

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

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології
та біоінформатики:
доцент Нипорко О.Ю.
Протокол №____ засідання кафедри
від “____” _____ 20__ р.

**Дослідження холіноміметичних властивостей сполуки 248008
на моделі гладеньких м’язів товстого кишечника**

Кваліфікаційна робота бакалавра
студента спеціальності 091
Біологія
ОП «Біологія та високі технології»
Мигашка Єгора Володимировича

Науковий керівник
професор кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
д.б.н. **Цимбалюк Ольга Володимирівна**

Оцінка захисту роботи

Анотація

Мигашко Є.В. Дослідження холіноміметичних властивостей сполуки 248008 на моделі гладеньких м'язів товстого кишечника. – Дипломна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія та високі технології».

У роботі здійснено дослідження дії сполуки 248008 (0.1-50 мкМ), для якої методами *in silico* було передбачено здатність до активації мускаринових ацетилхолінових рецепторів, на ацетилхолін-викликані та спонтанні скорочення кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки (*caecum*) щурів, а також досліджено вплив цієї сполуки на механокінетичні параметри процесів скорочення-розслаблення.

Встановлено, що сполука 248008 (1 мкМ) за короткочасної (упродовж 5 хв) аплікації до препаратів гладеньких м'язів спричиняє суттєве посилення ацетилхолін-викликаних скорочень. Ця речовина дозо-залежно (застосовані концентрації 0,1-50 мкМ) часо-залежно (аплікування упродовж години) посилює спонтанну моторику *caecum*; за дії вищих концентрацій (1-50 мкМ) спричиняє достовірні ефекти збільшення силових, швидкісних та імпульсних параметрів окремих спонтанних скорочень. Визначено, що усі досліджені концентрації сполуки 248008 дозо-залежно значно підвищують частоту спонтанних скорочень, що вказує на активацію пейсмейкерної активності пейсмейкерних клітин Кахаля. Ефекти сполуки 248008 були стабільними принаймні упродовж години аплікування до *caecum*, а також оборотними та значно усувалися при відмиванні м'язових препаратів нормальним розчином Кребса. За умови попередньої інкубації м'язів з селективним блокатором мускаринових рецепторів M₂-підтипу AF-DX 116 сполука 248008 не впливала на скорочувальну активність *caecum*. За сукупністю результатів експериментів встановлено, що сполука 248008 властивості M₂-холіноміметика.

Ключові слова: мускариновий ацетилхоліновий рецептори M₂-підтипу, товстий кишечник, ацетилхолін, спонтанні скорочення, механокінетичний аналіз.

Зміст

Анотація	2
Зміст	3
Перелік умовних позначень	4
Вступ	6
Розділ 1. Огляд літератури	8
1.1 Структура, клітинний склад та роль окремих клітин у регуляції скорочувальної активності гладеньких м'язів товстого кишечника	8
1.2 Інтерстиціальні клітини Кахалія (ІКК)	12
1.3 Мускаринові ацетилхолінові рецептори у гладеньких м'язах товстого кишечника.....	14
1.4 Сполуки-холіноміметики та їх застосування у терапії захворювань	21
Розділ 2. Матеріали та методи дослідження	24
2.1 Метод тензометрії (в ізометричному режимі реєстрації)	24
2.2 Кінетичний аналіз викликаних скорочень	26
2.3 Кінетичний аналіз спонтанних скорочень.....	27
2.4 Статистична обробка	33
Розділ 3. Результати досліджень та їхнє обговорення	34
3.1 Модуляція ацетилхолін-індукованих скорочень саесум сполукою 248008.....	34
3.2. Дозові ефекти сполуки 248008 на функціонування саесум щурів.....	35
3.3. Вивчення часо-залежних ефектів впливу сполуки 248008 на функціонування саесум щурів та ефективності її відмивання.	41
Висновки	49
Список використаних джерел	50

Перелік умовних позначень

- AF-DX116 – 11-[[2-[(Diethylamino)methyl]-1-piperidinyl]acetyl]-5,1 1-dihydro-6H-pyrido[2,3-b][1,4]benzodiazepin-6-one
- ШКТ – шлунково-кишковий тракт
- MLCK – кіназа легких ланцюгів міозину
- Ca²⁺-канали – кальцієві канали
- MLC – легкий ланцюг міозину
- MLC20 – фосфорильованні 20-кДа легкі ланцюги міозину (MLC20)
- PKC – протеїнкіназа C
- Ser19 – 19-й залишок серину в білковій послідовності
- MLCP – легколанцюгова фосфатаза міозину
- АТФ – аденозинтрифосфат
- ГТФ – гуанозинтрифосфат
- ПКС – прокоагулянтна активність
- Rho – сімейство малих ГТФ-аз
- ІКК – інтерстиціальні клітини Кахаля
- C-Kit – протоонкоген, що кодує рецепторну тирозинкіназу
- MY-ICC – інтерстиціальні клітини Кахаля мієнтеріального сплетення
- IM-ICC – внутрішньом'язові інтерстиціальні клітини Кахаля
- Gi/Go – гетеротримерні альфа-субодиниці G-білка
- Gq – гетеротримерні альфа-субодиниці G-білка
- ЦНС – центральна нервова система
- ПНС – периферична нервова система
- кДНК – комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота
- SDS-PAGE – додецилсульфатний поліакриламідний гель для електрофорезу
- NXS/TX – ділянка N-зв'язаного глікозилування
- COS – фібробластоподібні клітинні лінії, отримані з тканини нирок мавп
- Cho – клітини яєчників китайського хом'яка
- HEK293 – ембріональні клітини нирки людини, вирощені в культурі тканини
- mAChR – мускариновий ацетилхоліновий рецептор
- цАМФ – циклічний аденозинмонофосфат
- АХ – ацетилхолін
- PLC – фосфоліпаза C
- InsP₃ – інозитол трифосфат

- DAG – діацилгліцерол
- Cl⁻-канали – іонні канали, вибірково проникні для іонів хлору
- K⁺-канали – калієві канали
- VDCC – потенціалзалежні кальцієві канали
- TRPC4 – катіонний канал перехідного потенціалу рецептора 4 каналу
- TRPC6 – катіонний канал перехідного потенціалу рецептора 6 каналу
- BK-канал – потенціалкеровані калієві канали, які проводять іони (K⁺)
- I_{Ca} – струм який переноситься іонами кальцію (Ca²⁺) через кальцієві канали
- KATP-канал – АТФ-чутливі K⁺ канали
- EJP – потенціал збуджувального переходу
- PGF_{2α} – простагландин F_{2α}
- ГАМК – гамма-аміномасляна кислота
- ГМ – гладкий м'яз
- ІС – імпульс сили
- цАМФ – циклічний аденозинмонофосфат
- ДМСО – диметилсульфоксиді

Вступ

Натепер для лікування широкого спектру захворювань залишається нагальна потреба в спрямованій розробці, синтезі та дослідженні нових сполук з властивостями холіноміметиків. Холіноміметичні сполуки, які імітують дію нейромедіатора ацетилхоліну, можуть бути застосовані для терапії порушень функцій різних систем організму, зокрема нервової, серцево-судинної та травної систем. Особливий інтерес викликає дослідження їхнього впливу на гладенькі м'язи шлунково-кишкового тракту, оскільки порушення моторики кишечника є поширеною проблемою, що супроводжує багато патологічних станів.

Метою даного дипломного дослідження є детальне вивчення холіноміметичних властивостей нової синтетичної сполуки 248008 на моделі гладеньких м'язів товстого кишечника. Ця сполука представляє інтерес з огляду на її потенційну фармакологічну активність, яка може бути корисною для розробки нових терапевтичних стратегій лікування таких захворювань, як синдром подразненого кишечника, хронічний закреп та інші розлади шлунково-кишкового тракту.

Для досягнення мети дослідження поставлено наступні задачі:

1. На моделі мультиклітинних ізольованих гладеньком'язових препаратів товстого кишечника (на прикладі сліпої кишки *saesit*) щурів оцінити вплив сполуки 248008 на спонтанну скорочувальну активність
2. Провести повний механокінетичний аналіз спонтанних скорочень м'язових препаратів *saesit* у контролі та за дії сполуки 248008.
3. Із використанням екзогенного аплікування ацетилхоліну і блокатора M_2 -холінорецепторів AF-DX дослідити холіноміметичну ефективність сполуки 248008.
4. Оцінити ефективність відмивання сполуки 248008 від мультиклітинних м'язових препаратів *saesit*.

Для вирішення поставлених задач використані методи фізіологічної та фармакологічної оцінки, включаючи вимірювання скоротливої активності м'язів у ізометричному режимі реєстрації та методи механокінетичного аналізу. Особлива увага буде приділена вивченню аналізу механізмів дії сполуки 248008.

Дослідження холіноміметичних властивостей сполуки 248008 на моделі гладеньких м'язів товстого кишечника має важливе значення з кількох аспектів: наукового, медичного та практичного.

1. Наукове значення. Вивчення нових фармакологічно активних речовин, таких як сполука 248008, сприяє розширенню наших знань про холінергічну систему та її роль у регуляції функцій шлунково-кишкового тракту. Це дослідження дозволяє детально з'ясувати механізми дії нової сполуки, її взаємодію з холінергічними рецепторами та передбачити можливі інші молекулярні мішені.

2. Практичне медико-біологічне значення. Порушення моторики товстого кишечника, такі як синдром подразненого кишечника, хронічні запори та інші функціональні розлади, є поширеними і можуть значно погіршувати якість життя пацієнтів. Існуючі методи лікування не завжди є ефективними та безпечними. Дослідження холіноміметичних властивостей сполуки 248008 може призвести до відкриття нових терапевтичних засобів, які забезпечуватимуть більш ефективне і таргетоване лікування цих захворювань. Це особливо важливо в контексті пошуку нових ліків з мінімальними побічними ефектами та високою ефективністю.

3. Перспективи подальших досліджень. Одержані в результаті дослідження дані можуть стати основою для подальших наукових робіт, спрямованих на вивчення інших потенційних застосувань сполуки 248008. Це включає дослідження її впливу на інші органи і системи, розробку комбінованих терапевтичних підходів та вивчення можливостей синтезу нових похідних з покращеними фармакологічними властивостями.

Розділ 1 Огляд літератури

1.1 Структура, клітинний склад та роль окремих клітин у регуляції скорочувальної активності гладеньких м'язів товстого кишечника

Товстий кишечник є частиною травного тракту. Травний тракт включає ротову порожнину, стравохід, шлунок, тонкий кишечник, товстий кишечник і пряму кишку. Товстий кишечник має довжину, що становить п'яту частину довжини шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Товстий кишечник відповідає за переробку неперетравленого харчового матеріалу (хімусу) після того, як більшість поживних речовин всмокталася в тонкому кишечнику. Товстий кишечник складається з 4 частин. Він включає сліпу і висхідну ободову кишку, поперечну ободову кишку, низхідну ободову кишку і сигмовидну ободову кишку. Товстий кишечник виконує важливу роль, всмоктуючи воду, вітаміни та електроліти з відходів життєдіяльності.

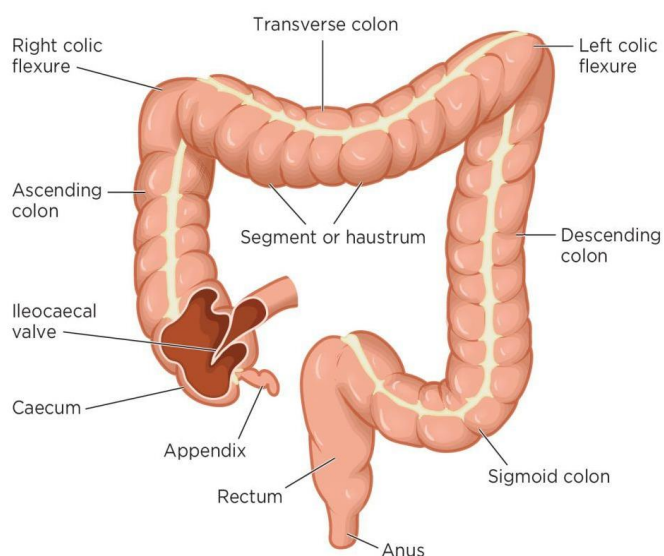


Рис. 1.1 Анатомія товстого кишечника людини

Кишкова стінка складається з декількох шарів: від просвіту назовні - це слизова оболонка, підслизова оболонка, м'язова оболонка та серозна оболонка. М'язовий шар складається з 2 шарів гладеньких м'язів, внутрішнього (колового) і зовнішнього (поздовжнього). Ці шари сприяють моториці

товстого кишечника. Існує 2 типи моторики товстої кишки: скорочення гаустри та рух маси. Скорочення гаустри активується присутністю хімусу (розтягом стінки кишки) і слугує для повільного переміщення їжі до наступної гаустри, а також для перемішування хімусу, що сприяє всмоктуванню води. Масові рухи сильні і слугують для швидкого просування хімусу до прямої кишки.

Загалом клітини гладеньких м'язів мають довжину від 200 до 300 і ширину від 5 до 15 мкм. Найбільш вражаючою особливістю гладеньких м'язів є відсутність видимих поперечних смуг. Щільні тільця і скоротливі нитки займають близько 80% внутрішньої частини клітини. Припускають, що щільні тільця виконують функцію Z-ліній. У гладеньком'язових клітинах можна виділити три типи структур цитоскелету: тонкі актинові нитки, товсті міозинові нитки та проміжні нитки. Проміжні філаменти з'єднують щільні тільця в цитоплазмі з щільними смугами на плазматичній мембрані. У гладких м'язах актинові філаменти організовані через прикріплення до щільних тілець, які містять - актинін, білок Z-смуги в скелетних м'язах. Актин - це всюдисущий глобулярний білок 42 кДа (G-актин), який полімеризується з утворенням 2-ланцюгових спіральних філаментів (F-актин). У борозенки актинової спіралі вставляється інший білок, тропоміозин. Тонкі нитки в гладеньких м'язах мають чітку полярність, вони вставляються в щільні тільця і виходять з них, а також розташовуються в пучках, які йдуть паралельно довгій осі клітини. Товсті філаменти - це агрегати молекул міозину, утворені з асоціації 6 різних білків: 1 пари важких ланцюгів міозину і 2 пар легких ланцюгів міозину (MLC).

Скорочення гладких м'язів у кишечнику в першу чергу ініціюється підвищенням концентрації цитозольного кальцію, який виступає основним тригером цього процесу. Цей кальцієвий сплеск спонукає до активації G-протеїн-зв'язаних рецепторів, що запускає каскад сигнальних подій, опосередкованих різними ферментами.

У гладком'язових клітинах шлунково-кишкового тракту виявлено два різних шляхи активації: шлях тимчасового скорочення, що залежить від кальмодуліну та інозитол-1,4,5-трифосфату, і шлях тривалого скорочення, що запускається специфічними агоністами, такими як бомбезин і керамід. Механізм транзиторного скорочення включає вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних запасів і подальшу активацію кальмодулін-залежних процесів. З іншого боку, тривале скорочення включає позаклітинний приплив кальцію та активацію протеїнкінази С (PKC), незалежних від кальмодуліну шляхів.

При підвищенні рівня кальцію активується кіназа легких ланцюгів міозину (MLCK), що призводить до фосфорилування 20-кДа легких ланцюгів міозину (MLC20) по Ser19. Ця подія фосфорилування має вирішальне значення, оскільки вона ініціює циклічне переміщення міозинових поперечних містків вздовж актинових ниток, викликаючи таким чином м'язове скорочення. На відміну від посмугованих м'язів, де тропонін виконує роль регуляторного перемикача, в гладких м'язах активація міозину відбувається незалежно для кожної міозинової головки, що призводить до уповільнення процесу скорочення.

Іони Ca^{2+} мають вирішальне значення для скоротливості гладких м'язів, активуючи кіназу легких ланцюгів міозину (MLCK) через кальцій-кальмодуліновий (Ca-CaM) комплекс. MLCK фосфорилує регуляторні легкі ланцюги міозину (MLC20), активуючи міозинову АТФ-азу та ініціюючи м'язове скорочення. Зниження внутрішньоклітинного рівня кальцію призводить до дисоціації MLCK, дефосфорилування MLC20 фосфатазою легких ланцюгів міозину (MLCP) і розслаблення м'язів. Інгібування MLCP збільшує фосфорилування MLC, посилюючи м'язове скорочення. Субмаксимальний рівень кальцію може викликати максимальне скорочення, що називається "підвищеною чутливістю до кальцію" або "кальцієвою сенсibiliзацією".

Хоча MLCK є Ca-CaM-залежною MLC-специфічною протеїнкіназою, вона в першу чергу відповідає за фосфорилування міозину в гладеньких м'язах, оскільки збільшення концентрації цитозольного Ca індукує фосфорилування MLC в гладеньких м'язах. З іншого боку, розвиток сили гладеньких м'язів визначається не лише концентрацією Ca. У гладеньких м'язах співвідношення сила Ca є змінним і частково залежить від специфічних механізмів активації. Було виявлено, що агоніст може викликати збільшення розвитку сили в гладеньких м'язах навіть тоді, коли цитоплазматичний Ca затиснутий. Ця індукована агоністом "Ca-сенсibilізація" переконливо свідчить про те, що існують додаткові механізми, які можуть регулювати скорочення гладеньких м'язів. Ca не завжди паралельно впливає на ступінь фосфорилування та скорочення MLC20. У випадку розвитку тонічної сили співвідношення між силою і фосфорилуванням MLC20 може змінюватися. Таким чином, у гладеньких м'язах вторинні регуляторні шляхи є функціонально важливими для контролю Ca-незалежних рівнів фосфорилування MLC20 і Ca-незалежного скорочення. Збільшення сили, індуковане агоністом при певній концентрації Ca, зумовлене інгібуванням MLCP. Ефекти Ca-сенсibilізуючих агоністів опосередковуються гуанозинтрифосфат (ГТФ)-зв'язуючими білками, які генерують ПКС або арахідонову кислоту в якості других месенджерів. Таким чином, основним механізмом Ca-сенсibilізації скорочення гладеньких м'язів є інгібування міозинфосфатази гладеньких м'язів, що збільшує фосфорилування MLC20 через підвищений базальний рівень активності MLCK.

У гладеньких м'язах існує Rho-регульована система MLCP, і Rho-кіназа є основним ферментом у цій системі. Було показано, що сенсibilізація Ca через RhoA/Rho-кіназний шлях сприяє тонічній фазі агоністичного скорочення гладеньких м'язів.

Повернення Ca^{2+} до рівня спокою призводить до дисоціації Ca^{2+} від CaM, інактивації MLCK та дефосфорилування міозину, що каталізується MLCP.

1.2 Інтерстиціальні клітини Кахаля (ІКК)

Сантьяго Рамон-і-Кахал, іспанський нейробіолог і патологоанатом, спостерігаючи за тонким кишечником кроликів, виявив наявність унікальних клітин біля вегетативних нервових закінчень. Пізніше ці клітини були названі «інтерстиціальними клітинами Каджала (ІКК)». Після першого відкриття ІКК їхні фізіологічні функції залишалися нез'ясованими протягом багатьох років, оскільки методів ідентифікації ІКК не існувало (окрім морфологічних). Першим проривом у цій галузі стало відкриття молекулярного маркера для ІКК.

ІКК є «клітинами-пейсмейкерами» для гладком'язового апарату шлунково-кишкового тракту. ІКК походять від c-Kit-позитивних мезенхімальних клітин-попередників. ІКК в шлунку розташовані в підм'язовому, внутрішньом'язовому, мієнтеральному та підсерозному шарах шлункової стінки. МУ-ІКК розташовані між циркулярними і поздовжніми м'язовими шарами шлунка і є ІКК, відповідальними за генерацію повільних хвиль. Ці ІКК спонтанно генерують повільні хвилі, які проводяться в сусідні гладком'язові клітини і викликають деполяризацію і скорочення гладких м'язів шляхом активації потенціалзалежних, дигідропіридинчутливих (I-типу) кальцієвих каналів. Збільшення амплітуди потенціалу плато корелює зі збільшенням амплітуди скорочення гладких м'язів. Повільні хвилі поширюються циркулярно і дистально через мережу ІКК через щілинні з'єднання і залучають більш дистальні ІКК з повільними власними частотами до вищої частоти повільних хвиль - частоти кардіостимулятора.

ІКК також розташовані в шарах циркулярних гладких м'язів (ІМ-ІКК), де вони інтегрують і координують поширення повільної хвилі і скорочення гладких м'язів, ініційоване МУ-ІКК. Повільні хвилі не регенеруються в клітинах гладких м'язів, оскільки іонні канали, необхідні для генерації і поширення повільних хвиль, не експресуються в гладких м'язах шлунка.

У тілі та антральному відділі шлунка МҮ-ІКК утворюють безперервну решітчасту мережу взаємозв'язків, яка простягається від кардіостимулятора циркулярно і абортально до пілоруса. МҮ-ІКК встановлюють домінуючу частоту пейсмекера, а ІМ-ІКК переносять повільну хвилю в циркулярні пучки гладких м'язів, координуючи циркулярне і абортівне поширення хвилі скорочення.

ІКК мають вроджену ритмічність, яка базується на їх унікальному метаболізмі та потоках внутрішньоклітинного та позаклітинного кальцію. Найактивніша зона деполяризації та реполяризації ІКК знаходиться в пейсмекерній ділянці шлунка, розташованій між дном і проксимальним відділом тіла. Деполяризація і реполяризація ІКК регенерується і поширюється через мережу ІКК у мігруючому хвильовому фронті, який рухається від пейсмекера по великій кривій через тіло і антральний відділ шлунка до пілоруса, як показано на, перекиваючи шлях шлункових перистальтичних скорочень. Збуджуючі входи (наприклад, холінергічні стимули, розтягнення) в МҮ-ІКК призводять до відкриття кальцієвих каналів і деполяризації гладком'язових клітин з активацією ІМ-ІКК для координації скорочень циркулярних м'язових клітин у часі і просторі. Таким чином, мережі ІКК забезпечують контроль частоти і швидкості поширення скорочень циркулярних м'язів, які складають хвилі шлункової перистальтики.

У дній частині шлунка відсутні повільні хвилі. ІМ-ІКК в очному дні відіграють роль у механорецепції і діють як сенсорні клітини, що мають зв'язок з аферентними нейронами блукаючого нерва, які іннервують очне дно. Очні ІМ-ІКК також іннервуються гальмівними нейронами блукаючого нерва, які регулюють тонус очного дна. Таким чином, ІКК також беруть участь у розслабленні тонусу очного дна, що відбувається під час акомодатії.

Втрата ІКК в антральному відділі асоціюється з гастропарезом у пацієнтів з цукровим діабетом. Пацієнти з діабетичним гастропарезом і тяжкою втратою ІКК мають більше шлункових електричних дисритмій (тахігастрія), більше симптомів з боку верхніх відділів шлунково-кишкового

тракту і гіршу реакцію на шлункову електростимуляцію в порівнянні з пацієнтами з нормальною кількістю ІКК. Електричні дисритмії та гастропарез були зареєстровані у гризунів з експериментальним діабетом. Переривання шляхів ІКК через недіабетичні механізми також призводить до шлункових дисритмій та ектопічних кардіостимуляторів, які подібні до шлункових дисритмій, виявлених у пацієнтів з діабетом.

1.3 Мускаринові ацетилхолінові рецептори у гладеньких м'язах товстого кишечника

Мускаринові ацетилхолінові рецептори, які включають п'ять підтипів (рецептори M_1 - M_5), експресуються як у ЦНС, так і в ПНС. Рецептори M_1 - M_5 є інтегральними мембранними білками з семи трансмембранних сегментів, зв'язуються з ацетилхоліном у позаклітинній фазі, а потім взаємодіють і активують GTP-зв'язувальні регуляторні білки (G білки) у внутрішньоклітинній фазі: M_1 , M_3 і M_5 взаємодіють з G-білками типу G_q , а M_2 і M_4 рецептори з білками типу G G_i/G_o . Активовані G-білки ініціюють низку внутрішньоклітинних систем передачі сигналу. Зв'язані з агоністами мускаринові рецептори фосфорилуються рецепторними кіназами, пов'язаними з G-протеїном, які ініціюють їх десенсибілізацію шляхом від'єднання від G-білків, інтерналізації рецепторів і розпаду рецепторів (понижуюча регуляція).

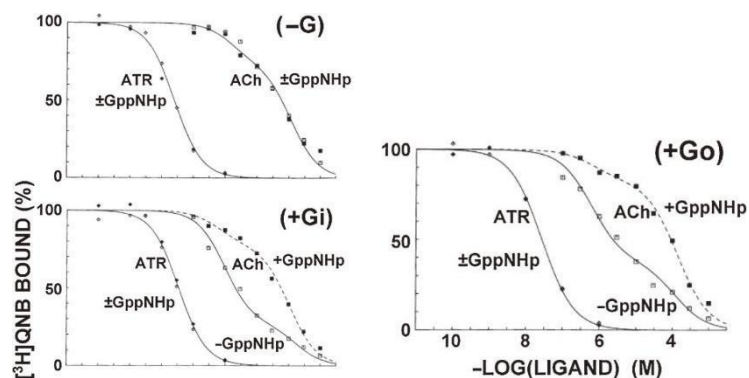


Рис. 1.2 Взаємодія мускаринових рецепторів з G-білком G_i або G_o

Концепція мускаринових рецепторів походить зі звіту Дейла в 1914 році, хоча він не використовував термін рецептор. Він повідомив, що дії кількох видів ефірів холіну або інших похідних у різних тканинах можна розділити на мускаринові та нікотинові, які зазвичай імітують мускарин та нікотин відповідно. Мускарин є натуральним продуктом деяких грибів, включаючи *Amanita muscaria*, і імітує дії парасимпатичних нейронів, які включають вазодилатацію судин, уповільнення частоти серцевих скорочень, звуження бронхіол, викликання секреції слини, звуження зіниць очей тощо.

Ендогенним лігандом для мускаринових рецепторів, а також для нікотинових рецепторів є ацетилхолін було підтверджено серією експериментів Льові, Дейла та інших у 1921–1934 рр. Зараз відомо, що ацетилхолін є нейромедіатором як у периферичній (ПНС), так і в центральній (ЦНС) нервовій системі: нейрони, що містять ацетилхолін як нейромедіатор, називаються холінергічними нейронами. Холінергічні нейрони в периферичній нервовій системі включають рухові нейрони, постгангліонарні парасимпатичні нейрони та прегангліонарні симпатичні та парасимпатичні нейрони. Мускаринові рецептори є рецепторами для ацетилхоліну у постгангліонарних парасимпатичних нейронах і присутні в органах-мішенях парасимпатичних нейронів, які охоплюють майже всі органи, тоді як нікотинові рецептори є рецепторами для ацетилхоліну у мотонейронах і прегангліонарних нейронах і присутні в скелетних м'язах і в постгангліонарних нейронах.

Амінокислотні послідовності M_1 і M_2 рецепторів були виведені з нуклеотидних послідовностей кДНК. Три з п'яти послідовностей, визначених для мускаринових рецепторів, очищених з мозку свиней, були знайдені в послідовності M_1 -рецепторів, і дві - в послідовності M_2 -рецепторів. M_1 і M_2 рецептори складаються з 460 і 466 амінокислотних залишків з розрахованою молекулярною масою 51 і 52 кДа, відповідно. Різниця між цими значеннями та значенням 70 кДа, визначеним за допомогою SDS-PAGE для церебральних мускаринових рецепторів, повинна була пояснюватися внеском вуглеводного

фрагмента, що було підтверджено обробкою ендоглікозидазою церебральних та передсердних рецепторів. Насправді, послідовності M_1 та M_2 рецепторів містять два та три потенційні сайти N-глікозилювання з консенсусною послідовністю NXS/TX в амінокінцевій частині.

Скринінг кДНК або генів, що демонструють гомологію з кДНК рецепторів M_1 і M_2 в бібліотеці кДНК або геномній бібліотеці, призвів до ідентифікації інших мускаринових рецепторів, які були названі рецепторами M_3 , M_4 і M_5 . Було виявлено, що кодуючі ділянки цих п'яти рецепторів знаходяться в одному екзоні і не містять інтрону, і, таким чином, гени з повною довжиною кодуючої ділянки можуть бути легко клоновані з геномної бібліотеки. Наявність рецепторів M_1 і M_2 , а також, можливо, і M_3 , була очікуваною з фармакологічних досліджень, але наявність рецепторів M_4 і M_5 не була передбачена до того, як були клоновані їхні кДНК або гени. Фармакологічні властивості цих п'яти мускаринових рецепторів були визначені шляхом їх експресії спочатку на ооцитах *Xenopus*, а пізніше на культивованих клітинах, таких як клітини COS, CHO або HEK293.

Наявність п'яти різних мускаринових рецепторів дає можливість розробляти специфічні для кожного підтипу ліганди, які можуть впливати лише на певний підтип і, таким чином, на певну фізіологічну функцію. Крім того, численні підтипи мускаринових рецепторів сприяють тонкій регуляції багатьох фізіологічних функцій за допомогою ацетилхоліну. Наприклад, продемонстрували, що секреція кислоти парієтальними клітинами регулюється подвійним чином мускариновими агоністами, тобто стимуляцією та інгібуванням при їх низьких та високих концентраціях відповідно, найімовірніше, через різні підтипи мускаринових рецепторів.

Мускаринові рецептори широко розповсюджені в організмі людини та забезпечують різні фізіологічні функції відповідно до розташування та підтипу рецепторів. Відомо, що існує п'ять різних підтипів мускаринових рецепторів (M_1 – M_5), хоча точне розташування та функціональна роль усіх цих підтипів на сьогоднішній день повністю не з'ясовані. Зокрема, ці рецептори

можуть виконувати різні, але життєво важливі ролі в одній системі організму з потенційною взаємодією між підтипами. Таким чином, глибоке розуміння цих різних підтипів мускаринових рецепторів є важливим.

У шлунково-кишковому тракті та інших органах mAChR викликають збудження і скорочення гладких м'язів. Вважалося, що основним медіатором є M_2 і M_3 , але нещодавні дослідження показали, що M_2 також модулює скорочення, пригнічуючи цАМФ-залежне розслаблення і регулюючи іонні канали.

Дослідження з використанням нокаутних мишей mAChR проливають світло на специфічні підтипи, що відіграють роль у збудженні та скороченні гладких м'язів. Крім того, пре-з'єднувальні mAChR на ентеральних нейронах впливають на активність гладеньких м'язів, модулюючи нейромедіатори, такі як АХ (ацетилхолін) та оксид азоту.

Активація мускаринових ацетилхолінових рецепторів (mAChR) у гладких м'язах шлунково-кишкового тракту викликає дві ключові реакції: пригнічення аденілілциклази, що знижує рівень цАМФ, і стимуляцію фосфоліпази С (PLC), що призводить до утворення інозитол-1,4,5-трифосфату ($InsP_3$) і діацилгліцеролу (DAG). Ці реакції викликають вивільнення кальцію та активацію протеїнкінази С (PKC), що впливає на різні клітинні процеси.

Дослідження вивчали роль підтипів mAChR у цих шляхах, використовуючи нокаутовані (КО) моделі мишей. Під час досліджень виявили, що карбахол, неселективний агоніст mAChR, переважно інгібує аденілілциклазу через M_2 -рецептори, тоді як в інших дослідженнях спостерігали M_3 -опосередкований гідроліз фосфоінозитиду в тканині сечового міхура. У клубовій кишці підтипи M_1 , M_2 і M_3 були залучені до фосфоінозитидної реакції, причому M_3 відігравав основну роль. Однак точний внесок M_1 ще належить підтвердити.

У гладких м'язах шлунково-кишкового тракту та інших вісцеральних гладких м'язів описано численні ефекти активації mAChR на іонні канали, включаючи активацію неселективних катіонних каналів або хлорних (Cl^-)

каналів, інгібування або потенціювання потенціалзалежних Ca^{2+} каналів (VDCC) і модуляцію декількох типів K^+ каналів.

Активація mAChR викликає деполяризацію та скорочення гладеньких м'язів переважно через відкриття неселективних катіонних каналів. Спочатку вважалося, що M_2 -рецептори опосередковують цей ефект, а M_3 -рецептори підсилюють його за рахунок вивільнення кальцію. Однак останні дані свідчать про те, що і M_2 , і M_3 рецептори роблять свій внесок, причому їхня взаємодія має вирішальне значення. Експерименти на нокаутованих мишах підтверджують це, показуючи, що видалення M_2 і M_3 різко знижує активність каналів. Одноканальні записи виявили три чіткі патерни активації, що вказують на залучення обох рецепторів як окремо, так і в синергії.

За катіонний струм відповідають канали TRPC4 і TRPC6, а не передбачувані раніше TRPC-канали, причому TRPC4 переважно активується M_3 , а TRPC6 - потенційно M_3 через DAG. Шлях M_2 модулює відкриття TRPC4 та інгібує аденілові циклази. Шлях M_2/M_3 поєднує сигнали від обох рецепторів, що забезпечує синергізм, необхідний для надійної активації каналу.

Тісний зв'язок між рецепторами M_2/M_3 , G-білками (Go/Gq/11) і TRPC-каналами дозволяє припустити наявність спеціалізованого сигнального шляху. Однак точний механізм цієї взаємодії залишається невловимим, оскільки деякі антитіла демонструють неочікувану поведінку, можливо, через структурну складність комплексу. Гетеродимеризація рецепторів M_2/M_3 може додатково сприяти специфічності цього сигнального комплексу.

K^+ канали відіграють важливу роль у регуляції мембранного потенціалу спокою та кінетики збудження в гладких м'язах шлунково-кишкового тракту. Мускаринові рецептори, зокрема M_3 , модулюють K^+ -канали, такі як K^+ -канали великої провідності, що активуються Ca^{2+} , шляхом внутрішньоклітинного вивільнення Ca^{2+} . Активація M_3 -рецепторів призводить до відкриття BK-каналів, тоді як M_2 -рецептори можуть пригнічувати їхню активність. АТФ-чутливі K^+ (КАТФ) канали також регулюються мускариновими рецепторами,

в першу чергу M_3 , PLC-залежним, але PKC-незалежним шляхом. Хлорні канали, що запускаються внутрішньоклітинним вивільненням Ca^{2+} , сприяють деполяризації, а мускаринові агоністи активують Cl^- -струми, особливо через M_3 -рецептори.

Потенціалзалежні Ca^{2+} - канали (VDCC) є основним шляхом входу Ca^{2+} під час деполяризації гладеньких м'язів. Незважаючи на деполяризацію гладеньких м'язів за допомогою mACh-рецепторів, їх активація, як правило, пригнічує VDCCs та вхідний Ca^{2+} струм (ICa), що, ймовірно, запобігає перевантаженню цитозольного Ca^{2+} . Карбахол інгібує ICa у двофазний спосіб у міоцитах клубової кишки морських свинок та мишей, причому початкова фаза пов'язана з інактивацією Ca^{2+} - індукованих каналів через шлях $M_3/Gq/11/PLC/InsP_3$, а механізми тривалої фази залишаються нез'ясованими. Експериментальні дані, отримані на мишах з нокаутованим геном mAChR (KO), свідчать про те, що як M_2 , так і M_3 рецептори опосередковують пригнічення ICa, причому M_2 рецептори діють через білки Gi/o , а M_3 рецептори - через $Gq/11$. Крім того, синергічний шлях, що включає як M_2 , так і M_3 рецептори, робить значний внесок у стійке пригнічення ICa, індуковане карбахолом. Цей комбінований шлях включає Ca^{2+} як потенціюючий фактор і, ймовірно, сходиться на катіонних каналах TRPC4/6 і VDCC. Однак є повідомлення про те, що за певних умов, наприклад, у міоцитах товстої кишки кролів, активація M_2 -рецепторів може посилювати ICa, що вказує на складність модуляції mACh-рецепторів ICa. Дослідження на mAChR-KO мишах свідчать про те, що M_2 -рецептори регулюють канали TRPC4 і VDCC, тоді як M_3 -рецептори регулюють ширший спектр іонних каналів, включаючи TRPC6, BK, KATP і Cl^- -канали.

Дослідження на мишах з нокаутованим геном mAChR (KO) з'ясували роль мускаринових шляхів у зміні мембранного потенціалу та потенціалів збуджувальних з'єднань у міоцитах клубової кишки. Індукована карбахолом деполяризація в клітинах дикого типу є дозозалежною, причому M_2 -рецептори роблять основний внесок у деполяризацію за низьких концентрацій агоніста,

тоді як M_3 -рецептори домінують за вищих концентрацій. M_3 -КО клітини демонструють мінімальну деполяризацію, що вказує на важливість M_3 -рецепторів у цьому процесі. Клітини M_2/M_3 подвійного КО не виявляють деполяризації, викликаной карбахолом, але реагують на $PGF2\alpha$, що свідчить про наявність різних шляхів. Вимірювання EJP у мишей $mAChR$ -КО показують внесок як M_2 , так і M_3 рецепторів, причому M_2/M_3 шлях відіграє більшу роль у холінергічних EJP. Однак, зауважте, що умови експерименту та застосування препаратів можуть впливати на ці відповіді.

Мускаринові рецептори в першу чергу регулюють скоротливу напругу гладких м'язів шляхом збільшення внутрішньоклітинного кальцію (Ca^{2+}). Крім того, вони можуть підвищувати чутливість скоротливих білків до кальцію двома шляхами за участю Rho/Rho-кінази та РКС. Обидва шляхи, ймовірно, ініціюються M_3 -рецепторами, з потенційною модуляцією M_2 -рецепторами через інші кінази.

Дослідження зосереджене на ідентифікації підтипів $mAChR$, залучених до карбахол-індукованої Ca^{2+} -сенсibiliзації. Вони порівнювали співвідношення $[Ca^{2+}]$ і (pCa)-напруження в клубових м'язах мишей з $mAChR$ -КО та мишей дикого типу. Карбахол збільшував реакцію напруження на кальцій у смужках мишей дикого типу та M_2 -КО, тоді як у смужках M_3 -КО та M_2/M_3 подвійного КО спостерігалися мінімальні зміни. Ці ефекти були опосередковані через M_3 -рецептори, з'єднані з білками Gq/11, без доказів залучення M_2 -рецепторів.

Тривалий вплив мускаринових агоністів на гладкі м'язи шлунково-кишкового тракту зменшує подальшу скоротливу реакцію на інші спазмогени. Ця гетерологічна десенсибілізація залучає як M_2 , так і M_3 рецептори, як показано в дослідженнях на клубовій кишці морських свинок і мишей. Дослідження, що десенсибілізація до $PGF2\alpha$ вимагає участі як M_2 , так і M_3 рецепторів, тоді як десенсибілізація до оксотреморину-М вимагає участі лише M_2 рецепторів. Синергія між M_2 і M_3 рецепторами призводить до значного відкриття TRPC4 каналів, що потенційно спричиняє внутрішньоклітинне

накопичення Na^+ і втрату K^+ , прискорюючи активність трансмембранного Na^+ - K^+ насоса і призводячи до гіперполяризації. Крім того, пригнічення активності VDCC через взаємодію M_2/M_3 може сприяти гетерологічній десенсibiliзації.

1.4 Сполуки-холіноміметики та їх застосування у терапії захворювань

Холіноміметики або холіноблокатори - це препарати, які викликають ефекти, подібні до тих, що виникають при введенні ацетилхоліну або імітації гангліїв парасимпатичної нервової системи. Ці препарати імітують дію ацетилхоліну, що вивільняється ендогенно. Відомо, що ефект ацетилхоліну в одних органах може бути відтворений алкалоїдом мускарином, а в інших - алкалоїдом нікотинном. На цьому спостереженні ґрунтується поділ холінорецепторів на так звані мукаринові (M-холінорецептори) та нікотинові (N-холінорецептори). Холінорецептори в певних місцях мають різну чутливість до різних препаратів. Нервова система людини налічує понад 10 мільярдів нейронів, які взаємодіють між собою за допомогою нейромедіаторів. Нейромедіаторами в центральній нервовій системі є ацетилхолін, ряд біогенних амінів (норадреналін, дофамін, серотонін і, ймовірно, гістамін і норадреналін), деякі амінокислоти і пептиди, а також аденозин. Амінокислотні нейромедіатори - це глутамінова та аспарагінова кислоти, які збуджують рецептори постсинаптичних мембран деяких нейронів, а також γ -аміномасляна кислота (ГАМК) і гліцин, які є гальмівними нейромедіаторами. Ендорфіни, енкефаліни та субстанція Р вважаються пептидергічними передавачами. Існує багато сполук, які імітують дію цих нейромедіаторів. Ацетилхолін є основним нейромедіатором парасимпатичного відділу вегетативної нервової системи, який переважно іннервує шлунково-кишковий тракт, очі, серце, дихальні шляхи та залози внутрішньої секреції. Хоча його рецептори мають вирішальне значення для підтримки всіх нормальних функцій організму, надзвичайно мала кількість захворювань може бути

пояснена дисфункцією холінергічних ділянок периферичної вегетативної системи.

Хоча ацетилхолін сам по собі є речовиною, без якої нормальне функціонування організму було б неможливим, дві властивості роблять його вкрай небажаним для використання в якості лікарського засобу. По-перше, його дія дуже коротка через швидке розщеплення холінестеразами, а по-друге - і це більш важливо - різноманітність дії, що робить практично неможливим зробити його дію специфічною для виконання певних завдань. Однак ряд похідних ацетилхоліну є більш стійкими до дії холінестерази і можуть мати більш селективну дію. Таким чином, холіноміметики - це препарати, які імітують дію ацетилхоліну, що вивільняється ендогенно. Холінергічні рецептори з'єднані з G-білками (внутрішньомембранними трансдукторами, які регулюють другі месенджери). Класифікації цих препаратів ґрунтуються на механізмі їх дії, який проявляється або шляхом прямої стимуляції 179 холінорецепторів ефірами холіну або холіноміметичними алкалоїдами, або опосередкованим шляхом інгібування ацетилхолінестерази - ферментів, що відповідають за хімічний розпад ацетилхоліну. Вони, в свою чергу, поділяються на оборотні інгібітори холінестерази та незворотні інгібітори холінестерази. Отже, парасимпатичні нерви використовують ацетилхолін як нейромедіатор, а холіноміметичні препарати імітують дію ацетилхоліну на його рецептори.

Підтипи мускаринових рецепторів знаходяться на нейроефекторних з'єднаннях. Нікотиніві підтипи рецепторів знаходяться на гангліонарних синапсах. Холіноміметики можна класифікувати як: 1. Прямої дії (агоністи рецепторів), що діють на мускаринові та нікотиніві рецептори. 2. Непрямої дії (інгібітори холінестерази), які, в свою чергу, можуть бути оборотними або необоротними. Агоністи мускаринових рецепторів - це препарати, які імітують ацетилхолін у нейроефекторних вузлах ПНС і загалом діють на гладку мускулатуру ока, звужуючи зіницю (міоз), скорочуючи цилиарний м'яз, що використовується переважно в офтальмології для лікування катаракти

(викликає швидкий міоз), знижують внутрішньоочний тиск, відкриваючи дренажний кут передньої камери ока, застосовуються для лікування глаукоми. Водночас вони селективно стимулюють сечовий і шлунково-кишковий тракти, полегшуючи випорожнення нейрогенного сечового міхура у пацієнтів після хірургічних операцій, пологів або при травмах спинного мозку. Агоністи нікотинових рецепторів імітують вплив ацетилхоліну на нікотинові рецептори вегетативних гангліонарних синапсів і скелетних нервово-м'язових з'єднань. Вони не мають терапевтичної дії, але важливі своєю токсичністю. Єдиним випадком медичної користі є їх використання як трансдермального пластиру або жувальної гумки для припинення куріння.

Холіноміметики прямої дії - це препарати, які діють безпосередньо шляхом стимуляції холінорецепторів. Вони поділяються на препарати, що стимулюють мускаринові (М-холінорецептори) або нікотинові (Н-холінорецептори) рецептори. Препарати, дія яких пов'язана насамперед зі стимуляцією мускаринових рецепторів, до яких належать ефіри холіну, тобто ацетилхолін та його структурні аналоги - метахолін, карбахолін, бетанехол, а також природні алкалоїди мускарин і пілокарпін. До препаратів, дія яких базується на стимуляції нікотинових рецепторів, належать алкалоїди нікотин і лобелін.

Холіноміметики непрямої дії - це клас препаратів, які посилюють холінергічну нейротрансмісію шляхом збільшення концентрації ацетилхоліну (АХ) у місцях розташування холінорецепторів у нервовій системі. На відміну від холіноміметиків прямої дії, які безпосередньо зв'язуються з холінорецепторами та активують їх, холіноміметики непрямої дії діють шляхом інгібування ферменту ацетилхолінестерази, який відповідає за розщеплення АХ в синаптичній щілині.

РОЗДІЛ 2

Матеріали та методи дослідження

2.1 Метод тензометрії (в ізометричному режимі реєстрації)

Дослідження проводили на щурах лінії Вістар, які утримувалися в ДУ «Інститут фармакології і токсикології НАН України». Щури перебували на стандартній дієті та при стандартних умовах: температура 20 ± 2 °С, відносна вологість повітря 50-70%, світловий режим світло:темрява = 12:12 год. Усі операції на тваринах проводились відповідно до Міжнародної конвенції про роботу з тваринами та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Щурів умертвляли шляхом дислокації шийних хребців під анестезією хлороформом.

Скоротливу активність препаратів кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки (саесум) вивчали тензометрично в ізометричному режимі. М'язи сліпої кишки попередньо очищали від слизової оболонки і розрізали по колу на препарати (середній розмір 1,2 x 7 мм) і поміщали в робочу камеру (об'ємом 2 мл) з проточним розчином Кребса (швидкість потоку – 5 мл/хв), термостатовану при температурі 37°C; прикладали до препарату пасивний натяг (10 мН) і залишали на 1 годину.

Розчин Кребса який використовувався для дослідів: 120,4 NaCl; 5,9 KCl; 15,5 NaHCO₃; 1,2 NaH₂PO₄; 1,2 MgCl₂; 2,5 CaCl₂; 11,5 глюкоза; рН розчину становив 7,4. У роботі використовували ацетилхолін (ефективна концентрація 10 мкМ) та AF-DX 116 (ефективна концентрація 1 мкМ) виробництва Sigma.

Сполуку 248008 синтезовано та охарактеризовано фізико-хімічними методами в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України. При використанні попередньо готують маточний розчин у диметилсульфоксиді (ДМСО) і додають 0,25% зазначеної речовини до кінцевого об'єму. Крім того, усі контрольовані дослідження скорочувальної активності сліпої кишки проводили в контексті 0,25% ДМСО.

Для дослідження скорочувальної активності нами був використаний прилад для вимірювання напруги виробництва Інституту фізіології імені О.О. Богомольця (Рис. 2.1).

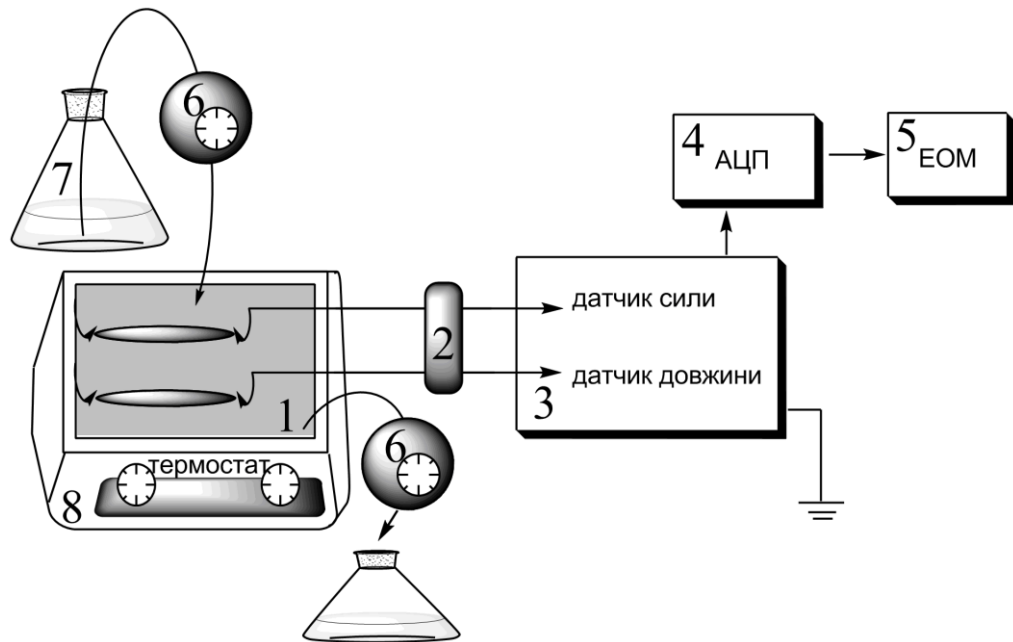


Рис. 2.1 Устаткування для тензометричних експериментів на багатоклітинних препаратах гладеньких м'язів: 1 - робоча камера, заповнена робочим розчином, з гладеньком'язовими препаратами, які закріплено на гачках; 2 – датчики сили (за умови реєстрації в ізометричних умовах) та переміщення (за умови реєстрації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

М'язи травного тракту (сліпої кишки) попередньо видаляли від слизової оболонки під бінокулярним мікроскопом за допомогою мікроінструментів, що використовуються в офтальмохірургії, і робили надрізи в потрібному напрямку для розміщення м'язових волокон (зазвичай та якщо не вказано окремо, експерименти проводили на кільцевих м'язах) на смужки необхідного розміру (зазвичай, якщо не вказано окремо, середній розмір становить 2 x 10 мм).

Для дослідження спонтанної та індукованої скорочувальної активності в робочу камеру (ефективний об'єм 2,0 мл) тонометричного приладу поміщають

гладком'язовий препарат (рис. 2.1) і додають стійкий розчин Кребса (швидкість потоку – 5 мл/хв) і залишають на 1 годину, до стабільної відтворюваності скорочень. За допомогою рідинного термостата термостатування робочої камери на рівні $(37,5 \pm 0,3)^\circ\text{C}$.

2.2 Кінетичний аналіз викликаних скорочень

В експериментальній частині ми використовували аналіз кінетичних закономірностей процесів розслаблення та скорочення. В експерименті ми проводили окремо вимірювання фаз скорочення та розслаблення на повній механокінетичній кривій, і з використанням модифікованого методу Костеріна-Бурдиги. Цей закон постулює, що фрагмент кривої в фазі розслаблення може бути описаний емпіричним рівнянням такого вигляду:

$$f = f_m \frac{\tau^n}{\tau^n + t^n} \quad (1.1)$$

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 $n = d\{\ln[(f_m-f)/f]\}/dt$.

Для того щоб лінеаризувати графіки ми візьмемо формулу (1.1) і перетворимо її в лінеаризовану форму:

$$\ln\left(\frac{f_m - f}{f}\right) = n \ln t - n \ln \tau \quad (1.2)$$

Використовуючи рівняння (1.2) можемо лінеаризувати фазу

$$\text{розслаблення в координатах } \left\{ \ln \left(\frac{f_m - f}{f} \right); \ln t \right\}.$$

Для того щоб розрахувати нормованої максимальної швидкості фази розслаблення (V_n), ми будемо використовувати параметри n і τ .

$$V_n = \frac{(n-1)^{\frac{n-1}{n}} \cdot (n+1)^{\frac{n+1}{n}}}{4n\tau} \quad (1.3)$$

Варто зазначити, що нормалізований піковий параметр швидкості (1.3) не залежить від амплітуди, тому він корисний для порівняння даних, отриманих для різних препаратів тощо. Цей метод дозволяє розрахувати механічні кінетичні параметри, що характеризують спонтанні або викликані скоротливі реакції і не залежать від амплітуди.

2.3 Кінетичний аналіз спонтанних скорочень

Як згадувалося раніше, механічний кінетичний аналіз процесів скорочення-розслаблення гладкої мускулатури в модельних експериментах *in vitro* є важливим кроком у з'ясуванні механізмів електричного та фармакомеханічного зв'язку та вивченні впливу фізіологічно активних і фармакологічних сполук на скорочувальну активність. В ізометричному режимі запису скорочувальної активності (тривалість підготовки м'яза = const) типова механічна кінетична крива $f = f(t)$ процесу скорочення-розслаблення гладких м'язів є надскладною кривою, що характеризується двома точками перегину: систолою – координата - F_C ; τ_C і фаза релаксації - F_R ; τ_R координата, де F та τ - точка перегину ($(d^2f/dt^2)\tau_C, \tau_R = 0$), значення сили f і t при $\tau_R = 0$, точка екстремуму f в момент максимуму (амплітуди) $F_{\max} \quad t=\tau_0 \quad (df/dt)\tau_0=0$ кривої.

Формою цього рівняння є одне з найпростіших емпіричних рівнянь, яке потенційно може відповідати вищезазначеним кінетичним властивостям шляху скорочення-розслаблення гладкої мускулатури.

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

При цьому A , n та k – деякі сталі.

Безпосередньо із співвідношення (1):

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

Де:

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

$$\tau_C = \frac{n - \sqrt{n}}{k}, \quad \tau_R = \frac{n + \sqrt{n}}{k}$$

Звідки:

$$\tau_0 - \tau_C = \frac{\sqrt{n}}{k}, \quad \tau_R - \tau_0 = \frac{\sqrt{n}}{k}, \quad \tau_C = 2 \frac{\sqrt{n}}{k},$$

$$\frac{\tau_R - \tau_C}{\tau_R - \tau_0} = 2, \quad \frac{\tau_R - \tau_0}{\tau_0 - \tau_C} = 1.$$

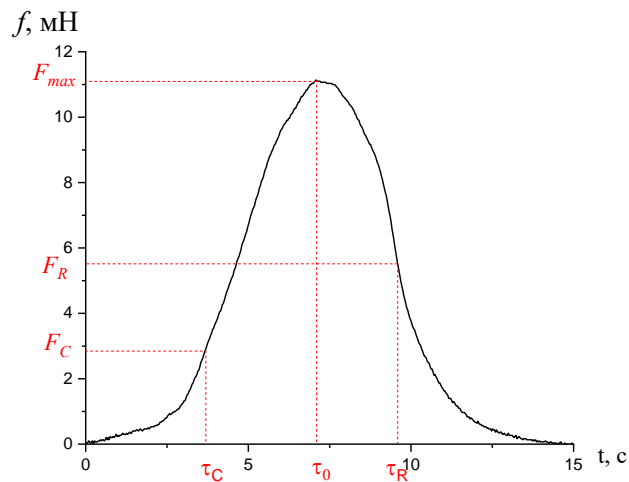


Рис. 2.2 Типовий повний ізометричний механокінетичний профіль процесу спонтанного скорочення-розслаблення гладкої мускулатури антрального відділу шлунка (antrum). Тут f та t – миттєві значення сили та часу на рівні скоротливого циклу, F_C та F_R – значення сили в точках перегину

$((d^2f/dt^2)\tau_C, \tau_R = 0)$ на рівні фаз скорочення та розслаблення в моменти часу τ_C та τ_R , відповідно, F_{\max} – максимальне значення сили f в момент часу τ_0 ($(df/dt)\tau_0 = 0$).

Щоб підтвердити що рівняння (2.2) може описувати механокінетику нашого процесу скорочення-розслаблення з включенням повного циклу, ми можемо сказати, що f_C – значення сили на рівні фази скорочення у момент часу $t < \tau_0$, а f_R – значення сили на рівні фази розслаблення в момент часу $t + \Delta t > \tau_0$ ($\Delta t = \text{const}$, вона задається експериментом). Тоді для цього ми візьмемо рівняння (2.1) і (2.2), і можемо записати їх як:

$$\ln\left(\frac{f_R}{f_C}\right) = -k \cdot \Delta t + n \cdot \ln\left(1 + \frac{\Delta t}{t}\right). \quad (2.5)$$

З цього співвідношення випливає, що ми можемо скоротити вираз до вигляду $\left[\ln\left(\frac{f_R}{f_C}\right); \ln\left(1 + \frac{\Delta t}{t}\right)\right]$, що дає нам можливість в цих координатах ліанеризувати графік. При використанні лінеаризації в цих координатах ми можемо ствердно сказати, що рівняння (2.1) надійно буде описувати механокінетику спонтанної відповіді на рівні повного циклу процесу ізометричного скорочення-розслаблення.

Тепер нам треба розібратися з значеннями k і n . Беручи до уваги формулу лінеаризації (2.5), k – це константа розмірність якої («час⁻¹»), варто зазначити, що при заданому значенні $\Delta t = \text{const}$, ми розраховуємо значення k як величина відрізка, що відсікається при екстраполяції лінійного графіку на вісь ординат. Тепер візьмемо значення n , що не має розмірності, і розраховується як тангенс кута нахилу цього графіку. На ці значення здебільшого впливають фізико-хімічні особливостей експерименту, вік та гормональний стан досліджуваної тварини, температури та складу середовища.

Для того щоб нам дізнатися миттєве значення сили f у будь-який момент часу t ми візьмемо співвідношення (2.1) та (2.2), і напишемо вираз для механокінетичної кривої в ізометричному режимі:

$$f = F_{max} \cdot \left(\frac{kt}{n}\right)^n \cdot e^{n-kt} . \quad (2.6)$$

З цього ми можемо зробити висновок, що рівняння (2.6) – буде основним рівнянням, що описує динаміку скорочення-розслаблення гладеньких м'язів за ізометричних умов. У випадку з цим рівнянням воно є інтегральним рівнянням, оскільки показує динаміку скорочення м'язів з використанням перинних експериментальних змінних f, t .

Використовуючи рівняння (2.3) і (2.4) ми можемо вивести співвідношення для емпіричних констант k і n , які входять в рівняння (2.6):

$$n = \left(\frac{\tau_0}{\tau_R - \tau_0}\right)^2 = \left(\frac{\tau_0}{\tau_0 - \tau_C}\right)^2 , \quad (2.7)$$

$$k = \frac{\tau_0}{(\tau_R - \tau_0)^2} = \frac{\tau_0}{(\tau_0 - \tau_C)^2} . \quad (2.8)$$

Тож ми можемо сказати, що значення констант, які входять до інтегрального механокінетичного рівняння (2.6), які в свою чергу розраховуються з використанням графіків які були заздалегідь лінеаризовані відповідно до рівняння (2.5), визначаються виключно характеристичними часовими параметрами механокінетичної кривої (повної) - τ_C, τ_R та τ_0 .

Перший закон спонтанного ізометричного скорочення-розслаблення базується на швидкості зміни механічної напруги гладенького м'язу, що визначається за формулою: $v = df/dt$, з виразу (2.6) ми можемо вивести ($v > 0$ при $t < \tau_0$; $v < 0$ при $t > \tau_0$):

$$v = F_{max} \cdot \left(\frac{kt}{n}\right)^n \cdot e^{n-kt} \cdot \left(\frac{n}{t} - k\right) \quad (2.9)$$

Тож приймаючи до уваги вираз (2.6) ми маємо:

$$v = f \cdot \frac{n-kt}{t} \quad (2.10)$$

Рівняння (2.10), відображає диференціальну форму базового механокінетичного рівняння, також треба зауважити, що при інтегруванні рівняння (2.10), призведе нас до базового інтегрального рівняння (2.6).

Із рівняння (2.10), також випливає таке співвідношення:

$$\frac{v}{f} = \frac{n}{t} - k \quad (2.11)$$

Вививши перший закон спонтанного скорочення-розслаблення вісцерального гладенького м'язу в ізометричному режимі: для повної механокінетичної кривої в будь-який момент часу t відношення миттєвої швидкості зміни сили v до миттєвого значення сили f змінюється обернено пропорційно до часу, протягом якого відбувається скорочення.

Взявши рівняння (2.4) та (2.6) для сили $f=F_C$ в точці перегину ($t=\tau_C$) на рівні фази скорочення механокінетичної кривої маємо рівняння вигляду:

$$F_C = F_{max} \cdot \left(\frac{n-\sqrt{n}}{n}\right)^n \cdot e^{\sqrt{n}} \quad (2.12)$$

Згідно з рівняннями (2.4) та (2.9), ми можемо записати рівняння для швидкості скорочення в цій точці $V=V_C$:

$$V_C = k \cdot F_{max} \cdot \left(\frac{n-\sqrt{n}}{n}\right)^{n-1} \cdot \frac{e^{\sqrt{n}}}{\sqrt{n}} \quad (2.13)$$

Тепер ми маємо зв'язок, згідно (2.12) та (2.13) між V_C та F_C :

$$V_C = \frac{k}{\sqrt{n}-1} F_C > 0 \quad (2.14)$$

Відповідно до рівнянь (2.4) та (2.8) для сили $f=F_R$ в точці перегину ($t=\tau_R$) на рівні фази розслаблення механокінетичної кривої маємо:

$$F_R = F_{max} \cdot \left(\frac{n+\sqrt{n}}{n}\right)^n \cdot e^{-\sqrt{n}} \quad (2.15)$$

Швидкість розслаблення в цій точці V_R , ми можемо записати згідно (2.9) та (2.4):

$$V_R = -k \cdot F_{max} \cdot \left(\frac{n+\sqrt{n}}{n}\right)^{n-1} \cdot \frac{e^{-\sqrt{n}}}{\sqrt{n}} \quad (2.16)$$

З рівнянь (2.15) та (2.16) зв'язок між V_R та F_R :

$$V_R = -\frac{k}{\sqrt{n}+1} F_R < 0 \quad (2.17)$$

Таким чином, відповідно до рівнянь (14) та (17), максимальні швидкості зміни м'язової напруги V_C та V_R у точках перегину механокінетичної кривої (при значеннях часу τ_C та τ_R) є прямо пропорційними відповідним значенням сил F_C та F_R у цих точках. Це формулює другий закон ізометричного скорочення-розслаблення вісцерального гладенького м'язу.

Далі з рівнянь (2.4), (2.14) та (2.17) маємо:

$$\frac{F_C}{F_R} = \frac{\tau_C}{\tau_R} \cdot \frac{V_C}{|V_R|} \quad (2.18)$$

Відповідно до рівняння (2.18), третій закон спонтанного ізометричного скорочення-розслаблення вісцерального гладенького м'язу можна сформулювати наступним чином: у точках перегину τ_C та τ_R механокінетичної кривої, відношення сили F_C на фазі скорочення до сили F_R на фазі розслаблення завжди є меншим за відношення максимальної швидкості зміни напруги V_C на фазі скорочення до максимальної швидкості зміни напруги V_R на фазі розслаблення.

Також для подальшого дослідження нам треба буде вивести формулу імпульсу сили у випадку спонтанного ізометричного скорочення-розслаблення гладкої мускулатури вісцерального м'язу:

Для імпульсу сили $I = f \cdot t$ у випадку повної механокінетичної кривої маємо зі співвідношення (2.6):

$$I = F_{max} \cdot \left(\frac{kt}{n}\right)^n \cdot e^{n-kt} \cdot t \quad (2.19)$$

Відповідно до рівнянь (2.4), на фазах скорочення та розслаблення вісцерального гладенького м'язу значення імпульсів сили I_C та I_R у точках перегину, відповідно, з абсцисами τ_C та τ_R можна представити наступним чином:

$$I_C = F_{max} \cdot \left(\frac{n-\sqrt{n}}{n}\right)^{n+1} \cdot \frac{n}{k} \cdot e^{\sqrt{n}} \quad (2.20)$$

$$I_R = F_{max} \cdot \left(\frac{n+\sqrt{n}}{n}\right)^{n+1} \cdot \frac{n}{k} \cdot e^{-\sqrt{n}} \quad (2.21)$$

Згідно (2.4), (2.20) та (2.21) для відношення імпульсів сили I_C/I_R маємо вираз:

$$\frac{I_C}{I_R} = \left(\frac{\tau_C}{\tau_R}\right)^{n+1} \cdot e^{2\sqrt{n}} \quad (2.22)$$

В точці екстремуму ($f = F_{max}$, $t = \tau_0$) для імпульсу сили I_{τ_0} маємо, згідно з (2.3):

$$I_{\tau_0} = F_{max} \cdot \tau_0 = F_{max} \cdot \frac{n}{k} \quad (2.23)$$

Імпульси сили I_C , I_R та $I_{\tau 0}$, що обчислюються за рівняннями (2.20), (2.21) та (2.23), є комплексними динамічними характеристиками циклу ізометричного скорочення-розслаблення вісцерального гладенького м'язу.

2.4 Статистична обробка

Експериментальні дані оброблено методом варіаційної статистики за допомогою програми OriginPro2018.

T-критерій Стьюдента, залежно від групи даних, використовується для визначення можливої різниці між середніми значеннями двох вибірок, підтверджуючи, що дві вибірки належать до нормально розподіленої сукупності.

Використовуємо критерій Фішера для аналізу надійності апроксимації даних лінійної функції; коефіцієнт кореляції Пірсона (r) не менше 0,95, а вимірне значення (R^2) не менше 0,9.

У всіх випадках результати вважалися достовірними, якщо значення ймовірності $p < 0,05$. Результати виражені як середнє арифметичне \pm стандартна помилка середнього, n – кількість експериментів.

РОЗДІЛ 3

Результати досліджень та їхнє обговорення

3.1 Модуляція ацетилхолін-індукованих скорочень саесит сполукою 248008

Для визначення ефектів сполуки 248008 на скорочення, викликані ацетилхоліном (10 мкМ), м'язові препарати попередньо інкубували зі сполукою (1 мкМ) протягом 5 хвилин. Слід зазначити, що додавання сполуки 248008 до розчину, яким омивали гладеньком'язові препарати, у концентрації 0,1 мкМ не викликало фазного скорочення, проте в цих умовах спостерігалось посилення спонтанних скорочень саесит, що потребувало детальнішого дослідження.

Додавання ацетилхоліну на тлі присутності сполуки 248008 викликало значне підвищення амплітуди ацетилхолін-індукованих скорочень, яке в середньому досягло $134,6 \pm 4,1$ % порівняно з контролем, який прийнято за 100% ($p < 0,01$, $n = 5$) (Рис. 3.1). Водночас було відзначено збільшення тонічного компоненту ацетилхолін-викликаних скорочень, який в середньому зріс до $134,1 \pm 3,9$ % ($p < 0,01$, $n = 5$).

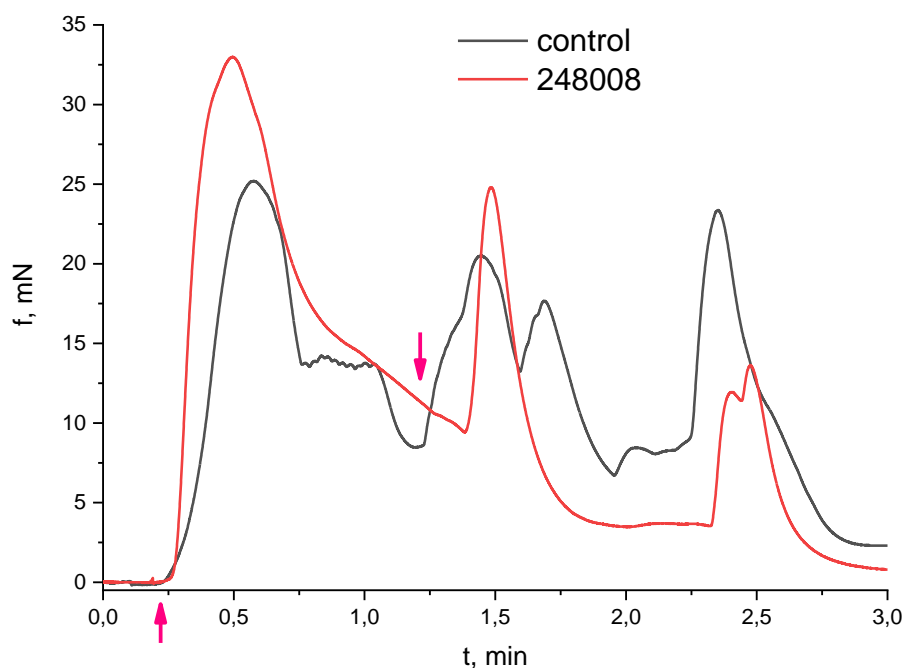


Рис. 3.1 Типові механограми скорочень кільцевих гладеньких м'язів саесум щурів, викликаних ацетилхоліном (1 мкМ), у контролі та після попередньої інкубації зі сполукою 248008 (1 мкМ) протягом 5 хвилин.

Механокінетичний аналіз показав, що сполука 248008 модулює фазу розслаблення, загалом покращуючи ефективність скорочувальної реакції. Нормована максимальна швидкість фази скорочення (V_{nc}) не виявила суттєвих відмінностей від контролю, складаючи в середньому $108,8 \pm 7,1 \%$ ($p > 0,05$, $n=5$). Натомість нормована швидкість фази розслаблення (V_{nr}) значно знизилася, в середньому до $51,7 \pm 4,3 \%$ ($p < 0,001$, $n=5$).

Підвищення амплітуди скорочень, викликаних ацетилхоліном, на фоні збільшення тонічного компонента та вибіркового уповільнення швидкості фази розслаблення під дією сполуки 248008, свідчить про можливість активації цією речовиною mAChRs M_2 -підтипу.

3.2. Дозові ефекти сполуки 248008 на функціонування саесум щурів.

На наступному етапі дослідження ми проаналізували механокінетичні ефекти кумулятивного введення сполуки 248008 в розчин, який омиває гладеньком'язові препарати саесум, у концентраціях 0.1, 1, 10 та 50 мкМ, при цьому кожна концентрація впливала протягом 10 хвилин.

Використання сполуки 248008 у найнижчій концентрації 0,1 мкМ не викликало фазного скорочення препаратів саесум, проте призвело до активації їх спонтанної скорочувальної активності (Рис. 3.2). За цих умов спостерігалось значне підвищення частоти спонтанних скорочень, у середньому до $168,8 \pm 9,2 \%$ ($p < 0,01$, $n=5$). Крім того, спостерігалася тенденція до зростання амплітуди спонтанних скорочень, яка становила $129,7 \pm 8,6 \%$ ($p = 0,079$, $n=5$).

Кумулятивне збільшення концентрації сполуки 248008 до 1 мкМ призводило до подальшої активації скорочувальної активності препаратів саесум. У цих умовах частота спонтанних скорочень збільшувалася до

середнього значення $572,6 \pm 23,4 \%$ ($p < 0,001$, $n=5$), а амплітуда скорочень досягала $281,0 \pm 11,7 \%$ ($p < 0,001$, $n=5$) порівняно з контролем.

Подальше підвищення концентрації сполуки 248008 до 10 мкМ супроводжувалося ще більшою активацією спонтанної скорочувальної активності гладеньких м'язів саесит. Зміни були найбільш виражені в амплітуді скорочень, яка в середньому досягала $508,8 \pm 27,9 \%$ від контролю ($n=5$), що було статистично значущо відмінним як від контролю ($p < 0,001$), так і від показників за концентрації 1 мкМ ($p < 0,001$) (Рис. 3.3(a)). Частота спонтанних скорочень також суттєво відрізнялася від контрольної величини, досягаючи середнього значення $614,6 \pm 35,1 \%$ від контролю ($n=5$, $p < 0,001$), хоча не відрізнялася від частоти при концентрації 1 мкМ ($p > 0,05$).

Збільшення концентрації сполуки до 50 мкМ призводило до ще більшої активації спонтанних скорочень гладеньком'язових препаратів. Амплітуда скорочень підвищувалася до середнього значення $605,6 \pm 31,3 \%$ від контролю ($p < 0,001$, $n=5$), що також було суттєво вище, ніж при концентрації 10 мкМ ($p < 0,01$) (Рис. 3.3(a)). Частота спонтанних скорочень надалі значно зростала, досягаючи в середньому $738,1 \pm 44,6 \%$ від контролю ($n=5$, $p < 0,001$).

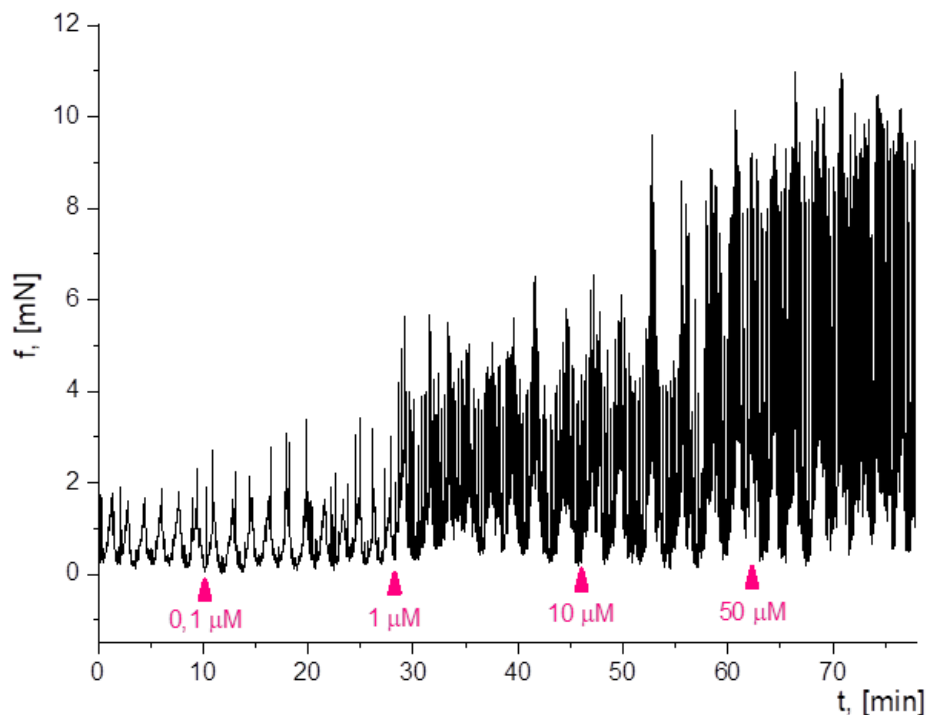


Рис. 3.2 Спонтанна скорочувальна активність кільцевих гладеньких м'язів саесит шурів у контрольних умовах та при кумулятивному додаванні

сполуки 248008 у концентраціях 0,1-50 мкМ до омиваючого розчину.

Представлено типову механограму.

Для отримання детальнішої інформації про вплив сполуки 248008 на функціонування гладеньких м'язів *saesum* щурів, окремі спонтанні скорочення були піддані багатопараметричному механокінетичному аналізу. Було розраховано часові (τ_0 , τ_C і τ_R), силові (F_C та F_R), швидкісні (V_C і V_R) та імпульсні (I_{max} , I_C та I_R) параметри (Рис. 3.3).

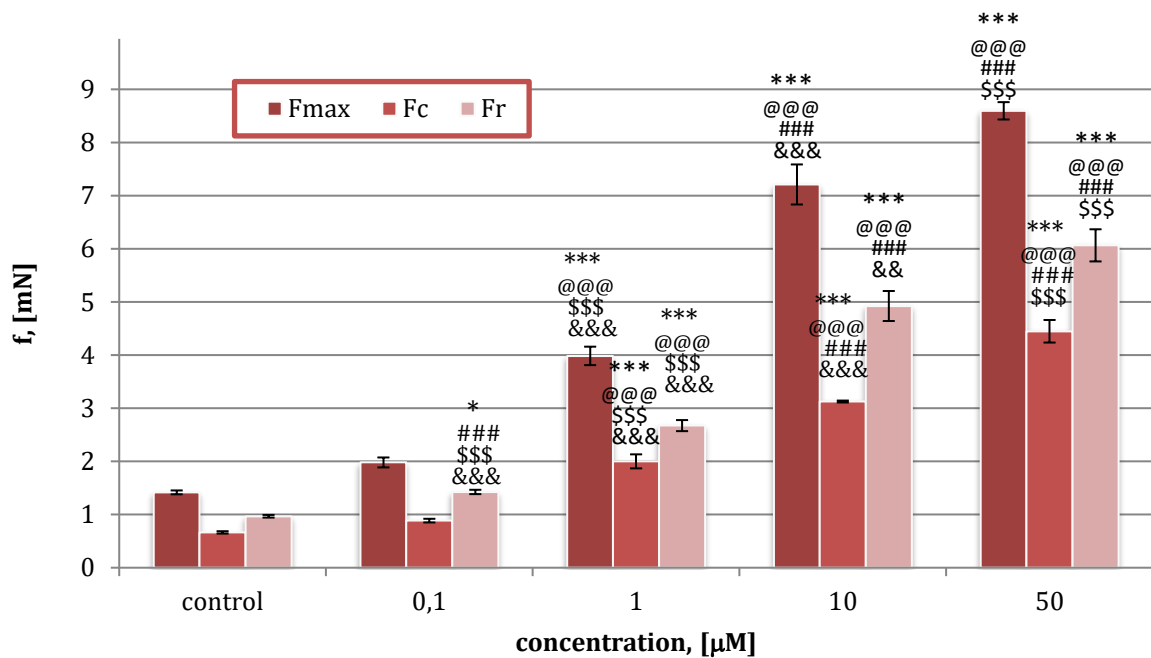


Рис. 3.3(а) Механокінетичні силові параметри (F_{max} , F_C та F_R) спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів *saesum* щурів у контролі та за кумулятивного внесення в омиваючий розчин сполуки 248008 у концентраціях 0.1-50 мкМ ($n = 5$, $M \pm m$).

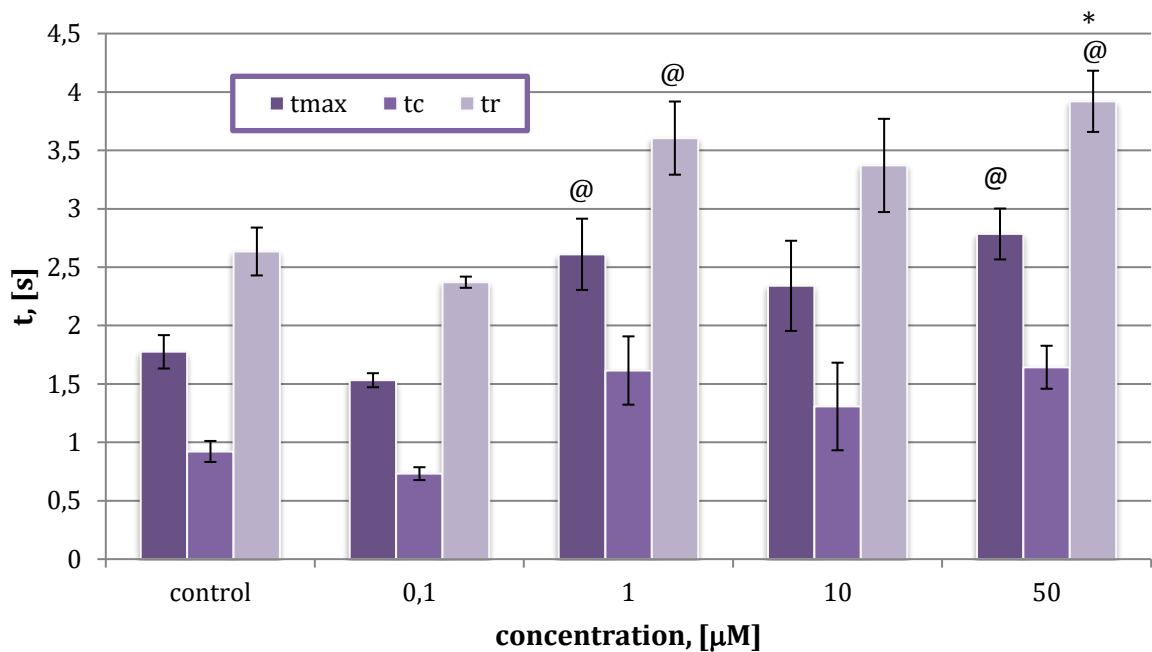


Рис. 3.3(б) Механокінетичні часові параметри (τ_0 , τ_C і τ_R) спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів *caecum* щурів у контролі та за кумулятивного внесення в омиваючий розчин сполуки 248008 у концентраціях 0.1-50 мкМ ($n = 5$, $M \pm m$).

* - $p < 0.05$ та ** - $p < 0.01$ – щодо контролю; статистично достовірно щодо різних концентрацій сполуки 248008: @ - $p < 0.05$ та @@@ - $p < 0.001$ – щодо 0.1 мкМ; ### - $p < 0.001$ – щодо 1 мкМ; \$\$\$ - $p < 0.001$ – щодо 10 мкМ; && - $p < 0.01$ та &&& - $p < 0.001$ – щодо 50 мкМ.

Було встановлено, що сполука 248008 у всіх застосованих концентраціях (0,1–50 мкМ) викликала значне дозозалежне збільшення силових параметрів, зокрема максимальна швидкість у фазі розслаблення (F_R) та, при вищих концентраціях (1–50 мкМ), аналогічний параметр у фазі скорочення (F_C) (Рис. 3.3(a)). Часові параметри спонтанних скорочень залишалися практично незмінними під впливом сполуки 248008 (Рис. 3.3(б)).

Нормування F_C і F_R на амплітудні значення (F_{max}) повністю усувало ефекти сполуки 248008, що вказує на загальну активацію процесів підвищення концентрації іонів Ca^{2+} у міоплазмі клітин гладеньких м'язів без специфічного впливу на процеси активної екструзії цих катіонів.

Крім того, за вищих концентрацій сполуки 248008 (1-50 мкМ) спостерігалось зростання абсолютних значень параметрів максимальних швидкостей фаз скорочення (V_C) і розслаблення (V_R) (Рис. 3.4(а)). Дозозалежність швидкісних параметрів була слабо виражена, а активаційні ефекти при концентраціях 10 і 50 мкМ 248008 не відрізнялися. Однак співвідношення V_C/V_R у всіх випадках впливу сполуки 248008 не відрізнялося від контрольного, що свідчить про відсутність впливу цієї речовини на процеси енергозалежного транспорту іонів Ca^{2+} .

Імпульсні параметри (I_{max} , I_C та I_R) змінювалися значною мірою та дозозалежно при концентраціях сполуки 248008 від 1 до 50 мкМ, досягаючи десятикратного збільшення при найвищій концентрації (Рис. 3.4(б)). Це зростання імпульсу сили не можна пояснити лише збільшенням сили скорочення, оскільки навіть після нормування імпульсних параметрів на значення F_{max} , вони залишалися суттєво вищими, в середньому в півтора рази.

Таким чином, результати досліджень показують, що сполука 248008 значною мірою дозозалежно активує функціональну активність гладеньких м'язів товстого кишечника, збільшуючи силу спонтанних скорочень, ймовірно, за рахунок підвищення концентрації іонів Ca^{2+} в цитоплазмі міоцитів під час збудження. Значне збільшення частоти спонтанних скорочень (у понад сім разів при концентрації 50 мкМ) на тлі сполуки 248008 вказує на активацію пейсмейкерної активності інтерстиціальних клітин Кахаля (ІКК).

Проте, навіть при високих концентраціях 248008 не було зафіксовано фазних скорочень, подібних до тих, що викликає ацетилхолін (Рис. 3.1). Це свідчить, що 248008 не є неселективним повним агоністом ацетилхолінових рецепторів, а, можливо, є частковим агоністом або агоністом M_2 -підтипу мускаринових ацетилхолінових рецепторів (mAChRs). На користь селективної дії сполуки 248008 свідчать результати досліджень функціональної активності гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту мишей з нокаутом M_3 - і M_2 -ацетилхолінових рецепторів: при наявності лише M_2 -підтипу mAChRs аплікація ацетилхоліну викликала значне посилення спонтанної

скорочувальної активності кишечника при слабо виражених фазних скороченнях.

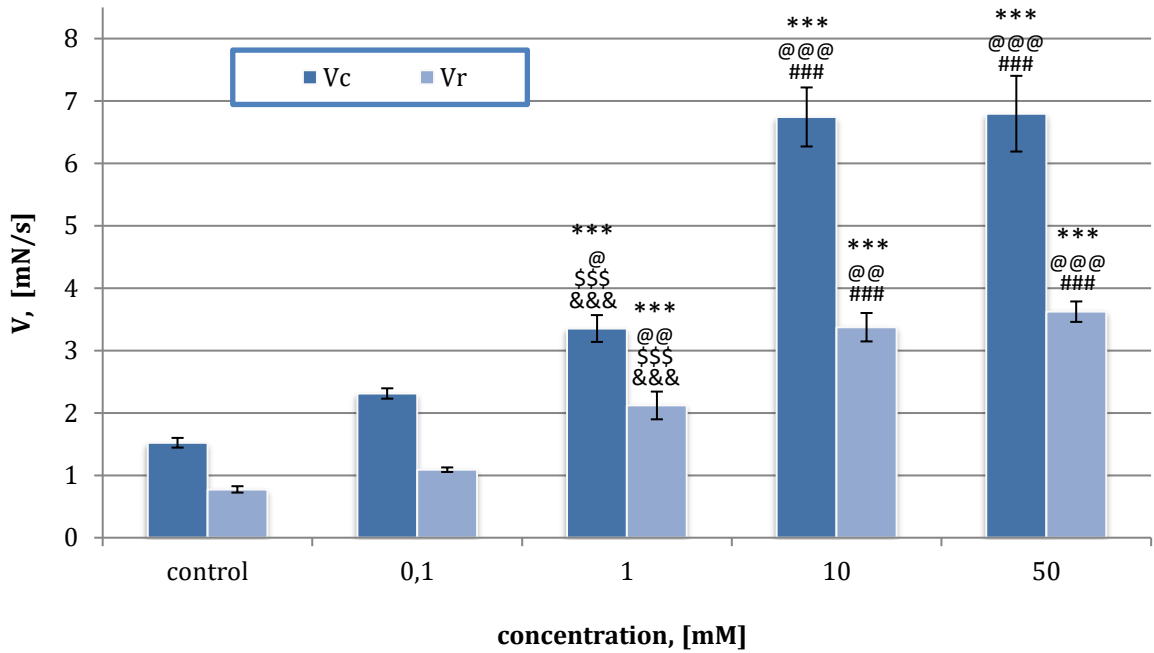


Рис. 3.4(а) Механокінетичні швидкісні параметри (V_C і V_R) спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів саесит щурів в контрольних умовах та при додаванні в омиваючий розчин сполуки 248008 у концентраціях від 0.1 до 50 мкМ ($n = 5$, $M \pm m$)

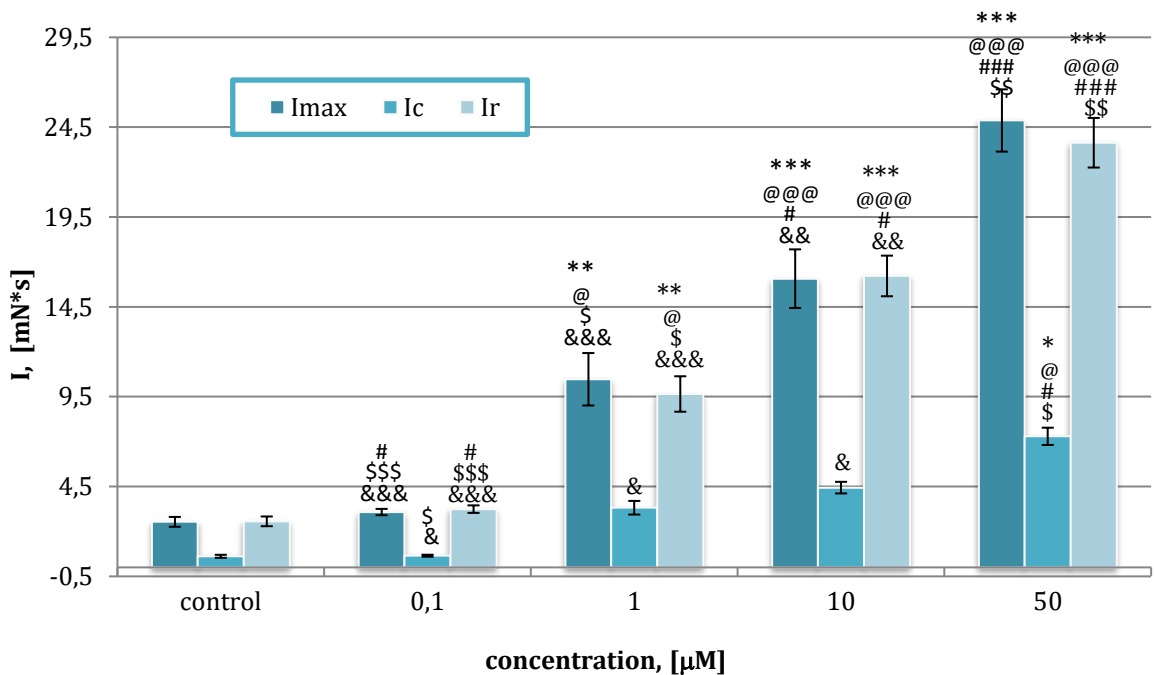


Рис. 3.4(б) Механокінетичні імпульсні параметри (I_{max} , I_C та I_R) спонтанних

скорочень кільцевих гладеньких м'язів *саесит* щурів у контролі та за кумулятивного внесення в омиваючий розчин сполуки 248008 у концентраціях 0.1-50 мкМ ($n = 5$, $M \pm m$)

* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ та *** - $p < 0.001$ – щодо контролю; статистично достовірно щодо різних концентрацій сполуки 248008: @ - $p < 0.05$, @@ - $p < 0.01$, @@@ - $p < 0.001$ – щодо 0.1 мкМ; # - $p < 0.05$, ## - $p < 0.01$, ### - $p < 0.001$ – щодо 1 мкМ; \$ - $p < 0.05$, \$\$ - $p < 0.01$, \$\$\$ - $p < 0.001$ – щодо 10 мкМ; & - $p < 0.05$, && - $p < 0.01$ та &&& - $p < 0.001$ – щодо 50 мкМ.

3.3. Вивчення часо-залежних ефектів впливу сполуки 248008 на функціонування саесит щурів та ефективності її відмивання.

Для розробки ліків критично важливо, щоб їх активні речовини забезпечували стабільні ефекти, не втрачаючи ефективності з часом і не викликаючи протилежних реакцій при тривалій експозиції на тканини-мішені. Наступний етап нашого дослідження був присвячений вивченню впливу аплікації сполуки 248008 у концентрації 0.1 мкМ протягом однієї години на механокінетичні параметри спонтанної скорочувальної активності гладеньких м'язів саесит щурів

Згідно з даними, представленими на Рис. 3.5, тривала дія сполуки 248008 значно посилює спонтанну скорочувальну активність, яка має тенденцію до стабілізації після 40 хвилин впливу. Через 30 хвилин після початку аплікації 248008 спостерігалось значне збільшення амплітуди спонтанних скорочень (F_{max}), як у порівнянні з контролем ($p < 0.001$), так і з ефектами через 10 хвилин впливу цієї сполуки ($p < 0.05$). Після години застосування сполуки амплітуда продовжувала зростати і в середньому досягала 242.3 ± 11.8 % ($p < 0.001$ у порівнянні з контролем і 10 хвилинами впливу, а також $p < 0.01$ у порівнянні з 30 хвилинами дії, $n = 5$) (Рис. 3.6(a)).

Також варто зазначити, що з збільшенням тривалості інкубації з сполукою 248008, частота спонтанних скорочень зростала прямо пропорційно,

що вказує на можливість стимуляції пейспекерної активності ІКК в цих умовах.

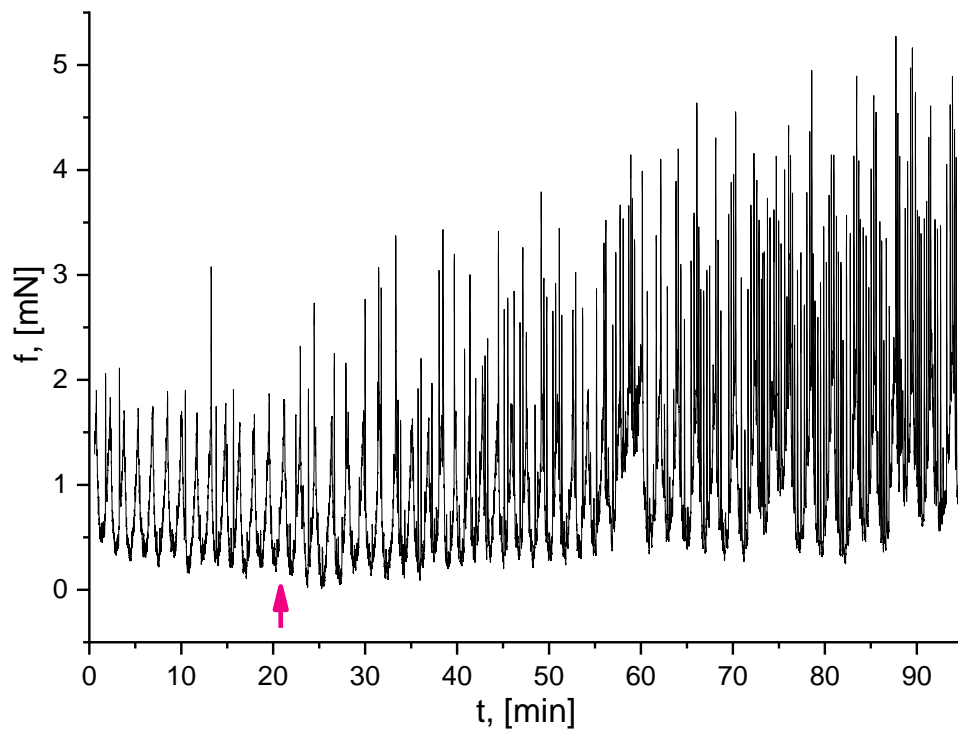


Рис. 3.5 Спонтанна скорочувальна активність кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки щурів у контрольних умовах та після додавання до омиваючого розчину сполуки 248008 у концентрації 0,1 мкМ. Представлено характерну механограму.

Для визначення кількісних закономірностей активації спонтанних скорочень гладеньких м'язів сліпої кишки при різній тривалості впливу сполуки 248008, їх було проаналізовано за допомогою методу багатопараметричного аналізу. Було встановлено, що за цих умов відбувалося значне часозалежне зростання силових параметрів (F_{max} , F_C та F_R) (Рис. 3.6(а)). Проте, при різній тривалості аплікації 248008, як і у випадку застосування різних концентрацій цієї сполуки (Рис. 3.3(б)), часові параметри спонтанних скорочень не зазнавали достовірних змін (Рис. 3.6(б)).

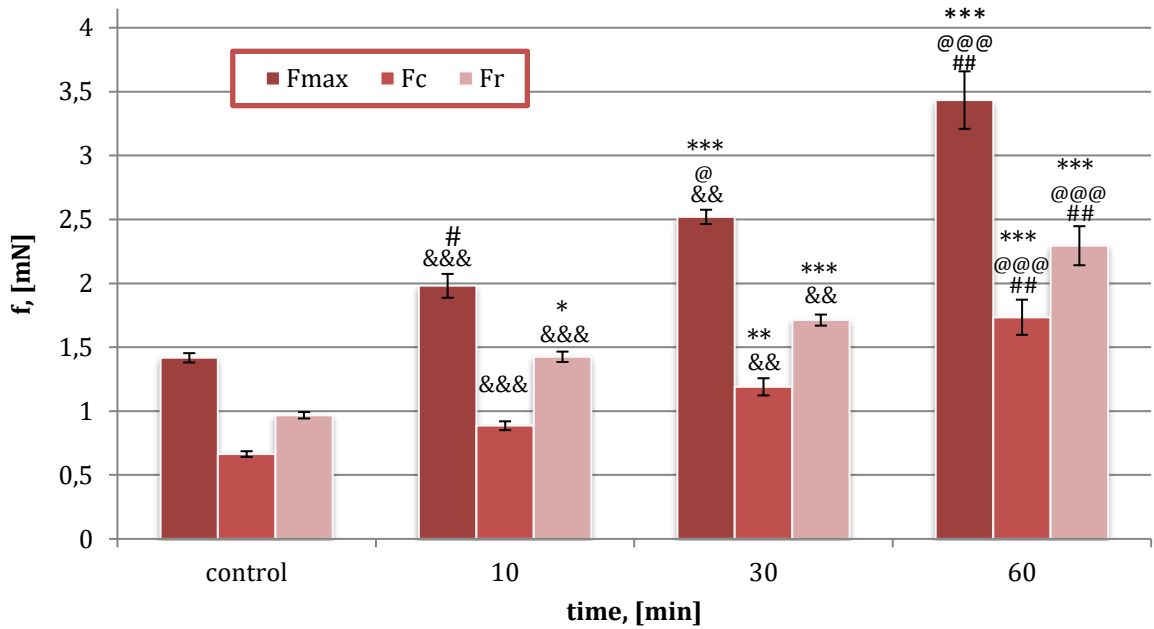


Рис. 3.6(а) Механокінетичні силові параметри (F_{max} , F_C та F_R) спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів *saecum* щурів у контролі та за дії сполуки 248008 (0.1мкМ) упродовж 10, 30 та 60 хв ($n = 5$, $M \pm m$)

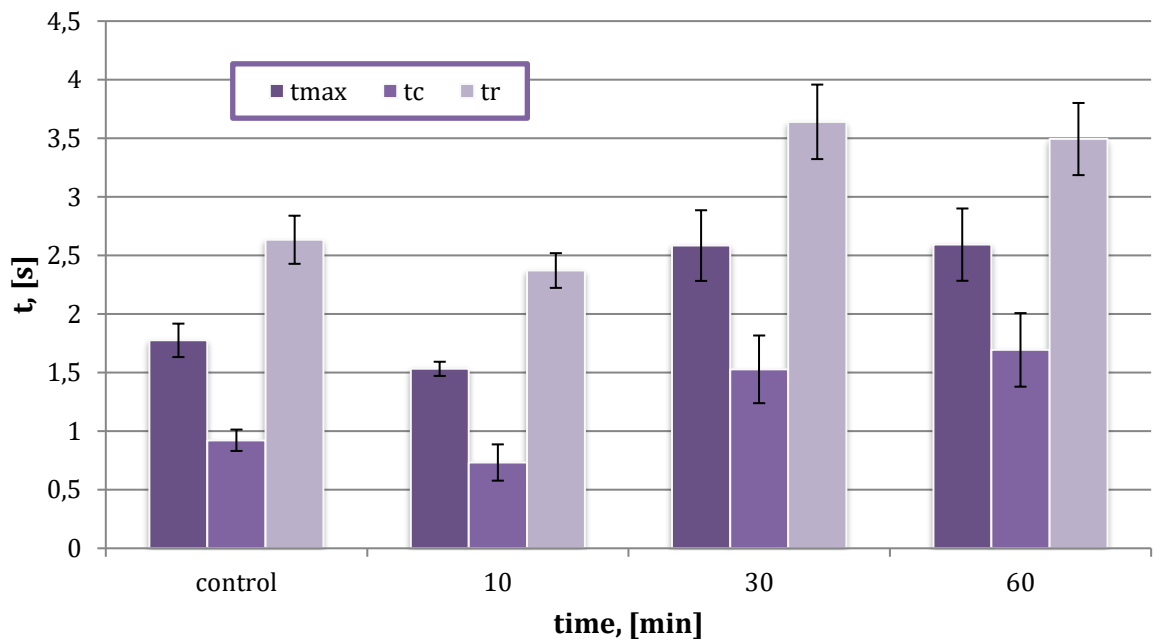


Рис. 3.6(б) Механокінетичні часові параметри (t_0 , t_C і t_R) спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів *saecum* щурів у контролі та за дії сполуки 248008 (0.1мкМ) упродовж 10, 30 та 60 хв ($n = 5$, $M \pm m$)

* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ та *** - $p < 0.001$ – щодо контролю; статистично достовірно щодо різної тривалості дії сполуки 248008: @ - $p < 0.05$ та @@@ - $p < 0.001$ – щодо дії впродовж 10 хв; # - $p < 0.05$, ## - $p < 0.01$ та ### - $p < 0.001$ – щодо дії впродовж 30 хв; & - $p < 0.05$, && - $p < 0.01$ та &&& - $p < 0.001$ – щодо дії впродовж 60 хв.

При різній тривалості впливу сполуки 248008 суттєве часозалежне збільшення обох швидкісних параметрів спонтанної скорочувальної активності гладеньких м'язів сліпої кишки спостерігалось лише при тривалому застосуванні (Рис. 3.7(a)). Зокрема, максимальна швидкість фази скорочення значно відрізнялася лише від групи контролю, тоді як швидкість фази розслаблення була значно вищою також при порівнянні тривалості аплікації сполуки протягом 10 та 30 хвилин. Щодо імпульсних параметрів (I_{max} , I_C та I_R), то їх значне часозалежне збільшення спостерігалось при впливі сполуки 248008 на препарати гладеньких м'язів протягом 30 та 60 хвилин (Рис. 3.7(б)). Отже, важливо зазначити, що за тривалого застосування в умовах *in vitro* сполука 248008 зберігає свою ефективність.

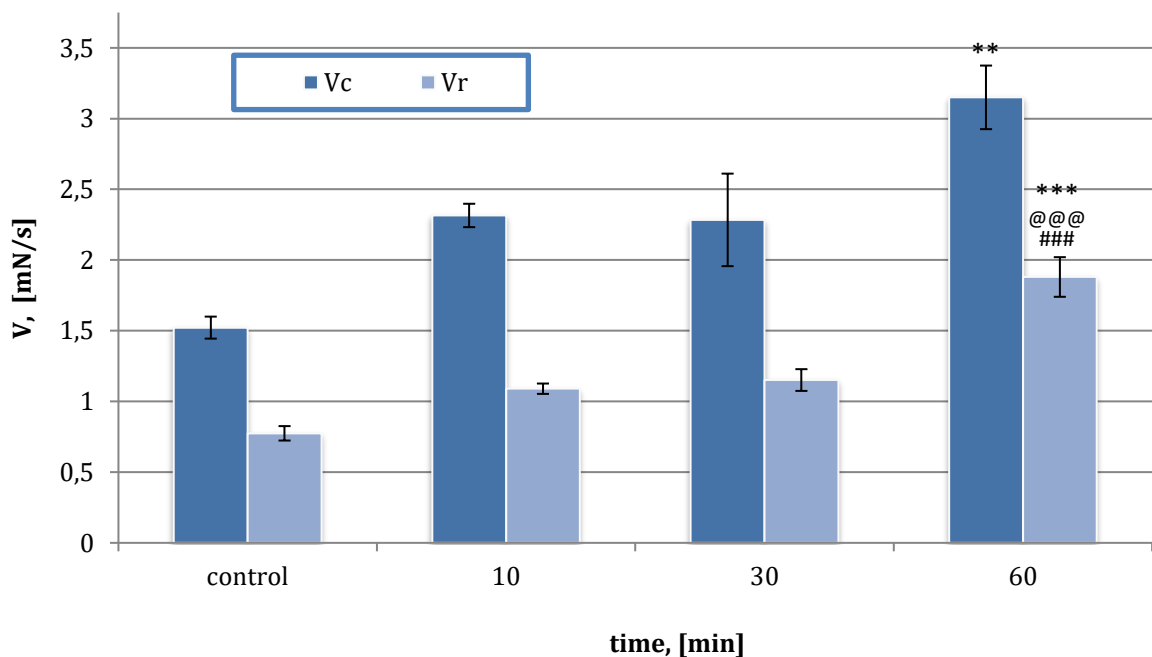


Рис. 3.7(a) Механокінетичні швидкісні параметри (V_C і V_R) спонтанних

скорочень кільцевих гладеньких м'язів *saesum* щурів у контролі та за дії сполуки 248008 (0.1мкМ) упродовж 10, 30 та 60 хв ($n = 5, M \pm m$)

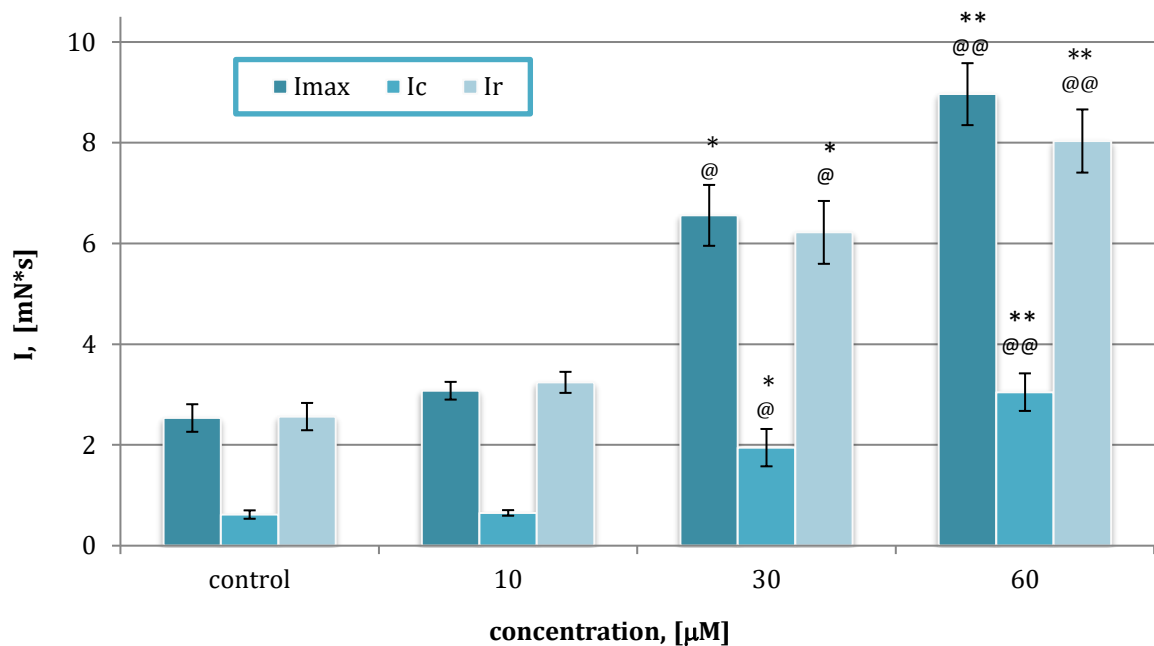


Рис. 3.7(б) Механокінетичні імпульсні параметри (V_C і V_R) спонтанних скорочень кільцевих гладеньких м'язів *saesum* щурів у контролі та за дії сполуки 248008 (0.1мкМ) упродовж 10, 30 та 60 хв ($n = 5, M \pm m$)

* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ та *** - $p < 0.001$ – щодо контролю; статистично достовірно щодо різних концентрацій сполуки 248008: @ - $p < 0.05$, @@ - $p < 0.01$, @@@ - $p < 0.001$ – щодо 0.1 мкМ; # - $p < 0.05$, ## - $p < 0.01$, ### - $p < 0.001$ – щодо 1 мкМ; \$ - $p < 0.05$, \$\$ - $p < 0.01$, \$\$\$ - $p < 0.001$ – щодо 10 мкМ; & - $p < 0.05$, && - $p < 0.01$ та &&& - $p < 0.001$ – щодо 50 мкМ.

Також важливою властивістю речовин, які можуть бути використані для розробки лікарських препаратів, є оборотність їхньої дії. Тому ми перевірили здатність сполуки 248008 до відмивання шляхом заміни омиваючого розчину Кребса, який містив 50 мкМ цієї речовини, на звичайний розчин Кребса. Як видно на Рис. 3.8(а), заміна розчину супроводжувалася зниженням амплітуди спонтанних скорочень, однак їх частота залишалася незмінною.

Далі, за допомогою механокінетичного аналізу, було проаналізовано фрагмент механограми через 20 хвилин після початку відмивання препаратів. Встановлено, що при відмиванні всі групи параметрів достовірно змінюються (Рис. 3.8(б)). Хоча за цей час лише часові параметри (τ_0 , τ_C і τ_R) та імпульс сили на фазі скорочення (IC) досягають контрольного рівня, отримані дані вказують на оборотність дії сполуки 248008.

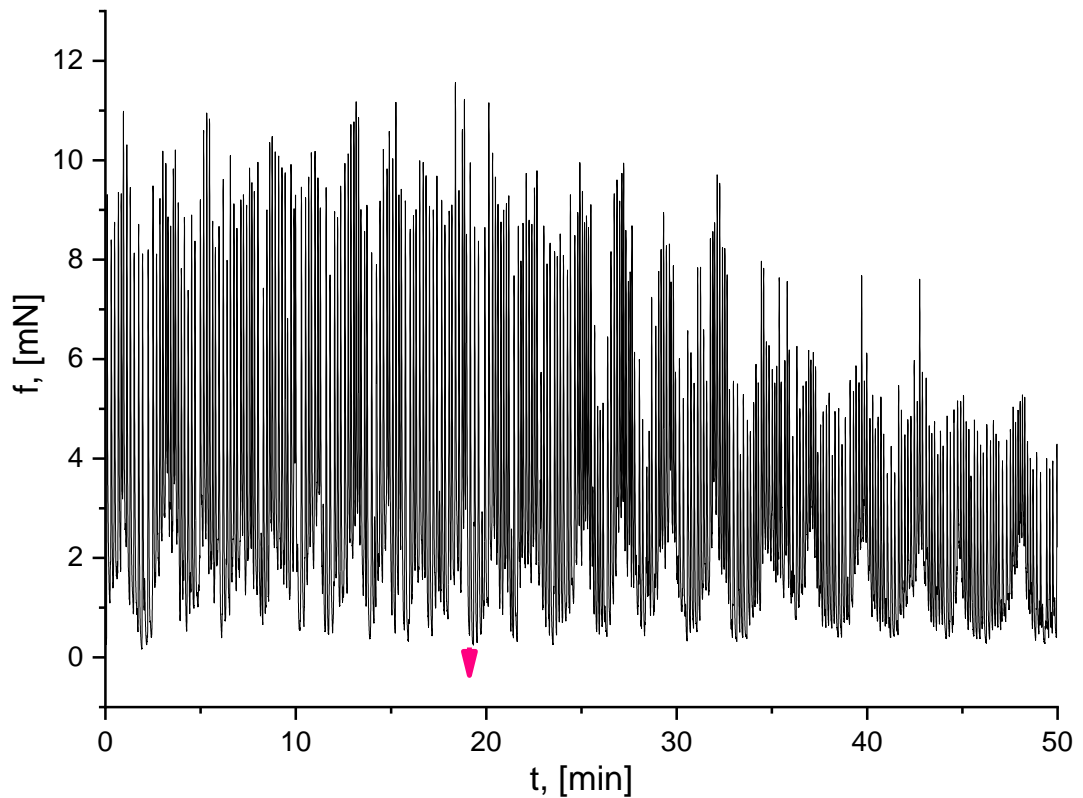


Рис. 3.8(а) Типова механограма спонтанної скорочувальної активності кільцевих гладеньких м'язів *saesum* щурів на тлі сполуки 248008 (50 мкМ) та за її відмивання нормальним розчином Кребса (момент початку відмивання показано стрілкою)

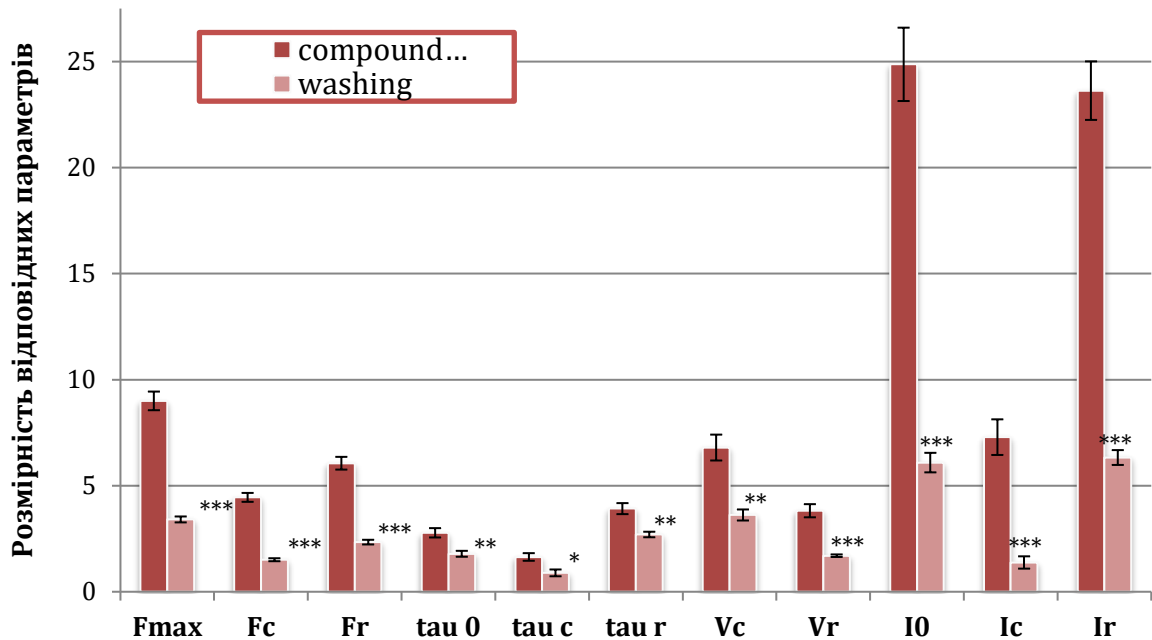


Рис. 3.8(б) Механокінетичні параметри окремих спонтанних скорочень на тлі сполуки 248008 (50 мкМ) та за її відмивання ($n = 5$, $M \pm m$): силові параметри (F_{max} , F_C та F_R ; їх розмірність [mN]); часові параметри (τ_0 , τ_c і τ_r ; їх розмірність [s]); швидкісні параметри (V_C і V_R ; їх розмірність [mN/s]); імпульсні параметри (I_{max} , I_C та I_R ; їх розмірність [mN*s]).
 * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ та *** - $p < 0.001$ – щодо дії сполуки 248008 (50 мкМ).

У тканині гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту (ШКТ) мускаринові ацетилхолінові рецептори (mAChRs) експресуються в робочих міоцитах та інтерстиціальних клітинах Кахаля (ІКК), відіграючи ключову роль у сприйнятті головного збуджувального нейромедіатора ацетилхоліну. Незважаючи на те, що рецептори M_2 -підтипу домінують у обох типах клітин, їх пряма реакція на активацію ацетилхоліном є слабкою. Функціональна роль цих рецепторів *in vivo* полягає в сприянні деполаризації плазматичної мембрани клітин шляхом активації вхідного катіонного струму через канали TRPC4 та потенціалкервані Ca^{2+} -канали L-типу, а також у пригніченні аденілатциклазної активності та зниженні концентрації цАМФ, що протидіє ефектам інгібіторних нейромедіаторів, таких як норадреналін. Таким чином,

вибіркова активація M_2 -підтипу mAChRs селективними агоністами може бути корисною для нормалізації багатьох патологій, які супроводжуються порушеннями моторики вісцеральних гладеньких м'язів.

Сполука 248008, для якої методами *in silico* передбачено здатність до активації mAChRs, в умовах *in vitro* проявила здатність активувати ацетилхолін-індуковані скорочення, а також дозозалежно підсилювати спонтанну моторику гладеньких м'язів товстого кишечника, підвищуючи їх амплітуду і частоту. Це, ймовірно, відбувається через дію на рецептори M_2 -підтипу. Оскільки ефекти цієї сполуки залишаються стабільними при тривалому застосуванні та є оборотними після відмивання м'язів, ми маємо всі підстави вважати, що сполука 248008 є перспективною для подальшого використання у розробці лікарських препаратів.

Висновки

У роботі із застосуванням методів тензорометрії в ізометричному режимі реєстрації і механокінетичного аналізу спонтанних і викликаних скорочень було досліджено холіноміметичні властивості сполуки 248008 (0,1-50 мкМ).

1. У роботі досліджено дію сполуки 248008 (0.1-50 мкМ), для якої методами *in silico* було передбачено здатність до активації mAChRs, на ацетилхолін-викликані та спонтанні скорочення кільцевих гладеньких м'язів сліпої кишки (*caecum*) щурів, а також досліджено вплив цієї сполуки на механокінетичні параметри процесів скорочення-розслаблення.
2. Встановлено, що сполука 248008 (1 мкМ) за короткочасної (упродовж 5 хв) аплікації до ГМ спричиняє суттєве посилення ацетилхолін-викликаних скорочень.
3. Виявлено, що сполука 248008 дозо-залежно (0.1-50 мкМ) і часо-залежно посилює спонтанну моторику *caecum*, спричиняючи достовірне збільшення силових, швидкісних та імпульсних параметрів.
4. Показано, що сполука 248008 дозо-залежно (0.1-50 мкМ) підвищує частоту спонтанних скорочень, що вказує на активацію пейсмейкерної активності ІКК.
5. Встановлено, що селективний блокатор мускаринових холінорецепторів M₂-підтипу AF-DX 116 усуває ефекти сполуки 248008, що свідчить про її властивості як властивості M₂-холіноміметика.

Список використаних джерел:

1. Leblanc, N. (2023, February 3). *B-adrenergic receptor antagonism of cholinergic stimulation of airway smooth muscle contraction: An old receptor requires a fresh look*. *Function* (Oxford, England).
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9972342/>)
2. Piovesana, R., Pisano, A., Loreti, S., Ricordy, R., Talora, C., & Tata, A. M. (2022, February 1). *Notch signal mediates the cross-interaction between M2 muscarinic acetylcholine receptor and neuregulin/erbb pathway: Effects on schwann cell proliferation*. *Biomolecules*.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8961597/>)
3. Halder, N., & Lal, G. (2021, April 15). *Cholinergic system and its therapeutic importance in inflammation and autoimmunity*. *Frontiers in immunology*.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8082108/>)
4. Tanahashi, Y., Komori, S., Matsuyama, H., Kitazawa, T., & Unno, T. (2021, January 18). *Functions of muscarinic receptor subtypes in gastrointestinal smooth muscle: A review of studies with receptor-knockout mice*. *International journal of molecular sciences*.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7831928/>)
5. KN;, B. (n.d.). *Function of gastrointestinal smooth muscle: From signaling to contractile proteins*. *The American journal of medicine*.
(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12928070/#:~:text=Abstract,bolus%20along%20the%20gastrointestinal%20tract>)
6. Azzouz, L. L. (2023, July 31). *Physiology, large intestine*. *StatPearls*.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507857/#:~:text=The%20large%20intestine%20has%203,toward%20the%20rectum%20for%20elimination>)
7. Pera, T., & Penn, R. B. (2014, June). *Crosstalk between beta-2-adrenoceptor and muscarinic acetylcholine receptors in the airway*. *Current*

- opinion in pharmacology.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4096844/>)
8. Alkawadri, T., Wong, P. Y., Fong, Z., Lundy, F. T., McGarvey, L. P., Hollywood, M. A., Thornbury, K. D., & Sergeant, G. P. (2022, September 26). *M2 muscarinic receptor-dependent contractions of airway smooth muscle are inhibited by activation of β -adrenoceptors*. *Function* (Oxford, England).
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9617473/>)
 9. Leblanc, N. (2023a, February 3). *B-adrenergic receptor antagonism of cholinergic stimulation of airway smooth muscle contraction: An old receptor requires a fresh look*. *Function* (Oxford, England).
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9972342/>)
 10. Piovesana, R., Pisano, A., Loreti, S., Ricordy, R., Talora, C., & Tata, A. M. (2022a, February 1). *Notch signal mediates the cross-interaction between M2 muscarinic acetylcholine receptor and neuregulin/erbb pathway: Effects on schwann cell proliferation*. *Biomolecules*.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8961597/>)
 11. Haga, T. (2013). *Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors*. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3749793/>)
 12. Kudlak, M. (2023, August 8). *Physiology, Muscarinic receptor*. *StatPearls*.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555909/>)
 13. Tanahashi, Y., Komori, S., Matsuyama, H., Kitazawa, T., & Unno, T. (2021b, January 18). *Functions of muscarinic receptor subtypes in gastrointestinal smooth muscle: A review of studies with receptor-knockout mice*. *MDPI*.
(<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/2/926>)

14. Wrzos, H. F., Tandon, T., & Ouyang, A. (2004, November 15). *Mechanisms mediating cholinergic antral circular smooth muscle contraction in rats*. *World Journal of Gastroenterology*.
(<https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v10/i22/3292.htm>)
15. Shih, C., & Lin, M. (1980). Effects of cholinomimetic drugs on sudomotor, metabolic, respiratory, vasomotor, and temperature response in palmar hyperhidrosis. *Journal of Neurosurgery*, *53*(5), 684–689.
(<https://doi.org/10.3171/jns.1980.53.5.0684>)
16. Vardanyan, R., & Hraby, V. (2006). Cholinomimetics. In *Elsevier eBooks* (pp. 179–193). (<https://doi.org/10.1016/b978-044452166-8/50013-3>)
17. Sales, M. E. (2013). Cholinergic drugs as therapeutic tools in inflammatory diseases: Participation of neuronal and Non-Neuronal cholinergic systems. *Anti-inflammatory and Anti-allergy Agents in Medicinal Chemistry*, *12*(2), 109–116. (<https://doi.org/10.2174/1871523011312020002>)
18. Kim, J. E., Park, J. J., Lee, M. R., Choi, J. Y., Song, B. R., Park, J. W., Kang, M. J., Son, H. J., Hong, J. T., & Hwang, D. Y. (2019). Constipation in Tg2576 mice model for Alzheimer's disease associated with dysregulation of mechanism involving the mAChR signaling pathway and ER stress response. *PloS One*, *14*(4), e0215205.
(<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215205>)
19. Iino, S., & Nojyo, Y. (2006). Muscarinic M2 acetylcholine receptor distribution in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Neuroscience*, *138*(2), 549–559. (<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.021>)
20. Unno, T., Matsuyama, H., Sakamoto, T., Uchiyama, M., Izumi, Y., Okamoto, H., Yamada, M., Wess, J., & Komori, S. (2005). M2 and M3 muscarinic receptor-mediated contractions in longitudinal smooth muscle of the ileum studied with receptor knockout mice. *British Journal of Pharmacology*, *146*(1), 98–108. (<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706300>)
21. Elorriaga, M., Anselmi, E., Hernandez, J. M., D'Ocon, P., & Ivorra, D. (1996). The sources of CA²⁺ for muscarinic receptor-induced contraction in

- the rat ileum. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48(8), 817–819.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1996.tb03980.x>
22. Fisher, S. A. (2010). Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiological Genomics/Physiological Genomics (Print)*, 42A(3), 169–187. (<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00111.2010>)
23. Enyedi, A., Brandt, J., Minami, J., & Penniston, J. T. (1989). Oxytocin regulates the plasma membrane Ca²⁺ transport in rat myometrium. *Biochemical Journal*, 261(1), 23–28. (<https://doi.org/10.1042/bj2610023>)
24. Chioss, G., Costantine, M., Bytautiene, E., Betancourt, A., Hankins, G., Saade, G., & Longo, M. (2012). In vitro Myometrial Contractility Profiles of Different Pharmacological Agents Used for Induction of Labor. *American Journal of Perinatology*, 29(09), 699–704. (<https://doi.org/10.1055/s-0032-1314891>)
25. Camilleri, M., & Linden, D. R. (2016b). Measurement of gastrointestinal and colonic motor functions in humans and animals. *CMGH*, 2(4), 412–428. (<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.04.003>)
26. Boberg, L., Szekeres, F. L. M., & Arner, A. (2018). Signaling and metabolic properties of fast and slow smooth muscle types from mice. *Pflügers Archiv Für Die Gesamte Physiologie Des Menschen Und Der Tiere/Pflügers Archiv*, 470(4), 681–691. (<https://doi.org/10.1007/s00424-017-2096-6>)
27. Apell, H., Hitzler, T., & Schreiber, G. (2017). Modulation of the Na,K-ATPase by magnesium ions. *Biochemistry*, 56(7), 1005–1016. (<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01243>)
28. Gregersen, H., & Lo, K. M. (2018). Pathophysiology and treatment of achalasia in a muscle mechanical perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1434(1), 173–184. (<https://doi.org/10.1111/nyas.13711>)
29. Sweeney, H. L., & Hammers, D. W. (2018). Muscle contraction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(2), a023200. (<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023200>)