

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

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доцент Олексій Юрійович Нипорко
Протокол № ____ засідання кафедри
від “ ____ ” _____ 2022 р.

ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОДИНАМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ
ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБІТОРІВ МУСКАРИНОВИХ АЦЕТИЛХОЛІНОВИХ
РЕЦЕПТОРІВ M₃-ТИПУ

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

Науковий керівник
професор кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
Цимбалюк Ольга Володимирівна

Оцінка захисту роботи _____

Київ – 2022 р.

АНОТАЦІЯ

Подгаєцька А. Ю. Дослідження фармакодинамічних властивостей потенційних інгібіторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів M₃-типу. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 16.162 Біотехнології ОП «Високі технології (Біотехнологія)».

На даний момент в світі є надзвичайно актуальною проблема розробки фармакологічних засобів нового покоління проти бронхіальної астми та ХОЗЛ на основі селективних антагоністів мускаринових M₃-холінорецепторів.

У роботі із використанням методів кінетичного аналізу та відомих фармакологічно-активних речовин (агоністів і антагоністів адренорецепторів та холінорецепторів, активаторів і блокувачів потенціалкеруваних Ca²⁺-каналів та систем мобілізації іонів Ca²⁺ з внутрішньоклітинних депо) на мультиклітинних гладеньком'язових препаратах трахеї і *antrum* щурів досліджено фармакодинамічні властивості попередньо відібраних і покращених (методами *in silico*) сполук з передбаченою холінолітичною активністю.

Показано, що сполуки з шифрами 154350, 249682 та 151685 характеризуються здатністю інгібувати ацетилхолін-індуковані скорочувальні реакції (середні значення IC₅₀ відповідно становлять: $3,09 \cdot 10^{-9}$ М, $= 3,72 \cdot 10^{-9}$ М та $3,39 \cdot 10^{-10}$ М) співвідносно з ефективністю одного із найбільш застосованих в Україні лікарських засобів для терапії астми і ХОЗЛ іпратропію броміду.

Встановлено, що сполуки з шифрами 154350, 249682 та 151685 володіють суттєво більшою здатністю пригнічувати проведення сигналу через холінорецептори M₃-типу порівняно з іпратропієм бромідом, не маючи значного впливу на M₂-холінорецептори.

Ключові слова: мускаринові холінорецептори M₂- і M₃-типу, астма, ХОЗЛ, мультиклітинні препарати трахеї і антрального відділу шлунку.

Зміст

Перелік умовних позначень	4
1. Огляд літератури.....	8
1.1. Астма та патологія хронічного обструктивного захворювання легень	8
1.2. Засоби для терапії астми: LABA SABA LAMA SAMA. Незадоволена потреба в лікуванні астми	11
1.3. Мускаринові ацетилхолінові рецептори, їх представництво у тканинах дихальної системи людини	14
2. Матеріали і методи	17
2.1 . Препаративні процедури та дослідження скорочувальної активності мультіклітинних гладеньком'язових препаратів	17
2.2. Тестування холінолітичної активності і фізіологічних механізмів дії сполук-ефекторів мускаринових холінорецепторів	18
2.3. Кінетичний аналіз скорочувальної активності гладеньких м'язів	21
2.4. Статистичний аналіз.....	21
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	23
3.1. Дослідження дії відомих сполук-холінолітиків на скорочення гладеньких м'язів трахеї та шлунку, активовані агоністами мускаринових ацетилхолінових рецепторів	23
3.2. Дослідження дії сполук з передбаченою інгібувальною властивістю щодо мускаринових ацетилхолінових рецепторів на гладенькі м'язи трахеї та antrum щурів.....	30
3.3. Біологічне тестування оптимізованих сполук з покращеними холінолітичною активністю і біодоступністю: дослідження фармакологічних і фізіологічних ефектів	36
3.4. Обговорення одержаних результатів.....	49
Висновки	53
Список використаних джерел	55

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ХОЗЛ – хронічне обструктивне захворювання легень

БА – бронхіальна астма

АХПС - астма-ХОЗЛ-перехресний синдром

ГМП – гладеньком'язові препарати

ГМ – гладенькі м'язи

ІКС (ICS) – інгаляційні кортикостероїди

LABA – β_2 -агоністи тривалої дії (long-acting β_2 -agonists)

SABA – β_2 -агоністи короткої дії (short-acting β_2 -agonists)

SAMA – мускаринові антагоністи короткої дії (short-acting muscarinic antagonists)

LAMA – мускаринові антагоністи тривалої дії (long-acting muscarinic antagonists)

ВСТУП

Астма та хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) є глобально значущими неінфекційними захворюваннями із серйозними наслідками для здоров'я як дітей, так і дорослих, включаючи високу захворюваність та смертність у важких випадках. Астма є одним з найпоширеніших основних неінфекційних захворювань, а ХОЗЛ є третьою провідною причиною смерті в усьому світі.

У дітей дані паталогії можуть погіршити розвиток дихальних шляхів і зменшити максимально досягнуту функцію легень, і ці порушення функції легень можуть зберігатися в дорослому віці без додаткової прогресуючої втрати. У дорослих може прискоритися зниження функції легень і підвищити ризик фіксованої обструкції повітряного потоку.

Таким чином, при лікуванні астми ми повинні зосередитися на покращенні не тільки короточасних симптомів, але й довгострокових респіраторних та інших наслідків для здоров'я.

Астма характеризується змінним обмеженням повітряного потоку, яке частково оборотне спонтанно або під час лікування. В основі цього обмеження повітряного потоку лежить хронічне запалення, яке підвищує гіперчутливість дихальних шляхів до різних подразників. ХОЗЛ характеризується хронічним обмеженням повітряного потоку, яке не є повністю оборотним. Пацієнти з ХОЗЛ можуть відчувати різке погіршення симптомів. Ці загострення характеризуються підвищеним виділенням мокротиння і задишкою. симптоми ХОЗЛ та астми перекриваються; однак найбільш відмінною відмінністю між умовами є оборотність обмеження повітряного потоку.

Крім того, жоден сучасний протиастматичний препарат не спрямований на гіперчутливість гладеньких м'язів бронхів, що є критичним фактором обструкції дихальних шляхів і фундаментальним фізіологічним відхиленням, що характеризує астму.

Таким чином, існує очевидна потреба в інших підходах до місцевої терапії астми, спрямованих на гіперреакцію гладеньких м'язів бронхів і запалення дихальних шляхів.

Пацієнти з астмою значною мірою покладаються на інгаляційні бронходилататори та інгаляційні кортикостероїди (ІКС) для контролю симптомів, максимізації якості життя та уникнення загострень та дорогих госпіталізацій. Відомо, що при ХОЗЛ підвищується активність холінергічної системи, яка є однією з причин обмеження повітряного потоку, викликаного скороченням гладких м'язів дихальних шляхів. Тому блокування скорочувальної дії антихолінергічними препаратами є корисним терапевтичним втручанням для зменшення обмеження повітряного потоку. На додаток до ефектів звуження бронхів і секреції слизу, накопичені дані на тваринних моделях ХОЗЛ свідчать про те, що ацетилхолін відіграє роль у запаленні. Експерименти показали, що M_3 -рецептори беруть участь у прозапальній дії ацетилхоліну. Останнім часом для лікування ХОЗЛ стали доступні комбінації β_2 -агоністів тривалої дії (LABA) і мускаринових антагоністів тривалої дії (LAMA). Але шлях інгібування через мускаринові ацетилхолінові рецептори M_3 -типу, що включає парасимпатичну нервову систему, регулює надмірні запальні реакції для захисту органів під час пошкодження тканин та інфекції, тому основне завдання роботи полягало в дослідженні фармакодинамічних властивостей сполук з передбаченою холінолітичною для удосконалення терапії астми і ХОЗЛ, за рахунок спрямованої дії лише на мускаринові холінорецептори M_3 -типу.

Звісно, на даний час розробляються нові антагоністи мускаринових рецепторів, які вирішують проблеми побічних ефектів і селективності рецепторів, які є досить перспективними в лікуванні астми та хронічної обструктивної хвороби легень. Але незважаючи на досягнення в лікуванні астми та ХОЗЛ за останні десятиліття, все ще необхідно досягти успіхів у покращенні існуючих препаратів, спрямовано знайшовши нові молекули селективних і високоафінних антагоністів мускаринових холінорецепторів.

Відповідно до наданої інформації, об'єктом дослідження стали речовини з передбаченою холінолітичною активністю – селективні антагоністи M_3 -холінорецепторів. Дослідження спрямоване на тестування інгібіторних якостей наданих речовин методом тензометрії у ізометричному режимі на мультиклітинних гладеньком'язових препаратах (ГМП); та для кращих з них довести на багатоклітинних препаратах дихальних шляхів і антрального відділу шлунку щурів, що ці сполуки діють саме на мускаринові холінорецептори M_3 підтипу, а на інші рецептори, які є в клітинах гладеньких м'язів (і ендотелію) дихальних шляхів вони не мають суттєвого впливу.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Астма та патологія хронічного обструктивного захворювання легень

Бронхіальна астма є найпоширенішим запальним захворюванням дихальної системи людини (код МКХ10 – J45), для якого характерне хронічне запалення нижніх дихальних шляхів. Зі свого боку це призводить до ряду клінічних проявів, реакцій на лікарські засоби та чинники природного походження протягом усього життя. Астма – клінічний синдром, який вражає всі вікові групи та супроводжується респіраторними симптомами в анамнезі, зокрема, хрипами і задишкою, стисканням в грудях і кашелем, які змінюються в часі та за інтенсивністю, а також періодичне обмеження повітряного потоку на видиху і гіперчутливість дихальних шляхів до ряду подразників, таких як фізичні вправи та подразники-іританти, що вдихаються [1-3].

Модель астми як єдиного цілого була замінена набагато складнішою біологічною мережею різних і взаємопов'язаних шляхів запалення. Зараз термін астма вважається комплексним діагнозом для кількох захворювань з різними механізмами (ендотипами) і різноманітними клінічними проявами (фенотипами). Точне визначення цих ендотипів є центральним для лікування астми через притаманні терапевтичні та прогностичні наслідки.

В загальному класифікують за причиною, тому маємо чотири фенотипи астми: алергічна (атопічну), неалергічна (неатопічну), персистуюча з пізнім початком, а також астма, що індуковану ожирінням. Атопічна астма з раннім початком найбільш поширена в дитинстві та в молодому віці, після чого серед старших вікових груп переважає неатопічна форма. [4].

Екологія, спосіб життя та стан навколишнього середовища впливають на походження і тяжкість протікання астми, наприклад, вплив алергенів, стрес, куріння, промислове забруднення повітря, вірусні інфекції, ожиріння. Хоча

ці фактори й відіграють велику роль у розвитку астми, було показано, що сильні генетичні фактори роблять також свій внесок [5]. Не тільки дитячому віці збільшується кількість випадків бронхіальної астми, але захворювання може виникнути й в дорослому віці. За даними досліджень найбільше зростання у країнах з розвинутою економікою (близько 10% загальної кількості) і великі відмінності в поширеності зберігаються між різними частинами світу. Загалом з літератури робимо висновок, що забезпечене населення з гарною гігієною, які постійно схильні до високого рівня аероалергену, у яких дієта з відносно низьким вмістом поживних речовин, а також низький рівень фізичних навантажень, мають підвищений ризик астми [4;6].

Кількість людей з діагностованою астмою по всьому світі складає понад 300 млн. Показники виявлення та лікування астми знаходяться не на достатньо високому рівні, особливо в країнах з низьким та середнім еквівалентним рівнем доходу. У найважчих випадках астма може призвести до смерті. Але астма включена до Глобального плану дій ВООЗ із запобігання і боротьби з неінфекційними захворюваннями та Порядку денного ООН зі сталого розвитку на період до 2030 року [7].

Патологія хронічного обструктивного захворювання легень, скорочено ХОЗЛ, код МКХ10 – J44, або хронічний обструктивний бронхіт – це загальний термін для різних клінічних утворень з численними причинами, що характеризується прогресуючим та стійким обмеженням та зниженням повітряного потоку [8]. Отже, ХОЗЛ краще визначити як клінічний синдром, що визначається хронічними респіраторними симптомами, структурними аномаліями легенів (перебудовою стінки повітроносних шляхів, запальними реакціями дихальних шляхів, емфіземою або супутніми захворюваннями), порушенням функції легень (в першу чергу обмеженням видихуваного повітря, яке погано оборотне) або будь-якою комбінацією наведених факторів [8;9]. Патогенез ХОЗЛ заснований на вродженій та адаптивній запальній імунній відповіді на вдихання токсичних частинок і газів. Хоча куріння

тютюну є основною причиною цієї інгаляційної травми, багато інших впливів навколишнього середовища та професій сприяють розвитку патології ХОЗЛ., Пов'язані з ХОЗЛ імунно-запальні зміни, взаємозалежні з процесом відновлення та ремоделювання тканин, що збільшує вироблення слизу та призводять до емфізематозного руйнування поверхонь легенів де відбувається газообмін. Поширена форма емфіземи, що спостерігається у курців, починається в дихальних бронхіолах поблизу потовщених і звужених дрібних бронхіол, які стають основним місцем обструкції при ХОЗЛ [9;10].

Останнє оновлення Глобальної ініціативи з хронічної обструктивної хвороби легень (GOLD) визначило концепцію ХОЗЛ як поширене захворювання, запобігти та вилікувати його є можливість, що окреслюється постійними симптомами респіраторних інфекцій та обмеженням прохідності повітряного потоку, що зумовлено аномалії дихальних шляхів та/або альвеолярних шляхів, які зазвичай виникають внаслідок сильного впливу шкідливих частинок або випарів. Це одна з основних причин смертності у всьому світі, яка значно зростає [11].

Центр громадського здоров'я України та ВООЗ інформує про те, що щонайменше 4% населення України хворіє на хронічну обструктивну хворобу легень, а близько 2% українців помирає від цього захворювання. Близько 10% населення світу у віці старше 40 років мають паталогію ХОЗЛ. Така поширеність та прогресивність хвороби дає невтішні прогнози: до 2030 року, за останніми даними, ХОЗЛ буде четвертою, за своєю летальністю, причиною смерті у світі [12;13].

У загальному, основним клінічним проявом астми та хронічного обструктивного захворювання легень є бронхіальна обструкція. Також в основі формування паталогій цих двох хвороб є обмеження потоку повітря повітряного, при різниці, що астма періодична та змінюється в часі – упродовж доби чи пори року. Тому об'єктивна симптоматика при астмі та ХОЗЛ за певних умов та обставин може бути подібною.

Зрештою, розвиток патологічних процесів при захворюваннях на астму і ХОЗЛ пов'язаний з різними факторами ризику, причинами активації та з'являються в результаті різних механізмів. Але є також випадки, що мають ознаки одночасно БА і ХОЗЛ, вони характеризуються стійким обмеженням потоку повітря. Цей тип патології відомий як АХПС - астма-ХОЗЛ-перехресний синдром. Перекриття двох патологій визначається в клінічній практиці за ознаками, спільними як з астмою, так і з ХОЗЛ. Це не визначення, а опис для клінічного використання, оскільки перекриття астми та ХОЗЛ включає кілька різних клінічно визначуваних фенотипів і, ймовірно, за цим стоять кілька різних механізмів в основі.[2;14;15].

1.2. Засоби для терапії астми: LABA SABA LAMA SAMA. Незадоволена потреба в лікуванні астми

Сучасні рекомендації щодо лікування астми закликають використання інгаляційних кортикостероїдів (ICS) спочатку, протизапальну терапію на етапі 2, а потім на 3 етапі або збільшення дози ICS, або додавання контролера β 2-адреноміметика тривалої дії (LABA) для досягнення стійкої бронходилатації (розширення дихальних шляхів у легенях внаслідок розслаблення навколишніх гладеньких м'язів), як правило, у вигляді комбінованого інгалятора ICS/LABA. Антагоністи мускаринових ацетилхолінових рецепторів короткої дії (SAMA), такі як іпратропій, в даний час використовуються як небулайзерна терапія у високих дозах при гострій тяжкій астмі в поєднанні з агоністами β -адренорецепторів короткої дії (SABA), такими як сальбутамол [16;17].

Антагоністи мускаринових ацетилхолінових рецепторів тривалої дії (LAMA), які добре закріплені в рекомендаціях щодо ХОЗЛ, наразі не ліцензовані для лікування астми [18]. Наразі доступні LAMA включають давно відомий тіотропій, а також новітні препарати, а саме аклідиній і

глікопіроній, усі з яких на даний момент ліцензовані для застосування при ХОЗЛ [17;18].

У свою чергу, Управління з контролю якості харчових продуктів і медикаментів Сполучених Штатів (FDA) після ретельного аналізу наявних доказів рекомендувало, що LABA не слід призначати для тривалої терапії навіть у комбінації з ICS, і що, якщо це можливо, пацієнтам слід відмовитися від лише ICS [19]. Зокрема, роль LABA у дітей, які страждають на астму, перебуває під пильною увагою FDA з огляду на недостатність доказів їхньої ефективності. На тлі цього занепокоєння щодо LABA існує незадоволена потреба в альтернативному бронходилататорі тривалої дії для використання як доповнення до терапії тільки до ICS або ICS/LABA для покращення контролю.

Тому доречно розглядати нові клінічні докази застосування інгібіторів мускаринових рецепторів, як один із можливих шляхів впливу на розвиток хронічного обструктивного захворювання легень. Мускаринові ацетилхолінові рецептори – це надродина серпентинових рецепторів, пов'язаних з G-білком, які регулюють численні фундаментальні функції центральної та периферичної нервової системи [21;22].

Зауважимо, що жоден сучасний протиастматичний препарат не спрямований на гіперчутливість гладеньких м'язів бронхів, що є критичним фактором обструкції дихальних шляхів і фундаментальним фізіологічним відхиленням, що характеризує астму. Експериментально доведено, що у гладеньких м'язових стінках повітроносних шляхів гіперактивність мускаринових рецепторів призводить до зменшення розміру дихального отвору хронічної гіповентиляції легень. В свою чергу, гіперактивність мускаринових рецепторів є одною з ключових причин розвитку астми, а при несприятливих умовах призводить до розвитку ХОЗЛ [1;23;24].

Препарати, які певним чином впливають на адренорецептори та мускаринові холіноорецептори, зараз використовують для лікування ХОЗЛ; приклади та короткий опис зазначено нижче. Це β_2 -адреноміметики короткої

дії (SABA): сальбутамол і фенотерол, але в загальному їх можна розділити на дві великі групи за тривалістю дії після інгаляції звичайних доз: 1) катехоламіни ізопреналін і римитерол, які мають дуже коротку дію від 1 до 2 год; і 2) ті, які зазвичай описуються як короткодійні, такі як фенотерол, альбутерол і тербуталін, які діють протягом 3-6 годин, хоча дія фенотеролу може бути трохи довшою. У будь-якому випадку тривалість дії всіх агоністів β_2 -адренорецепторів збільшується з дозуванням. β_2 -адреноміметики тривалої дії (LABA), такі як сальметерол і формотерол, забезпечують 12-годинну бронходилатацію, можуть бути ще індакатерол, вілантерол, фуросатом і умеклідініум. Тривалість дії агоністів β_2 -адренорецепторів в бронхах людини знаходиться в такому порядку: сальметерол \gg формотерол \geq альбутерол \geq тербуталін $>$ фенотерол. Хоча формотерол і сальметерол є потужними та ефективними агоністами β_2 -адренорецепторів, їхня різна хімічна структура надає помітно різні фармакологічні характеристики. У будь-якому випадку формотерол дещо менш ліпофільний, ніж сальметерол, і вважається, що він швидше дифундує в легеневиx тканинах, досягаючи місця дії швидше, ніж сальметерол. Також для лікування захворювань органів дихання застосовуються холінолітики SAMA, такі як і атропіну метонітрат, іпратропію бромід та окситропію бромід, що є ефективними четвертинними антихолінергічними препаратами короткої дії. Тривалість їх дії становить приблизно 6-8 годин, але в порівнянні з SABA вони мають повільніший початок дії, хоча, ймовірно, більш тривалий час дії. І тривалої дії (LAMA): тіотропій, який демонструє в 6-20 разів більшу спорідненість до мускаринових ацетилхолінових рецепторів, ніж іпратропію бромід, глікопропіонію бромід, умеклідінію бромід і аклідінію бромід [24-26].

Але дані препарати мають ряд побічних реакцій, це перш за все через свою селективність, вона є недостатньою. Наприклад, тіотропію бромід здатний взаємодіяти з TRPV1- рецептором (який активується капсаїцином, що зв'язується з ваніллоїдним рецептором типу один). TRPV1- рецептор розташований на нейронних клітинах або ненеурональних клітинних

мембранах з високою проникністю для Ca^{2+} і кардіоміоцитах, і його коригуючі властивості на ці рецептори є сумнівним – на фізіологічному рівні може бути як стан некритичного вдоволення та зниження больових подразнень, так і інфаркт міокарда.

В загальному, існує очевидна потреба в інших підходах до проблеми лікування астми та ХОЗЛ. І є очевидною потреба в розробці нових селективних препаратів, що спрямовані на гіперреакцію м'язів бронхів і запалення дихальних шляхів, розслаблюючи їх, тим саме застерігаючи гіповентиляцію легень.

1.3. Мускаринові ацетилхолінові рецептори, їх представництво у тканинах дихальної системи людини

Мускаринові ацетилхолінові рецептори виконують різноманітні фізіологічні функції. На даний момент визначено п'ять підтипів рецепторів ($M_1 - M_5$). Непарні рецептори (M_1, M_3 і M_5) переважно з'єднуються з $G_{q/11}$ -білками і активують фосфоліпазу C, яка ініціює каскад фосфатидилінозитолтрифосфату, що призводить до дисоціації фосфатидил-4,5-біфосфатів (PIP_2) на два компоненти, тобто інозитол-1,4,5-трифосфат (IP_3) та диацилгліцерол (DAG). IP_3 опосередковує вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинного пулу (ендоплазматичного ретикулума), тоді як DAG відповідає за активацію протеїнкінази C [29;30;35].

Залежно від різноманітності ефекторів, що знаходяться нижче, різні клітини демонструють різноманітні функціональні мускаринові реакції. Наприклад, у клітинах судин гладенької мускулатури активація мускаринового рецептора M_3 призводить до підвищення внутрішньоклітинного Ca^{2+} , щоб викликати скорочення клітин, тоді як сигнал від того ж рецептора (M_3) у клітинах ендотелію судин активує ендотеліальну синтазу оксиду азоту, що призводить до вироблення NO і

викликає розслаблення сусідніх гладком'язових клітин судин. У залозистих тканинах оборот фосфатидилінозиту, опосередкований рецептором M_3 , призводить до секреції гормону. M_3 -холінорецептори забезпечують посилення секреції слизу і звуження просвіту у дихальних шляхах. M_3 -рецептори зазвичай функціонують в комплексі з M_2 -рецепторами, домінуючи в екзокринних залозах [31-33].

З іншого боку, парні підтипи рецепторів (M_2 і M_4) з'єднані з білками G класу $G_{i/o}$ і пригнічують активність аденілатциклази. Ці рецептори також активують G-білкові калієві канали, що призводить до гіперполяризації мембрани в збудливих клітинах [34-36]. У серці залежна від M_2 мускаринового рецептора активація цього каналу сприяє уповільненню серцебиття. У нейронах мускаринові рецептори M_2 і M_4 присутні на терміналах аксонів і пригнічують збудливість нейронів, що призводить до негативного зворотного зв'язку вивільнення нейромедіатора [37].

Окремі члени сімейства відрізняється за первинною структурою молекули та експресуються в різних тканинах, типах клітин і органах. Нещодавні підходи до націлювання на гени розгадали специфічні функції цих підтипів мускаринових рецепторів, які не вдалося повністю з'ясувати за допомогою фармакологічних підходів через неселективну дію доступних лігандів. На основі цих висновків мускаринові рецептори стали важливою терапевтичною мішенню для різних захворювань, включаючи сухість у роті, нетримання сечі та хронічну обструктивну хворобу легень [26;33;37].

У тканинах легень людини (і у всіх досліджених видів тварин) ацетилхолін викликає звуження бронхів, стимулюючи рецептори M_3 на гладеньких м'язах. Хоча скорочення гладенької м'язової тканини дихальних шляхів опосередковується рецепторами M_3 , більшість мускаринових рецепторів гладенької мускулатури м'язів дихальних шляхів насправді є M_2 [28,38]. Ці рецептори M_2 опосередковано сприяють скороченню непосмугованої м'язової тканини дихальних шляхів, обмежуючи розслаблення за допомогою β -адренорецепторів шляхом інгібування аденілатциклази.

Секреція залоз також опосередковується переважно мускариновими рецепторами M_3 -підтипу в підслизових клітинах [28;39].

Мускаринові рецептори також присутні на парасимпатичних нервах, які живлять легені. Мускаринові рецептори M_2 на постгангліонарних парасимпатичних нервах обмежують вивільнення ацетилхоліну, таким чином забезпечуючи фізіологічно релевантний негативний зворотний зв'язок контроль над вивільненням ацетилхоліну. Блокування рецепторів M_2 за допомогою мускаринових антагоністів, включаючи атропін та іпратропій, або використання селективних антагоністів M_2 -рецепторів, таких як галламін, значно посилює бронхоспазм, спричинений блукаючим нервом [40-42]. Нейрональні M_2 -рецептори є вразливими, тому їх функція значно знижується після респіраторної вірусної інфекції, викликаной антигеном або впливу фосфорорганічних кислот або озону. Вони також менш функціональні у людей з астмою. Зниження функції M_2 -рецепторів нейронів опосередковується різними механізмами, включаючи блокаду ендогенними антагоністами та зниження експресії рецепторів [41;43]. Вважається, що збільшення вивільнення ацетилхоліну є важливим механізмом гіперреактивності дихальних шляхів. Клінічно антихолінергічні препарати використовуються як бронходилататори в поєднанні з протизапальними стероїдами при лікуванні астми та ХОЗЛ [44;45].

Також маємо, що експресія M_3 -рецепторів в міоцитах дихальних шляхів значно нижча за рівень для рецепторів M_2 -підтипу (пропорція мускаринових ацетилхолінових рецепторів M_2 -підтипу до M_3 -підтипу - 4:1) [4;46]. Проте саме M_3 -рецептори є посередниками для скорочення цих клітин. Секреторна функція залоз також відтворюється переважно M_3 -рецепторами. [47-49]. Тож препарати-холінолітики зі специфічною дією саме на M_3 -холінорецептори можуть бути найбільш перспективними LAMA і SAMA для терапії обструкції дихальних шляхів при астмі і ХОБЛ [47;50-52].

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Препаративні процедури та дослідження скорочувальної активності мультиклітинних гладеньком'язових препаратів

Дію речовин-інгібіторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів експериментально вивчали на мультиклітинних гладеньком'язових препаратів самців щурів лінії Wistar та нелінійних мурчаках обох статей. Усі експерименти за участі тварин проводили у відповідності до законодавства України та норм Європейського Співтовариства щодо гуманного поводження з лабораторними тваринами. Утримання тварин передбачало: стандартне харчування, стандартні умови (температура 20 ± 2 °C, відносна вологість повітря 50-70%, світловий режим – світло:темрява = 12:12 годин). Вага тварин була в межах 230-250 у самців лінії Wistar та 350-500 г у мурчаків. Умертвіння тварин проводили із використанням ефірного наркозу.

Дослідження ефектів речовин з передбаченою холінолітичною активністю здійснювали методом тензометрії у ізометричному режимі на мультиклітинних гладеньком'язових препаратах (ГМП). Більшість експериментів здійснено на ГМП трахеї, що являють собою кільця висотою до 5 мм (3-4 хрящових кілець) зі збереженою слизовою оболонкою. Для препарування кілець трахеї використовували фрагменти трахеї від початку біфуркації до ділянки на 1-1.5 см вище біфуркації.

Частина експериментів проведено на ГМП антрального відділу (*antrum*) шлунку щурів. М'язи шлунку попередньо під бінокулярним мікроскопом за допомогою мікроінструментів очищували від фрагментів жирової тканини і слизової оболонки та нарізали у кільцевому напрямку розміщення м'язових волокон на смужки середнього розміру 2 x 10 мм.

ГМП поміщали в робочу камеру тензометричного устаткування об'ємом 2 мл (Рис. 2.1). Камера термостатована при 37°C за допомогою рідинного термостата із барботованим оксигенованою газовою сумішшю проточним розчином Кребса (мМ): 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, де швидкість протікання була 5 мл/хв. Для реєстрації скорочувальної активності ГМП поміщали на гачках з медичної сталі, один з яких був нерухомо зафіксований у стінці камери, а інший – під'єднаний до ємнісного датчика сили, розташованого на рухомому (за допомогою мікрогвинта) столику. Препаратам за допомогою мікрогвинта створювали пасивний натяг на рівні 10 мН, а потім залишали у спокої на 60 хв; дослідження починали після реєстрації декількох відтворюваних скорочень на аплікування гіперкалієвого розчину (80 мМ) та ацетилхоліну (10⁻⁶ М).

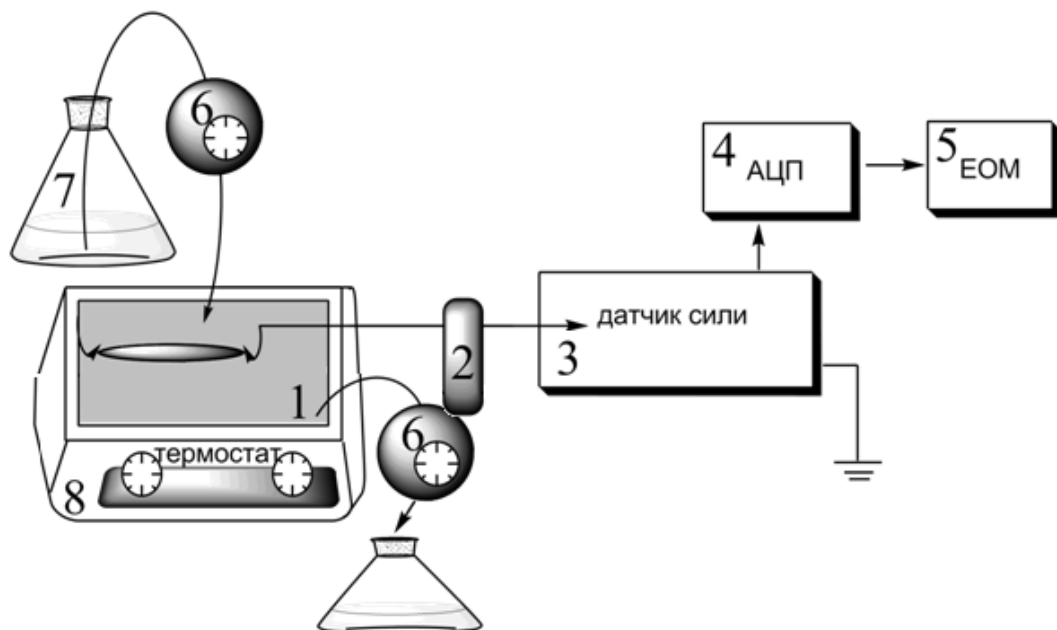


Рис. 2.1. Блок-схема тензометричної установки для дослідження скорочувальної активності багатоклітинних препаратів гладеньких м'язів: 1 - робоча камера з проточним розчином та закріпленим на сталевих гачках гладеньком'язовим препаратом; 2 - тензометричний ємнісний датчик; 3 - підсилювач; 4 - аналого-цифровий перетворювач (АЦП); 5 - комп'ютер (ЕОМ); 6 - перестальтичні насоси; 7 - набір робочих розчинів; 8 - рідинний термостат.

2.2. Тестування холінолітичної активності і фізіологічних механізмів дії сполук-ефекторів мускаринових холінорецепторів

Попередній скринінг речовин на холінолітичну активність здійснювали, реєструючи скорочувальну реакцію ГМП на аплікування ацетилхоліну (10^{-5} М) за попередньої 10-хвилинної інкубації ГМП з тестованою сполукою у концентрації 10^{-4} М). Для подальших експериментів відбирали речовини, які спричиняли пригнічення ацетилхолінових скорочень більше, ніж на 25 % порівняно з контролем. У випадку первинного скринінгу оптимізованих сполук, за аналогічних умов експерименту відбирали речовини, які пригнічували амплітуду ацетилхолінових скорочень на понад 50 % щодо контролю.

Для обраних речовин визначали параметр IC_{50} – концентрацію речовини, за якої спостерігалось зниження амплітуди ацетилхолінових скорочень вдвічі щодо контролю. Для цього реєстрували ацетилхолін-індуковані (10^{-4} М) скорочення на тлі попередньої інкубації ГМП зі зростаючою концентрацією тестованої сполуки 10^{-10} – 10^{-5} М).

Для встановлення характеру антагонізму тестованої сполуки щодо мускаринових холінорецепторами були зареєстровані криві «концентрація агоніста-ефект» ацетилхолін-індукованих (10^{-10} – 10^{-3} М) скорочень на тлі трьох концентрацій сполуки. Надалі для перевірки конкурентного механізму пригнічення ацетилхолінових скорочень та встановлення величини афінності сполуки використовували рівняння регресії Шілда. Відповідно до методу Шілда антагоніст-індукований паралельний зсув кривих «концентрація агоніста-ефект» визначали як співвідношення еквіефективних концентрацій (CR) агоніста в контролі та за присутності антагоніста. З графіків Шілда визначали афінність антагоніста (pK_B) та тангенс кута нахилу [53;54]. У випадку конкурентного антагоніста тангенс кута нахилу має статистично не відрізнятися від одиниці. Конкурентний антагоніст оборотно зв'язується з тим же рецептором, що і агоніст. Крива «концентрація агоніста- ефект», зареєстрована за присутності фіксованої концентрації антагоніста, буде зміщуватись вправо з такою ж максимальною відповіддю (або тенденціями до неї) і загалом такою ж формою.

Для дослідження фізіологічних механізмів дії тестованих речовин на ГМП використовували відомі речовини (Табл. 2.1.)

Таблиця 2.2 Перелік речовин, які використовувались у дослідженнях

Речовина, виробництво	Тип речовини	Концентрації
Ацетилхолін, Sigma	агоніст ацетилхолінових рецепторів	$10^{-10} - 10^{-3}$ М
Нікотин, Sigma	агоніст нікотинових ацетилхолінових рецепторів	10^{-7} і 10^{-3} М
Іпратропію бромід, Sigma	антагоніст ацетилхолінових мускаринових рецепторів	$10^{-10} - 10^{-5}$ М
Цевімелін, Sigma	агоніст ацетилхолінових мускаринових рецепторів M_3 -підтипу	10^{-4} М
4-DAMP, Sigma	антагоніст ацетилхолінових мускаринових рецепторів M_3 -підтипу	$10^{-10} - 10^{-5}$ М
Атропін, ПрАТ «Дарниця», м. Київ	антагоніст ацетилхолінових мускаринових рецепторів	$10^{-10} - 10^{-9}$ М
AF-DX 116, Sigma	антагоніст ацетилхолінових мускаринових рецепторів M_2 -підтипу	10^{-4} М
Тапсигаргін, Sigma	блокатор Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулуму	1 мкМ
Кофеїн, Sigma	агоніст ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів	20 мМ
Адреналін, Sigma	агоніст адренорецепторів	10^{-6} М
Фентоламін, Sigma	антагоніст α -адренорецепторів	10^{-6} М
Норадреналін, Sigma	агоніст адренорецепторів	10^{-6} М
Пропранолол, Sigma	антагоніст β -адренорецепторів	$5 \cdot 10^{-6}$ М
Ізопротеренол, Sigma	агоніст β -адренорецепторів	10^{-7} М
Метопролол, Sigma	антагоніст β_2 -адренорецепторів	$5 \cdot 10^{-6}$ М
Сальбутамол, Sigma	агоніст β_2 -адренорецепторів	10^{-6} М
2-АРВ, Sigma	агоніст IP_3 -рецепторів	10^{-4} М
Ніфедипін, Sigma	блокатор потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів	10^{-6} М
U-73122, Sigma	інгібітор фосфоліпази С	10^{-6} М
Bay K 8644	Активатор потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів	10^{-6} М

2.3. Кінетичний аналіз скорочувальної активності гладеньких м'язів

У дослідженнях механокінетики процесів скорочення-розслаблення ГМП з метою перевірки можливих неспецифічних щодо мускаринових холінорецепторів мішеней було використано модифікований метод Костеріна С.О. та Бурдиги Ф.В., яким аналізувалися закономірності процесів скорочення-розслаблення окремо на рівні фаз скорочення та розслаблення повної механокінетичної кривої [55].

Окремо фази скорочення і розслаблення лінеаризували у координатах $\left\{ \ln\left(\frac{f_m - f}{f}\right); \ln t \right\}$, та з лінеаризованих кривих визначали параметри: τ та n , які надалі використовували для розрахунку нормованих максимальних швидкостей:

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

2.4. Статистичний аналіз

Дані експериментів аналізували із використанням програми OriginPro2018. Перевірку вибірок на їх приналежність до нормально розподілених генеральних сукупностей здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Тест Шапіро-Уїлка є тестом нормальності в статистиці частоти. Для визначення достовірних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували парний і непарний t-тест; множинні порівняння здійснювали із використанням однофакторного дисперсійного аналізу. У всіх випадках достовірними вважали результати за умови $p < 0.05$.

Аналіз достовірності апроксимації даних лінійною функцією здійснювали із використанням F-критерію Фішера; у всіх випадках коефіцієнти детермінації (R^2) були не нижчими за 0,95. Результати представлені як середнє арифметичне \pm стандартна похибка середнього ($M \pm SEM$), n – кількість дослідів.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження дії відомих сполук-холінолітиків на скорочення гладеньких м'язів трахеї та шлунку, активовані агоністами мускаринових ацетилхолінових рецепторів

Ацетилхолін — нейромедіатор парасимпатичної автономної нервової системи, що є ключовим у регуляції функціональної активності вісцеральних гладеньких м'язів (ГМ). Клітини ГМ трахеї і шлунку експресують мускаринові холінорецептори M_2 - та M_3 -типів, причому їх співвідношення (близько 4,5:1) характерне для обох цих тканин. Екзогенне аплікування агоніста холінорецепторів нейромедіатора ацетилхоліну до клітин цих ГМ спричиняє складну скорочувальну реакцію, яка складається з початкового транзйєтного фазного компонента, що опосередковується ІГФ-залежним вивільненням іонів Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулулу внаслідок активації M_3 -мускаринових холінорецепторів, та тривалого тонічного компонента, асоційованого з M_2 -холінорецепторами.

Втім, між цими тканинами існує суттєва відмінність, яка обумовлюється особливостями пре- і постсинаптичної експресії рецепторів ацетилхоліну у ділянках парасимпатичної іннервації м'язів. На відміну від тканини ГМ шлунку, у гладеньком'язовій тканині дихальних шляхів застосування антагоністів M_2 -холінорецепторів супроводжується активацією скорочувальної активності та звуженням просвіту бронхіального дерева.

На даному етапі досліджень було досліджено ефекти неселективних (атропін та іпратропію бромід) та селективних (4-DAMP та AF-DX) антагоністів мускаринових ацетилхолінових рецепторів на скорочення, активовані ацетилхоліном та його негідролізабельним аналогом карбахоліном.

Як показано на Рис.3.1 (крива 1), алкалоїд атропін та його хімічний аналог іпратропію бромід спричиняють дозо-залежні пригнічення скорочень

препаратів трахеї щурів, які викликані ацетилхоліном. Надалі кількісне характеризування інгібування антагоністами здійснювали з аналізу кривих «концентрація антагоніста-ефект». Так, холінолітина дія атропіну характеризувались показником IC_{50} на рівні $9,15 \pm 0,38$. Аналог атропіну, непроникний для гемато-енцефалічного бар'єру та з мінімальними системними ефектами, - іпратропію бромід (Рис. 3.1, крива 2) спричиняв інгібування ацетилхолін-індукованих скорочень препаратів трахеї із показниками, які не виявляли статистично значущих відмінностей щодо атропіну: у даному випадку значення IC_{50} складало $9,58 \pm 0,41$ ($p > 0.05$ щодо атропіну, $n=7$).

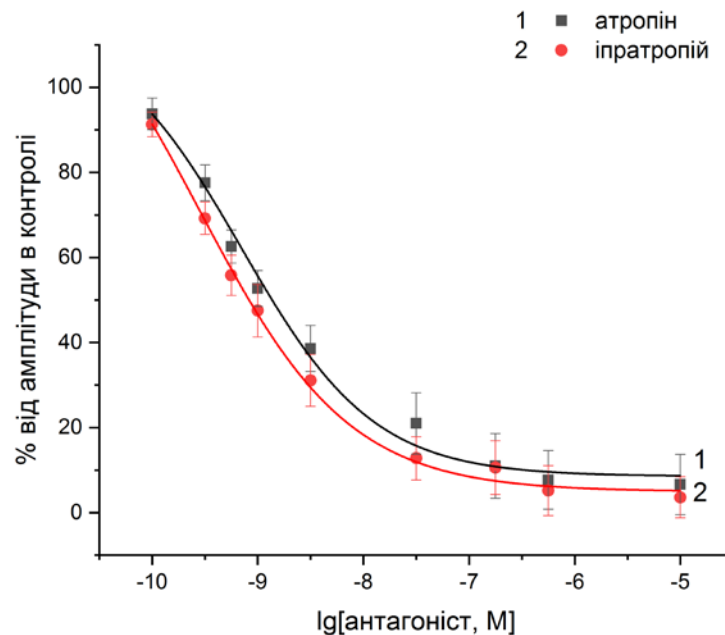


Рис. 3.1. Криві «концентрація антагоніста-ефект» у випадку активації скорочень гладеньком'язових препаратів трахеї щурів ацетилхоліном (10^{-6} M): крива 1 – атропін (10^{-10} - 10^{-5} M) та крива 2 – іпратропію бромід (10^{-10} - 10^{-5} M). Показники амплітуди скорочень за дії антагоністів перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10^{-6} M), прийнятим за 100 %. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=7$.

Дослідження залежностей «концентрація антагоніста-ефект» скорочувальних відповідей трахеї щурів на аплікування карбахоліну (10^{-6} M)

— холіноміметика, що є аналогом нейротрансмітера ацетилхоліну, але не гідролізується ензимом ацетилхолінестеразою, показав, що профіль залежностей істотно не відрізнялися від параметрів кривої за умов скорочень, викликаних ацетилхоліном. Таким чином, за активації скорочень ГМ трахеї в умовах *in vitro* аплікуванням підвищених концентрацій екзогенного ацетилхоліну ефекти холінестерази несуттєві та надалі ними можна нехтувати.

Оскільки регуляція скорочувальної функції ГМ дихальних шляхів здійснюється не лише парасимпатичною, але й симпатичною нервовою системою, тому було здійснено тестування залежностей «концентрація антагоніста мускаринових ацетилхолінових рецепторів-ефект» при активації скорочень ГМП трахеї щурів ацетилхоліном (10^{-6} М) на тлі блокування блокування β_2 -адренорецепторів пропранололом (селективним антагоністом). Встановлено, що показники IC_{50} за дії лише антагоністів мускаринових холіорецепторів та за дії антагоністів мускаринових холіорецепторів на тлі пропранололу достовірно не відрізнялись.

Важливим етапом тестування речовин з літичною активністю є встановлення типу інгібування (конкурентне, неконкурентне, змішане). Тож для відпрацювання протоколу визначення типу інгібування досліджуваних речовин з мускариновими ацетилхоліновими рецепторами були зареєстровані криві скорочення, викликаного агоністами (10^{-10} — 10^{-3} М), на тлі декількох (переважно 3 - 4) концентрацій антагоністів цих рецепторів. Надалі здійснювали перетворення даних скорочень кривих “концентрація агоніста-ефект” відповідно до рівняння регресії Шілда застосовували для дослідження величини афінності сполуки-антагоніста.

Дослідження були проведені із використанням іпратропію броміду; для скоротливої реакції на ГМП в трахеї щурів, активованих ацетилхоліном (Рис. 3.2). Згідно з аналізом графіка регресії Шілда, іпратропію бромід є конкурентним антагоністом мускаринових ацетилхолінових рецепторів. У випадку знаходження лінійного наближення за Шілдом, дані по інгібуванню

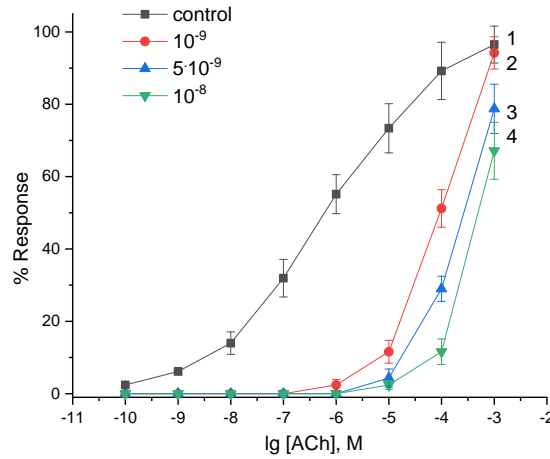
ацетилхолін-індукованих скорочень іпратропієм, то показник кута нахилу лінії становив (0.79 ± 0.07) , коефіцієнт детермінації $R^2 = 0.98$, а величина показника афінності pK_B складала 9.74 ± 0.36 .

Аналогічно, для графіків регресії Шілда за дії атропіну тангенс кута нахилу кривої становив 1.08 ± 0.11 (коефіцієнт детермінації $R^2 = 0.98$), що підтверджує його конкурентний механізм дії. Величина афінності цієї сполуки pK_B дорівнювала 9.57 ± 0.2 , а концентрація, за якої спостерігалось зниження амплітуди ацетилхолінових скорочень вдвічі щодо контролю $IC_{50} = 7,24 \cdot 10^{-10}$ М.

Також нами було досліджено кількісні закономірності пригнічення скорочувальної активності кільцевих ГМ антрального відділу шлунку, індукованої ацетилхоліном за дії іпратропію броміду (Рис. 3.3). Аналізом залежностей “концентрація антагоніста-ефект” встановлено, що величина показника афінності pK_B у випадку ГМ *antrum* складала 10.03 ± 0.48 (тангенс кута нахилу кривої 0.78 ± 0.112 коефіцієнт детермінації $R^2 = 0.98$), що не має достовірних відмінностей щодо відповідного показника, визначеного на препаратах трахеї.

Результати наших досліджень повністю узгоджуються з літературними даними [4-7], що свідчить про адекватність використаних моделей ГМП та дизайну експериментів.

А



Б

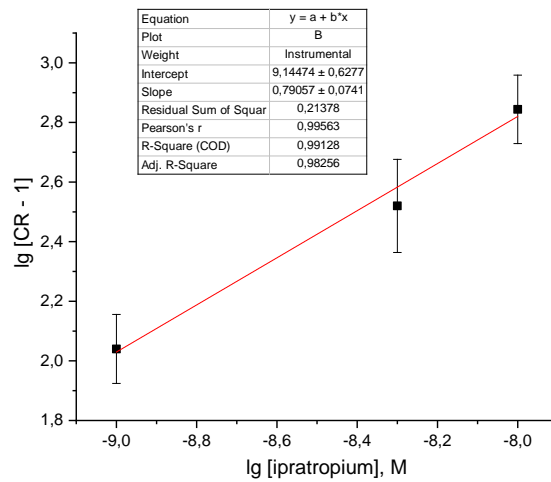


Рис. 3.2. Залежність «концентрація ацетилхоліну-ефект» (10^{-10} — 10^{-3} М) трахеї шурів у випадку дії іпратропію броміду (панель А) в концентраціях 10^{-9} М, $5 \cdot 10^{-9}$ М та 10^{-8} М, відповідно; графік регресії Шілда для іпратропію броміду (панель Б).

Показники амплітуди скорочень за дії іпратропію броміду (на панелі А) перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10^{-4} М), прийнятим за 100 %.

Позначення графіку регресії Шілда (на панелі Б): CR - співвідношення еквіефективних концентрацій ацетилхоліну в контролі та за присутності іпратропію броміду, які спричиняють однакові скорочення (50% від максимального). Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=7$.

Оскільки, не зважаючи на відносне переважання молекул M_2 -холінорецепторів у тканинах вісцеральних ГМ, найбільший внесок у ацетилхолінове скорочення на мають M_3 -холінорецептори, нами було

zareestrowano ta proanalizovano kриві «концентрація ацетилхоліну-ефект» на тлі селективного антагоніста M_3 -холінорецепторів 4-DAMP (Рис. 3.4).

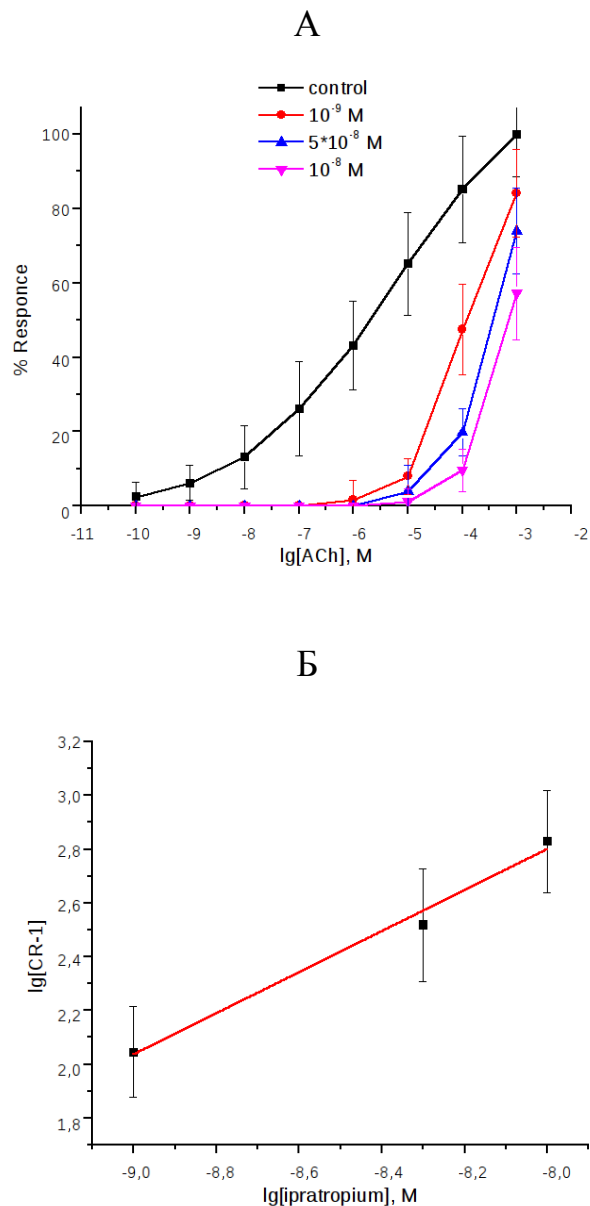


Рис. 3.3. Залежність «концентрація ацетилхоліну-ефект» (10^{-10} — 10^{-3} М) кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку за дії іпратропію броміду (панель А) в концентраціях 10^{-9} М, $5 \cdot 10^{-9}$ М та 10^{-8} М, відповідно; графік регресії Шілда для іпратропію броміду (панель Б).

Показники амплітуди скорочень за дії іпратропію броміду (на панелі А) перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10^{-4} М), прийнятим за 100 %.

Позначення на Б: CR - співвідношення еквіефективних концентрацій ацетилхоліну в контролі та за присутності іпратропію броміду, які спричиняють однакові скорочення (50% від максимального). Дані

представлені як $M \pm SEM$, $n=7$.

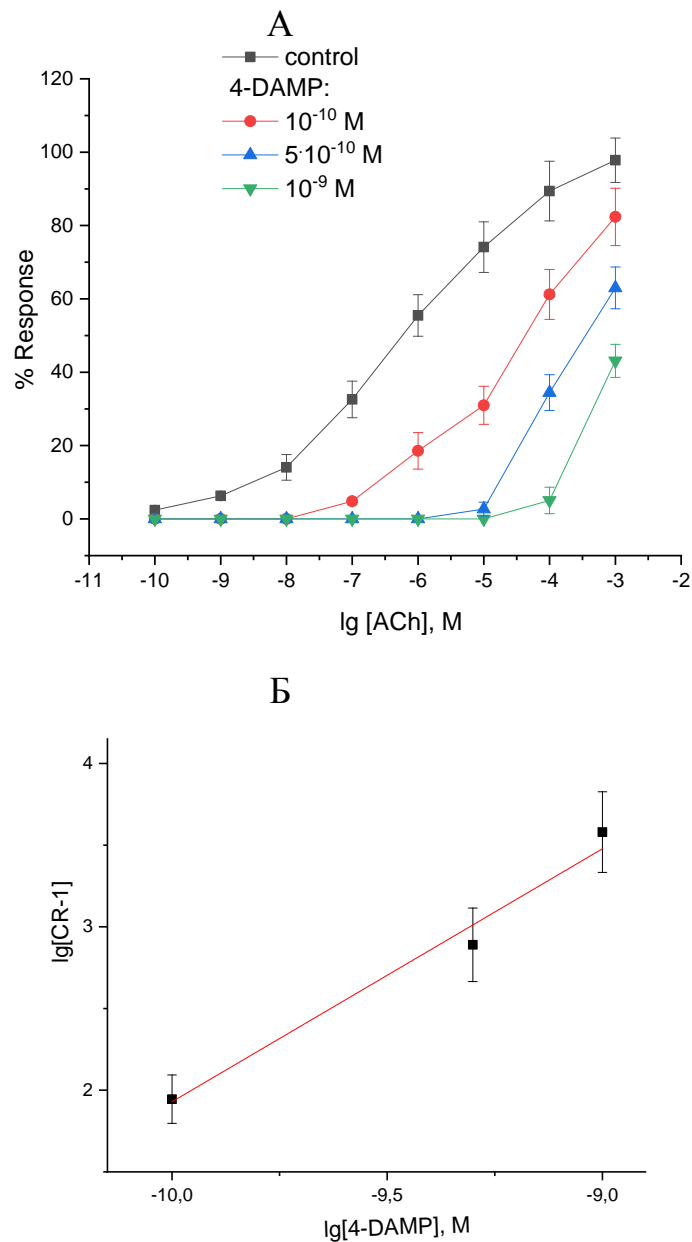


Рис. 3.4. Криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» (10^{-10} — 10^{-3} M) за дії 4-DAMP (панель А) в концентраціях 10^{-9} M, $5 \cdot 10^{-9}$ M та 10^{-8} M, відповідно; графік регресії Шілда для 4-DAMP (панель Б).

Показники амплітуди скорочень за дії 4-DAMP (на панелі А) перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10^{-4} M), прийнятим за 100 %.

Позначення в координатах графіку регресії Шілда (на панелі Б): CR - співвідношення еквіефективних концентрацій ацетилхоліну в контролі та за присутності 4-DAMP, які спричиняють однакові скорочення (50% від максимального). Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=7$.

У таблиці 3.1 систематизовано фармакологічні характеристики антагоністів мускаринових холінорецепторів за їх дії на ацетилхолін-викликані скорочення гладеньких м'язів трахеї та антрального відділу шлунку щурів.

Таблиця 3.1. Кількісні характеристики фармакологічних ефектів антагоністів мускаринових холінорецепторів за їх дії на ацетилхолін-індуковані скорочення гладеньких м'язів трахеї та кільцевого шару антрального відділу (*antrum*) шлунку щурів. Дані подано як $M \pm SEM$, $n=5-7$.

Антагоніст	Гладенько-м'язова тканина	pK_B	IC_{50} , М	Нахил графіка Шілда	Тип антагонізму
іпратропію бромід	трахея	$9,14 \pm 0,62$	$7,24 \cdot 10^{-10}$	$0,79 \pm 0,07$	конкурентний
	<i>antrum</i>	$10,03 \pm 0,48$	$1,43 \cdot 10^{-10}$	$0,78 \pm 0,11$	конкурентний
атропін	трахея	$9,57 \pm 0,2$	$2,97 \cdot 10^{-9}$	$1,08 \pm 0,11$	конкурентний
	<i>antrum</i>	$7,68 \pm 0,25$	$6,52 \cdot 10^{-10}$	$0,93 \pm 0,06$	конкурентний
4-DAMP	трахея	$10,91 \pm 1,71$	$4,43 \cdot 10^{-11}$	$1,55 \pm 0,18$	конкурентний
	<i>antrum</i>	$10,22 \pm 0,97$	$1,63 \cdot 10^{-11}$	$1,06 \pm 0,12$	конкурентний

3.2. Дослідження дії сполук з передбаченою інгібувальною властивістю щодо мускаринових ацетилхолінових рецепторів на гладенькі м'язи трахеї та *antrum* щурів

На наступному етапі досліджень нами проводилася перевірка затності інгібувати ацетилхолін-викликані скорочення ГМП органічними сполуками, для ких було передбачено *in silico* холінолітичну активність. Для цього реєстрували скорочувальну реакцію м'язів трахеї на аплікування ацетилхоліну (10^{-5} М) за попередньої 10-хвилинної інкубації ГМП з

тестованими сполуками (з концентрацією 10^{-4} М). Таким чином, було виявлено ряд сполук, які суттєво пригнічували ацетилхолінові скорочення (Рис. 3.5).

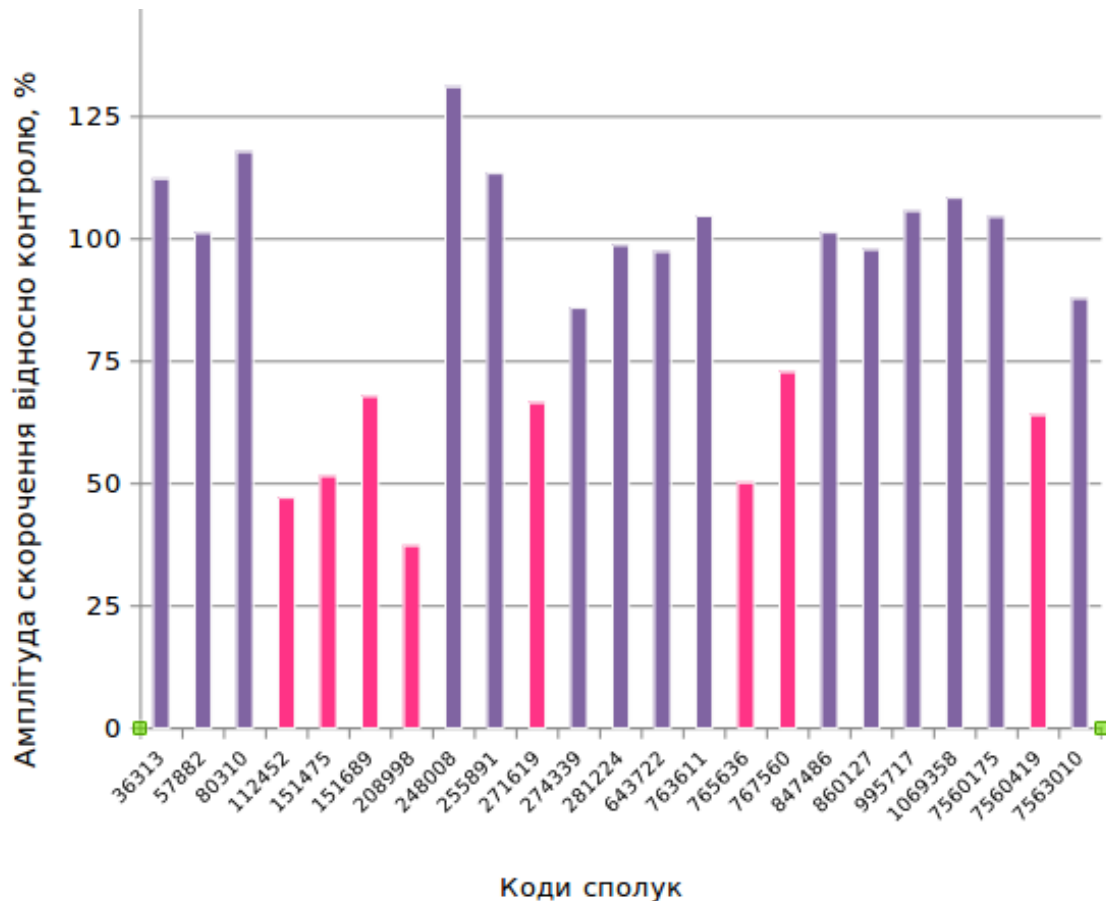


Рис. 3.5. Усереднені значення змін амплітуди ацетилхолін-індукованих (10^{-5} М) скорочень препаратів трахеї щурів сполуками (використано у концентрації 10^{-4} М, час попередньої інкубації 10 хв). За 100 % прийнято контрольні значення.

Також перевірені сполуки не впливали базальне напруження та на реакції ГМП на аплікацію агоніста нікотинових холінорецепторів нікотину (використана концентрація 10^{-6} М, дані не проілюстровано), що вказує на селективну дію протестованих речовин саме на мускаринові ацетилхолінові рецептори.

У випадку тестування речовин на ГМП антрального відділу шлунку не спостерігалось змін спонтанної скорочувальної активності, що свідчить про

відсутність їх впливу на пейсмейкерні клітини Кахаля. Окремі сполуки вибірково пригнічували фазний компонент ацетилхолінових скорочень *antrum*, що вказує на їх дію саме на M_3 -холінорецептори (Рис. 6).

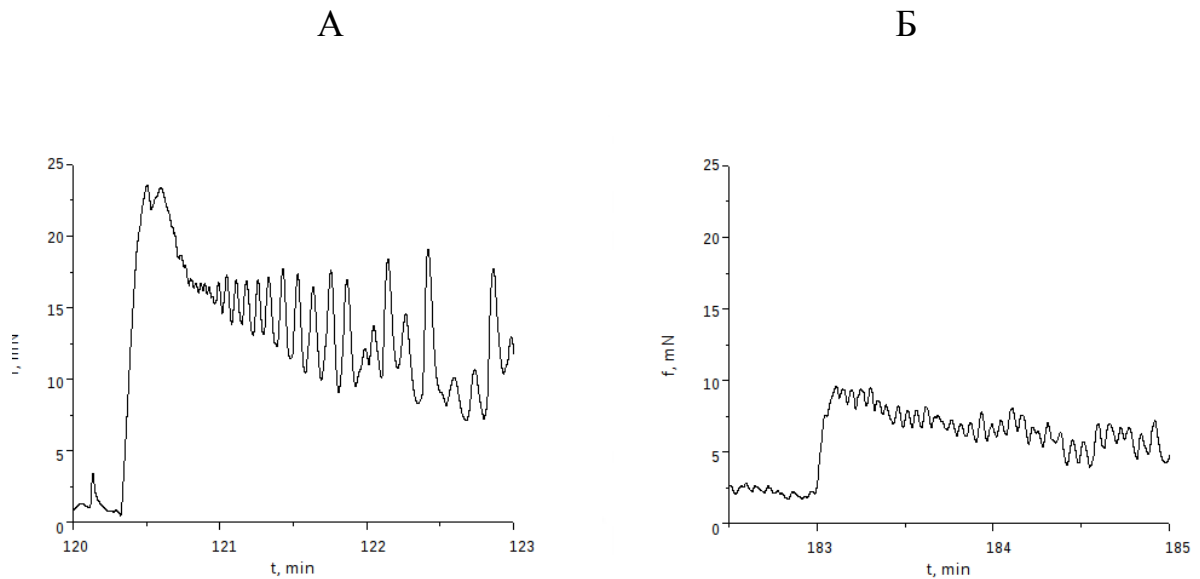


Рис. 3.6. Ацетилхолін-викликані (10^{-5} М) скорочення кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів у контролі (А) та за попередньої інкубації з 10^{-4} М сполуки **112452** упродовж 10 хв. Наведено типові механограми.

Оскільки саме інгібування рецепторів M_3 -типу призводить до бронходилатації, на наступному етапі досліджень нами було вивчено здатність обраних сполук (у концентрації 10^{-6} М, тривалість попередньої інкубації 10 хв) пригнічувати скорочення, викликані селективним агоністом M_3 -холінорецепторів цевімеліну (у концентрації 10^{-4} М). Високі, точніше найбільші властиві дії до інгібування щодо M_3 -холінорецепторів виявлено для сполук з кодами **151689**, **767560** та **112452** (Рис. 3.7, 3.8).

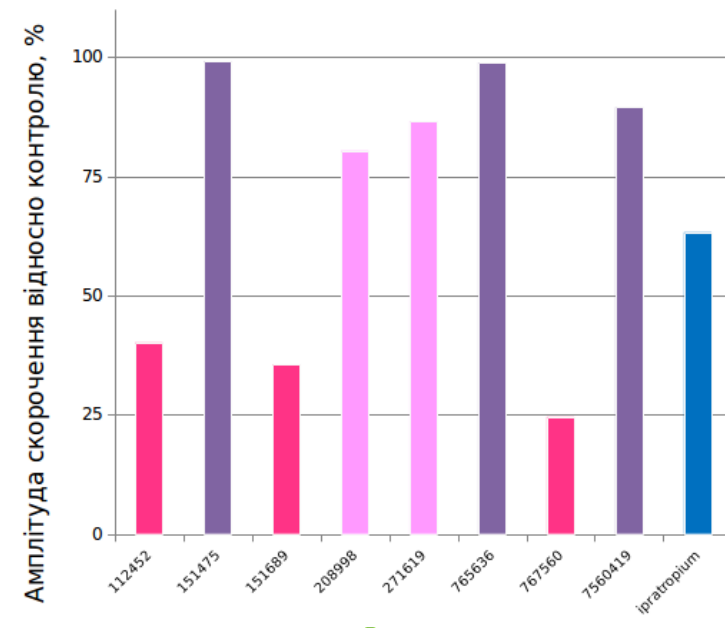


Рис. 3.7. Усреднені показники змін амплітуди цевімелін-індукованих (10^{-4} М) скорочень трахеї щурів сполуками-холінолітиками (фіксована концентрація 10^{-6} М, тривалість передінкубації 10 хв). За 100 % прийнято контрольні значення ($n = 7$).

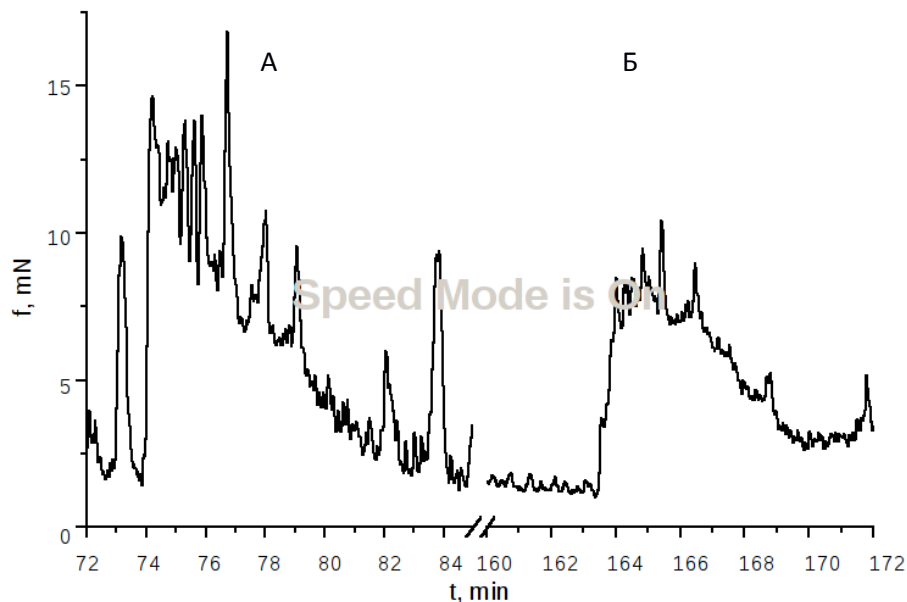


Рис. 3.8. Цевімелін-викликані (10^{-4} М) скорочення кільцевих гладеньких м'язів *antrum* щурів у контролі (А) та за передінкубації з 10^{-4} М сполуки **112452** упродовж 10 хв. Наведено типові механограми.

Надалі модифікований метод Костеріна-Бурдиги було використано для аналізу кінетики процесу скорочення-розслаблення агоніст-індукованих

скорочень. Це досліджувалося для того, щоб перевірити чи є додаткові клітинні мішені сполук з передбаченою інгібіторною здатністю щодо мускаринових холінорецепторів (та у порівняльному аспекті — іпратропію броміду) [3]. Даний метод включає в себе розрахунок максимальних швидкостей фаз скорочення (V_{nc}) та розслаблення (V_{nr}), нормованих на амплітуду. При цьому фази скорочення та розслаблення добре лінеаризувалась в координатах $\{\ln[(f_{max} - f)/f]; \ln t\}$ ($R^2 = 0,96 - 0,99$), а параметри V_{nc} і V_{nr} у контролі відповідно становили 0.404 хв^{-1} та 0.154 хв^{-1} . Мається на увазі фази зростання та зниження м'язового напруження у випадку скорочень препаратів трахеї, які є активовані аплікуванням цевімеліну (10^{-4} M).

Важливо, що за допомогою механікокінетичного аналізу не було виявлено речовин, що змінювали б кінетичні властивості цевімелін-активованих скорочень порівняно з контролем, тож ймовірно, ключовими рецепторами, на які діють досліджені сполуки, є M_3 -холінорецептори міоцитів (Табл. 3.2).

Таблиця 3.2. Кількісні характеристики механокінетичних ефектів холінолітиків за їх дії на цевімелін-індуковані скорочення гладеньких м'язів трахеї щурів. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=5-7$.

Антагоніст	Нормована максимальна швидкість фази скорочення $V_{nc}, \text{ хв}^{-1}$	Нормована максимальна швидкість фази розслаблення $V_{nr}, \text{ хв}^{-1}$
-	$0,404 \pm 0,029$	$0,154 \pm 0,007$
іпратропію бромід	$0,377 \pm 0,033$	$0,173 \pm 0,013$
112452	$0,427 \pm 0,026$	$0,152 \pm 0,008$
151475	$0,361 \pm 0,018$	$0,176 \pm 0,013$
151689	$0,476 \pm 0,032$	$0,150 \pm 0,007$

208998	$0,446 \pm 0,026$	$0,135 \pm 0,010$
---------------	-------------------	-------------------

В подальшому дослідженні отримували та аналізували криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» при дії певних сполук, які були обрані вище. Також визначили та отримали тип інгібування, показники афінності та IC_{50} (Табл. 3.3).

Таблиця 3.3. Фармакологічні характеристики сполук-холінолітиків за їх дії на гладенькі м'язи трахеї щурів. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=7$.

Антагоніст	pK_B	IC_{50}, М	Нахил графіка Шілда	Механізм антагонізму
іпратропію бромід	$9,14 \pm 0,62$	$7,24 \cdot 10^{-10}$	$0,79 \pm 0,07$	конкурентний
112452	$6,79 \pm 0,26$	$1,62 \cdot 10^{-7}$	$0,81 \pm 0,05$	конкурентний
151475	$7,61 \pm 0,91$	$2,45 \cdot 10^{-8}$	$1,04 \pm 0,15$	конкурентний
151689	$6,33 \pm 0,80$	$4,68 \cdot 10^{-7}$	$0,86 \pm 0,13$	конкурентний
208998	$7,68 \pm 0,25$	$2,09 \cdot 10^{-8}$	$0,99 \pm 0,04$	конкурентний

Якщо порівняти відому сполуку — активну речовину лікарських препаратів для терапії бронхіальної астми і ХОЗЛ — іпратропію бромід та сполуки, яким ми дали характеристику (**112452**, **151475**, **151689**, **208998**), прийдемо до висновку, що всі дані речовини є конкурентними антагоністами, але порівняно з іпратропієм мали меншу афінність і характеризувались вищими значеннями IC_{50} , тож перебували доопрацювання.

Втім, важливо відзначити, що сполуки відповідних кодувань **151475** та **112452** в тих же концентраціях значно ефективніше інгібували передачу сигналів через M_3 -холінорецептори, ніж іпратропію бромід (Рис. 3.7). Також нами було встановлено, що зазначені сполуки не мають значного впливу впливають на нікотинові холінорецептори і адренорецептори дихальних

шляхів щурів і мурчаків. Також із використанням інгібітора фосфоліпази С (U-73122) та блокаторів інозитол-1,4,5-трифосфат-чутливих (2-APB) і ріанодин-чутливих (кофеїну) Ca^{2+} -каналів саркоплазматичного ретикулуму наведено, що вищезазначені речовини діють на внутрішньоклітинний каскад передавання сигналу через мускаринові холінорецептори M_3 -типу.

Тож речовини з кодами **151475** та **112452** достатньо ефективно та за тих же концентрацій достеменно суттєвіше пригнічують проведення сигналу саме через M_3 -холінорецептори у порівнянні з іпратропієм бромідом, при цьому не маючи значного впливу на M_2 -холінорецептори. Цьому доказ є те, що середні значення IC_{50} для сполуки з кодом **151475** становить $45 \cdot 10^{-8}$ М та для сполуки **112452** це $1,62 \cdot 10^{-7}$ М. Тому є всі підстави вважати, що дані речовини є перспективними попередниками холінолітичних препаратів нового покоління, які спрямовані своєю на M_3 -холінорецептори.

3.3. Біологічне тестування оптимізованих сполук з покращеними холінолітичною активністю і біодоступністю: дослідження фармакологічних і фізіологічних ефектів

Продовжуючи дослідження, на даному етапі проведено біотестування сполук-антагоністів, попередньо оптимізованих щодо покращеної активності стосовно мускаринових ацетилхолінових рецепторів, а також і підвищеною біодоступністю. За допомогою попереднього скринінгу *in silico*, було вибрано 25 органічних сполук, які мали передбачені покращені холінолітичні особливості. Надалі використовували фармакологічне тестування на мультіклітинних ГМП кілець трахеї, а також кільцевих ГМ антрального відділу шлунку щурів. На першому етапі тестували реакцію препаратів трахеї на аплікування ацетилхоліну (10^{-4} М) при умові, що попередня 10-ти хвилинна дія на препарати була за рахунок тестованих сполук, які мали концентрацію 10^{-4} М. За рахунок цих експериментів, було виявлено три

органічні речовини, які здатні пригнічувати ацетилхолінові скорочення понад 50%, їх шифри: **249682**, **154350** та **151685** (Рис. 3.9).

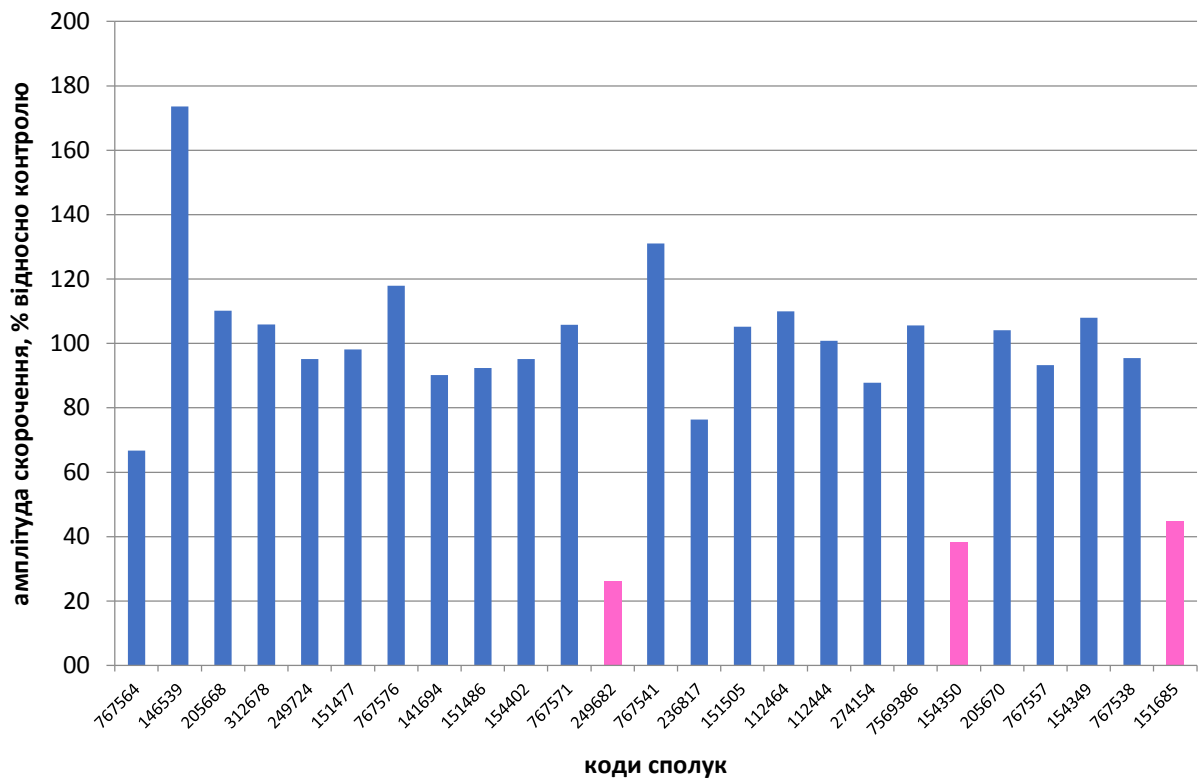


Рис. 3.9. Усереднені значення амплітуди ацетилхолін-індукованих (10^{-5} М) скорочень препаратів трахеї щурів сполуками з передбаченою холінолітичною активністю (використано у концентрації 10^{-4} М, час попередньої інкубації 10 хв). За 100 % прийнято контрольні значення ($n = 6$).

Цікаво, що сполуки з кодами **146539** та **767541** викликали достовірне зростання амплітуди ацетилхолінових скорочень, причому подібні ефекти спостерігались на препаратах кільцевих ГМ антрального відділу шлунку щурів. Тож ці сполуки фактично є холіноміметиками. Можемо передбачити механізм зазначених ефектів. З літератури та досліджень відомо, що у гладеньких м'язах дихальних шляхів експресуються мускаринові ацетилхолінові рецептори підтипів M_2 та M_3 у пропорціях (близько 80%:20%), що подібні до тканини м'язів шлунку, результати підтверджують нашу гіпотезу про те, що сполуки 156539 та 767541 є холіноміметиками [8, 9]. Тому ці сполуки можуть бути надалі використані при розробці активаторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів, в тому числі для

лікування патологій, пов'язаних із недостатньою скоротливою активністю вісцеральних гладеньких м'язів, до прикладу, гастропарезів [10, 11, 12].

Для наступних експериментів було обрано речовини з кодами **249682**, **154350** і **151685**; надалі реєстрували і аналізували викликані аплікуванням ацетилхоліну скорочення ГМ трахеї, за умови попередньої інкубації м'язових препаратів за дії на них вибраних сполук-антагоністів мускаринових ацетилхолінових рецепторів (коди даних сполук **249682**, **154350** і **151685**; при всіх експериментах сполуки використовували з концентрацією 10^{-4} М) разом з попередньою інкубацією препаратів трахеї щурів з відомим антагоністом холінорецепторів іпратропієм (концентрація 10^{-6} М, 10-ти хвилинна передінкубація). У висновку можна зазначити, що дані сполуки діють саме на мускаринові холінорецептори, так як ці речовини не впливають на базальне напруження і скорочувальну реакцію ГМП на тлі попереднього внесення іпратропію броміду (дані не проілюстровано).

Також речовини з кодами **249682**, **154350** і **151685** не мали впливу на реакції з боку гладеньком'язових препаратів на аплікацію агоніста нікотинових холінорецепторів нікотину (концентрація, що використовувалася була 10^{-6} М, дані не проілюстровано). Це дає можливість припустити, що це селективна дія протестованих сполук саме на мускаринові ацетилхолінові рецептори.

Обрані нами для подальшого фармакологічного аналізу сполуки (це речовини з шифрами **249682**, **154350** і **151685**, які в наступному етапі експериментів використовувалися з концентрацією 10^{-6} М та за умови 15-ти хвилинної попередньої інкубації з кожною тестованою сполукою), пригнічували скорочення ГМП трахеї, які були активовані селективним агоністом M_3 -холінорецепторів цевімеліном (при сталій концентрації 10^{-4} М) (Рис. 3.10).

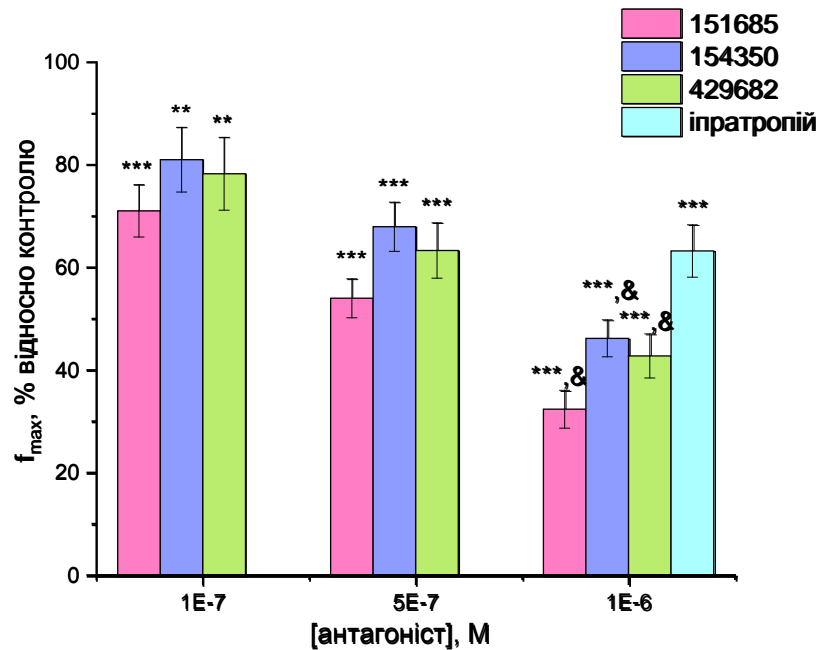


Рис. 3.10. Ефекти сполук-холінолітиків **151685**, **154350**, **429682** та **іпратропію броміду** (концентрації 10^{-7} М, $5 \cdot 10^{-6}$ М та 10^{-6} М, тривалість попередньої інкубації 10 хв) щодо фазних цевімелін-викликаних (10^{-4} М) скорочень гладеньком'язових препаратів трахеї щурів. Дані наведено як $M \pm SEM$. За 100 % прийнято скорочення у контрольні ($n = 7$).
 *** - $p < 0,001$, ** - $p < 0,01$ – достовірно порівняно з контролем; & - $p < 0,01$ - достовірно порівняно з іпратропієм бромідом.

Сполука з кодом **151685**, як встановили експерименти, є найбільш ефективною. Речовина **151685** найкраща по ефективності, бо, за концентрації 1 мкМ у омиваючому ГМП, амплітуда цевімелін-викликаного скорочення мала середнє значення 32,3% відносно контролю. Хоча, треба підкреслити, що всі обрані речовини, а саме з кодами **249682**, **154350** та **151685**, за концентрації 1 мкМ були більш ефективними порівняно з іпратропієм бромідом (Рис. 3.10).

Продовжуючи дослідження далі, на у наступній серії експериментів нами було показано, що 4-DAMP (селективний антагоніст M_3 -холінорецепторів) більш суттєво, порівняно зі сполуками **249682**, **154350** та **151685**, пригнічує цевімелін-викликані скорочення. 4-DAMP застосовувався за концентрацій 10^{-10} М, $5 \cdot 10^{-10}$ М та 10^{-9} М, при часі попередньої інкубації 30 хв (Рис. 3.11). У порівнянні обраної найефективнішої сполуки **151685** та 4-

DAMP, останній спричиняв аналогічне інгібування (приблизно 2/3 відносно контролю) при концентрації $5 \cdot 10^{-10}$ М, тоді як тестована речовина спричиняла аналогічний ефект за присутності в омиваючому розчині 10^{-6} М.

Рис. 3.11. Ефекти селективного антагоністу M_3 -холінорецепторів 4-DAMP (концентрації 10^{-10} М, $5 \cdot 10^{-10}$ М та 10^{-9} М, тривалість попередньої інкубації 10 хв) щодо фазних цевімелін-викликаних (10^{-4} М) скорочень гладеньком'язових препаратів трахеї щурів. Зміни амплітуди цевімелін-індукованих (10^{-4} М) скорочень препаратів трахеї щурів. Дані наведено як $M \pm SEM$. За 100 % прийнято скорочення у контролі ($n = 6$).

Надалі були проведені численні експерименти з метою вивчення можливих додаткових клітинних мішеней речовин, у яких передбачалися інгібіторні властивості до мускаринових холінорецепторів, коди даних сполук **249682**, **154350** та **151685**. Для даних речовин, а також відомого неселективного холінолітика іпратропію броміду досліджено та проаналізовано кінетику процесу скорочення-розслаблення цевімелін-активованих скорочень з допомогою модифікованого методу Костеріна-Бурдиги [3]. За цим методом використовували розрахунок нормованих на амплітуду максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення (V_{nc} та V_{nr} відповідно). Оскільки обрані речовини не змінювали кінетичних

властивостей цівімелін-викликаних скорочень (Рис. 3.12), це вказує на відсутність значного впливу на інші системи клітин, які беруть участь у процесі скорочення-розслаблення, індукованого активацією M_3 -холінорецепторів.

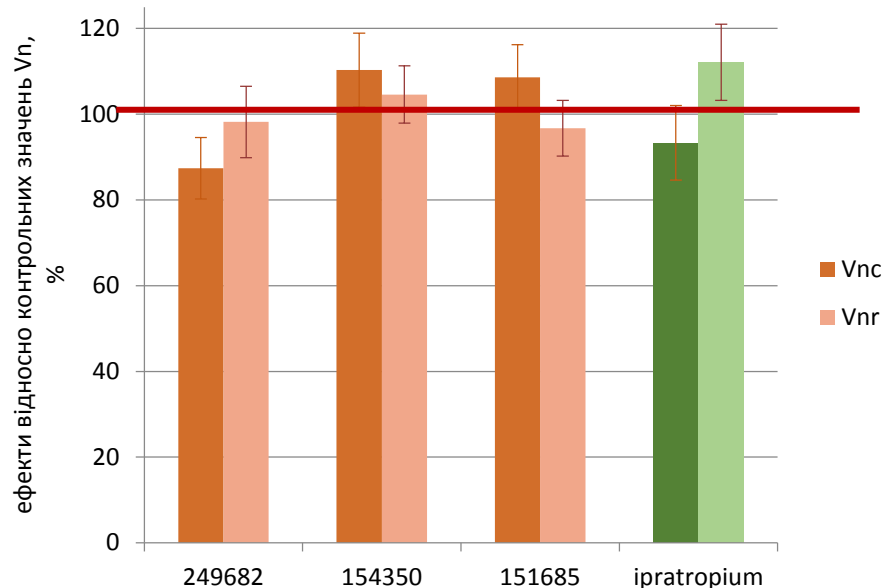


Рис. 3.12. Нормовані максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення (відповідно V_{nc} і V_{nr}) цевімелін-викликаних (10^{-4} M) скорочень трахеї щурів за присутності в омиваючому розчині холінолітиків **249682**, **154350**, **151685** та **іпратропію броміду** (використано 10^{-6} M, тривалість передінкубації 10 хв). Дані наведено як $M \pm SEM$. За 100 % прийнято скорочення у контролі ($n = 7$).

Нам було важливо перевірити вплив на реакції базального напруження. Тому під час наступних експериментів з використанням речовин з кодами **249682**, **154350** та **151685** (за концентрацій $5 \cdot 10^{-7}$ M та з часом попередньої інкубації 15-ть хвилин), було доведено, що реакції базального напруження суттєвого впливу не мають, крім того, експерименти показали, що модуляції скорочувальної активності, котрі опосередковані через адренорецептори дихальних шляхів (графіки даних не наведено) та нікотиніві холінорецептори також суттєвого впливу не мають.

Нами було досліджено, що ефекти речовин з шифром **249682**, **154350** та **151685** ($5 \cdot 10^{-7}$ М, з попередньою 15-ти хвилинної інкубації) з використанням інгібітора фосфоліпази С (U-73122) та блокатора інозитол-1,4,5-трифосфат-чутливих (IP_3) Ca^{2+} -каналів саркоплазматичного ретикулу (2-APB) реалізуються у IP_3 -залежний спосіб. Також важливо зазначити, що скорочення ГМП трахеї і *antrum*, на тлі інгібування фосфоліпази С та блокування IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів, які активували ацетилхоліном, не змінювались у присутності сполук **249682**, **154350** та **151685** (механограми не наведено).

Важливо зазначити, що речовини **249682**, **154350** та **151685** ($5 \cdot 10^{-7}$ М, час попередньої інкубації яких становив 15-ть хвилин) з попередньою інкубацією ГМП трахеї з антагоністом M_3 -холінорецепторів 4-DAMP (10^{-9} М, час попередньої інкубації становив 30 хв) не змінювали ацетилхолін-індуковані (10^{-5} М) скорочувальні реакції, з вище наведеного ми робимо висновок, що дані сполуки – холінолітики, котрі діють на мускаринові холінорецептори M_3 -типу.

В ході наступних експериментів було встановлено, що ацетилхолін-індуковані скорочення (за концентрації ацетилхоліну 10^{-5} М) не зазнають змін за дії речовин **249682** і **154350** ($5 \cdot 10^{-7}$ М, час попередньої інкубації становив 15-ть хвилин) за попереднього блокування mAChRs M_2 -типу AF-DX-116 (10^{-7} М). Але за дії сполуки **151685** (час попередньої інкубації та концентрація – ідентична) на тлі AF-DX-116 можна спостерігати зміни амплітуди ацетилхолін-індукованого (10^{-5} М) скорочення, збільшення котрої становило в середньому 17,4%.

У подальших експериментах досліджували вплив на ацетилхолін-індуковані (10^{-5} М) скорочення кільцевих ГМ *antrum* сполуки **151685** (у концентрації $5 \cdot 10^{-7}$ М, за тривалості передінкубації 15 хв). Адже у даних скороченнях кільцевих ГМ шлунку і кишечника можна виділити 2 яскраво виражені компоненти такі, як – фазний і тонічний. За активації мускаринових холінорецепторів M_3 -підтипу виникає фазне скорочення, яке

фактично реалізується внаслідок виходу Ca^{2+} через IP_3 -чутливі Ca^{2+} -канали саркоплазматичного ретикулуму (СР). Тонічне ж скорочення пов'язане з процесами активації холінорецепторів M_2 -підтипу та, як наслідок, активації неселективних катіонних каналів та Ca^{2+} -каналів плазматичної мембрани [13, 14, 15]. Виявлено (Рис. 3.13), що за дії **151685**, можна спостерігати, що при істотному падінні амплітуди фазного скорочення, мають місце тенденції до зростання тонічної складової.

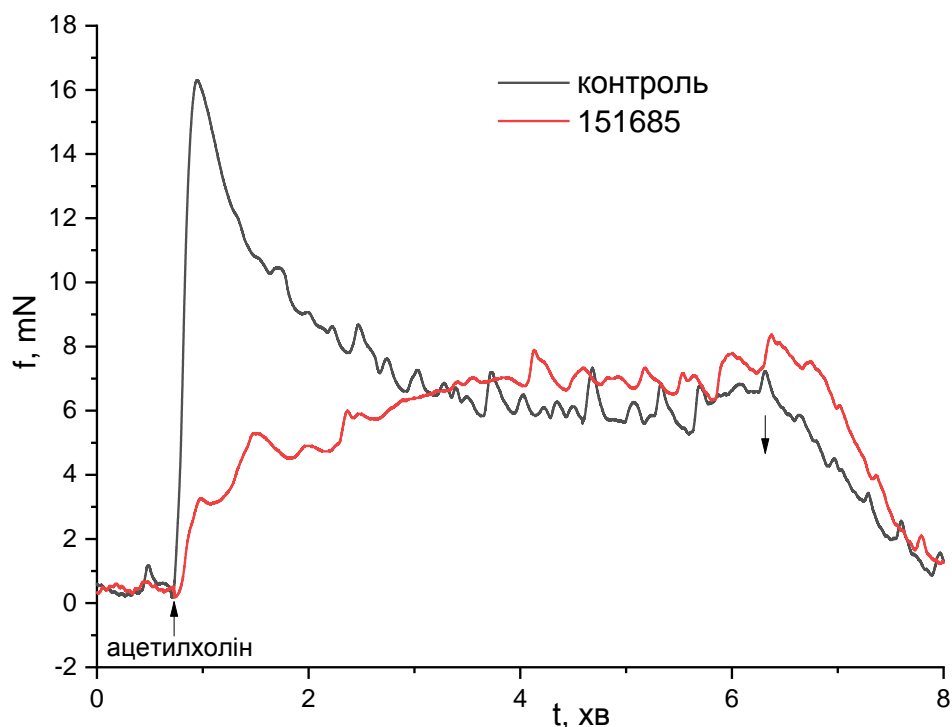


Рис. 3.13. Типові механограми ацетилхолін-викликаних (10^{-5} М) скорочень кільцевих гладеньких м'язів *antrum* у контролі та за дії сполуки **151685** ($5 \cdot 10^{-7}$ М, тривалість передінкубації 15 хв). Стрілками позначено внесення і відмивання ацетилхоліну.

У наступній серії експериментів ми вивчали відновлення фазних компонентів ацетилхолін-індукованих скорочень, а також відмивання препаратів ГМ *antrum* щурів за дії тестованих сполук. Як можна бачити на прикладі речовини **249682** (використано у концентрації $5 \cdot 10^{-7}$ М, тривалість передінкубації 15 хв) (Рис. 3.14), спостерігалось поступове відновлення

амплітуди фазного скорочення (за 40 хв у середньому до 21,5 % щодо контролю).

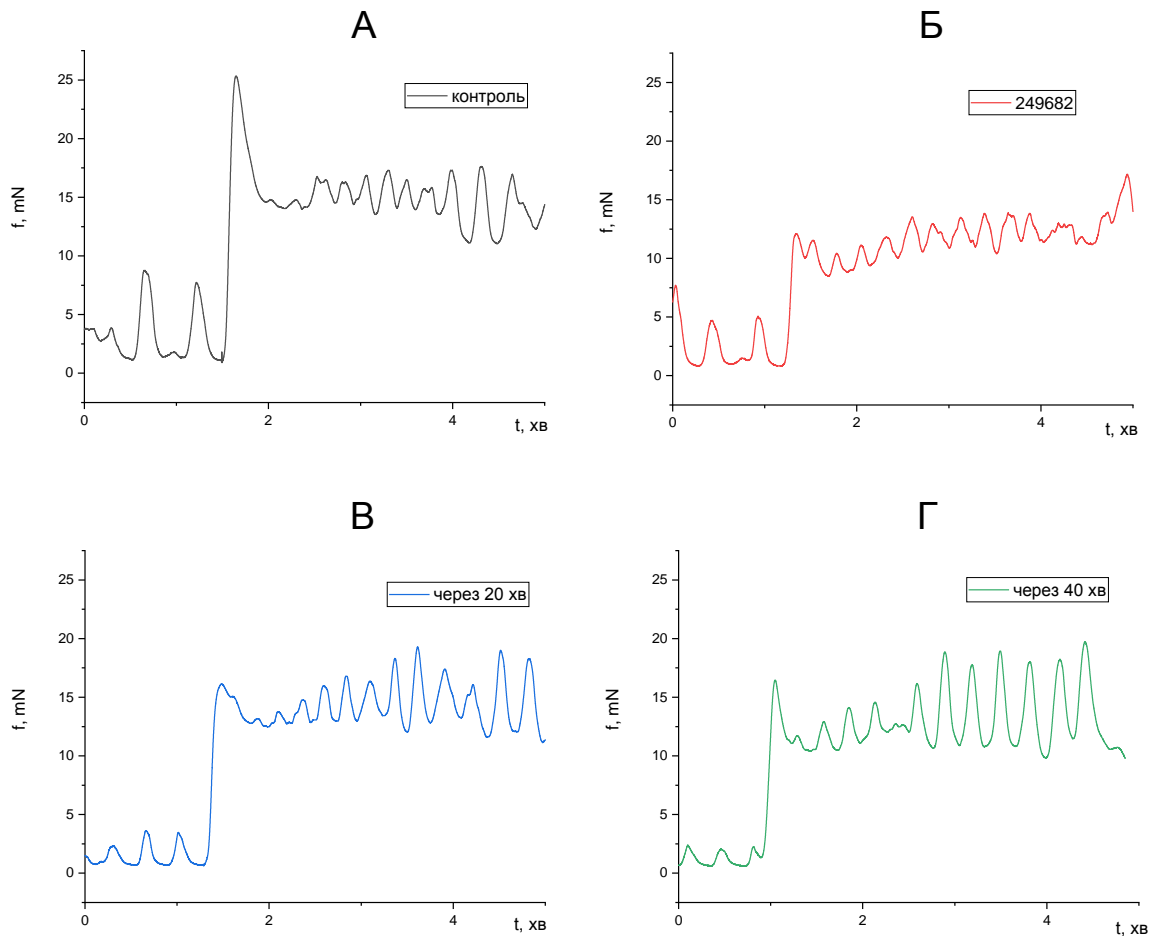


Рис. 3.14. Типові механограми динаміки відновлення ацетилхолін-викликаних (10^{-5} М) скорочень кільцевих гладеньких м'язів *antrum* за дії сполуки **249682** ($5 \cdot 10^{-7}$ М, час передінкубації 15 хв): контрольне скорочення (А), скорочення за передінкубації сполуки **249682** (Б), а також через 20 хв (В) та через 40 хв (Г) припинення дії сполуки **249682**.

У подальшій серії експериментів зареєстровано та проаналізовано криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» для вибраних речовин (у всіх випадках тривалість передінкубації складала 15 хв, а використані концентрації тестованих холінолітиків були 10^{-7} М, $5 \cdot 10^{-7}$ М та 10^{-6} М); при цьому було окреслено та передбачувано тип інгібування, визначено

показники афінності та IC_{50} і зроблено висновки за даними показниками до кожної досліджуваної сполуки (Рис. 3.15-3.17).

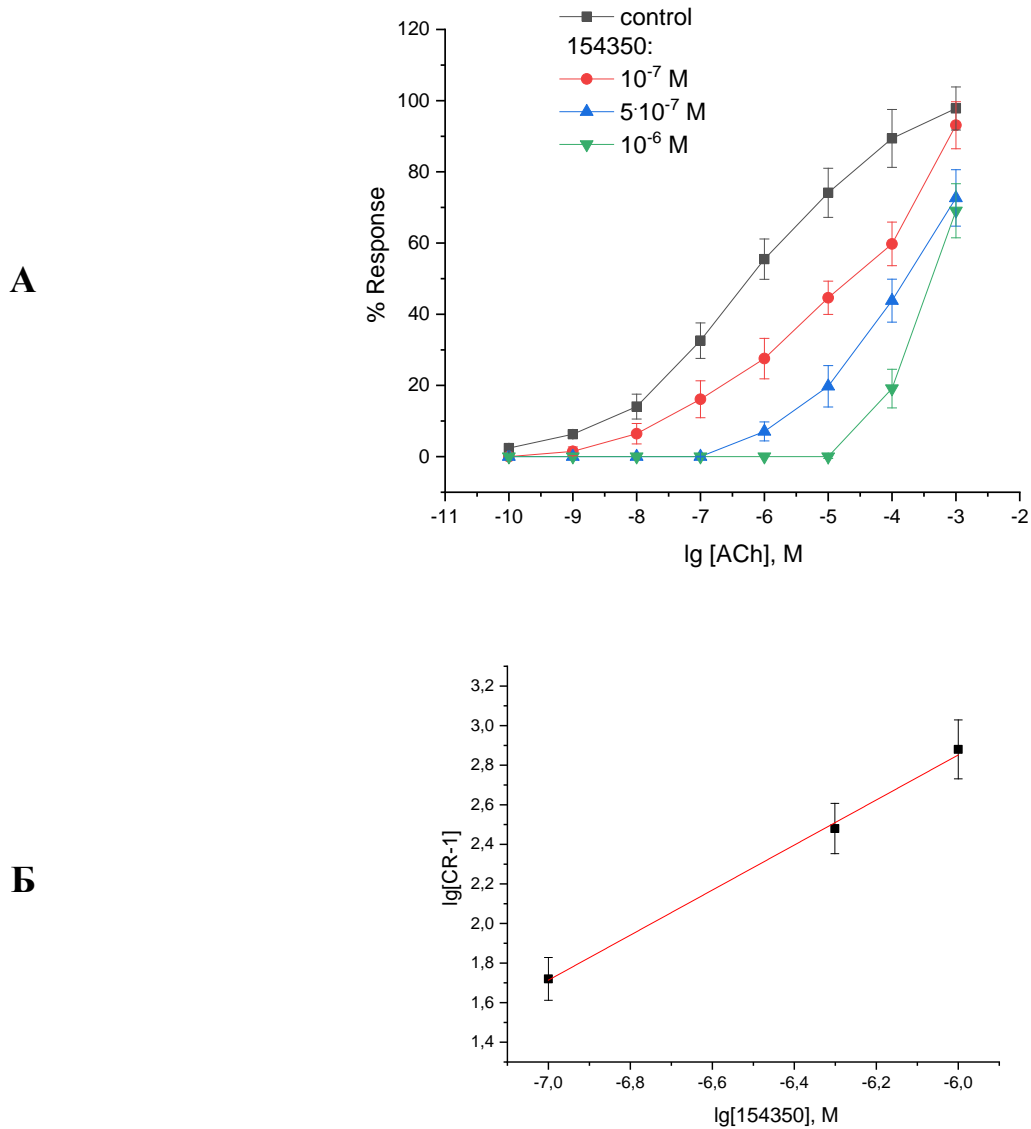


Рис. 3.15. Залежності «концентрація ацетилхоліну-ефект» гладеньких м'язів трахеї за дії речовини **154350** (використано 10^{-7} М, $5 \cdot 10^{-7}$ М і 10^{-6} М, тривалість передінкубації 15 хв). **А** - Показники амплітуди скорочень представлено як % щодо контрольного ацетилхолін-індукованого (10^{-4} М) скорочення. **Б** - Графік регресії Шілда. Дані подано як $M \pm SEM$, $n=7$.

Як видно з рис. 3.15 речовина з кодом **154350** є конкурентним антагоністом, бо при лінеаризації в координатах Шілда показник кута нахилу лінії регресії був в межах $1,15 \pm 0,05$ (коефіцієнт детермінації $R^2 = 0,99$). При цьому велична афінності речовини **154350** pK_B складала $8,96 \pm 0,35$ ($n=7$),

тоді як середнє значення концентрації, яка спричиняла напівмаксимальне інгібування ацетилхолінових скорочень (IC_{50}) було на рівні $3,09 \cdot 10^{-9}$ М.

Аналогічно, холінолітик **249682** (Рис. 3.16), у випадку його 15-ти хвилинної передінкубації при концентраціях 10^{-7} М, $5 \cdot 10^{-7}$ М та 10^{-6} М, характеризувався конкурентним механізмом антагонізму: показник кута нахилу лінії регресії Шілда становив 1.14 ± 0.18 ($R^2 = 0.99$, $n=7$). Величина афінності pK_B становила 9.33 ± 0.84 , а IC_{50} дорівнювала $3,72 \cdot 10^{-9}$ М.

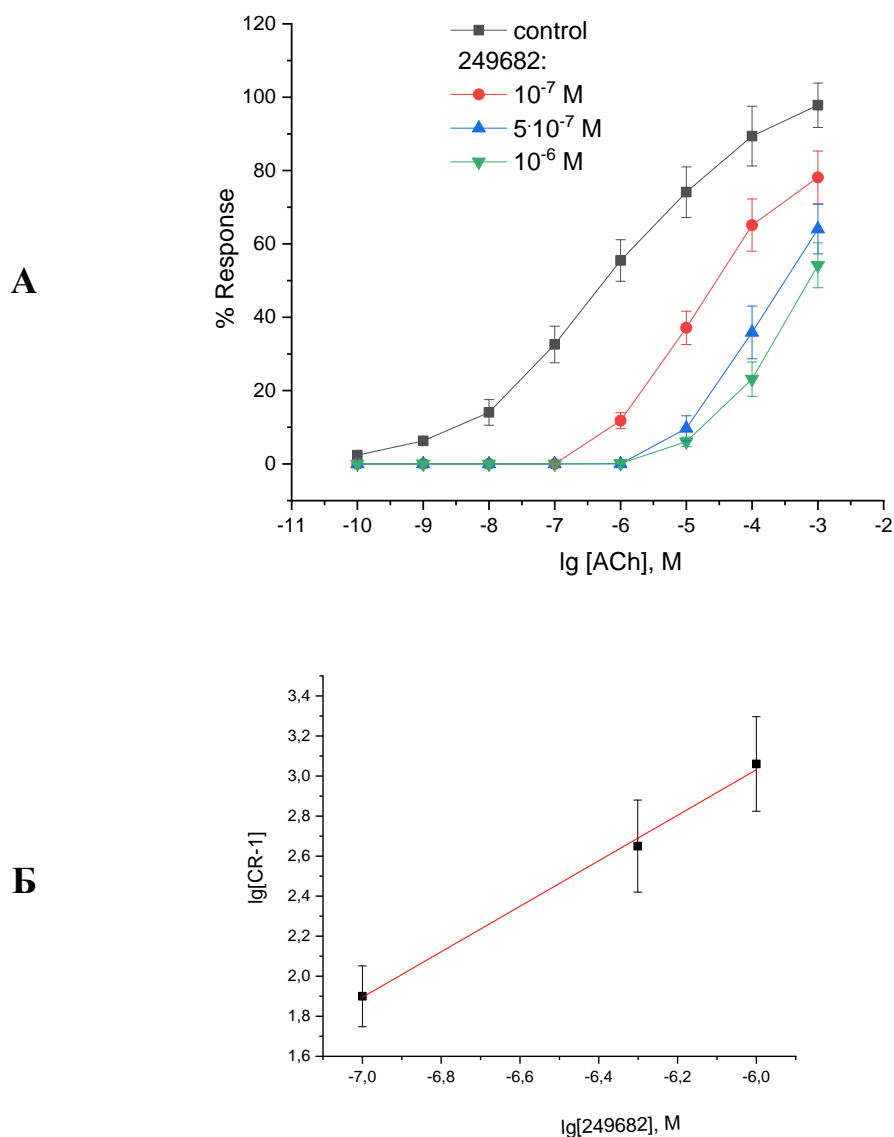


Рис. 3.16. Залежності «концентрація ацетилхоліну-ефект» гладеньких м'язів трахеї за дії речовини **249682** (використано 10^{-7} М, $5 \cdot 10^{-7}$ М і 10^{-6} М, тривалість передінкубації 15 хв). **А** - Показники амплітуди скорочень представлено як % щодо контрольного ацетилхолін-індукованого (10^{-4} М) скорочення. **Б** - Графік регресії Шілда. Дані подано як $M \pm SEM$, $n=7$.

Холінолітик **151685** (концентрації, які ми використали, - 10^{-7} М, $5 \cdot 10^{-7}$ М та 10^{-6} М за умови 15-ти хвилинної передінкубації) проявляв властивість конкурентного антагоніста: показник кута нахилу лінії регресії Шілда рівний 0.73 ± 0.08 ($R^2 = 0.97$) (Рис. 3.17). При цьому величина афінності речовини **151685** pK_B становила $10.02 \pm 0,73$ та $IC_{50} = 3,39 \cdot 10^{-10}$ М.

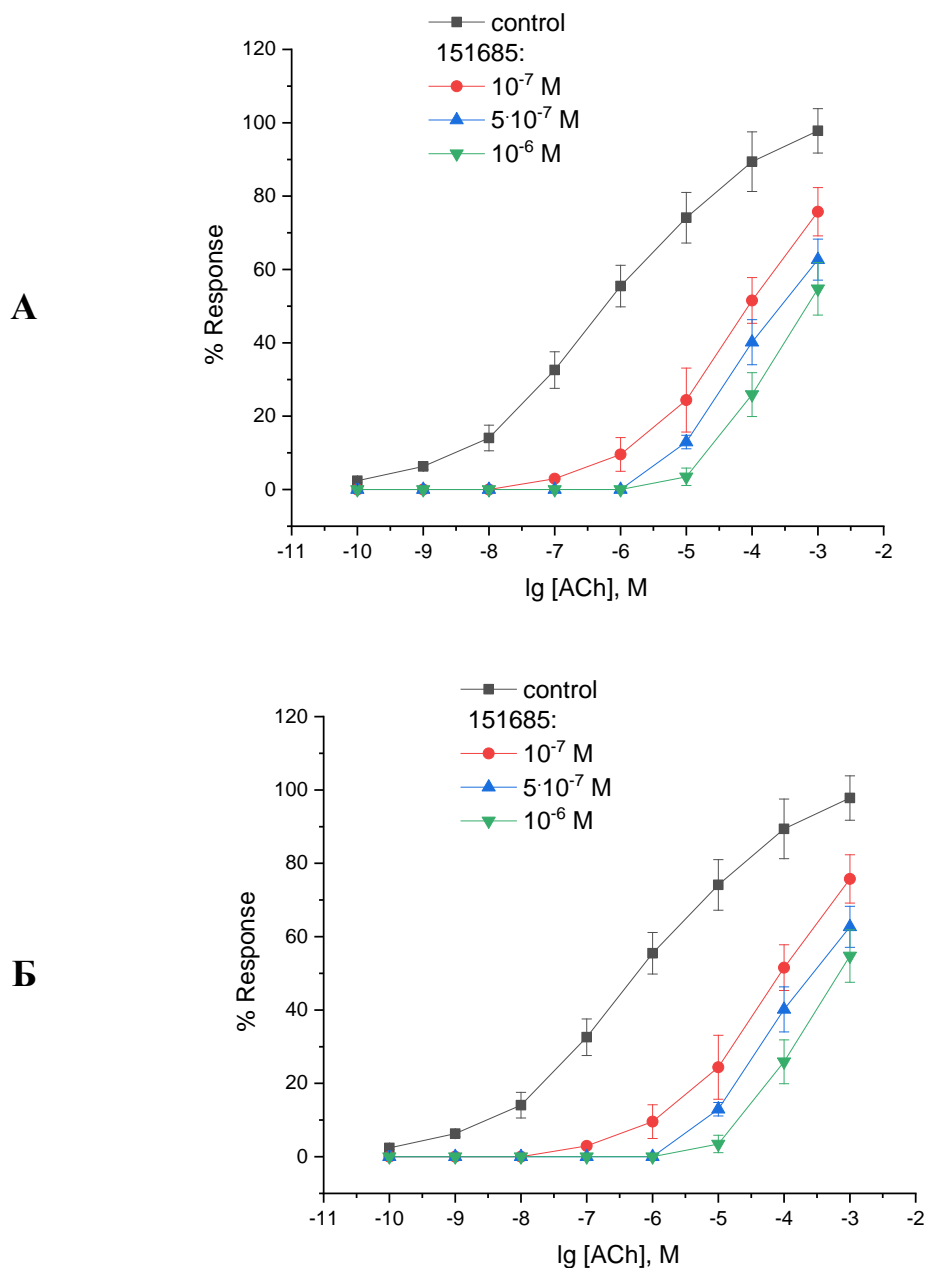


Рис. 3.17. Залежності «концентрація ацетилхоліну-ефект» гладеньких м'язів трахеї за дії речовини **151685** (використано 10^{-7} М, $5 \cdot 10^{-7}$ М і 10^{-6} М, тривалість передінкубації 15 хв). **А** - Показники амплітуди скорочень

представлено як % щодо контрольного ацетилхолін-індукованого (10^{-4} М)скорочення. Б - Графік регресії Шілда. Дані подано як $M \pm SEM$, $n=7$.

Підсумовуючи, з відібраних потенційних холінолітиків, для яких передбачено покращені кількісні параметру антагонізму щодо мускаринових холінорецепторів, нами було виконане біотестування, при цьому було вивчено та досліджено фармакологічні та кінетичні параметри і ефекти даних сполук. Табл. 3.4 має значення фармакоефектів речовин з кодами **154350**, **249682**, **151685** і також іпратропію броміду, що в свою чергу є найбільш використовуваним в Україні для терапії астми і ХОЗЛ; в таблиці наведені характеристики, які визначають здатність інгібувати ацетилхолін-індуковані скорочувальні реакції, зокрема середні значення IC_{50} , що являють собою значення $3,09 \cdot 10^{-9}$ М для сполуки з шифром **154350**, $3,72 \cdot 10^{-9}$ М для **249682** та $3,39 \cdot 10^{-10}$ М – **151685**, при значенні IC_{50} для іпратропію $7,24 \cdot 10^{-10}$ М. Також значущим доводом є те, що в сполуках **154350**, **249682** і **151685**, при однакових концентраціях, точно істотно відбувається пригнічення через M_3 -холінорецептори проведення сигналу, ніж у порівнянні з іпратропієм бромідом, на M_2 -холінорецептори не завдавався значний вплив.

Таблиця 3.4. Узагальнення фармакологічних характеристик сполук-холінолітиків за їх дії на гладенькі м'язи трахеї щурів. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=7$.

Шифр сполуки	pK_B	IC_{50} , М	Нахил графіка Шілда	Механізм антагонізму
154350	8.96 ± 0.35	$3.09 \cdot 10^{-9}$	1.15 ± 0.05	конкурентний
249682	9.33 ± 0.84	$3.72 \cdot 10^{-9}$	1.14 ± 0.18	конкурентний
151685	10.02 ± 0.73	$3.39 \cdot 10^{-10}$	0.73 ± 0.08	конкурентний
іпратропію бромід	9.14 ± 0.62	$7.24 \cdot 10^{-10}$	0.79 ± 0.07	конкурентний

Отже, для сполук з кодами **154350**, **249682** та **151685** є обґрунтовані підстави для рекомендації в продовженні доклінічних випробувань як основи препаратів нового покоління для лікування астми і ХОЗЛ, що мають вибірккову дію на M_3 -холінорецептори.

3.4. Обговорення одержаних результатів

З попередньо аналізованих та загальновідомих фактів маємо, що мускаринові рецептори експресуються в ГМ стінок внутрішніх органів та судин. У більшості випадків популяція мускаринових холінорецепторів у ГМ складається в основному з підтипів M_2 і M_3 у суміші від 80% до 20%, або й більше співвідношення, ніж 4:1. [19-22]. Незважаючи на відносно низькі рівні експресії, мускариновий M_3 -рецептор, пов'язаний з G_q , є основним підтипом, відповідальним за скорочення ГМ бронхіального дерева, а також вісцеральних органів (травного тракту і сечостатевої системи); це видно з функціональної спорідненості різноманітних підтипів селективних антагоністів у тканинах дихальних шляхів різних видів тварин, у тому числі людини. Тим не менш, деякі фармакологічні дослідження припускають невелику роль G_i -зв'язаних M_2 -рецепторів у посередництві скорочення ГМ дихальних шляхів у периферичних дихальних шляхах. [19, 23, 24]. Регуляція тонусу ГМ дихальних шляхів мускариновими рецепторами посилюється при астмі та ХОЗЛ двома основними механізмами: по-перше, посилення експресії та посилення функції сигнальних молекул, необхідних для опосередкованого мускариновим рецептором гладенької мускулатури дихальних шляхів; по-друге, перебільшене вивільнення нейронального ацетилхоліну через нейронні механізми, пов'язані із запаленням [19, 20, 25-27].

Ацетилхолін є парасимпатичним нейромедіатором і аутокринним або паракринним гормоном, який регулює скорочення ГМ дихальних шляхів, вироблення слизу, запалення дихальних шляхів і ремоделювання дихальних шляхів. Зменшення внеску негативного зворотного зв'язку вивільнення

ацетилхоліну з парасимпатичних нейронів за рахунок такого пригнічення M_2 -холінорецепторів, є одним із важливих патофізіологічних механізмів розвитку гіперзбудливості тканин дихальних шляхів при бронхіальній астми і ХОЗЛ. Вивільнення ацетилхоліну та експресія кількох ефекторних систем, центральних у мускариновій регуляції функції дихальних шляхів, посилюються при астмі та ХОЗЛ, що свідчить про те, що вплив ацетилхоліну може суттєво сприяти патофізіології цих обструктивних захворювань дихальних шляхів. Нещодавні клінічні та експериментальні дані підтверджують цю гіпотезу, припускаючи, що антихолінергічні засоби, особливо тіотропію бромід тривалої дії, могли б зменшити ремоделювання дихальних шляхів і зниження функції легенів на додаток до його ефекту як бронходилататора [19, 23, 28, 29].

Погано контрольована астма та заострення, які можна запобігти, створюють значне навантаження на охорону здоров'я, часто вимагаючи додаткових ліків, перебування в лікарні або лікування у відділенні невідкладної допомоги.

Мускаринові антагоністи тривалої дії (LAMA) підтвердили ефективність при хронічній обструктивній хворобі легень і зараз розглядаються як альтернативна додаткова терапія для людей з неконтрольованою астмою. LAMA блокують бронхоконстрикційну дію ацетилхоліну на мускаринові рецептори M_3 , експресовані в ГМ дихальних шляхів; вони мають тривале зв'язування з мускариновими рецепторами M_3 -підтипу з швидшою дисоціацією від мускаринових рецепторів M_2 -підтипу – відповідають даним глобальної ініціативи щодо ХОЗЛ за 2018 рік.

На даний час в Україні найпоширенішим препаратом проти астми і ХОЗЛ є САМА-препарат іпратропія бромід (ipratropium, зазвичай у дозі 0,25-0,5 мг) [30, 31], що в свою чергу не є оптимальною терапією. Але у США та країнах ЄС зазвичай використовують протоколи LAMA. До них входять такі поширені препарати як тіотропій, аклідіній, глікопірроній та умеклідіній, які

використовуються один раз на добу, окрім аклідінію (двічі на день) [20, 29, 33].

За даними мета-аналізу для новітніх препаратів LAMA (аклідінію та глікопірронію) не виявлено достовірних терапевтичних переваг щодо більш раннього тіотропія броміду (єдиного LAMA-препарату терапії ХОЗЛ до 2012 року) [29].

В даний момент частим є використання речовини, що є структурним аналогом іпратропія броміду – тіотропій бромід (функціональний антагоніст рецепторів M_3 -типу), адже хоч він і з'єднується з M_2 -рецепторами, але дисоціює з даних рецепторів з більшою швидкістю, ніж з M_3 -холінорецепторів. Також, якщо порівнювати дані аналоги можна побачити, що тіотропій бромід має час біологічного напіврозпаду з організму вищий, ніж іпратропієм, окрім того в порівнянні бачимо легші системні побічні ефекти та меншу біодоступність (пероральну) у тіотропія броміда [33-35]. При тому, використання даної сполуки скоріше за все буде неефективним, через малу дозу препарату для лікування стабільної астми бронхіальної астми, адже через збільшення дози відбувається підвищення ризику прояву побічних ефектів [19, 36].

На проміжній фазі експерименту ми провели біотестування речовин із інгібіторною активністю мускаринових холінових рецепторів (передбачуваною) у препаратах трахеї щурів та мурах: нами було досліджено їх фармакологічні та кінетичні ефекти та їх параметри. Ми виявили, що коди речовин з шифрами **767560**, **151475** і **112452** середнє значення IC_{50} котрих становило $5,25 \cdot 10^{-8}$ М, $,45 \cdot 10^{-8}$ М та $1,62 \cdot 10^{-7}$ М, відповідно, що свідчить про їх ефективність. Також, важливо зазначити, що при тих же концентраціях що і іпратропію бромід значно пригнічувалась передача сигналів через M_3 -холінові рецептори, в той час як істотного впливу на M_2 -холінові рецептори не було. Тому результати розробки препарату з холінергічної активністю, які ми отримали в ході експерименту на даному етапі є надзвичайно важливими та вселяють надію на подальші дослідження.

Згодом речовини з покращеною інгібіторною активністю mAChR були біологічно перевірені з використанням ГМП трахеї щурів та в окремих експериментах із препаратами антрального відділу шлунку. В результаті було досліджено кінетичні та фармакологічні ефекти та їх параметри. Отриманні результати показують, що речовини **154350**, **249682** та **151685** можуть інгібувати спричинені ацетилхоліном скоротливі реакції, в яких IC_{50} становлять $3,09 \cdot 10^{-9}$ М, $= 3,72 \cdot 10^{-9}$ М та $3,39 \cdot 10^{-10}$ М, відповідно (вище вказано середні значення IC_{50}). Якщо брати до уваги найчастіше застосовуваний препарат в Україні для лікування ХОЛЗ та астми, котрий співвідносний до ефективності іпратропію броміду середнє значення IC_{50} даного становить $7,24 \cdot 10^{-10}$ М. Важливо, що речовини **154350**, **249682** та **151685** інгібували передачу сигналів через M_3 -холінові рецептори значно сильніше, ніж іпратропію бромід при тих самих концентраціях, тоді як на рецептори M_2 -холінорецептори істотного впливу не було.

Проаналізувавши вище наведене, нами зроблено висновок, що речовини **154350**, **249682** та **151685** можна рекомендувати для наступного етапу досліджень (доклінічних), як холінолітики дія котрих спрямована на M_3 -холінорецептори, тобто як більш ефективні складові препаратів проти ХОЛЗ та бронхіальної астми.

Висновки

1. Досліджено фармакологічні властивості та кількісні закономірності пригнічення скорочувальної активності гладеньких м'язів трахеї та кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів, індукованої ацетилхоліном і цевімеліном за дії неселективних (атропін та іпратропію бромід) та селективних (4-DAMP) антагоністів мускаринових ацетилхолінових рецепторів.

2. Проаналізовано фармакологічні властивості та кількісні закономірності пригнічення скорочувальної активності гладеньких м'язів трахеї та кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів вибраними сполуками з передбаченою холінолітичною активністю.

3. Встановлено, що сполуки з шифрами 151689, 767560 та 112452 є холінолітиками з вираженим конкурентним антагонізмом щодо M_3 -холінорецепторів.

4. Із використанням методів кінетичного аналізу та фармакологічних інструментів (агоністів і антагоністів адренорецепторів та холінорецепторів, а також активаторів і блокувачів потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів та систем мобілізації іонів Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо), показано, що сполуки з шифрами 151689, 767560 та 112452 крім здатності пригнічувати проведення сигналу через мускаринові холінорецепторів не мають інших клітинних мішеней.

5. Вивчено фармакологічні властивості та кількісні закономірності пригнічення скорочувальної активності гладеньких м'язів трахеї та кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів сполуками з передбаченою покращеною холінолітичною активністю.

6. Показано, що сполуки з шифрами 154350, 249682 та 151685 характеризуються здатністю інгібувати ацетилхолін-індуковані скорочувальні реакції (середні значення IC_{50} відповідно становлять: $3,09 \cdot 10^{-9}$ М, $= 3,72 \cdot 10^{-9}$ М та $3,39 \cdot 10^{-10}$ М) співвідносно до ефективності одного із

найбільш застосованих в Україні лікарських засобів для терапії астми і ХОЗЛ іпратропію броміду.

7. Із використанням селективних агоністів холінорецепторів показано, що сполуки з шифрами 154350, 249682 та 151685 володіють суттєво більшою здатністю пригнічувати проведення сигналу через холінорецептори M_3 -типу порівняно з іпратропієм бромідом, не маючи значного впливу на M_2 -холінорецептори.

Список використаних джерел

1. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Sep 10;1(1):15025. doi: 10.1038/nrdp.2015.25. PMID: 27189668; PMCID: PMC7096989.
2. Global Initiative for Asthma (GINA). *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. Updated 2017. Available from: <http://www.ginasthma.org>
3. Hamida Hammad and Bart N. Lambrecht The basic immunology of asthma. *Cell*. 2021 March, 1469-1485 doi: 10.1016/j.cell.2021.02.016
4. Merin E. Kuruvilla, F. Eun-Hyung Lee & Gerald B. Lee Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* volume 56, 219–233 (2019) doi: 10.1007/s12016-018-8712-1
5. Stern, J., Pier, J. & Litonjua, A.A. Asthma epidemiology and risk factors. *Semin Immunopathol* 42, 5–15 (2020). doi: 10.1007/s00281-020-00785-1
6. Ann J. Woolcock, Jennifer K. Peat Evidence for the Increase in Asthma Worldwide. *Novartis Foundation Symposium* Edited by Derek J. Chadwick, Gail Cardew Copyright © 1997 by Ciba Foundation
7. Assessing national capacity for the prevention and control of noncommunicable diseases: report of the 2019 global survey. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
8. Bartolomé R. Celli, M.D., and Jadwiga A. Wedzicha, M.D. Update on Clinical Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2019;381:1257-66. DOI: 10.1056/NEJMra1900500
9. Mari Hikichi, Shu Hashimoto*, Yasuhiro Gon Asthma and COPD overlap pathophysiology of ACO. *Allergology International* 67 (2018) 179e186.
10. James C. Hogg and Wim Timens The Pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*

- Volume 4, 2009 Hogg, pp 435-459 doi:
10.1146/annurev.pathol.4.110807.092145
11. Alexandru Corlateanu, Yamely Mendez, Yafeng Wang, Ricardo de Jesus Avendaño Garnica, Victor Botnaru, Nikolaos Siafakas Chronic obstructive pulmonary disease and phenotypes: a state-of-the-art. *Pulmonology* Volume 26, Issue 2, March–April 2020, Pages 95-100
 12. Хронічне обструктивне захворювання легені: уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги та медичної реабілітації, Наказ Міністерства охорони здоров'я від 27 червня 2013 року № 555. Хронічне обструктивне захворювання легені: уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги та медичної реабілітації, Наказ Міністерства охорони здоров'я від 27 червня 2013 року № 555. https://zakononline.com.ua/documents/show/47081___486821#n1944
 13. *Bulletin of World Health Organisation*, 83, Bousquet, J., Bousquet, P. J., Godard, P. & Dyres, J.-P., The public health implications of asthma, 548–554, (2005)
 14. Hikichi M, et al., Asthma and COPD overlap pathophysiology of ACO, *Allergology International* (2018), 1-8, doi: 10.1016/j.alit.2018.01.001
 15. Diagnosis of Disease of Chronic Airflow Limitation: Asthma COPD and Asthma-COPD Overlap Syndrome (ACOS) 2014. Available from: <http://www.ginasthma.org/> or <http://goldcopd.org>
 16. Cazzola, M., Ora, J., Rogliani, P., & Matera, M. G. (2017). Role of muscarinic antagonists in asthma therapy. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 11(3), 239–253. doi:10.1080/17476348.2017.1289844
 17. Lipworth, B. J. (2013). Emerging role of long acting muscarinic antagonists for asthma. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(1), 55–62. doi:10.1111/bcp.12123

18. Chowdhury BA, Dal Pan G. The FDA and safe use of long-acting beta-agonists in the treatment of asthma. *N Engl J Med* 2010; 362: 1169–1171.
19. Lowie Vanfleteren Leonardo M Fabbri Alberto Papi Stefano Petruzzelli Bartolome Celli Triple therapy (ICS/LABA/LAMA) in COPD: time for a reappraisal. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, Volume 13, 3971–3981. doi: 10.2147/copd.s185975
20. Moulton, B. C., & Fryer, A. D. (2011). Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; finding drugs that actually work in asthma and COPD. *British Journal of Pharmacology*, 163(1), 44–52. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01190.x
21. Ilyaskina O.S., Lemoine H., Bünemann M. Lifetime of muscarinic receptor–G-protein complexes determines coupling efficiency and G-protein subtype selectivity. *PNAS Letters*, 2018; <https://www.pnas.org/content/pnas/early/2018/04/19/1715751115.full.pdf>
22. Saternos HC, Almarghalani DA, Gibson HM, Meqdad MA, Antypas RB, Lingireddy A, AbouAlaiwi WA. Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. *Physiol Genomics*. 2018 Jan 1;50(1):1-9. doi: 10.1152/physiolgenomics.00062.2017. *Bulletin of World Health Organisation*, 83, Bousquet, J., Bousquet, P. J., Godard, P. & Dyres, J.-P., The public health implications of asthma, 548–554, (2005)
23. Kruse, A. C., Kobilka, B. K., Gautam, D., Sexton, P. M., Christopoulos, A., & Wess, J. (2014). Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(7), 549–560. <https://doi.org/10.1038/nrd4295>
24. Wendell SG, Fan H, Zhang C. G Protein-Coupled Receptors in Asthma Therapy: Pharmacology and Drug Action. *Pharmacol Rev.* 2020 Jan;72(1):1-49. doi: 10.1124/pr.118.016899.
25. Rhee, C. K., Yoshisue, H., & Lad, R. (2019). Fixed-Dose Combinations of Long-Acting Bronchodilators for the Management of COPD: Global and

- Asian Perspectives. *Advances in therapy*, 36(3), 495–519.
<https://doi.org/10.1007/s12325-019-0893-3>
26. Cazzola, M., Page, C. P., Calzetta, L., & Matera, M. G. (2012). Pharmacology and Therapeutics of Bronchodilators. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 450–504. doi:10.1124/pr.111.004580 (<https://doi.org/10.1124/pr.111.004580>)
27. Ishii, M., & Kurachi, Y. (2006). Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Current Pharmaceutical Design*, 12(28), 3573–3581. doi:10.2174/138161206778522056 (<https://doi.org/10.2174/138161206778522056>)
28. Moulton, B. C., & Fryer, A. D. (2011). Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; finding drugs that actually work in asthma and COPD. *British Journal of Pharmacology*, 163(1), 44–52. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01190.x (<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01190.x>)
29. Eglen RM. Overview of muscarinic receptor subtypes. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(208):3-28. doi: 10.1007/978-3-642-23274-9_1.
30. Abrams P, Andersson KE, Buccafusco JJ, Chapple C, de Groat WC, Fryer AD, Kay G, Laties A, Nathanson NM, Pasricha PJ, Wein AJ. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol*. 2006 Jul;148(5):565-78. doi: 10.1038/sj.bjp.0706780.
31. Eglen RM. Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog Med Chem*. 2005;43:105-36. doi: 10.1016/S0079-6468(05)43004-0.
32. Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci*. 1993;52(5-6):521-7. doi: 10.1016/0024-3205(93)90310-y.
33. Miravittles M, Anzueto A, Jardim JR. Optimizing bronchodilation in the prevention of COPD exacerbations. *Respir Res*. 2017 Jun 20;18(1):125. doi: 10.1186/s12931-017-0601-2.

34. Maqsood MH, Rubab K, Maqsood MA. The Role of Revefenacin in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Cureus*. 2019 Apr 10;11(4):e4428. doi: 10.7759/cureus.4428.
35. Nadler LS, Rosoff ML, Hamilton SE, Kalaydjian AE, McKinnon LA, Nathanson NM. Molecular analysis of the regulation of muscarinic receptor expression and function. *Life Sci*. 1999;64(6-7):375-9. doi: 10.1016/s0024-3205(98)00577-3.
36. Zaagsma J, Roffel AF, Meurs H. Muscarinic control of airway function. *Life Sci*. 1997;60(13-14):1061-8. doi: 10.1016/s0024-3205(97)00048-9.
37. Malaiyandi LM, Sharthiya H, Surachaicharn N, Shams Y, Arshad M, Schupbach C, Kopf PG, Dineley KE. M3-subtype muscarinic receptor activation stimulates intracellular calcium oscillations and aldosterone production in human adrenocortical HAC15 cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2018 Dec 15;478:1-9. doi: 10.1016/j.mce.2018.06.016.
38. Santiago LJ, Abrol R. Understanding G Protein Selectivity of Muscarinic Acetylcholine Receptors Using Computational Methods. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 24;20(21):5290. doi: 10.3390/ijms20215290.
39. Baroffio M, Crimi E, Bricchetto L, Zappi L, Rehder K, Brusasco V. Pre-junctional muscarinic autoreceptors in bovine airways. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012 Jan 15;180(1):45-51. doi: 10.1016/j.resp.2011.10.007.
40. Luo L, Zhang G, Mao L, Wang P, Xi C, Shi G, Leavenworth JW. Group II muscarinic acetylcholine receptors attenuate hepatic injury via Nrf2/ARE pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2020 May 15;395:114978. doi: 10.1016/j.taap.2020.114978.
41. Roux E, Molimard M, Savineau JP, Marthan R. Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells. *Gen Pharmacol*. 1998 Sep;31(3):349-56. doi: 10.1016/s0306-3623(98)00007-x.
42. Alabaster VA. Discovery & development of selective M3 antagonists for clinical use. *Life Sci*. 1997;60(13-14):1053-60. doi: 10.1016/s0024-3205(97)00047-7.

43. Mak JC, Baraniuk JN, Barnes PJ. Localization of muscarinic receptor subtype mRNAs in human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992 Sep;7(3):344-8. doi: 10.1165/ajrcmb/7.3.344.
44. ten Berge RE, Roffel AF, Zaagsma J. Conditional involvement of muscarinic M1 receptors in vagally mediated contraction of guinea-pig bronchi. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1995 Aug;352(2):173-8. doi: 10.1007/BF00176771.
45. Matsumoto S. Functional evidence of excitatory M1 receptors in the rabbit airway. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997 Apr;281(1):531-9.
46. Eglen RM, Reddy H, Watson N, Challiss RA. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci*. 1994 Apr;15(4):114-9. doi: 10.1016/0165-6147(94)90047-7.
47. Filogonio R, Sartori MR, Morgensen S, Tavares D, Campos R, Abe AS, Taylor EW, Rodrigues GJ, De Nucci G, Simonsen U, Leite CAC, Wang T. Cholinergic regulation along the pulmonary arterial tree of the South American rattlesnake: vascular reactivity, muscarinic receptors, and vagal innervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2020 Aug 1;319(2):R156-R170. doi: 10.1152/ajpregu.00310.2019.
48. Taylor EW, Andrade DV, Abe AS, Leite CA, Wang T. The unequal influences of the left and right vagi on the control of the heart and pulmonary artery in the rattlesnake, *Crotalus durissus*. *J Exp Biol*. 2009 Jan;212(Pt 1):145-51. doi: 10.1242/jeb.024042..
49. Yuan Q, Xiao F, Liu Q, Zheng F, Shen S, He Q, Chen K, Wang Y, Zhang Z, Zhan J. M3 receptor is involved in the effect of penehyclidine hydrochloride reduced endothelial injury in LPS-stimulated human pulmonary microvascular endothelial cell. *Pulm Pharmacol Ther*. 2018 Feb;48:144-150. doi: 10.1016/j.pupt.2017.11.007.
50. Ismaila AS, Huisman EL, Punekar YS, Karabis A. Comparative efficacy of long-acting muscarinic antagonist monotherapies in COPD: a systematic

- review and network meta-analysis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015 Nov 16;10:2495-517. doi: 10.2147/COPD.S92412.
51. Malerba M, Foci V, Patrucco F, Pochetti P, Nardin M, Pelaia C, Radaeli A. Single Inhaler LABA/LAMA for COPD. *Front Pharmacol*. 2019 Apr 25;10:390. doi: 10.3389/fphar.2019.00390.
52. Kruse AC, Hu J, Kobilka BK, Wess J. Muscarinic acetylcholine receptor X-ray structures: potential implications for drug development. *Curr Opin Pharmacol*. 2014 Jun;16:24-30. doi: 10.1016/j.coph.2014.02.006.
53. Duckles S. P. (1990). p-Fluoro-hexahydro-sila-difenidol: affinity for vascular muscarinic receptors. *European journal of pharmacology*, 185(2-3), 227–230. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(90\)90645-m](https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)90645-m)
54. Stevens, L. A., Chapple, C. R., & Chess-Williams, R. (2007). Human idiopathic and neurogenic overactive bladders and the role of M2 muscarinic receptors in contraction. *European urology*, 52(2), 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.11.016>
55. Burdyga, V., & Kosterin, S. A. (1991). Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. *General physiology and biophysics*, 10(6), 589–598