



Стаття та будь-який пов'язаний з нею опублікований матеріал поширюється за ліцензією Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).
The article and any related published material are licensed under the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

УДК 577.352.5:615.015.3

DOI: <https://doi.org/10.17721/1728.2748.2026.104.25-31>

Роман СТРАТІЙЧУК, асп.

ORCID ID: 0009-0001-6632-7642

e-mail: romanstratiichuk1@gmail.com

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Дарія ДРИНЬ, канд. біол. наук, наук. співроб.

ORCID ID: 0000-0002-0708-5372

e-mail: daria.dryn@biph.kiev.ua

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

Олександр ЖОЛОС, д-р біол. наук, проф.

ORCID ID: 0000-0002-4320-149X

e-mail: avzholos@knu.ua

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

БЛОКУВАННЯ TRPC4-КАНАЛІВ ІНГІБІТОРОМ PICO145: ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ТА МОЛЕКУЛЯРНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

Вступ. Канонічні канали транз'єнтного рецепторного потенціалу 4 (TRPC4) гладеньких м'язів кишечника активуються шляхом взаємодії M2/M3-мускаринових рецепторів та активованими ними G-білками і є важливою ланкою кальцієвого сигналіну у процесі холінергічного контролю скоротливої активності кишечника. Їх блокування високо-ефективними інгібіторами, такими як Pico145, має значення для розроблення нових фармакологічних підходів. Метою роботи було дослідити вплив Pico145 на індукований мускариновими рецепторами катіонний струм (ml_{CAT}) у гладеньких м'язах клубової кишки миші та з'ясувати молекулярний механізм зв'язування Pico145 із каналом TRPC4.

Методи. Електрофізіологічні дослідження проведено методом patch-clamp у ізольованих гладеньком'язових клітинах клубової кишки миші. Молекулярне моделювання проводили докінгом молекули Pico145 у кріо-ЕМ структуру TRPC4 миші (PDB: 5Z96) після валідації на референтному комплексі TRPC1/TRPC4: Pico145 людини (PDB: 8WPM). Оцінювали енергію зв'язування та просторову відповідність пози ліганду до експериментально визначеної пози Pico145 у гетеротетрамерному каналі TRPC1/TRPC4.

Результати. Показано, що Pico145 суттєво пригнічує амплітуду струму ml_{CAT} у гладеньком'язових клітинах кишечника. При концентрації 100 нМ інгібітор зменшував струм більше ніж на 80 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем, що узгоджується з даними про внесок TRPC4 у генез ml_{CAT} . Молекулярний докінг підтвердив, що Pico145 зв'язується у консервативній міжсубодиничній гідрофобній кишені трансмембранного домену TRPC4, яка відповідає сайту зв'язування, раніше виявленому для TRPC5. Установлено, що змодельована конформація Pico145 майже повністю відтворює експериментально визначену позу ліганду в каналі TRPC4. Незначні відмінності у складі амінокислот кишені (Thr599 у мишачому TRPC4 проти Val624 у людському TRPC4) не впливають на характер зв'язування, що підтверджує консервативність механізму інгібування.

Висновки. Pico145 ефективно блокує рецептор-керовані TRPC4-канали гладеньких м'язів, значно зменшуючи струм ml_{CAT} . Молекулярне моделювання виявило, що Pico145 зв'язується з консервативним сайтом усередині мембранного каналу TRPC4, який збігається із сайтом зв'язування у структурно споріднених каналах підродино TRPC1/4/5. Отримані результати підтверджують універсальність механізму інгібування TRPC4 Pico145 і можуть бути використані для раціонального дизайну нових селективних блокаторів TRPC-каналів.

Ключові слова: TRPC4, Pico145, ml_{CAT} , молекулярний докінг, гладенькі м'язи.

Вступ

TRPC-канали є важливою підродиною неселективних катіонних каналів, які опосередковують рецептор-керований вхід іонів Na^+ та Ca^{2+} і відіграють ключову роль у клітинній сигналізації, регуляції мембранного потенціалу та внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу. Вони широко експресуються у нервовій, серцево-судинній і гладеньком'язовій тканинах і беруть участь у численних фізіологічних процесах, зокрема у механізмах збудження-скорочення, нейрональному передаванні сигналу, регуляції судинного тону та підтриманні кальцієвого гомеостазу в клітинах різних органів. Сучасні оглядові дослідження підкреслюють універсальність TRP-каналів як клітинних сенсорів і ефektorів, залучених до широкого спектра фізіологічних і патофізіологічних процесів, а також їхній потенціал як фармакологічних мішеней (Guo et al., 2025; Chubanov et al., 2025; Von et al., 2022). Зокрема, показано участь TRPC-каналів у регуляції кальцієвого гомеостазу в епітеліальних клітинах ниркових каналців, що підкреслює їхню роль поза межами класичних

збудливих тканин (Englisch et al., 2023), а також їхню залученість до механізмів хронічного болю та значення як потенційних терапевтичних мішеней при больових розладах (Ke et al., 2024).

Підродина TRPC включає сім ізоформ (TRPC1–7), серед яких TRPC1, TRPC4 і TRPC5 утворюють тісно споріднену функціональну групу, що характеризується високим ступенем подібності амінокислотних послідовностей і здатністю формувати гетеротетрамерні комплекси. Саме ця група каналів відіграє провідну роль у рецептор-керованих катіонних струмах у гладких м'язах, зокрема у шлунково-кишковому тракті, де TRPC4 є ключовим компонентом ml_{CAT} , що лежить в основі спряження холінергічного збудження і скорочення (Zholos, 2006; Tanahashi et al., 2021; Kang et al., 2024).

Попри фундаментальне фізіологічне значення TRPC-каналів, їхня фармакологічна модуляція протягом тривалого часу залишалася складною задачею. Перші широко вживані інструментальні блокатори TRPC-активності, зокрема SKF-96365 і 2-APB, дали змогу функціо-

© Стратійчук Роман, Дринь Дарія, Жолос Олександр, 2026

нально модулювати TRPC-канали, однак характеризувалися низькою селективністю і значними побічними ефектами (Alexander et al., 2023; Liu, 2024). Подальший розвиток галузі був пов'язаний із відкриттям більш специфічних модуляторів, включаючи Englerin A, ML204, HC-070 та низку ксантинових похідних, що дало можливість системно досліджувати фізіологічні й патологічні ролі підгрупи TRPC1/4/5 (Liu, 2024; Grimm et al., 2024). Особливу увагу серед цих сполук привернув Pico145 – надпотужний і високоселективний інгібітор TRPC1/4/5-каналів з активністю у пікомолярному діапазоні, який у сучасних дослідженнях розглядається як еталонний хімічний інструмент для функціонального та структурного аналізу цієї підгрупи каналів (Bon et al., 2022; Liu, 2024; Wright et al., 2020). Його виняткова ефективність дала можливість вперше з високою точністю зв'язати активність TRPC-каналів із конкретними фізіологічними ефектами у клітинах, тканинах і тваринних моделях.

Вирішальним кроком у розумінні механізму дії Pico145 стало отримання крио-ЕМ-структури людського TRPC5 у комплексі з Pico145, що вперше дало змогу експериментально ідентифікувати міжсубодиничний гідрофобний сайт зв'язування ліганду в трансмембранному домені каналу (Wright et al., 2020). Подальші структурні дослідження гетеротетрамерних комплексів TRPC1/TRPC4 підтвердили існування того самого сайту зв'язування у фізіологічно релевантному субодиничному контексті й підтримали гіпотезу про консервативність сайту зв'язування Pico145 у межах підгрупи TRPC1/4/5 (Won et al., 2025). Водночас, попри наявність високоякісних структурних референсів, залишається недостатньо з'ясованим, у який спосіб ці структурні механізми реалізуються у мишачому TRPC4 та як вони корелюють із функціональними проявами інгібування у нативних гладеньких м'язових клітинах. Зокрема, докінг Pico145 у мишачу структуру TRPC4 (PDB: 5Z96) раніше розглядався лише побіжно й без детального аналізу просторової відповідності, енергетичних характеристик і молекулярних детермінант зв'язування.

Метою цієї роботи є поєднання експериментального електрофізіологічного оцінювання блокади TRPC4-опосередкованого струму Pico145 у нативних міоцитах клубової кишки миші з розширеним молекулярним моделюванням взаємодії Pico145 із мишачим TRPC4, що дає можливість надати цілісну структурно-функціональну інтерпретацію механізму інгібування цього каналу.

Методи

Експериментальні дослідження виконували на свіжоотриманих ізольованих клітинах гладеньких м'язів клубової кишки. У роботі використовували білих лабораторних мишей-самців лінії *albino* з масою тіла 25–30 г. Тварини перебували у стандартних умовах віварію Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України. Усі процедури здійснювалися з дотриманням положень Європейської конвенції щодо гуманного поводження із хребетними тваринами, залученими до наукових досліджень.

Виділення ізольованих клітин гладеньких м'язів тонкого кишечника проводили під бінокулярним мікроскопом: тканину тонкого кишечника розсікали на фрагменти шириною приблизно 1 мм. Подальше ферментативне оброблення гладеньком'язових сегментів проводили в розчині Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 120, глюкоза – 12, HEPES – 10, KCl – 6, pH 7,4 (за допомогою NaOH), з додаванням колагенази типу IA (1 мг/мл), інгібітору трипсину (1 мг/мл) і бичачого сироваткового альбуміну (1 мг/мл). Інкубацію здійснювали протягом 17 хв при температурі 36 °C, після чого тканину проми-

вали, ізолювали міоцити шляхом тритурації та наносили аліквоту (0,5 мл) отриманої суспензії клітин на покривні скельця у розчині Кребса.

Реєстрацію іонних струмів через плазматичну мембрану здійснювали за допомогою методу patch-clamp у режимі *whole-cell* із використанням підсилювача AxoPatch 200B і програмного комплексу pClamp 8 (Molecular Devices, США). Для вимірювання трансмембранних струмів клітини перфузували зовнішнім цезієвмісним розчином такого складу (ммоль/л): CsCl – 120, глюкоза – 12, HEPES – 10; значення pH підтримували на рівні 7,4 шляхом титрування CsOH. З метою селективної реєстрації mI_{CAT} внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію стабілізували на рівні приблизно 100 нмоль/л шляхом використання внутрішньопіпеточного розчину такого складу (ммоль/л): CsCl – 80, MgATP – 1, креатин – 5, глюкоза – 5, BAPTA – 10, HEPES – 10, CaCl₂ – 4,6; pH доводили до 7,4 за допомогою CsOH. Активацію mI_{CAT} індукували аплікацією карбахолу в концентрації 50 мкмоль/л, що забезпечувало стимуляцію мускаринових рецепторів підтипів M₂ та M₃. Мембранний потенціал утримували на рівні –40 мВ. Для побудови стаціонарної вольт-амперної характеристики застосовували ramp-протокол із безперервною зміною потенціалу в діапазоні від +80 до –120 мВ тривалістю 6 с, який повторювали з інтервалом 30 с. Аналіз потенціалзалежної активації та деактивації mI_{CAT} проводили з використанням серії ступінчастих змін мембранного потенціалу від –40 до –120 мВ тривалістю 1,2 с. Записані струми фільтрували при частоті зрізу 2 кГц та оцифровували із частотою дискретизації 10 кГц.

Аналіз експериментальних результатів і графічну візуалізацію отриманих даних здійснювали з використанням програмних пакетів pClamp версії 9.2 та Origin версії 8.5 (OriginLab, США).

Сайт зв'язування Pico145 із TRPC4 сконструйований на основі крио-ЕМ-комплексів TRPC5: Pico145 миші з ідентифікатором 6YSN та TRPC1/TRPC: Pico145 людини з ідентифікатором 8WPM. Для проведення молекулярного докінгу було використано крио-ЕМ-структуру TRPC4 миші з ідентифікатором 5Z96, узятую з PDB. Цей файл складається із чотирьох ланцюгів A, B, C, D, де кожен відповідає окремій субодиниці. Перед проведенням молекулярного докінгу було додатково підготовлено обрану структуру: узяті ланцюги A та B, структури очищені від наявних лігандів із використанням BIOVIA Discovery Studio 4.5.

Молекулярний докінг було проведено за допомогою програми AutoDock 4.2.6 (Morris et al., 2009), яка працює за методом на основі пошуку по сітці, що дає можливість швидко оцінювати енергію зв'язування з пробними конформаціями. У цьому методі білок-мішень поміщається в сітку, після чого кожен атом ліганду послідовно розміщується в кожній точці сітки, обраховується енергія зв'язування між атомом ліганду і білком-мішенню, значення зберігаються. Основним методом конформаційного пошуку є генетичний алгоритм Ламарка. Під час роботи цього алгоритму створюється популяція пробних конформацій, з кожної генерації вони мутують, обмінюються конформаційними параметрами; у підсумку обирається один варіант із найменшою енергією зв'язування.

Спочатку молекула TRPC4 у форматі .pdb додавалась у робочий простір супутнього програмного пакету AutoDock Tools. Далі додавались полярні атоми водню, розраховувались часткові атомні заряди Коллмана. Після цього файл зберігали у форматі PDBQT, який потім використовувався для докінгу. За допомогою авто-

мативованого скрипту програми для лігандів, відібраних моделями машинного навчання, розраховувались часткові атомні заряди методом Гастієра, після чого молекули лігандів зберігали у форматі PDBQT.

Докінг проводили в кубічну ділянку, яка називається грідбоксом. Визначення параметрів грідбоксу є найважливішим етапом у молекулярному докінгу, оскільки вони задають область, у якій буде відбуватись докування конформерів молекул для пошуку оптимального положення відносно TRPC4. Для докінгу в 8WPM кількість точок грідбоксу вздовж розмірів x , y та z було встановлено як $36 \times 40 \times 44$. Координати центра грідбоксу встановлено як $x = 150.745$, $y = 162.433$ та $z = 168.913$, а для 5Z96 кількість точок грідбоксу вздовж розмірів x , y та z було встановлено як $36 \times 38 \times 44$. Значення центра грідбоксу встановлено як $x = 146.606$, $y = 172.504$ та $z = 184.846$. Роздільна здатність сітки становила $0,375 \text{ \AA}$. Решта параметрів були стандартними. Вихідні дані були збережені у форматі файлу параметрів сітки (GPF). Для розрахунку потенціалу було використано емпіричну скоринг-функцію. Після проведення молекулярного докінгу був виконаний аналіз результатів. З п'яти фінальних конформацій Pico145 було обрано одну на основі енергії зв'язування та пози зв'язування з TRPC4. Комплекс Pico145 із людським TRPC1/TRPC4 з ідентифікатором 8WPM використовувався як референс для оцінювання адекватної пози зв'язування. Візуалізацію отриманих комплексів Pico145 із TRPC4 миші проводили за допомогою BIOVIA Discovery Studio 4.5.

Результати

З метою експериментальної перевірки ефективності блокування Pico145 рецептор-керованих TRPC4 каналів у нативних клітинах була досліджена дія цього блокатора на mI_{CAT} в ізольованих міоцитах клубової кишки миші з використанням методу петч-клемп у стандартній конфігурації "ціла клітина". У наших попередніх дослідженнях були детально охарактеризовані біофізичні та фармакологічні властивості mI_{CAT} (Zholos, 2006). mI_{CAT} активується шляхом синергічної взаємодії між активованими мускариновими рецепторами M2- та M3-підтипів, які широко експресовані у вісцеральних гладеньких м'язах різних типів, у тому числі й у шлунково-кишковому тракті, де його активація лежить в основі холінергічного спряження збудження і скорочення (Zholos et al., 2024). З використанням нокаутних TRPC4-/- мишей було показано, що mI_{CAT} переважно, приблизно на 85 %, опосередковується TRPC4 каналами (Tsvilovsky et al., 2009). Реєстрації проводилися при кімнатній температурі ($20-22 \text{ }^\circ\text{C}$) з використанням симетричних розчинів, що містили Cs^+ (125 mM), $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (100 nM) та буферний розчин 10 mM BAPTA/4,6 mM CaCl_2 . Це давало змогу надійно ізолювати mI_{CAT} (Zholos, 2006).

Стационарні вольт-амперні залежності mI_{CAT} вимірювали за допомогою повільних (тривалістю 6 с) пилкоподібних змін мембранного потенціалу в межах від 80 до -120 mV , які прикладались кожні 30 с (рис. 1 А, Б).

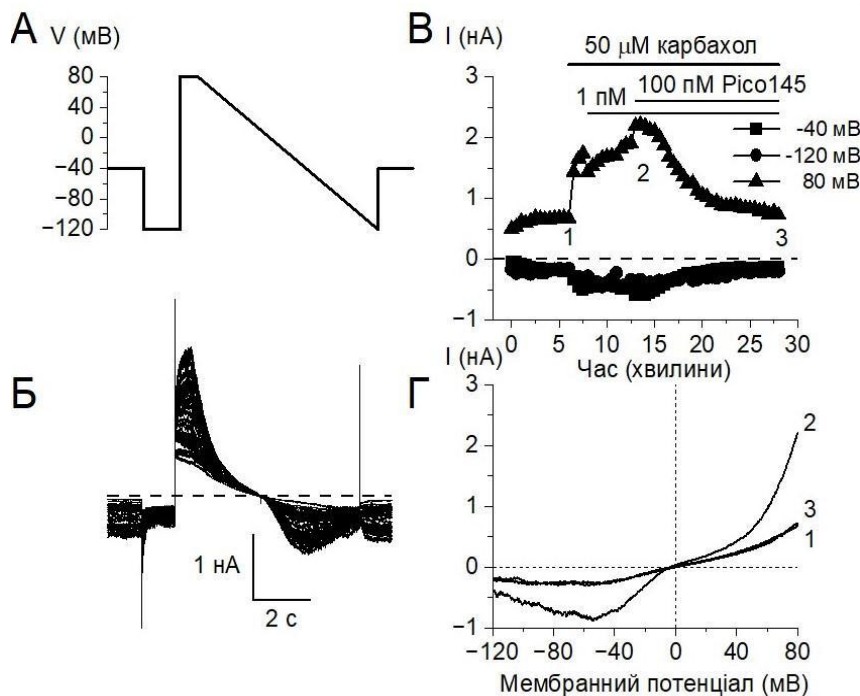


Рис. 1. Інгібування mI_{CAT} зареєстрованого в міоцитах клубової кишки миші селективним блокатором TRPC4-каналів Pico145.

А: схема 'ramp' протоколу з поступовим зміщенням потенціалу (з інтервалом у 30 с від 80 до 120 мВ протягом 6 с), що застосовувалась для дослідження біофізичних властивостей провідності каналів;

Б: відповідно, зареєстровані за допомогою цього протоколу оригінальні катіонні струми (mI_{CAT});

В: інгібування амплітуди струму із часом вимірювали при -40 mV (підтримувальний потенціал), -120 mV і 80 mV .

На тлі карбахол-індукованого струму (КХ, $50 \text{ }\mu\text{M}$) (1) спочатку апліквали 1 pM Pico145, а потім на піку розвитку струму (2) збільшили концентрацію блокатора до 100 pM , що викликало майже повне інгібування mI_{CAT} (3);

Г: вольт-амперна характеристика mI_{CAT} , що вимірювалася за допомогою повільних 'ramp' імпульсів до (крива 1) і після аплікації карбахолу в контролі (крива 2) і блокування струму у присутності Pico145 (крива 3). Ці моменти часу позначені відповідними цифрами на панелі В

Такий протокол експерименту давав можливість паралельно вимірювати зміни стаціонарної амплітуди струмів при потенціалах -40, -120 та 80 мВ у часі, як проілюстровано на рис. 1 В, а також стаціонарні вольт-амперні характеристики струму (рис. 1 Г). *mI_{CaT}* був активований карбахолом, який додавався до зовнішнього розчину в субмаксимальній концентрації (50 μ M). *mI_{CaT}* починав пригнічуватись *Pico145* у концентрації 100 пМ, а при додаванні *Pico145* у концентрації 100 пМ спостерігалось повне блокування струму (рис. 1 В, Г). При цьому інгібування розвивалося доволі повільно, протягом десятків секунд (рис. 1 Г), що, очевидно, пов'язано з тим, що сайт зв'язування блокатора міститься у площині мембран клітини, найбільш імовірно, у гідрофобній кишени. Це може бути причиною повільної дифузії блокатора і таким чином пояснювати повільний розвиток ефекту блокатора, що дуже контрастує з його високим афінитетом у пікомолярному діапазоні. Дійсно, середнє значення IC_{50} для інгібуючого ефекту *Pico145* на цей струм становило 3,1 пМ, але інгібування розвивалося доволі повільно, із середньою сталою часу 140 ± 6 с ($n = 9$). Більше того, спостерігалась потенціалзалежність блокування таким чином, що при -120 мВ інгібування було значно менше ефективним порівняно з 80 мВ (рис. 1 В). Це також є прямим доказом того, що інгібування TRPC4 відбувається всередині плазматичної мембрани клітини, адже сайт зв'язування молекули блокатора є чутливим до трансмембранної різниці потенціалів.

Отримані дані свідчать про високу ефективність *Pico145* у блокуванні *mI_{CaT}* і формують основу для подальшого структурного аналізу механізму його дії. Для структурної інтерпретації отриманих експериментальних результатів було проведено молекулярне моделювання взаємодії *Pico145* із TRPC4.

Першим етапом було проведено молекулярний докінг *Pico145* у структуру 8WPM після попереднього видалення ліганду з експериментального комплексу. Метою цього етапу було відтворення експериментально спостереженої пози *Pico145* та оцінювання здатності обраного докінг-протоколу коректно реконструювати реальну позу зв'язування. У межах молекулярного докінгу було отримано п'ять конформацій *Pico145* із різною енергією зв'язування. Фінальний вибір оптимальної моделі здійснювався на основі комбінованого оцінювання, що включало мінімальне значення передбаченої енергії зв'язування та візуальну перевірку просторової відповідності отриманої пози ліганду до положення *Pico145* у референтній структурі 8WPM. Енергія зв'язування найкращого конформера становить -10.3 ккал/моль. Отримані результати демонструють, що змодельована в процесі докінгу конформація *Pico145* практично повністю відтворює експериментально визначену позу ліганду, установлену за даними крио-ЕМ для комплексу TRPC1/TRPC4 (PDB: 8WPM). Як показано на рис. 2, докована (англ. *docked*) молекула *Pico145* характеризується високим ступенем просторового накладання з оригінальною позою ліганду, зберігаючи як орієнтацію ксантинового ядра, так і загальну геометрію розміщення у межах зв'язувальної кишені.

Така відповідність підтверджує коректність застосованого докінг-підходу та свідчить про високу достовірність відтворення механізму взаємодії *Pico145* із TRPC-каналом, що є принципово важливим для подальшого перенесення результатів на модель мишачого TRPC4.

Після валідації докінг-протоколу на референтній структурі TRPC1/TRPC4: *Pico145* (8WPM) було виконано докінг *Pico145* у структуру мишачого каналу TRPC4

(PDB: 5Z96). Вибір саме цієї структури як рецепторної моделі зумовлений її високою роздільністю, повною наявністю трансмембранного домену та відсутністю зв'язаного ліганду, що робить її оптимальною для дослідження механізму інгібування *Pico145*. Після проведення докінг-розрахунків для структури 5Z96 було згенеровано п'ять найкращих за енергією зв'язування конформацій *Pico145*. Фінальний вибір оптимальної моделі здійснювався за таким само принципом, як у попередньому етапі дослідження. Обрана конформація демонструвала найнижчу енергію зв'язування (-9.9 ккал/моль) і найкраще накладання на експериментальну позу ліганду в крио-ЕМ-комплексі.

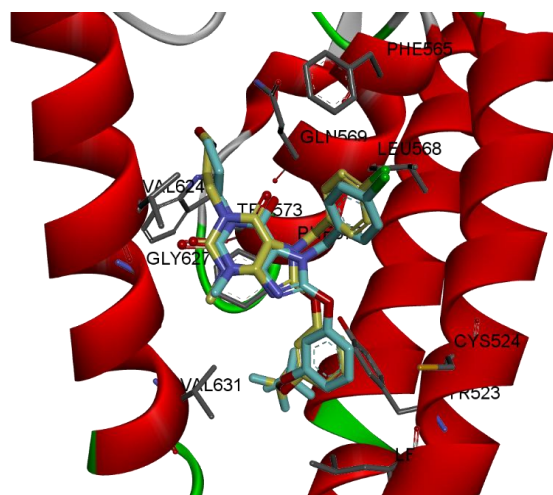


Рис. 2. Порівняння поз докованого *Pico145* та оригінального ліганду з 8WPM у TRPC1/TRPC5.

Кольорові позначення: жовтий – докований *Pico145*; світло-блакитний – оригінальна поза *Pico145* (PDB: 8WPM)

Для порівняльного аналізу просторової організації сайту зв'язування було виконано суперпозиціонування структур 5Z96 та 8WPM. Як показано на рис. 3, сайт, у якому зв'язується *Pico145* у гетеротетрамерному комплексі 8WPM, просторово повністю узгоджується з відповідною областю у мишачій структурі TRPC4. Геометрія кишені, орієнтація трансмембранних спіралей і локалізація ключових контактних залишків свідчать про високий ступінь структурної консервативності зазначеного сайту між людськими й мишачими каналами.

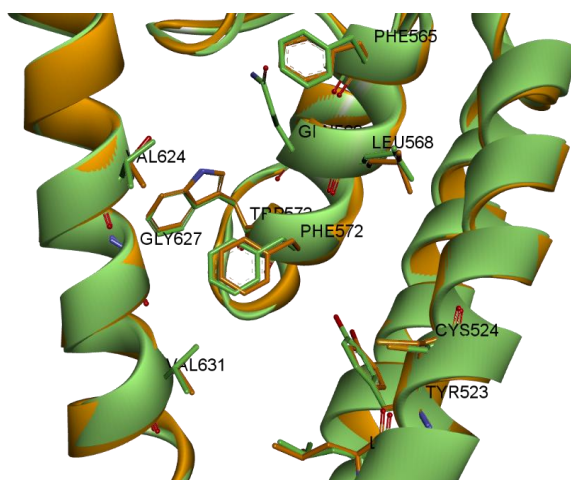


Рис. 3. Суперпозиціонування структур TRPC1/TRPC4 (колір зелений; PDB: 8WPM) та TRPC4 (колір помаранчевий; PDB: 5Z96)

Подальший докінг Pico145 у структуру 5Z96 продемонстрував стабільне зв'язування ліганду в тій самій міжсубодиночній гідрофобній кишені, яка була експериментально ідентифікована в референтній структурі 8WPM. Найкраща отримана модель відтворює характерну орієнтацію ксантинового ядра Pico145 та основні взаємодії з амінокислотними залишками сайту. На рис. 4 представлено отриманий комплекс TRPC4: Pico145 із візуалізацією взаємодій з амінокислотними залишками.

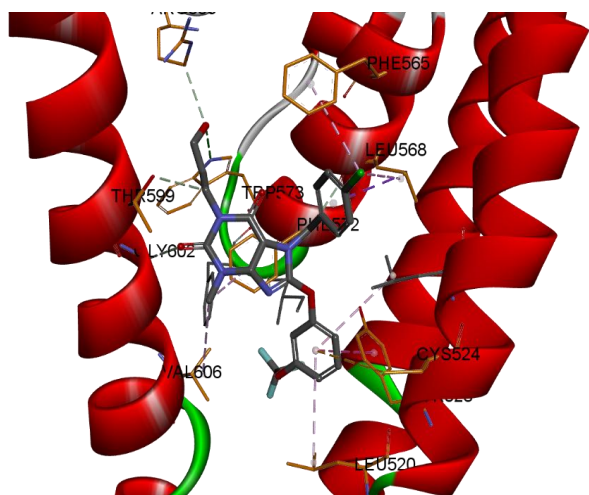


Рис. 4. Молекулярна модель комплексу Pico145 із мишачим TRPC4

Молекулярна модель комплексу Pico145 із мишачим TRPC4 (PDB: 5Z96), яка була отримана в результаті докінгу, демонструє стабілізацію ліганду в міжсубодиночній гідрофобній кишені за рахунок поєднання полярних і гідрофобно-ароматичних взаємодій. Зокрема, полярний фрагмент Pico145 формує конвенційний водневий зв'язок із Trp573, який задає орієнтацію молекули в сайт. Ароматичний фрагмент ліганду додатково фіксується через π - π (T-shaped)-взаємодію з Tyr523 та π -sulfur-контакт із Cys524, тоді як гідрофобне оточення кишені формується залишками Leu520, Leu527, Leu568, Phe565 та Phe572 (Alkyl/ π -Alkyl/ π - σ -взаємодії). Додаткові слабкі контакти (van der Waals) із Thr599, Gly602, Thr603 та Val606 підтримують щільне заповнення кишені лігандом.

Подальший аналіз відповідностей між периферійними залишками в моделях 5Z96 та 8WPM дає можливість більш детально оцінити ступінь консервативності сайту зв'язування Pico145. Зокрема, у мишачій структурі 5Z96 в оточенні кишені присутні залишки Gly602 та Val606, яким у референтній структурі 8WPM відповідають Gly627 та Val631, відповідно. Ці відповідності є повністю консервативними замінами, натомість позиція Thr599 у 5Z96 відповідає залишку Val624 у структурі 8WPM, що є напівконсервативною заміною полярного треоніну на гідрофобний валін. Така заміна, з огляду на її локалізацію у периферійній зоні кишені та відсутність прямих специфічних взаємодій із лігандом, імовірно, не порушує загальної архітектури сайту зв'язування, але може модулювати локальну гідрофобність середовища та впливати на динаміку бічних ланцюгів у цій області.

Отже, аналіз показує, що механізм зв'язування Pico145 є консервативним, тоді як виявлені відмінності стосуються переважно периферійних позицій і мають характер допустимих еволюційних варіацій, які не порушують функціональну цілісність сайту.

Дискусія і висновки

Отримані результати дають можливість поєднати функціональні електрофізіологічні спостереження з даними структурного моделювання в єдину структурно-функціональну інтерпретацію механізму інгібування TRPC4-каналів сполукою Pico145 у нативних гладеньком'язових клітинах.

Електрофізіологічні експерименти продемонстрували три характерні особливості дії Pico145 на mICAT: надзвичайно високу ефективність блокади в пікомолярному діапазоні ($IC_{50} \approx 3,1$ пМ), повільну кінетику розвитку інгібування ($\tau \approx 140$ с) і виражену потенціалзалежність ефекту. Сукупність цих ознак указує на те, що взаємодія ліганду з каналом відбувається не з боку водної фази, а в межах гідрофобного трансмембранного середовища, де процес дифузії молекули до сайту зв'язування є обмеженим, а сама взаємодія чутлива до трансмембранної різниці потенціалів. Таким чином, уже на рівні функціональних даних формується уявлення про глибоко локалізований мембранний сайт зв'язування Pico145 у структурі TRPC4. Подібний тип сайту вперше був експериментально ідентифікований у роботі (Wright et al., 2020) при дослідженні комплексу TRPC5 із Pico145, де за допомогою кріо-ЕМ було показано, що ліганд зв'язується у міжсубодиночній гідрофобній кишені трансмембранного домену каналу. У зазначеній роботі також було висунуто гіпотезу про консервативність цього сайту для представників підродини TRPC1/4/5 на підставі структурної та послідовнісної подібності відповідних ділянок білка. У цій же роботі було виконано докінг Pico145 до структури мишачого TRPC4 (PDB: 5Z96) для перевірки гіпотези про консервативність механізму зв'язування. Однак ця частина дослідження була описана стисло й без детального аналізу просторових відповідностей, енергетичних характеристик і структурно-функціональних наслідків взаємодії ліганду з каналом. У зв'язку із цим у даній роботі було реалізоване розширене молекулярне моделювання особливостей зв'язування Pico145 із мишачим TRPC4. Подальше підтвердження цієї гіпотези було отримано у структурі гетеротетрамерного комплексу TRPC1/TRPC4 людини (Won et al., 2025), де показано, що аналогічний міжсубодиночній сайт зберігається у цьому комплексі й відповідає сайту зв'язування Pico145. У нашому дослідженні ці структурні передумови отримують функціональне й молекулярне підтвердження для мишачого TRPC4. Молекулярний докінг Pico145 до структури 8WPM продемонстрував, що обраний протокол коректно відтворює експериментально визначену позу ліганду, що забезпечує достовірність подальшого перенесення методу на модель мишачого TRPC4 (5Z96).

Докінг до структури 5Z96 показав стабільне зв'язування Pico145 у тій самій міжсубодиночній гідрофобній кишені з відтворенням характерної орієнтації ксантинового ядра та системи полярних і гідрофобно-ароматичних взаємодій. Аналіз амінокислотного оточення кишені показав високий ступінь консервативності між мишачим TRPC4 та людським TRPC1/TRPC4. Виявлені відмінності, зокрема заміна Thr599 у миші на Val624 у людини, локалізовані у периферійній частині сайту, при цьому відповідні амінокислотні залишки не беруть участі у специфічних контактах із лігандом, що узгоджується з подібністю механізму зв'язування Pico145 у цих структурах.

Отже, отримані результати демонструють, що функціональні характеристики інгібування mICAT Pico145 повністю узгоджуються з існуванням саме такого міжсубодиночного гідрофобного сайту, який був раніше

ідентифікований у TRPC5 та TRPC1/TRPC4. Фактично, електрофізіологічні спостереження у нативних клітинах підтверджують структурні гіпотези, сформульовані на основі кріо-ЕМ-досліджень, а молекулярне моделювання надає просторове пояснення цим функціональним ефектам для мишачого TRPC4. У сукупності це дає можливість розглядати механізм інгібування Pico145 як універсальний для каналів підроддини TRPC1/4/5 і формує надійну структурно-функціональну основу для подальшого раціонального дизайну селективних модуляторів TRPC-каналів. Pico145 ефективно блокує рецептор-керовані TRPC4-канали гладеньких м'язів, значно пригнічуючи mICAT у пікомолярному діапазоні концентрацій, що в поєднанні зі структурними даними підтверджує консервативність механізму його дії. Отримані результати можуть бути використані як експериментальне та структурне підґрунтя для розроблення нових селективних блокаторів TRPC-каналів.

Внесок авторів: Роман Стратійчук – концептуалізація дослідження, методологія експериментів із молекулярного моделювання, проведення молекулярного моделювання, аналіз даних, написання чернетки рукопису; Дарія Дринь – планування та виконання експериментальної частини, збирання і аналіз електрофізіологічних даних, формулювання висновків; редагування рукопису; Олександр Жолос – концептуалізація, формальний аналіз, написання (перегляд і редагування).

Джерела фінансування. Дослідження виконано без залучення зовнішнього грантового фінансування в межах науково-дослідної роботи Київського національного університету імені Тараса Шевченка та Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна.

Список використаних джерел

- Alexander, S. P. H., Mathie, A. A., Peters, J. A., Veale, E. L., Striessnig, J., Kelly, E., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Davies, J. A., & Spedding, M. (2023). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2023/24: Ion channels. *British Journal of Pharmacology*, 180(Suppl. 2), S145–S222. <https://doi.org/10.1111/bph.16178>
- Bon, R. S., Wright, D. J., & Beech, D. J. (2022). Pharmacology of TRPC channels and its potential in cardiovascular and metabolic medicine. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 62, 427–446. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-030121-122314>
- Chubanov, V., Grimm, C., Hill, K., Schaefer, M., Köttgen, M., Storch, U., Mederos, Y., Schnitzler, M., Kudrina, V., Erbacher, A., & Gudermann, T. (2025). Physiological functions and pharmacological targeting of transient receptor potential channels. *Pharmacological Reviews*, 77(6), 100089. <https://doi.org/10.1016/j.pharmr.2025.100089>
- Englisch, C. N., Paulsen, F., & Tschernig, T. (2023). TRPC channels in the physiology and pathophysiology of the renal tubular system: What do we know? *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 181. <https://doi.org/10.3390/ijms24010181>
- Grimm, S., Just, S., Fuertig, R., Dwyer, J. B., Sharma, V. M., & Wunder, A. (2024). TRPC4/5 inhibitors: Phase I results and proof of concept studies. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00406-024-01890-0>
- Guo, D., Zhang, Y., Li, X., Wang, Q., & Chen, Z. (2025). Transient receptor potential channels as key regulators of physiological processes and therapeutic targets. *Journal of Neuroinflammation*, 22, Article 77. <https://doi.org/10.1186/s12974-025-03377-x>
- Kang, H., Kim, J., Park, C. H., Jeong, B., & So, I. (2024). Direct modulation of TRPC ion channels by Gα proteins. *Frontiers in Physiology*, 15, 1362987. <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1362987>
- Ke, X., Cai, H., & Chen, G. (2024). Exploring the therapeutic potential of TRPC channels in chronic pain: An investigation into their mechanisms, functions, and prospects. *European Journal of Pharmacology*, 961, 177206. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.177206>
- Liu, H. (2024). Small molecules targeting canonical transient receptor potential channels: Recent advances and therapeutic opportunities. *Drug Discovery Today*, 29(6), 103951. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2024.103951>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Tanahashi, Y., Komori, S., Matsuyama, H., Kitazawa, T., & Unno, T. (2021). Functions of muscarinic receptor subtypes in gastrointestinal smooth muscle: A review using receptor-knockout mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 926. <https://doi.org/10.3390/ijms22020926>
- Tsvilovskyy, V. V., Zholos, A. V., Aberle, T., Philipp, S. E., Dietrich, A., & Zhu, M. X. (2009). Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. *Gastroenterology*, 137(4), 1415–1424. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.06.046>
- Won, J., Kim, J., Kim, J., Lee, Y., & Park, C. Y. (2025). Cryo-EM structure of the heteromeric TRPC1/TRPC4 channel. *Nature Structural & Molecular Biology*, 32(2), 326–338. <https://doi.org/10.1038/s41594-024-01408-1>
- Wright, D. J., Simmons, K. J., Johnson, R. M., Beech, D. J., Muench, S. P., & Bon, R. S. (2020). Human TRPC5 structures reveal interaction of a xanthine-based TRPC1/4/5 inhibitor with a conserved lipid binding site. *Communications Biology*, 3, Article 704. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01437-8>
- Zholos, A. V. (2006). Regulation of TRP-like muscarinic cation current in gastrointestinal smooth muscle with special reference to PLC/InsP₃/Ca²⁺ system. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(7), 833–842. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00392.x>
- Zholos, A. V., Melnyk, M. I., & Dryn, D. O. (2024). Molecular mechanisms of cholinergic neurotransmission in visceral smooth muscles with a focus on receptor-operated TRPC4 channel and impairment of gastrointestinal motility by general anaesthetics and anxiolytics. *Neuropharmacology*, 242, 109776. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109776>

References

- Alexander, S. P. H., Mathie, A. A., Peters, J. A., Veale, E. L., Striessnig, J., Kelly, E., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Davies, J. A., & Spedding, M. (2023). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2023/24: Ion channels. *British Journal of Pharmacology*, 180(Suppl. 2), S145–S222. <https://doi.org/10.1111/bph.16178>
- Bon, R. S., Wright, D. J., & Beech, D. J. (2022). Pharmacology of TRPC channels and its potential in cardiovascular and metabolic medicine. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 62, 427–446. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-030121-122314>
- Chubanov, V., Grimm, C., Hill, K., Schaefer, M., Köttgen, M., Storch, U., Mederos, Y., Schnitzler, M., Kudrina, V., Erbacher, A., & Gudermann, T. (2025). Physiological functions and pharmacological targeting of transient receptor potential channels. *Pharmacological Reviews*, 77(6), 100089. <https://doi.org/10.1016/j.pharmr.2025.100089>
- Englisch, C. N., Paulsen, F., & Tschernig, T. (2023). TRPC channels in the physiology and pathophysiology of the renal tubular system: What do we know? *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 181. <https://doi.org/10.3390/ijms24010181>
- Grimm, S., Just, S., Fuertig, R., Dwyer, J. B., Sharma, V. M., & Wunder, A. (2024). TRPC4/5 inhibitors: Phase I results and proof of concept studies. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00406-024-01890-0>
- Guo, D., Zhang, Y., Li, X., Wang, Q., & Chen, Z. (2025). Transient receptor potential channels as key regulators of physiological processes and therapeutic targets. *Journal of Neuroinflammation*, 22, Article 77. <https://doi.org/10.1186/s12974-025-03377-x>
- Kang, H., Kim, J., Park, C. H., Jeong, B., & So, I. (2024). Direct modulation of TRPC ion channels by Gα proteins. *Frontiers in Physiology*, 15, 1362987. <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1362987>
- Ke, X., Cai, H., & Chen, G. (2024). Exploring the therapeutic potential of TRPC channels in chronic pain: An investigation into their mechanisms, functions, and prospects. *European Journal of Pharmacology*, 961, 177206. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.177206>
- Liu, H. (2024). Small molecules targeting canonical transient receptor potential channels: Recent advances and therapeutic opportunities. *Drug Discovery Today*, 29(6), 103951. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2024.103951>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Tanahashi, Y., Komori, S., Matsuyama, H., Kitazawa, T., & Unno, T. (2021). Functions of muscarinic receptor subtypes in gastrointestinal smooth muscle: A review using receptor-knockout mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 926. <https://doi.org/10.3390/ijms22020926>
- Tsvilovskyy, V. V., Zholos, A. V., Aberle, T., Philipp, S. E., Dietrich, A., & Zhu, M. X. (2009). Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. *Gastroenterology*, 137(4), 1415–1424. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.06.046>
- Won, J., Kim, J., Kim, J., Lee, Y., & Park, C. Y. (2025). Cryo-EM structure of the heteromeric TRPC1/TRPC4 channel. *Nature Structural & Molecular Biology*, 32(2), 326–338. <https://doi.org/10.1038/s41594-024-01408-1>
- Wright, D. J., Simmons, K. J., Johnson, R. M., Beech, D. J., Muench, S. P., & Bon, R. S. (2020). Human TRPC5 structures reveal interaction of a xanthine-based TRPC1/4/5 inhibitor with a conserved lipid binding site. *Communications Biology*, 3, Article 704. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01437-8>

Zholos, A. V. (2006). Regulation of TRP-like muscarinic cation current in gastrointestinal smooth muscle with special reference to PLC/InsP₃/Ca²⁺ system. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(7), 833–842. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00392.x>

Zholos, A. V., Melnyk, M. I., & Dryn, D. O. (2024). Molecular mechanisms of cholinergic neurotransmission in visceral smooth muscles with a focus on receptor-operated TRPC4 channel and impairment of gastrointestinal motility

by general anaesthetics and anxiolytics. *Neuropharmacology*, 242, 109776. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109776>

Отримано редакцією журналу / Received: 15.12.25
Прорецензовано / Revised: 02.02.26
Схвалено до друку / Accepted: 03.03.26
Опубліковано / Published: 27.04.26

Roman STRATIICHUK, PhD Student
ORCID ID: 0009-0001-6632-7642
e-mail: romanstratiichuk1@gmail.com
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Dariia DRYN, PhD (Biol.), Research
ORCID ID: 0000-0002-0708-5372
e-mail: daria.dryn@biph.kiev.ua
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
O. O. Bogomolets Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Alexander ZHOLOS, DSc (Biol.), Prof.
ORCID ID: 0000-0002-4320-149X
e-mail: avzholos@knu.ua
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

BLOCKADE OF TRPC4 CHANNELS BY THE PICO145 INHIBITOR: AN EXPERIMENTAL AND MOLECULAR STUDY

Background. Canonical transient receptor potential channel 4 (TRPC4) in intestinal smooth muscle is activated via interaction with M2/M3 muscarinic receptors and activated by these receptors G-proteins and represents an important component of calcium signaling. Blockade of these channels by highly potent inhibitors such as Pico145 is of considerable interest for the development of new pharmacological approaches. The aim of this study was to investigate the effect of Pico145 on muscarinic receptor-induced cation current (mICAT) in mouse ileal smooth muscle cells and to elucidate the molecular mechanism of Pico145 binding to the TRPC4 channel.

Methods. Electrophysiological experiments were performed using the patch-clamp technique on isolated smooth muscle cells from mouse ileum. Molecular modeling was conducted by docking Pico145 into the cryo-EM structure of TRPC4 (PDB: 5Z96) following validation on the reference TRPC1/TRPC4:Pico145 complex (PDB: 8WPM). Binding energies and spatial correspondence of the ligand pose relative to the experimentally determined Pico145 position in the TRPC1/TRPC4 channel were evaluated.

Results. Pico145 was shown to markedly suppress the amplitude of mICAT in intestinal smooth muscle cells. At a concentration of 100 pM, the inhibitor reduced the current by more than 80 % ($p < 0.05$) compared with control, consistent with the established contribution of TRPC4 to the generation of mICAT. Molecular docking confirmed that Pico145 binds within a conserved intersubunit hydrophobic pocket of the TRPC4 transmembrane domain, which corresponds to the binding site previously identified in the structurally related TRPC5 protein. The modeled conformation of Pico145 almost completely reproduces the experimentally determined ligand pose in the TRPC4 channel. Minor differences in the amino acid composition of the pocket (Thr599 in mouse TRPC4 versus Val624 in human TRPC4) do not affect the binding mode, confirming the conserved nature of the inhibition mechanism.

Conclusions. Pico145 effectively blocks receptor-operated TRPC4 channels in smooth muscle, leading to a pronounced inhibition of mICAT. Molecular modeling revealed that Pico145 binds to a conserved intramembrane site in the TRPC4 channel that coincides with the binding site in structurally related TRPC1/4/5 channels. These results support the common inhibitory mechanism of the TRPC4 by Pico145 and may facilitate the rational design of new selective TRPC channel blockers.

Keywords: TRPC4, Pico145, mICAT, molecular docking, smooth muscle.

Олександр Жолос є членом редколегії видання, тому не брав участі у рецензуванні та прийнятті рішення щодо публікації цієї статті. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

Alexander Zholos is the a member of the journal editorial board, therefore did not take part in the peer-review process or in the decision to publish of this article.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.