

**ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ  
(ВІДДІЛ БІОХІМІЇ М'ЗІВ)  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ  
КНУ імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

**Методичні рекомендації виконання лабораторних робіт з модулю  
«Міжклітинні взаємодії»**

**(самостійна робота аспірантів з дисципліни «Сучасні методи в біохімії та  
клітинній біології» ОНП Е1 «Біологія та біохімія»)**

Упорядники: д.б.н., проф. Цимбалюк О.В.,  
д.б.н., с.н.с. Данилович Ю.В.

**Київ-2025**

**УДК 615.2+577.3**

*Затверджено вченою радою  
Навчально-наукового Інституту високих технологій  
Київського національного університету імені Тараса Шевченка  
(протокол № 9 від 14 березня 2025 року) та  
вченою радою Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України  
(протокол №16 від 22.12.2025 року)*

**Рецензенти:**

**Нурищенко Н.Є.** - доктор біологічних наук, професор, професор кафедри біофізики та медичної інформатики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

**Векліч Т.О.** - доктор біологічних наук, старший дослідник, провідний науковий співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

*Наукове видання*

**Методичні рекомендації виконання лабораторних робіт з модулю  
«Міжклітинні взаємодії»**

**(самостійна робота аспірантів з дисципліни  
«Сучасні методи в біохімії та клітинній біології»  
ОНП Е1 «Біологія та біохімія»)**

***Методичні рекомендації***

Дата друку 20.02.2026. Формат 60 X 84/16

Папір офсетний. Друк цифровий

Гарнітура Times New Roman

Наклад \_\_\_\_\_

Виготовлено на власному обладнанні

# Лабораторна робота 1

## ВИВЧЕННЯ ДІЇ РЕЧОВИН – АГОНІСТІВ ТА АНТАГОНІСТІВ РЕЦЕПТОРІВ, СПРЯЖЕНИХ З G-ПРОТЕЇНАМИ

### ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Окремі природні ліганди рецепторів (гормони, нейромедіатори, цитокіни тощо) діють на рецептори, спричиняючи розвиток клітинної відповіді; такі ліганди є **агоністами (agonists)** рецепторів.

Інші речовини зв'язуючись з рецептором не спричиняють появу клітинного сигналу; ці ліганди діють як **антагоністи (antagonists)**; їх зв'язування з рецепторами унеможлиблює розвиток фізіологічної відповіді агоніста. Гладенькі м'язи стінки травного тракту генерують спонтанні ритмічні скорочення, викликані коливанням мембранного потенціалу, що обумовлюються взаємодією процесів: деполяризуючого входу іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та затримкою активації  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних  $\text{K}^{+}$ -каналів. Оскільки тканина гладеньких м'язів шлунку є функціональним синцитієм у цій тканині відбувається синхронізація скорочень. В клітинах гладеньких м'язів судин кожна м'язова клітина скорочується автономно.

**Ацетилхолін** у гладеньких м'язах антрального відділу шлунку спричиняє скорочення, перш за все, переважно внаслідок активації **мускаринових рецепторів М3-підтипу** та спряжене з нею збільшення внутрішньоклітинної концентрації вторинного посередника інозитол-1,4,5-трифосфату ( $\text{IP}_3$ ), з наступним активаційним внеском **рецепторів М2-підтипу**. У кровоносних судинах (зокрема і в аорті) ефект ацетилхоліну є зворотним (розслаблення) переважно внаслідок **М2-холінорецептор** опосередкованої активації синтезу **оксиду азоту (NO)** ендотелієм судин.

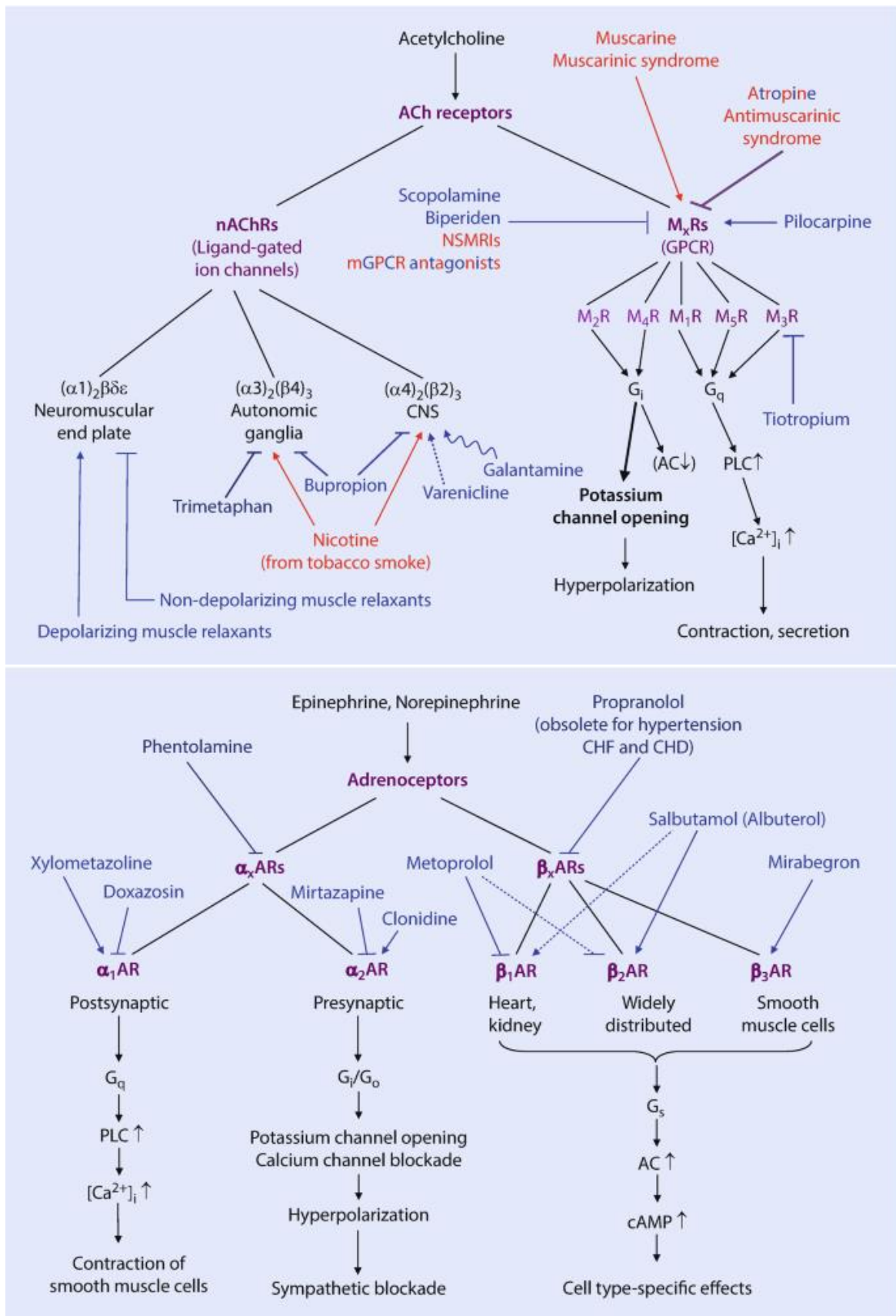
**Адреналін** і **норадреналін** опосередковують свої ефекти через  $\alpha$ - і  $\beta$ -адренорецептори. Активація  $\alpha$ -адренорецепторів зазвичай призводить до скорочення (внаслідок активування системи  $\text{IP}_3$  ( $\alpha_1$ -адренорецептори) та інгібування синтезу цАМФ ( $\alpha_2$ -адренорецептори). Навпаки, активування  $\beta_2$ -адренорецепторів активує синтез цАМФ, запускаючи внутрішньоклітинний

ланцюг процесів, що призводить до розслаблення. Тож кінцевий результат дії адреналіну і норадреналіну на гладенькі м'язи залежить від того, які типи рецепторів домінуватимуть в цих м'язах. Адреналін зв'язується з адренорецепторами у наступній закономірності: він має вищу спорідненість до  $\beta_2$ -рецепторів, ніж до  $\alpha$ -адренорецепторів.

Активація  $\beta_2$ -адренорецепторів спричиняє розслаблення м'язів шлунку і більшості інших м'язів (зокрема, кишечника). Навпаки, в гладеньких м'язах судин, таких як аорта, переважають  $\alpha$ -адренорецептори, активація яких призводить до скорочення. При дуже низьких концентраціях адреналіну в аорті можуть спостерігатись також незначні релаксаційні ефекти, індуковані високоафінними  $\beta$ -адренорецепторами, які далі (при підвищенні концентрації адреналіну) перекриваються скорочувальними реакціями опосередкованими активацією  $\alpha$ -адренорецепторів. Тож для дослідження ефектів кожного з цих типів рецепторів застосовують антагоністи інших типів рецепторів. Ефекти конкурентних антагоністів можна компенсувати досить високими дозами агоністів. Такий експеримент можна здійснювати із використанням конкурентних антагоністів  $\alpha$ - і  $\beta$ -адренорецепторів (відповідно, **фентоламін** і **пропранолол**).

**Атропін** – конкурентний антагоніст мускаринових ацетилхолінових рецепторів.

На відміну від конкурентних антагоністів, ефекти **неконкурентних антагоністів** не можуть бути в повній мірі компенсовані більш високими дозами агоністів.



**Рис. 1.** Схематичні представлення класифікації ацетилхолінових рецепторів (А) і адренорецепторів (Б), їх сигнальні шляхи активації, а також їх агоністи і антагоністи (запозичено з Seifert, R. (2019). Cholinergic and Adrenergic System. In: Basic Knowledge of Pharmacology. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18899-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18899-3_5))

## **Окремі методи аналізу дії агоністів і антагоністів на рецептори**

Фармакологічні властивості дії агоністів та антагоністів: криві концентрація-ефект. Криві концентрація-ефект відображають залежність між концентрацією речовини в омиваючому розчині та його дією на препарат, таким чином виражаючи її фармакологічну активність. При побудові цих графіків по осі абсцис відкладають концентрацію, а по осі ординат – ефект, виражений у відсотках порівняно з максимальним. Зазвичай використовують напівлогарифмічну шкалу і на осі абсцис подають логарифм значення концентрації. Криві у цьому випадку мають вигляд сигмоїди.

Такі криві будуються як для агоністів, так і для антагоністів. При дослідженні агоніста його концентрацію постійно підвищують від такого значення, коли скоротлива відповідь тільки починає проявлятися, до таких концентрацій, коли агоніст викликає максимальне скорочення. Коли концентрація агоніста перевищує максимальну, речовина починає пошкодувати ГМП (відбуваються процеси десенситизації) і скоротливі відповіді зменшуються. Коли досліджують криву концентрація-ефект для речовини з невідомим механізмом дії, його концентрацію підвищують доти, поки скорочення препарату не досягнуть рівня максимальних скорочень за присутності агоніста.

Аналогічно будують криву концентрація-ефект для антагоніста. Спочатку знаходять субмаксимальний ефект для відомого агоніста потім цей агоніст додають до омиваючого розчину на фоні попереднього впливу антагоніста, причому концентрацію антагоніста весь час збільшують. При цьому реєструється в якій мірі зростаючі концентрації антагоніста гальмують агоніст-викликані скорочення. Також можна спочатку викликати субмаксимальне скорочення дією агоніста і на його фоні через певний проміжок часу додавати антагоніст у зростаючих концентраціях. У даному випадку показником величини гальмування слугуватиме відсоток зменшення амплітуди скорочення, яке реєструють у фіксований момент часу. Коли

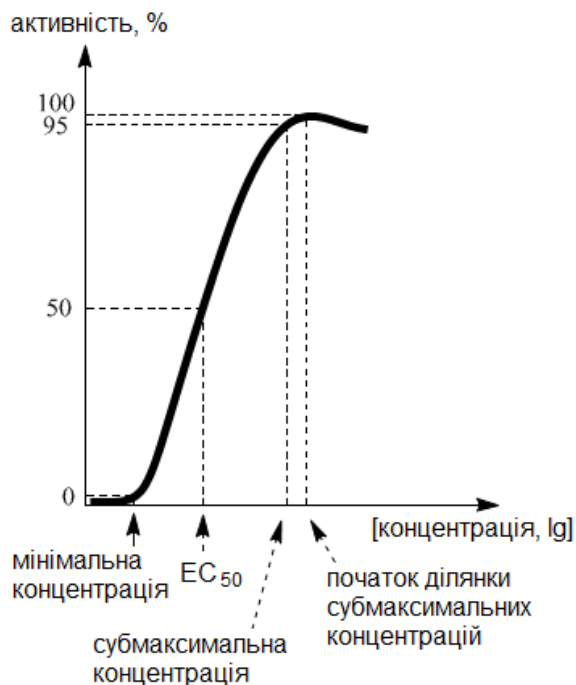
величина гальмування становить 30-70% від початкового скорочення, прийнятого за 100%, то при вираженні концентрації у логарифмічних одиницях, ця ділянка кривої концентрація-ефект буде лінійною.

Співвідношення між концентрацією і ефектом виражають у відсотках. Так досягається нормування ефекту по амплітуді і, відповідно, це дозволяє порівнювати скоротливі відповіді від препаратів, які мають неоднакову довжину і товщину. Максимальна величина скоротливої відповіді приймається за 100%, а усі інші виражають відносно неї. Цей механізм аналізу застосовують і для агоніста, і для антагоніста, але у випадку останнього у відсотках виражають ступінь розслаблення ГМП: величина агоніста у субмаксимальній концентрації викликає 0% гальмування, а повне пригнічення скорочення (повне розслаблення препарату) приймають за 100%.

Як для агоністів, так і для антагоністів графіки залежностей концентрація-ефект у напівлогарифмічній шкалі матимуть лінійну ділянку (відповідає значенням 30-70% ефекту) і два нелінійні фрагменти (від 0 до 30% та від 70 до 100% ефекту). Тому для порівняння дії різних речовин зазвичай використовують середню частину графіка. На шкалі графіка позначають п'ять інформативних значень концентрацій (Рис. 2):

- 1) **Мінімальна ефективна концентрація** – це концентрація речовини, яка викликає мінімальне скорочення ГМП.
- 2) **ЕС<sub>50</sub> (середня ефективна концентрація)** – це концентрація речовини, яка викликає скорочення, яке дорівнює половині максимального. Цей показник найчастіше використовують для того, щоб показати фармакологічну активність речовини. Важливим є те, що цей показник знаходиться на лінійній ділянці кривої концентрація-ефект.
- 3) **Субмаксимальна концентрація** – це концентрація речовини, яка викликає скорочення ГМП на рівні 95-99% від максимального. У досліджах на ізольованих органах дуже важливо знати цю концентрацію, оскільки її перевищення спричиняє незворотне пошкодження препарату.

- 4) **Максимальна концентрація** – це концентрація, при якій препарат розвиває максимальну реакцію (але препарат не пошкоджується). Для визначення цієї концентрації речовину тестують, збільшуючи її концентрацію до тих пір, доки амплітуда не почне спадати.

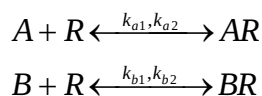


**Рис. 2.** Схематичне представлення кривої концентрація-ефект.

Отже, найбільш показовою для опису фармакологічних якостей речовини є показник  $EC_{50}$ . Але при порівнянні ефекту двох агоністів одного і того ж рецептора варто порівнювати криві концентрація-ефект на усьому діапазоні концентрацій, оскільки кути нахилу цих кривих можуть відрізнятися при однакових значеннях  $EC_{50}$ . Також криві концентрація-ефект для агоністів різних рецепторів можуть співпадати, при відмінностях у механізмі дії (ацетилхолін і гістамін). Щоб можна було відрізнити дві речовини, які викликають подібні скоротливі відповіді, використовують специфічні антагоністи. Наприклад, для гістамінових рецепторів селективний антагоніст мепірамін, для мускаринових холінорецепторів – атропін; атропін також пригнічує скорочення, викликані гістаміном, але у сто разів менш ефективно, ніж мепірамін.

Оборотній конкурентний антагонізм.

Нехай є дві хімічні сполуки (позначимо А і В), які впізнають спільний рецептор R і формують з ним комплекс:



де  $k_{a1}$ ,  $k_{b1}$  – константи швидкостей реакцій утворення відповідно комплексів AR і BR;  $k_{a2}$ ,  $k_{b2}$  – константи швидкостей реакцій дисоціації відповідно комплексів AR і BR. Кожна з реакцій бімолекулярна і оборотна.

Нехай фармакологічний сенс речовин А і В є наступним. У сполуки В відсутня фармакологічна ефективність, тобто він – **чистий антагоніст** (*pure antagonist*) і зменшує концентрацію зв’язаної форми агоніста А. Сполука А – **повний агоніст** (*full agonist*), отже, помітний ефект спостерігається при мінімальній зайнятості рецепторів речовиною А. Зменшення зайнятості за рахунок молекул В може не знижувати ефекту А при відносно низькій концентрації В.

Тобто відносні концентрації речовин А і В визначають величину ефекту агоніста. Також варто враховувати спорідненість А: коли у В вища афінність, то він може зменшувати ефект А навіть при незначних концентраціях В. Спорідненість речовин пов’язана з константами дисоціацій, які для А і В відповідно виражаються:

$$\begin{aligned} K_A &= \frac{k_{2a}}{k_{1a}}, \\ K_B &= \frac{k_{2b}}{k_{1b}}. \end{aligned}$$

Зв’язок концентрацій вільних форм А і В, констант дисоціацій та рецептор-зв’язаних концентрацій кожної з речовин виражається законом діючих мас. Нехай  $x$  – концентрація рецептор-зв’язаної форми речовини А,  $y$  – концентрація рецептор-зв’язаної форми речовини В. Тоді можна скласти систему диференціальних рівнянь:

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = k_{1a}[A]([R] - x - y) - k_{2a}x \\ \frac{dy}{dt} = k_{1b}[B]([R] - x - y) - k_{2b}x \end{cases} \quad (1)$$

У стані рівноваги:  $\frac{dx}{dt} = \frac{dy}{dt} = 0$

Тоді рівноважні концентрації X і Y:

$$\begin{cases} X_e = \frac{[A][R]}{[A] + K_A(1 + \frac{[B]}{K_B})} \\ Y_e = \frac{[B][R]}{[B] + K_B(1 + \frac{[A]}{K_A})} \end{cases} \quad (2)$$

У присутності В:

$$X_e < \frac{[A][R]}{[A] + K_A}$$

У присутності А:

$$Y_e < \frac{[B][R]}{[B] + K_B}$$

Таким чином, у присутності В ефективність А зменшується. Варіювання концентрацій А і В призводитиме до зведення ефекту іншої речовини до нуля. У випадку, коли проводять дослідження двох фармакологічних речовин, одна з яких є агоніст, а інша – конкурентний антагоніст, криві доза-ефект зсуваються. Для кількісного аналізу таких даних здійснюють наступні дії. Вважають, що ефект залежить від концентрації комплексів AR. Отже, припускають, що однакові ефекти – результат зв'язування однакової кількості агоніста. Підбирають таку концентрації агоніста в двох системах, щоб ефекти були однакові. Тоді можна позначити А і А' – еквіефективні концентрації агоніста (тут А' – концентрація агоніста в присутності антагоніста). У цьому випадку рівняння (2) можна записати для еквіефективних концентрацій А і А':

$$\frac{[A][R]}{[A] + K_A} = \frac{[A'][R]}{[A'] + K_A(1 + \frac{[B]}{K_B})}$$

Скоротивши ліву і праву частини рівняння на R, можна переписати:

$$[A]([A'] + (1 + \frac{[B]}{K_B})) = [A']([A] + K_A)$$

Врешті, вираз зведеться до

$$[A](1 + \frac{[B]}{K_B}) = [A']$$

або

$$\frac{[A']}{[A]} = 1 + \frac{[B]}{K_B} \quad (3)$$

Коли  $A'/A = 2$ , то, згідно (3),  $B = K_B$ .

Цей метод застосовують для визначення величини  $K_B$  для антагоніста.

Коли  $A'/A = 2$ , то  $B/K_B = 1$ .

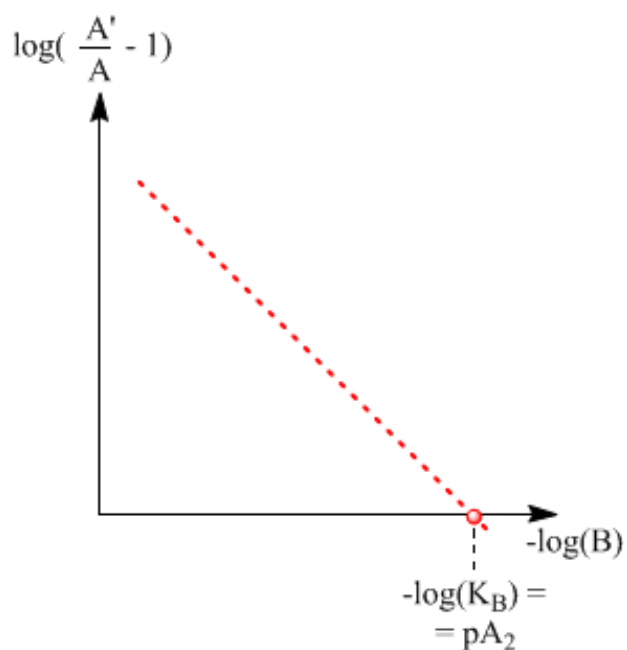
В логарифмічних координатах:

$$-\log([B]) = -\log(K_B) = [\text{моль}^{-1}]$$

Згідно тверджень Шілда (Schild),  $pA_2$  – логарифм спорідненості антагоніста, тоді:

$$pA_2 = -\log(K_B)$$

Логарифмуючи рівняння (12), отримують координати **графіка регресії Шілда**:



**Рис. 3** Графік регресії Шілда.

## ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

### Розчини, які використовуються в роботі:

*Нормальний розчин Кребса* (НРК, у мМ): NaCl - 120.4; KCl - 5.9; NaHCO<sub>3</sub> - 15.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1.2; MgCl<sub>2</sub> -1.2; CaCl<sub>2</sub> - 2.5; глюкоза -11.5 (рН доводять до 7.4 розчинами NaOH або HCl).

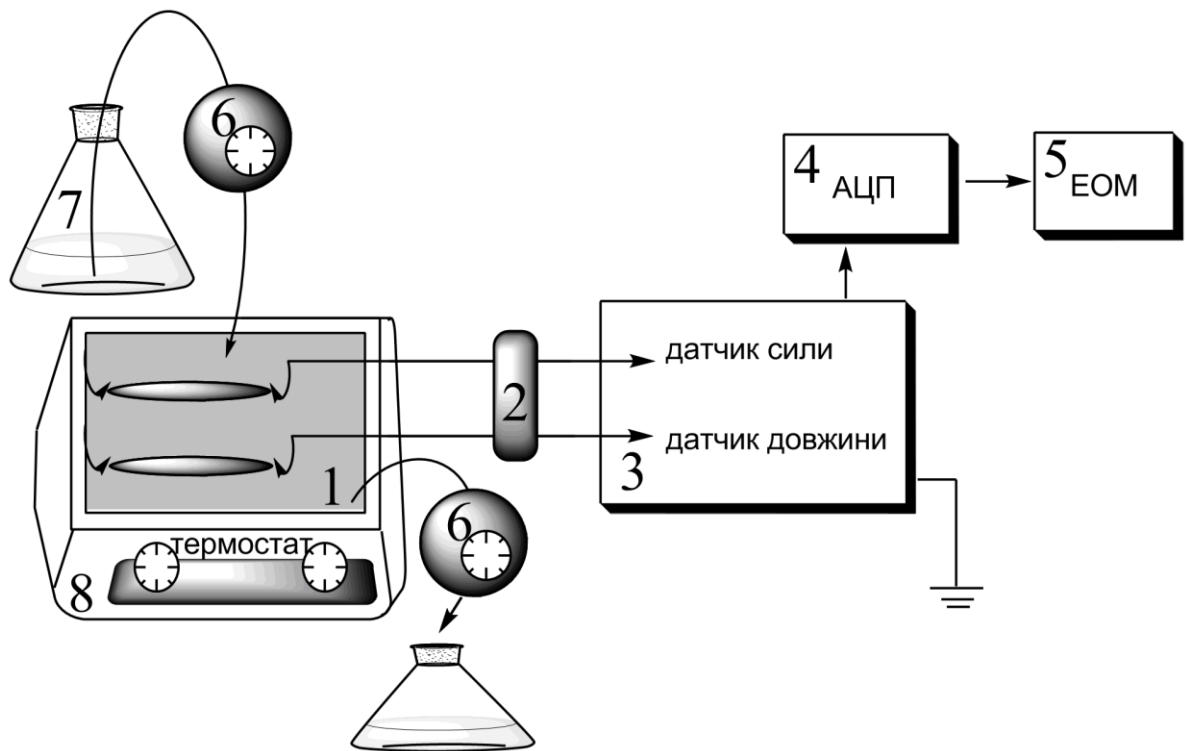
*Гіперкалієвий розчин* (ГКР, у мМ): NaCl - 46.3; KCl - 80; NaHCO<sub>3</sub> - 15.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1.2; MgCl<sub>2</sub> -1.2; CaCl<sub>2</sub> - 2.5; глюкоза -11.5 (рН доводять до 7.4 розчинами NaOH або HCl). У цьому випадку ГКР містить 80 мМ K<sup>+</sup>, але залежно від плану експерименту можна використовувати і іншу концентрацію іонів калію для того, щоб змодельовати різний ступінь деполяризації плазматичної мембрани.

Залежно від плану експерименту, агоністи і антагоністи розводять в НРК, додаючи їх стокові розчини у кількості 0,01-1% до кінцевого об'єму.

### Матеріали.

Для виконання роботи необхідно мати 1 л НРК, набір інструментів для очних операцій (мікропінцет і мікроножиці), набір препарувальних голок, дві ванночки з парафіноюю підложкою (на основі чашки Петрі з парафіноюю заливкою) та набір склянок для промивання кишки і зберігання готових препаратів.

Обладнання. Блок-схему устаткування для реєстрації скоротливої активності (у ізометричному або ізотонічному режимах) представлено на рис. 4.



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

#### Виконання роботи.

*Приготування гладеньком'язових препаратів кільцевих м'язів сліпої кишки (саесит) щура.* Після забору сліпої кишки необхідно помістити її в ванночку з розчином, зафіксувати сліпий кінець за допомогою препарувальної голки та надізнати кишку по внутрішній кривизні. Після розкривання кишки необхідно вимити її вміст у склянці, змінивши НРК (25 мл) декілька разів до прозорого розчину. Після того, як внаслідок

промивання кишки розчин залишатиметься прозорим, можна приступати до наступного етапу: звільнення гладеньких м'язів від слизового шару.

Для цього на іншій підложці (чашка Петрі, залита парафіном) розміщують кишку так, щоб слизовий шар знаходився зверху і, не розтягуючи її фіксують препарувальними голками. Потім обережно під бінокуляром за допомогою мікроножиць (допомагаючи мікропінцетом) зрізають шар слизової оболонки з площі кишки близько 2x2 см. Після цього нарізають м'язи на однакові гладеньком'язові препарати (ГМП). Нарізання проводять у напрямку розташування волокон на смужки довжиною близько 10 мм і з шириною 1.5 – 2.0 мм. Препарати переносять в склянку з чистим розчином НРК (об'єм 25 мл).

Препарати вміщують в камеру експериментальної установки. Робоча камера виконана з плексигласу і має ефективний об'єм 2 мл; вона містить дві системи фіксаторних гачків. Гачки зроблені з медичної сталі. Перша система дозволяє зафіксувати препарат в ізотонічному режимі: ГМП розміщують на двох гачках. Один гачок жорстко кріпиться в стінці камери, інший – з'єднаний з датчиком реєстрації переміщення та одночасно дозволяє надавати препарату фіксованого навантаження (від 0.5 до 10 г). Після розташування ГМП на гачках дослідник повинен виставити рівень навантаження на препарат; можна також змінювати навантаження у процесі експерименту.

Друга система гачків фіксує інший ГМП в ізометричному режимі: один гачок жорстко закріплений в стінці, а інший є закріплений на датчику сили. Датчик сили розташовується на підставці, яка рухається у горизонтальній площині за допомогою мікрогвинта. Таким чином, дослідник може, рухаючи підставку з датчиком сили, розтягувати препарат. Розтяг на певну довжину моделює постійне навантаження на м'яз. Вважається, що максимальне скорочення розвивають препарати, розтягнуті у півтора рази відносно їх довжини спокою (це відповідає навантаженню близько 1 г, тобто 10 мН).

Отже, така установка дозволяє проводити одночасну реєстрацію скоротливої активності двох ГМП (в ізометричному і ізотонічному режимах), які знаходяться в однакових умовах.

Реєстрація скорочень ГМП в ізометричному і ізотонічному режимах.

Після вміщення препаратів в камеру і надання їм певного навантаження, систему залишають на 1 годину, після цього вони готові до виконання експерименту. Після цього терміну препарати генерують спонтанні скорочення з постійною частотою і амплітудою, а також відповідають скороченнями (з повторюваними параметрами) на стимулювання, зокрема, ГКР або збуджувальними агоністами (ацетилхолін, карбахолін). Тестом на можливість початку експерименту є повторювання скорочень з однаковими параметрами при аплікуванні ГКР декілька разів з фіксованим інтервалом відмивання НРК.

Завдання:

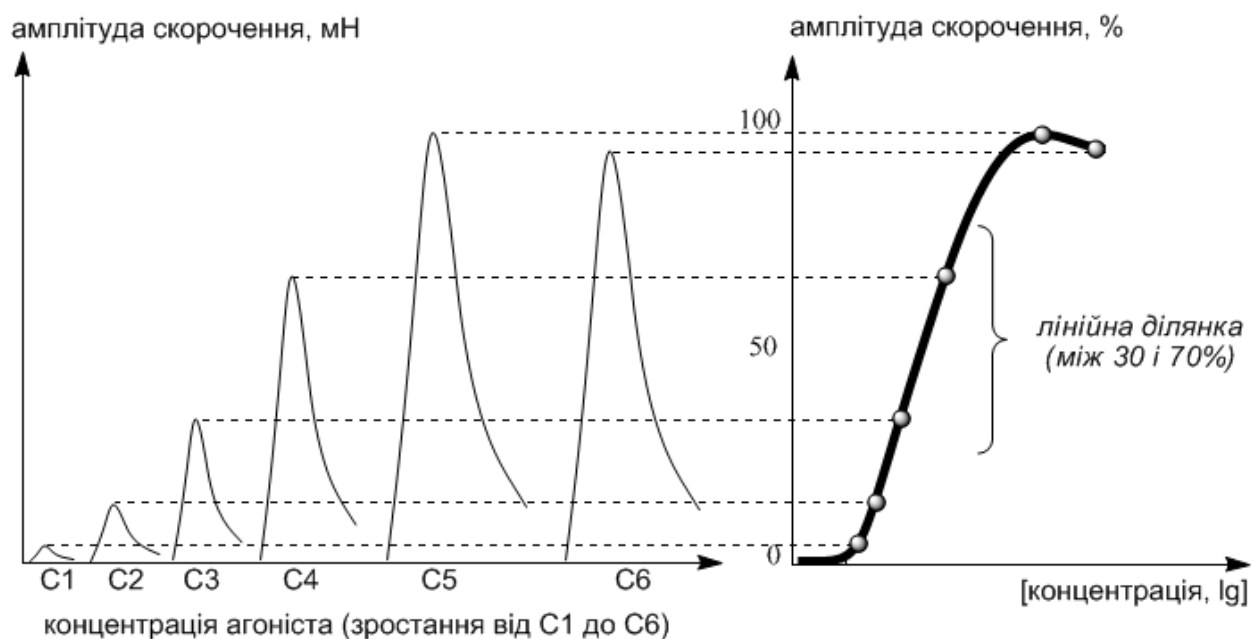
1. Приготувати гладеньком'язові препарати *saesit* (шириною 1.5 мм та довжиною 12 мм), помістити їх у термостатовану (при 37 °C) камеру. На препарат, прикріплений до системи ізометричного датчика, надати постійного натягу, який відповідає 10 мН. На препарат, прикріплений до системи ізотонічного датчика, надати навантаження 10 мН. Протягом усього експерименту має підтримуватись постійне протікання НРК (8 мл/хв.). У такому стані залишити препарати на 45 хвилин.
2. Додати розчин агоніста мускаринових ацетилхолінових рецепторів – ацетилхоліну (або карбахоліну) ( $10^{-6}$  М) у НРК та зареєструвати скорочення. Після виходу скоротливої відповіді на постійний рівень, замінити розчин ацетилхоліну на НРК і провести відмивання препаратів протягом 20-30 хв. Дочекатись відновлення постійної амплітуди і частоти спонтанних скорочень і повторити аплікування розчину ацетилхоліну. Скоротливі реакції на аплікування ацетилхоліну не повинні відрізнятись більше, ніж на 2,5-5,0 %.

3. Використовуючи розчин АХ, побудуйте залежність концентрація-ефект. Для цього спочатку приготуйте розчини з концентрацією АХ від  $10^{-10}$  до  $10^{-4}$  М. Відмінність постановки експерименту полягає у тому, що варто починати діяти на препарат мінімальною концентрацією АХ і, відмиваючи АХ після кожного збільшення концентрації, довести концентрацію агоніста до  $10^{-4}$  М (рис. 5). Заповніть таблицю (табл. 1).

**Табл. 1.** Залежність концентрація-ефект скоротливих відповідей на аплікацію ацетилхоліну (АХ) гладеньком'язових смужок *saesum* щурів.

| Концентрація АХ, М | Скоротлива відповідь,<br>zareєстрована у<br>ізометричному режимі,<br>мН | Активність, % |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------|
| $10^{-10}$         |                                                                         |               |
| $5 \cdot 10^{-10}$ |                                                                         |               |
| $10^{-9}$          |                                                                         |               |
| ..                 | ..                                                                      | ..            |
| $10^{-3}$          |                                                                         |               |

4. Побудуйте графік у координатах ( $\lg [АХ]$ , М; активність, %). Знайдіть  $EC_{50}$ , мінімальну, субмаксимальну, максимальну та супрамаксимальні концентрації.
5. При постійній концентрації агоніста (АХ,  $10^{-5}$  моль/л) дослідіть залежність концентрація-ефект для антагоніста мускаринових холінорецепторів (атропін) у концентраціях від  $10^{-9}$  до  $10^{-5}$  М (з кроком 0,5 М).
6. Заповніть таблицю (табл. 2).



**Рис. 5.** Побудова кривої концентрація-ефект для агоніста. Зліва від цієї кривої схематично показано скоротливі відповіді на аплікацію зростаючих (від C1 до C6) концентрацій агоніста. Права частина рисунка схематично зображає залежність концентрація-ефект, де відповідні амплітуди скорочень переведені у % відносно субмаксимальної концентрації і показані точками.

**Табл. 2.** Залежність концентрація-ефект ацетилхолін-викликаних ( $10^{-5}$  моль/л) скоротливих відповідей на аплікацію атропіну (АТ) гладеньком'язових смужок саесит щурів:

| Концентрація атропіну,<br>М | Скоротлива відповідь,<br>zareєстрована у<br>ізометричному режимі,<br>мН | Активність, % |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------|
| $10^{-9}$                   |                                                                         |               |
| $5 \cdot 10^{-9}$           |                                                                         |               |
| $10^{-8}$                   |                                                                         |               |
| ..                          | ..                                                                      | ..            |
| $10^{-4}$                   |                                                                         |               |

7. Принцип побудови залежності концентрація-ефект у цьому випадку реалізується за алгоритмом, зображеним на рис. 4.

.\*\*\*

8. На нових гладеньком'язових препаратах зареєструйте декілька контрольних ацетилхолін-викликаних ( $10^{-5}$  М) скорочень, після чого зареєструйте ацетилхолін-викликані скорочення на тлі ( $10^{-10}$  –  $10^{-3}$  М, з кроком прядок) 4-DAMP та визначіть IC50.

.\*\*\*

9. На нових гладеньком'язових препаратах зареєструйте залежність концентрація ацетилхоліну-ефект ( $10^{-10}$  –  $10^{-3}$  М) у контролі та на тлі  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  та  $5 \cdot 10^{-8}$  М блокаторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів 4-DAMP та проаналізуйте методом Шіда.

### Віртуальне дослідження

Для вивчення дії агоністів і антагоністів рецепторів, спряжених з G-протеїнами можна використати програмне забезпечення **Organ Bath Simulation**, розроблене Університетом Стратклайда (Уельс, Об'єднане Королівство) і вільно розповсюджене: [https://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/software\\_sims.htm](https://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/software_sims.htm)

### Підготовка і початок експерименту

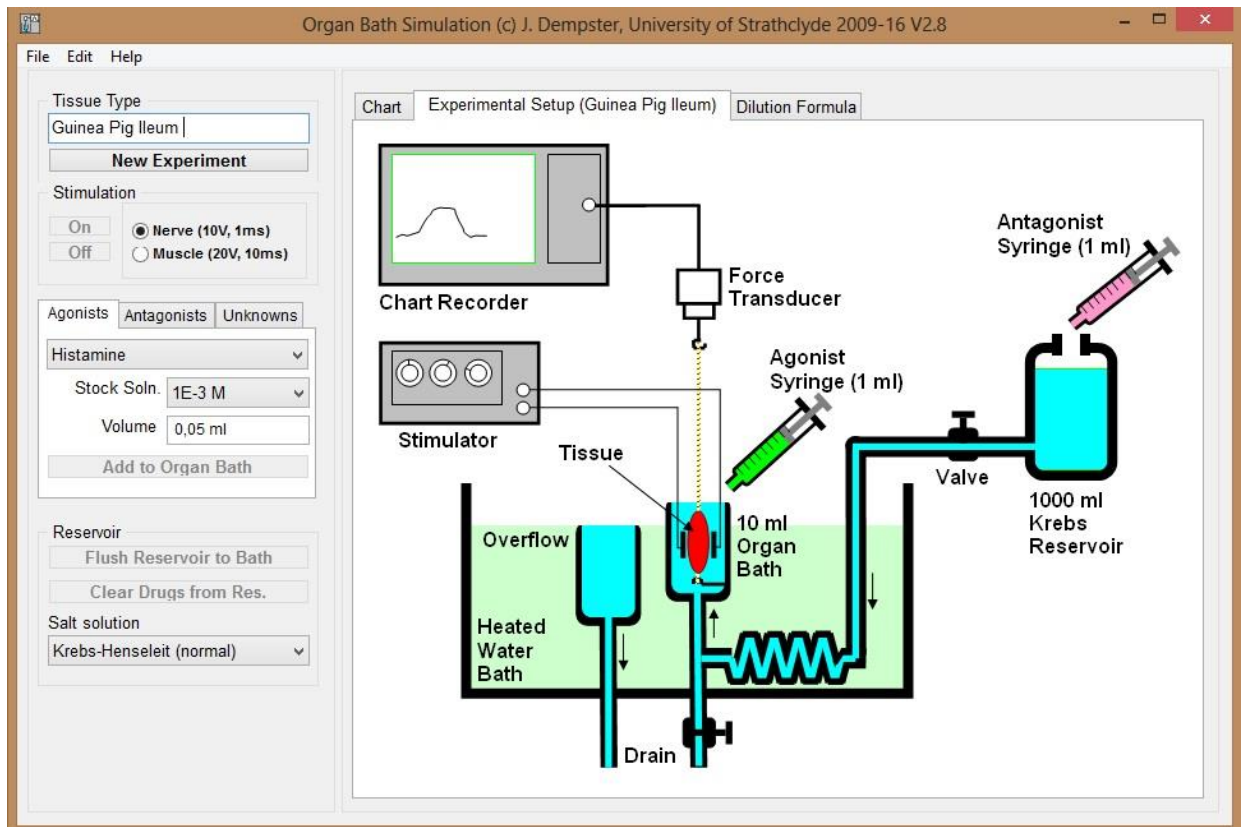
Хід роботи. Щоб розпочати новий експеримент:

- а) Виберіть тип препарату тканини, яку буде досліджено, для цього використайте список **Tissue Type** (*Тип тканини*).

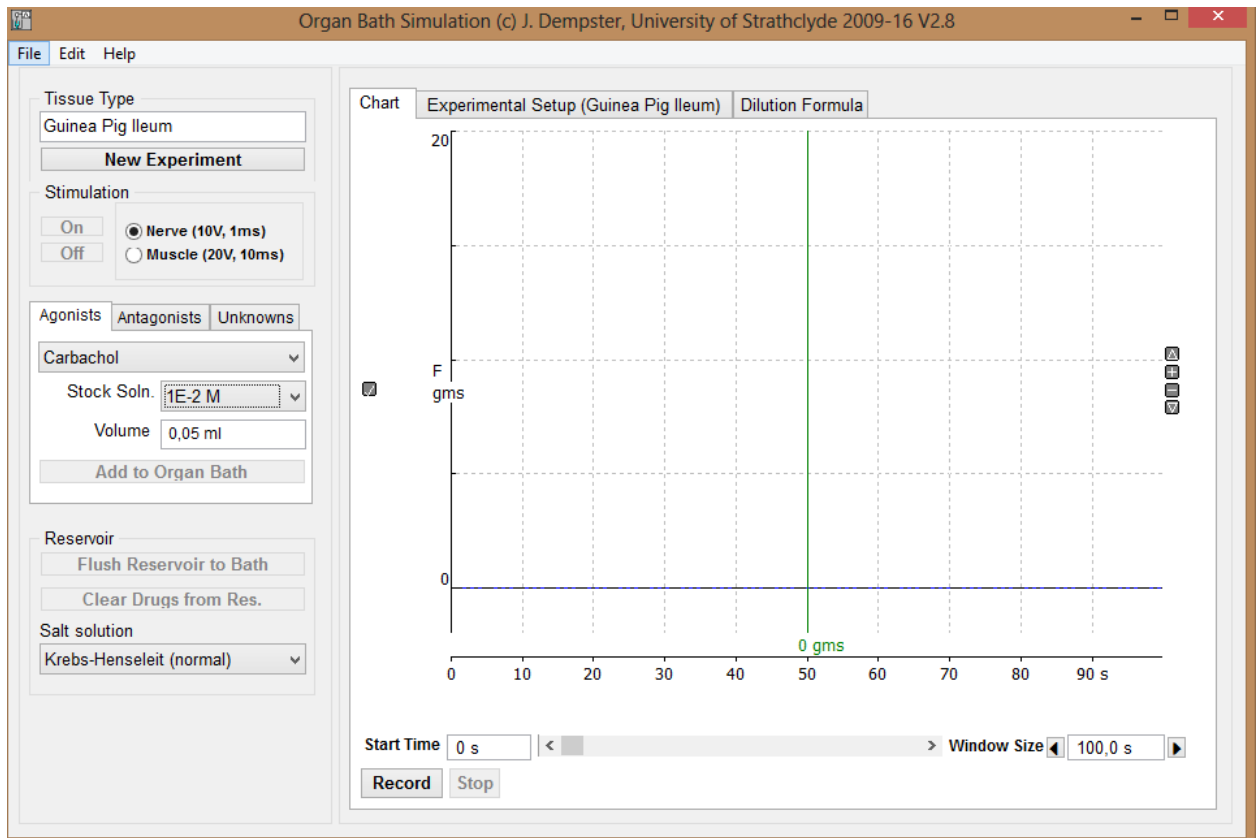
Для експериментів доступні чотири типи препаратів:

- Клубова кишка (*ileum*) морської свинки (її гладенькі м'язи скорочуються під дією агоністів мускаринових холінорецепторів, а також за умови електричної стимуляції інтрамуральних нервів).
- Цервіцис курчати (скелетний м'яз шиї курчати); він також препарується разом з нервом, тому може бути скорочений при стимулюванні нерва.

- Артеріальне кільце (частина артерії) кролика; його скорочення викликають KCL або агоністи адренорецепторів.
- Порожня кишка (*jejunum*) кролика – цей препарат може скорочуватись спонтанно, а також під дією агоністів мускаринових холінорецепторів.



- Натисніть кнопку **New Experiment** (Новий експеримент).
- Натисніть кнопку **Record** (Запис), щоб запустити віртуальний самописець.
- Виберіть та застосуйте реактиви зі списку доступних віртуальних речовин -агоністів, антагоністів або речовин з невідомою дією.



## Робота з речовинами-ефекторами рецепторів плазматичної мембрани агоністи

Щоб додати агоніст до експериментальної камери:

- Виберіть вкладку **Agonists** (Агоністи).
- Виберіть тип агоністу, який потрібно застосувати, якщо відомо:

| Agonist (агоніст)           | Receptors (Рецептори)                                  |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------|
| Histamine (гістамін)        | Histamine receptors (гістамінові рецептори)            |
| Carbachol (карбахол)        | Cholinceptors (холінорецептори)                        |
| Morphine (морфін)           | Mu-opioid receptors (мю-опіюїдні рецептори)            |
| Loperamide (лоперамід)      | Mu-opioid receptors (мю-опіюїдні рецептори)            |
| Phenylephrine (фенілефрин)  | Alpha1-adrenoreceptors (альфа1-адренорецептори)        |
| Acetylcholine (ацетилхолін) | Cholinceptors (холінорецептори)                        |
| Pilocarpine (пілокарпін)    | Muscarinic cholinceptors (мускаринові холінорецептори) |

- Виберіть концентрацію стокового розчину (**Stock Solution**) агоніста, яку Ви будете використовувати.
- Введіть об'єм (**Volume**, від 0 до 1 мл) стокового розчину, яку Ви хочете додати в експериментальну камеру (об'єму 10 мл).

е) Натисніть кнопку **Add to Organ Bath** (Додати до експериментальної камери), щоб ввести вибраний об'єм агоніста до омиваючого препарат розчину.

ф) Коли реакція препарату на записі діаграми досягає стаціонарного стану (або через 30 секунд, якщо відповіді немає), натисніть кнопку **Flush Reservoir to Bath** (промити експериментальну камеру), щоб вимити агоніст з розчину навколо препарату.

Розрахунок об'єму речовин, які необхідно додати в експериментальну камеру, щоб отримати в ній потрібну концентрацію. Для розрахунку кінцевої концентрації у експериментальній камері зручно користуватись вкладкою:

The screenshot shows the 'Organ Bath Simulation' software interface. The 'Dilution Formula' tab is active, displaying the formula:  $\text{Stock Soln Conc.} \times \text{Volume Added} = \text{Final Bath Conc.} \times \text{Bath Volume}$ . The 'Result' section shows a 'Stock Solution Conc.' of 0,01 M, a 'Final Bath Conc. (M)' of 0,00005 M, and a 'Bath Volume (ml)' of 10 ml. The calculated 'Volume to Add (ml)' is 0,05 ml. The 'Calculate' button is visible. The left sidebar contains various controls: 'Tissue Type' (Guinea Pig Ileum), 'Stimulation' (On/Off, Nerve/Muscle), 'Agonists' (Carbachol, Stock Soln. 1E-2 M, Volume 0,05 ml, Add to Organ Bath button), 'Reservoir' (Flush Reservoir to Bath, Clear Drugs from Res. buttons), and 'Salt solution' (Krebs-Henseleit (normal)).

Формула, яка використовується для розрахунку, має вигляд:

$[\text{stock}] \times \text{Volume added}$

$[\text{FBC}] = \text{-----}$

Bath volume (об'єм експериментальної камери = 10 мл, а резервуара = 1000 мл)

У випадку додавання речовини до резервуара використовуємо аналогічні міркування, але пам'ятаємо, що:

Chart | Experimental Setup (Guinea Pig Ileum) | Dilution Formula

**Stock Soln Conc. X Volume Added = Final Bath Conc. X Bath Volume**

Result

Volume to Add: 1 ml

Final Bath Conc. (M): 1E-8

Bath Volume (ml): 1000

Stock Soln. Conc. (M): 1E-5

Calculate

### антагоністи

Працюємо аналогічно до вивчення ефектів агоністів:

- Виберіть вкладку **Antagonists** (*Антагоністи*).
- Виберіть тип антагоніста, який хочете застосувати (з переліку доступних антагоністів).

| Antagonist (антагоніст)    | Acts On (мішень дії)                                                                                                                           |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Meperamine (мепірамін)     | H1 histamine receptors (H1 гістамінові рецептори)                                                                                              |
| Atropine (атропін)         | Muscarinic cholinceptors (мускаринові холінорецептори)                                                                                         |
| Tubocurarine (тубокурарин) | Nicotinic cholinceptors (нікотинові холінорецептори)                                                                                           |
| Naloxone (налоксон)        | Mu-opioid receptors (мю-опіоїдні рецептори)                                                                                                    |
| Prazosin (празозін)        | Alpha1-adrenoceptors (альфа1-адренорецептори)                                                                                                  |
| Yohimbine (йохімбін)       | Alpha2-adrenoceptors (альфа2-адренорецептори)                                                                                                  |
| Hyoscine (гіозин)          | Muscarinic cholinceptors (мускаринові холінорецептори)                                                                                         |
| Heparin (гепарин)          | Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor inhibitor (інгібітор IP3-рецепторів)                                                               |
| Propranolol (пропранолол)  | Beta-adrenoceptors (бета-адренорецептори)                                                                                                      |
| Nifedipine (ніфедипін)     | Calcium channels blocker (блокатор кальцієвих каналів)                                                                                         |
| Thapsigargin (тапсигаргін) | sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase (SERCA) inhibitor (інгібітор Ca <sup>2+</sup> -АТФ-ази сарко/ендоплазматичного ретикулуму) |

- Виберіть концентрацію стокового розчину (**Stock Solution**) антагоніста, яку Ви будете використовувати.
- Введіть об'єм (**Volume**, від 0 до 1 мл) стокового розчину, яку Ви хочете додати.

е) Виберіть, куди необхідно додати антагоніст (**Add to**): у експериментальну камеру з препаратом, або у резервуар з розчином Кребса.

ф) Натисніть кнопку **Add to** (Додати).

#### Речовини з невідомою активністю (Unknown Drug)

Ми маємо встановити, на яку рецепторну мішень діє невідома речовина (її ми можемо додати в експериментальну камеру, або в резервуар з розчином Кребса). Схема дослідження наступна:

а) Виберіть вкладку **Unknowns** (Невідомі).

б) Виберіть речовину зі списку невідомих, яку планується дослідити.

с) Виберіть концентрацію речовини, яку Ви хотіли б отримати.

д) Введіть об'єм (**Volume**, від 0 до 1 мл) стокового розчину, яку Ви хочете додати.

е) Виберіть, куди необхідно додати речовину (**Add to**): у експериментальну камеру з препаратом, або у резервуар з розчином Кребса.

ф) Натисніть кнопку **Add to** (Додати).

#### Визначення скорочувальних реакцій м'язового препарату

Щоб виміряти пікову амплітуду скорочень тканин:

а) Натисніть кнопку Зупинити, щоб зупинити запис.

б) Прокрутіть стрічку запису скорочувальної реакції до тієї частини запису, яка Вас цікавить.

с) Перетягніть курсор вимірювання на дисплеї діаграми до точки на скорочувальній реакції, амплітуду якої потрібно виміряти (пік реакції, отриманих при стимуляції нерва, або плато відповідей на дію агоністів). Під курсором буде вказано цифру, яка відповідатиме силі скорочення (в грамах).

#### Важливі параметри меню

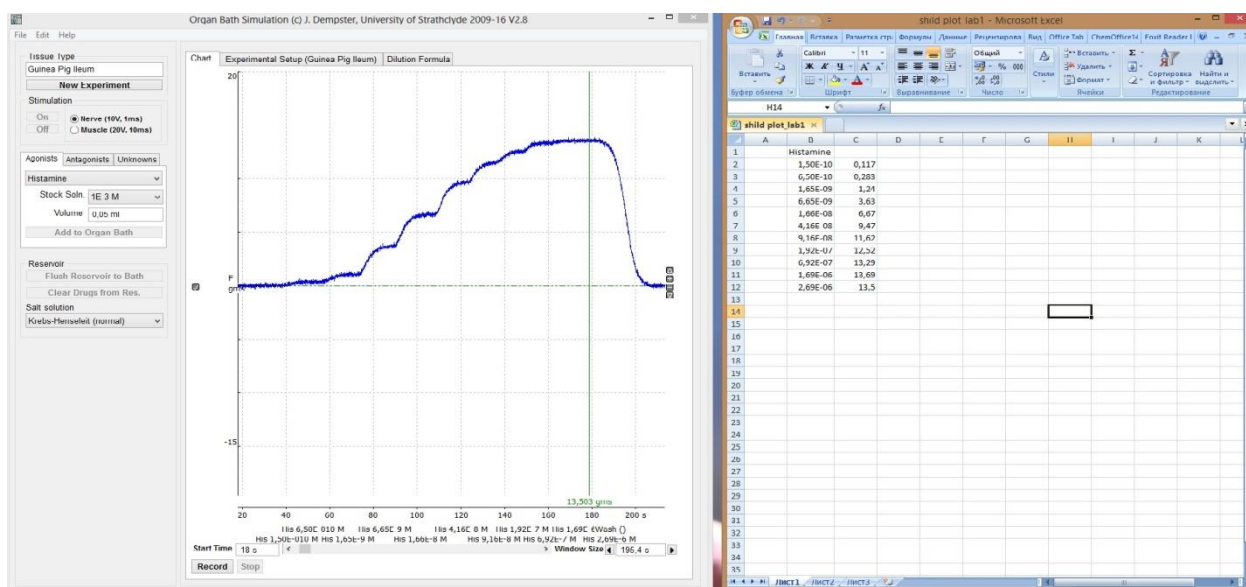
Важливо, що запис скорочувальної реакції м'язів можна скопіювати в буфер обміну (меню **Edit - Copy Data**), вставити їх у таблиці програм аналізу даних (зокрема, Excel або Origin) і надалі їх аналізувати.

Також можна скопіювати зображення механограми скорочення в буфер обміну та вставити в документ (Word, PowerPoint): меню **Edit - Copy Image**

Також можна зберегти запис експерименту у файл даних: меню **File - Save Experiment**.

До прикладу, розглянемо аналіз дії речовини з невідомою активністю А у програмі **Organ Bath Simulation**:

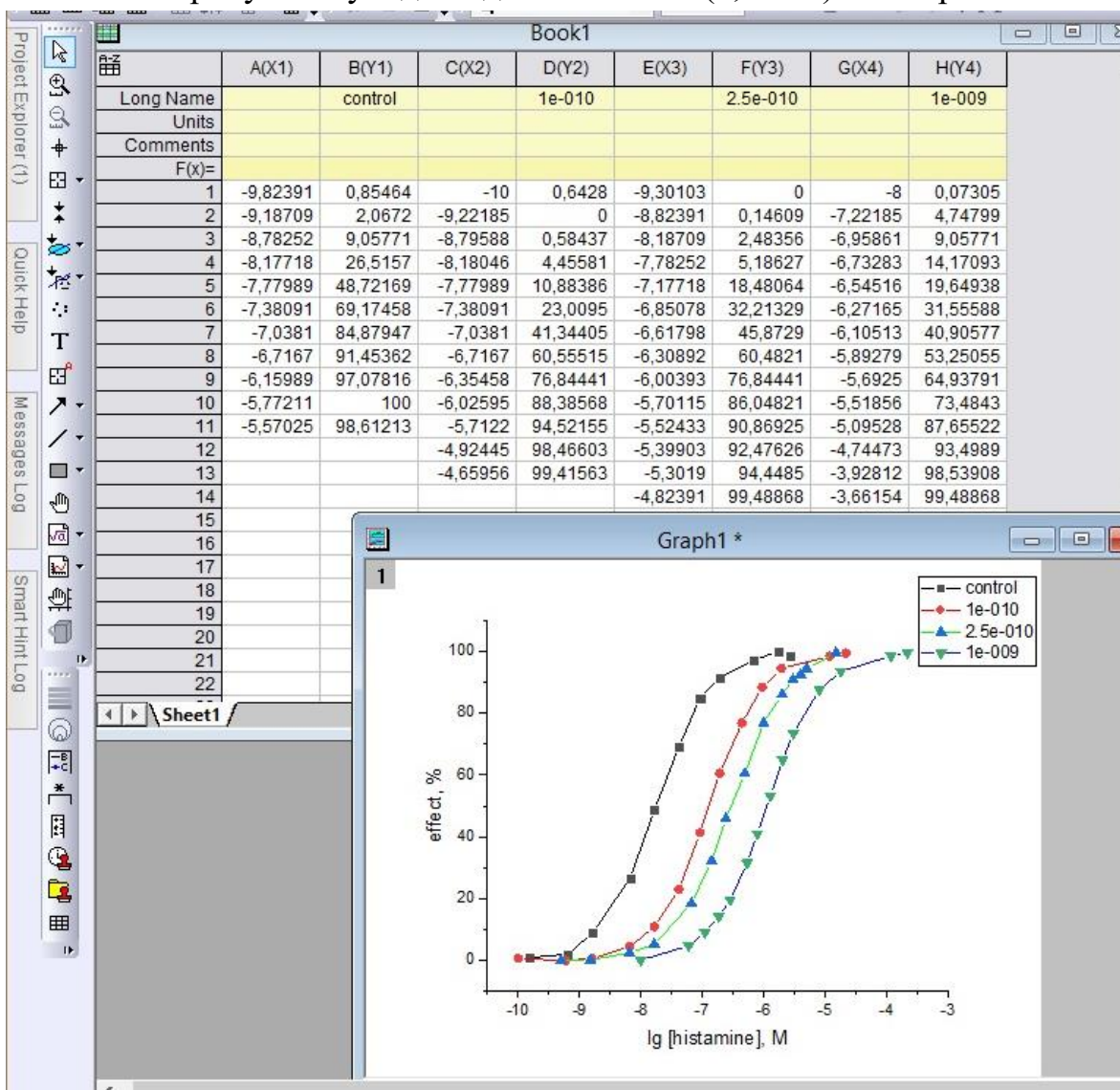
- 1) попередньо вивчаємо скорочувальні відповіді ileum на аплікування агоністів у контролі та на тлі дії речовини А з невідомою активністю; встановлюємо, що ця речовина пригнічує гістамін-індуковані скорочення; надалі аналізуємо дозові криві
- 2) реєструємо криві доза-ефект у контролі та визначаємо платові значення сили, які заносимо в робочий файл Excel:



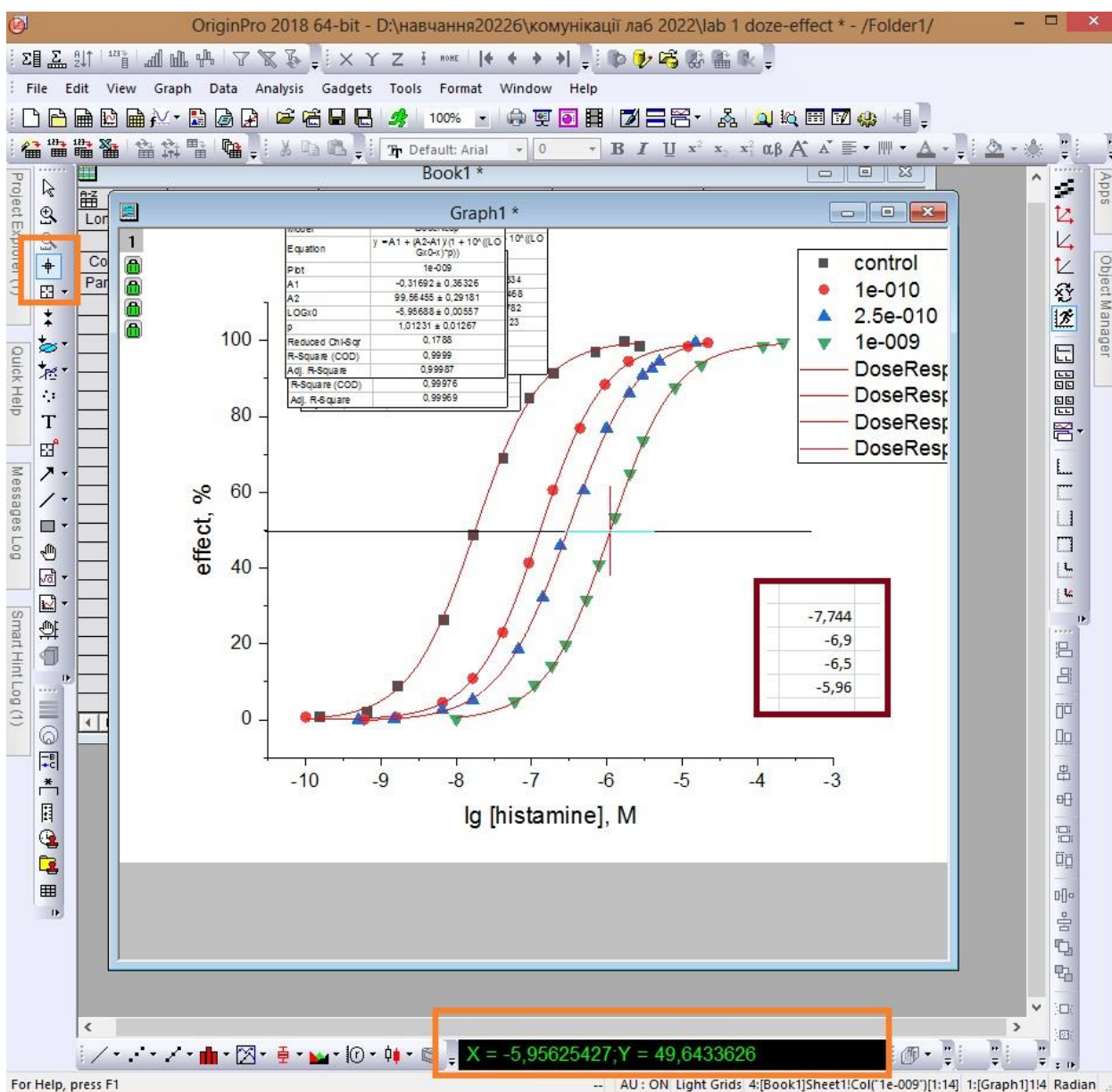
- 3) Аналогічно повторюємо реєстрацію дозових кривих на тлі речовини А; маємо:

| shild plot_lab1 |   |           |         |     |           |          |   |           |          |   |           |          |   |
|-----------------|---|-----------|---------|-----|-----------|----------|---|-----------|----------|---|-----------|----------|---|
|                 | A | B         | C       | D   | E         | F        | G | H         | I        | J | K         | L        | M |
| 1               |   | Histamine | control | dr1 | Histamine | 1,00E-10 |   | Histamine | 2,50E-10 |   | Histamine | 1,00E-09 |   |
| 2               |   | 1,50E-10  | 0,117   |     | 1,00E-10  | 0,088    |   | 5,00E-10  | 0        |   | 1,00E-08  | 0,01     |   |
| 3               |   | 6,50E-10  | 0,283   |     | 6,00E-10  | 0        |   | 1,50E-09  | 0,02     |   | 6,00E-08  | 0,65     |   |
| 4               |   | 1,65E-09  | 1,24    |     | 1,60E-09  | 0,08     |   | 6,50E-09  | 0,34     |   | 1,10E-07  | 1,24     |   |
| 5               |   | 6,65E-09  | 3,63    |     | 6,60E-09  | 0,61     |   | 1,65E-08  | 0,71     |   | 1,85E-07  | 1,94     |   |
| 6               |   | 1,66E-08  | 6,67    |     | 1,66E-08  | 1,49     |   | 6,65E-08  | 2,53     |   | 2,85E-07  | 2,69     |   |
| 7               |   | 4,16E-08  | 9,47    |     | 4,16E-08  | 3,15     |   | 1,41E-07  | 4,41     |   | 5,35E-07  | 4,32     |   |
| 8               |   | 9,16E-08  | 11,62   |     | 9,16E-08  | 5,66     |   | 2,41E-07  | 6,28     |   | 7,85E-07  | 5,6      |   |
| 9               |   | 1,92E-07  | 12,52   |     | 1,92E-07  | 8,29     |   | 4,91E-07  | 8,28     |   | 1,28E-06  | 7,29     |   |
| 10              |   | 6,92E-07  | 13,29   |     | 4,42E-07  | 10,52    |   | 9,91E-07  | 10,52    |   | 2,03E-06  | 8,89     |   |
| 11              |   | 1,69E-06  | 13,69   |     | 9,42E-07  | 12,1     |   | 1,99E-06  | 11,78    |   | 3,03E-06  | 10,06    |   |
| 12              |   | 2,69E-06  | 13,5    |     | 1,94E-06  | 12,94    |   | 2,99E-06  | 12,44    |   | 8,03E-06  | 12       |   |
| 13              |   |           |         |     | 1,19E-05  | 13,48    |   | 3,99E-06  | 12,66    |   | 1,80E-05  | 12,8     |   |
| 14              |   |           |         |     | 2,19E-05  | 13,61    |   | 4,99E-06  | 12,93    |   | 1,18E-04  | 13,49    |   |
| 15              |   |           |         |     |           |          |   | 1,50E-05  | 13,62    |   | 2,18E-04  | 13,62    |   |

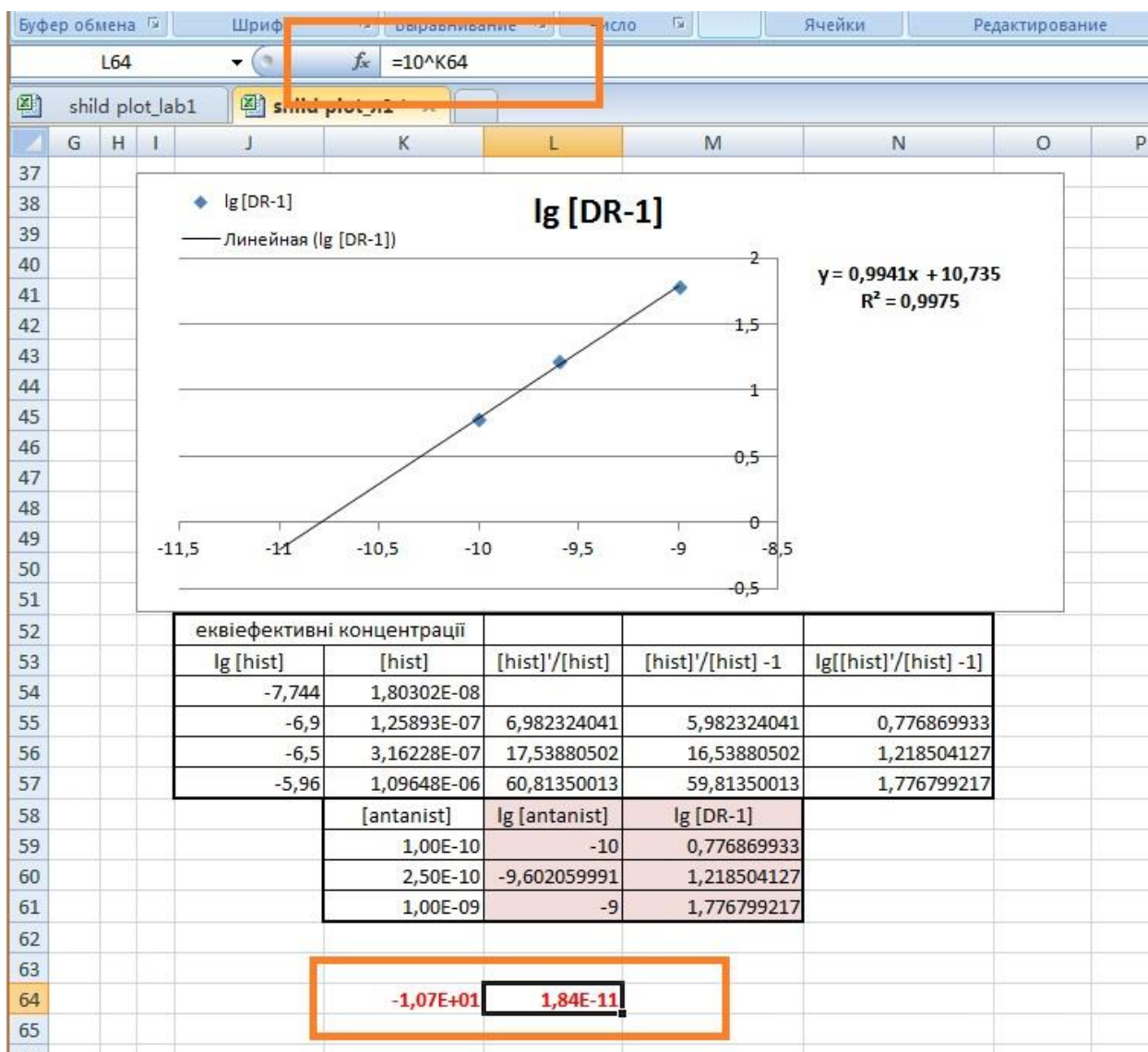
4) у програмі Origin будуємо криві доза-ефект, про нормовані на скорочувальну відповідь на гістамін (0,1 мМ) в контролі:



5) Відповідно до методу Шілда визначаємо еквіефективні концентрації гістаміну (на рівні ефекту гістаміну 50% від максимального):



6) будемо графік регресії Шілда:



7) Як видно, тангенс кута нахилу графіка регресії Шілда становить 0,9941, тобто статистично не відрізняється від 1. Тож робимо висновок про конкурентний механізм інгібування речовиною А гістамінових рецепторів. Далі з рівняння регресії Шілда визначаємо  $pA_2$ .

## Завдання до роботи

### Завдання1:

1. Розгляньте скорочувальні реакції гладеньком'язових препаратів (клубової кишки (*ileum*) або порожньої кишки (*jejunum*)) на аплікування агоністів мускаринових рецепторів, адренорецепторів та гістамінових рецепторів. Які реакції цих м'язів за умови використання цих агоністів?
2. Протестуйте скорочувальні реакції цих м'язів на дію агоністів в умовах перед інкубації препаратів з відповідними антагоністами.
3. Зробіть висновки.

### Завдання2:

1. Дослідіть невідому речовину та встановіть механізм її дії.
2. Обґрунтуйте свої міркування.

### Завдання3:

1. Для дослідженої у попередньому завданні невідомої речовини дослідіть тип інгібування,  $IC_{50}$ .
2. У випадку конкурентного інгібування застосуйте рівняння регресії Шілда і встановіть  $pK_b$  (а також зверніть увагу на тангенс кута нахилу кривої).

## Лабораторна робота 2

# ВИВЧЕННЯ ДІЇ РЕЧОВИН – АГОНІСТІВ ТА АНТАГОНІСТІВ МУСКАРИНОВИХ АЦЕТИЛХОЛІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ

### ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

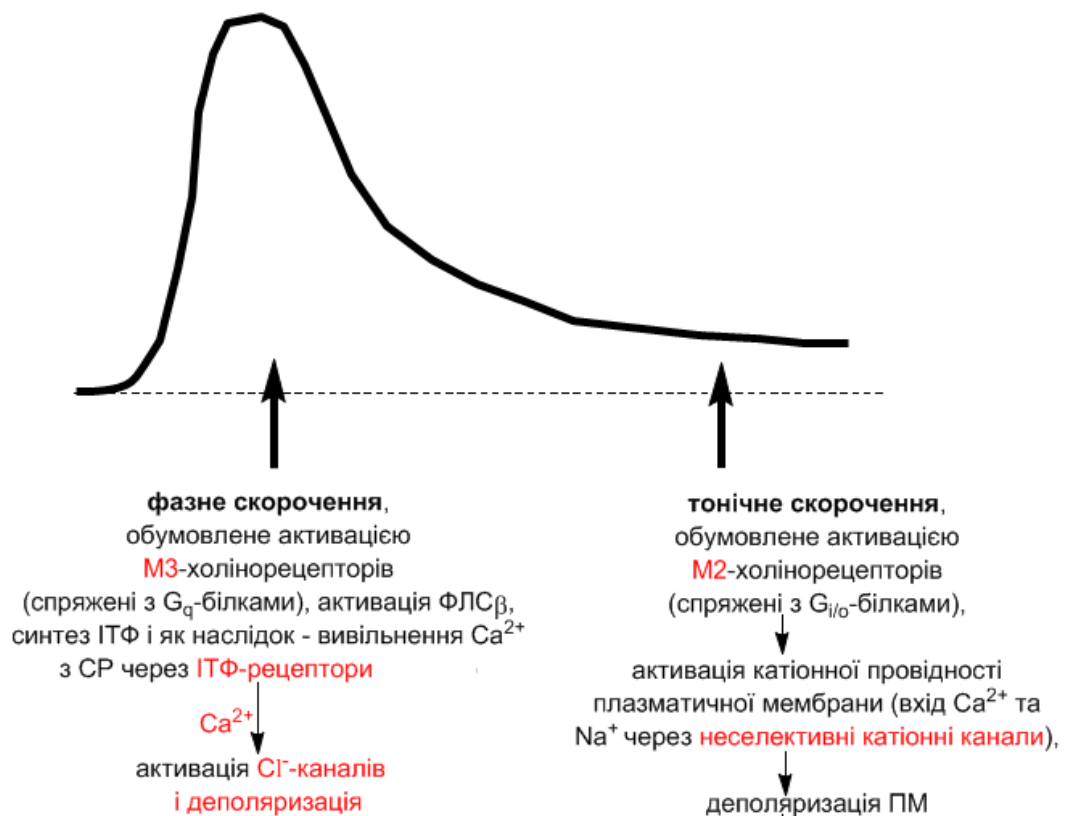
Ацетилхолін – важливий нейромедіатор, що регулює роботу органів і систем організму за рахунок активації мембранних рецепторів, які належать до двох надродин рецепторів: іонотропних (нікотинові ацетилхолінові рецептори) та метаботропних, спряжених з G-протеїнами (мускаринові ацетилхолінові рецептори). Активація мускаринових ацетилхолінових рецепторів регулює цілу низку важливих фізіологічних функцій, зокрема, формування пам'яті, підтримання базального напруження і моторики гладеньких м'язів повітроносних шляхів, травного тракту і сечостатевої системи, зниження частоти серцевих скорочень. Мускаринові ацетилхолінові рецептори (mAChRs) поділяють на 5 підтипів (M1-M5), молекули яких мають високу ступінь структурної подібності (також і одних підтипів різних організмів).

Відомо, що ацетилхолін у гладеньких м'язах стінок травного тракту спричиняє скорочення, перш за все, внаслідок активації **мускаринових рецепторів M3-підтипу** (спряжених з  $G_{q/11}$ -білками), призводить до фосфоліпаза C $\beta$ -активованого синтезу інозитол-1,4,5-трифосфату (ІТФ) та диацилгліцеролу (ДАГ); у свою чергу, ІТФ індукує вивільнення іонів  $Ca^{2+}$  з саркоплазматичного ретикулуму (СР). Так ми можемо зареєструвати швидке (фазне, транзієнтне) зростання внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$  та скорочувальну реакцію (так зване фазне скорочення) (Рис. 6).

Активація **холінорецепторів M2-підтипу** також мають суттєвий внесок у скорочувальну відповідь гладеньком'язової тканини за рахунок активації вхідної катіонної провідності через канали надродини TRP (TRPC4 і частково TRPC6) і наступної активації потенціалкерованих  $Ca^{2+}$ -каналів L-типу. На рівні кальцієвого сигналу і скорочувальної відповіді ми

спостерігатимемо тривале (тонічне) зростання внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  та скорочувальну реакцію (так зване тонічне скорочення).

Зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  призводить до активації  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін-залежної кінрази легких ланцюгів міозину (КЛЛМ). Цей ензим є серин-треоніною протеїнкіназою, яка фосфорилує регуляторні легкі ланцюги міозину (РЛЛМ); їх фосфорилування призводить до перебудови скорочувального апарату, робить можливим взаємодію молекул актину та міози нових головок, призводячи до скорочувальної реакції ГМК. Скорочувальна реакція закінчується після дефосфорилування РЛЛМ фосфатазою легких ланцюгів міозину (ФЛЛМ). Співвідношення активностей цих двох ензимів у ГМК визначатиме ступінь фосфорилування РЛЛМ і, врешті, силу скорочувальної реакції м'язу. Дійсно, варіювання активності ФЛЛМ (стимулювання або пригнічення) при постійних значеннях активності КЛЛМ і  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  спричиняє відповідно сенситизацію та десенситизацію ГМ, які супроводжуватимуться збільшенням і зменшенням рівнів фосфорилування РЛЛМ та сили скорочення. Крім того, також запускаються механізми «сенсibiliзації» протеїнів скоротливого апарату ГМК до іонів  $\text{Ca}^{2+}$  через RhoA/Rho-кіназу, які підсилюють ефект  $\text{Ca}^{2+}$  через регуляцію динаміки фосфорилування/дефосфорилування  $\text{MLC}_{20}$  (так званий  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежний шлях активації скорочення).



**Рис. 6.** Схема процесів у міоциті кишечника підчас активації скорочення ацетилхоліном

## ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

### Розчини, які використовуються в роботі:

*Нормальний розчин Кребса* (НРК, у мМ): NaCl - 120.4; KCl - 5.9;  $NaHCO_3$  - 15.5;  $NaH_2PO_4$  - 1.2;  $MgCl_2$  - 1.2;  $CaCl_2$  - 2.5; глюкоза - 11.5 (pH доводять до 7.4 розчинами NaOH або HCl).

*Гіперкалієвий розчин* (ГКР, у мМ): NaCl - 46.3; KCl - 80;  $NaHCO_3$  - 15.5;  $NaH_2PO_4$  - 1.2;  $MgCl_2$  - 1.2;  $CaCl_2$  - 2.5; глюкоза - 11.5 (pH доводять до 7.4 розчинами NaOH або HCl). У цьому випадку ГКР містить 80 мМ  $K^+$ , але залежно від плану експерименту можна використовувати і іншу концентрацію іонів калію для того, щоб змодельовати різний ступінь деполяризації плазматичної мембрани.

Залежно від плану експерименту, агоністи і антагоністи розводять в НРК, додаючи їх стокові розчини у кількості 0,01-1% до кінцевого об'єму.

### Матеріали.

Для виконання роботи необхідно мати 1 л НРК, набір інструментів для очних операцій (мікропінцет і мікроножиці), набір препарувальних голок, дві ванночки з парафіною підложкою (на основі чашки Петрі з парафіною заливкою) та набір склянок для промивання кишки і зберігання готових препаратів.

### Завдання:

1. Приготувати гладеньком'язові препарати кільцевих гладеньких м'язів травного тракту: *caecum* або *antrum* (шириною 1.5 мм та довжиною 12 мм), помістити їх у термостатовану (при 37 °C) камеру. На препарат, прикріплений до системи ізометричного датчика, надати постійного натягу, який відповідає 10 мН. На препарат, прикріплений до системи ізотонічного датчика, надати навантаження 10 мН. Протягом усього експерименту має підтримуватись постійна швидкість протікання НРК (8 мл/хв.). У такому стані залишити препарати принаймні на 45 хвилин.
2. Дослідження агоніст-викликаних скорочень гладеньких м'язів:
  - a. Отримати скорочення, активоване гіперкалієвим розчином (50 мМ): амплітуда скорочення може бути використана як референтна величина для нормування інших скорочень;
  - b. відмити препарати НРК упродовж 15 хв;
  - c. Додати розчин агоніста мускаринових ацетилхолінових рецепторів – ацетилхоліну ( $10^{-6}$  або  $10^{-5}$  М).
  - d. Після відмивання препаратів упродовж 20 хв нормальним розчином Кребса (НРК) додати розчин агоніста мускаринових ацетилхолінових

рецепторів – карбахоліну ( $10^{-6}$  або  $10^{-5}$  М) у НРК та зареєструвати скорочення;

е. Порівняти ефекти однакових концентрацій ацетилхоліну і карбахоліну (фазні і тонічні скорочення); чи є відмінність між відповідями з використанням агоністів?

ф. відмити препарати НРК упродовж 15 хв.

3. Додати в омиваючий м'язові препарати розчин антагоніста М3-ацетилхолінових рецепторів 4-DAMP ( $10^{-8}$  або  $10^{-7}$  М) та проінкубувати препарати на тлі 4-DAMP упродовж 20 хв, після чого зареєструвати скорочувальну відповідь на аплікування ацетилхоліну ( $10^{-6}$  або  $10^{-5}$  М). Як змінилася скорочувальна відповідь на ацетилхолін (порівняно з контрольною)?

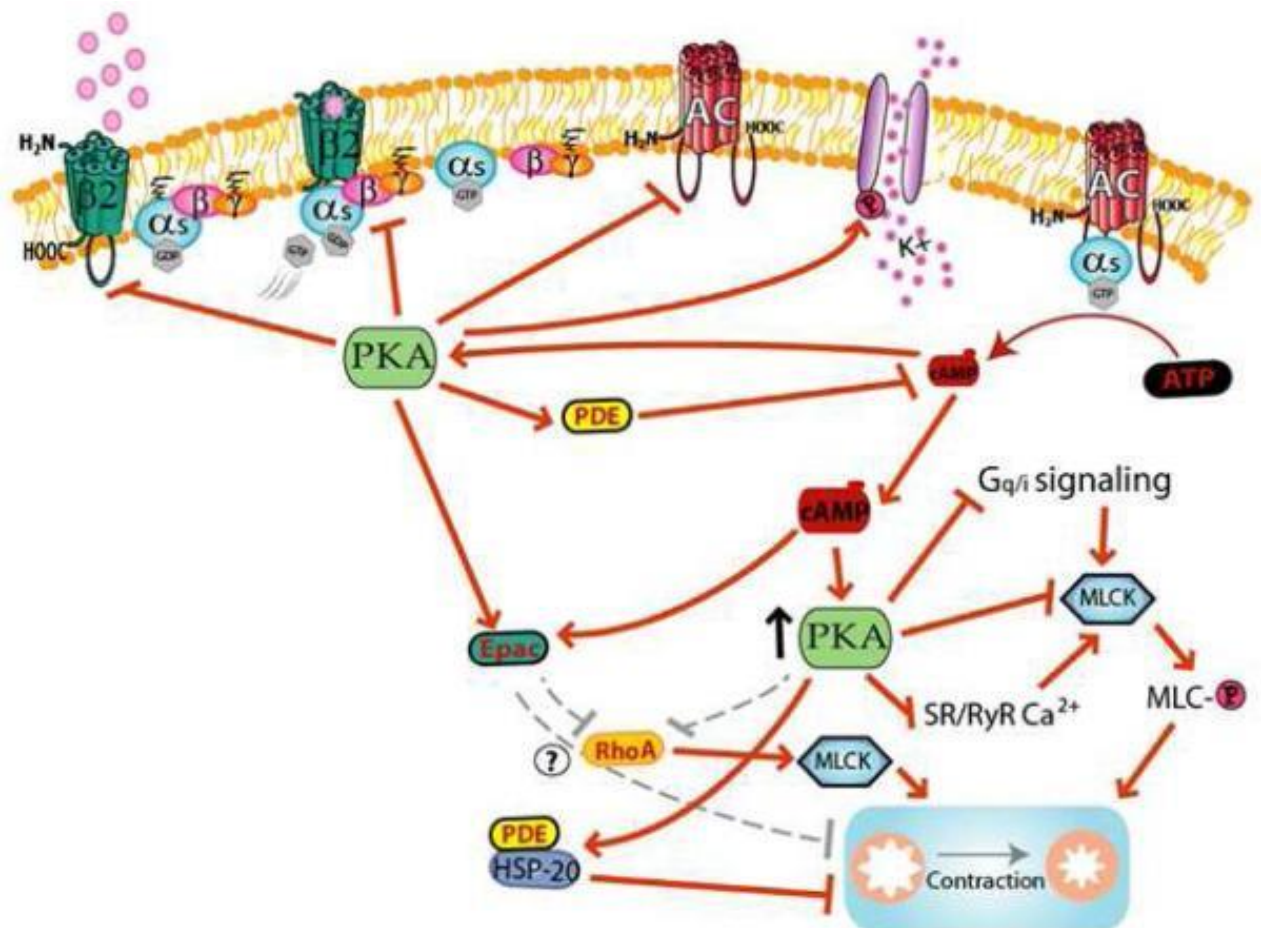
4. Додати в омиваючий м'язові препарати розчин антагоніста М2-ацетилхолінових рецепторів AF-DX116 ( $10^{-5}$  М) та проінкубувати препарати на його тлі упродовж 20 хв, після чого зареєструвати скорочувальну відповідь на аплікування ацетилхоліну ( $10^{-6}$  або  $10^{-5}$  М). Як змінилася скорочувальна відповідь на ацетилхолін (порівняно з контрольною)?

5. Зробити висновки.

**Лабораторна робота 3**  
**ВИВЧЕННЯ ДІЇ РЕЧОВИН – АГОНІСТІВ ТА АНТАГОНІСТІВ**  
**АДРЕНОРЕЦЕПТОРІВ**

**ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ**

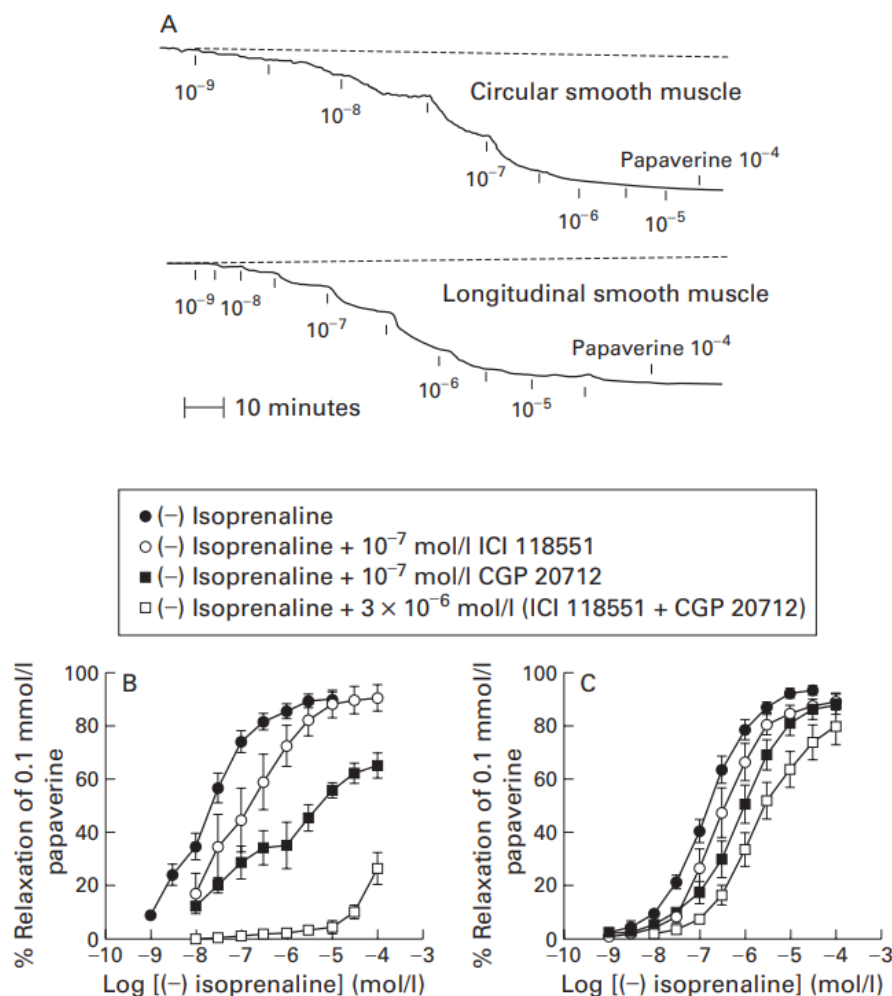
Відомо, що **норадреналін** (як і **адреналін**) у вісцеральних гладеньких м'язах спричиняє розслаблення, перш за все, внаслідок активації  **$\beta$ -адренорецепторів** (спряжених з  $G_s$ -білками). Активація  **$\beta$ -адренорецепторів** ініціює трансмембранний сигнальний каскад, який включає гетеротримерний білок G,  $G_s$ , і ефектор, аденілілциклазу. Активування аденілілциклази призводить до збільшення внутрішньоклітинної концентрації цАМФ шляхом гідролізу АТФ. Підвищена концентрація цАМФ служить для активації цАМФ-залежної протеїнкінази А (РКА). РКА може фосфорилувати внутрішньоклітинні субстрати, які модулюють різні ефекти всередині клітини. Зокрема, у гладких м'язах дихальних шляхів РКА діє через фосфорилування  $G_q$ -спряжених рецепторів, що призводить до каскаду внутрішньоклітинних сигналів, які, як припускають, знижують внутрішньоклітинну концентрацію іонів  $Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ -активовані  $K^+$ -канали великої провідності ( $BK_{Ca}$ ) та/або знижують чутливість протеїнів скорочувального апарату до  $Ca^{2+}$  (Рис. 7).



**Рис. 7.** Модель передавання сигналів  $\beta 2$ -AR через цАМФ, PKA та Epac (Epac, фактор обміну гуанінових нуклеотидів Rap1 (GEF)), що беруть участь у регуляції скорочення вісцеральних гладеньких м'язів (рисунок запозичено з (Gomperts B.D., Kramer L.M., Tatham P.E.R. Signal Transduction Academic Press; 1st edition, 2002, 440 p.)

Ефекти впливу агоністів адренорецепторів найкраще реєструвати на попередньо скорочених препаратах гладеньких м'язів (на тонічній складовій скорочення, індукованого ацетилхоліном, карбахоліном, або іншими агоністами, які активують рецептори, спряжені з  $G_{q/11}$ -білками).

Також важливий методичний прийом: після реєстрації ефектів агоністів адренорецепторів застосовують папаверин ( $10^{-4}$  М), який є блокатором фосфодіестерази (тобто призводить до максимального зростання концентрації цАМФ у клітинах м'язів і спричиняє їх повне розслаблення). Надалі ефекти агоністів адренорецепторів виражають у % відносно ефекту папаверину, який приймають за 100% (Рис. 8).



**Рис. 2.** Приклад реєстрації реакцій розслаблення, викликаного неселективним агоністом  $\beta$ -адренорецепторів ізопреналіном та побудова залежностей доза-ефект (запозичено з Manara L, Croci T, Aureggi G, Guagnini F, Maffrand JP, Le Fur G, Mukenge S, Ferla G. Functional assessment of beta adrenoceptor subtypes in human colonic circular and longitudinal (taenia coli) smooth muscle. Gut. 2000 Sep;47(3):337-42. doi: 10.1136/gut.47.3.337.).

## ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

### Розчини, які використовуються в роботі:

*Нормальний розчин Кребса* (НРК, у мМ): NaCl - 120.4; KCl - 5.9;  $\text{NaHCO}_3$  - 15.5;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  - 1.2;  $\text{MgCl}_2$  - 1.2;  $\text{CaCl}_2$  - 2.5; глюкоза - 11.5 (pH доводять до 7.4 розчинами NaOH або HCl).

*Гіперкалієвий розчин* (ГКР, у мМ): NaCl - 46.3; KCl - 80;  $\text{NaHCO}_3$  - 15.5;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  - 1.2;  $\text{MgCl}_2$  - 1.2;  $\text{CaCl}_2$  - 2.5; глюкоза - 11.5 (pH доводять до 7.4 розчинами NaOH або HCl). У цьому випадку ГКР містить 80 мМ  $\text{K}^+$ , але залежно від плану експерименту можна використовувати і іншу

концентрацію іонів калію для того, щоб змодельовати різний ступінь деполяризації плазматичної мембрани.

Залежно від плану експерименту, агоністи і антагоністи розводять в НРК, додаючи їх стокові розчини у кількості 0,01-1% до кінцевого об'єму.

### Матеріали.

Для виконання роботи необхідно мати 1 л НРК, набір інструментів для очних операцій (мікропінцет і мікроножиці), набір препарувальних голок, дві ванночки з парафіною підложкою (на основі чашки Петрі з парафіною заливкою) та набір склянок для промивання кишки і зберігання готових препаратів.

### Завдання:

1. Приготувати гладеньком'язові препарати кільцевих гладеньких м'язів травного тракту: *caecum* або *antrum* (шириною 1.5 мм та довжиною 12 мм), помістити їх у термостатовану (при 37 °C) камеру. На препарат, прикріплений до системи ізометричного датчика, надати постійного натягу, який відповідає 10 мН. На препарат, прикріплений до системи ізотонічного датчика, надати навантаження 10 мН. Протягом усього експерименту має підтримуватись постійне протікання НРК (8 мл/хв.). У такому стані залишити препарати принаймні на 45 хвилин.

Дослідження агоніст-викликаних розслаблень гладеньких м'язів:

2. Викликати скорочення препаратів карбахолом (3 мкМ) та почекати упродовж 15–20 хв періоду рівноваги;
3. Аплікувати кумулятивно неселективний агоніст β-адренорецепторів ізопротеренол (ізопреналін) у концентраціях  $10^{-9}$ ,  $5 \cdot 10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $5 \cdot 10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  М (інтервали часу між додаванням кожної концентрації обрати від 4–5 хв); в кінці аплікувати папаверин  $10^{-4}$  М;

4. Промити камеру установки спиртом. Змінити розчин НРК та помістити в камеру нові препарати гладеньких м'язів. Після впрацьовування препаратів здійснити підготовчу процедуру: аплікувати карабохол; відмити його упродовж 30 хв і знову аплікувати карабохол (3 мкМ) та почекати упродовж 15–20 хв періоду рівноваги;
5. Додати в омиваючий м'язові препарати розчин антагоніста  $\beta_1$ -адренорецепторів метапрололу ( $10^{-6}$  М) та проінкубувати препарати на його тлі упродовж 20 хв, після чого зареєструвати відповідь м'язів на аплікування ізопротеренолу в концентраціях  $10^{-9}$ ,  $5 \cdot 10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $5 \cdot 10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  М (інтервали часу між додаванням кожної концентрації обрати від 4–5 хв). Як змінилася релаксація?
6. На тлі метапрололу ( $10^{-6}$  М) додати в омиваючий м'язові препарати розчин неселективного антагоніста адренорецепторів пропранололу ( $10^{-6}$  М) та проінкубувати препарати на його тлі упродовж 20 хв, після чого зареєструвати відповідь м'язів на аплікування ізопротеренолу в концентраціях  $10^{-9}$ ,  $5 \cdot 10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $5 \cdot 10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  М (інтервали часу між додаванням кожної концентрації обрати від 4–5 хв). Як змінилася релаксація?
7. На тлі пропранололу ( $10^{-6}$  М) додати неселективний антагоніст  $\alpha$ -адренорецепторів фентоламін ( $0,5 \cdot 10^{-6}$  М) та проінкубувати препарати на його тлі упродовж 20 хв, після чого зареєструвати відповідь м'язів на аплікування ізопротеренолу в концентраціях  $10^{-9}$ ,  $5 \cdot 10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $5 \cdot 10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  М (інтервали часу між додаванням кожної концентрації обрати від 4–5 хв). Як змінилася релаксація?
8. Зробити висновки.

## **Лабораторна робота 4**

### **ВИВЧЕННЯ ДІЇ РЕЧОВИН – МОДИФІКАТОРІВ КАЛЬЦІЄВОГО СИГНАЛУ**

#### **ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ**

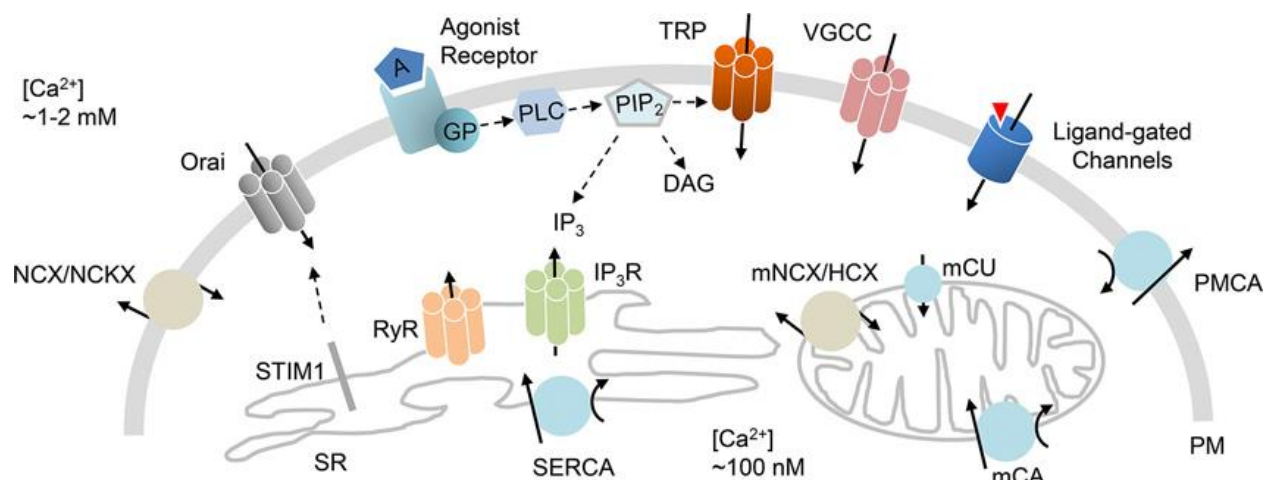
Одним з головних і універсальних регуляторів функціонування клітини є іонізований кальцій. Він визначає оптимальне проходження процесів поділу, росту та диференціації клітини, її адгезії. У збудливих тканинах  $\text{Ca}^{2+}$  регулює секрецію (ендокринні залози), скоротливість (м'язи) і вивільнення нейромедіаторів (нейрони). Різноманітність функцій іонів кальцію полягає у його здатності передавати регуляторні сигнали за рахунок зв'язування зі специфічними  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливими білками.

Між позаклітинним і внутрішньоклітинним просторами існує значний градієнт концентрації іонів кальцію:  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у стані спокою становить 50 - 100 нМ,  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  – у межах мікромольних концентрацій. Надходження на поверхню клітини збуджувального сигналу (внаслідок зв'язування гормонів або нейромедіаторів із відповідними рецепторами) викликає транзиторне зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  на декілька порядків відносно базальної концентрації. Процес збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  забезпечується шляхами його входу із позаклітинного простору (через  $\text{Ca}^{2+}$ -канали) та вивільненням з внутрішньоклітинних депо (ендоплазматичний ретикулум). Важливою умовою нормального функціонування клітин є швидке зниження концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ ; це забезпечується системами активного транспорту ( $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної мембрани, ендоплазматичного ретикулуму і мітохондрій,  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника тощо).

Шляхи збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Загалом можливо виділити два шляхи збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$ : надходження із позаклітинного простору та звільнення з внутрішньоклітинних депо.

У обох випадках це – енергонезалежні процеси. У свою чергу, відомо 5 систем, які гіпотетично можуть забезпечувати надходження кальцію до

клітини з зовнішнього боку. Це – потенціалкеровані канали; канали, керовані вторинними посередниками; ємнісний вхід  $\text{Ca}^{2+}$  через канали, керовані спустошенням внутрішньоклітинних кальцієвих депо; рецептор-керовані канали та  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник. Внутрішньоклітинними кальцієвими депо є ендоплазматичний (саркоплазматичний) ретикулум та мітохондрії. Щоправда, важливість останніх полягає скоріше у здатності швидко відкачувати іони  $\text{Ca}^{2+}$  з клітини і перерозподіляти їх відносно інших депо. (Рис. 9).



**Рис. 9.** Механізми підтримання гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  в клітині. Схематична діаграма, яка висвітлює іонні канали та транспортери, безпосередньо залучені до гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$ . Надходження  $\text{Ca}^{2+}$  переважно опосередковується потенціалкерованими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами (VGCC), рецептор-керованими каналами, каналами TRP, ліганд-керованими каналами та депо-керованими каналами Orai, які активуються протеїном STIM1. Викачування  $\text{Ca}^{2+}$  з цитоплазми досягається за допомогою  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани (PMCA),  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника (NCX) або  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -обмінника (NCKX). Вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з енд(сарко)плазматичного ретикулуму (ER/SR) відбувається через IP<sub>3</sub>- (IP<sub>3</sub>R) або ріанодинові (RyR) рецептори. Зворотне захоплення  $\text{Ca}^{2+}$  в ER/SR в основному опосередковується  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазою сарко(ендо)плазматичного ретикулуму (SERCA). Участь мітохондрій як  $\text{Ca}^{2+}$  депо передбачає такі системи транслокації  $\text{Ca}^{2+}$ : мітохондріальний уніпортер  $\text{Ca}^{2+}$  (mCU),  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза (mCA) або  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - чи  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінники (mNCX, mHCX). Також позначено: G-протеїни (GP); фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфат (PIP<sub>2</sub>); фосфоліпаза C (PLC). Запозичено з: Harraz O. F., Altier C. STIM1-mediated bidirectional regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  entry through voltage-gated calcium channels (VGCC) and calcium-release activated channels (CRAC). Front. Cell. Neurosci., Sec. Cellular Neurophysiology, 2014, Vol.8 <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00043>.

Найбільш поширені потенціалкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали м'язів та ендокринних залоз – L-типу. Саме вони забезпечують активацію процесів м'язового скорочення та секреції гормонів. Їх було так названо від «long-lasting»; ці канали активуються при високих потенціалах на мембрані ( $> -10$  мВ) та мають дуже повільну кінетику інактивації. L-канали, які активуються при більш низьких значеннях мембранного потенціалу, характерні для нейронів та клітин-пейсмейкерів серцевого м'язу. Часто канали L-типу також називають дигідропіридин-чутливими, оскільки частина білкового комплексу каналу вибірково зв'язує блокатори групи 1,4-дигідропіридинів (так званий дигідропіридиновий рецептор, ДГПР або DHPR), наприклад ніфедипін. Крім дигідропіридинів, L-канали блокуються також хімічними сполуками груп фенілалкіламінів (верапаміл) та бензотіазепінів. Активатором цих каналів є сполука **Bay K 8644** (Рис. 10).

Найважливіший шлях надходження іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в незбудливі клітини – так званий ємнісний вхід. Процес надходження іонів кальцію через специфічні канали (SOC або CRAC) активується кальцієм, який вивільняється з внутрішньоклітинних депо (ER). Відповідно, цей специфічний кальцієвий струм у світовій науковій літературі отримав назву  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated calcium current ( $I_{\text{CRAC}}$ ) або вхід  $\text{Ca}^{2+}$ , активований спустошенням  $\text{Ca}^{2+}$ -депо. Насьогодні процес ємнісного входу кальцію активно досліджують. За останніми даними, у депо, розташованими близько до плазматичної мембрани, містяться трансмембранні білки-сенсори рівню кальцію всередині депо – STIM. Їх активатором є сполука **MRS 1845**.

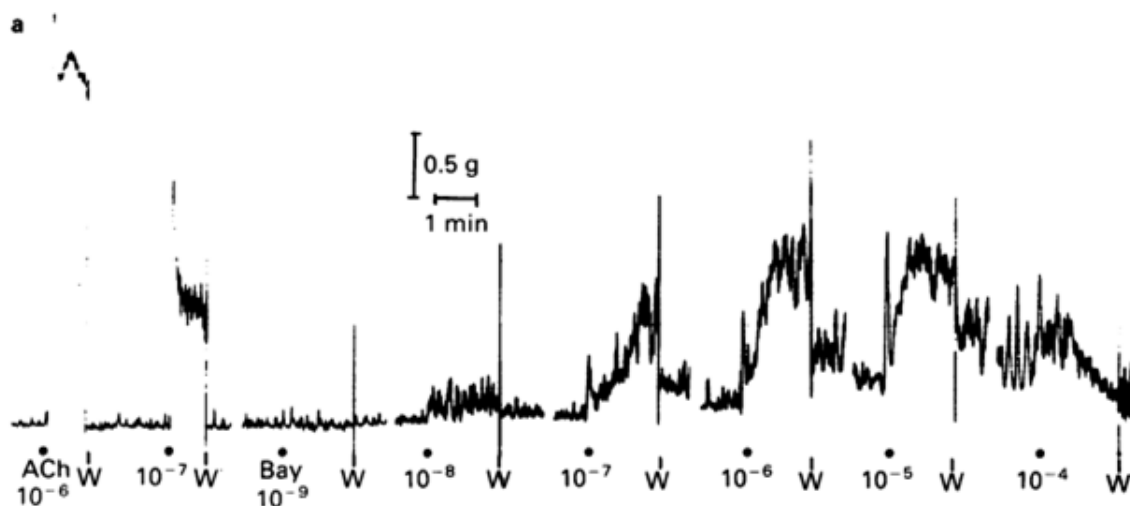
Важливе значення у регуляції концентрації іонів кальцію в клітині відіграє ендоплазматичний (саркоплазматичний) ретикулум (ER). У ER концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  досягає 300 мкМ, хоча кальцієва ємність цього внутрішньоклітинного депо значно варіює у різних клітинах. Мембрани ER містять тетрамерні рецептори-канали двох типів — інозитол-1,4,5-трифосфат-чутливі (ІТФР) та ріанодинові (РР) рецептори. На відміну від широко поширених у різних тканинах ІТФР, РР переважно властиві для

збудливих тканин.

Відкривання ІТФР викликає вторинний посередник інозитол-1,4,5-трифосфат (ІТФ), який утворюється після розщеплення фосфатиділінозитол-4,5-дифосфату фосфоліпазою C. Оптимальна концентрація ІТФ для активації струму через ці канали становить 0.5 - 1 мкМ. Інші кальцієві канали ЕР – ріанодинові рецептори. Активатором виходу  $\text{Ca}^{2+}$  через РР є **кофеїн** (у концентрації понад 10 мМ).

Участь ЕР у кальцієвій регуляції клітин можна усунути, заблокувавши функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ЕР (оскільки цей ензим є єдиною системою для поповнення депо іонами  $\text{Ca}^{2+}$ ). Блокатором  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ЕР є **тапсигаргін**.

Іншим важливим депо кальцію у клітинах є мітохондрії, які секвеструють  $\text{Ca}^{2+}$  з великою ємністю, а потім вивільняють його часто поблизу ЕР, забезпечуючи таким чином перерозподіл цього катіона. Пригнітити роботу мітохондрій як депо кальцію можна застосуванням блокатора  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера внутрішньої мітохондрійної мембрани – **рутенієвого червоного**.



**Рис. 10.** Ефекти активатора  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів L-типу Bay K8644 на препарати товстого кишечника миші (запозичено з Fontaine, J., & Lebrun, P. (1988). Pharmacological analysis of the effects of Bay K 8644 and organic calcium antagonists on the mouse isolated distal colon. *British journal of pharmacology*, 94(4), 1198–1205. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb11639.x>).

## ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

### Розчини, які використовуються в роботі:

*Нормальний розчин Кребса* (НРК, у мМ): NaCl - 120.4; KCl - 5.9; NaHCO<sub>3</sub> - 15.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1.2; MgCl<sub>2</sub> -1.2; CaCl<sub>2</sub> - 2.5; глюкоза -11.5 (рН доводять до 7.4 розчинами NaOH або HCl).

*Гіперкалієвий розчин* (ГКР, у мМ): NaCl - 46.3; KCl - 80; NaHCO<sub>3</sub> - 15.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1.2; MgCl<sub>2</sub> -1.2; CaCl<sub>2</sub> - 2.5; глюкоза -11.5 (рН доводять до 7.4 розчинами NaOH або HCl). У цьому випадку ГКР містить 80 мМ K<sup>+</sup>, але залежно від плану експерименту можна використовувати і іншу концентрацію іонів калію для того, щоб змодельовати різний ступінь деполяризації плазматичної мембрани.

Залежно від плану експерименту, агоністи і антагоністи розводять в НРК, додаючи їх стокові розчини у кількості 0,01-1% до кінцевого об'єму.

### Матеріали.

Для виконання роботи необхідно мати 1 л НРК, набір інструментів для очних операцій (мікропінцет і мікроножиці), набір препарувальних голок, дві ванночки з парафіноюю підложкою (на основі чашки Петрі з парафіноюю заливкою) та набір склянок для промивання кишки і зберігання готових препаратів.

### Завдання:

1. Приготувати гладеньком'язові препарати кільцевих гладеньких м'язів травного тракту: *caecum* або *antrum* (шириною 1.5 мм та довжиною 12 мм), помістити їх у термостатовану (при 37 °C) камеру. На препарат, прикріплений до системи ізометричного датчика, надати постійного натягу, який відповідає 10 мН. На препарат, прикріплений до системи ізотонічного датчика, надати навантаження 10 мН. Протягом усього експерименту має

підтримуватись постійне протікання НРК (8 мл/хв.). У такому стані залишити препарати принаймні на 45 хвилин.

Дослідження сполук-модифікаторів ланок кальцієвого сигналу:

2. Викликати скорочення препаратів гіперкалієвим розчином (40 або 80 мМ), відмити препарати НРК упродовж 15 хв і повторити аплікування цієї гіперкалієвого розчину;
3. Відмити препарати НРК упродовж 15 хвилин і аплікувати активатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів L-типу сполуку Bay K 8644 у концентрації  $10^{-4}$  М; порівняти відповіді препаратів на ГКР і Bay K 8644;
4. Відмити препарати НРК упродовж 20 хв та аплікувати карабахол (1 мкМ); відмити його упродовж 20 хв, додати в омиваючий розчин активатор РР каналів ендо(сарко)плазматичного ретикулуму - сполуку кофеїн (20 мМ) та спостерігати ефекти кофеїну;
5. Відмити препарати НРК упродовж 20 хв та аплікувати карабахол (1 мкМ) ; відмити його упродовж 20 хв, додати в омиваючий розчин блокатор каналів ємнісного входу  $\text{Ca}^{2+}$  ORAY - сполуку MRS 1845 (15 мкМ) та дати їй діяти на м'язи упродовж 15 -20 хв; спостерігати характер спонтанної скорочувальної активності м'язів до та після дії MRS 1845; знову аплікувати карбахол та спостерігати його відмивання (у порівнянні з контрольним відмиванням до дії MRS 1845);
6. Додати в омиваючий м'язові препарати розчин блокатора  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи сарко (ендо)плазматичного ретикулуму тапсигаргіну ( $10^{-6}$  М) та проінкубувати препарати на його тлі упродовж 10 хв, спостерігати характер спонтанної скорочувальної активності м'язів до та після дії тапсигаргіну після чого зареєструвати відповідь м'язів на аплікування карбахолу. Як змінилося скорочення?
7. Додати в омиваючий м'язові препарати розчин блокатора  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера мітохондрій – рутенієвого червоного ( $10^{-7}$  М) та проінкубувати препарати на його тлі упродовж 10 хв, спостерігати характер спонтанної скорочувальної

активності м'язів до та після дії тапсигаргіну після чого зареєструвати відповідь м'язів на аплікування карбахолу. Як змінилося скорочення?

8. Зробити висновки.

## Лабораторна робота 5

### ВИВЧЕННЯ ДІЇ РЕЧОВИН – МОДИФІКАТОРІВ ЛІГАНД-КЕРОВАНИХ ІОННИХ КАНАЛІВ

#### ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

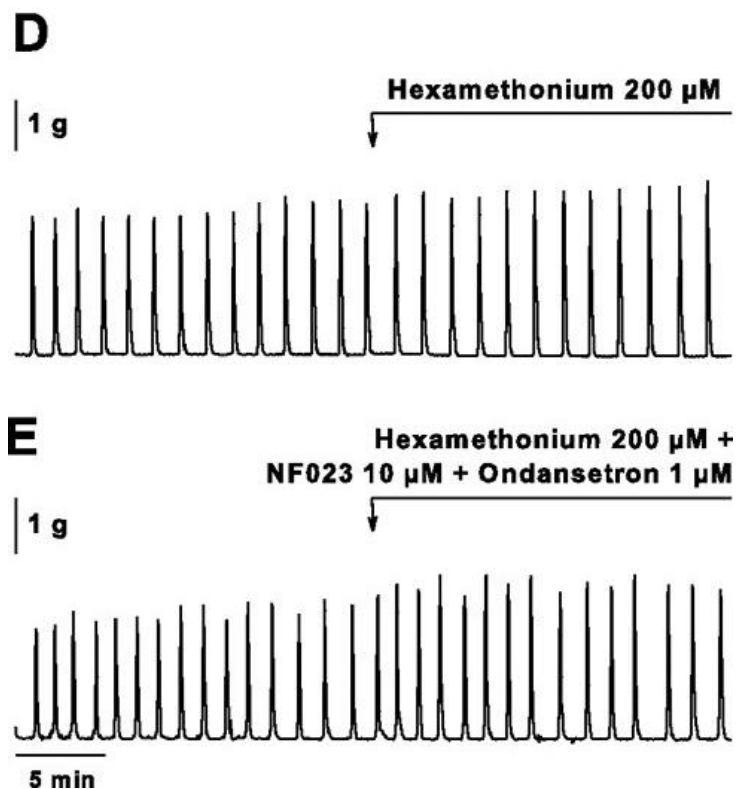
Лігандкеровані іонні канали (ЛКІК) або іонотропні рецептори – це рецептори плазматичної мембрани, субодиниці яких об'єднуються з утворенням внутрішнього іонного каналу. Ці канали відкриваються після активації структури зв'язуванням агоністів зі специфічними сайтами рецептора. Отже, це рецептори, активація яких лігандами спричиняє відкривання іонного каналу, при цьому рецептор або міститься на субодиниці іонного каналу, або утворює з каналом комплекс. ЛКІК об'єднують три надродини – Cys-loop надродину (надродина, представники якої містять специфічну цистеїнову петлю – дисульфідний зв'язок між двома залишками цистеїну; також ця надродина має назву нікотиноїдних рецепторів), надродину збуджуючих іонотропних глутаматних рецепторів та надродину іонотропних пуринергічних рецепторів P2X.

Кожна субодиниця представників рецепторів надродини Cys-loop має чотири трансмембранні фрагменти (M1-M4) і жодної пороформуючої петлі. Іонний канал формують п'ять субодиниць (пентаметр). Основними представниками цієї надродини є рецептори: нікотинові ацетилхолінові (nAChRs),  $\gamma$ -аміномасляної кислоти A ( $GABA_A$ ), гліцинові (GlyRs), серотонінові третього типу (5-HT<sub>3</sub>Rs).

Нейрональні нікотинові ацетилхолінові рецептори (nnAChRs) можуть формуватись або як гетеропентамери з двох  $\alpha$  ( $\alpha_{2-6}$  та  $\alpha_{10}$ ) та трьох  $\beta$  ( $\beta_{2-4}$ ) субодиниць, або як гомопентамери з  $\alpha$  ( $\alpha_{7-9}$ ) субодиниць. Найчастіше зустрічаються комбінації з субодиниць  $\alpha_4\beta_2$  (мозок),  $\alpha_3\beta_4$  (симпатичні ганглії) та  $\alpha_7$  (пресинаптичні терміналі). У випадку периферичного розташування ці рецептори модулюють вивільнення нейромедіаторів. nnAChRs відносно більш проникні до двовалентних катіонів порівняно з

mнAChRs: їхня провідність до  $\text{Ca}^{2+}$  порівняно з  $\text{Na}^{+}$  варіює в межах від 1,5 до 20,0 відносних одиниць.

Рецептори nAChRs та 5-HT<sub>3</sub>Rs експресуються у периферичних нейронах, які іннервують стінки травного тракту. Антагоністом nAChRs є сполука **гексаметоній**, а антагоністом 5-HT<sub>3</sub>Rs – сполука **ондансетрон**. Обидві ці речовини дещо посилюють моторику кишечника (Рис. 11).



**Рис. 1.** Ефекти аплікування антагоністів nAChRs (гексаметонію) та суміші nAChRs, P2X (NF-023) і 5-HT<sub>3</sub>Rs (ондасетрону) на моторику товстого кишечника морської свинки (запозичено з Gil, V., Gallego, D., Grasa, L., Martín, M. T., & Jiménez, M. (2010). Purinergic and nitrgergic neuromuscular transmission mediates spontaneous neuronal activity in the rat colon. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 299(1), G158–G169. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00448.2009>).

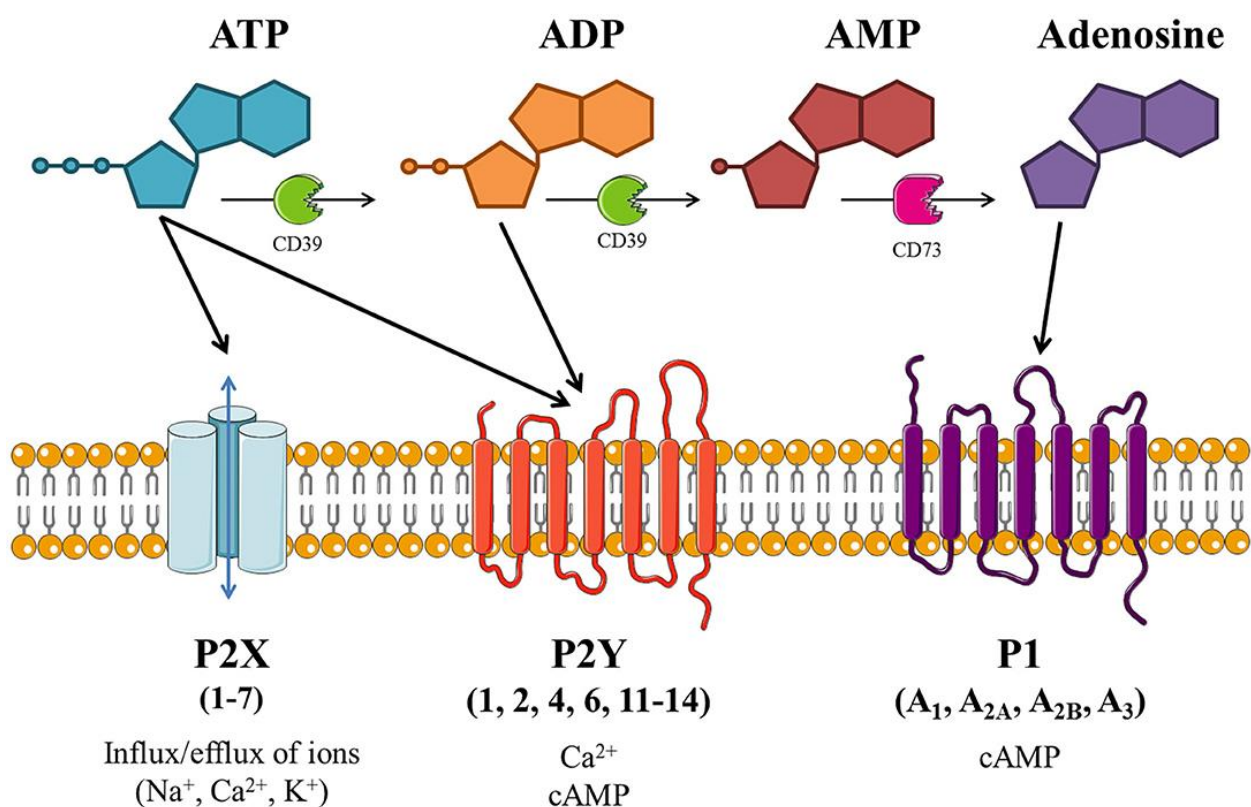
Надродина іонотропних глутаматних рецепторів (GluRs) об'єднує три родини. Усі три представники надродини активуються амінокислотою L-глутаматом, проте на родини їх було розділено за специфічно різною спорідненістю до синтетичних агоністів  $\alpha$ -аміно-5-метил-3-гідрокси-4-ізоксазол пропіонової кислоти (АМПК, АМРА), N-метил-D-аспартаму (НМДА, NMDA) та каїнату.

У тканинах стінки травного тракту експресуються і метаботропні, і іонотропні рецептори. Скоротливий ефект глутамату на гладенькі м'язи кишечника щурів опосередковується декількома GluR (не-NMDA > NMDA > mGluR групи I/II).

Надродина іонотропних пуринорецепторів (P2X) об'єднує ліганд-керовані іонотропні рецептори, які активуються АТФ. Ці рецептори забезпечують нейротрансмісію у синапсах між двома нейронами та між нейроном і гладеньким м'язом, також виконують функцію стимулятора у первинних аферентних терміналях; і врешті, виступають в ролі прозапального активатора в імунних і ендокринних клітинах.

Іонотропні пуринорецептори властиві для збудливих і незбудливих тканин. Вони функціонують у багатьох органах, зокрема вісцеральних гладеньких м'язах та мозку. Канали P2X рецепторів у однаковій мірі проникні до  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  і суттєво – до  $\text{Ca}^{2+}$ .

Оскільки у тканинах організму, зокрема у вісцеральних гладеньких м'язах присутні представники обох надродин: і P2X, і P2Y (спряжені з G-протеїнами) рецептори, які є в обох випадках збуджувальні, їх внесок у регуляцію функціональної активності тканини можна відокремити, зокрема використанням декількох агоністів: АТФ є ефективним агоністом і P2X, і P2Y рецепторів, тоді як ADP, UTP і UDP – ефективні агоністи лише для P2Y рецепторів (Рис. 12).



**Рис. 12.** Схема пуринергічної сигналізації. Позаклітинний АТФ активує рецептори P2X та/або P2Y, таким чином змінюючи внутрішньоклітинні концентрації іонів та/або циклічного аденозинмонофосфату (сAMP). АТФ може бути гідролізований ектонуклеотидазами (включаючи CD39 і CD73), утворюючи аденозиндифосфат (ADP), аденозинмонофосфат (AMP) і аденозин. ADP також здатний активувати рецептори P2Y, тоді як аденозин активує рецептори P1, які модулюють активність аденілатциклази (AC) і змінюють внутрішньоклітинну концентрацію сAMP (запозичено з Thompson Rebecca J., Sayers Ian, Kuokkanen Katja, Hall Ian P. Purinergic Receptors in the Airways: Potential Therapeutic Targets for Asthma? *Frontiers in Allergy*, 2021 DOI 10.3389/falgy.2021.677677).

**Табл. 3** Ефекти блокування пуринергічного сигналу на гладенькі м'язи ШКТ наведено у таблиці (Запозичено з Jiménez, M., Clavé, P., Accarino, A., & Gallego, D. (2014). Purinergic neuromuscular transmission in the gastrointestinal tract; functional basis for future clinical and pharmacological studies. *British journal of pharmacology*, 171(19), 4360–4375. <https://doi.org/10.1111/bph.12802>):

|                        | Purinergic neurotransmission     |
|------------------------|----------------------------------|
| Membrane potential     | No effect                        |
| Spontaneous motility   | No effect/Decrease               |
| Spontaneous IJP        | Inhibition                       |
| EFS-induced IJP        | Inhibition of the fast component |
| EFS-induced relaxation | No effect/Partial reversion      |

Імуноцитохімічно у тканині товстого кишечника щурів продемонстровано експресію рецепторів P2Y(1), P2Y(6) і P2X(1) на клітинах гладеньких м'язів і рецепторів P2Y(2), P2Y(12), P2X(2) і P2X(3) у міоентеріальному сплетенні; майже чверть P2Y(2)-імунопозитивних нейронів коекспресує nNOS. Активація пуринорецепторів P2 супроводжується транзиторне розслаблення, яке потім змінюється на тривале скорочення. Загалом відомо, що індуковане агоністом рецептора P2Y транзиторне розслаблення смужок гладеньких м'язів клубової кишки щура опосередковується переважно рецептором P2Y1, а також рецепторами P2Y6 та P2Y13, і включає наступну послідовність сигналів:  $G_{q/11}$ -опосередкована активація PLC  $\rightarrow$  активація синтезу  $IP_3$   $\rightarrow$  вивільнення  $Ca^{2+}$  з саркоплазматичного ретикулуму  $\rightarrow$  активація  $Ca^{2+}$ -активованих  $K^+$ -каналів малої провідності (SK) плазматичної мембрани  $\rightarrow$  пригнічення. Ці процеси є незалежними від сигналіngu, активованого ацетилхоліном та не змінюють синтез оксиду азоту (NO).

## ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

### Розчини, які використовуються в роботі:

*Нормальний розчин Кребса* (НРК, у мМ): NaCl - 120.4; KCl - 5.9;  $NaHCO_3$  - 15.5;  $NaH_2PO_4$  - 1.2;  $MgCl_2$  - 1.2;  $CaCl_2$  - 2.5; глюкоза - 11.5 (pH доводять до 7.4 розчинами NaOH або HCl).

*Гіперкалієвий розчин* (ГКР, у мМ): NaCl - 46.3; KCl - 80;  $NaHCO_3$  - 15.5;  $NaH_2PO_4$  - 1.2;  $MgCl_2$  - 1.2;  $CaCl_2$  - 2.5; глюкоза - 11.5 (pH доводять до 7.4 розчинами NaOH або HCl). У цьому випадку ГКР містить 80 мМ  $K^+$ , але залежно від плану експерименту можна використовувати і іншу концентрацію іонів калію для того, щоб змодельовати різний ступінь деполяризації плазматичної мембрани.

Залежно від плану експерименту, агоністи і антагоністи розводять в НРК, додаючи їх стокові розчини у кількості 0,01-1% до кінцевого об'єму.

### Матеріали.

Для виконання роботи необхідно мати 1 л НРК, набір інструментів для очних операцій (мікропінцет і мікроножиці), набір препарувальних голок, дві ванночки з парафіною підложкою (на основі чашки Петрі з парафіною заливкою) та набір склянок для промивання кишки і зберігання готових препаратів.

### Завдання:

1. Приготувати гладеньком'язові препарати кільцевих гладеньких м'язів травного тракту: *caecum* або *antrum* (шириною 1.5 мм та довжиною 12 мм), помістити їх у термостатовану (при 37 °C) камеру. На препарат, прикріплений до системи ізометричного датчика, надати постійного натягу, який відповідає 10 мН. На препарат, прикріплений до системи ізотонічного датчика, надати навантаження 10 мН. Протягом усього експерименту має підтримуватись постійне протікання НРК (8 мл/хв.). У такому стані залишити препарати принаймні на 45 хвилин.

Дослідження сполук-модифікаторів ланок кальцієвого сигналу:

2. Викликати скорочення препаратів гіперкалієвим розчином (40 або 80 мМ), відмити препарати НРК упродовж 15 хв і аплікувати ацетилхолін у концентрації  $10^{-5}$  М;
3. Відмити препарати НРК упродовж 20 хвилин і аплікувати активатор нікотинових ацетилхолінових рецепторів **нікотин** у концентрації  $10^{-4}$  М; спостерігати ефект аплікування нікотину;
4. Відмити препарати НРК упродовж 20 хв та аплікувати блокатор нікотинових ацетилхолінових рецепторів **гексаметоній** (200 мкМ); через 10 хв його дії додати нікотин; спостерігати ефект аплікування нікотину;

5. Відмити препарати НРК упродовж 15 хв та аплікувати гіперкалієвий розчин (40 або 80 мМ);
6. Відмити препарати НРК упродовж 15 хв та аплікувати агоніст пуринорецепторів АТР у концентрації  $10^{-4}$  М; спостерігати ефект АТР;
7. Відмити препарати НРК упродовж 15 хв та аплікувати гіперкалієвий розчин (40 або 80 мМ);
8. Відмити препарати НРК та аплікувати агоніст пуринорецепторів УТР у концентрації  $10^{-4}$  М; спостерігати ефект УТР; порівняти ефекти АТР і УТР.
9. Зробити висновки.

## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Krauss G. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. Fifth, Completely Revised Edition / Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014. - 845 p.
2. Byrne J.H., Heidelberger R., Waxham M.N. FROM MOLECULES TO NETWORKS. An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience. THIRD EDITION / Elsevier Inc., 2014. - 692 p.
3. Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., Scott M.P. MOLECULAR CELL BIOLOGY. SEVENTH EDITION / W. H. Freeman and Company, New York, 2013. - 1247 p.
4. Pollard T., Earnshaw W., Lippincott-Schwartz J., Johnson G. Cell Biology. 3rd Edition / Elsevier, 2017. - 882 p.
5. Textbook of receptor pharmacology / edited by John C. Foreman, Torben Johansen. — 2nd ed. - CRC Press, 2003. - 302 p.
6. Hammond, C. Cellular and molecular neurophysiology. Third edition. - Amsterdam: ELSEVIER, 2008. - 405 p.
7. Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структури і функції / П.Г. Костюк, О.П. Костюк, О.О. Лук'янець – Київ, "Наукова думка", 2010, – 175 с.
8. Шуба Я.М. Основи молекулярної фізіології іонних каналів, Київ., Наукова Думка, 2010, 448 с
9. <https://www.biochemistry-dnu.dp.ua/wp-content/downloads/metodichki/molek-mekh-mizkl-kom-ushakova.pdf>
10. Yang, D., Zhou, Q., Labroska, V., Qin, S., Darbalaei, S., Wu, Y., Yuliantie, E., Xie, L., Tao, H., Cheng, J., Liu, Q., Zhao, S., Shui, W., Jiang, Y., & Wang, M. W. (2021). G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00435-w>.
11. Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annual review of biochemistry*, 87, 897–919. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033910>
12. Cooper D. M. (2003). Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *The Biochemical journal*, 375(Pt 3), 517–529. <https://doi.org/10.1042/BJ20031061>.
13. Offermanns S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Progress in biophysics and molecular biology*, 83(2), 101–130. [https://doi.org/10.1016/s0079-6107\(03\)00052-x](https://doi.org/10.1016/s0079-6107(03)00052-x).
14. Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., & Huang, X. Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of molecular biology*, 428(19), 3850–3868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>.
15. Jackson, L., Qifti, A., Pearce, K. M., & Scarlata, S. (2020). Regulation of bifunctional proteins in cells: Lessons from the phospholipase C $\beta$ /G protein pathway. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 29(6), 1258–1268. <https://doi.org/10.1002/pro.3809>.

16. Haga T. (2013). Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 89(6), 226–256. <https://doi.org/10.2183/pjab.89.226>.
17. Bassler, J., Schultz, J. E., & Lupas, A. N. (2018). Adenylate cyclases: Receivers, transducers, and generators of signals. *Cellular signalling*, 46, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.03.002>.
18. Scarlata S. (2019). The role of phospholipase C $\beta$  on the plasma membrane and in the cytosol: How modular domains enable novel functions. *Advances in biological regulation*, 73, 100636. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.100636>.
19. Khannpnavar, B., Mehta, V., Qi, C., & Korkhov, V. (2020). Structure and function of adenylyl cyclases, key enzymes in cellular signaling. *Current opinion in structural biology*, 63, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.03.003>.
20. Textbook of medical physiology. Arthur C. Guyton, John E. Hall, 11th ed. 2006. – 1116 p.
21. Alexander, S. P. H., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., Davies, J. A., & CGTP Collaborators (2019). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: G protein-coupled receptors. *British journal of pharmacology*, 176 Suppl 1(Suppl 1), S21–S141. <https://doi.org/10.1111/bph.14748>.
22. Milligan, G., & Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British journal of pharmacology*, 147 Suppl 1(Suppl 1), S46–S55. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706405>.
23. Offermanns S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Progress in biophysics and molecular biology*, 83(2), 101–130. [https://doi.org/10.1016/s0079-6107\(03\)00052-x](https://doi.org/10.1016/s0079-6107(03)00052-x).
24. Kankanamge, D., Tennakoon, M., Karunarathne, A., & Gautam, N. (2022). G protein gamma subunit, a hidden master regulator of GPCR signaling. *The Journal of biological chemistry*, 298(12), 102618. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102618>.
25. Delmas, P., Coste, B., Gamper, N., & Shapiro, M. S. (2005). Phosphoinositide lipid second messengers: new paradigms for calcium channel modulation. *Neuron*, 47(2), 179–182. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.07.001>.
26. Давидовська Т.Л., Цимбалюк О.В., Грабчук Г.П., Войтешенко І.С., Нипорко О.Ю., Федоренко Т.В., Науменко А.М., Латищенко Л.А. Фізика біосистем у формулах, термінах, схемах. Київ, Видавництво ЦП "КОМПРИНТ" 2017 р., 210 с.
27. Garcia, M. A., Nelson, W. J., & Chavez, N. (2018). Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(4), a029181. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029181>
28. Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Mar 1;3(3):a004994. doi: 10.1101/cshperspect.a004994. PMID: 21421922; PMCID: PMC3039929.

29. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res.* 2010 Jan;339(1):269-80. doi: 10.1007/s00441-009-0834-6. Epub 2009 Aug 20. PMID: 19693543; PMCID: PMC2784866.
30. Michael M, Parsons M. New perspectives on integrin-dependent adhesions. *Curr Opin Cell Biol.* 2020 Apr;63:31-37. doi: 10.1016/j.ceb.2019.12.008. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31945690; PMCID: PMC7262580.
31. Hartsock, A., & Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta*, 1778(3), 660–669. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012>.
32. Scalise, A. A., Kakogiannos, N., Zanardi, F., Iannelli, F., & Giannotta, M. (2021). The blood-brain and gut-vascular barriers: from the perspective of claudins. *Tissue barriers*, 9(3), 1926190. <https://doi.org/10.1080/21688370.2021.1926190>.
33. Kobilka BK, Deupi X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2007 Aug;28(8):397-406. doi: 10.1016/j.tips.2007.06.003. Epub 2007 Jul 13. PMID: 17629961.
34. Deupi X, Kobilka B. Activation of G protein-coupled receptors. *Adv Protein Chem.* 2007;74:137-66. doi: 10.1016/S0065-3233(07)74004-4. PMID: 17854657.
35. Gomperts B.D., Tatham P.E.R., Kramer I.M. *Signal Transduction*, 1st Edition, Academic Press; 2003, 440 p.
36. Milovanovic, D. R., & Jankovic, S. M. (2002). A pharmacological analysis of the contractile effects of glutamate on rat and human isolated gut smooth muscle strips. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 24(10), 661–668. <https://doi.org/10.1358/mf.2002.24.10.802315>

## ЗМІСТ

|                                                                                                                | сторінка |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Лабораторна робота 1. Вивчення дії речовин – агоністів та антагоністів рецепторів, спряжених з G-протеїнами    | 3        |
| Лабораторна робота 2. Вивчення дії речовин – агоністів та антагоністів мускаринових ацетилхолінових рецепторів | 29       |
| Лабораторна робота 3. Вивчення дії речовин – агоністів та антагоністів адренорецепторів                        | 34       |
| Лабораторна робота 4. Вивчення дії речовин – модифікаторів кальцієвого сигналу                                 | 39       |
| Лабораторна робота 5. Вивчення дії речовин – модифікаторів ліганд-керованих іонних каналів                     | 46       |
| Список рекомендованої літератури                                                                               | 53       |