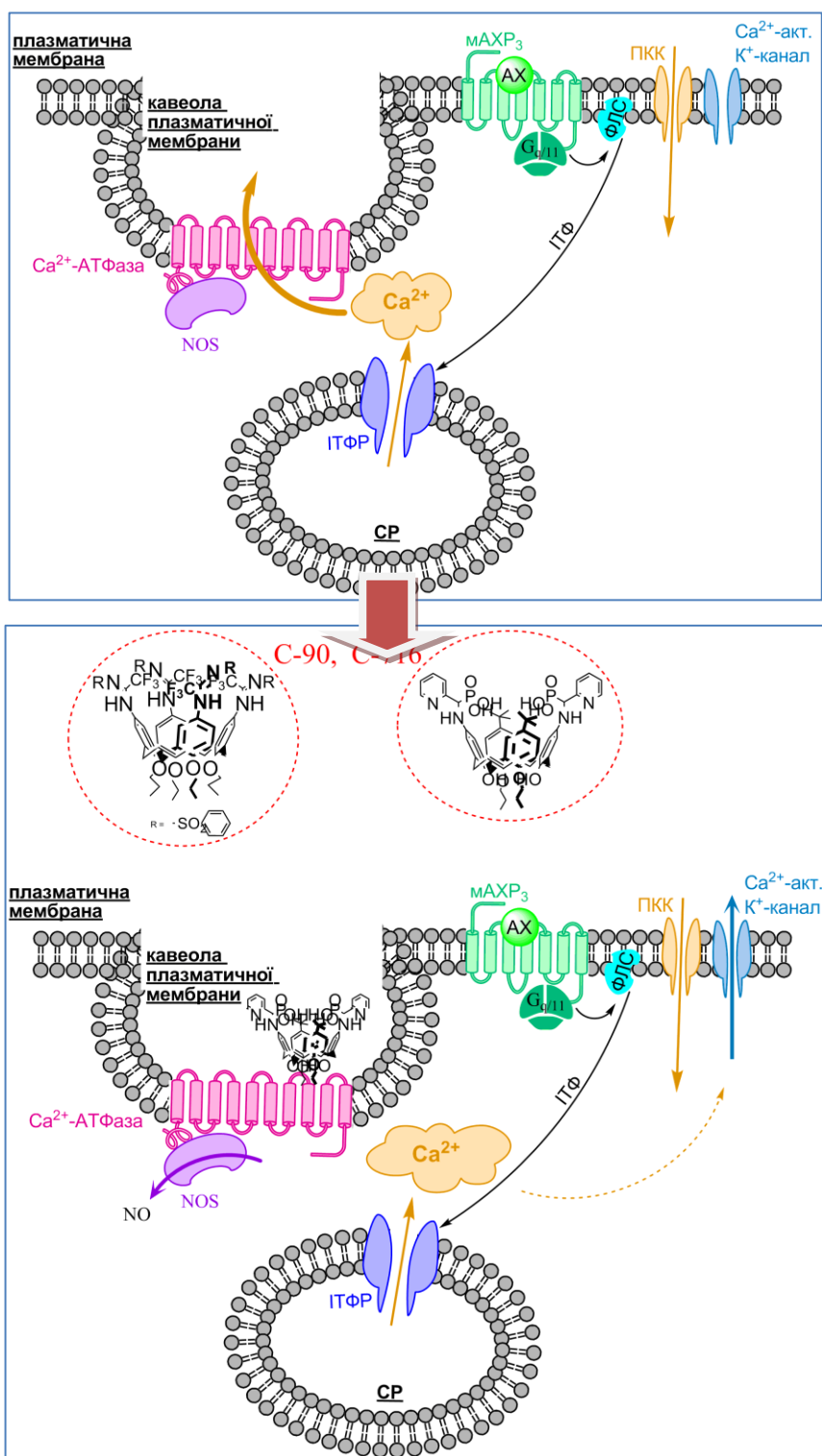


Рис.10.3. Схема механізмів дії *in vitro* каліксаренів-інгібіторів Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани (C-90 і C-716) на тканини вісцеральних гладеньких м'язів. Позначення: СР – саркоплазматичний ретикулум; ПКК – потенціал керований Ca^{2+} -канал L-типу; Ca^{2+} -акт. K^{+} -канал – Ca^{2+} -активований K^{+} -канал; ІТФР – рецептор інозитол-1,4,5-трифосфату (ІТФ); ФЛС – фосфоліпаза С; NOS – синтаза оксиду азоту (NO); mAHR_3 – мускариновий ацетилхоліновий рецептор типу 3.

ВИСНОВКИ

У контексті дослідження фундаментальних властивостей гладеньком'язової тканини, у дисертаційній роботі були визначені механокінетичні та термодинамічні характеристики вісцеральних гладеньких м'язів. З огляду на важливість та актуальність встановлення біофізичних закономірностей модуляції нанорозмірними ксенобіотиками функціонування гладеньком'язових внутрішніх органів, із використанням сукупності методичних підходів *in vitro*, *in vivo* та *in silico* було детально вивчено закономірності впливу і визначено механізми дії вибраних нанорозмірних матеріалів на вісцеральні гладенькі м'язи.

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

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

3. Встановлено, що суспензії нанорозмірного матеріалу TiO₂ трьох розмірних груп, які містять різні співвідношення сумішей поліморфів рутилу і анатазу: 1-3 нм (рутил), 4-8 нм (анатаз) та 21 нм (співвідношення рутил:анатаз=1:4) за умов некумулятивної ($5 \cdot 10^{-2}$, 10^{-5} мг/мл) та кумулятивної (10^{-7} – 10^{-4} мг/мл) дії, є ефективними модуляторами спонтанної і викликанної

скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів. Зокрема, TiO_2 модулює пресинаптичні і постсинаптичні механізми регуляції за участі нейрональних ацетилхолінових нікотинових, гістамінових і ГАМК-рецепторів з одного боку, а з іншого боку експресованих власне у гладеньком'язових клітинах ацетилхолінових мускаринових, гістамінових та брадикінінових рецепторів.

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

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

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

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

8. Дослідженнями *in silico* встановлено, що нанорозмірний матеріал TiO_2 здатний взаємодіяти з різною спорідненістю із декількома сайтами позаклітинної частини метаботропних ГАМК_B-, гліцинових, M_2 - та M_3 -ацетилхолінових рецепторів.

9. Елементним аналізом показано, що за умов інтрагастрального введення *in vivo* щурам нано- TiO_2 проникає в тканини та нерівномірно накопичується у різних органах: найбільшу кількість Ti накопичують тканини вісцеральних

гладеньких м'язів (шлунок > товстий кишечник > матка) та нирок. Тензометричними дослідженнями та механокінетичним аналізом встановлено, що тривале (30 і 100 діб) навантаження організму *in vivo* щурів TiO_2 спричиняє неоднорідний (часо-залежний і тканино-залежний) вплив на спонтанну і викликану скоротливу активність вісцеральних гладеньких м'язів. Термодинамічним аналізом виявлено, що в умовах хронічної дії TiO_2 обумовлює суттєві зміни процесів високоеластичної деформації у гладеньком'язовій тканині шлунку за великих деформацій ($\Delta L/L_0 \approx 50\%$).

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

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

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

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

14. Встановлено, що підвищення тонічної складової K^+ -скорочення гладеньких м'язів міометрія під дією калікс[4]арену С-716 (за попереднього

блокування обміну іонів Са у внутрішньоклітинних Са²⁺-депо) пов'язане з підвищеною концентрацією іонів Са²⁺ в міоцитах, тоді як збільшення нормованої швидкості розслаблення за цих умов, ймовірно, обумовлюється суттєвою активацією синтезу оксиду азоту.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Quigley E. M. M Review article: gastric emptying in functional gastrointestinal disorders. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2004; 20 (Suppl. 7): 56–60.
2. Sanders K.M., Ward S.M., Koh S.D. Interstitial Cells: Regulators of Smooth Muscle Function. *Physiol. Rev.* 2014; 94(3): 859–907.
3. Sanders K.M., Kito Y., Hwang S.J., Ward S.M. Regulation of Gastrointestinal Smooth Muscle Function by Interstitial Cells. *Physiology (Bethesda)*. 2016; 31(5): 316-326.
4. Sanders K.M. Spontaneous Electrical Activity and Rhythmicity in Gastrointestinal Smooth Muscles. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1124: 3-46.
5. Kreis M.E., Kasperek M.S., Starlinger M.J., Becker H.D., Zittel T.T., Jehle E.-C. Recordings of Gastrointestinal Motility. *Digestion.* 2002; 66: 213–221.
6. Schwizer W., Steingötter A., Fox M., Zur T., Thumshirn M., Bösiger P., Fried M. Non-invasive measurement of gastric accommodation in humans. *Gut.* 2002; 51(Suppl I): i59–i62.
7. Chioss G., Costantine M.M., Bytautiene E., Betancourt A., Hankins G.D., Saade G.R., Longo M. In vitro myometrial contractility profiles of different pharmacological agents used for induction of labor. *Am J Perinatol.* 2012; 29(9): 699-704.
8. Gregersen H., Lo K.M. Pathophysiology and treatment of achalasia in a muscle mechanical perspective. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1434(1):173-184.
9. Yao J.J., Lewallen E.A., Trousdale W.H., Xu W., Thaler R., Salib C.G., Reina N., Abdel M.P., Lewallen D.G., van Wijnen A.J. Local Cellular Responses to Titanium Dioxide from Orthopedic Implants. *BioResearch Open Access*; 2017: 6.1. DOI: 10.1089/biores.2017.0017
10. Trovato M.C., Andronico D., Sciacchitano S., Ruggeri R.M., Picerno I., Di

- Pietro A., Visalli G. Nanostructures: between natural environment and medical practice. *Rev Environ Health*. 2018; 33(3): 305-317.
11. Song Y., Chen S. Janus nanoparticles: preparation, characterization, and applications. *Chem Asian J*. 2014; 9(2): 418-430.
 12. Missaoui W.N., Arnold R.D., Cummings B.S. Toxicological status of nanoparticles: What we know and what we don't know. *Chem Biol Interact*. 2018; 295: 1-12.
 13. Weir A., Westerhoff P., Fabricius L., Hristovski K., von Goetz N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol*. 2012; 46(4): 2242-2250.
 14. Chen Z., Wang Y., Zhuo L., Chen S., Zhao L., Luan X., Wang H., Jia G. Effect of titanium dioxide nanoparticles on the cardiovascular system after oral administration. *Toxicol Lett*. 2015; 239(2): 123-30.
 15. Adverse Effects of Engineered Nanomaterials: Exposure, Toxicology, and impact on human health. Second Edition / Edited by Fadeel B., Pietroiusti A., Shvedova A.A.- 2017, Elsevier, Academic Press, 468 p.
 16. Proquin H., Jetten M.J., Jonkhout M.C.M., Garduño-Balderas L.G., Briedé J.J., de Kok T.M., van Loveren H., Chirino Y.I. Transcriptomics analysis reveals new insights in E171-induced molecular alterations in a mouse model of colon cancer. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 9738. doi: 10.1038/s41598-018-28063-z.
 17. Proquin H., Jonkhout M.C.M., Jetten M.J., van Loveren H., de Kok T.M., Briedé J.J. Transcriptome changes in undifferentiated Caco-2 cells exposed to food-grade titanium dioxide (E171): contribution of the nano- and micro-sized particles. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 18287. doi: 10.1038/s41598-019-54675-0.
 18. Rodik R.V. Application of calixarenes for DNA transfection in cells. *Ukr Biokhim Zh (1999)*. 2012; 84(5): 5-15.
 19. Rodik R., Rozhenko A., Boyko V., Pirozhenko V., Danylyuk O., Suwinska

- K., Lipkowski J., Kalchenko V. Calix[4]arenequinazolinones. Synthesis and structure. *Tetrahedron*. 2007; 63: 11451-11457.
20. R.V.Rodik, V.Yu.Malytsky, V.S.Starova, T.V.Yegorova, A.I.Kysil, O.A.Zaporozhets, Z.V.Voitenko, V.I.Kalchenko. Synthesis, fluorescent properties and aggregation of 2,3-dihydroisoindolenylcalix[4]arenes. *J. Incl. Phenom. Macrocycl Chem*. 2013; 77(1-4): 343-350.
 21. Shulov I., Rodik R.V., Arntz Y., Reisch A., Kalchenko V.I., Klymchenko A.S. Protein-Sized Bright Fluorogenic Nanoparticles Based on Cross-Linked Calixarene Micelles with Cyanine Corona. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016 Dec 19;55(51):15884-15888.
 22. Кальченко В.І., Родік Р.В., Бойко В.І. Каліксарени. Перспективи медико-біологічного застосування. *Журн. органіч. та фармац. хімії*. - 2005. - Т. 3, N 4. - С. 13-29.
 23. Кальченко О. І., Кальченко В. І. Рідинна хроматографія в аналітичній та супрамолекулярній хімії каліксаренів. *Журн. органіч. та фармац. хімії*. - 2011. - Т. 9, N 1. - С. 21-36.
 24. Кальченко В. І., Родік Р. В. Супрамолекулярні наномашини та смарт-матеріали. *Вісник НАН України*, 2017; 1. - С.82-88.
 25. Кальченко, В. І., Вовк М. В., Родік Р. В., Ярош О. К. Нейродіабет та шляхи його фармакотерапії. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2016; 6: 21-31.
 26. Kalchenko V. Calixarene receptors of environmentally hazardous and bio-relevant molecules and ions. *IUPAC*. 2008. 80. 1449-1458
 27. Calix[4]arene- α -hydroxyphosphonic acids. Synthesis, stereochemistry and inhibition of glutathione S-transferase. *Arkivok*. 2012; 278-298.
 28. Кальченко В.І., Костерин С.А., Веклич Т.А., Родик Р.В., Шкрабак А.А., Мазур Ю.Ю., Слинченко Н.Н. Синтез новых перспективных утеростимуляторов на основе каліксаренсульфониламидинов и их биохимическая активность. Монографія: Фундаментальні проблеми

- створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва. – Київ: Академперіодика, 2016. – Р. 224-235.
29. Buldenko V.M., Trush V.V., Kobzar O.L., Drapailo A.B., Kalchenko V.I., Vovk A.I. Calixarene-based phosphinic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatases. *Bioorg Med Chem Lett*. 2019 Mar 15;29(6):797-801.
 30. Naseer M.M., Ahmed M., Hameed S. Functionalized calix[4]arenes as potential therapeutic agents. *Chem Biol Drug Des*. 2017 Feb;89(2):243-256. doi: 10.1111/cbdd.12818.
 31. Mazur I.I., Veklich T.O., Shkrabak O.A., Mohart N.A., Demchenko A.M., Gerashchenko I.V., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Selective inhibition of smooth muscle plasma membrane transport Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase by calixarene C-90 and its activation by IPT-35 compound. *Gen Physiol Biophys*. 2018; 37(2): 223-231. doi: 10.4149/gpb_2017035.
 32. Komisarenko S.V., Kosterin S.O., Lugovskoy E.V., Kalchenko V.I. Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes. In book: *Biochemistry and biotechnology for modern medicine*. Publishing House O.M. Moskalenko. Kyiv. 2013.
 33. Komisarenko S.V., Kosterin S.O., Lugovskoy E.V., Cherenok S.O., Tanchuk V.Yu, Vovk A.I, Kalchenko V.I. Synthesis and characterization of calixarene methylene bisphosphonic acids as effectors of biochemical processes. In Book: “LIGANDS: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND ROLE IN BIOTECHNOLOGY”. Nova Publisher. 2013.
 34. Костерін С.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Данилович Ю.В., Векліч Т.О., Мазур Ю.Ю. Біохімічні властивості та регуляція Ca^{2+} -транспортувальних систем мембранних структур гладеньком'язевих клітин. Наукова думка, 2016. 273 с..
 35. Labyntseva R., Yavorovska V., Bevza O., Drapaylo A., Kalchenko V., Kosterin S. Thiocalix[4]arenes remove the Inhibitory Effects of Zn Cations on the Myosin ATPase Activity. *Nanoscale Res Lett*. 2018. Jul 25;13(1):22

36. Veklich T.O., Shkrabak O.A., Rodik R.V., Boïko V.I., Kal'chenko V.I., Kosterin S.O. Spatial structure of the calixarene-aminophosphonic acids is important for their inhibition of the Na⁺, K⁺-ATPase activity in plasma membrane of smooth muscle cells. *Ukr Biochem J.* 2010; 82 (1): 21-33.
37. Veklich T.O. The inhibitory influence of calix[4]Arene of C-90 on the activity of Ca²⁺,Mg²⁺-ATPases in plasma membrane and sarcoplasmic reticulum in myometrium cells. *Ukr Biochem J.* 2016; 88(2): 5-15.
38. https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/990_005
39. https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137
40. https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/995_503
41. https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/995_575
42. https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_334
43. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>
44. Storozhuk M.V., Moroz O.F., Zholos A.V. Multifunctional TRPV1 Ion Channels in Physiology and Pathology with Focus on the Brain, Vasculature, and Some Visceral Systems. *Biomed Res Int.* 2019; 2019: 5806321. doi: 10.1155/2019/5806321.
45. Gash M.C., Varacallo M. Physiology, Muscle Contraction. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019.
46. Goyal R.K., Guo Y., Mashimo H. Advances in the physiology of gastric emptying. *Neurogastroenterol Motil.* 2019; 31(4): e13546. doi: 10.1111/nmo.13546.
47. Breland A., Ha S.E., Jorgensen B.G., Jin B., Gardner T.A., Sanders K.M., Ro S. Smooth Muscle Transcriptome Browser: offering genome-wide references and expression profiles of transcripts expressed in intestinal SMC, ICC, and PDGFR α ⁺ cells. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 387. doi: 10.1038/s41598-018-36607-6.
48. Reho J.J., Zheng X., Fisher S.A. Smooth muscle contractile diversity in the control of regional circulations. *Am. J. Physiol. HeartCirc. Physiol.* 2014;

306(2): H163–H172.

49. Rattan S., Phillips B.R., Maxwell P.J. RhoA/Rho-Kinase: Pathophysiological and Therapeutic Implications in Gastrointestinal Smooth Muscle Tone and Relaxation. *Gastroenterology*. 2010 Jan; 138(1): 13–18.e1-3.
50. Fisher S.A. Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiol. Genomics*. 2010; 42A(3): 169-187.
51. Boberg L., Szekeres F.L.M., Arner A. Signaling and metabolic properties of fast and slow smooth muscle types from mice. *Pflugers Arch*. 2018; 470(4): 681-691.
52. Perrino B.A. Calcium Sensitization Mechanisms in Gastrointestinal Smooth Muscles. *J. Neurogastroenterol. Motil*. 2016; 22(2): 213-225.
53. Gabella G. Cells of visceral smooth muscles. *J. Smooth Muscle Res*. 2012; 48(4): 65-95.
54. Drumm B.T., Hwang S.J., Baker S.A., Ward S.M., Sanders K.M. Ca²⁺ signalling behaviours of intramuscular interstitial cells of Cajal in the murine colon. *J Physiol*. 2019; 597(14): 3587-3617.
55. Drumm B.T., Rembetski B.E., Baker S.A., Sanders K.M. Tonic inhibition of murine proximal colon is due to nitrergic suppression of Ca²⁺ signaling in interstitial cells of Cajal. *Sci Rep*. 2019 Mar 13;9(1):4402.
56. Cretoiu D., Radu B.M., Banciu A., Banciu D.D., Cretoiu S.M. Telocytes heterogeneity: From cellular morphology to functional evidence. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2017; 64: 26-39.
57. Blair P.J., Rhee P.-L., Sanders K.M., Ward S.M. The Significance of Interstitial Cells in Neurogastroenterology. *J. Neurogastroenterol. Motil.*, 2014; 20 (3): 294 – 317.
58. Berridge M.J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J. Physiol*. 2008; 586 (Pt 21): 5047–5061.
59. Koh S.D., Ward S.M., Sanders K.M. Ionic conductances regulating the

- excitability of colonic smooth muscles. *Neurogastroenterol. Motil.* 2012; 24(8): 705–718.
60. Smith T.K., Reed J.B., Sanders K.M. Interaction of two electrical pacemakers in muscularis of canine proximal colon. *Am J Physiol Cell Physiol* 252: C290–C299, 1987.
 61. Olson M.L., Sandison M.E., Chalmers S., McCarron J.G. Microdomains of muscarinic acetylcholine and Ins(1,4,5)P₃ receptors create ‘Ins(1,4,5)P₃ junctions’ and sites of Ca²⁺ wave initiation in smooth muscle. *J. Cell Sci.* 2012; 125(22): 5315–5328.
 62. Liu Y.A., Chung Y.C., Shen M.Y., Pan S.T., Kuo C.W., Peng S.J., Pasricha P.J, Tang S.C. Perivascular Interstitial Cells of Cajal in Human Colon. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2014; 1(1):102-119.
 63. Mikkelsen H.B. Interstitial cells of Cajal, macrophages and mast cells in the gut musculature: morphology, distribution, spatial and possible functional interactions. *J. Cell. Mol. Med.* 2010; 14 (4): 818-832.
 64. Wang Q., Wang K., Solorzano-Vargas R.S., Lin P.Y., Walthers C.M., Thomas A.L., Martín M.G., Dunn J.C.Y. Bioengineered intestinal muscularis complexes with long-term spontaneous and periodic contractions. *PLoS One.* 2018; 13(5): e0195315. doi: 10.1371/journal.pone.0195315. eCollection 2018.
 65. Radenkovic G., Abramovic M. Differentiation of interstitial cells of Cajal in the human distal colon. *Cells Tissues Organs.* 2012; 196(5): 463-469.
 66. Kurahashi M., Nakano Y., Hennig G.W., Ward S.M., Sanders K.M. Platelet-derived growth factor receptor α -positive cells in the tunica muscularis of human colon. *J. Cell Mol. Med.* 2012; 16(7): 1397-1404.
 67. Pieri L., Vannucchi M.G., Faussone-Pellegrini M.S. Histochemical and ultrastructural characteristics of an interstitial cell type different from ICC and resident in the muscle coat of human gut. *J. Cell Mol. Med.* 2008; 12(5B): 1944-1955.

68. Kurahashi M., Zheng H., Dwyer L., Ward S.M., Koh S.D., Sanders K.M. A functional role for the 'fibroblast-like cells' in gastrointestinal smooth muscles. *J Physiol.* 2011; 589 (Pt 3): 697-710.
69. Lang R.J. Do 'fibroblast-like cells' intercede during enteric inhibitory motor neurotransmission in gastrointestinal smooth muscles? *J Physiol.* 2011; 589 (Pt 3): 453-454.
70. Bolton T.B., Prestwich S.A., Zholos A.V., Gordienko D.V. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu. Rev. Physiol.* 1999; 61: 85–115.
71. Sanders K.M., Koh S.D., Ro S., Ward S.M. Regulation of gastrointestinal motility-insights from smooth muscle biology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 9(11): 633-645.
72. Park K.S., Cho K.B., Hwang I.S., Park J.H., Jang B.I., Kim K.O., Jeon S.W., Kim E.S., Park C.S., Kwon J.G. Characterization of smooth muscle, enteric nerve, interstitial cells of Cajal, and fibroblastlike cells in the gastric musculature of patients with diabetes mellitus. *World J.Gastroenterol.* 2016; 22(46): 10131-10139.
73. Cobine C.A., Hannah E.E., Zhu M.H., Lyle H.E., Rock J.R., Sanders K.M., Ward S.M., Keef K.D. ANO1 in intramuscular interstitial cells of Cajal plays a key role in the generation of slow waves and tone in the internal anal sphincter. *J. Physiol.* 2017; 595(6): 2021-2041.
74. Means S.A., Sneyd J. Spatio-temporal calcium dynamics in pacemaking units of the interstitial cells of Cajal. *J.Theor. Biol.* 2010; 267(2): 137-152.
75. Szymański J., Janikiewicz J., Michalska B., Patalas-Krawczyk P., Perrone M., Ziółkowski W., Duszyński J., Pinton P., Dobrzyń A., Więckowski M.R. Interaction of Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane in Calcium Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(7). pii: E1576. doi: 10.3390/ijms18071576.

76. Zhang C.H., Wang P., Liu D.H., et al. The molecular basis of the genesis of basal tone in internal anal sphincter. *Nat Commun.* 2016; 7: 11358. doi: 10.1038/ncomms11358.
77. Patejdl R., Noack T. Calcium movement in smooth muscle and evaluation of graded functional intercellular coupling. *Chaos.* 2018; 28 (10): 106311. doi: 10.1063/1.5035168.
78. Faussonne-Pellegrini M.S., Cortesini C., Romagnoli P. The ultrastructure of the muscle coat of human gastro-oesophageal junction, with special reference to "interstitial cells of Cajal". *Front Neurosci.* 2013; 7:49. doi: 10.3389/fnins.2013.00049. eCollection 2013.
79. Crețoiu S.M., Crețoiu D., Popescu L.M. Human myometrium - the ultrastructural 3D network of telocytes. *J Cell Mol Med.* 2012; 16(11): 2844-2849. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01651.x.
80. Roatesi I., Radu B.M., Crețoiu D., Crețoiu S.M. Uterine Telocytes: A Review of Current Knowledge. *Biol Reprod.* 2015; 93(1): 10. doi: 10.1095/biolreprod.114.125906.
81. Aleksandrovykh V., Walocha J.A., Gil K. Telocytes in female reproductive system (human and animal). *J Cell Mol Med.* 2016; 20(6): 994-1000. doi: 10.1111/jcmm.12843.
82. Domino M., Pawlinski B., Zabielski R., Gajewski Z. C-kit receptor immunopositive interstitial cells (Cajal-type) in the porcine reproductive tract. *Acta Vet Scand.* 2017; 59(1): 32. doi: 10.1186/s13028-017-0300-5.
83. Young R.C. Myocytes, Myometrium, and Uterine Contractions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1101: 72–84. doi: 10.1196/annals.1389.038
84. Jones K., Shmygol A., Kupittayanant S., Wray S. Electrophysiological characterization and functional importance of calcium-activated chloride channel in rat uterine myocytes. *Pflugers Arch.* 2004; 448(1): 36-43.
85. Matthew A., Shmygol A., Wray S. Ca^{2+} entry, efflux and release in smooth muscle. *Biol Res.* 2004; 37(4): 617-624.

86. Gravina F.S., Parkington H.C., Kerr K.P., et al. Role of mitochondria in contraction and pacemaking in the mouse uterus. *Br J Pharmacol.* 2010; 161 (6): 1375-1390. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00949.x.
87. Wray S., Jones K., Kupittayanant S., Li Y., Matthew A., Monir-Bishty E., Noble K., Pierce S.J., Quenby S., Shmygol A.V. Calcium signaling and uterine contractility. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2003; 10(5): 252-264.
88. Duquette R.A., Shmygol A., Vaillant C., Mobasher A., Pope M., Burdyga T., Wray S. Vimentin-positive, c-kit-negative interstitial cells in human and rat uterus: a role in pacemaking? *Biol Reprod.* 2005; 72(2): 276-283.
89. Казарян К.В., Унанян Н.Г., Мкртчян А.В. Взаимодействие пейсмекерных активностей крайних отделов маточных труб у небеременных крыс. *Доклады НАН Армении.* 2014; 114 (1): 69-75.
90. Казарян К.В., Унанян Н.Г., Меликсантян И.Б., Акопян Р.Р., Саваян А.А. Роль окситоцина в активации спонтанной электрической активности тела и рогов матки у небеременных крыс. *Цитология*, 2010; 52 (12): 990-996.
91. Казарян К.В., Пилипосян Т.А. Овариальная область миометрия и ее роль в регуляции спонтанной электрической активности. *Медицинская наука Армении НАН РА.* 2016; LVI (2): С. 46-54.
92. Borysova L., Shabir S., Walsh M.P., Burdyga T. The importance of Rho-associated kinase-induced Ca^{2+} sensitization as a component of electromechanical and pharmacomechanical coupling in rat ureteric smooth muscle. *Cell Calcium.* 2011; 50(4): 393-405. doi: 10.1016/j.ceca.2011.07.003.
93. de Oliveira D.M.N., Batista-Lima F.J., de Carvalho E.F., Havt A., da Silva M.T.B., Dos Santos A.A., Magalhães P.J.C. Extracellular acidosis selectively inhibits pharmacomechanical coupling induced by carbachol in strips of rat gastric fundus. *Exp Physiol.* 2017; 102(12): 1607-1618. doi: 10.1113/EP086573.

94. Lamounier-Zepter V., Baltas L.G., Morano I. Distinct contractile systems for electromechanical and pharmacomechanical coupling in smooth muscle. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 538: 417-425.
95. Wray S., Burdyga T., Noble D., Noble K., Borysova L., Arrowsmith S. Progress in understanding electro-mechanical signalling in the myometrium. *Acta Physiol (Oxf).* 2015;213(2): 417-431. doi: 10.1111/apha.12431.
96. Wray S. Insights from physiology into myometrial function and dysfunction. *Exp Physiol.* 2015; 100(12): 1468-1476. doi: 10.1113/EP085131.
97. Noble K., Matthew A., Burdyga T., Wray S. A review of recent insights into the role of the sarcoplasmic reticulum and Ca entry in uterine smooth muscle. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2009; 144 Suppl 1: S11-9. doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.02.010.
98. Wray S., Burdyga T. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle // *Physiol Rev.* 2010; 90(1): 113-78. doi: 10.1152/physrev.00018.2008.
99. Noble D., Borysova L., Wray S., Burdyga T. Store-operated Ca^{2+} entry and depolarization explain the anomalous behaviour of myometrial SR: effects of SERCA inhibition on electrical activity, Ca^{2+} and force. *Cell Calcium.* 2014; 56(3): 188-94. doi: 10.1016/j.ceca.2014.07.003.
100. Wray S., Shmygol A. Role of the calcium store in uterine contractility. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; 18(3): 315-320.
101. Pliska V., Jutz G. Kinetics of oxytocin and deaminoxytocin displacement from the OXTR-receptor compartment in rat uterus ex vivo. *Biochem Pharmacol.* 2018; 148: 278-287. doi: 10.1016/j.bcp.2018.01.006.
102. Bafor E.E., Rowan E.G., Edrada-Ebe R. Toward Understanding Myometrial Regulation: Metabolomic Investigation Reveals New Pathways of Oxytocin and Ritodrine Activity on the Myometrium. *Reprod Sci.* 2017; 24(5): 691-705. doi: 10.1177/1933719116667224.
103. Arrowsmith S., Wray S. Oxytocin: its mechanism of action and receptor

- signalling in the myometrium. *J Neuroendocrinol.* 2014; 26(6): 356-69. doi: 10.1111/jne.12154.
104. Chatterjee O., Patil K., Sahu A., Gopalakrishnan L., Mol P., Advani J., Mukherjee S., Christopher R., Prasad T.S. An overview of the oxytocin-oxytocin receptor signaling network. *J Cell Commun Signal.* 2016; 10(4): 355-360.
 105. Gimpl G., Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 2001; 81 (2): 629-683.
 106. Ferreira J.J., Butler A., Stewart R., Gonzalez-Cota A.L., Lybaert P., Amazu C., Reinl E.L., Wakle-Prabakaran M., Salkoff L., England S.K., Santi C.M. Oxytocin can regulate myometrial smooth muscle excitability by inhibiting the Na^+ -activated K^+ -channel, Slo2.1. *J Physiol.* 2018 Oct 17. doi: 10.1113/JP276806.
 107. Ilicic M., Butler T., Zakar T., Paul J.W. The expression of genes involved in myometrial contractility changes during ex situ culture of pregnant human uterine smooth muscle tissue. *J. Smooth Muscle Res.* 2017; 53(0): 73-89. doi: 10.1540/jsmr.53.73.
 108. Kim S.H., MacIntyre D.A., Firmino Da Silva M., Blanks A.M., Lee Y.S., Thornton S., Bennett P.R., Terzidou V. Oxytocin activates NF- κ B-mediated inflammatory pathways in human gestational tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015; 403: 64-77. doi: 10.1016/j.mce.2014.11.008.
 109. Shmygol A., Wray S. Modulation of agonist-induced Ca^{2+} release by SR Ca^{2+} load: direct SR and cytosolic Ca^{2+} measurements in rat uterine myocytes. *Cell Calcium.* 2005; 37: 215–223.
 110. Morgan J.M., De Smedt H., Gillespie J.I. Identification of three isoforms of the InsP_3 receptor in human myometrial smooth muscle. *Pflugers Arch.* 1996; 431(5): 697-705.
 111. Narayanan D., Adebisi A., Jaggar J.H. Inositol trisphosphate receptors in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012; 302(11):

- H2190-H2210. doi: 10.1152/ajpheart.01146.2011.
112. Arthur P., Taggart M.J., Mitchell B.F. Oxytocin and parturition: a role for increased myometrial calcium and calcium sensitization? *Front Biosci.* 2007; 12: 619-633.
 113. Shlykov S.H. Oxytocin and its role in the control of intracellular level of calcium ions in the myometrium. *Ukr. Biokhim. Zh* (1999). 2010; 82(2): 5-14.
 114. Shmygol A., Gullam J., Blanks A., Thornton S. Multiple mechanisms involved in oxytocin-induced modulation of myometrial contractility. *Acta Pharmacol. Sin.* 2006; 27(7): 827-832.
 115. Amin E., Dubey B.N., Zhang S.C., Gremer L., Dvorsky R., Moll J.M., Taha M.S., Nagel-Steger L., Piekorz R.P., Somlyo A.V., Ahmadian M.R. Rho-kinase: regulation, (dys)function, and inhibition. *Biol. Chem.* 2013; 394(11): 1399-1410.
 116. Tahara M., Morishige K., Sawada K., Ikebuchi Y., Kawagishi R., Tasaka K., Murata Y. RhoA/Rho-kinase cascade is involved in oxytocin-induced rat uterine contraction. *Endocrinology* 2002; 143(3): 920-929.
 117. Rattan S. Ca^{2+} /calmodulin/MLCK pathway initiates, and RhoA/ROCK maintains, the internal anal sphincter smooth muscle tone. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 2017; 312(1): G63-G66. doi: 10.1152/ajpgi.00370.2016.
 118. Olson M.L., Sandison M.E., Chalmers S., McCarron J.G. Microdomains of muscarinic acetylcholine and $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ receptors create 'Ins(1,4,5) P_3 junctions' and sites of Ca^{2+} wave initiation in smooth muscle. *J Cell Sci.* 2012; 125(Pt 22): 5315-5328. doi: 10.1242/jcs.105163.
 119. Zhang M., Leung F.P., Huang Y., Bian Z.X. Increased colonic motility in a rat model of irritable bowel syndrome is associated with up-regulation of L-type calcium channels in colonic smooth muscle cells. *Neurogastroenterol Motil.* 2010; 22(5): e162-e170. doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01467.x.

120. Kirschstein T., Rehberg M., Bajorat R., Tokay T., Porath K., Köhling R. High K^+ -induced contraction requires depolarization-induced Ca^{2+} release from internal stores in rat gut smooth muscle. *Acta Pharmacol Sin.* 2009; 30(8): 1123-1131. doi: 10.1038/aps.2009.98.
121. Egea-Guerrero J.J., Murillo-Cabezas F., Muñoz-Sánchez M.Á., Vilches-Arenas A., Porras-González C., Castellano A., Ureña J., González-Montelongo Mdel C. Role of L-type $Ca^{(2+)}$ channels, sarcoplasmic reticulum and Rho kinase in rat basilar artery contractile properties in a new model of subarachnoid hemorrhage. *Vascul. Pharmacol.* 2015; 72: 64-72. doi: 10.1016/j.vph.2015.04.011.
122. Wu C., Sui G., Fry C.H. The role of the L-type $Ca^{(2+)}$ channel in refilling functional intracellular $Ca(2+)$ stores in guinea-pig detrusor smooth muscle. *J Physiol.* 2002; 538(Pt 2): 357-369.
123. Xiong Z., Sperelakis N., Noffsinger A., Fenoglio-Preiser C. Changes in calcium channel current densities in rat colonic smooth muscle cells during development and aging. *Am. J. Physiol.* 1993; 265(3 Pt 1):C617-625.
124. Strege P.R., Sha L., Beyder A., Bernard C.E., Perez-Reyes E., Evangelista S., Gibbons S.J., Szurszewski J.H., Farrugia G. T-type $Ca(2+)$ channel modulation by otilonium bromide. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2010; 298(5): G706-G713. doi: 10.1152/ajpgi.00437.2009.
125. Kim Y.H., Chung S., Lee Y.H., Kim E.C., Ahn D.S. Increase of L-type Ca^{2+} current by protease-activated receptor 2 activation contributes to augmentation of spontaneous uterine contractility in pregnant rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 418(1): 167-172. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.154.
126. Leiria L.O., Mónica F.Z., Carvalho F.D., Claudino M.A., Franco-Penteado C.F., Schenka A., Grant A.D., De Nucci G., Antunes E. Functional, morphological and molecular characterization of bladder dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: evidence of a role for L-type voltage-

- operated Ca^{2+} channels. *Br J Pharmacol.* 2011; 163(6): 1276-88. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01311.x.
127. Hirota K., Hashiba E., Yoshioka H., Kabara S., Matsuki A. Effects of three different L-type Ca^{2+} entry blockers on airway constriction induced by muscarinic receptor stimulation. *Br. J. Anaesth.* 2003; 90(5): 671-675.
 128. Drumm B.T., Rembetski B.E., Cobine C.A., Baker S.A., Sergeant G.P., Hollywood M.A., Thornbury K.D., Sanders K.M. Ca^{2+} signalling in mouse urethral smooth muscle in situ: role of Ca^{2+} stores and Ca^{2+} influx mechanisms. *J Physiol.* 2018; 596(8): 1433-1466. doi: 10.1113/JP275719.
 129. Drumm B.T., Hennig G.W., Battersby M.J., Cunningham E.K., Sung T.S., Ward S.M., Sanders K.M., Baker S.A. Clustering of Ca^{2+} transients in interstitial cells of Cajal defines slow wave duration. *J. Gen. Physiol.* 2017; 149(7): 703-725. doi: 10.1085/jgp.201711771.
 130. Hashitani H., Mitsui R., Masaki S., Van Helden D.F. Pacemaker role of pericytes in generating synchronized spontaneous Ca^{2+} transients in the myenteric microvasculature of the guinea-pig gastric antrum. *Cell Calcium.* 2015; 58(5): 442-456. doi: 10.1016/j.ceca.2015.06.012.
 131. Drumm B.T., Sung T.S., Zheng H., Baker S.A., Koh S.D., Sanders K.M. The effects of mitochondrial inhibitors on Ca^{2+} signalling and electrical conductances required for pacemaking in interstitial cells of Cajal in the mouse small intestine. *Cell Calcium.* 2018; 72: 1-17. doi: 10.1016/j.ceca.2018.01.003.
 132. Zheng H., Park K.S., Koh S.D., Sanders K.M. Expression and function of a T-type Ca^{2+} conductance in interstitial cells of Cajal of the murine small intestine // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2014; 306(7): C705-C713. doi: 10.1152/ajpcell.00390.2013.
 133. Saini H.K., Dhalla N.S. Sarcolemmal cation channels and exchangers modify the increase in intracellular calcium in cardiomyocytes on inhibiting Na^+/K^+ -ATPase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007, 293: H169–

- H181. doi:10.1152/ajpheart.00007.2007.
134. Wang Y., Deng X., Hewavitharana T., Soboloff J., Gill D.L. Stim, ORAI and TRPC channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2008; 35(9): 1127-1133. doi: 10.1111/j.1440-1681.2008.05018.x.
 135. Coburn R.F., Baron C.B. Coupling mechanisms in airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1990; 258 (4 Pt 1): L119-L133.
 136. Dryn D.O., Melnyk M.I., A. Kury L.T., Prylutsky Y.I., Ritter U., Zholos A.V. C60 fullerenes disrupt cellular signalling leading to TRPC4 and TRPC6 channels opening by the activation of muscarinic receptors and G-proteins in small intestinal smooth muscles. *Cell Signal.* 2018; 43: 40-46. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.12.003.
 137. Sanders K.M. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterol. Motil.* 2008; 20 Suppl 1: 39-53. doi: 10.1111/j.1365-2982.2008.01108.x.
 138. Burdyga T., Paul R. J. Chapter 86 - Calcium homeostasis and signaling in smooth Muscle / Muscle. *Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*. Edited by J. A. Hill and E. N. Olson. Elsevier Inc. 2012; 2: 1155-1171.
 139. Pritchard T.J., Bowman P.S., Jefferson A., Tosun M., Lynch R.M., Paul R.J. Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺ clearance proteins in smooth muscle: a functional unit. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010; 299: H548-H556.
 140. Floyd R., Wray S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell Calcium* 2007; 42: 467-476.
 141. Leung F.P., Yung L.M., Yao X., Laher I., Huang Y. Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 153: 846-857.
 142. Sakamoto T., Matsuyama H., Yamamoto M., Tanahashi Y., Kitazawa T., Taneike T., Komori S., Unno T. A non-selective cationic channel activated by diacylglycerol in mouse intestinal myocytes. *Eur J Pharmacol.* 2008;

- 599(1-3): 54-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.09.039.
143. Gudermann T., Hofmann T., Mederos y., Schnitzler M., Dietrich A. Activation, subunit composition and physiological relevance of DAG-sensitive TRPC proteins. *Novartis Found Symp.* 2004; 258: 103-18; discussion 118-22, 155-9, 263-6.
 144. Zheng J. Molecular mechanism of TRP channels. *Compr Physiol.* 2013; 3(1): 221-42. doi: 10.1002/cphy.c120001.
 145. Reinl E.L., Cabeza R., Gregory I.A., Cahill A.G., England S.K. Sodium leak channel, non-selective contributes to the leak current in human myometrial smooth muscle cells from pregnant women. *Mol Hum Reprod.* 2015; 21(10): 816-24. doi: 10.1093/molehr/gav038.
 146. Kim B.J., So I., Kim K.W. The relationship of TRP channels to the pacemaker activity of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *J Smooth Muscle Res.* 2006; 42(1): 1-7.
 147. Raingo J., Rebolledo A., Iveli F., Grassi de Gende A.O., Milesi V. Non-selective cationic channels (NSCC) in smooth muscle cells from human umbilical arteries. *Placenta.* 2004; 25(8-9): 723-9.
 148. Beech D.J., Muraki K., Flemming R. Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of *Drosophila* TRP. *J Physiol.* 2004; 559(Pt 3): 685-706.
 149. Thebault S., Zholos A., Enfissi A., Slomianny C., Dewailly E., Roudbaraki M., Parys J., Prevarskaya N. Receptor-operated Ca^{2+} entry mediated by TRPC3/TRPC6 proteins in rat prostate smooth muscle (PS1) cell line. *J Cell Physiol.* 2005; 204(1): 320-8.
 150. Sakamoto T., Unno T., Kitazawa T., Taneike T., Yamada M., Wess J., Nishimura M., Komori S. Three distinct muscarinic signalling pathways for cationic channel activation in mouse gut smooth muscle cells. *J Physiol.* 2007; 582(Pt 1): 41-61.
 151. Alom F., Miyakawa M., Matsuyama H., Nagano H., Tanahashi Y., Unno T.

- Possible antagonistic effects of the TRPC4 channel blocker ML204 on M2 and M3 muscarinic receptors in mouse ileal and detrusor smooth muscles and atrial myocardium. *J Vet Med Sci.* 2018; 80(9): 1407-1415. doi: 10.1292/jvms.18-0197.
152. Woodard G.E., López J.J., Jardín I., Salido G.M., Rosado J.A. TRPC3 regulates agonist-stimulated Ca^{2+} mobilization by mediating the interaction between type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, RACK1, and Orai1. *J Biol Chem.* 2010; 285(11): 8045-53. doi: 10.1074/jbc.M109.033605.
 153. Abramowitz J., Birnbaumer L. Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *FASEB J.* 2009; 23(2): 297-328. doi: 10.1096/fj.08-119495.
 154. Leung F.P., Yung L.M., Yao X., Laher I., Huang Y. Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 2008; 153(5): 846-57.
 155. Avila-Medina J., Mayoral-Gonzalez I., Dominguez-Rodriguez A., Gallardo-Castillo I., Ribas J., Ordoñez A., Rosado J.A., Smani T. The Complex Role of Store Operated Calcium Entry Pathways and Related Proteins in the Function of Cardiac, Skeletal and Vascular Smooth Muscle Cells. *Front Physiol.* 2018; 9: 257. doi: 10.3389/fphys.2018.00257.
 156. Shmygol A., Wray S. Modulation of agonist-induced Ca^{2+} release by SR Ca^{2+} load: direct SR and cytosolic Ca^{2+} measurements in rat uterine myocytes. *Cell Calcium.* 2005; 37: 215–223.
 157. Palmgren M.G., Nissen P. P-type ATPases. *Annu Rev Biophys.* 2011; 40: 243-66. doi: 10.1146/annurev.biophys.093008.131331.
 158. Saffioti N.A., de Sautu M., Ferreira-Gomes M.S., Rossi R.C., Berlin J., Rossi J.P.F.C., Mangialavori I.C. E2P-like states of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase characterization of vanadate and fluoride-stabilized phosphoenzyme analogues. *Biochim.Biophys.Acta.Biomembr.* 2019; 1861(2): 366-379. doi: 10.1016/j.bbamem.2018.11.001.
 159. Montes M.R., Ferreira-Gomes M.S., Centeno M., Rossi R.C. The E2P-like

- state induced by magnesium fluoride complexes in the Na,K-ATPase. Kinetics of formation and interaction with Rb(+). *BiochimBiophysActa*. 2015; 1848 (7): 1514-1523. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.03.023.
160. Clausen M.V., Hilbers F., Poulsen H. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front. Physiol.* 2017; 8: 371. doi: 10.3389/fphys.2017.00371
 161. Morth J.P., Pedersen B.P., Toustrup-Jensen M.S., Sørensen T.L., Petersen J., Andersen J.P., Vilsen B., Nissen P. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature*. 2007; 450 (7172): 1043-9.
 162. Tejral G., Sopko B., Necas A., Schoner W., Amler E. Computer modelling reveals new conformers of the ATP binding loop of Na⁺/K⁺-ATPase involved in the transphosphorylation process of the sodium pump. *PeerJ*. 2017; 5: e3087. doi: 10.7717/peerj.3087.
 163. Horisberger J.D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda)*. 2004; 19: 377-387.
 164. Takeuchi A., Reyes N., Artigas P., Gadsby D. C. Visualizing the mapped ion pathway through the Na,K-ATPase pump. *Channels*. 2009; 3 (6): 383–386.
 165. Price E. M., Lingrel J. B. Ouabain affinity determining residues lie close to the Na/K pump ion pathway. *Biochemistry*. 1988; 27(22): 8400–8408.
 166. Lingrel J. B. Subunit Isoform Selectivity in Assembly of Na,K-ATPase α - β Heterodimers. *Annu. Rev. Physiol.* 2010; 72(72): 395–412.
 167. Lingrel J.B. The Physiological Significance of the CardiotonicSteroid/Ouabain-Binding Site of the Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol.* 2010; 72: 395–412. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135725.
 168. Price E.M., Rice D.A., Lingrel J.B. Structure-function studies of Na,K-ATPase. Site-directed mutagenesis of the border residues from the H1-H2 extracellular domain of the alpha subunit. *J. Biol. Chem.* 1990; 265(12): 6638-6641.

169. Middleton D. A., Rankin S., Esmann M., Watts A. Structural insights into the binding of cardiac glycosides to the digitalis receptor revealed by solid-state NMR. *PNAS*.2000; 97(25): 13602–13607.
170. Qiu L.Y., Koenderink J.B., Swarts H.G., Willems P.H., De Pont J.J. Phe783, Thr797, and Asp804 in transmembrane hairpin M5-M6 of Na⁺,K⁺-ATPase play a key role in ouabain binding. *J Biol Chem*. 2003; 278(47): 47240-47244.
171. Canessa C.M., Horisberger J.D., Rossier B.C. Mutation of a tyrosine in the H3-H4 ectodomain of Na,K-ATPase alpha subunit confers ouabain resistance. *J Biol Chem*. 1993; 268(24): 17722-17726.
172. Vasilets L. A., Takeda K., Kawamura M., Schwarz W. Significance of the glutamic acid residues Glu334, Glu959, and Glu960 of the alpha subunits of Torpedo Na⁺, K⁺ pumps for transport activity and ouabain binding. *Biochim. Biophys. Acta*. 1998; 1368 (1): 137–149.
173. Ogawaa H., Shinodaa T., Corneliusb F., Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *PNAS*. 2009; 106 (33): 13742–13747.
174. Geering K. The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr*. 2001; 33 (5): 425–438.
175. Beguin P., Wang X., Firsov D., Puoti A., Claeys D., Horisberger J.D., Geering K. The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *The EMBO Journal*. 1997; 16 (14): 4250–4260.
176. Scheiner-Bobis G. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem*. 2002; 269: 2424–2433.
177. Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am. J. Physiol.: Renal Physiol*. 2006; 290: F241–F250.
178. Dostanic-Larson I., Lorenz J., Van Huysse J., Neumann J.C., Moseley A.E., Lingrel J.B. Physiological role of the alpha1- and alpha2-isoforms of the

- Na⁺-K⁺-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *Am. J. Physiol.: Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006; 290: R524–R528.
179. Lingrel J., Williams M., Vorhees C., Moseley A. Na,K-ATPase and the role of alpha isoforms in behavior. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007; 39: 385–389.
 180. Wang Sh., Farley R. Valine 904, tyrosine 898, and cysteine 908 in Na,K-ATPase alpha subunits are important for assembly with beta subunits. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (6): 29400–29405.
 181. Khalaf F.K., Dube P., Mohamed A., Tian J., Malhotra D., Haller S.T., Kennedy D.J. Cardiotonic Steroids and the Sodium Trade Balance: New Insights into Trade-Off Mechanisms Mediated by the Na⁺/K⁺-ATPase. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(9). pii: E2576. doi: 10.3390/ijms19092576.
 182. Blanco G., Mercer R. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.: Renal. Physiol.* 1998; 275 (44): F633–F650.
 183. Eakle K., Kabalin M., Wang Sh., Farley R. The influence of beta subunit structure on the stability of Na⁺/K⁺-ATPase complexes and interaction with K⁺. *J. Biol. Chem.* 1994; 269 (4): 6550–6557.
 184. Blaustein M.P., Zhang J., Chen L., Song H., Raina H., Kinsey S.P., Izuka M., Iwamoto T., Kotlikoff M.I., Lingrel J.B., Philipson K.D., Wier W.G., Hamlyn J.M. The pump, the exchanger, and endogenous ouabain: signaling mechanisms that link salt retention to hypertension. *Hypertension.* 2009; 53: 291–298.
 185. Schoner W., Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am. J. Physiol.: Cell. Physiol.* 2007; 293: C509–C536.
 186. Tymiak A., Norman J., Bolgar M., DiDonato G.C., Lee H., Parker W.L., Lo L.C., Berova N., Nakanishi K., Haber E. Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993; 90: 8189–8193.
187. Simonini M., Casanova P., Citterio L., Messaggio E., Lanzani C., Manunta P. Endogenous Ouabain and Related Genes in the Translation from Hypertension to Renal Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(7). pii: E1948. doi: 10.3390/ijms19071948.
 188. Fedorova O., Agalakova N., Talan M., Lakatta E.G., Bagrov A.Y. Brain ouabain stimulates peripheral marinobufagenin via angiotensin II signalling in NaCl-loaded Dahl-S rats. *J.Hypertens.* 2005; 23(8): 1515–1523.
 189. Bauer N., Müller-Ehmsen J., Krämer U., Hambarchian N., Zobel C., Schwinger R.H., Neu H., Kirch U., Grünbaum E.G., Schoner W. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of beta-blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension.* 2005; 45: 1024–1102.
 190. Dmitrieva R., Doris P. Cardiotonic steroids: potential endogenous sodium pump ligands with diverse function. *Exp. Biol. Med.* 2002; 227(8): 561–569.
 191. Cavalcante-Silva L.H.A., Lima É.A., Carvalho D.C.M., de Sales-Neto J.M., Alves A.K.A., Galvão J.G.F.M.1, da Silva J.S.F., Rodrigues-Mascarenhas S. Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain. *Front Physiol.* 2017; 8: 895. doi: 10.3389/fphys.2017.00895.
 192. Kaplan J. The sodium pump and hypertension: a physiological role for the cardiac glycoside binding site of the Na,K-ATPase. *PNAS.* 2005; 102 (44): 15723–15724.
 193. Lorenz J., Loreaux E., Dostanic-Larson I., Lasko V., Schnetzer J.R., Paul R.J., Lingrel J.B. ACTH-induced hypertension is dependent on the ouabain-binding site of the $\alpha 2$ -Na⁺-K⁺-ATPase subunit. *Am. J. Physiol.: Heart. Circ. Physiol.* 2008; 295: H273–H280.
 194. Yuan C., Manunta P., Hamlyn J., Chen S., Bohen E., Yeun J., Haddy F.J., Pamnani M.B. Long-term ouabain administration produces hypertension in

- rats. *Hypertension*. 1993; 22: 178–187.
195. Wauquier I., Pernollet M.-G., Grichois M.-L., Lacour B., Meyer P., Devynck M.A. Endogenous digitalislike circulating substances in spontaneously hypertensive rats. *Ibid.* 1988; 12: 108–116.
 196. Tian G., Dang C., Lu Z. The change and significance of the Na⁺-K⁺-ATPase alpha-subunit in ouabain-hypertensive rats. *Hypertens. Res.* 2001; 24: 729–734.
 197. Huang B., Veerasingham S., Leenen F. Brain "ouabain," ANG II, and sympathoexcitation by chronic central sodium loading in rats. *Am. J. Physiol.: Heart. Circ. Physiol.* 1998; 274: 1269–1276.
 198. Blanco G., Mercer R. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.: Renal. Physiol.* 1998; 275 (44): F633–F650.
 199. Bagrov Y., Manusova N., Frolova E., Egorova I.A., Kashkin V.A., Tapilskaya N.I., Fedorova O.V., Bagrov A.Y. Endogenous sodium pump inhibitors, diabetes mellitus and preeclampsia Preliminary observations and a hypothesis. *Pathophysiology*. 2007; 14(3–4): 147–151.
 200. Kimura K., Manunta P., Hamilton B. P., Hamlyn J. M. Different effects of in vivo ouabain and digoxin on renal artery function and blood pressure in the rat. *Hypertens Res.* 2000; 23: S67–S76.
 201. Kappl M., Nagel G., Hartung K. Voltage and Ca(2+) dependence of pre-steady-state currents of the Na-Ca exchanger generated by Ca(2+) concentration jumps. *Biophys. J.* 2001; 81: 2628–2638.
 202. Reuter H., Pott C., Goldhaber J., Henderson S.A., Philipson K.D., Schwinger R.H. Na(+)--Ca²⁺ exchange in the regulation of cardiac excitation-contraction coupling. *Cardiovasc. Res.* 2005; 67(2): 198–207.
 203. Liu J., Lilly M.N., Shapiro J.I. Targeting Na/K-ATPase Signaling: A New Approach to Control Oxidative Stress. *Curr Pharm Des.* 2018; 24(3): 359–364. doi: 10.2174/1381612824666180110101052.

204. Arnon A., Hamlyn J., Blaustein M. Na(+) entry via store-operated channels modulates Ca(2+) signaling in arterial myocytes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2000; 278 (1): C163-C173.
205. Xie Z., Cai T. Na⁺-K⁺--ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol. Interv.* 2003; 3(3): 157–168.
206. Bagrov Y., Manusova N., Frolova E., Egorova I.A., Kashkin V.A., Tapilskaya N.I., Fedorova O.V., Bagrov A.Y. Endogenous sodium pump inhibitors, diabetes mellitus and preeclampsia. Preliminary observations and a hypothesis. *Pathophysiology.* 2007; 14(3–4): 147–151.
207. Chidlow J., Sessa W. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation . *Cardiovasc. Res.* 2010; 86: 219–225.
208. Chen H.S., Chen X., Li W.T., Shen J.G. Targeting RNS/caveolin-1/MMP signaling cascades to protect against cerebral ischemia-reperfusion injuries: potential application for drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2018; 39(5): 669-682. doi: 10.1038/aps.2018.27.
209. Davis K.A., Samson S.E., Hammel K.E., Kiss L., Fulop F., Grover A.K. Functional linkage of Na⁺-Ca²⁺-exchanger to sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in coronary artery: comparison of smooth muscle and endothelial cells. *J Cell Mol Med.* 2009; 13(8B): 1775-1783. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00480.x.
210. Gomez-Pinilla P.J., Pozo M.J., Baba A., Matsuda T., Camello P.J. Ca²⁺ extrusion in aged smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol.* 2007; 74(6): 860-869.
211. Liu L., Ishida Y., Okunade G., Shull G.E., Paul R.J. Role of plasma membrane Ca²⁺-ATPase in contraction-relaxation processes of the bladder: evidence from PMCA gene-ablated mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 290(4): C1239-C1247.
212. Lewis S., Little R., Baudoin F., Prehar S., Neyses L., Cartwright E.J., Austin C. Acute inhibition of PMCA4, but not global ablation, reduces

- blood pressure and arterial contractility via a nNOS-dependent mechanism. *J Cell Mol Med*. 2018; 22(2): 861-872. doi: 10.1111/jcmm.13371.
213. Cartwright E.J., Oceandy D., Austin C., Neyses L. Ca^{2+} signalling in cardiovascular disease: the role of the plasma membrane calcium pumps. *Sci China Life Sci*. 2011; 54(8): 691-8. doi: 10.1007/s11427-011-4199-1.
 214. Brini M. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase: from a housekeeping function to a versatile signaling role. *Pflugers Arch*. 2009; 457(3): 657-64. doi: 10.1007/s00424-008-0505-6.
 215. Pritchard T.J., Bowman P.S., Jefferson A., Tosun M., Lynch R.M., Paul R.J. Na^{+} - K^{+} -ATPase and Ca^{2+} clearance proteins in smooth muscle: a functional unit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 299(2): H548-56. doi: 10.1152/ajpheart.00527.2009.
 216. Stafford N., Wilson C., Oceandy D., Neyses L., Cartwright E.J. The Plasma Membrane Calcium ATPases and Their Role as Major New Players in Human Disease. *Physiol Rev*. 2017; 97(3): 1089-1125. doi: 10.1152/physrev.00028.2016.
 217. Wu X., Weng L., Zhang J., Liu X., Huang J. The Plasma Membrane Calcium ATPases in Calcium Signaling Network. *Curr Protein Pept Sci*. 2018; 19(8): 813-822. doi: 10.2174/1389203719666180416122745.
 218. Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Na^{+} , K^{+} -АТФ-аза, ендогенні кардіостероїди та їхня трансдукторна роль. *Укр. біохім. журн.*, 2012; 84 (1): 5-17.
 219. Mangialavori I., Villamil-Giraldo A.M., Pignataro M.F., Ferreira-Gomes M., Caride A.J., Rossi J.P. Plasma membrane calcium pump (PMCA) differential exposure of hydrophobic domains after calmodulin and phosphatidic acid activation. *J Biol Chem*. 2011; 286(21): 18397-404. doi: 10.1074/jbc.M110.210088.
 220. Calì T., Brini M., Carafoli E. Regulation of Cell Calcium and Role of Plasma Membrane Calcium ATPases. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2017; 332:

- 259-296. doi: 10.1016/bs.ircmb.2017.01.002.
221. Brini M., Carafoli E., Calì T. The plasma membrane calcium pumps: focus on the role in (neuro)pathology. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 483(4): 1116-1124. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.117.
 222. Gong D., Chi X., Ren K., Huang G., Zhou G., Yan N., Lei J., Zhou Q. Structure of the human plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 1 in complex with its obligatory subunit neuroplastin. *Nat Commun.* 2018; 9(1): 3623. doi: 10.1038/s41467-018-06075-7.
 223. Lopreiato R., Giacomello M., Carafoli E. The plasma membrane calcium pump: new ways to look at an old enzyme // *J Biol Chem.* 2014; 289(15): 10261-8. doi: 10.1074/jbc.O114.555565.
 224. Krebs J. The plethora of PMCA isoforms: Alternative splicing and differential expression. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1853(9): 2018-24. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.12.020.
 225. Mangialavori I.C., Ferreira-Gomes M.S., Saffioti N.A., González-Lebrero R.M., Rossi R.C., Rossi J.P. Conformational changes produced by ATP binding to the plasma membrane calcium pump. *J Biol Chem.* 2013; 288(43): 31030-41. doi: 10.1074/jbc.M113.494633.
 226. Szewczyk M.M., Pande J., Grover A.K. Caloxins: a novel class of selective plasma membrane Ca^{2+} pump inhibitors obtained using biotechnology. *Pflugers Arch.* 2008; 456(2): 255-66.
 227. Pande J., Szewczyk M.M., Kuszczak I., Grover S., Escher E., Grover A.K. Functional effects of caloxin 1c2, a novel engineered selective inhibitor of plasma membrane Ca^{2+} -pump isoform 4, on coronary artery. *J Cell Mol Med.* 2008; 12(3): 1049-60. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00140.x.
 228. Stokes D.L., Green N.M. Structure and function of the calcium pump. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2003; 32: 445-468.
 229. Xu C., Rice W.J., He W., Stokes D.L. A structural model for the catalytic cycle of Ca^{2+} -ATPase. *J Mol Biol.* 2002; 316(1): 201-211.

230. Xu J., Qian H.X., Hu SP., Liu L.Y., Zhou M., Feng M., Su J., Ji L.D. Gender-Specific Association of ATP2B1 Variants with Susceptibility to Essential Hypertension in the Han Chinese Population. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:1910565. doi: 10.1155/2016/1910565.
231. Gao Y., Tao Y., Chu H., Chen J., Chen Q., Zhou L., Liu Y., Yu Y., Cui Y. Age-related expression of plasma membrane Ca(2+) -ATPase isoform 2 in the cochleas of C57BL/6J mice. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2015; 50(11): 934-8.
232. Padányi R., Pászty K., Hegedűs L., Varga K., Papp B., Penniston J.T., Enyedi Á. Multifaceted plasma membrane Ca(2+) pumps: From structure to intracellular Ca(2+) handling and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1863 (6 Pt B): 1351-63. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.12.011.
233. Smaardijk S., Chen J., Wuytack F., Vangheluwe P. SPCA2 couples Ca²⁺ influx via Orai1 to Ca²⁺ uptake into the Golgi/secretory pathway. *Tissue Cell*. 2017; 49(2 Pt A): 141-149. doi: 10.1016/j.tice.2016.09.004.
234. Di Leva F., Domi T., Fedrizzi L., Lim D., Carafoli E. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 476(1): 65-74. doi: 10.1016/j.abb.2008.02.026.
235. Nitsche J., Josts I., Heidemann J., Mertens H.D., Maric S., Moulin M., Haertlein M., Busch S., Forsyth V.T., Svergun D.I., Uetrecht C., Tidow H. Structural basis for activation of plasma-membrane Ca²⁺-ATPase by calmodulin. *Commun Biol*. 2018; 1: 206. doi: 10.1038/s42003-018-0203-7.
236. Strehler E.E., Filoteo A.G., Penniston J.T., Caride A.J. Plasma-membrane Ca(2+) pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35(Pt 5): 919-922.
237. Bruce J.I.E. Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival. *Cell Calcium*. 2018; 69: 28-36. doi: 10.1016/j.ceca.2017.06.001.
238. Penniston J.T., Padányi R., Pászty K., Varga K., Hegedus L., Enyedi A.

- Apart from its known function, the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase can regulate Ca^{2+} signaling by controlling phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels. *J Cell Sci.* 2014; 127(Pt 1): 72-84. doi: 10.1242/jcs.132548.
239. Dodes Traian M.M., Cattoni D.I., Levi V., González Flecha F.L. A two-stage model for lipid modulation of the activity of integral membrane proteins. *PLoS One.* 2012; 7(6): 39255. doi: 10.1371/journal.pone.0039255.
 240. Bruce J. Plasma membrane calcium pump regulation by metabolic stress. *World J Biol Chem.* 2010; 1(7): 221-8. doi: 10.4331/wjbc.v1.i7.221.
 241. Monteith G.R., Roufogalis B.D. The plasma membrane calcium pump--a physiological perspective on its regulation. *Cell Calcium.* 1995; 18(6): 459-470.
 242. Benetti F., Mičetić I., Carsughi F., Spinozzi F., Bubacco L., Beltramini M. Insights into the oligomerization process of the C-terminal domain of human plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *Arch Biochem Biophys.* 2011; 506(2): 194-200. doi: 10.1016/j.abb.2010.11.017.
 243. Carafoli E., Stauffer T. The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J Neurobiol.* 1994 Mar;25(3):312-24.
 244. Brown C.S., Dean W.L. Regulation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in human platelets by calpain. *Platelets.* 2007; 18(3): 207-11.
 245. Aversa M., Stifanese R., De Tullio R., Passalacqua M., Defranchi E., Salamino F., Melloni E., Pontremoli S. Regulation of calpain activity in rat brain with altered Ca^{2+} homeostasis. *J Biol Chem.* 2007;282(4):2656-2665.
 246. Schuh K., Uldrijan S., Telkamp M., Rothlein N., Neyses L. The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I. *J Cell Biol* 2001; 155: 201-205.
 247. Schuh K., Uldrijan S., Gambaryan S., Roethlein N., Neyses L. Interaction of the plasma membrane Ca^{2+} pump 4b/CI with the Ca^{2+} /calmodulin-dependent membrane-associated kinase CASK. *J Biol Chem* 2003; 278:

9778-9783

248. Williams J.C., Armesilla A.L., Mohamed T.M., Hagarty C.L., Mc-Intyre F.H., Schomburg S., Zaki A.O., Oceandy D., Cartwright E.J., Buch M.H., Emerson M., Neyses L. The sarcolemmal calcium pump, alpha-1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex. *J Biol Chem* 2006; 281: 23341-23348
249. Mohamed T.M., Oceandy D., Prehar S., Alatwi N., Hegab Z., Baudoin F.M., Pickard A., Zaki A.O., Nadif R., Cartwright E.J., Neyses L. Specific role of neuronal nitric-oxide synthase when tethered to the plasma membrane calcium pump in regulating the beta-adrenergic signal in the myocardium. *J Biol Chem.* 2009;284(18):12091-8. doi: 10.1074/jbc.M809112200.
250. Duan W., Zhou J., Li W., Zhou T., Chen Q., Yang F., Wei T. Plasma membrane calcium ATPase 4b inhibits nitric oxide generation through calcium-induced dynamic interaction with neuronal nitric oxide synthase. *Protein Cell.* 2013; 4(4): 286-98. doi: 10.1007/s13238-013-2116-z.
251. Olli K.E., Li K., Galileo D.S., Martin-DeLeon P.A. Plasma membrane calcium ATPase 4 (PMCA4) co-ordinates calcium and nitric oxide signaling in regulating murine sperm functional activity. *J Cell Physiol.* 2018; 233(1): 11-22. doi: 10.1002/jcp.25882.
252. Linde C.I., Di Leva F., Domi T., Tosatto S.C., Brini M., Carafoli E. Inhibitory interaction of the 14-3-3 proteins with ubiquitous (PMCA1) and tissue-specific (PMCA3) isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *Cell Calcium.* 2008; 43(6): 550-561.
253. Rimessi A., Coletto L., Pinton P., Rizzuto R., Brini M., Carafoli E. Inhibitory interaction of the 14-3-3{epsilon} protein with isoform 4 of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase pump. *J Biol Chem.* 2005; 280(44): 37195-37203.
254. Oceandy D., Cartwright E.J., Emerson M., Prehar S., Baudoin F.M., Zi M.,

- Alatwi N., Venetucci L., Schuh K., Williams J.C., Armesilla A.L., Armesilla L.N. Neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart is regulated by the sarcolemmal calcium pump 4b. *Circulation*. 2007; 115: 483–492.
255. Strehler E.E. Plasma Membrane Calcium ATPases as Novel Candidates for Therapeutic Agent Development. *J Pharm Pharm Sci*. 2013; 16(2): 190–206.
 256. Busija A.R., Patel H.H., Insel P.A. Caveolins and cavins in the trafficking, maturation, and degradation of caveolae: implications for cell physiology. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017; 312(4): C459-C477. doi: 10.1152/ajpcell.00355.2016.
 257. Holton M.L., Wang W., Emerson M., Neyses L., Armesilla A.L. Plasma membrane calcium ATPase proteins as novel regulators of signal transduction pathways. *World J Biol Chem*. 2010; 1(6): 201-208. doi: 10.4331/wjbc.v1.i6.201.
 258. Cartwright E.J., Oceandy D., Neyses L. Plasma membrane calcium ATPase and its relationship to nitric oxide signaling in the heart. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1099: 247-253.
 259. Lavorato M., Huang T.Q., Iyer V.R., Perni S., Meissner G., Franzini-Armstrong C. Dyad content is reduced in cardiac myocytes of mice with impaired calmodulin regulation of RyR2. *J Muscle Res Cell Motil*. 2015; 36(2): 205-14. doi: 10.1007/s10974-015-9405-5.
 260. Mohamed T.M., Oceandy D., Zi M., Prehar S., Alatwi N., Wang Y., Shaheen M.A., Abou-Leisa R., Schelcher C., Hegab Z., Baudoin F., Emerson M., Mamas M., Di Benedetto G., Zaccolo M., Lei M., Cartwright E.J., Neyses L. Plasma membrane calcium pump (PMCA4)-neuronal nitric-oxide synthase complex regulates cardiac contractility through modulation of a compartmentalized cyclic nucleotide microdomain. *J Biol Chem*. 2011 Dec 2;286(48):41520-9. doi: 10.1074/jbc.M111.290411.

261. Mohamed T.M., Oceandy D., Prehar S., Alatwi N., Hegab Z., Baudoin F.M., Pickard A., Zaki A.O., Nadif R., Cartwright E.J., Neyses L. Specific role of neuronal nitric-oxide synthase when tethered to the plasma membrane calcium pump in regulating the beta-adrenergic signal in the myocardium. *J Biol Chem.* 2009 May 1;284(18):12091-8. doi: 10.1074/jbc.M809112200.
262. Zhang Y.H. Neuronal nitric oxide synthase in hypertension - an update. *Clin Hypertens.* 2016; 22: 20. eCollection 2016.
263. Missiaen L., Kanmura Y., Wuytack F., Casteels R. Carbachol partially inhibits the plasma-membrane Ca^{2+} -pump in microsomes from pig stomach smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 150(2): 681-686.
264. Magocsi M., Penniston J.T. Oxytocin pretreatment of pregnant rat uterus inhibits Ca^{2+} uptake in plasma membrane and sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1063(1): 7-14.
265. Popescu L.M., Nutu O., Panoiu C. Oxytocin contracts the human uterus at term by inhibiting the myometrial Ca^{2+} -extrusion pump. *Biosci Rep.* 1985; 5(1): 21-28.
266. Soloff M.S., Sweet P. Oxytocin inhibition of $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase activity in rat myometrial plasma membranes. *J Biol Chem.* 1982; 257(18): 10687-10693.
267. Prasad V., Okunade G., Liu L., Paul R.J., Shull G.E. Distinct phenotypes among plasma membrane Ca^{2+} -ATPase knockout mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1099: 276-286.
268. Pande J., Grover A.K. Plasma membrane calcium pumps in smooth muscle: from fictional molecules to novel inhibitors. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005; 83(8-9): 743-754.
269. Khan I., Grover A.K. Expression of cyclic-nucleotide-sensitive and -insensitive isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} pump in smooth muscle and other tissues. *Biochem J.* 1991; 277 (Pt 2): 345-349.

270. De Jaegere S., Wuytack F., Eggermont J.A., Verboomen H., Casteels R. Molecular cloning and sequencing of the plasma-membrane Ca^{2+} pump of pig smooth muscle. *Biochem J.* 1990; 271(3): 655-660.
271. Ishida Y., Paul R.J. Ca^{2+} clearance in smooth muscle: lessons from gene-altered mice. *J Smooth Muscle Res.* 2005; 41(5): 235-245.
272. Liu L., Ishida Y., Okunade G., Shull G.E., Paul R.J. Role of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in contraction-relaxation processes of the bladder: evidence from PMCA gene-ablated mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 290(4): C1239-C1247.
273. Liu L., Ishida Y., Okunade G., Pyne-Geithman G.J., Shull G.E., Paul R.J. Distinct roles of PMCA isoforms in Ca^{2+} homeostasis of bladder smooth muscle: evidence from PMCA gene-ablated mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(1): C423-C431.
274. Sanborn B.M. Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometrial calcium dynamics. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; 18(3): 305–314.
275. Kim Hoe-Jin, Geun-Shik Lee, Youn-Kyu Ji, Kyung-Chul Choi, Eui-Bae Jeung Differential expression of uterine calcium transporter 1 and plasma membrane Ca^{2+} ATPase 1b during rat estrous cycle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E234–E241, 2006; doi:10.1152/ajpendo.00434.2005.
276. Sanborn B.M. Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometrial calcium dynamics. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; 18(3): 305–314.
277. Shmigol A., Eisner D., Wray S. Properties of voltage-activated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. *J Physiol* 1998;511:803–811.
278. Matthew A., Kupittayanant S., Burdyga T., Wray S. Characterization of contractile activity and intracellular Ca^{2+} signalling in mouse myometrium.

- J Soc Gynecol Investig 2004; 11:207–212.
279. Shimizu H., Borin M.L., Blaustein M.P. Use of La^{3+} to distinguish activity of the plasmalemmal Ca^{2+} pump from $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange in arterial myocytes. *Cell Calcium*. 1997 Jan;21(1):31-41.
 280. Furukawa K., Tawada Y., Shigekawa M. Regulation of the plasma membrane Ca^{2+} pump by cyclic nucleotides in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1988; 263(17): 8058-8065.
 281. Luo D., Nakazawa M., Yoshida Y., Cai J., Imai S. Effects of three different $\text{Ca}(2+)$ pump ATPase inhibitors on evoked contractions in rabbit aorta and activities of $\text{Ca}(2+)$ pump ATPases in porcine aorta. *Gen Pharmacol*. 2000; 34(3): 211-220.
 282. Carrera F., Proverbio T., Marín R., Proverbio F. Ca-ATPase of human myometrium plasma membranes. *Physiol Res*. 2000; 49(3): 331-338.
 283. Gatto C., Hale C.C., Xu W., Milanick M.A. Eosin, a potent inhibitor of the plasma membrane Ca pump, does not inhibit the cardiac Na-Ca exchanger. *Biochemistry*. 1995; 34(3): 965-972.
 284. Slinchenko N.N., Bratkova N.F., Kosterin S.A., Zimina V.P., Chernysh I.G. Effects of eosin Y on the catalytic and functional activities of Mg^{2+} , ATP-dependent calcium pump of smooth muscle cell plasma membrane. *Biochemistry (Mosc)*. 1998; 63(6): 685-690.
 285. Ogan J.T., Reifenberger M.S., Milanick M.A., Gatto C. Kinetic characterization of Na,K-ATPase inhibition by Eosin. *Blood Cells Mol Dis*. 2007; 38(3): 229-237.
 286. Griff E.R., Kleene N.K., Kleene S.J. A selective PMCA inhibitor does not prolong the electroolfactogram in mouse. *PLoS One*. 2012; 7(5): e37148. doi: 10.1371/journal.pone.0037148.
 287. Pande J., Szewczyk M.M., Grover A.K. Allosteric inhibitors of plasma membrane Ca pumps: Invention and applications of caloxins. *World J Biol Chem*. 2011; 2(3): 39-47. doi: 10.4331/wjbc.v2.i3.39.

289. Chen Y.F., Cao J., Zhong J.N., Chen X., Cheng M., Yang J., Gao Y.D. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase regulates Ca^{2+} signaling and the proliferation of airway smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740: 733-741. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.05.055.
290. El-Yazbi A.F., Cho W.J., Schulz R., Daniel E.E. Calcium extrusion by plasma membrane calcium pump is impaired in caveolin-1 knockout mouse small intestine. *Eur J Pharmacol.* 2008; 591(1-3): 80-87. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.06.098.
291. Veklich T. A., Shkrabak A. A., Slinchenko N. N., Mazur I. I., Rodik R. V., Boyko V. I., Kalchenko V. I., Kosterin S. A. Calix[4]arene C-90 Selectively Inhibits Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of Myometrium Cell Plasma Membrane. *Biokhimiya*, 2014, Vol. 79, No. 5, pp. 532-540.
292. Veklich T.O., Shkrabak O.A., Mazur Iu.Iu., Rodik R.V., Kal'chenko V.I., Kosterin S.O. Kinetics of inhibitory effect of calix[4]arene C-90 on activity of transporting plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of smooth muscle cells. *Ukr Biochem J.* 2014; 86(5): 37-46.
293. Veklich T.O., Shkrabak O.A., Mazur Iu.Iu., Rodik R.V., Boïko V.I., Kal'chenko V.I., Kosterin S.O. Kinetic properties of calixarene C-90 action on the myometrial plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity and on the Ca^{2+} concentration in unexcited cells of the myometrium. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2013; 85(4): 20-29.
294. Labyntseva R.D., Bevza O.V., Lytvyn K.V., Borovyk M.O., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-90 and its analogs activate ATPase of the myometrium myosin subfragment-1. *Ukr Biochem J.* 2016; 88(5): 48-61. doi: 10.15407/ubj88.05.048.
295. Berwick Z.C., Dick G.M., O'Leary H.A., Bender S.B., Goodwill A.G., Moberly S.P., Owen M.K., Miller S.J., Obukhov A.G., Tune J.D. Contribution of electromechanical coupling between Kv and Ca v1.2 channels to coronary dysfunction in obesity. *Basic Res Cardiol.* 2013

- Sep;108(5):370. doi: 10.1007/s00395-013-0370-0.
296. Du P., O'Grady G., Gao J., Sathar S., Cheng L.K. Toward the virtual stomach: progress in multiscale modeling of gastric electrophysiology and motility. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2013; 5(4): 481-93. doi: 10.1002/wsbm.1218.
 297. Howitt L., Chaston D.J., Sandow S.L., Matthaei K.I., Edwards F.R., Hill C.E. Spreading vasodilatation in the murine microcirculation: attenuation by oxidative stress-induced change in electromechanical coupling. *J Physiol*. 2013; 591(8): 2157-2173. doi: 10.1113/jphysiol.2013.250928.
 298. Du P., Poh Y.C., Lim J.L., Gajendiran V., O'Grady G., Buist M.L., Pullan A.J., Cheng L.K. A preliminary model of gastrointestinal electromechanical coupling. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2011 Dec;58(12):3491-5. doi: 10.1109/TBME.2011.2166155.
 299. Shabir S., Borisova L., Wray S., Burdyga T. Rho-kinase inhibition and electromechanical coupling in rat and guinea-pig ureter smooth muscle: Ca^{2+} -dependent and -independent mechanisms. *J Physiol*. 2004; 560(Pt 3): 839-855.
 300. Ratz P.H., Berg K.M., Urban N.H., Miner A.S. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol*. 2005; 288:C769–C783.
 301. Lamounier-Zepter V., Baltas L.G., Morano I. Distinct contractile systems for electromechanical and pharmacomechanical coupling in smooth muscle. *Adv Exp Med Biol*. 2003;538:417-425.
 302. Welsh D.G., Jackson W.F., Segal S.S. Oxygen induces electromechanical coupling in arteriolar smooth muscle cells: a role for L-type Ca^{2+} channels. *Am J Physiol*. 1998;274(6 Pt 2): H2018-H2024.
 303. Chen X.L., Rembold C.M. Phenylephrine contracts rat tail artery by one electromechanical and three pharmacomechanical mechanisms. *Am J Physiol*. 1995; 268 (1 Pt 2): H74-H81.

304. Maggi C.A., Giuliani S., Santicoli P. Effect of the Ca(2+)-ATPase inhibitor, cyclopiazonic acid, on electromechanical coupling in the guinea-pig ureter. *Br J Pharmacol.* 1995; 114(1): 127-137.
305. Povstyan O.V., Harhun M.I., Gordienko D.V. Ca²⁺ entry following P2X receptor activation induces IP3 receptor-mediated Ca²⁺ release in myocytes from small renal arteries. *Br J Pharmacol.* 2011; 162(7): 1618-1638. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01169.x.
306. Tao L., Huang Y., Bourreau J.P. Control of the mode of excitation-contraction coupling by Ca(2+) stores in bovine trachealis muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279(4): L722-L732.
307. Somlyo A.P., Wu X., Walker L.A., Somlyo A.V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1999; 134: 201-234.
308. Somlyo A.P., Somlyo A.V. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta Physiol Scand.* 1998; 164(4): 437-448.
309. Blanks A.M., Shmygol A., Thornton S. Preterm labour. Myometrial function in prematurity. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007; 21(5): 807-819.
310. Mahavadi S., Nalli A.D., Wang H., Kendig D.M., Crowe M.S., Lyall V., Grider J.R., Murthy K.S. Regulation of gastric smooth muscle contraction via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent actin polymerization. *PLoS One.* 2018 Dec 20;13(12):e0209359. doi: 10.1371/journal.pone.0209359.
311. Domokos D., Ducza E., Falkay G., Gaspar R. Alteration in expressions of RhoA and Rho-kinases during pregnancy in rats: their roles in uterine contractions and onset of labour. *J Physiol Pharmacol.* 2017; 68(3): 439-451.
312. Mahavadi S., Sriwai W., Manion O., Grider J.R., Murthy K.S. Diabetes-induced oxidative stress mediates upregulation of RhoA/Rho kinase

- pathway and hypercontractility of gastric smooth muscle. *PLoS One*. 2017; 12(7): e0178574. doi: 10.1371/journal.pone.0178574.
313. Im Y.J., Lee J.K., Lee S.H., Oh S.J., Park K. Developmental changes in contractile responses to cholinergic stimuli: role of calcium sensitization and related pathways. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017 Aug 1;313(2):F370-F377. doi: 10.1152/ajprenal.00597.2016.
 314. Al-Shboul O. The role of the RhoA/ROCK pathway in gender-dependent differences in gastric smooth muscle contraction. *J Physiol Sci*. 2016; 66(1): 85-92. doi: 10.1007/s12576-015-0400-9.
 315. Ruggieri M.R., Braverman A.S. Gastric body cholinergic contractile signal transduction in M2 and M3 receptor knockout mice. *J Recept Signal Transduct Res*. 2013; 33(4): 249-254. doi: 10.3109/10799893.2013.802803.
 316. Büyükaşar K., Levent A. Involvement of Rho/Rho-kinase signalling in the contractile activity and acetylcholine release in the mouse gastric fundus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 303(3): 777-781.
 317. Bhetwal B.P., Sanders K.M., An C., Trapanese D.M., Moreland R.S., Perrino B.A. Ca^{2+} sensitization pathways accessed by cholinergic neurotransmission in the murine gastric fundus. *J Physiol*. 2013; 591(12): 2971-2986. doi: 10.1113/jphysiol.2013.255745.
 318. Hussain M.A., Ashraf M.U., Muhammad G., Tahir M.N., Bukhari S.N.A. Calixarene: A Versatile Material for Drug Design and Applications. *Curr Pharm Des*. 2017; 23(16): 2377-2388. doi: 10.2174/1381612822666160928143328.
 319. Gangemi C.M.A., Puglisi R., Pappalardo A., Trusso Sfrassetto G. Supramolecular complexes for nanomedicine. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018; 28(20): 3290-3301. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.09.015.
 320. Buttress J.P., Day D.P., Courtney J.M., Lawrence E.J., Hughes D.L., Blagg R.J., Crossley A., Matthews S.E., Redshaw C4., Bulman Page P.C., Wildgoose G.G. "Janus" Calixarenes: Double-Sided Molecular Linkers for

- Facile, Multianchor Point, Multifunctional, Surface Modification. *Langmuir*. 2016; 32(31): 7806-7813. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b02222.
321. Nasuhi Pur F. Calixdrugs: calixarene-based clusters of established therapeutic drug agents. *Mol Divers*. 2016; 20(3): 781-787. doi: 10.1007/s11030-016-9667-x.
 322. Baldini L., Casnati A., Sansone F., Ungaro R. Calixarene-based multivalent ligands. *Chem Soc Rev*. 2007; 36(2): 254-266.
 323. de Fátima A., Fernandes S.A., Sabino A.A. Calixarenes as new platforms for drug design. *Curr Drug Discov Technol*. 2009; 6(2): 151-170.
 324. Baldini L., Casnati A., Sansone F., Ungaro R. Calixarene-based multivalent ligands. *Chem Soc Rev*. 2007; 36(2): 254-266.
 325. Rodik R.V., Klymchenko A.S., Jain N., Miroshnichenko S.I., Richert L., Kalchenko V.I., Mély Y. Virus-sized DNA nanoparticles for gene delivery based on micelles of cationic calixarenes. *Chemistry*. 2011; 17(20): 5526-38.
 326. Giuliani M., Morbioli I., Sansone F., Casnati A. Moulding calixarenes for biomacromolecule targeting. *Chem. Commun.*, 2015, DOI: 10.1039/C5CC05204A.
 327. Хіральні каліксарени / В. І. Бойко, В. І. Кальченко, О. А. Єсипенко. – К.: Компринт, 2013. – 200 с.
 328. Zhou X., Pathak P., Jayawickramarajah J. Design, synthesis, and applications of DNA-macrocyclic host conjugates. *Chem Commun (Camb)*. 2018 Oct 16;54(83):11668-11680. doi: 10.1039/c8cc06716c.
 329. An L., Wang J.W., Liu J.D., Zhao Z.M., Song Y.J. Design, Preparation, and Characterization of Novel Calix[4]arene Bioactive Carrier for Antitumor Drug Delivery. *Front Chem*. 2019; 7:732. doi: 10.3389/fchem.2019.00732.
 330. Mo J., Eggers P.K., Yuan Z.X., Raston C.L., Lim L.Y. Paclitaxel-loaded phosphonated calixarene nanovesicles as a modular drug delivery platform. *Sci Rep*. 2016; 6: 23489. doi: 10.1038/srep23489.

331. Mehta V., Athar M., Jha P.C., Panchal M., Modi K., Jain V.K. Efficiently functionalized oxacalix[4]arenes: Synthesis, characterization and exploration of their biological profile as novel HDAC inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016; 26(3): 1005-1010. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.12.044.
332. Nasuhi Pur F., Akbari Dilmaghani K. Calixtyrosol: a Novel Calixarene Based Potent Radical Scavenger. *Iran J Pharm Res.* 2015; 14(4): 1181-1187.
333. A simple and rapid method for calixarene-based selective extraction of bioactive molecules from natural products. *Amino Acids.* 2016; 48(3): 849-858. doi: 10.1007/s00726-015-2132-9.
334. Rodell C.B., Mealy J.E., Burdick JA. Supramolecular Guest-Host Interactions for the Preparation of Biomedical Materials. *Bioconj Chem.* 2015; 26(12): 2279-2289. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00483.
335. Adhikari B.B., Roshandel S., Fujii A., Schramm M.P. Calixarene-Mediated Liquid Membrane Transport of Choline Conjugates 2: Transport of Drug-Choline Conjugates and Neurotransmitters. *European J Org Chem.* 2015; 2015 (12): 2683-2690.
336. Yousaf A., Hamid S.A., Bunnori N.M., Ishola A.A. Applications of calixarenes in cancer chemotherapy: facts and perspectives. *Drug Des Devel Ther.*; 9: 2831-2838. doi: 10.2147/DDDT.S83213.
337. da Silva D.L., Silva Terra B., Ribeiro Lage M., Ruiz A.L., Capeletti da Silva C., de Carvalho J.E., Walkimar de Mesquita Carneiro J., Terra Martins F., Fernades S.A., de Fátima Â. Xanthenones: calixarenes-catalyzed syntheses, anticancer activity and QSAR studies. *Org Biomol Chem.* 2015; 13(11): 3280-3287. doi: 10.1039/c4ob02611j.
338. Tauran Y., Anjard C., Kim B., Rhimi M., Coleman A.W. Large negatively charged organic host molecules as inhibitors of endonuclease enzymes. *Chem Commun (Camb).* 2014; 50(77): 11404-11406. doi: 10.1039/c4cc04805a.

339. Guo D.S., Liu Y. Supramolecular chemistry of p-sulfonatocalix[n]arenes and its biological applications. *Acc Chem Res.* 2014; 47(7): 1925-1934. doi: 10.1021/ar500009g.
340. Mokhtari B., Pourabdollah K. Applications of nano-baskets in drug development: high solubility and low toxicity. *Drug Chem Toxicol.* 2013; 36(1): 119-132. doi: 10.3109/01480545.2011.653490.
341. Sharma N., Ojha H., Pathak D.P., Goel R., Sharma R.K. Ex-vivo complexation, skin permeation, interaction and cytodermal toxicity studies of p-tertbutylcalix[4]arene nanoemulsion for radiation decontamination. *Life Sci.* 2017; 168: 65-76. doi: 10.1016/j.lfs.2016.11.007.
342. Dings R.P.M., Miller M.C., Nesmelova I., Astorgues-Xerri L., Kumar N., Serova M., Chen X., Raymond E., Hoye T.R., Mayo K.H. Anti-tumor agent calixarene 0118 targets human galectin-1 as an allosteric inhibitor of carbohydrate binding. *J Med Chem.* 2012; 55(11): 5121–5129. doi: 10.1021/jm300014q
343. Pur F.N., Dilmaghani K.A. Calixplatin: novel potential anticancer agent based on the platinum complex with functionalized calixarene. *Journal of Coordination Chemistry* V.67, 2014 - Issue 3 - P. 440-448
344. Nasuhi Pur F. Calixdrugs: calixarene-based clusters of established therapeutic drug agents. *Mol Divers.* 2016; 20(3): 781-787. doi: 10.1007/s11030-016-9667-x.
345. Trush V.V., Cherenok S.O., Tanchuk V.Y., Kukhar V.P., Kalchenko V.I., Vovk A.I. Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013; 23(20): 5619-5623. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.08.040.
346. Gupta R., Xie H. Nanoparticles in Daily Life: Applications, Toxicity and Regulations. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2018; 37(3): 209-230. doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2018026009.
347. Chun S.H., Yuk J.S., Um S.H. Regulation of cellular gene expression by

- nanomaterials. *Nano Converg.* 2018; 5(1): 34. doi: 10.1186/s40580-018-0166-x.
348. Bakand S., Hayes A. Toxicological Considerations, Toxicity Assessment, and Risk Management of Inhaled Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(6). pii: E929. doi: 10.3390/ijms17060929.
 349. Kumar V., Kumari A., Guleria P., Yadav S.K. Evaluating the toxicity of selected types of nanochemicals. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2012; 215: 39-121. doi: 10.1007/978-1-4614-1463-6_2.
 350. Zhang Y. Cell toxicity mechanism and biomarker. *Clin Transl Med.* 2018; 7(1): 34. doi: 10.1186/s40169-018-0212-7.
 351. Souza, W., Piperni, S.G., Laviola, P. et al. The two faces of titanium dioxide nanoparticles bio-camouflage in 3D bone spheroids. *Sci Rep* 9, 9309 (2019) doi:10.1038/s41598-019-45797-6
 352. Grande F., Tucci P. Titanium Dioxide Nanoparticles: a Risk for Human Health? *Mini Rev Med Chem.* 2016;16(9):762-9.
 353. Schulte P., Leso V., Niang M., Iavicoli I. Biological monitoring of workers exposed to engineered nanomaterials. *Toxicol Lett.* 2018 Dec 1;298:112-124. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.06.003.
 354. Hou J., Wang L., Wang C., Zhang S., Liu H., Li S., Wang X. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *J Environ Sci (China).* 2019 Jan;75:40-53. doi: 10.1016/j.jes.2018.06.010.
 355. McClements D.J., Xiao H., Demokritou P. Physicochemical and colloidal aspects of food matrix effects on gastrointestinal fate of ingested inorganic nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017; 246: 165-180. doi: 10.1016/j.cis.2017.05.010.
 356. Xu F. Review of analytical studies on TiO₂ nanoparticles and particle aggregation, coagulation, flocculation, sedimentation, stabilization. *Chemosphere.* 2018; 212: 662-677.
 357. Ribeiro A.R., Gemini-Piperni S., Travassos R., Lemgruber L., Silva R.C.,

- Rossi A.L., Farina M., Anselme K., Shokuhfar T., Shahbazian-Yassar R., Borojevic R., Rocha L.A., Werckmann J., Granjeiro J.M. Trojan-Like Internalization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles by Human Osteoblast Cells. *Sci Rep.* 2016; 6: 23615. doi: 10.1038/srep23615.
358. De Matteis V., Cascione M., Brunetti V., Toma C.C., Rinaldi R. Toxicity assessment of anatase and rutile titanium dioxide nanoparticles: The role of degradation in different pH conditions and light exposure. *Toxicol In Vitro.* 2016; 37: 201-210. doi: 10.1016/j.tiv.2016.09.010.
359. Uboldi C., Urbán P., Gilliland D., Bajak E., Valsami-Jones E., Ponti J., Rossi F. Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Toxicol In Vitro.* 2016; 31: 137-145. doi: 10.1016/j.tiv.2015.11.005.
360. Dréno B., Alexis A., Chubierre B., Marinovich M. Safety of titanium dioxide nanoparticles in cosmetics. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019 Nov;33 Suppl 7:34-46.
361. Proquin H., Rodríguez-Ibarra C., Moonen C.G., Urrutia Ortega I.M., Briedé J.J., de Kok T.M., van Loveren H., Chirino Y.I. Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis.* 2017 Jan;32(1):139-149.
362. Khalili Fard J., Jafari S., Eghbal M.A. A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Adv Pharm Bull.* 2015; 5(4): 447-454. doi: 10.15171/apb.2015.061.
363. Fadeel B., Garcia-Bennett A.E. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010 Mar 8;62(3):362-74.
364. Guo Z., Martucci N.J., Moreno-Olivas F., Tako E., Mahler G.J. Titanium Dioxide Nanoparticle Ingestion Alters Nutrient Absorption in an In Vitro Model of the Small Intestine. *NanoImpact.* 2017 Jan;5:70-82. doi: 10.1016/j.impact.2017.01.002.

365. Weir A., Westerhoff P., Fabricius L., Hristovski K., von Goetz N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol* 2012, 46:2242–2250.
366. Powell J.J., Faria N., Thomas-McKay E., Pele L.C. Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *J. Autoimmun.* 2010 , 34 , J226 – J233.
367. Moyes S.M., Smyth S.H., Shipman A., Long S., Morris J.F., Carr K.E. Parameters influencing intestinal epithelial permeability and microparticle uptake in vitro. *Int J Pharm* 2007;337(1e2):133e41.
368. Bettini, S., Boutet-Robinet E., Cartier C., Coméra C., Gaultier E., Dupuy J., Naud N., Taché S., Grysan P., Reguer S., Thieriet N., Réfrégiers M., Thiaudière D., Cravedi J.P., Carrière M., Audinot J.N., Pierre F.H., Guzylack-Piriou L., Houdeau E. Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci. Rep.* 2017; 7, 40373; doi: 10.1038/srep40373.
369. Hummel, T. Z., Kindermann, A., Stokkers, P. C., Benninga, M. A. & ten Kate, F. J. Exogenous pigment in Peyer patches of children suspected of having IBD. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 58, 477–480.
370. Thoree V., Skepper J., Deere H., Pele L.C., Thompson R.P., Powell J.J. Phenotype of exogenous microparticle-containing pigment cells of the human Peyer's patch in inflamed and normal ileum. *Inflamm. Res.* 2008, 57, 374-378.
371. Cai K, Hou Y, Hu Y, et al. Correlation of the cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles with different particle sizes on a sub-200-nm scale. *Small.* 2011;7:3026–3031.
372. Huerta-García E., Márquez-Ramírez S.G., Ramos-Godinez Mdel P., López-Saavedra A., Herrera L.A., Parra A., Alfaro-Moreno E., Gómez E.O., López-Marure R. Internalization of titanium dioxide nanoparticles by glial

- cells is given at short times and is mainly mediated by actin reorganization-dependent endocytosis. *Neurotoxicology*. 2015; 51: 27-37. doi: 10.1016/j.neuro.2015.08.013.
373. Jagessar A., Mathew A., Tesfamichael T., Wang H., Yan C., Yarlagadda P.K. Bacteria Death and Osteoblast Metabolic Activity Correlated to Hydrothermally Synthesised TiO₂ Surface Properties. *Molecules*. 2019 Mar 27;24(7). pii: E1201. doi: 10.3390/molecules24071201.
 374. Ribeiro A.R., Gemini-Piperni S., Travassos R., Lemgruber L., Silva R.C., Rossi A.L., Farina M., Anselme K. , Shokuhfar T., Shahbazian-Yassar R., Borojevic R., Rocha L.A., Werckmann J1., Granjeiro J.M. Trojan-Like Internalization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles by Human Osteoblast Cells. *Sci Rep*. 2016; 6: 23615. doi: 10.1038/srep23615.
 375. Gurr JR1, Wang AS, Chen CH, Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*. 2005 Sep 15;213(1-2):66-73.
 376. Wu T., Tang M. The inflammatory response to silver and titanium dioxide nanoparticles in the central nervous system. *Nanomedicine (Lond)*. 2018; 13(2): 233-249. doi: 10.2217/nnm-2017-0270.
 377. Tsugita M., Morimoto N., Nakayama M. SiO₂ and TiO₂ nanoparticles synergistically trigger macrophage inflammatory responses. *Part Fibre Toxicol*. 2017; 14(1): 11. doi: 10.1186/s12989-017-0192-6.
 378. Valeria De Mattei Exposure to Inorganic Nanoparticles: Routes of Entry, Immune Response, Biodistribution and In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation. *Toxics*, 2017, 5, 29; doi:10.3390/toxics5040029
 379. Nogueira C.M., Walter Mendes de Azevedo, Maria Lucia Zaidan Dagli, Sérgio Hiroshi Toma, André Zonetti de Arruda Leite, Maria Laura Lordello, Iêda Nishitokukado, Carmen Lúcia Ortiz-Agostinho, Maria Irma Seixas Duarte, Marcelo Alves Ferreira, Aytan Miranda Sipahi Titanium dioxide induced inflammation in the small intestine. *World J Gastroenterol* 2012;

- 18(34): 4729-4735.
380. Bettini, S. et al. Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci. Rep.* 2017; 7, 40373; doi: 10.1038/srep40373.
 381. De Matteis V., Cascione M., Brunetti V., Toma C.C., Rinaldi R. Toxicity assessment of anatase and rutile titanium dioxide nanoparticles: The role of degradation in different pH conditions and light exposure, (2016), doi: 10.1016/j.tiv.2016.09.010
 382. Ruskiewicz J.A., Pinkas A., Ferrea B., Peres T. V., Tsatsakis A., Aschner M. Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review. *Toxicology Reports* 4 (2017) 245–259.
 383. Jensen D.M., Christophersen D.V., Sheykhzade M., Skovsted G.F., Lykkesfeldt J., Münter R., Roursgaard M., Loft S., Møller P. Vasomotor function in rat arteries after ex vivo and intragastric exposure to food-grade titanium dioxide and vegetable carbon particles. *Part Fibre Toxicol.* 2018; 15(1): 12. doi: 10.1186/s12989-018-0248-2.
 384. Hou J., Wang L., Wang C., Zhang S., Liu H., Li S., Wang X. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *J Environ Sci (China)*. 2019; 75: 40-53.
 385. Abukabda A.B., Stapleton P.A., Nurkiewicz T.R. Metal Nanomaterial Toxicity Variations Within the Vascular System. *Curr Environ Health Rep.* 2016; 3(4): 379–391. doi:10.1007/s40572-016-0112-1.
 386. Stapleton P.A., McBride C.R., Yi J. Uterine microvascular sensitivity to nanomaterial inhalation: An in vivo assessment. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015; 288(3):420–428.
 387. Maurer M. M., Donohoe G. C., Maleki H., Yi J., McBride C., Nurkiewicz T R., Valentine S.J. Comparative plasma proteomic studies of pulmonary TiO₂ nanoparticle exposure in rats using liquid chromatography tandem

- mass spectrometry. *J Proteomics*. 2016; 130: 85–93. doi:10.1016/j.jprot.2015.09.010.
388. Ze Y., Hu R., Wang X., Sang X., Ze X., Li B., Su J., Wang Y., Guan N., Zhao X., Gui S., Zhu L., Cheng Z., Cheng J., Sheng L., Sun Q., Wang L., Hong F. Neurotoxicity and gene-expressed profile in brain-injured mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles, *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2014; 102: 470–478.
 389. Wang Y., Chen Z., Ba T., Pu J., Chen T., Song Y., Gu Y., Qian Q., Xu Y., Xiang K., Wang H., Jia G. Susceptibility of young and adult rats to the oral toxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Small*, 2013; 9(9-10): 1742-1752.
 390. Ren Y., Huang R., Lu Z. Ouabain at pathological concentrations might induce damage in human vascular endothelial cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2006; 27 (2): 165–172.
 391. Song C. S., Rubin W., Rifkind A. B., Kappas A. Plasma membranes of the rat liver. Isolation and enzymatic characterization of a fraction rich in bile canaliculi. *J. Cell Biology*. 1969; 41: 124 – 132.
 392. Данилова В.М., Трегубов В.С. Сравнительное изучение структурно-функциональных свойств миозина скелетных и гладких мышц млекопитающих. *Мол. Генет. Биофиз.*, 1988;13: 88-95.
 393. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951; 93: 265-275.
 394. Rathbun W.B., Betlach M.V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem*. 1969; 28 (1): 436-445.
 395. Nasibyan L.S., Filippov I.B. Modulation of rat myometrium contractions via *Staphylococcus aureus* cell wall peptidoglycan. *Physiol Journal*, 2014; 60: 62–72.
 396. Rothhammer A., Schmidt E., Bruch H.P., Weis K.H., Gaertner T. Spontaneous motility of the human taenia coli under morphine, thiopental

- and dehydrobenzperidol Anaesthesist. 1983; 32(3): 111-116.
397. Rothhammer A., Weis K.H., Skrobek W., Schmidt E., Bruch P., Trenkel K. Halothane and spontaneous motility of human taenia libera in vitro. Anaesthesist. 1981; 30(9): 472-475.
 398. Burdyga Th.V., Kosterin S.A. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. Gen Physiol Biophys, 1991; 10(6): 589–598.
 399. Онуфрийчук О.В., Цимбалюк О.В., Мірошніченко М.С., Костерін С.О. Механокінетика “скорочення-розслаблення” кільцевого м’язу сліпої кишки (саесум) щурів. Фізика живого, 2006; 14 (3): 63-75
 400. Цимбалюк О.В., Онуфрийчук О.В., Векліч Т.О., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу оуабаїну і каліксарен біс-гідроксиметилфос-фонової кислоти на активність Na^+/K^+ -АТФази на міханокінетику процесу “скорочення-розслаблення” гладенького м’язу. Фізика живого. 2006; 14 (1): 53-72.
 401. Qazi Mohd. S. J. Elucidation of Mechanism of Carcinogenesis by Environmental Carcinogens and their Prevention by Nanoparticles: an In Silico study Lucknow, India: Integral University. 2014. 190 p.
 402. Fahmi A., Minot C., Silvi B., Cause M. Theoretical analysis of the structure of titanium dioxide crystals. Physical Review B . 1993; 47(18): 11717 – 11724.
 403. Jacimovic J., Vaju C., Gaal R., Magrez A., Berger H., Forro L. High-pressure study of anatase TiO_2 . Materials. 2010; 3: 1509 – 1514.
 404. Прилуцький Ю.І., Ільченко О.В., Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Статистичні методи в біології, підручник / Наукова думка, 2017, 216 с.
 405. Gregersen H., Christensen J. Gastrointestinal tone. Neurogastroenterol. Mot. 2000; 12: 501-508.
 406. Gregersen H., Kassab G. Biomechanics of the gastrointestinal tract. Neurogastroenterol. Mot. 1996; 8: 277-297.
 407. Meiss R.A. Mechanics of smooth muscle. Advances in Organ Biology.

- 2000; 8: 1-48.
408. Bharucha A.E., Hubmayr R.D., Ferber I.J., Zinsmeister A.R. Viscoelastic properties of the human colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 2001; 281: G459–G466.
 409. Ford M.J., Camilleri M., Wiste J.A., Hanson R.B. Differences in colonic tone and phasic response to a meal in the transverse and sigmoid human colon. *Gut.* 1995; 37: 264–269.
 410. Américo M.F, Ietsugu M.V., Romeiro F.G., Corá L.A., Oliveira R.B. Effects of meal size and proximal-distal segmentation on gastric activity // *World. J. Gastroenterol.* 2010; 16(46): 5861-5868.
 411. Bennett A.F. Thermal dependence of muscle function. *Am. J. Physiol.* 1984; 247: R217-R229.
 412. Yamakawa M., Harris D.E., Fay F.S., Warshaw D. Mechanical Transients of Single Toad Stomach Smooth Muscle Cells. Effects of Lowering Temperature and Extracellular Calcium. *J. Gen. Physiol.* 1990; 95: 697-715.
 413. Burdyga Th.V., Wray S. On the Mechanisms Whereby Temperature Affects Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle. *J. Gen. Physiol.* 2002; 119: 93-104.
 414. Quigley E.M. What we have learned about colonic motility: normal and disturbed. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010; 26(1): 53-60.
 415. Won K.-J., Sanders K.M., Ward S.M. Interstitial cells of Cajal mediate mechanosensitive responses in the stomach. *PNAS.* 2005; 102 (41): 14913–14918.
 416. Azpiroz F., Malagelada J.R. Intestinal control of gastric tone. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)*. 1985; 249: G501-G509.
 417. Zhao J., Liao D., Chen P., Kunwald P., Gregersen H. Stomach stress and strain depend on location, direction and the layered structure. *J. Biomechanics.* 2008; 41: 3441–3447.
 418. Zhao J., Gregersen H. Tension and stress in the rat and rabbit stomach are

- location- and direction-dependent. *Neurogastroenterol. Motil.* 2005; 17: 388–398.
419. Kamm K.E., Stull J.T. Activation of smooth muscle contraction. Relation between myosin phosphorylation and stiffness. *Science.* 1986; 232: 80-82.
 420. Mayne T.P., Paskaranandavadivel N., Erickson J.C., OGrady G., Cheng L.K., Angeli T.R. Improved Visualization of Gastrointestinal Slow Wave Propagation Using a Novel Wavefront-Orientation Interpolation Technique. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2018; 65 (2): 319-326.
 421. Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Термомеханокінетика вискоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щура І. Динамічні закономірності розтягування гладеньких м'язів шлунка. *Studia Biologica.* 2012; 6 (2): 87–98.
 422. Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков / упоряд., предисловие Г.П. Пинаев, В.Б. Ушаков – Ленинград: «Наука», 1978. – 259 с.
 423. Макарова М.Н., Рыбакова А.В., Гущин Я.А., Шедько В.В., Мужикян А.А., Макаров В.Г. Анатомо-физиологическая характеристика пищеварительного тракта у человека и лабораторных животных. *Международный вестник ветеринарии*, № 1, 2016, 82-104.
 424. Oloyede H.O.B., Adaja M.C., Ajiboye T.O., Salawu M.O. Anti-ulcerogenic activity of aqueous extract of *Carica papaya* seed on indomethacin-induced peptic ulcer in male albino rats. *J Integr Med.* 2015; 13(2): 105–114.
[http://dx.doi.org/10.1016/S2095-4964\(15\)60160-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-4964(15)60160-1)
 425. Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Термомеханокінетика вискоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щура. II. Явище гістерезису у випадку розтягування гладеньких м'язів шлунка та товстого кишечника. *Studia Biologica.* 2012; 6 (3): 73–84.
 426. Smooth muscle: as assessment of current knowledge / edited by Bulbring E., Brading A., Jones A., Tomita T. – Great Britain: Butler & Tanner Ltd,

1981. – 563 p.

427. Davis M.J., Meininger G.A., Zawieja D.C. Stretch-induced increases in intracellular calcium of isolated vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1992; 263 (Heart Circ. Physiol. 32): H1292-H1299.
428. Wells S.M., Langille B.L., Lee J.M., Adamson S. L. Determinants of mechanical properties in the developing ovine thoracic aorta. *Am. J. Physiol.* 1999; 277 (Heart Circ. Physiol. 46): H1385–H1391.
429. Newman S., Cardinal L.R., Simmons B. Mechanical properties of tracheal smooth muscle: effects of temperature. *Am. J. Physiol.* 1977; 233 (3): C92-C98.
430. Gibbs C.L., Loiselle D.S. Effect of temperature on mechanical and myothermic properties of rabbit smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1980; 238 (Cell Physiol. 7): C49-C55.
431. Peiper U., Klemt P., Schleupner R. The Temperature Dependence of Parallel and Series Elastic Elements in the Vascular Smooth Muscle of the Rat Portal Vein. *Pfliigers Arch.* 1978; 378: 25-30.
432. Klemt P., Peiper U. The dynamics of cross-bridge movement in vascular smooth muscle estimated from a single isometric contraction of the portal vein: the influence of temperature and calcium. *Pfliigers Arch.* 1978; 378: 31-36.
433. Sun W.M., Houghton L.A., Read N.W., Grundy D.G., Johnson A.G. Effect of meal temperature on gastric emptying of liquids in man. *Gut.* 1988; 29: 302–305.
434. Apter J.T. Correlation of Visco-Elastic Properties with Microscopic Structure of Large Arteries: IV thermal responses of collagen, elastin, smooth muscle, and intact arteries. *Circ Res.* 1967; 21: 901-918.
435. Villanova N., Azpiroz F., Malagelada J.-R. Perception and gut reflexes induced by stimulation of gastrointestinal thermoreceptors in humans. *J. Physiol.* 1997; 502 (1): 215-222.

436. Herrera B., Desco M.M., Eisenberg G., García-Barreno P., Del Canizo J.F. Role of elastic fibers in cooling-induced relaxation. *Cryobiology*. 2002; 44: 54–61.
437. Magaribuchi T., Ito Y., Kuriyama H. Effects of Rapid Cooling on the Mechanical and Electrical Activities of Smooth Muscles of Guinea Pig Stomach and Taenia Coli. *J. Gen. Physiol.* 1973; 6: 323-341.
438. Mustafa S., Pilcher C., Williams I. Cooling-induced bronchoconstriction: the role of ion-pumps and ion-carrier systems. *Pharm. Res.* 1999; 39 (2): 125-136.
439. Holzer P. Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. *Pharm. & Therap*, 2011; 131: 142–170.
440. Koerner H., Price G., Pearce N.A. et al. Remotely actuated polymer nanocomposites – stress-recovery of carbon-nanotube-filled thermoplastic elastomers. *nature (materials)*, 2004; 3: 115–120.
441. Mishima Y., Amano Y., Takahashi Y. et al. Gastric emptying of liquid and solid meals at various temperatures. Effect of meal temperature for gastric emptying. *J. Gastroenterol*, 2009; 44: 412–418.
442. Sun W.M., Penagini R., Hebbard G. et al. Effect of drink temperature on antropyloduodenal motility and gastric electrical activity in humans. *Gut*, 1995; 37: 329–334.
443. Boesmans W., Owsianik G., Tack J. TRP channels in neurogastroenterology: opportunities for therapeutic intervention. *Br. J. Pharm*, 2011; 162: 18–37.
444. Talavera K., Nilius B., Voets T. Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers. *Trends in Neurosciences*, 2008; 31(6): 287–295.
445. Bautista D.M., Siemens J., Glazer J.M. et al. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, 2007; 448: 204–209.
446. Fuchs J.R., Nasser B.A., Vacanti J.P. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann. Thorac. Surg*, 2001; 72: 577–591.

447. Mustafa S., Oriowo M. Cooling-induced contraction of the rat gastric fundus: mediation via transient receptor potential (TRP) cation channel TRPM8 receptor and Rho-kinase activation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2005; 32(10): 832–838.
448. Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Термомеханокінетика вискоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щура. III. Робота вискоеластичного розтягування гладеньких м'язів антрального відділу шлунка. *Studia Biologica*. 2013; 7 (1): 21-30.
449. Jaworowski A., Arner A. Temperature sensitivity of force and shortening velocity in maximally activated skinned smooth muscle. *J. Muscle Res. Cell Motility*. 1998; 19: 247-255.
450. Burke S., Abu-Wasel B., Eid A., Nissan A., Hanani M. Differential effect of hyperthermia on nerves and smooth muscle of the mouse ileum. *J. Surg. Oncol.* 2011; 103 (1): 92-100.
451. Mitsui T., Kitazawa T., Ikebe M. Correlation between high temperature dependence of smooth muscle myosin light chain phosphatase activity and muscle relaxation rate . *J. Biol.Chem.* 1994; 269: 5842–5848.
452. Sabeur G. Effect of temperature on the contractile response of isolated rat small intestine to acetylcholine and KCl: calcium dependence. *Arch. Physiol. Biochem.* 1996; 104 (2): 220-228.
453. Politou A. S., Thomas D. J., Pastore A. The folding and stability of titin immunoglobulin-like modules, with implications for the mechanism of elasticity. *Biophys. J.* 1995; 69: 2601–2610.
454. Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Застосування рівняння Віганда-Снайдера до термодинамічної інтерпретації вискоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунка. *Доповіді НАН України*. 2013; 6: 162-167.
455. Tsymbalyuk O.V., Kosterin S.O. Thermomechanokinetics of viscoelastic deformation of smooth muscles in rat stomach. *Advances in Pharmacology*

- and Pathology of the Digestive Tract, 4th International Scientific Conference. 26-28 september 2012, Kyiv. – P. 64.
456. Pluja L., Alberti E., Fernandez E., Mikkelsen H.B., Thuneberg L., Jimenez M. Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 2001; 281.: G255–G266.
 457. Yoneda S., Kadowaki M., Sugimori S., Sekiguchi F., Sunano S., Fukui H., Takaki M. Rhythmic spontaneous contractions in the rat proximal colon. *Jpn J Physiol.* 2001; 51(6): 717-723.
 458. Онуфрийчук О.В., Цимбалюк О.В. Вплив фізико-хімічних факторів на механокінетичні параметри процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів. IV з'їзд Українського біофізичного товариства 19-21 грудня, Донецьк, 2006. – С. 401-402.
 459. Todorov S. Effects of histaminergic drugs on the contractile activity of smooth muscles from imipramine-treated rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1990; 12(9): 605-608.
 460. Poli E., Pozzoli C., Coruzzi G. Role of histamine H(3) receptors in the control of gastrointestinal motility. An overview. *J Physiol Paris.* 2001; 95(1-6): 67-74.
 461. Liu X., Lin K.W. Effect and its mechanism of substance P on contractile activity of isolated antral muscle strips of rat. *Sheng Li Xue Bao.* 1994; 46(1): 1-7.
 462. Ercan Z.S., Türker R.K. Histamine receptors in the isolated rat stomach fundus and rabbit aortic strips. *Pharmacology.* 1977; 15(2): 118-126.
 463. Tsymbalyuk O.V., Naumenko A.M., Skoryk M.A., Nyporko A.Y., Davidovska T.L., Skryshevsky V.A. Histamine- and nicotine-stimulated modulations of mechanic activity of smooth muscles in gastrointestinal tract at the impact of nanosized TiO₂ material. *Biopolymers and Cell.* 2016; 32(2): 140-149.
 464. Tugay M., Yildiz F., Utkan Z., Utkan T., Sarioğlu Y. Impaired gastric

- motility in the gastroesophageal reflux rat model: an in vitro study. *J Surg Res.* 2003; 115(2): 272-278.
465. Romano C. Nicotine action on rat colon. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981; 217(3): 828-833.
 466. Mitsui R., Komuro T. Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the gastric antrum of wild-type and Ws/Ws rats. *Anat Embryol (Berl).* 2003; 206(6): 453-460.
 467. Pavlovsky V.I., Tsymbalyuk O.V., Martynyuk V.S., Kabanova T.A., Semenishyna E.A., Khalimova E.I., Andronati S.A. Analgesic Effects of 3-Substituted Derivatives of 1,4-Benzodiazepines and their Possible Mechanisms. *Neurophysiology.* 2013; 45 (5): 463-468.
 468. Xu J., Menon S.N., Singh R., Garnier N.B., Sinha S., Pumar A. The Role of Cellular Coupling in the Spontaneous Generation of Electrical Activity in Uterine Tissue. *PLoS One.* 2015; 10(3): e0118443. doi: 10.1371/journal.pone.0118443.
 469. Pehlivanoglu B., Bayrak S., Dogan M. A close look at the contraction and relaxation of the myometrium; the role of calcium. *J. Turkish-German Gynecol. Assoc.* 2013; 14: 230-234.
 470. Abdalla F.M., Maróstica E., Picarelli Z.P., Abreu L.C., Avellar M.C., Porto C.S. Effect of estrogen on muscarinic acetylcholine receptor expression in rat myometrium. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 213(2): 139-148.
 471. Цимбалюк О.В., Мартынюк В.С. Влияние магнитного поля крайне низкой частоты на вызванную K^+ -деполяризацией и ацетилхолином сократительную активность интестинальных гладких мышц. *Фізика живого.* 2011; 19 (1): 20-26.
 472. Меленевська Н.В., Цимбалюк О.В., Романенко О.В., Давидовська Т.Л. Нефармакологічна корекція ритмоактивності гладеньких м'язів кишечника. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Регуляція фізіологічних функцій».* 2012; 1:

36-39.

473. Костенко В.І., Чамор Т.Г., Цимбалюк О.В., Давидовська Т.Л. Модуляція скорочувальної активності гладеньких м'язів кишечника щурів в умовах дії низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання. Вісник Східноєвропейського національного університету. Серія «Біологічні науки». 2014; 1 (13): 24-29.
474. Цимбалюк О.В., Мартинюк В.С. Вплив магнітного поля наднизької частоти на спонтанну скоротливу активність інтестинальних гладеньких м'язів. Вісник Черкаського університету. Серія «Біологічні науки». 2012; 2 (215): 128-133.
475. Bulbring E., Brading A.F., Jones A.W., Tomita T. / London: Edward Arnold. – 1981. – 563 p.
476. Онуфрийчук О.В., Цимбалюк О.В., Мірошніченко М.С., Родік Р.В., Бойко В.І. Вплив каліксарену C107 та його фрагменту M3 на механокінетичні параметри процесу “скорочення-розслаблення” гладеньких м'язів *саесит* щура. Науковий вісник Волинського державного університету імені Лесі Українки. 2007; 5: 41-46.
477. Cunha A. R., Umbelino B., Correia M. L., Neves M. F. Magnesium and Vascular Changes in Hypertension. Int. J.Hypert. 2012, doi: 10.1155/2012/754250
478. Phillippe M. Cellular mechanisms underlying magnesium sulfate inhibition of phasic myometrial contractions. Biochem Biophys Res Commun. 1998; 252(2): 502-507.
479. Apell H.J., Hitzler T., Schreiber G. Modulation of the Na,K-ATPase by Magnesium Ions. Biochemistry. 2017; 56(7): 1005-1016. doi: 10.1021/acs.biochem.6b01243.
480. Kato T., Saito M., Hasegawa S., Kondo A., Miyake K. Effects of magnesium ions on the contraction of the rat detrusor muscle. Nihon. Hinyokika. Gakkai. Zasshi. 1992; 83 (10): 1622-1627.

481. Kato T., Saito M., Kondo A. Effects of magnesium ions on detrusor contraction in rat. *Urol Int.* 1995; 54 (4): 204-207.
482. Sun L., Hou Y., Zhao T., Zhou S., Wang X., Zhang L., Yu G. A combination of genistein and magnesium enhances the vasodilatory effect via an eNOS pathway and BKCa current amplification. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2014; 18: 1-7.
483. Богуцька К. І., Прилуцький Ю. І. Вплив іонів цинку на АТФазну активність міозину і реакцію суперпреципітації актоміозину серцевого м'яза. *Biopolymers and Cell.* 2011; 27 (6): 446–452.
484. Цимбалюк О.В., Онуфрийчук О.В. Кінетичний аналіз процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів. IV з'їзд Українського біофізичного товариства 19-21 грудня, Донецьк, 2006. – С. 407-408.
485. Богуцька К.І., Цимбалюк О.В., Данилова В.М. Особливості функціонування міози нової АТРази серцевого м'яза. *Биополимеры и клетка.* 2002; 18 (4): 297-300.
486. Богуцька К.І., Цимбалюк О.В., Данилова В.М., Мірошніченко М.С. Вплив рН середовища на АТФазну активність міозину різних типів м'язів. *Фізіологічний журнал.* 2003; 49 (6): 52-55.
487. Yoneda S., Takano H., Takaki M., Suzuki H. Effects of nifedipine and nickel on plateau potentials generated in submucosal interstitial cells distributed in the mouse proximal colon. *J Smooth Muscle Res.* 2003; 39(3): 55-65.
488. Dolphin A.C. Voltage-gated calcium channels: their discovery, function and importance as drug targets. *Brain Neurosci Adv.* 2018; 2. pii: 2398212818794805. doi: 10.1177/2398212818794805
489. Kumfu S., Chattipakorn S.C., Chattipakorn N. T-type and L-type Calcium Channel Blockers for the Treatment of Cardiac Iron Overload: An Update. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2017; 70(5): 277-283. doi: 10.1097/FJC.0000000000000525.

490. Striessnig J., Ortner N.J., Pinggera A. Pharmacology of L-type Calcium Channels: Novel Drugs for Old Targets? *Curr Mol Pharmacol*. 2015; 8(2): 110-122.
491. Stengel W., Jainz M., Andreas K. Different potencies of dihydropyridine derivatives in blocking T-type but not L-type Ca^{2+} channels in neuroblastoma-glioma hybrid cells. *Eur J Pharmacol*. 1998; 342(2-3): 339-345.
492. Dacquet C., Mironneau C., Mironneau J. Effects of calcium entry blockers on calcium-dependent contractions of rat portal vein. *Br J Pharmacol*. 1987; 92(1): 203-211.
493. Opie L.H. Calcium channel antagonists, Part I: Fundamental properties: mechanisms, classification, sites of action. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1987; 1(4): 411-430.
494. Lebrun P., Antoine M.H., Ouedraogo R., Pirotte B., Herchuelz A., Cosgrove K.E., Kane C., Dunne M.J. Verapamil, a phenylalkylamine Ca^{2+} channel blocker, inhibits ATP-sensitive K^{+} channels in insulin-secreting cells from rats. *Diabetologia*. 1997; 40(12): 1403-10.
495. Gaginel T.S., Kachur J.F. Kinins as mediators of intestinal secretion. *Am J Physiol*. 1989; 256(1 Pt 1): G1-15.
496. Piskorskaia N.G., Davidovskaia T.L., Vlasenko N.I. Effect of bradykinin and angiotensin on synaptic transmission in smooth muscles. *Fiziol Zh*. 1983; 29(1): 108-112.
497. Würner L., Diener M. Receptors and mechanisms mediating the biphasic response evoked by bradykinin in rat colonic smooth muscle. *Neurogastroenterol Motil*. 2013; 25(9): e581-90. doi: 10.1111/nmo.12165
498. Regoli D., Gobeil F., Nguyen Q.T., Jukic D., Seoane P.R., Salvino J.M., Sawutz D.G. Bradykinin receptor types and B2 subtypes. *Life Sci*. 1994; 55(10): 735-749.
499. Dutra R.C. Kinin receptors: Key regulators of autoimmunity. *Autoimmun*

- Rev. 2017;16(2):192-207. doi: 10.1016/j.autrev.2016.12.011.
500. Takano M., Matsuyama S. Intracellular and nuclear bradykinin B2 receptors. *Eur J Pharmacol.* 2014; 732: 169-172. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.03.011.
 501. Zagorodnyuk V., Santicioli P., Maggi C.A. Evidence for the involvement of multiple mechanisms in the excitatory action of bradykinin in the circular muscle of guinea-pig colon. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998; 357(3): 197-204.
 502. Cabrini D.A, Calixto J.B. Characterization of des-Arg9-bradykinin-induced contraction in guinea-pig gallbladder in vitro. *Eur J Pharmacol.* 1997; 331(1): 31-38.
 503. Павловский В.И., Цимбалюк О.В., Мартынюк В.С., Кабанова Т.А., Халимова Е.И. Анальгетическая активность 3-пропанокси-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она и выявление механизма, лежащего в его основе. Міжнародна науково-практична конференція «Біологічно активні речовини», 27 травня – 1 червня, Новий Світ, 2013: матер. конф., т.1. – С.439.
 504. Cucchi P., Meini S., Bressan A. MEN16132, a novel potent and selective nonpeptide antagonist for the human bradykinin B2 receptor. In vitro pharmacology and molecular characterization. *Eur. J. Pharmacol.*, 2005; 528, 7-16.
 505. Field J.L., Hall J.M., Morton I.K.M. Bradykinin receptors in the guinea-pig taenia caeci are similar to proposed BK3 receptors in the guinea-pig trachea, and are blocked by HOE 140. *Br. J. Pharmacol.*, 1992; 105, 293-296.
 506. Nakamura E., Yokoi T., Fukuta H., Iida T., Tanaka Y., Yamamoto Y., Suzuki H. Hypoxia differentially modulates the activity of pacemaker and smooth muscle cells in the guinea pig stomach antrum. *J Smooth Muscle Res.* 2009; 45(4): 149-166.
 507. Plujà L., Albertí E., Fernández E., Mikkelsen H.B., Thuneberg L., Jiménez

- M. Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 281(1): G255-G266.
508. Burdyga T.V., Wray S. The relationship between the action potential, intracellular calcium and force in intact phasic, guinea-pig uretic smooth muscle. *J Physiol.* 1999; 520 Pt 3: 867-883.
 509. Sanders K.M., Publicover N.G. Excitation-contraction coupling in gastric muscles. *Dig Dis Sci.* 1994; 39(12 Suppl): 69S-72S.
 510. Takaki M. Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res.* 2003; 39(5): 137-161.
 511. Цимбалюк О.В., Науменко А.М., Нипорко О.Ю., Давидовська Т.Л., Скришевський В.А. Збудження-гальмування гладеньких м'язів шлунку при взаємодії з нанорозмірним матеріалом диоксиду титану. *Доповіді НАН України.* 2015; 10: 85-92.
 512. Tsymbalyuk O.V., Naumenko A.M., Davidovska T.L. The influence of nano-TiO₂ on the functioning of gastric smooth muscles: an *in vitro* and *in silico* studies. *Studia Biologica.* 2019; 13 (1): 3-26.
 513. Цимбалюк О.В., Науменко А.М., Давидовська Т.Л. Нанорозмірні матеріали як модулятори скорочувальної функції гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту. VII з'їзд Українського біофізичного товариства, 29-31 жовтня, Київ, 2018. – С.10.
 514. Correa R.M., Lafayette S.S.L., Pereira G.J.S., Hirata H., Garcez-do-Carmo L., Smaili S.S. Mitochondrial involvement in carbachol-induced intracellular Ca²⁺ mobilization and contraction in rat gastric smooth muscle. *Life Sciences.* 2011; 89: 757–764.
 515. Sergeant G.P., Bradley E., Thornbury K.D., McHale N.G., Hollywood M.A. Role of mitochondria in modulation of spontaneous Ca²⁺ waves in freshly dispersed interstitial cells of Cajal from the rabbit urethra. *J Physiol.* 2008; 586.19: 4631–4642.
 516. Chen E.Y., Garnica M., Wang Y.C., Mintz A.J., Chen C.S., Chin W.C. A

- mixture of anatase and rutile TiO₂ nanoparticles induces histamine secretion in mast cells. *Part Fibre Toxicol.* 2012; 9: 2. doi: 10.1186/1743-8977-9-2.
517. Mashimo H., He X. D., Huang P. L., Fishman M. C., Goya R. K. Neuronal Constitutive Nitric Oxide Synthase Is Involved in Murine Enteric Inhibitory Neurotransmission. *The Journal of Clinical Investigation*, 98 (1), 1996, 8–13.
 518. Mulè F., Serio R. NANC inhibitory neurotransmission in mouse isolated stomach: involvement of nitric oxide, ATP and vasoactive intestinal polypeptide. *Br J Pharmacol.* 2003; 140(2): 431–437.
 519. Burnstock G. Purinergic signalling in the gastrointestinal tract and related organs in health and disease. *Purinergic Signalling.* 2014; 10: 3–50.
 520. Lefebvre R.A., De Vriese A., Smits G.J. Influence of vasoactive intestinal polypeptide and NG-nitro-L-arginine methyl ester on cholinergic neurotransmission in the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol.* 1992; 221(2-3): 235-242.
 521. Vetri T., Bonvissuto F., Marino A., Postorino A. Nitrergic and purinergic interplay in inhibitory transmission in rat gastric fundus. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2007; 27(3): 151-157.
 522. Richards W.G., Sugarbaker D.J. Neuronal control of esophageal function. *Chest Surg Clin N Am.* 1995; 5(1): 157-171.
 523. Kerr K.P. The guinea-pig oesophagus is a versatile in vitro preparation for pharmacological studies. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002; 29(12): 1047-1054.
 524. Tsymbalyuk O.V., Naumenko A.M., Rohovtsov O.S., Skoryk M.O., Voyteshenko I.S., Skryshevsky V.A., Davydovska T.L. Titanium dioxide modulation of the contractibility of visceral smooth muscles *in vivo*. *Nanoscale Research Letters.* 2017; 12: 129, DOI: 10.1186/s11671-017-1865-7.
 525. Braverman A.S., Miller L.S., Vegesna A.K., Tiwana M.I., Tallarida R.J.,

- Ruggieri M.R.Sr. Quantitation of the contractile response mediated by two receptors: M2 and M3 muscarinic receptor-mediated contractions of human gastroesophageal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 329(1): 218-224. doi: 10.1124/jpet.108.148106.
526. Wrzos H.F., Tandon T., Ouyang A. Mechanisms mediating cholinergic antral circular smooth muscle contraction in rats. *World J Gastroenterol.* 2004; 10(22): 3292-3298.
 527. Naumenko A.M., Nyporko A.Yu., Tsymbalyuk O.V., Nuryshchenko N.Ye., Voiteshenko I.S., Davidovska T.L. Molecular docking of nanosized titanium dioxide material to the extracellular part of GABA_B-receptor. *Studia Biologica.* 2016; 10 (3-4): 5-16.
 528. Kreyling W.G., Holzwarth U., Schleh C., Kozempel J., Wenk A., Haberl N., Hirn S., Schäffler M., Lipka J., Semmler-Behnke M., Gibson N. Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats: Part 2. *Nanotoxicology.* 2017; 11(4): 443-453. doi: 10.1080/17435390.2017.1306893.
 529. Geraets L., Oomen A.G., Krystek P., Jacobsen N.R., Wallin H., Laurentie M., Verharen H.W., Brandon E.F., de Jong W.H. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol.* 2014; 11: 30. doi: 10.1186/1743-8977-11-30.
 530. Stapleton P.A., Nichols C.E., Yi J., McBride C.R., Minarchick V.C., Shepherd D.L., Hollander J.M., Nurkiewicz T.R. Microvascular and mitochondrial dysfunction in the female F1 generation after gestational TiO₂ nanoparticle exposure. *Nanotoxicology.* 2015; 9(8): 941-951. doi: 10.3109/17435390.2014.984251.
 531. Brohi R.D., Wang L., Talpur H.S., Wu D., Khan F.A., Bhattarai D., Rehman Z.U., Farmanullah F., Huo L.J. Toxicity of Nanoparticles on the Reproductive System in Animal Models: A Review. *Front Pharmacol.*

- 2017; 8: 606. doi: 10.3389/fphar.2017.00606.
532. Hashitani H., Hayase M., Suzuki H. Effects of imatinib mesylate on spontaneous electrical and mechanical activity in smooth muscle of the guinea-pig stomach. *Br J Pharmacol.* 2008; 154(2): 451-459. doi: 10.1038/bjp.2008.91.
 533. Suzuki H. Cellular mechanisms of myogenic activity in gastric smooth muscle. *Jpn J Physiol.* 2000; 50(3): 289-301.
 534. Rychter J., Espín F., Gallego D., Vergara P., Jiménez M., Clavé P. Colonic smooth muscle cells and colonic motility patterns as a target for irritable bowel syndrome therapy: mechanisms of action of otilonium bromide. *Therap Adv Gastroenterol.* 2014; 7(4): 156-166. doi: 10.1177/1756283X14525250.
 535. Amato A., Liotta R., Mulè F. Effects of menthol on circular smooth muscle of human colon: analysis of the mechanism of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740: 295-301. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.018.
 536. Lavoie B., Balemba O.B., Nelson M.T., Ward S.M., Mawe G.M. Morphological and physiological evidence for interstitial cell of Cajal-like cells in the guinea pig gallbladder. *J Physiol.* 2007; 579 (Pt 2): 487-501.
 537. Zhu M.H., Sung T.S., O'Driscoll K., Koh S.D., Sanders K.M. Intracellular Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum regulates slow wave currents and pacemaker activity of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015; 308(8): C608-C620. doi: 10.1152/ajpcell.00360.2014.
 538. Singh R.D., Gibbons S.J., Saravanaperumal S.A., Du P., Hennig G.W., Eisenman S.T., Mazzone A., Hayashi Y., Cao C., Stoltz G.J., Ordog T., Rock J.R., Harfe B.D., Szurszewski J.H., Farrugia G. Ano1 , a Ca^{2+} -activated Cl^- channel, coordinates contractility in mouse intestine by Ca^{2+} transient coordination between interstitial cells of Cajal. *J Physiol.* 2014; 592(18): 4051-4068. doi: 10.1113/jphysiol.2014.277152.
 539. Yoneda S., Fukui H., Takaki M. Pacemaker activity from submucosal

- interstitial cells of Cajal drives high-frequency and low-amplitude circular muscle contractions in the mouse proximal colon. *Neurogastroenterol Motil.* 2004; 16(5): 621-627.
540. Yoneda S., Kadowaki M., Sugimori S., Sekiguchi F., Sunano S., Fukui H., Takaki M. Rhythmic spontaneous contractions in the rat proximal colon. *Jpn J Physiol.* 2001; 51(6): 717-723.
 541. Nichols C.E., Shepherd D.L., Hathaway Q.A., Durr A.J., Thapa D., Abukabda A4., Yi J., Nurkiewicz T.R., Hollander J.M. Reactive oxygen species damage drives cardiac and mitochondrial dysfunction following acute nano-titanium dioxide inhalation exposure. *Nanotoxicology.* 2018; 12(1): 32-48. doi: 10.1080/17435390.2017.1416202.
 542. Nalika N., Parvez S. Mitochondrial dysfunction in titanium dioxide nanoparticle-induced neurotoxicity. *Toxicol Mech Methods.* 2015;25(5):355-63. doi: 10.3109/15376516.2015.1020183.
 543. Song B., Zhang Y., Liu J., Feng X., Zhou T., Shao L. Is Neurotoxicity of Metallic Nanoparticles the Cascades of Oxidative Stress? *Nanoscale Res Lett.* 2016; 11(1): 291. doi: 10.1186/s11671-016-1508-4.
 544. Dodds K.N., Staikopoulos V., Beckett E.A. Uterine Contractility in the Nonpregnant Mouse: Changes During the Estrous Cycle and Effects of Chloride Channel Blockade. *Biol Reprod.* 2015; 92(6): 141. doi: 10.1095/biolreprod.115.129809.
 545. Sukwan C., Wray S., Kupittayanant S. The effects of Ginseng Java root extract on uterine contractility in nonpregnant rats. *Physiol Rep.* 2014; 2(12): e12230. doi: 10.14814/phy2.12230
 546. Lee Si-Eun, Ahn Duck-Sun, Lee Young-Ho Role of T-type Ca²⁺ Channels in the Spontaneous Phasic Contraction of Pregnant Rat Uterine Smooth Muscle. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2009; 13(3): 241–249. doi: 10.4196/kjpp.2009.13.3.241
 547. Blanks A. M., Zhao Z.-H., Shmygol A., Bru-Mercier G., Astle Sh.,

- Thornton S. Characterization of the molecular and electrophysiological properties of the T-type calcium channel in human myometrium. *J Physiol.* 581.3 (2007) pp 915–926.
548. Gravina F.S., Parkington H.C., Kerr K.P., de Oliveira R.B., Jobling P., Coleman H.A., Sandow S.L., Davies M.M., Imtiaz M.S., van Helden D.F. Role of mitochondria in contraction and pacemaking in the mouse uterus. *Br J Pharmacol.* 2010; 161(6): 1375-1390. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00949.x.
 549. Maggi C.A., Giuliani S. A pharmacological analysis of calcium channels involved in phasic and tonic responses of the guinea-pig ureter to high potassium. *J Auton Pharmacol.* 1995; 15(1): 55-64.
 550. Kato K., Kito Y., Suzuki H. Mechanical and electrical responses modulated by excitation of inhibitory nerves during stimulation with high-potassium solutions in circular smooth muscle of the rabbit rectum. *J Smooth Muscle Res.* 2007; 43(6): 229-246.
 551. Bergner A., Sanderson M.J. Acetylcholine-induced calcium signaling and contraction of airway smooth muscle cells in lung slices. *J Gen Physiol.* 2002; 119(2): 187-198.
 552. Nakajima K., Tooyama I., Kuriyama K., Kimura H. Immunohistochemical demonstration of GABAB receptors in the rat gastrointestinal tract. *Neurochem Res.* 1996; 21(2): 211-215.
 553. Bayer S., Jellali A., Crenner F., Aunis D., Angel F. Functional evidence for a role of GABA receptors in modulating nerve activities of circular smooth muscle from rat colon in vitro. *Life Sci.* 2003; 72(13): 1481-1493.
 554. Bayer S., Crenner F., Aunis D., Angel F. Effects of GABA on circular smooth muscle spontaneous activities of rat distal colon. *Life Sci.* 2002; 71(8): 911-925.
 555. Zizzo M.G., Mulè F., Serio R. Functional evidence for GABA as modulator of the contractility of the longitudinal muscle in mouse duodenum: role of

- GABA(A) and GABA(C) receptors. *Neuropharmacology*. 2007; 52(8): 1685-1690.
556. Krantis A., Mattar K., Glasgow I. Rat gastroduodenal motility in vivo: interaction of GABA and VIP in control of spontaneous relaxations. *Am J Physiol*. 1998; 275(5 Pt 1): G897-G903.
 557. Moore E., Etter E., Philipson K., Carrington W.A., Fogarty K.E., Lifshitz L.M., Fay F.S. Coupling of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, Na^+/K^+ pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *Nature*. 1993; 365: 657–660.
 558. Tian J., Xie Z. The Na-K-ATPase and calcium-signaling microdomains. *Physiology*. 2008; 23: 205–211.
 559. Dostanic I., Schultz J., Lorenz J., Lingrel J. Dostanic I., Schultz J., Lorenz J., Lingrel J. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 54053–54061.
 560. Лабинцева Р.Д., Слінченко Н.М., Векліч Т.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Mg^{2+} -залежні АТР-гідролазні ферментативні системи гладеньком'язових клітин матки. *Укр. біохім. Журн*. 2007; 79 (3): 44-54.
 561. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену C-99 та його аналогів на Na^+/K^+ -АТР-азну активність у плазматичній мембрані міоцитів матки. *Укр. біохім. журн*. 2012; 84 (6): 49-57.
 562. Tsybalyuk O.V., Shelyuk O.V., Miroshnichenko N.S. Comparative study of influence of ouabain and calixarene bis-hydroxymethylphosphone acids (C99 and C107) on the mechanokinetics of process contraction-relaxation of intestinal smooth muscles. Vth International Symposium «Supramolecular Systems in Chemistry and Biology» May 12-16, 2009, Kyiv, Ukraine. – P. 72.
 563. Veklich T.O., Shkrabak O.A., Rodik R.V., Kal'chenko V.I., Kosterin S.O. The calixarene C-107 increases the affinity of the Na^+/K^+ -ATPase in

- plasmatic membrane of smooth muscle cells to the ouabain. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2011; 83(1): 38-44.
564. Veklich T.O., Shkrabak O.A., Rodik R.V., Kal'chenko V.I., Kosterin S.O. Effect of calixarene C-107 on kinetic parameters of Na⁺, K(+)-ATPase in the plasma membrane of the uterus myocytes. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2011; 83(2): 36-44.
 565. Hauck C., Frishman W.H. Systemic hypertension: the roles of salt, vascular Na⁺/K⁺ ATPase and the endogenous glycosides, ouabain and marinobufagenin. *Cardiol. Rev.* 2012; 20 (3): 130-138.
 566. Barajas-Lopez C., Huizinga J.D. Ouabain-induced excitation of colonic smooth muscle due to block of K⁺ conductance by intracellular Na⁺ ions. *Eur. J. Pharm.* 1992; 221: 51-58.
 567. Espinosa-Tanguma R., Valle-Aguilera J.R., Zarazúa-Garcia O., Navarro-Huerta M.P., Pecina C., Sánchez-Armass S. Mechanism of ouabain-induced contractions in guinea-pig tracheal rings. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 2004; 31: 710–715.
 568. Цимбалюк О.В. Порівняльний аналіз механокінетики скоротливої активності гладеньких м'язів міометрія щурів за дії каліксаєрену С-99 та убаїну. *Studia Biologica.* 2014; 8 (1): 63-72.
 569. Olson M.L., Sandison M.E., McCarron J.G. Microdomains of muscarinic acetylcholine and Ins(1,4,5)P₃ receptors create 'Ins(1,4,5)P₃ junctions' and sites of Ca²⁺ wave initiation in smooth muscle. *J. Cell. Sci.* 2012; 125 (Pt 22): 5315-5328. doi: 10.1242/jcs.105163.
 570. Yasuda K., Sumi G., Kanamori C., Nakajima T., Tsuzuki T., Cho H., Nishigaki A., Okada H., Kanzaki H. Effects of ovarian hormone treatment on the gene expression of muscarinic acetylcholine receptors in the ovariectomized rat myometrium. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2014; 143: 81-89. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.02.012.
 571. Eglen R.M., Hegde S.S., Watson N. Muscarinic receptor subtypes and

- smooth muscle function. *Pharmacol. Rev.* 1996, 48, 531–565.
572. Ausina P., Savineau J.P., Hernandez J.S., D'Ocón M.P., Martín J.D., Candenás M.L. Effect of inhibition of the electrogenic Na^+/K^+ pump on the mechanical activity in the rat uterus. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1996; 10 (1): 38-46.
 573. Цимбалюк О.В., Онуфрийчук О.В., Мірошніченко М.С., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарен біс-гідроксиметилфосфонова кислота змінює механокінетичні параметри скорочення кільцевих гладеньких м'язів саесум щура, що викликані ацетилхоліном. *Доповіді НАН України.* 2007; 9: 167-173.
 574. Connor J. A., Prosser C. L., Weems W. A. A study of pacemaker activity in intestinal smooth muscle. *J. Physiol.* 1974; 240: 671-701.
 575. Ward S.M., Ordog T., Koh S.D., Abu Baker S., Jun J.Y., Amberg G., Monaghan K., Sanders K.M. Pacemaking in interstitial cells of Cajal depends upon calcium handling by endoplasmic reticulum and mitochondria. *J. Physiol.* 2000; 525 (2): 355-361.
 576. Pritchard K., Ashley C.C. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in isolated smooth muscle cells demonstrated by the fluorescent calcium indicator fura-2. *FEBS LETTERS.* 1986; 195 (1-2): 23-27.
 577. Barajas-Lopez C., Chow E., Hertog A.D., Huizing J.D. Role of the sodium pump in pacemaker generation in dog colonic smooth muscle. *J. Physiol.* 1989; 416: 369-383.
 578. Цимбалюк О.В. Вплив каліксарену С-99 на скоротливу активність м'язів товстого кишечника щурів. *Studia Biologica.* 2016; 10 (3-4): С.33-46.
 579. Shi X.-Z., Sarna S.K. Impairment of Ca^{2+} mobilization in circular muscle cells of the inflamed colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000; 278 (2): G234-G242.
 580. Kawamura M., Yabu H. Selective inhibition of potassium contracture in

- guinea pig taenia coli by ruthenium red. *Jap. J. Physiol.* 1978; 28: 447-460.
581. Данилович Г.В., Данилович Ю.В., Коломієць О.В., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Кальченко В.І., Чуніхін О.Ю., Горчев В.Ф., Карахім С.О. Зміни поляризації плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембран клітин міометрія за дії каліксаренів – інгібіторів Na^+, K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани. *Укр. біохім. журн.* 2012; 84 (6): 37-48.
 582. Kishimoto T., Urakawa N. Effects of ouabain on high-K induced contractions of various smooth muscle tissues in the guinea-pig. *Japan. J. Pharmacol.* 1982; 32: 551-561.
 583. Oguri G., Nakajima T., Yamamoto Y., Takano N., Tanaka T., Kikuchi H., Morita T., Nakamura F., Yamasoba T., Komuro I. Effects of methylglyoxal on human cardiac fibroblast: roles of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channels. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2014; 307 (9): H1339-H1352.
 584. Tajima N., Itokazu Y., Korpi E.R., Somerharju P., Kakela R. Activity of BKCa channel is modulated by membrane cholesterol content and association with Na^+/K^+ -ATPase in human melanoma IGR39 cells. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (7): 5624–5638.
 585. Schwinger R.H., Bubdgaard H., Muller-Ehmsen J., Kjeldsen K. The Na, K-ATPase in the failing human heart. *Cardiovasc. Res.* 2003; 57: 913–920.
 586. Shamraj O., Grupp I., Grupp G., Melvin D., Gradoux N., Kremers W., Linqrel J., De Pover A. Characterization of Na/K-ATPase, its isoforms, and the inotropic response to ouabain in isolated failing hearts. *Cardiovasc. Res.* 1993; 72: 2229–2237.
 587. Zahler R., Gilmore-Hebert M., Baldwin J., Franeo K., Benz E Jr. Expression of α -isoforms of the Na,K-ATPase in human heart. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993; 1149: 189–194.
 588. Ren Y., Huang R., Lu Z. Ouabain at pathological concentrations might

- induce damage in human vascular endothelial cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2006; 27 (2): 165–172.
589. Alrefai W.A., Gill R.K. Bile Acid Transporters: Structure, Function, Regulation and Pathophysiological Implications. *Pharmaceutical Research*. 2007; 24(10): 1803 – 1823.
 590. Arystarkhova E., Sweadner K.J. Tissue-specific Expression of the Na,K-ATPase β 3 Subunit. *J. Biol. Chem*. 1997; 272(36): 22405–22408.
 591. Bagrov A.Y., Shapiro J.I., Fedorova O.V. Endogenous Cardiotonic Steroids: Physiology, Pharmacology, and Novel Therapeutic Targets. *Pharmacol. Rev.* 2009; 61(1): 9–38.
 592. Noé B., Hagenbuch B., Stieger B., Meier P.J. Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *PNAS*. 1997; 94: 10346-10350.
 593. Anwer M.S. Effects of ion substitution on transport and choleric effect of ouabain. *Am. J. Physiol.* 1987; 252(3 Pt 1): G357-G364.
 594. Lindsay R., Parker J.L. Rat hepatic sodium plus potassium ion-dependent adenosine triphosphatase after treatment with digoxin and thyroxine. *Clin. Sci. Mol. Med.* 1976; 50(5): 329 – 332.
 595. Reyes A., Galindo M.M., Garcia L., Segura-Pena D., Caruso-Neves C., Eblen-Zajjur A., Proverbio T., Marin R., Proverbio F. Ouabain-insensitive, Na^+ -stimulated ATPase of several rat tissues: activity during a 24 h period. *Physiological research pre-press article*, *шлях доступу до файлу*: <http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/prepress/1509.pdf>
 596. Proverbio F., Reyes A., Galindo M.M., Proverbio T., Pinero S., Garcia L., Marin R. Ritmo ultradiano y Na,K-ATPasa. *Nefrol. Venez.* 2004; 6:19-22.
 597. Swaminathan R., Chan E., Sin L., King N., Fun N., Chan A. The effect of ouabain on metabolic rate in guinea-pigs: estimation of energy cost of sodium pump activity. *British Journal of Nutrition*. 1989; 61: 467-473.

598. Янчук П.І., Русінчук Я.І., Тєрєхов А.А. Вплив ендотеліну-1 на кисневий баланс і теплотворення печінки. *Фізіологічний журнал*. 2008; 54 (6): 38 – 41.
599. Krumschnabel G., Biasi C., Schwarzbaum P.J., Wieser W. Membrane-metabolic coupling and ion homeostasis in anoxia-tolerant and anoxia-intolerant hepatocytes. *Am.J.Physiol.* 1996; 270 (3, Pt.2): R614 – R620.
600. Buck L.T., Hochachka P.W. Anoxic suppression of Na(+)-K(+)-ATPase and constant membrane potential in hepatocytes: support for channell arrest. *Am. J. Physiol.* 1993; 265 (5, Pt. 2): R1020 - R1025.
601. Gualbert J., Shahgaldian P., Coleman A.W. Interactions of amphiphilic calix[4]arene-based Solid Lipid Nanoparticles with bovine serum albumin. *Int. J. Pharm.* 2003; 257(1-2): 69-73.
602. Brini M., Carafoli E. The Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a004168.
603. Penniston J, Enyedi A. Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump. *J Membr Biol* 1998;165:101–109.
604. Khan I., Tabb T. N., Garfield R.E., Grover A.K. Ca pump messenger RNA expression in pregnant rat uterus. *Biochem. Int. J.* 27, No. 1, 1992 Pages 189-196.
605. Kim H.-J., Lee G.-S., Ji Y.-K., Choi K.-C., Jeung E.-B. Differential expression of uterine calcium transporter 1 and plasma membrane Ca²⁺ ATPase 1b during rat estrous cycle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E234–E241, 2006.
606. Ніконішина Ю.В., Мазур Ю.Ю. ІНГІБІТОРНИЙ ВПЛИВ СТРУКТУРНИХ АНАЛОГІВ КАЛІКС[4]АРЕНУ C-90 НА Ca²⁺,Mg²⁺-АТРАЗУ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ / «Біологія: від молекули до біосфери». Матеріали X Міжнародної конференції молодих учених (2–4 грудня 2015р., м.Харків, Україна). – Х.: ФОП Шаповалова Т.М.,

2015.– 256 с.

607. Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Вплив каліксарену C-90 на скоротливу активність гладеньких м'язів міометрія щурів. *Studia Biologica*. 2013; 7(2): 87-98.
608. Насібян Л.С., Філіппов І.Б. Модуляція скорочення міометрія щурів пептидогліканом клітинної стінки золотистого стафілокока. *Фізіол. журн.* 2014; 60 (5): 62-72.
609. Muscle. Fundamental biology and mechanism of disease / Ch. 86: Calcium homeostasis and signaling in smooth muscle. Elsevier, 2012, V.II: 1155-1173.
610. Wray S., Burdyga Th., Noble K. Calcium signalling in smooth muscle. *Cell Calcium*, 2005; 38: 397–407.
611. Wray S., Jones K., Kupittayanant S., Li Y., Matthew A., Monir-Bishty E., Noble K., Pierce S.J., Quenby S., Shmygol A.V. Calcium signaling and uterine contractility. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 2003; 10 (5): 252-264.
612. Blanks A.M., Zhao Z.-H., Shmygol A., Bru-Mercier G., Astle S., Thornton S. Characterization of the molecular and electrophysiological properties of the T-type calcium channel in human myometrium. *J. Physiol.*, 2007; 581 (3): 915–926.
613. Brown A., Cornwell T., Korniyenko I., Solodushko V., Bond C.T., Adelman J.P., Taylor M.S. Myometrial expression of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels depresses phasic uterine contraction. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 2007; 292: C832–C840.
614. Wray S., Jones K., Kupittayanant S., Li Y., Matthew A., Monir-Bishty E., Noble K., Pierce S.J., Quenby S., Shmygol A.V. Calcium signaling and uterine contractility. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 2003; 10 (5): 252-264.
615. Ishida Y., Paul R.J. Ca^{2+} clearance in smooth muscle: lessons from gene-altered mice. *J. Smooth Muscle Res.*, 2005; 41 (5): 235–245.

616. Brini M., Carafoli E. The plasma membrane Ca^{2+} ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011: 1-15.
617. Matthew A., Shmygol A., Wray S. Ca^{2+} entry, efflux and release in smooth muscle. *Biol. Res.*, 2004; 37: 617-624.
618. Khan R.N., Matharoo-Ball B., Arulkumaran S., Ashford M.L.J. Potassium channels in the human myometrium. *Exp. Physiol.*, 2001; 86 (2): 255-264.
619. Hennan J.K., Diamond J. Evidence that spontaneous contractile activity in the rat myometrium is not inhibited by NO-mediated increases in tissue levels of cyclic GMP. *Br. J. Pharm.*, 1998; 123: 959-967.
620. Данилович Ю.В. Оксид азоту як регулятор внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в міоцитах матки. *Укр. біохім. журн.*, 2012; 84 (3): 5-25.
621. Цимбалюк О.В. Дослідження кінетичних закономірностей впливу оксиду азоту на викликані окситоцином скорочення гладеньких м'язів міометрія. *Вісник Черкаського університету. Серія «Біологічні науки»*. 2013; 2 (255): 121-126.
622. Shmigol A., Eisner D.A., Wray S. Carboxyeosin decreases the rate of decay of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient in uterine smooth muscle cells isolated from pregnant rats. *Eur. J. Physiol.*, 1998; 437: 158–160.
623. Shmigol A. V., Eisner D. A., Wray S. The role of the sarcoplasmic reticulum as a Ca^{2+} sink in rat uterine smooth muscle cells. *J. Physiol.*, 1999; 520 (1): 153-163.
624. Kosterin S.A. Mechanisms of Ca^{2+} transport in myometrium / Chapter 6. Eds. By R.E. Garfield, T.N. Tabb. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo. 1994.
625. Summers B.A., Overholt J.L., Prabhakar N.R. Nitric oxide inhibits L-type Ca^{2+} current in glomus cells of the rabbit carotid body via a cGMP-independent mechanism. *J. Neurophysiol.*, 1999; 81: 1449-1457.

626. Chaud M., Franchi A.M., Rettori V., Mccann S.M., Gimeno M.F. Nitric oxide in the contractile action of bradykinin, oxytocin, and prostaglandin F₂ α in the estrogenized rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997; 94: 11049–11054.
627. Tsymbalyuk O.V. Kinetics of relaxation of rat myometrium in conditions of inhibition of plasma membrane calcium pump and systems of active Ca²⁺ transport of intracellular Ca²⁺-depot. *Studia Biologica*. 2018; 12 (2): 3-12.
628. Yeatman L., Parmley W.W., Sonnenblick E. H. Effects of temperature on series elasticity and contractile element motion in heart muscle. *Am. J. Physiol*, 1969; 217 (4): 1030-1034
629. Boesmans W., Owsianik G., Tack J. et al. TRP channels in neurogastroenterology: opportunities for therapeutic intervention. *Brit. J. Pharm*, 2011; 162: 18–37.
630. Kim H.J., Wie J., So I., Jung M.H., Ha K.T., Kim B.J. Menthol Modulates Pacemaker Potentials through TRPA1 Channels in Cultured Interstitial Cells of Cajal from Murine Small Intestine. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(5):1869-82. doi: 10.1159/000445549.
631. Zholos A.V. TRP Channels in Respiratory Pathophysiology: the Role of Oxidative, Chemical Irritant and Temperature Stimuli. *Curr Neuropharmacol*. 2015;13(2):279-91.
632. Rau K.K., Jiang N., Johnson R.D., Cooper B.Y. Heat sensitization in skin and muscle nociceptors expressing distinct combinations of TRPV1 and TRPV2 protein. *J Neurophysiol*. 2007 Apr;97(4):2651-62.
633. Ford M.J., Camilleri M., Wiste J.A. et al. Differences in colonic tone and phasic response to a meal in the transverse and sigmoid human colon. *Gut*, 1995; 37: 264–269.
634. McArthur K.E., Feldman M. Gastric acid secretion, gastrin release, and gastric emptying in humans as affected by liquid meal temperature. *Am. J. Clin. Nutr*, 1989; 49: 51-54.

635. Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков. Упоряд., предисловие Г.П. Пинаев, В.Б. Ушаков / Ленинград: Наука, 1978. 259 с.
636. Peiper U., Klemm P., Schleupner R. The Temperature Dependence of Parallel and Series Elastic Elements in the Vascular Smooth Muscle of the Rat Portal Vein. *Pflügers Arch.* 1978; 378: 25-30.
637. Kito Y. The functional role of intramuscular interstitial cells of Cajal in the stomach. *J Smooth Muscle Res.* 2011;47(2):47-53.
638. Hirst G.D., Edwards F.R. Role of interstitial cells of Cajal in the control of gastric motility. *J Pharmacol Sci.* 2004; 96(1): 1-10.
639. Fujita A., Takeuchi T., Saitoh N., Hanai J., Hata F. Expression of Ca(2+)-activated K(+) channels, SK3, in the interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Nov; 281(5): C1727-33.
640. Gangula P.R., Maner W.L., Micci M.-A., Garfield R.E., Pasricha P.J. Diabetes induces sex-dependent changes in neuronal nitric oxide synthase dimerization and function in the rat gastric antrum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Mar; 292(3): G725–G733. doi: 10.1152/ajpgi.00406.2006
641. Radu B.M., Banciu A., Banciu D.D., Radu M., Cretoiu D., Cretoiu S.M. Calcium Signaling in Interstitial Cells: Focus on Telocytes. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 13;18(2). pii: E397. doi: 10.3390/ijms18020397.
642. Natarajan V., Wilson C.L., Hayward S.L., Kidambi S. Titanium Dioxide Nanoparticles Trigger Loss of Function and Perturbation of Mitochondrial Dynamics in Primary Hepatocytes. *PLoS One.* 2015 Aug 6;10(8):e0134541. doi: 10.1371/journal.pone.0134541.
643. Yu K.N., Chang S.H., Park S.J., Lim J., Lee J., Yoon T.J., Kim J.S., Cho M.H. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagic Cell Death via Mitochondria-Associated

Endoplasmic Reticulum Membrane Disruption in Normal Lung Cells.

PLoS One. 2015 Jun 29;10(6):e0131208. doi: 10.1371/journal.pone.0131208.

644. Kajioka S., Nakayama S., Asano H., Brading A.F. Involvement of ryanodine receptors in muscarinic receptor-mediated membrane current oscillation in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005; 288(1): C100-C108.
645. Xu S.F., Collins M.A., Chang K.J. Phorbol esters induce oscillatory contractions of intestinal smooth muscles. *Eur J Pharmacol.* 1991; 201(2-3): 215-222.
646. Matchkov V.V., Gustafsson H., Rahman A., Briggs D. M., Gorintin B.S., Hansen A.K., Bouzinova E.V., Praetorius H.A., Aalkjaer C., Nilsson H. Interaction Between Na^+/K^+ -Pump and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Exchanger Modulates Intercellular Communication. *Circ. Res.*, 2007; 100: 1026-1035.
647. Ausina P., Savineau J.P., Hernandez J.S, D'Ocon M.P., Martin J.D., Candenias M.L. Effect of inhibition of the electrogenic Na^+/K^+ pump on the mechanical activity in the rat uterus. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 1996; 10: 38-46.
648. Matthews E. K., Sutte M.C Ouabain-induced changes in the contractile and electrical activity, potassium content, and response to drugs, of smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1967; 45, 509: 509-520.
649. Parkington H.C., Tonta M.A., Davies N.K., Brennecke S.P., Coleman H.A. Hyperpolarization and slowing of the rate of contraction in human uterus in pregnancy by prostaglandins E2 and f2alpha: involvement of the Na^+ pump. *J Physiol.* 1999; 1, 514 (Pt 1): 229-243.
650. Brown A., Cornwell T., Korniyenko I., Solodushko V., Bond C.T., Adelman J.P., Taylor M.S. Myometrial expression of small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels depresses phasic uterine contraction. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 2007; 292: C832–C840.

651. Schuh K., Uldrijan S., Telkamp M., Röhlein N., Neyses L. The plasmamembrane calmodulin–dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I. *J. Cell Biol.*, 2001; 155 (2): 201-205.

Додаток А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Богуцька К.І., **Цимбалюк О.В.**, Данилова В.М. Особливості функціонування міози нової АТРази серцевого м'яза. Биополимеры и клетка. 2002; 18 (4): 297-300.
2. Богуцька К.І., **Цимбалюк О.В.**, Данилова В.М., Мірошніченко М.С. Вплив рН середовища на АТФазну активність міозину різних типів м'язів. Фізіологічний журнал. 2003; 49 (6): 52-55.
3. **Цимбалюк О.В.**, Онуфрийчук О.В., Векліч Т.О., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу оуабаїну і каліксарен біс-гідроксиметилфосфонові кислоти на активність Na^+/K^+ -АТФази на міханокінетику процесу “скорочення-розслаблення” гладенького м'язу. Фізика живого. 2006; 14 (1): 53-72.
4. Онуфрийчук О.В., **Цимбалюк О.В.**, Мірошніченко М.С., Костерін С.О. Механокінетика “скорочення-розслаблення” кільцевого м'язу сліпої кишки (*саесит*) щурів. Фізика живого. 2006; 14 (3): 63-75.
5. **Цимбалюк О.В.**, Онуфрийчук О.В., Мірошніченко М.С., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарен біс-гідроксиметилфосфонева кислота змінює механокінетичні параметри скорочення кільцевих гладеньких м'язів *саесит* щура, що викликані ацетилхоліном. Доповіді НАН України. 2007; 9: 167-173.
6. Онуфрийчук О.В., **Цимбалюк О.В.**, Мірошніченко М.С., Родік Р.В., Бойко В.І. Вплив каліксарену С107 та його фрагменту М3 на механокінетичні параметри процесу “скорочення-розслаблення” гладеньких м'язів *саесит* щура. Науковий вісник Волинського державного університету імені Лесі Українки. 2007; 5: 41-46.
7. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О., Кальченко В.І., Родік Р.В. Порівняльне вивчення в досліджах *in vitro* та *in vivo* впливу каліксарену С107 та уабаїну

на Na^+, K^+ -АТФ-азну активність в плазматичних мембранах гепатоцитів щурів. Укр. біохім. журн. 2010; 82 (4): 78-85.

8. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О., Кальченко В.І., Родік Р.В. Механокінетичні параметри скоротливої активності гладеньких м'язів *саесит* щура за умов хронічної дії каліксарену C107 *in vivo*. Фізика живого. 2010; 18 (1): 47-51.
9. **Цимбалюк О.В.**, Мартинюк В.С. Влияние магнитного поля крайне низкой частоты на вызванную K^+ -деполяризацией и ацетилхолином сократительную активность кишечинальных гладких мышц. *Фізика живого*. 2011; 19 (1): 20-26.
10. Меленевська Н.В., **Цимбалюк О.В.**, Романенко О.В., Давидовська Т.Л. Нефармакологічна корекція ритмоактивності гладеньких м'язів кишечника. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Регуляція фізіологічних функцій». 2012; 1: 36-39.
11. **Цимбалюк О.В.**, Мартинюк В.С. Вплив магнітного поля наднизької частоти на спонтанну скоротливу активність інтестинальних гладеньких м'язів. Вісник Черкаського університету. Серія «Біологічні науки». 2012; 2 (215): 128-133.
12. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Термомеханокінетика вискоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щура І. Динамічні закономірності розтягування гладеньких м'язів шлунка. *Studia Biologica*. 2012; 6 (2): 87–98.
13. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Термомеханокінетика вискоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щура. II. Явище гістерезису у випадку розтягування гладеньких м'язів шлунка та товстого кишечника. *Studia Biologica*. 2012; 6 (3): 73–84.
14. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Na^+, K^+ -АТФ-аза, ендогенні кардіостероїди та їх трансдукторна роль. Укр. біохім. журн. 2012; 84 (1): 5-17.
15. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Термомеханокінетика вискоеластичної

- деформації гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту щура. III. Робота високоеластичного розтягування гладеньких м'язів антрального відділу шлунка. *Studia Biologica*. 2013; 7 (1): 21-30.
16. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Застосування рівняння Віганда-Снайдера до термодинамічної інтерпретації високоеластичної деформації гладеньких м'язів шлунка. *Доповіді НАН України*. 2013; 6: 162-167.
 17. Pavlovsky V.I., **Tsymbalyuk O.V.**, Martynyuk V.S., Kabanova T.A., Semenishyna E.A., Khalimova E.I., Andronati S.A. Analgesic Effects of 3-Substituted Derivatives of 1,4-Benzodiazepines and their Possible Mechanisms. *Neurophysiology*. 2013; 45 (5): 463-468.
 18. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Вплив каліксарену С-90 на скоротливу активність гладеньких м'язів міометрія щурів. *Studia Biologica*. 2013; 7(2): 87-98.
 19. **Цимбалюк О.В.** Дослідження кінетичних закономірностей впливу оксиду азоту на викликані окситоцином скорочення гладеньких м'язів міометрія. *Вісник Черкаського університету. Серія «Біологічні науки»*. 2013; 2 (255): 121-126.
 20. Костенко В.І., Чамор Т.Г., **Цимбалюк О.В.**, Давидовська Т.Л. Модуляція скорочувальної активності гладеньких м'язів кишечника щурів в умовах дії низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання. *Вісник Східноєвропейського національного університету. Серія «Біологічні науки»*. 2014; 1 (13): 24-29.
 21. **Цимбалюк О.В.** Порівняльний аналіз механокінетики скоротливої активності гладеньких м'язів міометрія щурів за дії каліксарену С-99 та убаїну. *Studia Biologica*. 2014; 8 (1): 63-72.
 22. **Цимбалюк О.В.**, Науменко А.М., Нипорко О.Ю., Давидовська Т.Л., Скришевський В.А. Збудження-гальмування гладеньких м'язів шлунку при взаємодії з нанорозмірним матеріалом диоксиду титану. *Доповіді НАН України*. 2015; 10: 85-92.

23. **Цимбалюк О.В.** Вплив каліксарену C-99 на скоротливу активність м'язів товстого кишечника щурів. *Studia Biologica*. 2016; 10 (3-4): С.33-46.
24. **Tsybalyuk O.V.**, Naumenko A.M., Skoryk M.A., Nyporko A.Y., Davidovska T.L., Skryshevsky V.A. Histamine- and nicotine-stimulated modulations of mechanic activity of smooth muscles in gastrointestinal tract at the impact of nanosized TiO₂ material. *Biopolymers and Cell*. 2016; 32(2): 140-149.
25. Naumenko A.M., Nyporko A.Yu., **Tsybalyuk O.V.**, Nuryshchenko N.Ye., Voiteshenko I.S., Davidovska T.L. Molecular docking of nanosized titanium dioxide material to the extracellular part of GABA_B-receptor. *Studia Biologica*. 2016; 10 (3-4): 5-16.
26. **Tsybalyuk O.V.**, Naumenko A.M., Rohovtsov O.S., Skoryk M.O., Voyteshenko I.S., Skryshevsky V.A., Davydovska T.L. Titanium dioxide modulation of the contractibility of visceral smooth muscles *in vivo*. *Nanoscale Research Letters*. 2017; 12: 129, DOI: 10.1186/s11671-017-1865-7
27. Naumenko A. M., Dmytrenko O. V., Shapoval L. M., **Tsybalyuk O. V.**, Sagach V. F., Davydovska T. L. Effects of Injections of Nanostructured Titanium Dioxide into the Rat Medullary Nuclei Involved in Cardiovascular Control. *Neurophysiology*. 2018; 50 (6): 409-414. doi:10.1007/s11062-019-09772-1.
28. **Tsybalyuk O.V.** Kinetics of relaxation of rat myometrium in conditions of inhibition of plasma membrane calcium pump and systems of active Ca²⁺ transport of intracellular Ca²⁺-depot. *Studia Biologica*. 2018; 12 (2): 3-12.
29. **Tsybalyuk O.V.**, Naumenko A.M., Davidovska T.L. The influence of nano-TiO₂ on the functioning of gastric smooth muscles: an *in vitro* and *in silico* studies. *Studia Biologica*. 2019; 13 (1): 3-26.
30. Онуфрийчук О.В., **Цимбалюк О.В.** Вплив інгібіторів Na⁺,K⁺-АТРази на міханокінетику скорочення-розслаблення гладенького м'язу *saesum* щура. *IX Український біохімічний з'їзд*, 24-27 жовтня, Харків, 2006; Укр. біохім. журн. 2006; 78 (6): 113.

31. Онуфрийчук О.В., **Цимбалюк О.В.** Вплив фізико-хімічних факторів на механокінетичні параметри процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів. *IV з'їзд Українського біофізичного товариства* 19-21 грудня, Донецьк, 2006. – С. 401-402.
32. **Цимбалюк О.В.**, Онуфрийчук О.В. Кінетичний аналіз процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів. *IV з'їзд Українського біофізичного товариства* 19-21 грудня, Донецьк, 2006. – С. 407-408.
33. Онуфрийчук О.В., **Цимбалюк О.В.** Вплив інгібіторів натрієвої помпи на механокінетику “скорочення-розслаблення” гладенького м'язу саесум щурів. *III Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь та поступ біології»* 5-6 листопада, Львів, 2007. – С. 16-17.
34. **Tsymbalyuk O.V.**, Shelyuk O.V., Miroshnichenko N.S. Comparative study of influence of ouabain and calixarene bis-hydroxymethylphosphone acids (C99 and C107) on the mechanokinetics of process contraction-relaxation of intestinal smooth muscles. *Vth International Symposium «Supramolecular Systems in Chemistry and Biology»* May 12-16, 2009, Kyiv, Ukraine. – P. 72.
35. **Tsymbalyuk O.V.**, Davydovs'ka T.L., Miroshnichenko M.S., Radchenko N.V. Study of the kinetic characteristics of Ca^{2+} -dependent tension changes of skinned smooth muscles *caecum*. «*Biological motility-2010. From fundamental achievements to nanotechnologies*», Pushchino, Moscow region, Russia, 10-15 may, 2010. – P.303-306.
36. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О., Родік Р.В., Кальченко В.І. Дослідження впливу уабаїну та каліксарену C107 на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази в плазматичних мембранах печінки щура в умовах *in vivo* та *in vitro*. *X Український біохімічний з'їзд*, 13-17 вересня, Одеса, 2010; Укр. біохім. журн. 2010; 82 (4) (додаток 1): С. 112-113.
37. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Дослідження хронічної дії каліксарену C107 на кінетичні характеристики скоротливої активності гладеньких м'язів саесум щура. *V з'їзд Українського біофізичного товариства* 22-25 червня, Луцьк, 2011. – С. 134.

38. **Цимбалюк О.В.**, Костерін С.О. Особливості дії інгібітора натрієвої помпи каліксарену C107 в умовах *in vivo*. *Міжнародна науково-практична конференція «Біологічно активні речовини»*, 23-28 травня, Новий Світ, 2011. – С. 621-622.
39. Мартинюк В.С., **Цимбалюк О.В.** Влияние слабого магнитного поля крайне низкой частоты на сократительную активность гладких мышц. *Междисциплинарная конференция «Адаптационные стратегии живых систем»*, 11-16 июля, Новый Свет, 2012. – С. 287.
40. **Tsymbalyuk O.V.**, Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Chronic action of calixarene C-107 under in vivo conditions on Na^+, K^+ -ATPase activity of rat hepatocyte plasmatic membranes. *III International Symposium: Intracellular Signaling & Bioactive Molecules Design*, September 2012, Lviv, Ukraine. – P.150.
41. **Tsymbalyuk O.V.**, Martynyuk V.S., Tseyslyer Yu.V., Shelyuk O.V., Nurishenko N.E. Modification of functional state of muscle tissue upon influence extremely low frequency of electromagnetic field. *Biological Motility: Fundamental and Applied Science*, Pushchino, Moscow region, Russia, May 11–15, 2012. – P. 122-126.
42. **Tsymbalyuk O.V.**, Kosterin S.O. Thermomechanokinetics of viscoelastic deformation of smooth muscles in rat stomach. *Advances in Pharmacology and Pathology of the Digestive Tract, 4th International Scientific Conference*. 26-28 september 2012, Kyiv. – P. 64.
43. Павловский В.И., **Цимбалюк О.В.**, Мартинюк В.С., Кабанова Т.А., Халимова Е.И. Анальгетическая активность 3-пропанокси-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она и выявление механизма, лежащего в его основе. *Міжнародна науково-практична конференція «Біологічно активні речовини»*, 27 травня – 1 червня, Новий Світ, 2013: матер. конф., т.1. – С.439.
44. Костерин С.А., Бабич Л.Г., Шлыков С.Г., Веклич Т.А., Лабынцева Р.Д.,

- Цимбалюк О.В.**, Шкрабак А.А., Бевза А.В., Бевза А. А., Родик Р.В., Черенок С.О., Кальченко О.И., Кальченко В.И. Каликс[4]арены как эффекторы атр-гидролаз *Міжнародна науково-практична конференція «Біологічно активні речовини»*, 27 травня – 1 червня, Новий Світ, 2013: матер. конф., т.2. – С.175.
45. **Цимбалюк О.В.**, Павловский В.И., Мельник М.И., Мартынюк В.С. Изучение действия непептидных синтетических антагонистов брадикининовых рецепторов на гладкие мышцы желудка *Міжнародна науково-практична конференція «Біологічно активні речовини»*, 27 травня – 1 червня, Новий Світ, 2013: матер. конф., т.1. – С.319.
46. Скришевський В.А., **Цимбалюк О.В.**, Нипорко О.Ю., Давидовська Т.Л. Дослідження механізмів впливу наночастинок TiO_2 на скорочувальну активність гладеньких м'язів шлунку. *IV міжнародна конференція «Медицина фізика – сучасний стан, проблеми, шляхи розвитку. Новітні технології»*, 23-24 жовтня, Київ, 2014. – С. 41.
47. Naumenko A.M., **Tsymbalyuk O.V.**, Nyporko A.Yu., Davidovska T.L., Skryshevsky V.A. Excitation processes in stomach smooth muscles under action of TiO_2 nanoparticles. *XI Міжнародна конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»*, 20 – 23 квітня, Львів, 2015. – С.118.
48. **Tsymbalyuk O.V.**, Nyporko A.Yu., Naumenko A.M., Davidovska T.L., Skryshevsky V.A. TiO_2 nanoparticles as modulators of stomach smooth muscles function. *XIX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г.Костюка*, 24 - 26 травня, Львів, 2015. – С.19.
49. Науменко А.М., **Цимбалюк О.В.**, Скорик М.А., Нипорко О.Ю., Давидовська Т.Л., Скришевський В.А. Пресинаптична модуляція процесів збудження та гальмування в інтестеціальних гладеньких м'язах за дії нанорозмірного матеріалу TiO_2 . *V Міжнародна конференція «Медицина фізика - сучасний стан, проблеми, шляхи розвитку»*, 24 - 25 вересня, Київ, 2015. – С. 52.

50. Naumenko A.M., **Tsymbaluk O.V.**, Skoryk M.A., Nyporko O.Yu., Davidovska T.L., Skryshevsky V.A. Modulations of molecular signaling mechanisms in smooth muscles excitable cells by titanium dioxide nanoscale material. *IV Міжнародна науково-практична конференція «Нанотехнології та наноматеріали»*, 24 - 27 серпня, Львів, 2016. – С. 491.
51. Naumenko A.M., Nyporko A.Yu., **Tsybalyuk O.V.**, Voiteshenko I.S., Davidovska T.L. The analysis of potential binding sites of TiO₂ nanoparticles docked to the extracellular part of GABA_{B1a}. *V міжнародна науково-практична конференція «Нанотехнології та наноматеріали»*, 23 - 26 серпня, Чернівці, 2017. – С. 635.
52. Naumenko A.M., **Tsybalyuk O.V.**, Voiteshenko I.S., Davydovska T.L. Cholinergic excitation of the gastrointestinal tract smooth muscles due to the action of nanostructured TiO₂, and its molecular docking to the extracellular parts of muscarinic acetylcholine receptors M2 and M3 types. *VI міжнародна науково-практична конференція «Нанотехнології та наноматеріали»*, 27-30 серпня, Київ, 2018. – С. 80.
53. **Цимбалюк О.В.**, Науменко А.М., Давидовська Т.Л. Нанорозмірні матеріали як модулятори скорочувальної функції гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту. *VII з'їзд Українського біофізичного товариства*, 29-31 жовтня, Київ, 2018. – С.10.
54. Naumenko A.M., **Tsybalyuk O.V.**, Rohovtsov O.O., Skoryk M.A., Voiteshenko I.S., Davydovska T.L., Skryshevsky V.A. The state of spontaneous contractile activity of *caecum* and myometrium smooth muscles under the actions of nanostructured TiO₂ *in vivo*. *XV International scientific conference for students and PhD students. «Youth and progress of biology»*, dedicated to the 135th anniversary of J. O. Parnas. Lviv, Ukraine. April 9–11, 2019. – P. 143-144.