

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

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

Доцент Нипорко Олексій Юрійович

Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2023 р.

**Вивчення механізмів дії наночастинок ZnO на функціонування  
гладеньких м'язів травного тракту і міометрія щурів**

Випускна кваліфікаційна робота магістра  
студентки спеціальності  
162 Біотехнологія та біоінженерія  
ОП «Високі технології (Біотехнологія)»  
**Подгасцької Юлії Юріївни**

Науковий керівник  
професор кафедри молекулярної  
біотехнології та біоінформатики,  
доктор біологічних наук **Цимбалюк О.В.**

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2023 р.**

## АНОТАЦІЯ

Подгаєцька Ю. Ю. Вивчення механізмів дії наночастинок ZnO на функціонування гладеньких м'язів травного тракту і міометрія щурів. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 162 Біотехнологія та біоінженерія ОП «Високі технології (Біотехнологія)».

Випускна кваліфікаційна робота викладена на 58 сторінках, ілюстрована 17 рисунками, містить 15 формул. Список використаних джерел включає 52 роботи.

У роботі проведено дослідження фізіологічних механізмів скоротливої активності міоцитів в умовах її модуляції за впливу різних концентрацій наночастинок ZnO. Отримані результати є новими та актуальними у фармакологічній та токсикологічній галузі для вивчення гострої цитотоксичності наночастинок ZnO та його впливу на скорочувальну активність гладеньких м'язів.

Було встановлено, що наночастинки ZnO суттєво інгібують спонтанну скорочувальну активність міометрія, зменшуючи при цьому механокінетичні параметри окремих скорочень. Окрім цього, показано, що нано-ZnO спричиняє суттєве зниження амплітуди скорочень препаратів міометрія, активованих застосуванням гіперкалієвого розчину та окситоцину, причому тонічна фаза цих скорочень залишається без змін. Також було встановлено, що нано-ZnO при застосуванні до гладеньких м'язів шлунку спричиняє аналогічні за напрямками ефекти змін спонтанної і викликанної скорочувальної активності.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що механізмом модуляції скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів в умовах короткочасової аплікації *in vitro* є пригнічення надходження іонів  $\text{Ca}^{2+}$  через потенціалкервані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали плазматичної мембрани, іонами

$Zn^{2+}$ , які дисоціюють у розчин з поверхні наночастинок ZnO. Отримані у роботі результати є принципово новими та важливими для розуміння токсичності наночастинок ZnO та їх впливу на функціонування внутрішніх органів. Та можуть бути використані для подальших досліджень.

**Ключові слова:** наночастинок, ZnO, потенціалкеровані  $Ca^{2+}$ -канали, міометрій, вісцеральні гладенькі м'язи, *antrum*, скорочувальна активність.

## ANNOTATION

Yuliia Podhaietska Study of the action mechanisms of ZnO nanoparticles on the functioning of smooth muscles of the digestive tract and myometrium of rats. – Master's final qualification work on the specialty 162 Biotechnology and Bioengineering, under the Program " High Technologies (Biotechnology)".

The graduation qualification work is laid out on 58 pages, illustrated with 17 figures and 15 formulas. The list of used sources includes 52 works.

In the work, a study of the physiological mechanisms of the contractile activity of myocytes under the conditions of its modulation under the influence of different concentrations of ZnO nanoparticles was carried out. The obtained results are new and promising in the pharmacological and medical field for studying the cytotoxicity of ZnO nanoparticles and its effect on the contractile activity of muscles.

It was established that ZnO nanoparticles significantly inhibit the spontaneous contractile activity of the myometrium, while reducing the mechanokinetic parameters of individual contractions. In addition, it was shown that nano-ZnO causes a significant decrease in the amplitude of the contractions of the myometrium preparations activated by the application of hyperpotassium solution and oxytocin, and the tonic phase of these contractions remains unchanged. It was also established that nano-ZnO, when applied to the smooth muscles of the stomach, causes similar effects of changes in spontaneous and induced contractile activity.

The obtained results allow us to conclude that the mechanism of modulation of the contractile activity of visceral smooth muscles under the conditions of short-term application *in vitro* is inhibition of the influx of  $\text{Ca}^{2+}$  ions through potential-controlled  $\text{Ca}^{2+}$  channels of the plasma membrane by  $\text{Zn}^{2+}$  ions, which dissociate into the solution from the surface of ZnO nanoparticles. The results obtained in the

work are fundamentally new and important for understanding the toxicity of ZnO nanoparticles and their impact on the functioning of internal organs, and they can be used for further research.

**Key words:** nanoparticles, ZnO, potential-controlled  $\text{Ca}^{2+}$  channels, myometrium, visceral smooth muscles, *antrum*, contractile activity.

## ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	8
ВСТУП .....	9
РОЗДІЛ 1 .....	12
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	12
1.1. Фізико-хімічні властивості наночастинок ZnO .....	15
1.1.1 Хімічні властивості наночастинок ZnO .....	15
1.1.2 Кристалічна та поверхнева структура наночастинок ZnO .....	16
1.2. Вісцеральні гладенькі м'язи .....	18
1.2.1. Гладеньком'язова тканина стінок шлунково-кишкового тракту .....	18
1.2.2. Гладеньком'язова тканина матки. Міометрій щурів .....	19
1.2.3. Вплив цинк оксиду на міометрій .....	21
РОЗДІЛ 2 .....	22
МЕТОДИ ТА РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	22
2.1. Вивчення скорочувальної активності багатоклітинних препаратів вісцеральних гладеньких м'язів .....	22
2.2. Механокінетичний аналіз спонтанних скорочень .....	24
2.3. Аналіз викликаних скорочень за методом Костеріна-Бурдиги .....	26
2.4. Статистичний аналіз .....	27
РОЗДІЛ 3 .....	29
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	29
3.1. Вивчення дії <i>in vitro</i> нанорозмірного ZnO на спонтанні ізометричні та ізотонічні скорочення міометрія щурів .....	29
3.1.1. Аналіз модуляції ізометричних спонтанних скорочень на тлі нано-ZnO .....	29
3.1.2. Аналіз модуляції ізотонічних спонтанних укорочень на тлі нано-ZnO .....	32
3.1.3. Дослідження викликаних скорочень міометрія на тлі нано-ZnO .....	35
3.2 Вивчення дії <i>in vitro</i> нанорозмірного ZnO на скорочувальну активність антрального відділу шлунку щурів .....	42
3.2.1. Аналіз модуляції ізометричних спонтанних скорочень на тлі нано-ZnO .....	42

3.2.2. Аналіз модуляції викликаних аплікуванням гіперкалієвого розчину і ацетилхоліну скорочень на тлі нано-ZnO .....	47
ВИСНОВКИ.....	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	53

## СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню;

Нано – наночастинки;

antrum – антральний відділ шлунку;

ГМК – гладеньком'язові клітини;

ІСС – інтерстиціальні клітини Кахаля;

$\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$  – часові параметри;

$F_{max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$  – силові параметри;

$V_C$  і  $V_R$  – швидкісні параметри;

$I_{max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$  – імпульсні параметри;

$f$  – миттєва сила скорочування ГМ;

$n$  – логарифмічний декремент крутизни механокінетичної кривої;

ІТФ – інозитол-1,4,5-трифосфату;

ДАГ – діацилгліцерол;

СР – саркоплазматичний ретикулум.



## ВСТУП

Оксид цинку (ZnO) є одним зі штучно синтезованих матеріалів, який завдяки своїм фізико-хімічним властивостям активно використовується у різних галузях сучасного промислового виробництва. Так, ZnO є напівпровідником, який має значну енергію екситонного збудження (енергія зв'язку екситону 60 MeV), високу заборонену зону (її ширина 3,37 eV) [35, 47]. Також цей оксид має унікальні хімічні властивості. Він належить родини вюрцитових структур та характеризується нецентральною симетрією з полярними поверхнями. Його структура – система площин, що складаються з тетраедрично координованих іонів  $O^{2-}$  та  $Zn^{2+}$  [35].

Особливих властивостей набуває ZnO у нанорозмірній формі. Так, завдяки поверхневим та квантово-розмірним ефектам нано-ZnO використовують у розробках в галузі електроніки, оптоелектроніки, лазерної техніки [5, 11, 20, 31].

Втім, наночастинки ZnO мають високу адсорбційну ємність та каталітична активність, що в свою чергу обумовлює потужне продукування ними вільних радикалів та активних форм кисню (АФК) [13, 27, 52]. Також варто відзначити, що у водних суспензіях заряд поверхні частинок ZnO змінюється в залежності від рН: вони мають позитивний заряд ( $ZnOH^{2+}$ ) при  $pH < 7$  та негативний заряд ( $ZnO^-$ ) при  $pH > 7$ , тоді як при нейтральному значенні рН – нейтральні ( $ZnOH$ ) [26].

Усі вищеперераховані властивості обумовлюють специфічні ефекти нано-ZnO щодо біологічних об'єктів навіть за дуже низьких його концентрацій [13, 15, 26 – 27]. Так, натепер описані і обґрунтовані квантово-хімічними розрахунками структурних і енергетичних характеристик цього наноматеріалу механізми його антибактеріальної дії. Головним індуктором руйнування бактерійних клітин є напрацювання АФК; також важливим цитотоксичним чинником є іони  $Zn^{2+}$ , які вивільнюються з поверхні частинок

у водному середовищі. Відомо, що іони  $Zn^{2+}$  є інгібіторами окремих іонних каналів (зокрема, потенціалкерованих  $Ca^{2+}$ -каналів L-типу) та ензимів [ 13, 21-23, 44]. Саме завдяки цьому, нано-ZnO наразі застосовують у фармакології як антимікробний консервант медичних засобів. Також, за даними Управління по санітарному нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів США (21CFR 182.8991) ZnO використовується у якості харчової добавки [34, 41]. Проте на тепер залишається недослідженим ряд молекулярних механізмів дії цього наноматеріалу на функціонування органів і тканин, зокрема вісцеральних гладеньких м'язів.

Дослідження виконані на базі кафедри молекулярної біології та біоінформатики ННІ високих технологій. **Об'єктом** дослідження були механокінетичні параметри спонтанних і викликаних скорочень кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку, а також поздовжніх гладеньких м'язів міометрія щурів за короткотривалої дії *in vitro* суспензії нанорозмірного ZnO.

**Метою** роботи було вивчення механізмів модуляції скоротливої активності вісцеральних гладеньких м'язів (на прикладі шлунку і міометрія) за короткотривалої дії *in vitro* нанорозмірного ZnO. Отримані у роботі результати є принципово новими та важливими для розуміння токсичності наночастинок ZnO та їх впливу на функціонування внутрішніх органів.

Відповідно до мети поставлено такі **завдання**:

1. Дослідити спонтанну і викликану скорочувальну активність мультиклітинних гладеньком'язових препаратів міометрія щурів за дії *in vitro* нанорозмірного ZnO у концентрації  $10^{-3}$  мг/мл;
2. Дослідити спонтанну і викликану скорочувальну активність мультиклітинних гладеньком'язових препаратів травного тракту (на прикладі антрального відділу шлунку) щурів за дії *in vitro* нанорозмірного ZnO у концентрації  $10^{-3}$  мг/мл;
3. Методами механокінетичного аналізу проаналізувати скорочувальну активність вісцеральних гладеньких м'язів за дії *in vitro*

нанорозмірного ZnO, та встановити клітинні механізми, за якими реалізуються ефекти цього наноматеріалу.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Метою наномолекулярних технологій є розробка та впровадження в промислове виробництво нанорозмірних матеріалів, розміри яких знаходяться в діапазоні 1-100 нм. Ці матеріали є модифікованими формами основних елементів зі змінами їхніх властивостей [37]. Актуальність дослідження наночаток полягає у можливості використання у різних сферах. Зокрема, у медицині нанотехнології пропонують нові інструменти та методи лікування різних захворювань. Сюди входять наноматеріали, які імітують біологічні процеси, «наномашини», біоматеріали для тканинної інженерії, біосенсиори та нанорозмірні пристрої для цільової доставки ліків (що є надзвичайно важливо для лікування раку) [10,51].

Передбачається, що кількість і різноманітність наноматеріалів швидко збільшуватиметься, що зробить нанотехнології та наноматеріали однією з найперспективніших галузей науки та техніки 21 століття. Пріоритетними наноматеріали стануть такі як наночастинки кремнію, благородних металів цинку, церію, також вуглецеві нанотрубки, фулерени тощо. Однак збільшення використання та виробництва наноматеріалів може призвести до їх накопичення в навколишньому середовищі [45]. Головною проблемою є те, що наразі немає переконливих доказів про небезпеку наночастинок. Саме тому надзвичайно важливо дослідити всі можливі негативні наслідки після впливу наночастинок на організм, зокрема механізми дії наночастинок та їх вплив зокрема на вісцеральні гладенькі м'язи, біосумісності та можливі біотрансформації, також важливим є де накопичуються ті чи інші наночастки та їхню можливу токсичність [14].

За останні десять років дослідники створили методи синтезу (хімічний, фізичний та біологічний) та аналізу різних нових матеріалів, таких як

нанорозмірні матеріали та наночастинки. Головним є те, що властивості даних матеріалів можна контролювати. Саме тому даний синтез є важливим аспектом нанонауки та нанотехнологій. Ці крихітні, дрібнодисперсні частинки можуть поводитись як один об'єкт у зв'язку з їхніми фізичними, хімічними та транспортними властивостями. В даний час синтез даних матеріалів є популярною сферою досліджень у всьому світі.

Наночастинки, які вимірюються в нанометрах, можуть виникати в природі або утворюються в результаті діяльності людини. Завдяки своєму надзвичайно малому розміру вони володіють унікальними властивостями. Це важливо, оскільки синтезовані наночастинки мають практичне застосування у екології (відновлення навколишнього середовища), в медицині (тестування наночасток для доставки ліків), каталізі тощо [12].

Також важливим є те, що можна синтезувати та використовувати наночастки різних металів. Найпопулярнішими на даний момент є:

- Наночастки срібла (AgNPs). Дані частинки актуальні через властивість до інгібування росту (грибів, бактерії та вірусів) [18]. Тому зараз їх тестують для подальшого використання в текстилі, косметології та, навіть, в медицині [25-26].
- Наночастки золота (AuNPs). На даний момент вже використовуються для відслідковування ДНК-відбитків (перевірка наявності ДНК), також AuNPs залучають до імунохімічних дослідження (перевірка взаємодій між протеїнами). Також за допомогою даних частинок можливе розпізнавання деяких аміноглікозидів (I-го (стрептоміцин та неоміцин) та II-го (гентаміцин) покоління) [36, 38].
- Наночастки заліза (FeNPs) зараз активно досліджуються через їхню біосумісність. Адже через дану властивість дані частинки можна використовувати для лікування раку, також залучають в роботі з МРТ та генній терапії [19].

- Наночастинки оксиду цинку (ZnO) – мають унікальні фізичні та хімічні властивості (висока реактивність, антибактеріальні властивості, біосумісність), що робить їх корисними для різноманітних застосувань у різних галузях, включаючи електроніку (електронні пристрої, такі як сонячні батареї та транзистори), оптику, біомедицину (УФ-блокування в сонцезахисних кремах та інших косметичних продуктах, антибактеріальні покриття для медичних приладів і поверхонь) та науку про навколишнє середовище (датчики газу для виявлення шкідливих газів у навколишньому середовищі) [5].

Технології в яких задіяне використання наночасток спрямовані на підвищення ефективності, стабільності та зміни швидкості різних процесів. Наночастинки також можна використовувати в інших цілях, таких як маніпулювання або розміщення матерії на нанорозмірній поверхні. Для цього використовується квантовий ефект частинок: квантові точки використовуються для підвищення чіткості зображення, а напівпровідники використовуються в молекулярній електроніці тощо [12].

В даній роботі були дослідженні наночастки оксиду цинка, через ряд унікальних фізичних та хімічних властивостей, що робить їх корисними для різноманітних застосувань у різних галузях, включаючи електроніку, оптику, біомедицину та науку про навколишнє середовище.

Але також, важливо відзначити, що наночастинки, включаючи наночастинки ZnO, можуть становити потенційну небезпеку для здоров'я та навколишнього середовища через свій малий розмір і підвищену реакційну здатність. Таким чином, належне поводження з цими частинками та утилізація є важливими для мінімізації їх впливу на здоров'я людини та навколишнє середовище.

## 1.1. Фізико-хімічні властивості наночастинок ZnO

### 1.1.1 Хімічні властивості наночастинок ZnO

Наночастинки оксиду цинку (ZnO) складаються з атомів цинку (Zn) та кисню (O), і класифікуються як d- і p-елементи в періодичній таблиці Менделєєва. Наночастки ZnO є універсальним і перспективним матеріалом, який має широкий спектр застосування завдяки своїм функціональним властивостям [47]. Поверхня цих наночастинок, як правило, покрита нейтральними гідроксильними групами (-ОН група), які відіграють значну роль у поведінці поверхневого заряду даної сполуки [35].

За високого рівня рН –  $H^+$  (хемосорбовані протони) дисоціюють з поверхонь наночастинок, при цьому залишається негативно заряджений оксид цинку ( $ZnO^-$ ). За низьких показниках рН ми можемо споглядати за зворотною ситуацією, коли протони з навколишнього середовища переносяться на поверхню наночастинок, утворюючи  $ZnOH_2^+$ . Ізоелектрична точка даних структур буде знаходитись в діапазоні від 9 до 10, і це вказує на те, що у фізіологічних розчинах наночастки оксиду цинку мають сильний позитивний поверхневий заряд [11]. Також від рН залежить концентрація різних груп ( $-ZnOH_2^+$ ,  $-ZnOH$ ,  $-ZnO^-$ ) на поверхні наночастинок [31].

Однією з переваг наносток ZnO є можливість використання у каталітичних реакціях через розміри поверхні та високу каталітичну активність [20]. Також, важливо зазначити, що дані структури (1D) мають цікаві електронні та оптичні властивості, які зумовлені їх розмірами, як наслідок – ефект квантового утримання [5]. Наприклад, позитивно заряджені наночастинки ZnO можуть взаємодіяти з високою концентрацією аніонних фосфоліпідів на зовнішній мембрані ракових клітин через електростатичні взаємодії, що може сприяти ендоцитозу і подальшій цитотоксичній дії.

Також важливою є здатність змінювати, як поверхневі так і електростатичні характеристики, так званий електрокінетичний потенціал (або дзета-потенціал).

### **1.1.2 Кристалічна та поверхнева структура наночастинок ZnO.**

ZnO - це напівпровідник II-VI, ширина забороненої зони якого становить 3,4 eV, окрім цього у оксиду цинку енергія зв'язку екситону становить близько 60 meV, що робить його стійким при кімнатній температурі.

Природна форма оксиду цинка – цинкіт, має шестикутну структуру типу вюрциту, яку можна забарвити від жовтого до червоного кольорів залежно від наявності природних забруднень. Проте, чистий ZnO без забруднень має безбарвний вигляд.

Напівпровідники II-VI зазвичай кристалізуються в кубічних цинкових сумішах або у шестикутній структурі типу вюрциту, де іони одного типу оточені чотирма іншими іонами, розташованими в кутах чотиригранника. Ця чотиригранна координація характерна для ковалентного зв'язку між  $sp^3$ -гібридизованими атомами [27].

Також важливою рисою ZnO є його полярні поверхні. Це призводить до великої активності поверхні, що робить ZnO популярним матеріалом для різних застосувань, таких як каталізатори, сенсори, світловипромінювальні діоди, транзистори, активні шари сонячних батарей та інше. Полярна природа поверхонь також зумовлює ефект пасивації, коли заряджена поверхня сприймає нейтральну молекулу, що дає можливість знижувати концентрацію неочищених домішок в матеріалі. Також ZnO має високу прозорість у видимому та ультрафіолетовому діапазоні, що дозволяє використовувати його як підложку для різноманітних оптичних пристроїв та сенсорів.

Ці неполярні грани можуть бути корисними для росту кристалів, оскільки їх структура не має дипольного моменту, тому їх поверхня не буде



зарядженою, як у випадку полярних граней. Важливо зазначити, що оксид цинку можна вважати винятком, адже полярні структури ZnO – атомно плоскі, стійкі та без перебудови [26, 34].

Це може допомогти уникнути проблем з ростом кристалів, пов'язаних з електричною взаємодією між поверхнею кристала і розчином. Однак, для деяких застосувань полярні грани можуть бути бажаними, оскільки вони можуть мати певні електронні та оптичні властивості, які не можуть бути досягнуті на неполярних гранях [25, 52]. Таким чином, вибір гранів залежить від конкретного застосування.

Узагальнюючи вище сказане, можна підсумувати, що наночастинки оксиду цинку (ZnO) демонструють унікальні фізико-хімічні властивості завдяки їх малому розміру та високому співвідношенню площі поверхні до об'єму. Деякі з ключових фізико-хімічних властивостей наночастинок ZnO:

- Розмір частинок: наночастинки ZnO мають розмір від 1 до 100 нм із середнім розміром приблизно 20-50 нм.
- Площа поверхні: високе співвідношення площі поверхні до об'єму наночастинок ZnO призводить до великої площі поверхні на одиницю об'єму, що підвищує реакційну здатність частинок.
- Кристалічна структура: наночастинки ZnO мають кристалічну структуру вюрциту, подібну структурі основного матеріалу ZnO. Однак кристалічна структура наночастинок ZnO може бути спотворена через їх малий розмір.
- Поверхневий заряд: наночастинки ZnO мають високу щільність поверхневого заряду через наявність поверхневих дефектів і звисаючих зв'язків. Поверхневим зарядом наночастинок ZnO можна маніпулювати, змінюючи хімічний склад поверхні частинок.
- Оптичні властивості: наночастинки ZnO демонструють унікальні оптичні властивості, включаючи широку заборонену зону та високу прозорість у видимій області електромагнітного спектру.

- Хімічна реакційна здатність: завдяки високій площі поверхні та поверхневому заряду наночастинки ZnO виявляють підвищену хімічну реакційну здатність, що робить їх корисними для каталітичних і сенсорних застосувань.

Важливо відзначити, що на фізико-хімічні властивості наночастинок ZnO можуть впливати такі фактори, як розмір частинок, форма, хімічний склад поверхні та метод синтезу. Тому ретельний контроль цих параметрів є важливим для адаптації властивостей наночастинок ZnO для конкретних застосувань [15].

## 1.2. Вісцеральні гладенькі м'язи

### 1.2.1. Гладеньком'язова тканина стінок шлунково-кишкового тракту

Гладеньком'язова тканина стінок шлунково-кишкового тракту (ШКТ) крім власне гладеньком'язових клітин (ГМК) містить розгалужені мережі пейсмейкерних клітин (інтерстиціальних клітин Кахаля) і нейронів інтрамурального нервового сплетення, які регулюють скоротливість ГМ [3, 16]. Інтерстиціальні клітини Кахаля (ІСС) ініціюють повільні хвилі деполяризації в ГМ травного тракту, регулюючи скорочувальну активність ГМК, а також опосередковують ефекти на них ентеральних нейронів. ІСС класифікуються на декілька клітинних популяцій і відрізняються за морфологією, розташуванням і параметрами пейсмейкерної активності; вони формують щільні контакти з ГМК [30]. Зокрема, стінки антрального відділу шлунка людини містять ІСС-ІМ (клітини, що розміщені усередині м'язових шарів, intramuscular), ІСС-МУ (ІСС міоентерального (Ауербахового) нервового плетива, myenteric plexus) і ІСС-СМ (ІСС, розташовані під кільцевим шаром ГМ та контактують з підслизовим шаром, submucosa) [42-43], тоді як у ГМ антрального відділу шлунку щурів

ідентифіковані ICC-IM та ICC-MY [8, 28]. У випадку патологій, які зачіпають порушення скорочувальної функції ГМ шлунку, спостерігаються суттєві зміни кількості ICC. Так, при гастропатіях і гастропарезах, які розвиваються у майже половини хворих на цукровий діабет I і II типів, спостерігається втрата ICC в ГМ стінці шлунку [6, 8, 17, 24]; аналогічні зміни також показані на тваринних моделях діабету [6, 33]. Також гастропарези, які супроводжуються зменшенням кількості ICC та нейронів інтрамуральних сплетень у тканині ГМ шлунку, спостерігаються у людей з діагностованими неврологічними патологіями (такими як ревматичні стани і хвороба Паркінсона), вірусними захворюваннями, порушеннями функції щитоподібної залози тощо [6-7]. До прикладу, методами імуногістохімії показано, що у людей з діагностованим гастропарезом суттєво зменшується кількість ICC у антральному і пілоричному відділах шлунку, причому у антральному відділі ці зміни із відносно значно меншою частотою супроводжуються фіброзом тканини ГМ [29].

### **1.2.2. Гладеньком'язова тканина матки. Міометрій щурів**

Міометрій — це середній шар стінки матки, що складається в основному з клітин гладких м'язів матки (також званих матковими міоцитами), а також з підтримуючої стромы та судинної тканини [1]. Його основна функція полягає в тому, щоб викликати скорочення матки. Міометрій здатний виробляти регулярні скорочення без гормонального чи нервового впливу [32]. Міометрій складається з двох шарів гладкої мускулатури з судинною зоною між ними. М'язові волокна зовнішнього поздовжнього шару розташовані паралельно, а внутрішніх циркулярних шарів — концентрично навколо довгої осі матки. Веретеноподібні м'язові клітини, пов'язані з мембраною, об'єднані в пучки по 10 – 50 клітин. Сусідні клітини зближуються в певних спеціалізованих областях їх плазматичних

мембран, утворюючи контакти між клітинами, які називаються щілинними контактами. Вони є модифікаціями прилеглих плазматичних мембран сусідніх клітин і з'єднують їх електрично та метаболічно. Проміжок — це вузький простір приблизно від 2 до 3 нм, який складається з кількох тисяч каналів.

Подібно до багатьох вісцеральних гладких м'язів, скорочення міометрія мають фазовий характер; вони демонструють збереження тону спокую з циклами дискретних, періодичних скорочень різної частоти, амплітуди та тривалості. Саме ці параметри скорочувальної діяльності матки варіюються, щоб підготувати її до її основних фізіологічних функцій і які необхідно добре контролювати, щоб уникнути таких проблем, як передчасні або дисфункціональні пологи.

Тканина міометрія спонтанно активна, оскільки вона скорочується *in vivo* та *in vitro* без необхідності зовнішніх подразників. Швидше, його діяльність ініціюється та координується самими м'язовими клітинами. Скорочення залежить від спонтанної генерації потенціалів дії, підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  та наявності провідної системи між сусідніми клітинами у вигляді щілинних контактів [46].

Скорочувальна активність в матці є прямим наслідком електричної активності гладком'язових клітин. Ця активність характеризується циклічною деполяризацією та реполяризацією плазматичної мембрани і називається потенціалом дії. Деполяризація в основному зумовлена підвищеною проникністю для  $Ca^{2+}$  і, меншою мірою, для Na. Обидва іони мають вищі концентрації у позаклітинному просторі і, отже, легко переміщуються у внутрішньоклітинний простір, роблячи мембранний потенціал більш позитивним. Мембрана реполяризується шляхом підвищення проникності для K (висока концентрація у внутрішньоклітинній рідині), що призводить до руху  $K^+$  назовні.

### **1.2.3. Вплив цинк оксиду на міометрій**

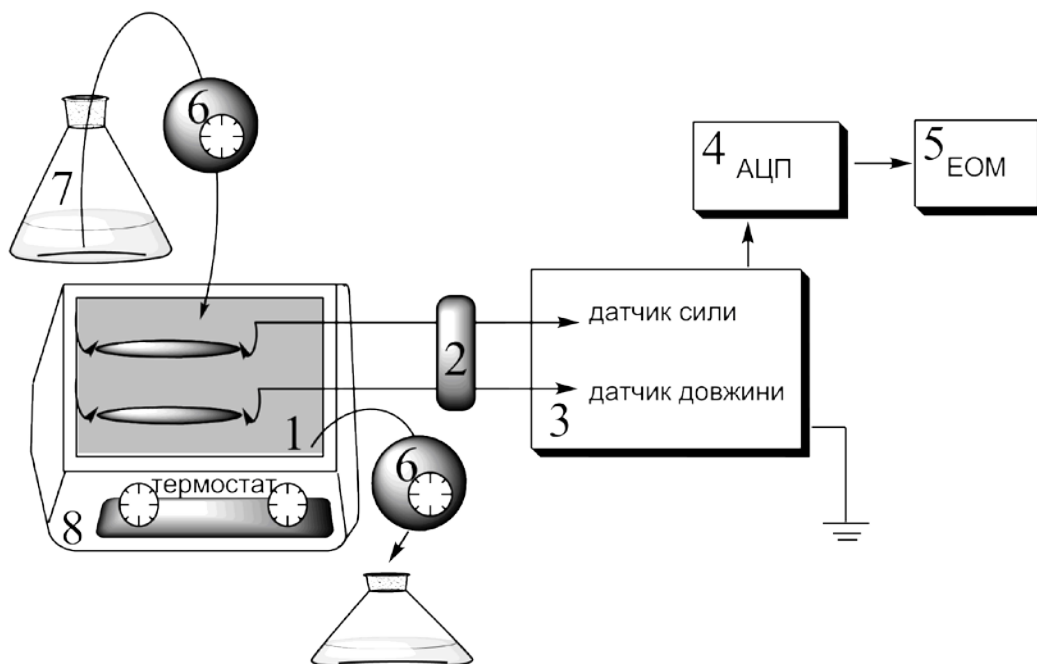
Дослідження специфічних впливів наночастинок оксиду цинку на міометрій – обмежені, і необхідні подальші дослідження, щоб повністю зрозуміти їх вплив. Наночастинки оксиду цинку потенційно можуть взаємодіяти з клітинами гладкої мускулатури матки та впливати на їхню функцію. Це може включати модуляцію скорочувальної здатності, клітинних сигнальних шляхів або експресії генів. Однак конкретні механізми та вплив наночастинок оксиду цинку на міометрій ще недостатньо вивчені. Саме це стало поштовхом до наших подальших досліджень [46].

## РОЗДІЛ 2

## МЕТОДИ ТА РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Вивчення скорочувальної активності багатоклітинних препаратів вісцеральних гладеньких м'язів

Дослідження механокінетичних властивостей ГМ шлунку було проведено на препаратах вісцеральної ГМ нелінійних білих щурів. Усі експерименти з тваринами були проведені з дотриманням норм, встановлених Європейським Співтовариством щодо гуманного поводження з лабораторними тваринами, а також відповідно до законодавства України. Щури були піддані ефірному наркозу відповідно до вимог. Для вимірювання скорочувальної активності ГМ було використано тензометричне обладнання, яке було спеціально розроблене та виготовлене в Інституті фізіології імені О.О. Богомольця НАН України (Рис. 2.1). Це обладнання дозволяє виміряти силу скорочення м'язових тканин, що дозволяє отримати детальні дані про їхню механокінетичну активність.



**Рис. 2.1.** Блок-схема для тензометричних експериментів на препаратах ГМК: 1 - робоча камера, з робочим розчином та ГМ препаратами

(попередньо закріпленні); 2 – датчики сили (для реєстрації в ізометричних умовах) та переміщення (реєстрація в ізотонічних умовах); 3 – підсилювач; 4 – аналого-цифровий перетворювач (АЦП); 5 – комп'ютер; 6 – перестальтичні насоси; 7 – набір робочих розчинів; 8 – рідинний термостат.

Під мікроскопом бінокулярного типу м'язи антрального відділу шлунку (*antrum*) були очищені від слизової оболонки та нарізані на смужки з середнім розміром 2 x 10 мм у кільцевому напрямку за допомогою мікроінструментів для очних операцій.

Процедури, пов'язані з підготовкою препаратів та проведенням тензометричних експериментів, були виконані в розчині Кребса. Склад цього розчину включав наступні компоненти: 120,4 мМ NaCl, 5,9 мМ KCl, 15,5 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub> та 11,5 мМ глюкози.

Готовий розчин мав рН значення 7,4, що відповідає нейтральному середовищу. Розчин Кребса використовується для забезпечення оптимальних умов для функціонування м'язової тканини і збереження її життєдіяльності під час експерименту.

Для досліджень були використані наночастинки середнього розміру 10 нм, синтезовані, охарактеризовані фізико-хімічними методами (були надані для досліджень Науковим центром «Наномедтех»).

М'язові препарати були поміщені в робочу камеру об'ємом 2 мл, яка була наповнена проточним розчином Кребса зі швидкістю протікання 5 мл/хв і підтримувалася при температурі 37 °С. Препарат був підданий пасивному натягу на рівні 10 мН і залишений на 1 годину до досягнення стабільної відтворюваності спонтанних скорочень. Після цього були зареєстровані спонтанні скорочення, які були піддані кінетичному аналізу. Скоротливу активність досліджували в ізометричному режимі з використанням тензометричного датчика сили. Сигнали були записані за допомогою аналого-цифрового перетворювача.

## 2.2. Механокінетичний аналіз спонтанних скорочень

Одне з можливих емпіричних співвідношень, яке може враховувати необхідні закономірності, що характерні для кривої скорочення-розслаблення м'язової тканини, може мати такий вигляд:

$$f = A \cdot t^n \cdot e^{-kt} \quad (2.1)$$

Це емпіричне співвідношення дозволяє описати залежність між силою скорочення м'язової тканини та часом, враховуючи експоненційний процес скорочення та розслаблення. Додатковий член  $A$  може використовуватися для коригування моделі залежно від конкретних умов експерименту або для врахування інших факторів, які можуть впливати на вимірювання.

Працюючи з даним співвідношенням, ми можемо отримати наступне:

$$A = \left(\frac{e}{\tau_0}\right)^n F_{max} = \left(\frac{ke}{n}\right)^n F_{max}, \quad (2.2)$$

$$\tau_0 = \frac{\tau_C + \tau_R}{2} = \frac{n}{k}, \quad (2.3)$$

$$\tau_C = \frac{n - \sqrt{n}}{k} \quad (2.4)$$

$$\tau_R = \frac{n + \sqrt{n}}{k} \quad (2.5)$$

Відповідно до вже виведеного рівнянь для сили  $f = F_C$  в точці перегину ( $t = \tau_C$ ) на рівні фази скорочення механокінетичної кривої отримуємо:

$$F_C = F_{max} \cdot \left(\frac{n - \sqrt{n}}{n}\right)^n \cdot e^{\sqrt{n}} \quad (2.6)$$

Для швидкості скорочення  $V = V_C$  в точці ( $t = \tau_C$ ), згідно співвідношенням, маємо:

$$V_C = k \cdot F_{max} \cdot \left(\frac{n - \sqrt{n}}{n}\right)^{n-1} \cdot \frac{e^{\sqrt{n}}}{\sqrt{n}} \quad (2.7)$$

Аналогічно для сили  $f = F_R$  в точці перегину ( $t = \tau_R$ ) на рівні фази розслаблення механокінетичної кривої маємо:

$$F_R = F_{max} \cdot \left(\frac{n + \sqrt{n}}{n}\right)^n \cdot e^{-\sqrt{n}} \quad (2.8)$$



а для швидкості розслаблення  $V_R$  в цій точці,

$$V_R = -k \cdot F_{max} \cdot \left(\frac{n+\sqrt{n}}{n}\right)^{n-1} \cdot \frac{e^{-\sqrt{n}}}{\sqrt{n}} \quad (2.9)$$

Згідно із залежностями на рівні фаз скорочення та розслаблення ГМ для значень імпульсів сили  $I_C$  та  $I_R$  у точках перегину з абсцисою  $\tau_C$  та  $\tau_R$  можна записати, відповідно:

$$I_C = F_{max} \cdot \left(\frac{n-\sqrt{n}}{n}\right)^{n+1} \cdot \frac{n}{k} \cdot e^{\sqrt{n}} \quad (2.10)$$

$$I_R = F_{max} \cdot \left(\frac{n+\sqrt{n}}{n}\right)^{n+1} \cdot \frac{n}{k} \cdot e^{-\sqrt{n}} \quad (2.11)$$

Для імпульсу сили  $I$  у випадку повної механокінетичної кривої маємо співвідношення:

$$I_{\tau_0} = F_{max} \cdot \tau_0 = F_{max} \cdot \frac{n}{k} \quad (2.12)$$

Для проведення аналізу повного профілю окремих спонтанних скорочень, їх привели до лінійної форми в координатах  $\left[ \ln\left(\frac{f_R}{f_C}\right); \ln\left(1 + \frac{\Delta t}{t}\right) \right]$ , у цій формі координат:  $f$  і  $t$  – представляють миттєві значення сили і часу під час циклу скорочення,  $F_C$  і  $F_R$  – відповідають значенням сили на точках згину механограми під час фаз скорочення (від початку зростання сили до її максимального значення  $F_{max}$ ) і розслаблення (від  $F_{max}$  і до її повернення на базальний рівень),  $\Delta t$  – це фіксований заданий інтервал часу, (який варіюється у межах 5-10 секунд. За допомогою лінійних графіків, які отримані з цих координат, визначаються константи  $k$  і  $n$ . Ці константи потім використовуються для розрахунку різних параметрів, включаючи: часових ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ) які відповідають різним фазам скорочення і розслаблення, силових ( $F_{max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ) які представляють максимальну силу та значення сили в точках згину механограми, швидкісних ( $V_C$  і  $V_R$ ) які характеризують швидкість скорочення і розслаблення та імпульсних ( $I_{max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) параметрів які представляють імпульси скорочення і розслаблення.

Ці параметри є важливими для оцінки кінетичних характеристик скорочення та розслаблення ГМ. Використання лінійних графіків і констант  $k$

і  $n$  дозволяє отримати кількісні значення цих параметрів, що сприяє більш детальному аналізу механокінетичних властивостей скорочення і розслаблення м'язів.

### 2.3. Аналіз викликаних скорочень за методом Костеріна-Бурдиги

Для аналізу кінетичних закономірностей процесів скорочення та розслаблення препаратів ГМ, було проведено окремий аналіз на рівні фаз скорочення та розслаблення повної механокінетичної кривої. Для цього був використаний модифікований метод, запропонований С.О. Костеріним та Ф.В. Бурдиги [22]. Зазначений метод базується на припущенні, що фаза розслаблення окремого скорочення може бути описана емпіричним рівнянням:

$$f = f_m \frac{\tau^n}{\tau^n + t^n}, \quad (2.13)$$

де:

$f$  – миттєва сила скорочування ГМ (у момент часу  $t$ );

$f_m$  – максимальна сила фазового скорочення ГМ;

$\tau$  – характеристичний час скорочувальної відповіді (момент часу, в яких миттєва сила розслаблення м'язу за якого  $f = 1/2 f_m$ );

$n$  – логарифмічний декремент крутизни механокінетичної кривої, тобто  $n = d\{\ln[(f_m - f)/f]\}/dt$ .

Час, за який досягається  $f_m$ , вважається початковою точкою для фази розслаблення ( $t = 0$ ), тоді як поточному значенню часу  $t$  відповідає значення миттєвої сили  $f$ .

Лінеризоване рівняння (2.13) має наступний вигляд:

$$\left\{ \ln \left( \frac{f_m - f}{f} \right); \ln t \right\} \quad (2.14)$$

Тоді фазу розслаблення можна лінеаризувати у координатах  $\left\{ \ln \left( \frac{f_m - f}{f} \right); \ln t \right\}$ ; за допомогою даної формули можна визначити  $\tau$  та  $n$ .

Значення  $n$  і  $\tau$  використовуються для розрахунку нормованої максимальної швидкості фази розслаблення ( $V_n$ ):

$$V_n = \frac{(n-1)^{\frac{n-1}{n}} \cdot (n+1)^{\frac{n+1}{n}}}{4n\tau} \quad (2.15)$$

Важливо підкреслити, що параметр нормованої максимальної швидкості (2.15) є незалежним від амплітуди скорочення. Це робить його цінним інструментом для порівняння даних, отриманих з різних препаратів. Незалежність від амплітуди означає, що цей параметр може бути використаний для порівняння механокінетичних характеристик скорочення, незалежно від індивідуальних розмірів або сили скорочення.

Використання незалежних від амплітуди параметрів дозволяє отримати об'єктивні результати і встановити загальні закономірності, що спрощує порівняння даних і розуміння механізмів, що визначають механокінетичні властивості скорочення м'язів.

## 2.4. Статистичний аналіз

Методи варіаційної статистики використовуються для аналізу даних, тобто вивчення розподілу та залежностей між різними параметрами. MS Excel та Origin 2018 є програмним забезпеченням, що забезпечує зручний та швидкий аналіз даних, а також побудову графіків та діаграм. Кінетичні та статистичні розрахунки використовуються для визначення швидкості процесів, оцінки точності та достовірності результатів дослідження.

У процесі дослідження, кінетичні та статистичні розрахунки використовуються для визначення швидкості процесів, оцінки точності та достовірності отриманих результатів. Для перевірки вибірок на їх приналежність до нормального розподілу, застосовувався критерій Шапіро-

Уїлка. Цей критерій дозволяє визначити, наскільки добре вибірка підпорядковується нормальному розподілу.

Для визначення вірогідних відмінностей між середніми значеннями вибірок використовували t-критерій Стюдента, який дозволяє порівнювати середні значення двох вибірок і знаходити ймовірність того, що вони різні. У всіх випадках було встановлено значущість різниці за умови  $p < 0.05$ . Для оцінки достовірності апроксимації даних лінійною функцією використовувався F-критерій Фішера. Цей критерій дозволяє оцінити достовірність апроксимації даних лінійною функцією. Коефіцієнти детермінації ( $R^2$ ) були не менші за 0,97, що свідчить про високу точність апроксимації.

Результати були представлені у вигляді середнього арифметичного значення  $\pm$  стандартна похибка середнього. Кількість дослідів (n) також була зазначена.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

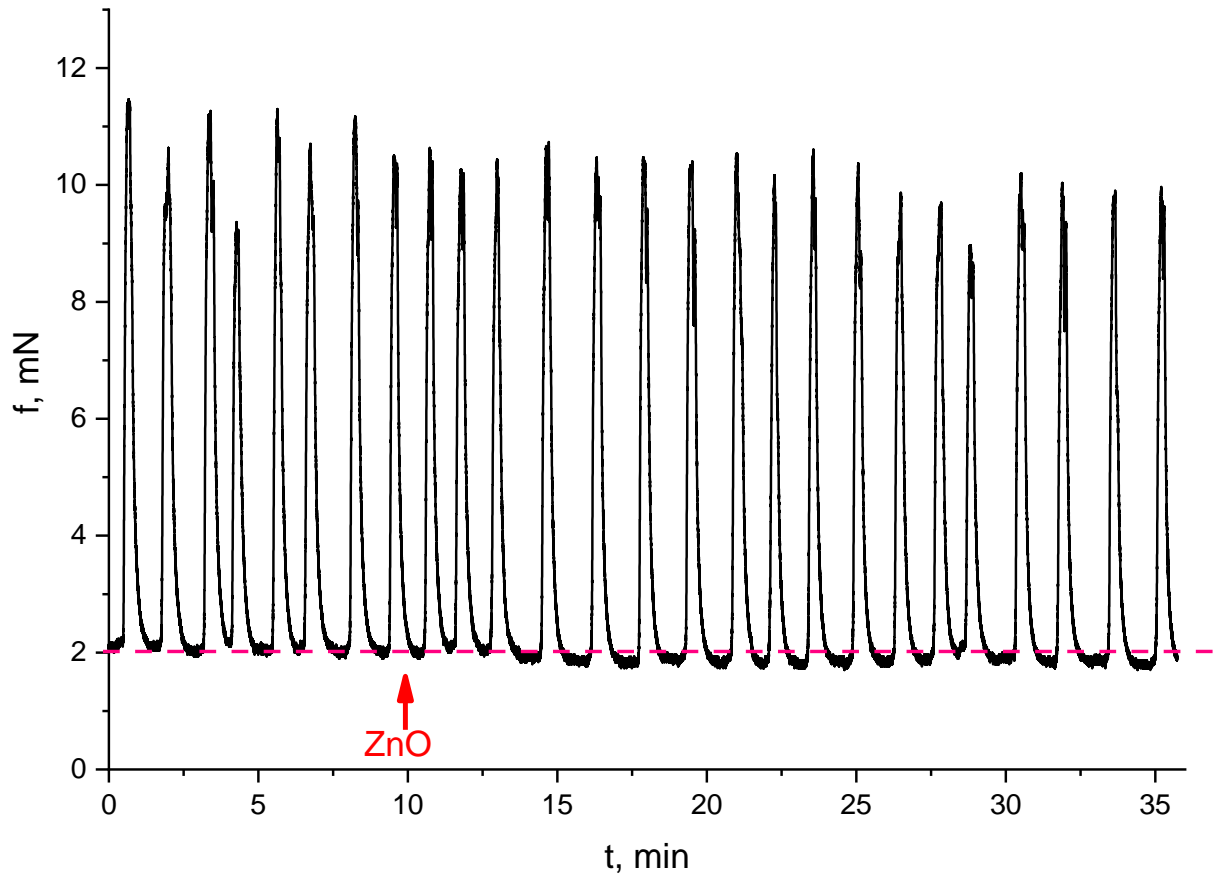
#### 3.1. Вивчення дії *in vitro* нанорозмірного ZnO на спонтанні ізометричні та ізотонічні скорочення міометрія щурів

##### 3.1.1. Аналіз модуляції ізометричних спонтанних скорочень на тлі нано-ZnO

Як фізико-хімічні, так біологічні властивості нано-ZnO, згідно даних літературних джерел, значною мірою визначаються великою площею поверхні, здатністю спричиняти генерування АФК, зарядовими властивостями поверхні, а також розчинністю у полярних розчинниках із дисоціацією з їх поверхні іонів  $Zn^{2+}$  [26].

Ізометричні спонтанні скорочення мультиклітинних препаратів поздовжніх гладеньких м'язів міометрія щурів суттєво пригнічувалися на тлі суспензії нано-ZnO (середній розмір частинок 25 нм) (Рис. 3.1). Так, через 15 хв від початку інкубації м'язів у присутності  $10^{-3}$  мг/мл ZnO відбувалося зниження тону м'язових препаратів, пригнічення амплітуди спонтанних скорочень у середньому до  $84,7 \pm 2,6$  % ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ) та зниження їх частоти до  $72,4 \pm 5,8$  % ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ).

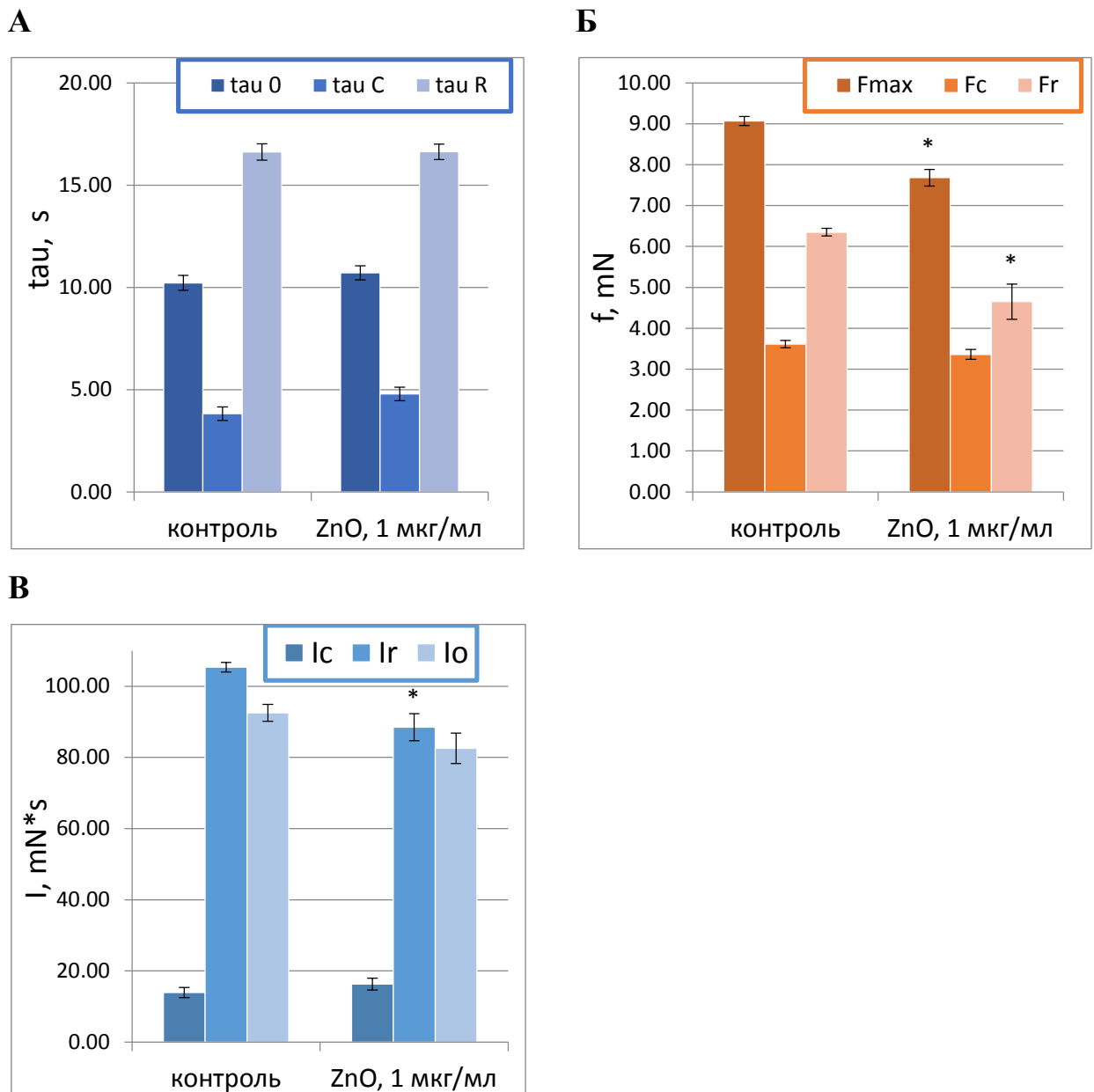
Надалі спонтанні скорочення у контролі та за дії ZnO були проаналізовані методом комплексного механокінетичного аналізу [9]; у випадку дослідження ефектів ZnO до аналізу були обрані фрагменти механограм від 15 до 25 хв від початку аплікування наночастинок. Встановлено, що ZnO не змінював показники часових параметрів (Рис. 3.2 А). Так, час досягнення амплітуди  $\tau_c$  у середньому становив  $104,8 \pm 3,2$  % ( $n=7$ ,  $p>0.05$ ), тоді як часові показники у випадку досягнення максимальних швидкостей фаз набували значень для скорочення  $125,4 \pm 6,9$  % ( $n=7$ ,  $p>0.05$ ) та для розслаблення відповідно  $100,1 \pm 2,3$  % ( $n=7$ ,  $p>0.05$ ).



**Рис. 3.1.** Типова механограма спонтанних скорочень поздовжніх гладеньких м'язів міометрія щурів в умовах дії *in vitro* нано-ZnO (концентрація наноматеріалу у розчині  $10^{-3}$  мг/мл).

Аналізом силових параметрів встановлено, що на тлі нано-ZnO суттєво зменшується (у середньому до  $73,2 \pm 9,3$  % ( $n=7$ ,  $p<0.05$ )) показник сили, за якої спостерігається максимальна швидкість фази розслаблення ( $F_R$ ), тоді як відповідне значення сили на фазі скорочення ( $F_C$ ) було на рівні контролю і у середньому становило  $93,1 \pm 3,5$  % ( $n=7$ ,  $p>0.05$ ) (Рис. 3.2 Б).

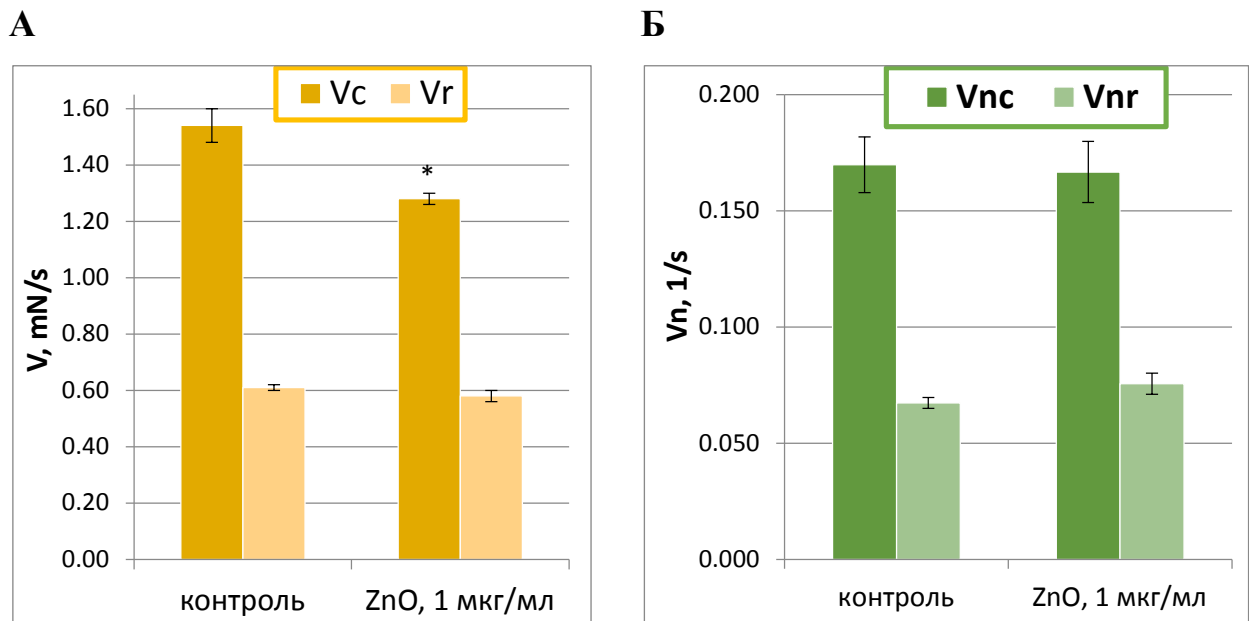
Що стосується імпульсних параметрів, то на тлі нано-ZnO суттєво змінювався лише імпульс сили на фазі розслаблення ( $I_R$ ) і у середньому становив  $84,0 \pm 4,3$  % ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ), тоді як інші імпульсні параметри ( $I_C$  та  $I_{max}$ ) загалом залишалися без змін (Рис. 3.2 В).



**Рис. 3.2** Механокінетичні параметри спонтанних скорочень міометрія щурів у контролі та за дії *in vitro* нано-ZnO (концентрація наноматеріалу у розчині  $10^{-3}$  мг/мл): А – часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ); Б – силові параметри ( $F_{max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ); В – імпульсні параметри ( $I_{max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ).  $n = 7$ ; \* -  $p < 0.05$  – різниця достовірна щодо контролю.

Оскільки надзвичайно інформативним щодо молекулярних механізмів дії ефektorів на м'язи є аналіз швидкостей процесів скорочення-розслаблення, надалі у роботі визначали параметри абсолютних максимальних швидкостей фаз скорочення ( $V_C$ ) і розслаблення ( $V_R$ ), а також нормованих на амплітуду максимальних швидкостей (відповідно  $V_{nc}$  і  $V_{nr}$ )

(Рис. 3.3). Встановлено, що на тлі nano-ZnO суттєво зменшувався параметр  $V_C$  (у середньому до  $82,9 \pm 1,7 \%$ ,  $n=7$ ,  $p<0.05$ ), втім, нормування цього показника на амплітуду нівелювало ефекти наночастинок (Рис. 3.3 Б).

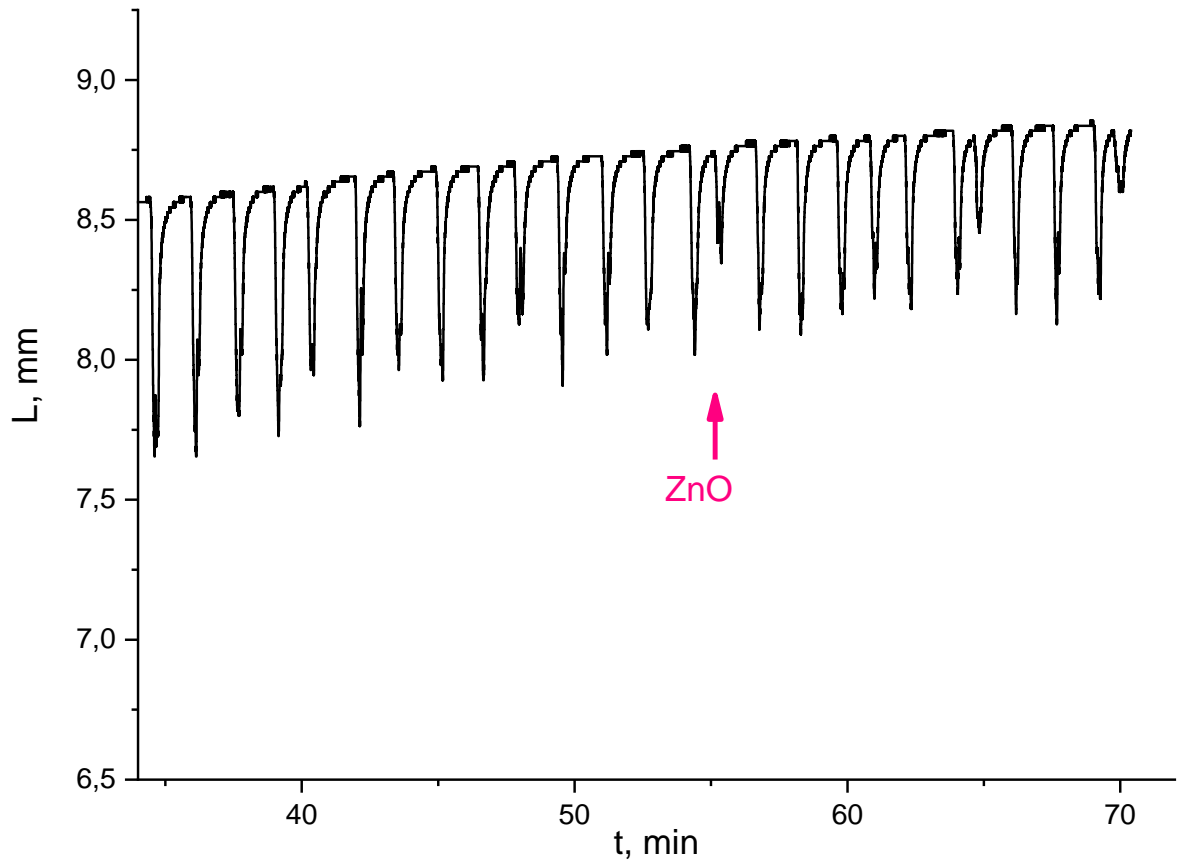


**Рис. 3.3** Швидкісні параметри спонтанних скорочень міометрія щурів у контролі та за дії *in vitro* nano-ZnO (концентрація наноматеріалу у розчині  $10^{-3}$  мг/мл): А – максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення ( $V_C$  і  $V_R$ ); Б – нормовані максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення ( $V_{nc}$  і  $V_{nr}$ ).  $n = 7$ ; \* -  $p<0.05$  – різниця достовірна щодо контролю.

### 3.1.2. Аналіз модуляції ізотонічних спонтанних укорочень на тлі nano-ZnO

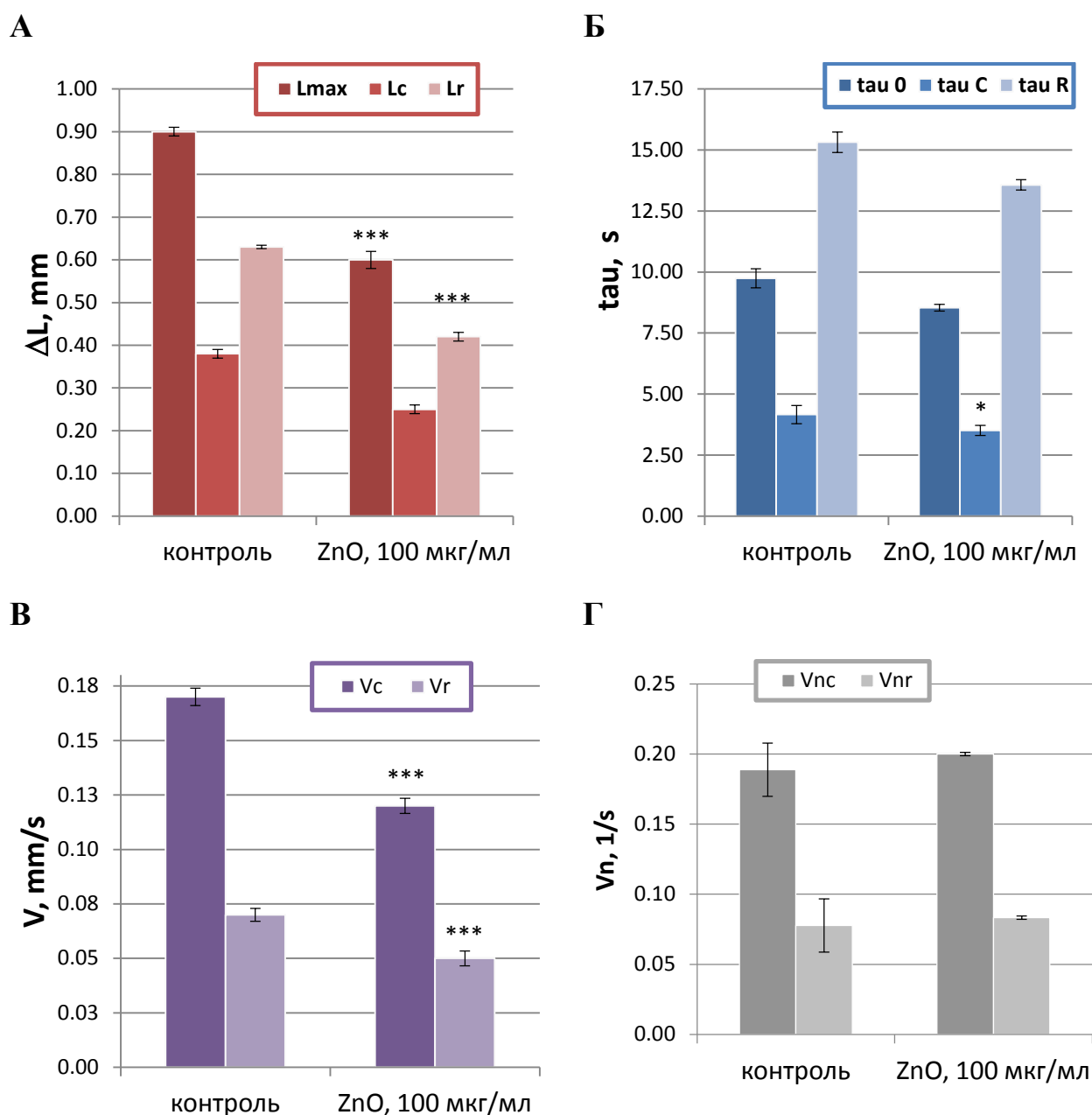
У випадку якщо відбулась реєстрація спонтанної скорочувальної активності міометрія у ізотонічному режимі (в умовах ізотонічних укорочень за постійного навантаження препаратів 10 мН) на тлі суспензії наночастинок ZnO також спостерігалось пригнічення амплітуди, причому воно було суттєво більш вираженим порівняно з ізометричним режимом реєстрації (Рис. 3.4).





**Рис. 3.4.** Типова механограми спонтанних ізотонічних укорочень поздовжніх ГМ міометрія щурів в умовах дії *in vitro* нано-ZnO (концентрація наноматеріалу у розчині  $10^{-3}$  мг/мл).

На відміну від ізометричних скорочень, де достовірно зменшувалися лише  $F_{\max}$  та  $F_R$ , за даних умов були достовірно знижені усі параметри укорочення ( $\Delta L_{\max}$ ,  $\Delta L_C$  та  $\Delta L_R$ ). Так, за дії наночастинок у концентрації  $10^{-3}$  мг/мл спостерігалось зменшення амплітуди укорочень у середньому до  $66,3 \pm 2,6$  % ( $n=7$ ,  $p<0.001$ ) (Рис. 3.5А). За даних умов частота спонтанних укорочень суттєво не змінювалася. Встановлено, що за дії нано-ZnO в однаковій мірі (у середньому на третину) також зменшувалися параметри укорочень в точках перегину  $\Delta L_C$  та  $\Delta L_R$ ) (Рис. 3.5 А).



**Рис. 3.5** Механокінетичні параметри спонтанних ізотонічних укорочень міомерія щурів у контролі та за дії *in vitro* нано-ZnO (концентрація наноматеріалу у розчині  $10^{-3}$  мг/мл): А – параметри укорочення ( $\Delta L_{max}$ ,  $\Delta L_C$  та  $\Delta L_R$ ); Б – часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ); В – абсолютні швидкісні параметри ( $V_C$  і  $V_R$ ) і Г – нормовані швидкісні параметри ( $V_{nc}$  і  $V_{nr}$ ).  $n = 7$ ; \* -  $p < 0.05$  – різниця достовірна щодо контролю.

Ми бачимо, як за даних умов залишалися без змін показники характеристичних часів укорочення ( $\tau_C$ ) і розслаблення ( $\tau_R$ ), середні значення яких становили  $84,6 \pm 5,8$  % та  $88,6 \pm 1,6$  % ( $n=7$ ,  $p > 0.05$ ). Разом з

тим, часовий параметр амплітуди ( $\tau_{\max}$ ) був статистично достовірно менший від аналогічного контрольного показника ( $87,7 \pm 1,6$ ,  $n=7$ ,  $p<0.05$ ) (Рис. 3.5 Б).

У випадку швидкісних параметрів ізотонічних укорочень на тлі наночастинок ZnO було виявлено суттєве і у однаковій мірі зниження показників абсолютних швидкостей  $V_C$  і  $V_R$  (вони становили  $74,7 \pm 3,9$  % і  $73,7 \pm 5,4$  % відповідно; у обох випадках,  $n=7$ ,  $p<0.01$ ), тоді як нормування максимальних швидкостей на амплітуду укорочення нівелювало ефекти цих наноматеріалів на обидва параметри. Під час аналізу даних було виявлено, що параметр нормованої максимальної швидкості фази укорочення ( $V_{nc}$ ) у середньому становив  $105,9 \pm 4,1$  ( $n=7$ ,  $p>0.05$ ). Аналогічний параметр для фази розслаблення ( $V_{nr}$ ) був на рівні  $107,1 \pm 5,7$  ( $n=7$ ,  $p>0.05$ ).

Загалом, результати досліджень короткотривалого впливу нано-ZnO на скорочувальну функцію міометрія щурів вказують на ймовірну відсутність вибіркової дії наночастинок ZnO на процеси активного транспорту іонів  $Ca^{2+}$  в міоцитах та дозволяють передбачити, що присутність цього наноматеріалу змінює (зменшує) кількість  $Ca^{2+}$  в міоцитах за рахунок зменшення його входу через потенціалкеровані  $Ca^{2+}$ -канали.

### 3.1.3. Дослідження викликаних скорочень міометрія на тлі нано-ZnO

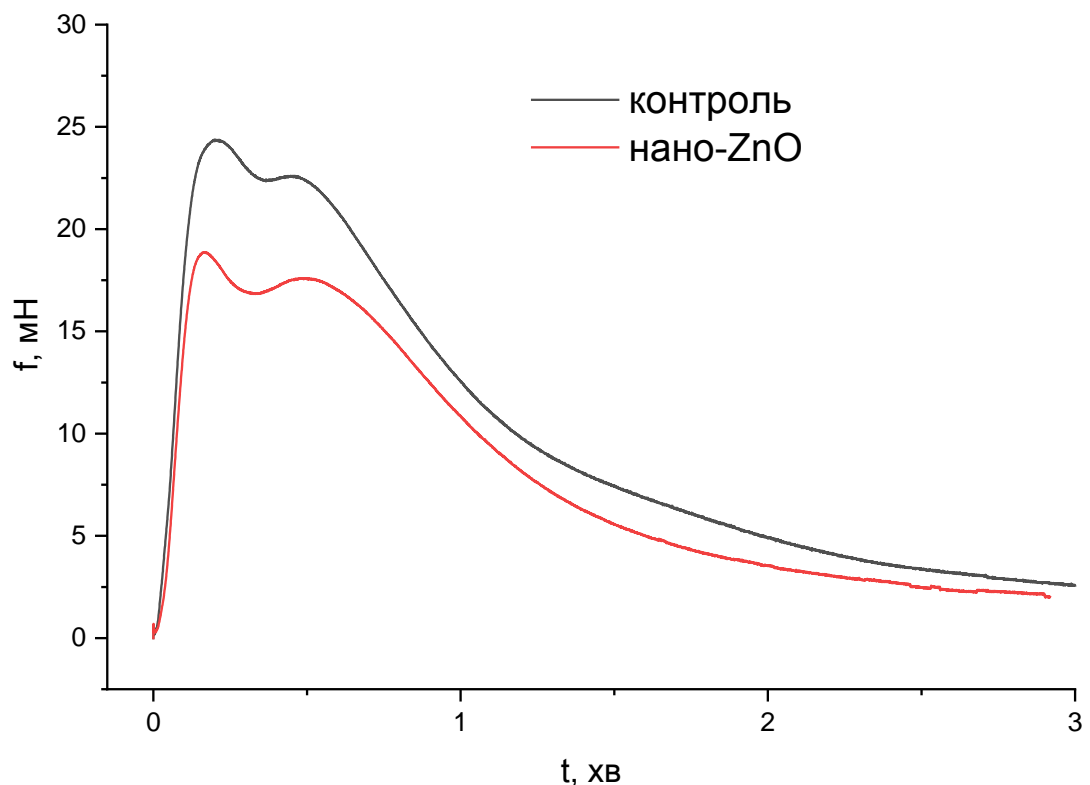
Для з'ясування можливої дії наночастинок ZnO на системи плазматичної мембрани міоцитів, які залучені у регуляцію тонуру і скорочувальної функції міометрія, на наступному етапі було досліджено скорочення, індуковані активацією надходження в міоцити іонів  $Ca^{2+}$  через іонні канали (зручною і адекватною моделлю є активація потенціалкерованих  $Ca^{2+}$ -каналів плазматичної мембрани деполяризацією гіперкалієвим розчином), а також фармако-механічного спряження збудження-скорочення внаслідок дії на рецептори плазматичної мембрани гормону-утеротоніка – окситоцину. У випадку активації скорочень окситоцином передавання

сигналу до міоплазми опосередковується через  $G_{q/11}$ -протеїни, стимулювання активності фосфоліпази  $C\beta$  та напрацювання вторинних месенджерів – інозитол-1,4,5-трифосфату (ІТФ) та диацилгліцеролу (ДАГ). Саме ІТФ-залежний викид  $Ca^{2+}$  з саркоплазматичного ретикулуму визначає процес скорочення та особливості фазного компонента окситоцин-активованих скорочень. Кінетика особливості тонічного компонента окситоцинових скорочень в більшій мірі залежать від процесів енергозалежного викачування іонів  $Ca^{2+}$  з міоплазми.

На попередніх етапах досліджень було встановлено, що суспензія нанозnO суттєво пригнічує ізометричні та ізотонічні спонтанні скорочення мультіклітинних гладеньком'язових препаратів матки щурів. Також встановили, що за дії цього наноматеріалу на тлі зменшення тонуусу і зниження амплітуди спонтанної механічної активності спостерігаються значні зміни окремих механокінетичних параметрів скорочень, зокрема, зниження амплітудних ( $F_{max}$ ,  $F_C$ ,  $F_R$ ,  $\Delta L_{max}$ ,  $\Delta L_C$  та  $\Delta L_R$ ) та швидкісних ( $V_C$  і  $V_R$ ) параметрів спонтанних скорочень. Оскільки зазначені ефекти могли обумовлюватися впливом наночастинок на окремі ланки спряження збудження-скорочення, на даному етапі нами було досліджено та проаналізовано механокінетичні ефекти цього наноматеріалу на параметри скорочень міометрія, індукованих за шляхами електромеханічного (модель активації надходження іонів  $Ca^{2+}$  внаслідок гіперкалієвої деполяризації плазматичної мембрани) та фармакомеханічного (ключовий природній утеротонік – гормон окситоцин) спряження збудження-скорочення.

Наноматеріал використовували у концентрації  $10^{-3}$  мг/мл. Аналіз для розпізнавання кінетичних закономірностей під час скорочень (zareєстрованих через 15 хв після початку аплікування ZnO) здійснювали відповідно до методу Костеріна-Бурдиги розрахунку нормованих на амплітуду максимальних швидкостей фаз скорочення ( $V_{nc}$ ) та розслаблення ( $V_{nr}$ ).

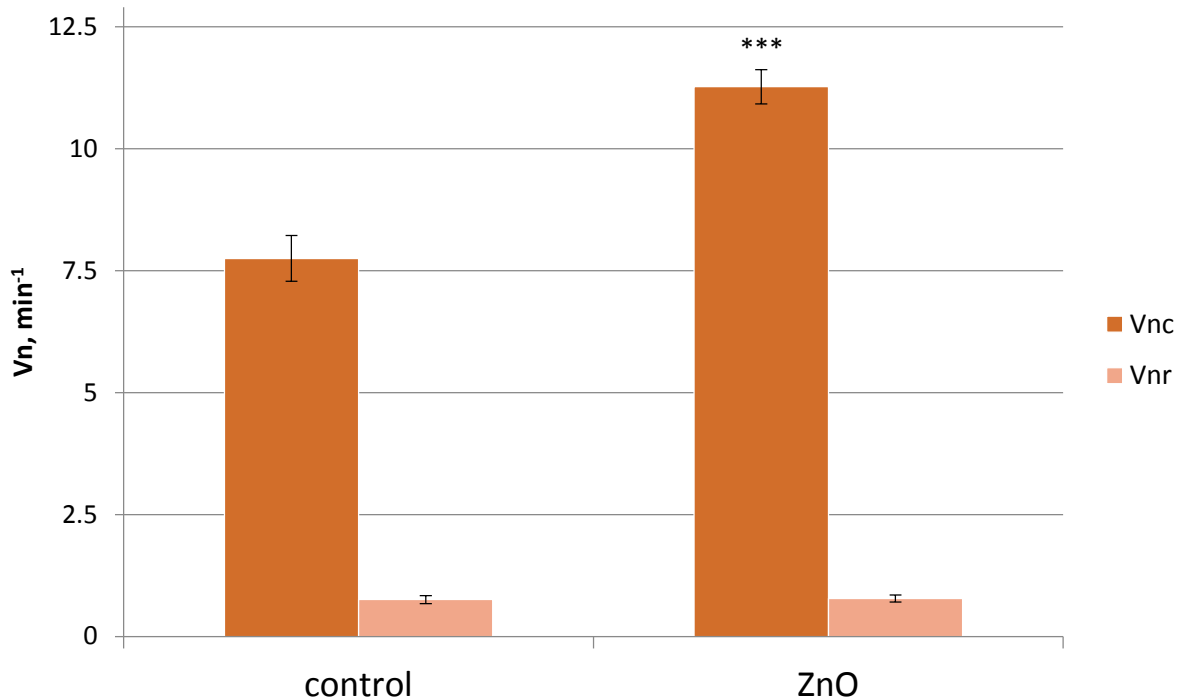
На тлі дії суспензії нано-ZnO спостерігалось суттєве зниження амплітуди скорочення препаратів міометрія, активованого аплікуванням гіперкалієвого розчину (80 мМ), причому тонічна фаза цих скорочень залишалася без змін (Рис. 3.6). Таким чином, спостерігалось суттєве пригнічення фазного компоненту (амплітуди) скорочень у середньому до  $77,1 \pm 5,9 \%$  ( $n=5$ ,  $p<0.01$ ), тоді як тонічний компонент був на рівні  $101,9 \pm 6,8 \%$  ( $n=5$ ,  $p>0.05$ ).



**Рис. 3.6** Типові механограми викликаних гіперкалієвим розчином (80 мМ) скорочень міометрія щурів у контролі та за дії *in vitro* нано-ZnO (концентрація наноматеріалу у розчині  $10^{-3}$  мг/мл, тривалість попередньої інкубації 15 хв).

Надалі скорочення у контролі та за дії наночастинок ZnO були проаналізовані методом механокінетичного аналізу Костеріна-Бурдиги. Встановлено, що на тлі наноматеріалу суттєво збільшується показник нормованої максимальної швидкості фази скорочення ( $V_{nc}$ ) (становить у середньому  $145,4 \pm 4,9 \%$ ,  $n=5$ ,  $p<0.001$ ), тоді як відповідний показник фази

розслаблення залишається на контрольному рівні (становить у середньому  $103,2 \pm 6,3 \%$ ,  $n=5$ ,  $p>0.05$ ) (Рис. 3.7).



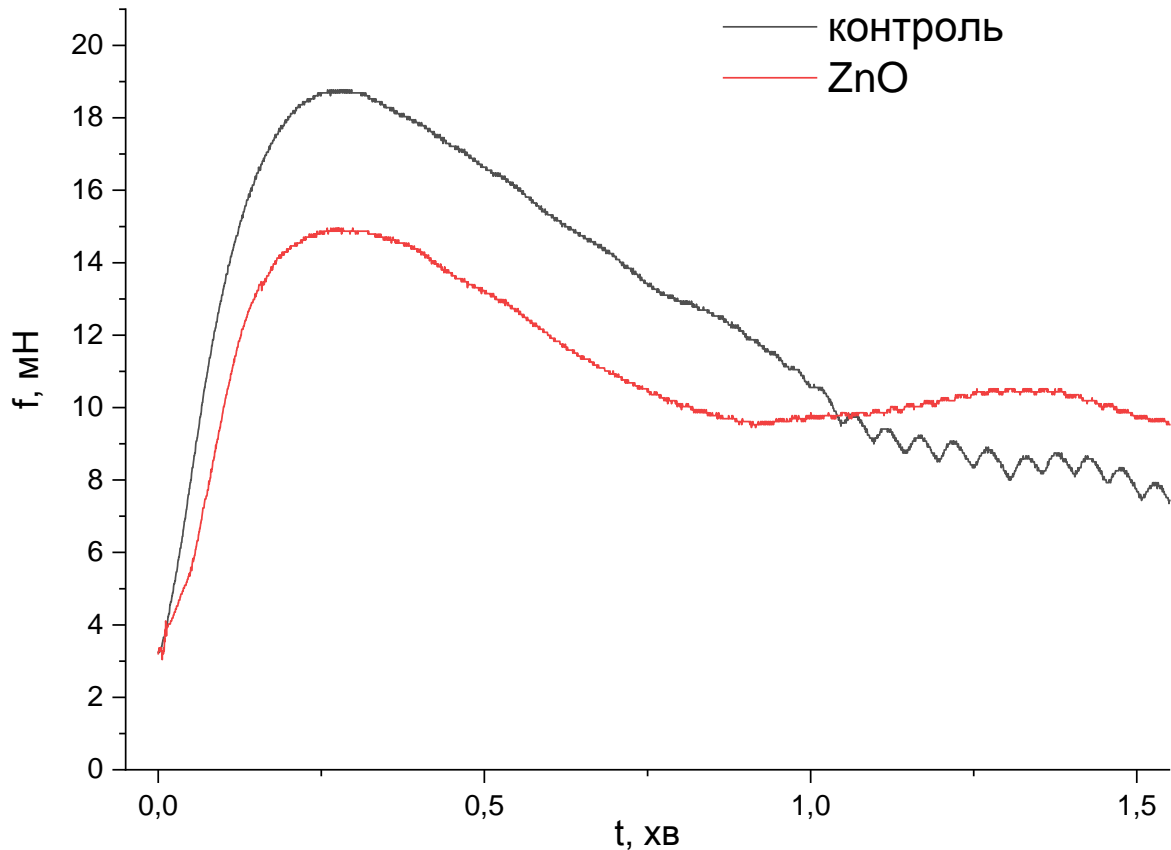
**Рис. 3.7** Параметри нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення ( $V_{nc}$ ) та розслаблення ( $V_{nr}$ ) викликаних гіперкалієвим розчином (80 мМ) скорочень міометрія щурів у контролі та за попередньої інкубації препаратів на тлі наночастинок ZnO ( $10^{-3}$  мг/мл, тривалість попередньої інкубації 15 хв;  $n = 5$ ). \*\*\* -  $p<0.001$  – різниця достовірна щодо контролю.

Як відомо, гіперкалієве скорочення є зручною фізіологічною моделлю для перевірки функціонування потенціалкерованих  $Ca^{2+}$ -каналів плазматичної мембрани, які у скорочувальних клітинах матки представлені L-типом [3]. Тож ми маємо всі підстави передбачити, що пригнічення скорочень міометрія, індуковані нано-ZnO обумовлюються фізико-хімічними властивостями цього наноматеріалу, адже відомо, що у водних розчинах з його поверхні дисоціюють іони  $Zn^{2+}$ , які є відомими інгібіторами потенціалкерованих  $Ca^{2+}$ -каналів L-типу [39]. Також на користь цього припущення вказують результати механокінетичного аналізу, адже в умовах впливу нано-ZnO спостерігалися зміни кінетики лише фази скорочення.

Окситоцин, який є основним утеротонічним гормоном, контролює стимуляцію та рівень механічного напруження матки. Рецептори окситоцину відносяться до групи метаботропних рецепторів. Вони переважно зв'язані з рецепторами Gq/11, а головним ефекторним ензимом цих рецепторів є фосфоліпаза С-β. Цей ензим розщеплює фосфатидилінозитолдифосфат, утворюючи два вторинних посередники - Інозитолтрифосфат (ІТФ) та діацилгліцерол (ДАГ). Обидва ці посередники беруть участь у фізіологічній реакції на окситоцин. Головний тип рецепторів ІТФ в саркоплазматичному ретикулумі (СР) матки - ІТФР1.

Окситоцин викликає швидке та транзиторне збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію  $Ca^{2+}$ , що супроводжується практично повним виливанням кальцію з депо. Цей процес сприяє, активації контрольованого виливання кальцію зовнішньої середовища в клітину та активації процесів відновлення концентрації кальцію в СР.

У випадку активації скорочувальної активності міометрія головним утеротонічним гормоном окситоцином також спостерігалось пригнічення амплітуди скорочень (Рис. 3.8).



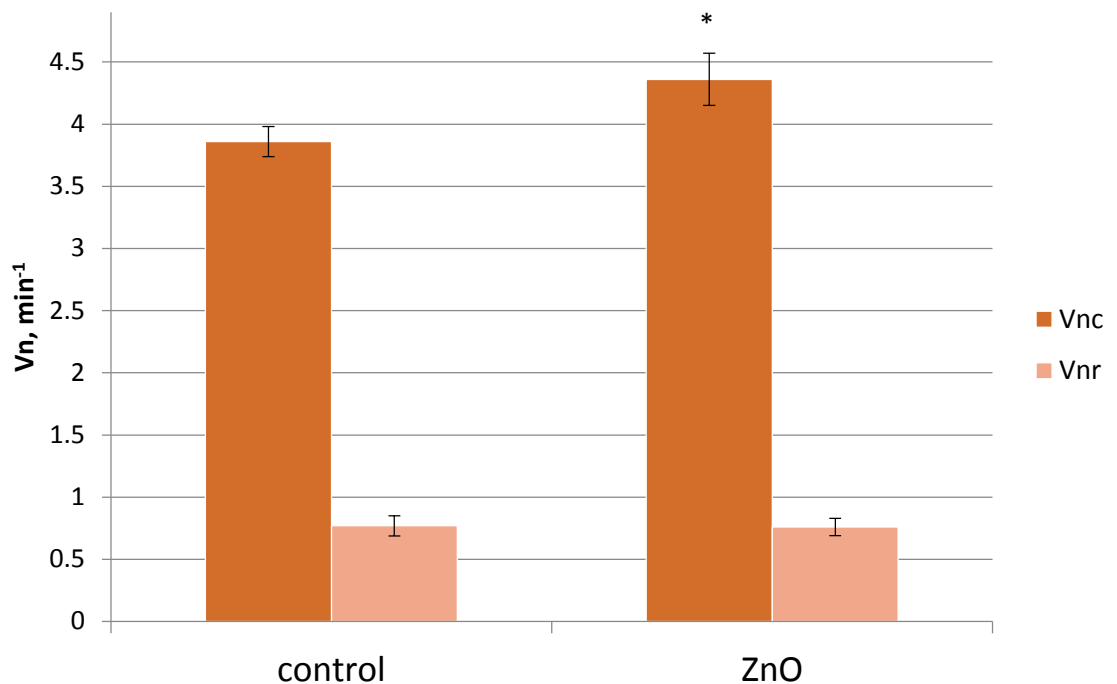
**Рис. 3.8** Типові механограми викликаних окситоцином (0,1 МО) скорочень міометрія шурів у контролі та за дії *in vitro* нано-ZnO (концентрація наноматеріалу у розчині  $10^{-3}$  мг/мл, тривалість попередньої інкубації 15 хв).

Подібно до випадку гіперкалієвого скорочення, на тлі суспензії нано-ZnO спостерігалось суттєве зниження амплітуди фазного компоненту (у середньому до  $65,4 \pm 6,9$  %,  $n=5$ ,  $p<0.01$ ) окситоцин-індукованих скорочень міометрія за збереження тонічного компоненту без змін (у середньому  $103,8 \pm 4,6$  %,  $n=5$ ,  $p>0.05$ ).

Також у випадку окситоцин-індукованих скорочень ми спостерігали подібні ефекти щодо нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення та розслаблення: показник швидкості фази скорочення ( $V_{nc}$ ) достовірно зростав у середньому до  $112,94 \pm 3,2$  %,  $n=5$ ,  $p<0.05$ ), тоді як відповідний



показник фази розслаблення не зазнавав змін (у середньому  $98,7 \pm 4,1 \%$ ,  $n=5$ ,  $p>0.05$ ) (Рис. 3.9).



**Рис. 3.9** Параметри нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення ( $V_{nc}$ ) та розслаблення ( $V_{nr}$ ) викликаних окситоцином (0,1 МО) скорочень міометрія щурів у контролі та за попередньої інкубації препаратів на тлі наночастинок ZnO ( $10^{-3}$  мг/мл, тривалість попередньої інкубації 15 хв;  $n = 5$ ). \* -  $p<0.05$  – різниця достовірна щодо контролю.

Отже отримані результати дозволяють передбачити, що механізмом модуляції скорочувальної активності поздовжніх гладеньких м'язів міометрія щурів в умовах коротко часової аплікації *in vitro* є часткове пригнічення потенціалкерованих  $Ca^{2+}$ -каналів плазматичної мембрани іонами  $Zn^{2+}$ , які дисоціюють у розчин з поверхні наночастинок ZnO.

## 3.2 Вивчення дії *in vitro* нанорозмірного ZnO на скорочувальну активність антрального відділу шлунку щурів

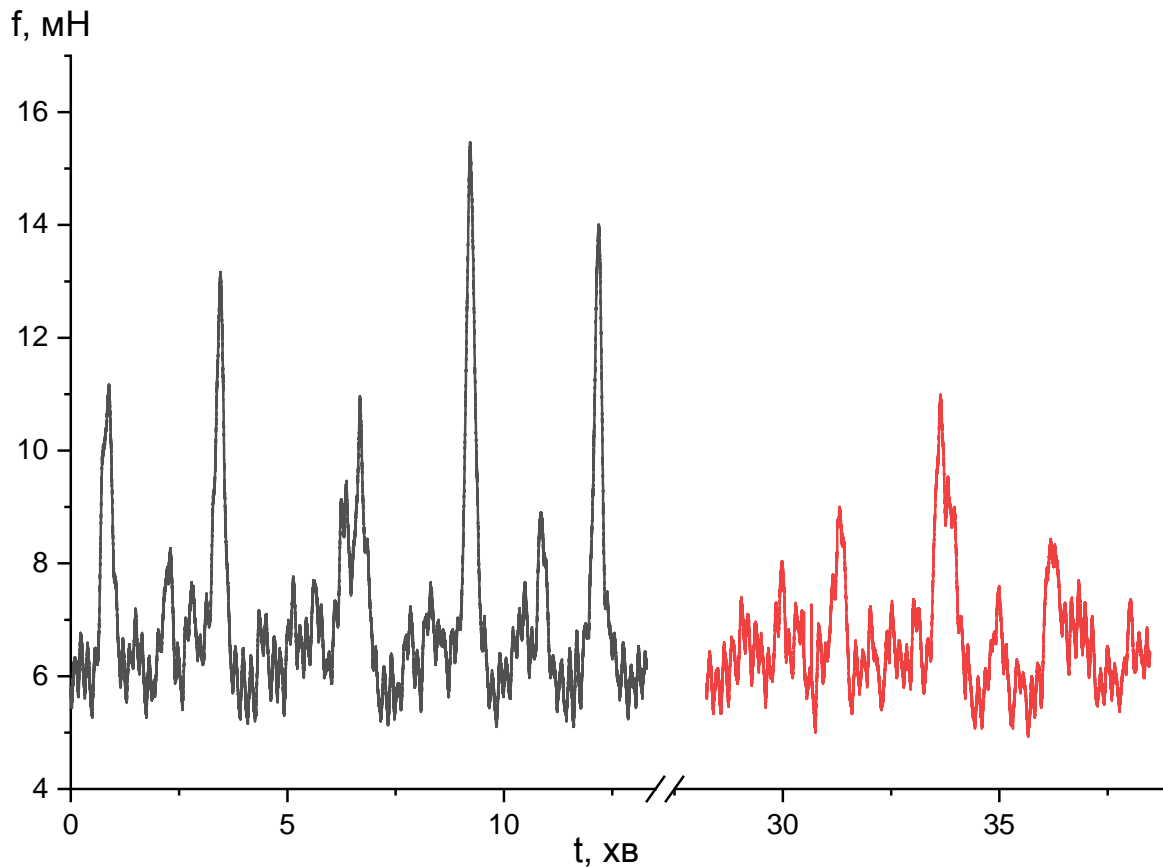
### 3.2.1. Аналіз модуляції ізометричних спонтанних скорочень на тлі нано-ZnO

При проходженні по травному тракту нанорозмірні ксенобіотики мають можливість проникати через ендотеліальний бар'єр, при цьому частина з них накопичується безпосередньо в тканинах стінки шлунка і кишечника, а інші частинки поширюються з током крові, накопичуючись у периферичних тканинах з вираженою вибірковістю. Зокрема, підвищені кількості наноматеріалів виявляють у тканинах вісцеральних гладеньких м'язів (травної трубки і міометрія) [49]. Тому надзвичайно важливою медико-біологічною задачею є вивчення закономірностей і механізмів дії промислово поширених наноматеріалів на функціонування цих тканин.

Було здійснено визначення закономірностей модуляції спонтанних і викликаних скорочень антрального відділу шлунку щурів за короткотривалого (упродовж 15 хв) впливу нано-ZnO.

Спонтанну скорочувальну активність препаратів кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку реєстрували в ізометричному режимі. Аналіз кінетичних закономірностей скорочень здійснювали відповідно до методу емпіричного багатопараметричного аналізу за допомогою якого відбувався розрахунок часових ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ), силових ( $F_{max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ), швидкісних ( $V_C$  і  $V_R$ ), імпульсних ( $I_C$ ,  $I_R$  та  $I_{max}$ ) а також нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення та розслаблення ( $V_{nc}$  та  $V_{nr}$ ).

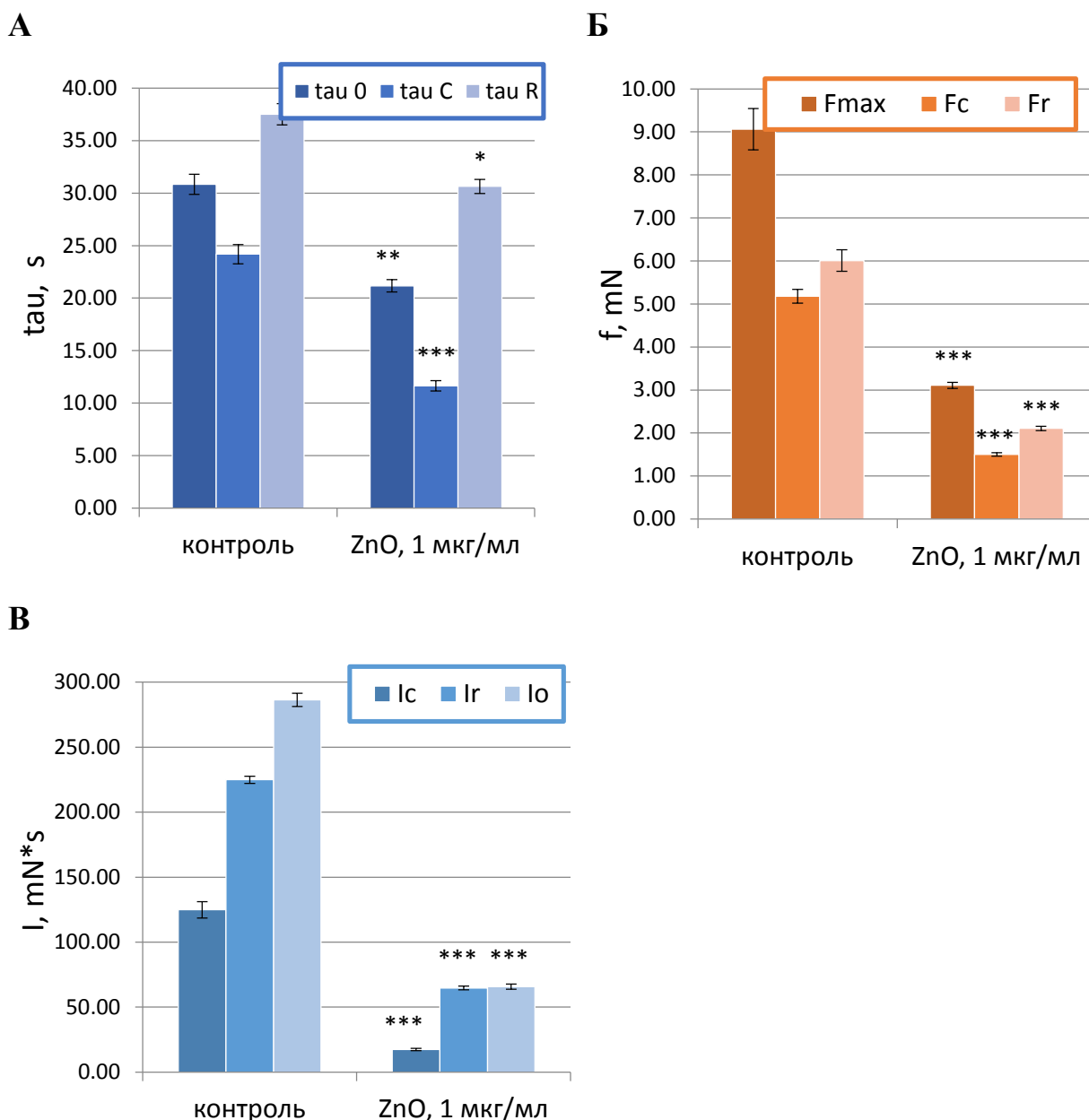
Встановлено, що нано-ZnO спричиняє аналогічні (до отриманих на препаратах міометрія) за напрямками ефекти, які є значно більш вираженими. Так в умовах коротко часової дії цього наноколоїду амплітуда спонтанних скорочень зменшувалася на дві третини (у середньому до  $34,3 \pm 4,8$  % ( $n=5$ ,  $p<0.001$ )) (Рис. 3.10). Втім, що дуже важливо частота спонтанних скорочень за дії нано-ZnO не відрізнялась від контрольної.



**Рис. 3.10** Типова механограма спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів в умовах дії *in vitro* нано-ZnO (концентрація наноматеріалу у розчині  $10^{-3}$  мг/мл).

Із застосуванням багатопараметричного методу комплексного механокінетичного аналізу було встановлено, що на тлі нано-ZnO в однаковій мірі зменшуються силові параметри процесів скорочення-розслаблення ( $F_C$  та  $F_R$ ), які у середньому становлять  $29,0 \pm 5,1$  % та  $35,1 \pm 4,3$ % відповідно (у обох випадках  $n=5$ ,  $p<0.001$ ).

Також вірогідно, але найменше порівняно з іншими механокінетичними показниками спонтанних скорочень зазнавали змін часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ). Так, характеристичний час амплітуди у середньому становив  $68,6 \pm 4,2$ % ( $n=5$ ,  $p<0.01$ ), а відповідні значення характеристичних часів на фазі скорочення і розслаблення – відповідно  $48,1 \pm 5,3$  % ( $n=5$ ,  $p<0.001$ ) та  $81,7 \pm 5,2$  % ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ) (Рис. 3.11).

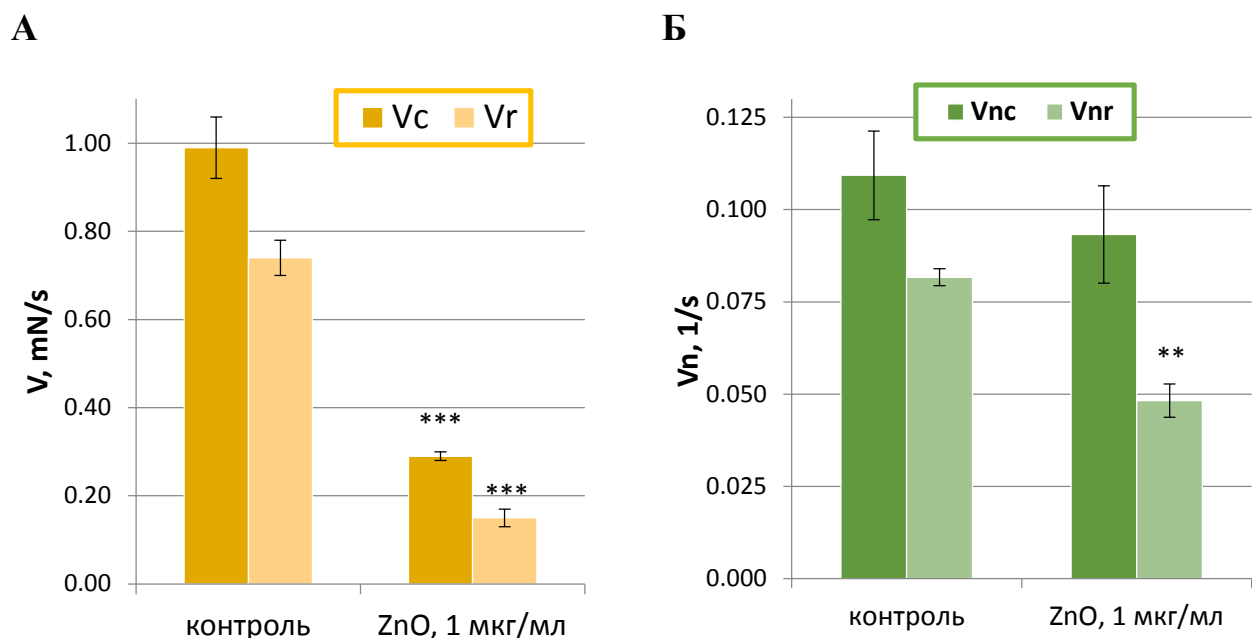


**Рис. 3.11** Механокінетичні параметри спонтанних скорочень антрального відділу шлунку щурів у контролі та за дії *in vitro* нано-ZnO (концентрація наноматеріалу у розчині  $10^{-3}$  мг/мл): А – часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ); Б – силові параметри ( $F_{max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ); В – імпульсні параметри ( $I_0$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ).  $n = 5$ ; \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$  та \*\*\* -  $p < 0.001$  – різниця достовірна щодо контролю.

Також на тлі нано-ZnO суттєво зменшувалися імпульсні параметри. Так, під дією цього наноколоїду імпульс сили у точці амплітуди становив  $23,0 \pm 2,1$  % ( $n=5$ ,  $p < 0.001$ ); відповідні значення імпульсу сили у точці

максимальної швидкості фази скорочення та розслаблення ( $I_C$  та  $I_R$ ) становили у середньому  $14,0 \pm 0,9$  % та  $28,8 \pm 1,5$  % (у обох випадках  $n=5$ ,  $p<0.001$ ).

Також за дії нано-ZnO відбувається значне зменшення швидкісних параметрів: у випадку абсолютних швидкостей найбільшого пригнічення зазнає фаза розслаблення – її швидкість ( $V_R$ ) зменшується у п'ять разів щодо контрольного значення, причому навіть нормування на амплітуду не усуває пригнічення (нормована максимальна швидкість фази розслаблення становить у середньому  $59,1 \pm 3,8$  % ( $n=5$ ,  $p<0.01$ ) (Рис 3.12). Що стосується швидкостей фази скорочення, то хоча її абсолютне значення було суттєво менше контрольного (у середньому становило  $29,3 \pm 3,8$  %,  $n=5$ ,  $p<0.001$ ), його нормування на амплітуду усувало ефект (показник нормованої максимальної швидкості був на рівні  $85,3 \pm 7,1$  % щодо контролю,  $n=5$ ,  $p>0,05$ ).



**Рис. 3.12** Швидкісні параметри спонтанних скорочень антрального відділу шлунку щурів у контролі та за дії *in vitro* нано-ZnO (концентрація наноматеріалу у розчині  $10^{-3}$  мг/мл): А – максимальні швидкості фаз

скорочення і розслаблення ( $V_C$  і  $V_R$ ); Б – нормовані максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення ( $V_{nc}$  і  $V_{nr}$ ).  $n = 5$ ; \*\* -  $p < 0.01$  та \*\*\* -  $p < 0.001$  – різниця достовірна щодо контролю.

Ми можемо міркувати про механізми, за якими нано-ZnO спричиняє пригнічення спонтанних скорочень гладеньких м'язів шлунку. У травному тракті людини і тварин спонтанні скорочення індукуються декількома популяціями пейсмеркерних клітин – інтерстиціальних клітин Кахаля (ICC) та модулюються нейромедіаторами (збуджувальними і гальмівними), які вивільняються з нервових закінчень нейронів інтрамуральних нервових сплетень. Так, різні популяції ICC здатні з певною частотою генерувати спонтанні хвилі деполяризації, які індукують скорочення повторюваних амплітуди і частоти. Зокрема, клітини ICC-SM, які містяться між підслизовою і кільцевими гладенькими м'язами поряд з нейронами сплетення Мейснера, обумовлюють високочастотні низькоамплітудні скорочення кільцевого шару м'язів (у *colon* щурів частота скорочень за їх активності становить 10-15 ск/хв). ICC-MY – інша популяція клітин Кахаля, яка локалізується між кільцевими і поздовжніми шарами м'язів шлунку і кишечника поряд з нейронами міжм'язового нервового сплетення, що опосередковує генерування скорочень у стінці травного тракту з високою амплітудою і низькою частотою (у *colon* щурів частота скорочень близько 0,5-1,5 ск/хв) [48-49]. Надійним критерієм впливу фармакологічних препаратів на процеси генерування спонтанної деполяризації клітинами Кахаля є модуляція частоти спонтанної механічної активності гладеньких м'язів [49]. Тож можна передбачити, що внесення нано-ZnO до омиваючого гладеньком'язові препарати розчину Кребса призводить до порушення функціонування ICC.

Як відомо [4, 48-49], модуляція амплітуди спонтанних скорочень свідчить про зміну ефективності функціонування міоцитів внаслідок зміни кількості іонів  $Ca^{2+}$ , які надходять з позаклітинного середовища і мобілізуються з внутрішньоклітинних депо. Тож можемо припустити, що

пригнічення амплітуди даної скорочувальної активності гладеньких м'язів шлунку за дії нано-ZnO, ймовірно, спричинене зниженням внутрішньоклітинної концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  підчас спонтанних скорочень.

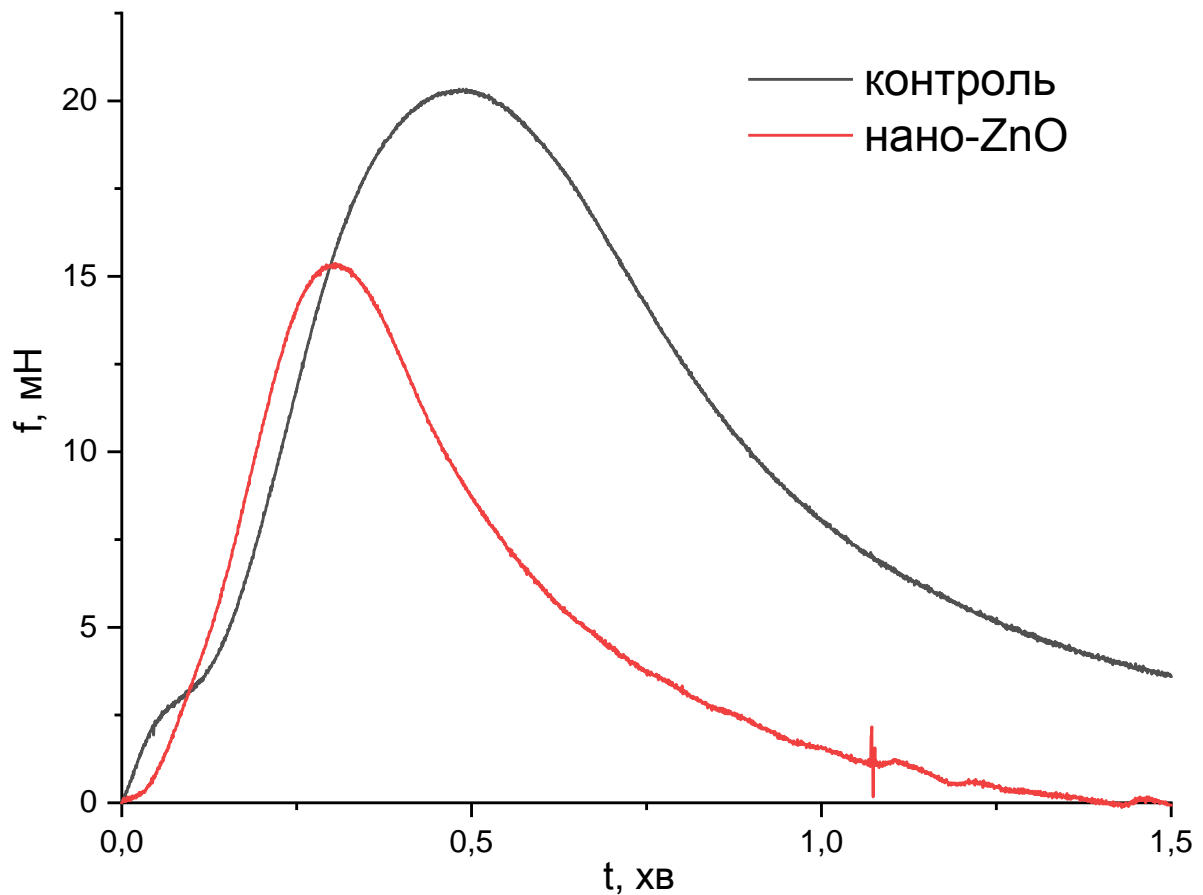
На користь останнього припущення також вказують дані [39] щодо здатності іонів  $\text{Zn}^{2+}$  блокувати потенціалкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, які є головними у забезпеченні підвищення внутрішньоклітинного кальцію міоцитів.

### 3.2.2. Аналіз модуляції викликаних аплікуванням гіперкалієвого розчину і ацетилхоліну скорочень на тлі нано-ZnO

Для перевірки здатності нано-ZnO спричиняти пригнічення входу  $\text{Ca}^{2+}$  через потенціалкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали плазматичної мембрани, на наступному етапі було проаналізовано модуляцію цим наноматеріалом ізометричні скорочення *antrum*, індуковані аплікуванням гіперкалієвого розчину ( $\text{K}^+$ -деполяризація плазматичної мембрани).

Як і у випадку спонтанних скорочень, на тлі дії суспензії нано-ZnO спостерігалось значно більш суттєве (порівняно з реакціями препаратів міометрія) скорочувальних відповідей, активованих аплікуванням гіперкалієвого розчину (80 мМ). У даному випадку значного пригнічення зазнавала як фазна, так і тонічна складова цих скорочень (Рис. 3.13). Таким чином, при даних умовах можна було спостерігати суттєве пригнічення фазного компонента (амплітуди) скорочень у середньому до  $75,4 \pm 3,8 \%$  ( $n=5$ ,  $p<0.01$ ), тоді як тонічний компонент був на рівні  $22,1 \pm 4,5 \%$  ( $n=5$ ,  $p<0.001$ ).

Аналіз кінетичних закономірностей скорочень здійснювали із розрахунком нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення ( $V_{nc}$  і  $V_{nr}$ , відповідно).

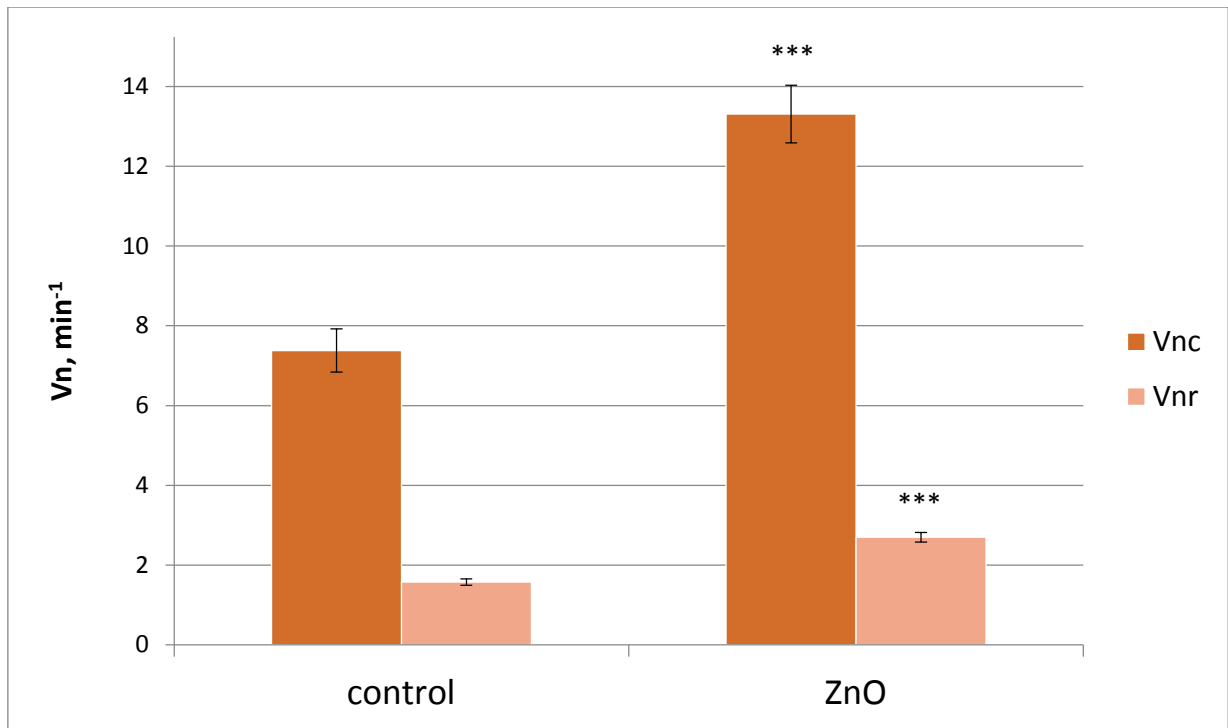


**Рис. 3.13** Типові механограми викликаних гіперкалієвим розчином (80 мМ) скорочень антрального відділу шлунку щурів у контролі та за дії *in vitro* нано-ZnO (концентрація наноматеріалу у розчині  $10^{-3}$  мг/мл, тривалість попередньої інкубації 15 хв).

Встановлено, що на тлі наноматеріалу суттєво і в однаковій мірі збільшується як показник нормованої максимальної швидкості фази скорочення ( $V_{nc}$  становить у середньому  $180,1 \pm 6,2$  %,  $n=5$ ,  $p<0.001$ ), так і відповідний показник фази розслаблення ( $V_{nr}$  становить у середньому  $171,6 \pm 5,8$  %,  $n=5$ ,  $p<0.001$ ) (Рис. 3.14).

Тож такі результати підтверджують зроблене раніше припущення про інгібування саме процесів надходження іонів  $Ca^{2+}$  через потенціалкеровані  $Ca^{2+}$ -канали плазматичної мембрани.



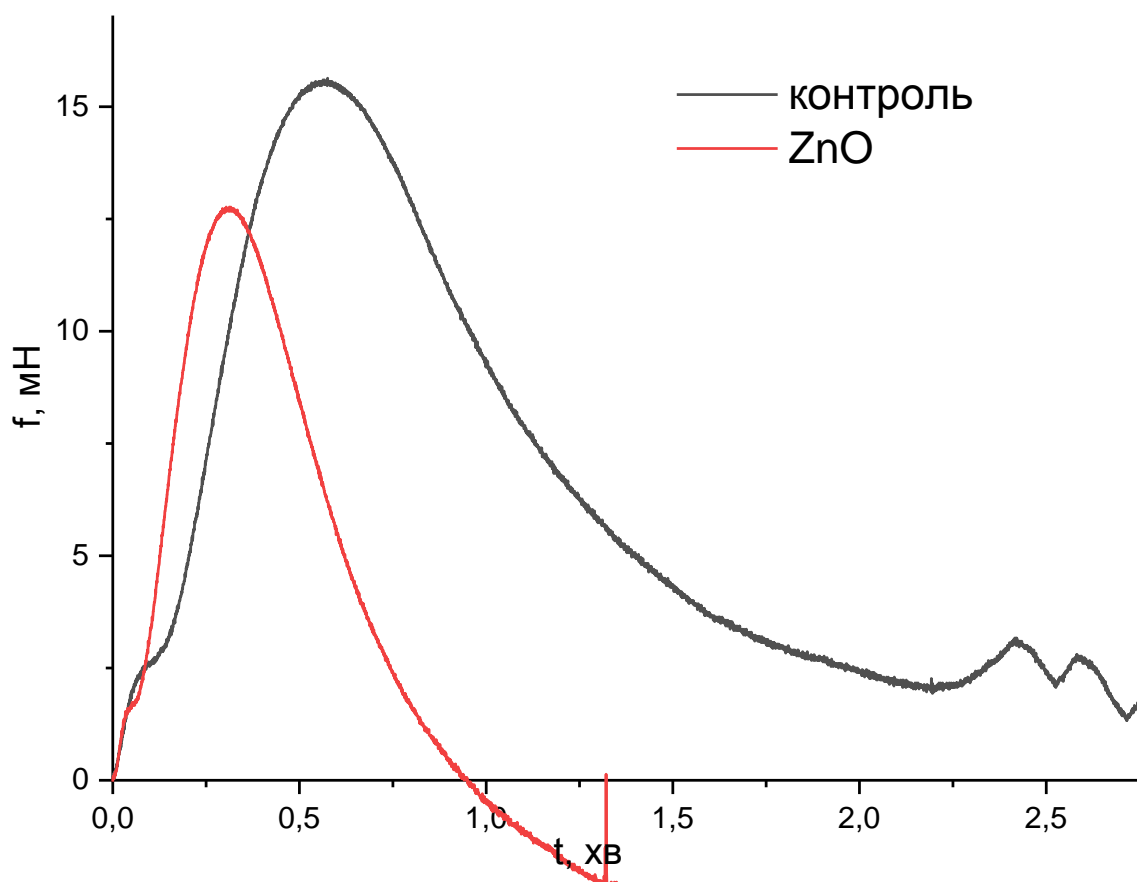


**Рис. 3.14** Параметри нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення ( $V_{nc}$ ) та розслаблення ( $V_{nr}$ ) викликаних гіперкалієвим розчином (80 мМ) скорочень кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів у контролі та за попередньої інкубації препаратів на тлі наночастинок ZnO ( $10^{-3}$  мг/мл, тривалість попередньої інкубації 15 хв;  $n = 5$ ). \*\*\* -  $p < 0.001$  – різниця достовірна щодо контролю.

Як відомо, ацетилхолін є нейротрансмітером парасимпатичної нервової системи, який, вивільняючись із закінчень інтрамуральних нейронів, спричиняє зростання тонуусу і посилення моторики гладеньких м'язів травного тракту. У випадку екзогенного аплікування до м'язів шлунку ацетилхоліну у високих концентраціях спостерігається суттєва біфазна скорочувальна реакція. Як відомо, у гладеньких м'язах шлунку скорочувальна реакція на аплікування ацетилхоліну індукується активацією мускаринових ацетилхолінових рецепторів M3- та M2-підтипів, коли початкова ланка скорочення обумовлюється M3-холінорецептор-опосередкованим посиленням синтезу інозитол-1,4,5-трифосфату та мобілізацією іонів  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинного депо. Тому на наступному

етапі було досліджено викликані ацетилхоліном ( $10^{-5}$  М) скорочення гладеньких м'язів шлунку за дії *in vitro* нано-ZnO.

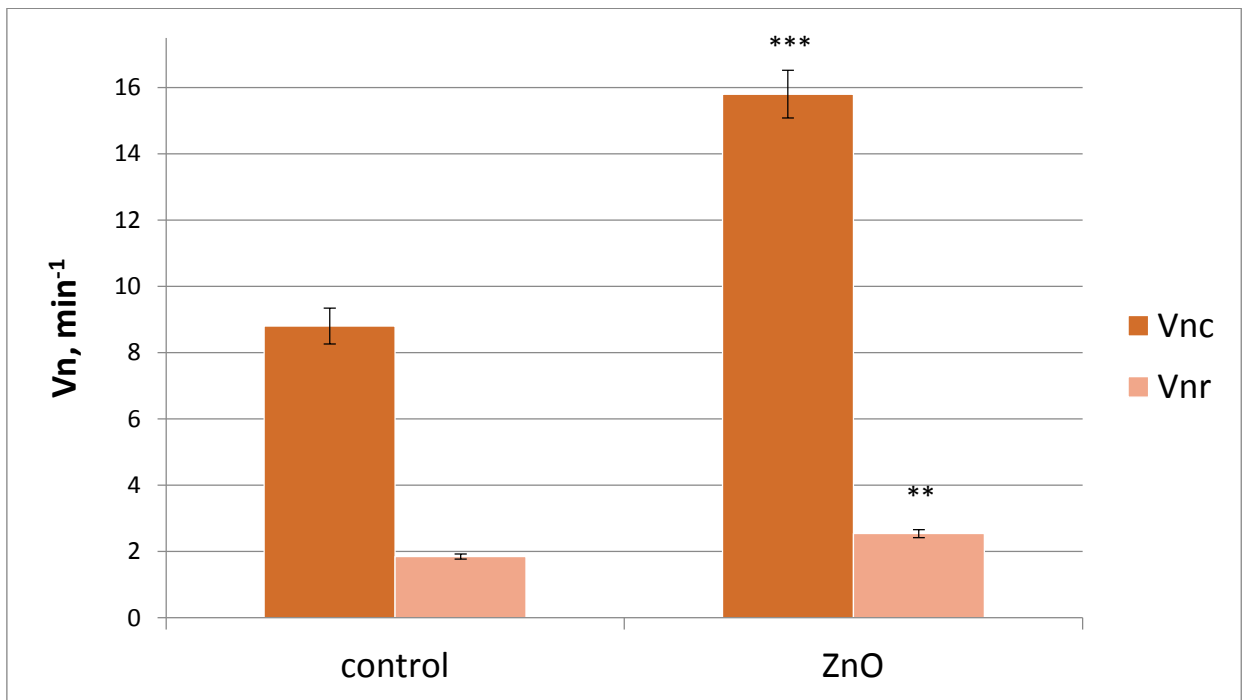
На тлі ZnO спостерігалось суттєве зменшення амплітуди скорочень, активованих екзогенною аплікацією нейромедіатора ацетилхоліну (Рис. 3.15). Так, за даних умов скорочення характеризувались пригніченням фазного компоненту у середньому до  $72,2 \pm 4,3$  % ( $p < 0.01$ ,  $n=5$ ), тоді як тонічний компонент зникав повністю (що є додатковим підтвердженням суттєвого блокування потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів на тлі дії наноматеріалу).



**Рис. 3.15** Типові механограми викликаних ацетилхоліном ( $10^{-5}$  М) скорочень кільцевих гладеньких м'язів шлунку шурів у контролі та за дії *in vitro* нано-ZnO (концентрація наноматеріалу у розчині  $10^{-3}$  мг/мл, тривалість попередньої інкубації 15 хв).

Також у випадку ацетилхолін-індукованих скорочень мало місце суттєве збільшення нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення та розслаблення: показник швидкості фази скорочення ( $V_{nc}$ ) достовірно

зростав у середньому до  $179,5 \pm 6,4 \%$ ,  $n=5$ ,  $p<0.001$ ) та показник швидкості фази розслаблення у середньому становив  $137,3 \pm 4,7 \%$ ,  $n=5$   $p<0.01$ ) (Рис. 3.16).



**Рис. 3.16** Параметри нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення ( $V_{nc}$ ) та розслаблення ( $V_{nr}$ ) викликаних ацетилхоліном ( $10^{-5}$  М) скорочень кільцевих гладеньких м'язів antrum щурів у контролі та за попередньої інкубації препаратів на тлі наночастинок ZnO ( $10^{-3}$  мг/мл, тривалість попередньої інкубації 15 хв;  $n = 5$ ). \*\* -  $p<0.01$ , \*\*\* -  $p<0.001$  – різниця достовірна щодо контролю.

Тож такі результати дослідження викликаних гіперкалієвим розчином і ацетилхоліном скорочень кільцевих ГМ шлунку щурів за короткотривалої дії наночастинок ZnO підтверджують зроблене раніше припущення про те, що за даних умов відбувається інгібування саме процесів надходження іонів  $Ca^{2+}$  через потенціалкервані  $Ca^{2+}$ -канали плазматичної мембрани міоцитів.

## ВИСНОВКИ

1. Тензометричним методом в ізометричному та ізотонічному режимах досліджено спонтанну і викликану скорочувальну активність ізольованих поздовжніх гладеньких м'язів *uterus* та кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів за короткотривалого впливу *in vitro* нанорозмірних частинок ZnO ( $10^{-3}$  мг/мл).

2. Встановлено, що нано-ZnO суттєво інгібує спонтанну скорочувальну активність міометрія, зареєстровану в ізотонічному та ізометричному режимах, зменшуючи при цьому механокінетичні параметри (часові ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ), силові ( $F_{max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ), укорочення ( $\Delta L_{max}$ ,  $\Delta L_C$  та  $\Delta L_R$ ), швидкісні ( $V_C$  і  $V_R$  та  $V_{nc}$  і  $V_{nr}$ ) та імпульсні ( $I_{max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ )) окремих скорочень.

3. Показано, що на нано-ZnO спричиняє суттєве зниження амплітуди скорочень препаратів міометрія, активованих аплікуванням гіперкалієвого розчину (80 мМ) та окситоцину (0,1 МО), причому тонічна фаза цих скорочень залишається без змін.

4. Встановлено, що нано-ZnO при аплікуванні до гладеньких м'язів шлунку спричиняє аналогічні (до отриманих на препаратах міометрія) за напрямками ефекти змін спонтанної і викликанної скорочувальної активності, які є значно більш вираженими. Зниження частоти спонтанних скорочень вказує на пригнічення функціонування за даних умов також пейсмекерних клітин Кахаля.

5. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що механізмом модуляції скорочувальної активності вісцеральних гладеньких м'язів в умовах короткочасової аплікації *in vitro* є пригнічення надходження іонів  $Ca^{2+}$  через потенціалкеровані  $Ca^{2+}$ -канали плазматичної мембрани, іонами  $Zn^{2+}$ , які дисоціюють у розчин з поверхні наночастинок ZnO.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Aguilar, H. N.; Mitchell, S.; Knoll, A. H.; Yuan, X. (2010). "Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility". *Human Reproduction Update*. 16 (6): 725–744.
2. Baban, D. Seymour, L. (1998). Control of tumour vascular permeability. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, V. 34, P. 109-119.
3. Baker SA, Hwang SJ, Blair PJ, Sireika C, Wei L, Ro S, Ward SM, Sanders KM (2021) Ca<sup>2+</sup> transients in ICC-MY define the basis for the dominance of the corpus in gastric pacemaking. *Cell calcium* 99: 102472.
4. Baker SA, Leigh WA, Del Valle G, De Yturriaga IF, Ward SM, Cobine CA, Drumm BT, Sanders KM. Ca<sup>2+</sup> signaling driving pacemaker activity in submucosal interstitial cells of Cajal in the murine colon. *Elife*. 2021 Jan 5;
5. Baruah, S. and Dutta, J. and Dutta: "Hydrothermal growth of ZnO nanostructures". *Sci. Technol. Adv. Materials*, 2009; 10(1): 013001.
6. Bekkelund M, Sangnes DA, Gunnar Hatlebakk J, Aabakken L (2019) Pathophysiology of idiopathic gastroparesis and implications for therapy. *Scand J Gastroenterol* 54(1): 8–17.
7. Camilleri M, Grover M, Farrugia G. (2012) What are the important subsets of gastroparesis? *Neurogastroenterol Motil* 24(7): 597-603.
8. Chen Y, Wang H, Li H, Liu S (2018) Long-Pulse Gastric Electrical Stimulation Repairs Interstitial Cells of Cajal and Smooth Muscle Cells in the Gastric Antrum of Diabetic Rats *Gastroenterol Res Pract*: 6309157.
9. Cobine CA, Hannah EE, Zhu MH, Lyle HE, Rock JR, Sanders KM, Ward SM, Keef KD (2017) 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* 595(6): 2021-2041.

10. Daniel, M. Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.*, V. 104, P. 293–346.
11. Degen A and Kosec M.: Effect of pH and impurities on the surface charge of zinc oxide in aqueous solution. *J European Ceramic Society*, 2000; 20: 667–73.
12. Dobson, P. King, S. Jarvie, H. (2019). *Nanoparticle*. [online] Encyclopædia Britannica, inc. Available at: <https://www.britannica.com/science/nanoparticle> [Accessed 02 May 2020]. doi: 10.3109/10408444.2015.1137864
13. Dulub O, Boatner L A and Diebold U (2002). STM study of the geometric and electronic structure of ZnO-ZnO and surfaces, *Surface Science*, Volume 519, Issue 3, Pages 201-217, ISSN 0039-6028,
14. Ed. Fendler, J. (1998). *Nanoparticles and nanostructured films: Preparation, characterization and applications*. New York: John Wiley & Sons, 463 p.
15. Ferrari M. 2005 ra Panchal RG 1998
16. Foong D, Zhou J, Zarrouk A, Ho V, O'Connor MD (2020) Understanding the Biology of Human Interstitial Cells of Cajal in Gastrointestinal Motility. *Int J Mol Sci* 21(12): 4540.
17. Forster J, Damjanov I, Lin Z, Sarosiek I, Wetzel P, McCallum RW (2005) Absence of the interstitial cells of Cajal in patients with gastroparesis and correlation with clinical findings. *Journal of gastrointestinal surgery: official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 9(1): 102–108.
18. Gong, P. Li, H. He, X. Wang, K. Hu, J. Tan, W. Tan, S. Zhang, X. (2007). Preparation and antibacterial activity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ag nanoparticles. *Nanotechnology*, V. 18, P. 604–611,
19. Hasan, S. (2015). A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. *Research Journal of Recent Sciences*, V. 4, P. 1-3.

20. Huang, YH, Zang, Y, Liu, L, Fan, SS, Wei, Y and He, J: Controlled synthesis and field emission properties of ZnO nanostructures with different morphologies. *J. Nanosci. Nanotechnol*, 2006; 6: 787–790.
21. Jia Liu, Xiaoli Feng, Limin Wei, Liangjiao Chen, Bin Song & Longquan Shao; The toxicology of ion-shedding zinc oxide nanoparticles, *Critical Reviews in Toxicology*; February 2016;
22. Kosterin S, Tsymbalyuk O, Holden O (2021) Multiparameter analysis of mechanokinetics of the contractile response of smooth muscles. *Series on Biomechanics* 35(1): 14-30.
23. Landsiedel R, Ma-Hock L, Hofmann T, Wiemann M, Strauss V, Treumann S, Wohlleben W, et al. Application of short-term inhalation studies to assess the inhalation toxicity of nanomaterials. *Part Fibre Toxicol* 2014;11:16
24. Long QL, Fang DC, Shi HT, Luo YH (2004) Gastro-electric dysrhythm and lack of gastric interstitial cells of cajal. *World J Gastroenterol* 10(8): 1227–1230.
25. M. J. Sailor and J. R. Link, *Chemical Communications*, 2005, “Smart dust”: nanostructured devices in a grain of sand. V 11, 1375–1383.
26. M. Le Bras<sup>1</sup>, M.-V. Clément<sup>1</sup>, S. Pervaiz<sup>1</sup> and C. Brenner<sup>1</sup> Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death *Histol Histopathol* (2005) 20: 205-220
27. Meyer B and Marx D (2003) Density-functional study of the structure and stability of ZnO surfaces *Phys. Rev. B* 67 035403
28. Mitsui R, Komuro T (2003) Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the gastric antrum of wild-type and Ws/Ws rats. *Anat Embryol (Berl)*. 206(6): 453–460.
29. Moraveji S, Bashashati M, Elhanafi S, Sunny J, Sarosiek I, Davis B, Torabi A, McCallum RW (2016) Depleted interstitial cells of Cajal and fibrosis in the pylorus: Novel features of gastroparesis. *Neurogastroenterol Motil* 28(7): 1048–1054.

30. Mostafa RM, Moustafa YM, Hamdy H (2010). Interstitial cells of Cajal, the Maestro in health and disease. *World J Gastroenterol* 16(26): 3239–3248.
31. Nagao M.: Physiosorption of water on zinc oxide surface. *J Phys Chem.*, 1971; 75: 3822–8.
32. O’Rahilly R: Prenatal human development. In WYNN RM, JOLIE WP, editors: *Biology of the Uterus*, New York, 1989, Plenum Publishing, p 35.
33. Ordög T, Takayama I, Cheung WK, Ward SM, Sanders KM (2000) Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis. *Diabetes* 49(10):1731–1739.
34. Parihar A Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury / Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S // *Burns*. – 2008. – Vol. 34, № 1. – P. 6-17.
35. Qu F and Morais PC: Energy levels in metal oxide semiconductor quantum dots in water-based colloids. *J of Chem Physics.*, 1999; 111: 8588–94.
36. Rai, M. Yadav, A. Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotech. Adv.*, V. 27, P. 76-83.
37. Roco, M. (2003). Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, V. 14, P. 337–346.
38. Sharma, V. Ria, A. Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: «Green» synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, V. 145, P. 83-96.
39. Tang Q, Ren H, Yan L, Quan X, Xia H, Luo H. Diallyl trisulfide regulates rat colonic smooth muscle contractions by inhibiting L-type calcium channel currents. *J Pharmacol Sci.* 2018 Jul;137(3):299-304. doi: 10.1016/j.jphs.2018.07.009. Epub 2018 Jul 30. PMID: 30098911.
40. Tomar, A. Garg, G. (2013). Short Review on Application of Gold Nanoparticles. *Global Journal of Pharmacology*, 7(1), P. 34-38.
41. Wang L, Wang L, Ding W, Zhang F. Acute toxicity of ferric oxide and zinc oxide nanoparticles in rats. *J Nanosci Nanotechnol* 2010b; 10:8617–8624.



42. Wang Q, Wang K, Solorzano-Vargas RS, Lin PY, Walthers CM, Thomas AL, Martín MG, Dunn JCY (2018) Bioengineered intestinal muscularis complexes with long-term spontaneous and periodic contractions. *PLoS One* 13(5): e0195315.
43. Wang XY, Huizinga JD, Diamond J, Liu LW (2009) Loss of intramuscular and submuscular interstitial cells of Cajal and associated enteric nerves is related to decreased gastric emptying in streptozotocin-induced diabetes. *Neurogastroenterol Motil* 21(10): 1095–e92.
44. Warheit DB, Sayes CM, Reed KL. Nanoscale and fine zinc oxide particles: can in vitro assays accurately forecast lung hazards following inhalation exposures? *Environ Sci Technol* 2009; 43:7939–7945.
45. Wong, T. Schwaneberg, U. (2003). Protein engineering in bioelectrocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, V. 14, P. 590–596.
46. Wray S. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. *Am J Physiol* 1993;264:C1 18.
47. Y.G. Gertrude Neumark, I. Kuskovsky, in *Springer Handbook of Electronic and Photonic Materials: Doping Aspects of Zn-Based Wide-Band-Gap Semiconductors*, ed. by P.C. Safa Kasap, Springer, 2007; 843–854.
48. 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 Oct;16(5):621-7. doi: 10.1111/j.1365-2982.2004.00546.x. PMID: 15500519.
49. 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 Dec;51(6):717-23. doi: 10.2170/jjphysiol.51.717. PMID: 11846963.

50. Zhang CH, Wang P, Liu DH, et al. (2016) The molecular basis of the genesis of basal tone in internal anal sphincter. *Nat Commun* 7:11358. <https://doi.org/10.1038/ncomms11358>
51. Zhang, L. Gu, F. Chan, J. Wang, A. Langer, R. Farokhzad O. (2008). Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, V. 83, P. 761–780.
52. Нетюхайло Л.Г., Харченко С.В. Активні форми кисню (огляд літератури) УДК: 616.5-002.