УДК 577.3.01; 577.38; 577.3.001.57
№ державної реєстрації 0121U111603
Інв. №

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, тел: 239-31-25

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з наукової роботи
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
професор _____Ганна ТОЛСТАНОВА
«___» _____ 2021 р.

ЗВІТ

про науково-дослідну роботу

за договором від 02.11.2020 р. № 123/2020.01

та договором від 01.06. 2021 р. № 203/01/0543

РАЦІОНАЛЬНИЙ ДИЗАЙН ІНГІБІТОРІВ МУСКАРИНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ АЦЕТИЛХОЛІНУ ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ КОМПОНЕНТІВ КОМБІНОВАНОЇ ТЕРАПІЇ ХРОНІЧНОГО ОБСТРУКТИВНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ (ХОЗЛ) ТА АСТМИ

грантова підтримка Національного фонду досліджень України у межах конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства»
(остаточний)

Науковий керівник НДР
завідувач кафедри, к.б.н, доцент _____Олексій НИПОРКО
(підпис)
(дата)

2021

Результати роботи розглянуто Науково-технічною радою Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
протокол №10 від 09. 12. 2021 р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР
к.б.н., доцент., завідувач кафедри
молекулярної біотехнології
та біоінформатики — Олексій НИПОРКО (реферат, вступ, розділи 1-14, висновки)

Відповідальні виконавці:

Ст. наук. співр.,д.б.н., доцент — Ольга ЦИМБАЛЮК (реферат, розділи 1-14, висновки)

Ст. наук. співр.,к.ф.-м.н. — Іван ВОЙТЕШЕНКО (реферат, розділи 1-14, висновки)

Ст. наук. співр.,к.х.н., с.н.с — Володимир БДЖОЛА (реферат, розділи 1-14, висновки)

Ст. наук. співр.,к.б.н. — Сергій СТАРОСИЛА (реферат, розділ 1-14, висновки)

Провідний інженер — Микола ПРОТОПОПОВ (реферат, розділи 1-14, висновки)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 129 с., 47 рис., 8 табл., 118 джерел

Об'єкт дослідження – взаємодія низькомолекулярних органічних сполук з мускариновими рецепторами ацетилхоліну М3 та М2.

Мета роботи Розробити ефективні та селективні інгібітори мускаринових рецепторів ацетилхоліну, які можуть бути використані як компоненти комбінованої терапії хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) та астми.

Методи дослідження – структурний аналіз *in silico*, молекулярний докінг, високопропускний віртуальний скринінг, молекулярна динаміка, тензометрія, фармакодинаміка, механокінетичний аналіз, фармакофорний аналіз.

Результати і новизна. Реконструйовано просторову структуру повномірних mAChRs рецепторів М2 та М3. На поверхні цих рецепторів ідентифіковано сайти зв'язування низькомолекулярних органічних сполук. Проведено молекулярний докінг колекції органічних сполук (понад 150000) в знайдені сайти зв'язування антагоністів та агоністів та сформовано бібліотеку сполук – потенційних інгібіторів мускаринових рецепторів ацетилхоліну. 23 сполуки, що характеризувались найнижчими значеннями скорінгової функції, було відібрано для дослідження їх інгібувальної активності щодо mAChRs. В результаті дослідження фармакологічних і кінетичних ефектів і параметрів дії обраних на інтактних багатоклітинних препаратах дихальних шляхів було встановлено, що 8 з 23 досліджуваних сполук проявляють інгібувальну активність щодо мускаринових рецепторів ацетилхоліну з константами інгібування IC_{50} в межах від $4{,}68 \cdot 10^{-7}$ до $2.09 \cdot 10^{-8}$. При цьому 3 досліджувані сполуки виявились не лише ефективними, а і селективними інгібіторами рецепторів М3 mAChRs (середні значення IC_{50} становлять $5{,}25 \cdot 10^{-8}$ М, $2{,}45 \cdot 10^{-8}$ М та $1{,}62 \cdot 10^{-7}$ М, відповідно), які є функціонально головним типом ацетилхолінових рецепторів дихальних шляхів, забезпечують їх скорочення та звуження просвіту, а також регуляцію секреторної активності слизових залоз. На основі аналізу залежності активності від хімічної структури було створено фармакофорну модель активності виявлених сполук та створено стратегію оптимізації активності та селективності сполук на основі знайдених класів, які проявили найбільші інгібіторні властивості щодо М3-холінорецепторів. В результаті оптимізації сформовано бібліотеку з 25 сполук, серед яких були виявлені 3 нові селективні інгібітори М3 рецепторів із покращеними значеннями констант інгібування $3{,}09 \cdot 10^{-9}$ М, $3{,}72 \cdot 10^{-9}$ М та $3{,}39 \cdot 10^{-10}$ М, що відповідає константам інгібування, характерним для лікарських засобів і свідчить про ефективність обраної стратегії вдосконалення інгібіторів. Таким чином, розроблені селективні інгібітори М3 рецепторів можуть розглядатись як готові прототипи лікарських препаратів проти ХОЗЛ та астми, які можна використовувати в предклінічних дослідженнях.

Ключові слова: mAChRs, хронічне обструктивне захворювання легень, біомолекулярне розпізнавання, молекулярний докінг, комп'ютерне моделювання, структурний аналіз, гладенькі м'язи дихальних шляхів, інгібітори, віртуальний скринінг.

Умови одержання звіту: за договором. 03171, Київ-171, вул. Горького, 180, УкрІНТЕІ.

ABSTRACT

Report on research work: 129 pages, 47 figures, 8 tables, 118 sources
The object of research - interaction of small molecular organic compounds with muscarinic acetylcholine receptors M3 and M2.
Purpose of the work – to develop the effective and selective inhibitors of muscarinic acetylcholine receptors that can be used as components of combination therapy for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma.
Research methods - structural analysis *in silico*, molecular docking, high-throughput virtual screening, molecular dynamics, tensometry, pharmacodynamics, mechanokinetic analysis, pharmacophore analysis.
Results and novelty. The spatial structure of full-length mAChRs receptors M2 and M3 was reconstructed. Binding sites of low molecular weight organic compounds have been identified on the surface of these receptors. Molecular docking of an organic compounds collection (over 150,000) was performed in the found antagonist and agonist binding sites, and library of potential muscarinic acetylcholine receptors inhibitors was formed. 23 compounds with the lowest scoring function values were selected to study their mAChRs inhibitory activity. As a result of the pharmacological and kinetic effects study on intact cells, it was found that 8 of the 23 compounds show inhibitory activity against mAChRs with IC50 inhibition constants in the range from $4.68 \cdot 10^{-7}$ to $2.09 \cdot 10^{-8}$. Three tested compounds were not only effective but also selective against M3 mAChRs (mean IC50 values are $5.25 \cdot 10^{-8}$ M, $2,45 \cdot 10^{-8}$ M and $1.62 \cdot 10^{-7}$ M, respectively). These receptors are functionally the main type of acetylcholine receptors in the respiratory tract, providing their reduction and narrowing of the lumen, as well as regulation of mucous glands secretory activity. Based on the SAR analysis, a pharmacophore model of the detected compounds activity was created and a strategy for optimizing the activity and selectivity of compounds was developed, based on the found chemical classes of compounds with the best inhibitory activity against M3-cholinoreceptors . As a result of optimization, a library of 25 compounds was formed, among which 3 new selective inhibitors of M3 receptors were identified with improved values of inhibition constants $3.09 \cdot 10^{-9}$ M, $3.72 \cdot 10^{-9}$ M and $3.39 \cdot 10^{-10}$ M , which corresponds to the inhibition constants characteristic of drugs and indicates the effectiveness of the chosen strategy to improve inhibitors. Thus, the developed selective M3 receptor inhibitors can be considered as ready-made prototypes of drugs against COPD and asthma that can be used in preclinical studies.
Key words: mAChRs, chronic obstructive pulmonary disease, biomolecular recognition, molecular docking, computer simulation, structural analysis, airway smooth muscle, inhibitors, virtual screening.
Terms of the report receipt: under the contract. 03171, Kyiv-171, Gorky str., 180, UkrISTEI.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ..... 7
ВСТУП 8
РОЗДІЛ 1. Сучасний стан проблеми 9
РОЗДІЛ 2. Відпрацювання, оптимізація та стандартизація протоколів структурного аналізу *in silico*..... 14
РОЗДІЛ 3. Відпрацювання, оптимізація та стандартизація протоколів високопропускного віртуального скринінгу 17
РОЗДІЛ 4. Відпрацювання, оптимізація та стандартизація протоколів біологічного тестування сполук – потенційних інгібіторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів 22
4.1. Дослідження скоротливої активності м'язів..... 22
4.2.Аналіз скорочувальних відповідей 23
4.3. Результати та їх обговорення..... 24
РОЗДІЛ 5. Відпрацювання та стандартизація протоколів хімічної оптимізації 30
РОЗДІЛ 6. Реконструкція та детальний аналіз особливостей просторової структури mAChRs..... 33
РОЗДІЛ 7. Ідентифікація сайтів зв'язування органічних сполук на поверхні mAChRs 37
7.1 Області зв'язування на поверхні М3 рецептора 37
7.2 Області зв'язування на поверхні М2 рецептора 40
РОЗДІЛ 8. Молекулярний докінг колекції органічних сполук в знайдені сайти зв'язування антагоністів та агоністів 43
РОЗДІЛ 9. Відбір лігандів для дослідження їх інгібувальної активності щодо mAChRs. 48

РОЗДІЛ 10. Вивчення фармакологічних і кінетичних ефектів і параметрів дії сполук-інгібіторів на інтактних багатоклітинних препаратах дихальних шляхів щурів та мурчаків. 53
10.1 Методологія дослідження 53
10.2. Результати та їх обговорення 55
РОЗДІЛ 11. Аналіз залежності активності від хімічної структури та створення стратегії оптимізації активності та селективності сполук 75
РОЗДІЛ 12. Оптимізація фізико-хімічних параметрів найбільш селективних та активних інгібіторів mAChRs для покращення біодоступності та зменшення токсичності сполук. 82
РОЗДІЛ 13. Біологічне тестування оптимізованих сполук з високою інгібувальною активністю щодо mAChRs, покращенною біодоступністю та зменшеною токсичністю: встановлення фармакологічних і кінетичних ефектів і параметрів дії сполук 94
РОЗДІЛ 14. ОБГОВОРЕННЯ 109
ВИСНОВКИ 113
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ 116

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ

АСО - синдром перекриття астми та ХОЗЛ (asthma-COPD overlap)

COPD - хронічне обструктивне захворювання легень (chronic obstructive pulmonary disease)

CR - співвідношення еквіефективних за фізіологічною реакцією концентрацій агоніста в контролі та за присутності антагоніста

IC_{50} - молярна концентрація антагоніста, яка зменшує фізіологічну реакцію на дію агоніста на 50%

ICS - інгаляційні кортикостероїди

LABA - агоніст β2-адренорецепторів тривалої дії (β2-адреноміметик тривалої дії)

LAMA - антагоніст мускаринових ацетилхолінових рецепторів тривалої дії (холінолітик тривалої дії)

M - середнє арифметичне

mAChR - мускариновий ацетилхоліновий рецептор

pK_B - від'ємний десятковий логарифм молярної концентрації антагоніста, при якій потрібно подвоєння концентрації агоніста для отримання аналогічної фізіологічної відповіді

SABA - агоніст β2-адренорецепторів короткої дії (β2-адреноміметик короткої дії)

SAMA - антагоніст мускаринових ацетилхолінових рецепторів короткої дії (холінолітик короткої дії)

SEM - стандартна похибка середнього

R^2 - коефіцієнт детермінації

ВООЗ - Всесвітня організація охорони здоров'я

ФЛСβ - фосфоліпаза Cβ

ХОЗЛ - хронічне обструктивне захворювання легень

цАМФ - циклічний аденозинмонофосфат

ВСТУП

Хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) – патологія, яке характеризується не повністю зворотнім обмеженням прохідності повітроносних шляхів. За прогнозами ВООЗ до 2030 року, хронічне обструктивне захворювання легень є третьою за своєю летальністю хворобою в світі. В Україні щонайменше 4% населення хворіє на ХОЗЛ та близько 2% летальних випадків у нашій державі зумовлено цією хворобою; у світі захворюваність на ХОЗЛ серед населення у віці понад 60 років коливається від 7,8 до 19,7 %. Наразі існує близько 20 препаратів, що використовують для терапії ХОЗЛ, але всі вони характеризуються неселективною дією і спричиняють небезпечні побічні ефекти, одними з яких є інфаркт міокарду. Таким чином наразі існує гостра потреба в розробці селективних ліків проти хронічного обструктивного захворювання легень. Одним із можливих шляхів впливу на розвиток хронічного обструктивного захворювання легень – застосування інгібіторів мускаринових рецепторів. Гіперактивність мускаринових рецепторів у гладенькомʼязових стінках повітроносних шляхів призводить до стабільного зменшення величини дихального отвору, хронічної гіповентиляції легень, що є одною з ключових причин розвитку астми, а при несприятливих умовах призводить до розвитку ХОЗЛ. Тому метою даного проєкту є розробка інгібіторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів, що здатні селективно розслабляти гладенькомʼязову тканину в стінках повітроносних шляхів. Для досягнення цієї мети нами застосовується методологія раціональної розробки лікарських засобів, з використанням компʼютерного структурно-біологічного аналізу і моделювання, рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу, біологічного тестування із використанням препаратів повітроносних шляхів і вісцеральних гладеньких мʼязів та сучасної комбінаторної хімії.

РОЗДІЛ 1. Сучасний стан проблеми

Бронхіальна астма (астма) – це найбільш поширене захворювання дихальної системи людини (код МКХ10 – J45), що характеризується хронічним запаленням повітроносних шляхів. Воно супроводжується появою дихальних симптомів: періодичним обмеженням об'єму видихуваного повітря, хрипами, задишкою та відчуттям стискання в грудях [1-3]. В залежності від етіологічних, патофізіологічних та клінічних властивостей, виділяють чотири фенотипи астми: алергійну (атопічну), неалергійну (неатопічну), персистуючу астму з пізнім початком, а також астму, індуковану ожирінням [3-5]. Походження і тяжкість протікання астми визначаються генетичними факторами і впливом несприятливих умов навколишнього середовища, до яких можна віднести алергени, промислове забруднення повітря, тютюнопаління, вірусні інфекції, ожиріння. Так, хоча у більшості випадків дебют бронхіальної астми спостерігається у дитинстві, це захворювання також може з'явитись у дорослому віці; в останньому випадку астма зазвичай не супроводжується алергічними проявами [3]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) загальносвітова кількість людей з діагностованою астмою складає понад 300 млн., причому ця патологія суттєво більше представлена у країнах з розвинутою економікою (близько 10% від загальної кількості населення) порівняно з державами з низьким валовим внутрішнім продуктом (до 1% населення) [2, 6].

Патологія хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ, chronic obstructive pulmonary disease – COPD; код МКХ10 – J44) характеризується стійкими дихальними симптомами, перш за все, – стійким, прогресуючим обмеженням потоку повітря [3, 7, 8]. У процесі розвитку ХОЗЛ обмеження прохідності повітроносних шляхів зазвичай прогресує та супроводжується перебудовою стінки повітроносних шляхів, розвитком запальних реакцій, позалегеневих системних ефектів та супутніх захворювань [9, 10]. Оскільки головним індуктором ХОЗЛ є систематичний подразнюючий вплив на повітроносні шляхи шкідливих часток і газів, патологічні зміни в

тканинах дихальної системи посилюються під дією несприятливих екологічних умов від викидів забруднюючих газів повітря, а також при інфекційних захворюваннях. За прогнозами ВООЗ до 2030 року, хронічне обструктивне захворювання легень стане третьою за своєю летальністю хворобою в світі. В Україні щонайменше 4% населення хворіє на COPD та близько 2% летальних випадків у нашій державі зумовлено цією хворобою; у світі захворюваність на COPD серед населення у віці понад 60 років коливається від 7,8 до 19,7 % [11, 12].

Врешті, хоча розвиток патологічних процесів при захворюваннях на астму і ХОЗЛ відбувається за різними механізмами та активуються різнорідними причинами спричинених різними патогенезами, існує також тип патології відомий як синдром перекриття астми та ХОЗЛ (asthma-COPD overlap – ACO) [1, 3, 13, 14]. ACO характеризується стійким обмеженням повітряного потоку з кількома ознаками, властивими астмі, та декількома – характерними для ХОЗЛ.

Для терапії астми вибірково або комбіновано використовують декілька груп фармакологічних засобів: інгаляційні кортикостероїди (ICS), пероральні кортикостероїди, β2-адреноміметики тривалої дії (LABA), β2-адреноміметики короткої дії (SABA), антагоністи мускаринових ацетилхолінових рецепторів тривалої дії (LAMA), антагоністи мускаринових ацетилхолінових рецепторів короткої дії (SAMA), антагоністи лейкотрієнових рецепторів, теофілін, кромолін, а також у окремих випадках – терапія IgE-специфічними моноклональними антитілами [2, 15-19].

Одним із можливих шляхів впливу на розвиток хронічного обструктивного захворювання легень – застосування інгібіторів мускаринових рецепторів [2, 13]. Мускаринові ацетилхолінові рецептори – це трансмембранні рецептори, що відносяться до надродини серпентинових рецепторів і забезпечують цілу низку важливих фізіологічних функцій, зокрема, формування пам’яті, регулювання базального напруження і моторики гладеньких м’язів повітроносних шляхів, травного тракту і сечостатевої

системи, зниження частоти серцевих скорочень [21-24]. Експериментально доведено що гіперактивність мускаринових рецепторів у гладенькоm'язових стінках повітроносних шляхів призводить до стабільного зменшення величини дихального отвору, хронічної гіповентиляції легень, що є одною з ключових причин розвитку астми, а при несприятливих умовах призводить до розвитку COPD [2, 4, 25]. На тепер протокол лікування COPD передбачає використання препаратів, які діють на адренорецептори, мускаринові холінорецептори. Це β2-адреноміметики короткочасної дії (SABA): сальбутамол і фенотерол, тривалої дії (LABA): сальметерол, форметерол, індакатерол, вілантерол, фуро атом і умеклідініум. Також холінолітики короткочасної дії (SAMA), зокрема іпратропію бромід, та тривалої дії (LAMA): тіотропій, глікопропіонію бромід, умеклідинію бромід і аклідинію бромід [26]. Зазначені препарати через недостатню селективність щодо відповідних мішеней спричиняють ряд шкідливих побічних реакцій. Зокрема, тіотропій здатний взаємодіяти з TRPV1- рецептором (ванілоїдним рецептором), розташованим в клітинах нервової системи і кардіоміоцитах, і його модулюючий вплив на ці рецептори є вельми неоднозначним – на фізіологічному рівні наслідком може бути як легка ейфорія та зниження больових відчуттів, так і інфаркт міокарда. Таким чином, проблема лікування COPD в Україні та світі не вирішена повністю і існує гостра потреба в розробці нових селективних препаратів, що діятимуть саме на гладенькі м'язи повітроносних шляхів, розслаблюючи їх, тим саме попереджаючи гіповентиляцію легень.

Мускаринові ацетилхолінові рецептори – представники надродини рецепторів, асоційованих з G-білками (клас А). Насьогодні для мускаринових ацетилхолінових рецепторів (мускаринових холінорецепторів) відомо 5 підтипів, які позначають М1, М2, М3, М4 і М5 [27, 28]. Кожен підтип відрізняється за первинною структурою молекули і кодується окремими генами, що специфічно експресуються в різних тканинах і органах. Так, мускаринові холінорецептори присутні у багатьох органах-мішенях автономної нервової системи. М2-холінорецептори переважають в серцевому

та вісцеральних гладеньких м'язах; М3-рецептори зазвичай функціонують в комплексі з М2-рецепторами, домінуючи в екзокринних залозах [29, 30]. У дихальних шляхах М3-холінорецептори забезпечують посилення секреції слизу і звуження просвіту [31-33].

Підтипи mAChRs класифікують на дві групи за подібністю поліпептидного ланцюга і схожою функцією. Підтипи М1, М3 і М5 спряжені з нечутливими до коклюшного токсину $G_{q/11}$-білками, а їх ефекторним ензимом є фосфоліпаза Cβ (ФЛСβ, підтипи 1-4), а вторинні посередники, які синтезуються при їх активації – інозитол-1,4,5-трифосфат і діацилгліцерол. Кінцевим виразним ефектом активації цих рецепторів є мобілізація іонів Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо; також їх активація супроводжується стимулюванням ефекторних ферментів – фосфоліпаз А2 і D, а також тирозинкіназ [34-37]. Стимулювання M_2 і M_4 холінорецепторів призводить до активації чутливих до кашлюкового токсину $G_{i/o}$-білків і, як наслідок, інгібування аденілатциклази. Головним внутрішньоклітинним ефектом при цьому є зниження внутрішньоклітинної концентрації цАМФ. Додатково M_2 і M_4 рецептори здійснюють стимуляцію фосфоліпази A_2. У випадку, коли ці рецептори надлишково експресуються в клітинах, вони також можуть неспецифічно активувати ФЛСβ (підтипи 2 і 3) субодиничним комплексом $G_{\beta\gamma}$ [38-40].

У тканинах дихальної системи людини надійно ідентифіковано М1-, М2- та М3-підтипи мускаринових холінорецепторів [31, 41, 42], де вони «спеціалізуються» на виконанні окремих фізіологічних функцій. Так, рецептори М1-підтипу, розташовуються в парасимпатичних гангліях та стінках альвеол; у першому випадку вони полегшують холінергічну нейротрансмісію та опосередковують холінергічні рефлекси [43, 44].

Мускаринові ацетилхолінові рецептори М2 підтипу – домінуючі за кількістю в міоцитах повітроносних шляхів. М2-рецептори, по-перше, функціонують як авторецептори постгангліонарних холінергічних нейронів, пригнічуючи вивільнення ацетилхоліну і цим самим спрацьовуючи як

ключова частина системи фізіологічного контролю зі зворотнім зв'язком [45, 46]. Блокування сигналізації через цей підтип холінорецепторів (наприклад, неселективними антагоністами холінорецепторів атропіном чи іпратропієм або селективним антагоністом М2-рецепторів галламіном) суттєво посилює бронхоспазм, індукований стимулюванням блукаючого нерва. Окремі дані літератури вказують на те, що порушення сигналінгу через М2-холінорецептори може спричинятись запаленням дихальних шляхів та супроводжуватись при цьому астматичною патологією; такий патологічний ланцюг подій може посилювати холінергічні вагусні рефлекси та обумовлювати напад астми за дії ефекторів β-адренорецепторів [4, 47, 48].

Експресія мускаринових ацетилхолінових рецепторів М3-підтипу в міоцитах дихальних шляхів суттєво менша за її рівень для рецепторів М2-підтипу (співвідношення М2:М3 = 4:1) [4, 49]. Однак саме М3-рецептори опосередковують скорочення цих клітин, оскільки їх активація призводить до індукованого інозитол-1,4,5-трифосфату вивільнення іонів Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулуму та забезпечення Ca^{2+}/кальмодулін-опосередкованої активації скорочувальних протеїнів [50, 51]. Також М3-холінорецептори переважають у тканинах підслизових залоз і ендотелію судин дихальних шляхів [52-54]. Тож препарати-холінолітики зі специфічною дією саме на М3-холінорецептори можуть бути найбільш перспективними LAMA і SAMA для терапії обструкції дихальних шляхів при астмі і ХОБЛ [52, 55 - 57].

РОЗДІЛ 2. Відпрацювання, оптимізація та стандартизація протоколів структурного аналізу *in silico*

Сьогодні методи *in silico* досліджень використовують широкий вибір підходів обчислювальних алгоритмів для виявлення, подальшого ґрунтовного аналізу та систематизації отриманої із різних джерел біологічної та/або медичної інформації. Особливо цікавим і актуальними на сьогодні є дослідження зі створення та оптимізації біохімічних характеристик молекул для покращення афінності до заданих мішеней, виявлення параметрів їхнього зв'язку та токсичності, як фундаментального наслідку їхніх фізико-хімічних характеристик. Тобто, дослідження елементарних фізико-хімічних характеристик ґрунтуючись та теорії атомів у молекулах [58], а також, біологічно важливих водневих зв'язків є однією із центральних задач молекулярної біохімії. Попри помітні теоретичні успіхи, що досягнуто у цій біологічно важливій області знань залишається ряд проблем які потребують значних розрахункових ресурсів та опрацювання великих об'ємів даних.

У рамках даної роботи розроблено та доопрацьовано розширену методику [59-63], яка дозволяє відслідковувати еволюцію усіх фізико-хімічних параметрів, що дозволяють генерувати конформаційне різноманіття, аналізувати таутомеризацію будь-яких Н-зв'язаних комплексів для подальшого раціонального дизайну інгібіторів мускаринових рецепторів ацетилхоліну. Розроблено програмний скрип генерації просторових координат із заданим кроком для будь-якої внутрішньої координати або набору координат досліджуваних сполук (приклад скрипта наведено у додатку А) та підготовки отриманих геометрій для наступного аналізу у загальновживаних програмних пакетах для *in silico* пошуку [64-65]. Перевага між існуючими аналогами, що частково реалізовані у сторонніх програмних пакетах полягає у одночасному варіюванні необхідної кількості параметрів і тонкому налаштуванні кроку по кожному із них. Особливу увагу приділено ідентифікації водневих зв'язків і дослідженню їхніх структурних та фізико-хімічних параметрів у молекулах лігандів-антагоністів мускаринових

рецепторів: атропіну та іпратропію броміду, а також молекул агоністів - ацетилхоліну та карбахолу. Для чого також, підготовано програмні скрипти, що значно полегшують та пришвидшують рутинну обробку великих масивів даних. Приклад аналізу енергій водневих зв'язків [58,66-68] умовного комплексу в графічному вигляді наведено на рис. 2.1. Аналогічні залежності можна знімати для будь-яких фізико-хімічних параметрів молекул чи молекулярного комплексу, а саме зміну внутрішніх геометричних координат: відстані між атомами, валентними та двогранними кутами. Серед фізико-хімічних характеристик – це енергія системи, дипольний момент, парціальні заряди на атомах, електронна густина та лаплас електронної густини. Наведений перелік може бути розширений під нову характеристику, що вимагається, а вже згадані характеристики можуть у подальшому бути використані, додатково, наприклад, для параметризації нових або уточнення відомих силових полів при молекулярно динамічному моделюванні. Скрипти, що відповідають даним задачам не наводяться через значний об'єм і за необхідності можуть бути адаптовані під наступні задачі проєкту. Загалом згаданий підхід дозволяє максимально деталізовано розглянути яким чином еволюціонують фізико-хімічні та геометричні характеристики під час актів хімічних реакцій або в процесах конформаційних перебудов молекул між локальними мінімумами.

Згадані конформери лігандів будуть у подальшому використані в експериментальних дослідженнях *in vitro,* а програмні скрипти застосовані для аналізу та пошуку нових потенційних лігандів з кращими характеристиками афінності.

.

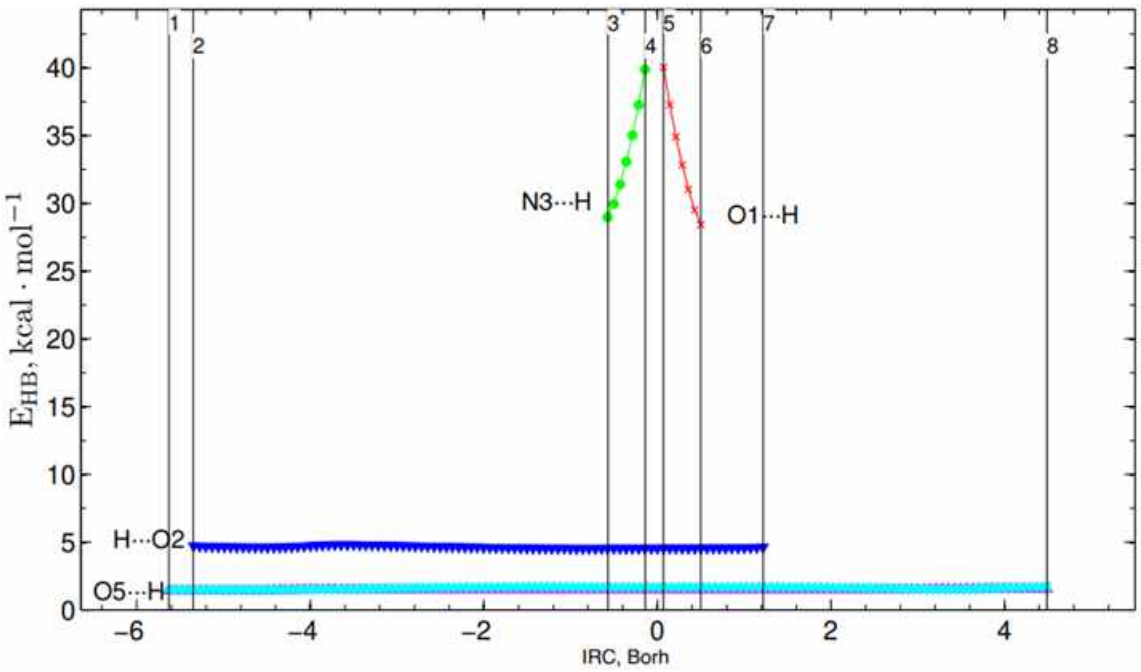


Рис. 2.1. Приклад залежності енергій водневих зв’язків вздовж координати реакції, цифрами з вертикальними лініями виділені межі існування кожного зв’язку, (N3, O1, O2, O5, H – атоми, що утворюють зв'язки). Зв'язок O5…H - існує весь час реакції (від 1 до 8), O2…H – існує на початкових стадіях реакції (від 2 до 7), N3…H (від 3 до 4) та O1…H (від 5 до 6) – короткоживучі водневі зв’язки, що виникають в процесі переносу протону – таутомеризації. Аналогічні дослідження можна застосувати для конформаційних перебудов або міжмолекулярних взаємодій молекул. Енергії зв’язків оцінено відповідно до [58, 68].

РОЗДІЛ 3. Відпрацювання, оптимізація та стандартизація протоколів високопропускного віртуального скринінгу

В рамках виконання даного завдання було налаштовано комп'ютерний кластер на архітектурі «Beowulf» (див. Рис. 3.1), що дозволяє ефективно розподіляти потужності згідно задач проєкту. Кластер складається з Master-ноди, 6-ти Slave-нод та комутатора. Master-нода – це повноцінний комп'ютер, що складається з центрального процесора, материнської плати, оперативної пам'яті та запам'ятовуючого пристрою. На Master-ноді встановлена операційна система Linux, дистрибутив Ubuntu 14.04, та все необхідне програмне забезпечення, необхідне для проведення розрахунків. Slave-ноди – це комп'ютери, що складаються лише з центрального процесору, материнської плати та оперативної пам'яті. Джерело операційної системи для Slave-нод є Master-нода, операційна система на Slave-ноді завантажується за допомогою PXE протоколу, тобто через мережеву карту. Всі операції на Slave-ноді відбуваються в оперативній пам'яті. Master-нода комутується з Slave-нодами за допомогою швидкісного комутатора, 1000 Гігабіт.

Дана архітектура була реалізована на базі операційної системи Linux, дестрибутив Ubuntu 14.04. Для виконання наступних етапів проєкту буде задіяно 48 ядер з тактовою частотою 4 ГГц. Така система опрацьовує один ліганд в середньому за 140 сек., залежно від розміру ліганду, і за добу здатна проводити обчислення близько 20000 лігандів.

Рис. 3.1. Блок схема кластера побудованого за принципами архітектури «Beowulf».

Наступним кроком було налаштування протоколу віртуального скринінгу. Головним інструментом при виконанні віртуального скринінгу в рамках даного проєкту буде молекулярний докінг програмним забезпеченням AutoDock. Оптимальні параметри для виконання процедури докінгу представлені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Значення озмінних в файлі параметрів програми AutoDock, що забезпечують оптимальну процедуру віртуального скринінга.

Параметр *(оригінальна назва в файлі DPF)*	Значення
Крок поступального руху *(Translation step)*	2 Å
Кут кватерніону *(Quaternion step)*	50°
Торсійний кут *(Torsion step)*	50°
Коефіцієнт торсійної свободи *(Torsional degrees of freedom and coefficient)*	2 / 0.274
Толерантність кластера *(Cluster tolerance)*	2 Å
Зовнішня енергія решітки *(External grid energy)*	1000
Максимальна початкова енергія *(Max initial energy)*	0
Максимальне число спроб *(Max number of retries)*	10000

Число структур у популяції *(Number of individuals in population)*	300
Максимальне число етапів оцінки енергії *(Maximum number of energy evaluations)*	850000
Максимальне число генерацій *(Maximum number of generations)*	27000
Кількість структур, які переходять до наступної генерації *(Number of top individuals to survive to next generation)*	1
Рівень генної мутації *(Rate of gene mutation)*	0,02
Рівень кросоверу *(Rate of crossover)*	0,8
Спосіб кросоверу *(Mode of crossover)*	arithmetic
Альфа параметр розподілу Гауса *(Alpha parameter of Cauchy distribution)*	0
Бета параметр розподілу Гауса *(Beta parameter Cauchy distribution)*	1
Кількість запусків генетичного алгоритму Ламарка *(Number of Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) runs)*	50

Для автоматизації процесу віртуального скринінгу був написаний Bash-скрипт для оболонки UNIX. Основою роботи скрипта є відкритий програмний пакет «GNU parallel», що здатний ідентифікувати кількість ядер та розподіляти аргументи згідно заданих параметрів. В якості аргумента використовується ліганди, тобто загальну кількість лігандів рівномірно розподіляють між 48 ядер кластеру. В середині скрипта є багато змінних та допоміжних скриптів, що дозволяють гнучко його налаштовувати. Приклад скрипта вказаний нижче:

```
#!/bin/sh
...
## SCRIPT
#echo "Підготовка ліста аргументів"
dir mol2 -1 >$listName
```

```
sed -e s/.mol2//g -i $listName
echo "Створення pdbqt-файлів"
cat $listName | parallel -j+0 --progress vega ./mol2/{}.mol2 -f pdbqt -p autodock -j autodock -o ./pdbqt/LOut{}.pdbqt -r apolar -q all
echo "Створення dpf-файлів"
cat $listName | parallel -j+0 --progress $way/prepare_dpf42.py -l ./pdbqt/LOut{}.pdbqt -r ./$RECETOR_NAME.pdbqt -i ./param -o ./dpf/LOut{}.dpf
echo "Заміна шляхів"
cat $listName | parallel -j+0 --progress 'sed -e s/LOut/"\.\/pdbqt\/LOut"/g -i ./dpf/LOut{}.dpf'
echo "Заміна в параметр файлі 1"
cat $listName | parallel -j+0 --progress sed -e $sedscript1 -i ./dpf/LOut{}.dpf
echo " Заміна в параметр файлі 2"
cat $listName | parallel -j+0 --progress sed -e $sedscript2 -i ./dpf/LOut{}.dpf
echo " Заміна в параметр файлі 3"
cat $listName | parallel -j+0 --progress sed -e $sedscript3 -i ./dpf/LOut{}.dpf
cat $listName | parallel -j+0 --progress 'sed -e s/"NSP9\.pdbqt/NSP9/g" -i ./dpf/LOut{}.dpf'
echo "Docking"
cat $listName | parallel -j+0 --progress --workdir $PVD $node './autodock4 -p ./dpf/LOut{}.dpf -l ./dlg/LDOut{}.dlg'

echo "Скор - функія"
cat $listName | parallel -j+0 --progress ./summarize_docking.py -l ./dlg/LDOut{}.dlg -b -o ./LOG_"$RECETOR_NAME"_"$data".txt -a -k -r ./$RECETOR_NAME.pdbqt
echo "Prepare pdbqt_out"
cat $listName | parallel -j+0 --progress $way/write_lowest_energy_ligand.py -f ./dlg/LDOut{}.dlg -o ./pdbqt_out/LDOut{}.pdbqt -v
echo "Prepare mol2_out"
cat $listName | parallel -j+0 --progress ./p_molscr2.sh {}
cat $listName | parallel -j+0 --progress 'sed -e s/LOut1//g -i ./mol2_out/LDOut{}.mol2'
```

Скрипт проводить всі маніпуляції від підготовки лігандів, до проведення молекулярного докінгу та пост обробці даних для подальшого аналізу. Лог файл докінгу оброблюється в програмному пакеті «Microsoft Office» за допомогою програми редагування таблиць Excel, з використанням регулярних виразів та методів статистичної обробки даних.

РОЗДІЛ 4. Відпрацювання, оптимізація та стандартизація протоколів біологічного тестування сполук – потенційних інгібіторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів

4.1. Дослідження скоротливої активності м'язів

Експерименти проводили на самцях щурів лінії Wistar (вага тварин була в межах 230-250 г). Усі маніпуляції з тваринами здійснювали згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Тестування речовин-інгібіторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів здійснювалось методом тензометрії у ізометричному режимі на мультиклітинних препаратах трахеї щурів, що являють собою кільця шириною у середньому 4 мм з інтактною слизовою оболонкою, та містили не менше 4 хрящових кілець [69]. У експериментах використовували фрагменти трахеї від початку біфуркації до ділянки на 1-1.5 см вище біфуркації.

Кільця трахеї вміщували в робочу камеру (об'єм 2 мл) з барботованим оксигенованою газовою сумішшю проточним розчином Кребса (швидкість протікання - 5 мл/хв), термостатовану при 37°С. Препарату трахеї надавали пасивний натяг на рівні 10 мН і залишали на 1 годину; дослідження починали після реєстрації декількох відтворюваних скорочень на аплікування гіперкалєвого розчину, адреналіну (10^{-6} М) та ацетилхоліну (10^{-6} М). Скоротливу активність досліджували в ізометричному режимі за допомогою ємнісного датчика сили; підсилений сигнал реєстрували за допомогою АЦП.

В дослідах використовували розчин Кребса (мМ): 120,4 NaCl; 5,9 KCl; 15,5 $NaHCO_3$; 1,2 NaH_2PO_4; 1,2 $MgCl_2$; 2,5 $CaCl_2$; 11,5 глюкоза; pH розчину становив 7,4. Гіперкалієвий розчин, який містив іони K^+ у концентрації 60 мМ, готували шляхом ізотонічної заміни в вихідному розчині Кребса необхідної частини іонів Na^+ на еквімолярну кількість іонів K^+.

Відпрацювання протоколів біологічних експериментів було здійснено із використанням стандартизованих речовин – агоністів і антагоністів окремих

мембранних рецепторів (мускаринових ацетилхолінових і адренергічних рецепторів), які є важливими для регуляції просвіту повітроносних шляхів. Тестування скорочувальної активності препаратів трахеї здійснювали із використанням активаторів і інгібіторів скорочень: гіперкалієвого розчину, агоністів мускаринових ацетилхолінових (ацетилхоліну і карбахолу) та адренергічних (адреналіну і фенотеролу) рецепторів, а також антагоністів мускаринових ацетилхолінових (атропіну і іпратропію) та адренергічних (пропранололу) рецепторів. Речовини використовували у наступних концентраціях: ацетилхолін – 10^{-9} - 10^{-3} М; карбахол – 10^{-9} - 10^{-3} М; атропін – 10^{-10} - 10^{-5} М, іпратропій – 10^{-10} - 10^{-5} М; пропранолол – 10^{-5} М; адреналін – 10^{-6} М; фенотерол – 10^{-6} М.

4.2.Аналіз скорочувальних відповідей

Криві «концентрація антагоніста-ефект» будували на основі даних тензометричних експериментів, коли концентрації антагоніста мускаринових ацетилхолінових рецепторів (атропіну або іпратропію) кумулятивно збільшували з 10^{-10} - 10^{-5} М (час попередньої інкубації дії кожної концентрації антагоністу становив 30 хв) із використанням проточного розчину Кребса із додаванням антагоніста до відповідних концентрацій. З дозових кривих визначали IC_{50} – концентрацію антагоніста, яка спричиняла пригнічення скорочувальної відповіді вдвічі відносно ацетилхолін-активованого (10^{-6} М) скорочення. Скорочувальні відповіді виражали у відсотках, розрахованих відносно ацетилхолін-активованого (10^{-6} М) скорочення, прийнятого за 100%.

Також були зареєстровані криві «концентрація антагоніста-ефект» на тлі попереднього блокування β2-адренорецепторів їх селективним антагоністом пропранололом (10^{-5} М).

Для відпрацювання протоколів встановлення характеру взаємодії досліджуваної речовини з мускариновими ацетилхоліновими рецепторами були зареєстровані криві «концентрація агоніста-ефект» ацетилхолін- і карбахолін-індукованих скорочень на різних концентрацій антагоніста. Надалі

для встановлення величини афінності сполуки-антагоніста використовували рівняння регресії Шілда. Відповідно до методу Шілда антагоніст-індукований паралельний зсув кривих «концентрація-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 [70, 71].

Експериментальні дані аналізували із використанням програми OriginPro2018. Перевірку вибірок на їх приналежність до нормально розподілених генеральних сукупностей здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Уілка. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували парний t-тест Стьюдента. У всіх випадках достовірними вважали результати за умови $p < 0.05$. Аналіз достовірності апроксимації даних лінійною функцією здійснювали із використанням F-критерію Фішера; коефіцієнти детермінації (R^2) були не нижчими за 0,9. Результати представлені як середнє арифметичне ± стандартна похибка середнього (M±SEM), *n* – кількість дослідів.

4.3. Результати та їх обговорення

Астма і хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) – одні з найбільш поширених у світі неінфекційних захворювань. Так, за даними Global Asthma Network та Global Initiative for Asthma на астму хворіють від 1 до 18% населення країн, а загальна світова кількість хворих перевищує 300 млн; тривожною загальною тенденцією є щорічне світове пацієнтів зі встановленим діагнозом «астма» на 2,9% [72, 73]. Астма характеризується транзієнтним обмеженням потоку повітря через повітроносні шляхи, а також гіперчутливістю дихальних шляхів та іноді перебудовою тканин їх стінки; ці симптоми також є головними для ХОЗЛ.

Міоцити гладеньких м’язів дихальних шляхів у значній кількості експресують мускаринові ацетилхолінові рецептори M_2- та M_3-типів (відповідно, спряженими з $G_{i/o}$ та $G_{q/11}$-протеїнами). Кількісне співвідношення

M_2- та M_3-типів цих рецепторів становить близько 4:1 (аналогічно до міоцитів шлунково-кишкового тракту). Втім функціональна роль рецепторів M_3-типу у скороченні гладеньких м'язів бронхів і трахеї є суттєво домінуючою; внесок холінорецепторів M_2-типу набуває більшого значення лише у периферійних відділах повітроносних шляхів [73-75]. Участь мускаринових ацетилхолінових рецепторів у підтриманні тонусу гладеньких м'язів дихальних шляхів суттєво посилюється при астмі та ХОЗЛ за участі двох основних механізмів: по-перше, підвищення рівня експресії мускаринових холінорецепторів з подальшим посиленням внутрішньоклітинної ефективності вторинних месенджерів, які напрацьовуються за активації цих рецепторів; по-друге, збільшення вивільнення ацетилхоліну з інтрамуральних нейронів, яке активується запальними процесами [73].

Фармакологічні препарати, які використовуються для лікування астми і ХОЗЛ, поділяються на декілька груп: агоністи β_2-адренорецепторів тривалої дії (LABA), агоністи β_2-адренорецепторів короткочасної дії (SABA), антагоністи мускаринових ацетилхолінових рецепторів тривалої дії (LAMA), антагоністи мускаринових ацетилхолінових рецепторів короткочасної дії (SAMA), а також інгаляційні і пероральні кортикостероїди [71, 76, 77].

Алкалоїд з Atropa belladonna атропін є неселективним антагоністом мускаринових ацетилхолінових рецепторів. Як в дослідженнях на тваринах, так і на людях атропін дозозалежо пригнічує бронхоконстрикцію, викликану стимуляцією парасимпатичних нервів та індуковану екзогенним ацетилхоліном. Для блокування 50% мускаринових рецепторів у легенях потрібно системного введення атропіну у дозі 0,67 мг/кг (це відповідає кількості 47 мг на дорослу людину); втім внутрішньовенне введення 10–20 мг атропіну призводить до суттєвого погіршення загального стану пацієнта. Таким чином, фармакологічно ефективний діапазон дозування атропіну перекривається з токсичним діапазоном цієї сполуки [72, 75].

Іпратропій – синтетична четвертинна амонієва сполука з ізопропіловою групою у N-атомі атропіну. Ця сполука має широке використання для терапії

астми і ХОЗЛ, оскільки, на відміну від атропіну не долає гемато-енцефалічного бар'єру і погано всисається через стінки шлунково-кишкового тракту. Наразі іпратропій рекомендований Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2009 (відповідно до Global strategy for diagnosis, management, and prevention of COPD) для 4 разового щоденного інгаляційного використання пацієнтами з ХОЗЛ як SAMA (максимальний ефект досягається впродовж 60-90 хв, а тривалість терапевтичного ефекту становить 4-6 годин) [72, 78].

Відповідно до технічного завдання, із використанням відомих агоністів (ацетилхоліну та карбахолу) і антагоністів (атропіну та іпратропію) у звітній період нами було здійснено відпрацювання, оптимізацію та стандартизацію протоколів біологічного тестування сполук – потенційних інгібіторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів.

Аплікування неселективних антагоністів мускаринових холінорецепторів атропіну і іпратропію спричиняло дозо-залежне пригнічення ацетилхолін-викликаних скорочень препаратів трахеї щурів (Рис.4.1). Криві «концентрація антагоніста-ефект» у випадку дії атропіну характеризувались показником IC_{50} на рівні 9,15±0,38; за умови передінкубації препаратів з іпратропієм значення IC_{50} складало 9,58±0,41 ($p>0.05$, $n=7$).

Характеристики кривих «концентрація антагоніста мускаринових ацетилхолінових рецепторів-ефект» у випадку активації скорочувальних відповідей аналогом нейромедіатора ацетилхоліну (нечутливим до дії ацетилхолінестерази) карбахоліном (10^{-6} М) не мали достовірних відмінностей порівняно з параметрами кривих в умовах ацетилхолін-індукованих скорочень.

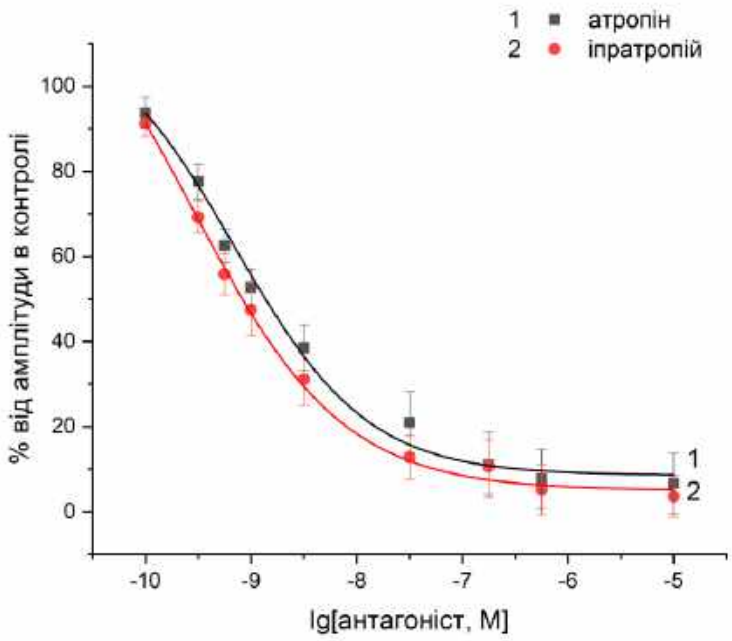


Рис. 4.1. Криві «концентрація антагоніста-ефект» у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів ацетилхоліном (10-6 М): крива 1 – атропін (10-10 10-5 М) та крива 2 – іпратропію бромід (10-10 10-5 М). Показник амплітуди скорочень за дії антагоністів перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10-6 М), прийнятим за 100 %. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Параметри залежностей «концентрація антагоніста мускаринових ацетилхолінових рецепторів-ефект» у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів ацетилхоліном (10^{-6} М) на тлі попереднього блокування β2-адренорецепторів їх селективним антагоністом пропранололом (10^{-5} М) достовірно не відрізнялись від показників, зареєстрованих за дії лише антагоністів мускаринових холінорецепторів.

Для відпрацювання протоколів встановлення типу інгібування досліджуваної речовини з мускариновими ацетилхоліновими рецепторами були зареєстровані криві агоніст-індукованих скорочень на тлі ряду концентрацій антагоністів цих рецепторів. Рівняння регресії Шілда використовували для встановлення величини афінності сполуки-антагоніста. Показник кута нахилу лінії (1.08±0.11, коефіцієнт детермінації R^2 = 0.98)

вказує на конкурентний механізм дії атропіну (Рис. 4.2, крива 1). Велична афінності цієї сполуки pK_B становила 9.57±0.2.

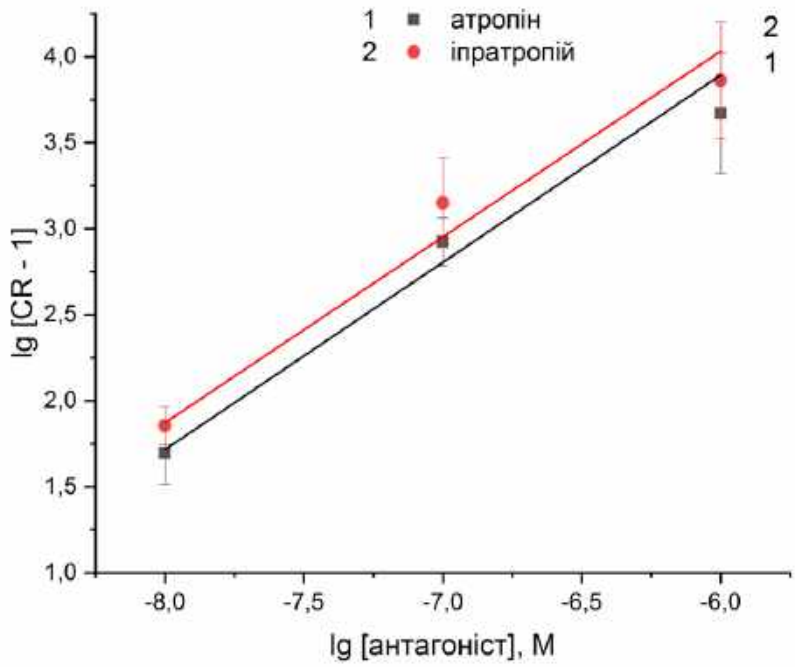


Рис. 4.2. Графіки Шілда для антагоністів мускаринових ацетилхолінових рецепторів атропіну (крива 1) та іпратропію броміду (крива 2) у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів ацетилхоліном. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Аналогічні дослідження були проведені із використанням іпратропію броміду (Рис. 4.2, крива 2); для скорочувальних відповідей гладеньком'язових препаратів трахеї щурів, активованих ацетилхоліном і карбахолом. Відповідно до аналізу графіків регресії Шілда показано, що, як і атропін, іпратропій є конкурентним антагоністом мускаринових ацетилхолінових рецепторів. Так, зокрема у випадку лінеаризації за Шілдом даних щодо інгібування ацетилхолін-індукованих скорочень іпратропієм, показник кута нахилу лінії становив (1.09±0.15, коефіцієнт детермінації $R^2 = 0.98$), а величина афінності pK_B складала 9.74±0.36.

Отримані нами результати експериментів цілком узгоджуються з літературними даними [78-81], що підтверджує адекватність застосованих

біологічних моделей. Отже, відповідно до технічного завдання, у звітній період нами було здійснено відпрацювання, оптимізація та стандартизація протоколів біологічного тестування сполук – потенційних інгібіторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів.

РОЗДІЛ 5. Відпрацювання та стандартизація протоколів хімічної оптимізації

Робота за данним завданням була зосереджена на аналізі хемоінформатичних та структурно-обчислювальних методах, що використовуються для вирішення складної проблеми хімічної оптимізації. Правильне поєднання і використання цих методів дуже важливе оскільки вони дозволяють передбачити напрямки оптимізації і зменшують кількість сполук, які потрібно отримувати і досліджувати експериментально, тобто за допомогою інструментальних підходів.

Одне з перших завдань оптимізації – покращити афінність сполук щодо mAChRs. Для передбачення шляхів спрямованої хімічної оптимізації активних сполук з метою покращення їхньої інгібувальної активності потрібно розробити моделі їх взаємодії з mAChRs. Оскільки сайти зв'язування органічних сполук на поверхні mAChRs будуть ідентифіковані, то моделі будуть розроблятись шляхом поєднання методу молекулярного докінгу та досліджених залежностей інгібувальної активності сполук від їх структури. На основі розроблених моделей буде визначено ключові взаємодії ліганда з рецептором. Далі будуть визначені можливості і шляхи для підсилення ключових взаємодій (шляхом впливу додаткових замісників на електронний розподіл, поляризованість, ліпофільність, тощо). Також на основі моделей будуть запропоновані структурні модифікації сполук для утворення додаткових взаємодій з іншими амінокислотними залишками сайту зв'язування mAChRs. Підсилення ключових взаємодій і додаткові взаємодії мають значно збільшити афініть лігандів і відповідно активність інгібіторів. Але покращення активності інгібіторів тільки одне з завдань оптимізації, сполука повинна мати й певні фізико-хімічні властивості, які обумовлюють її розчинність, всмоктування, розподіл, метаболізм, виведення. Висока активність сполуки *in vitro* може бути повністю зведена нанівець поганими фізико-хімічними властивостями. Отже, вдале співвідношення між цими

властивостями та активністю *in vitro* сполуки є необхідною умовою розробки ефективних інгібіторів. Тут з’являється найпоширеніша проблема визначення шляхів оптимізації однієї властивості без шкоди для іншої властивості. Для подолання цих проблем потрібно проводити паралельну оптимізацію активності та фізико-хімічних властивостей інгібіторів. Сучасні *in-silico* методи доволі точно обраховують фізико-хімічні властивості сполук, їх застосування разом зі структурно обчислюваними методами дозволить дослідити взаємозв'язок між хімічною структурою, фізико-хімічними властивостями та біологічною активністю і спрямувати хімічну оптимізацію для отримання ефективних інгібіторів.

В цілому алгоритм оптимізації сполук такий:

1. Аналіз сайту зв’язування органічних сполук на поверхні mAChRs, та комплексів отриманих молекулярним докінгом (програмний пакет Autodock)
2. Аналіз результатів біологічного тестування і визначення залежностей «структура-активність»
3. Побудова моделей взаємодії інгібіторів з mAChRs
4. Визначення напрямків оптимізації активності сполук і підготовка віртуального сету оптимізованих сполук
5. Молекулярний докінг віртуального сету сполук для оцінки взаємодії з mAChRs
6. Оцінка фізико-хімічних властивостей віртуального сету сполук (методи XLOGP2 для розрахунку LogP та OCHEM для розрахунку LogS)
7. Порівняльний аналіз результатів та відбір сполук для тестування
8. Біологічне тестування оптимізованих сполук, оцінка ефективності інгібіторів (ефективність ліганду (LE), ліпофільна ефективність (LipE)) і проведення чергового етапу хімічної оптимізації на основі нових отриманих даних.

Таким чином, в рамках першого етапу виконання проєкту «Раціональний дизайн інгібіторів мускаринових рецепторів ацетилхоліну як потенційних компонентів комбінованої терапії хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) та астми» було проаналізовано і підготовлено всі важливі компоненти для подальшої хімічної оптимізації знайдених інгібіторів mAChRs.

РОЗДІЛ 6. Реконструкція та детальний аналіз особливостей просторової структури mAChRs

Інформація щодо просторової організації мускаринових рецепторів ацетилхоліну (*mAChRs)* є ключовим компонентом для розуміння структурних механізмів взаємодії цих рецепторів з агоністами та антагоністами, як природними, так і штучними, і подальшої раціональної розробки або пошуку низькомолекулярних органічних сполук, здатних специфічно і селективно зв'язуватись з цільовими білками і модулювати їх активність в заданому напрямку.

Просторову структуру мускаринових рецепторів ацетилхоліну М3 та М2 було реконструйовано з використанням комбінованого підходу, що включає моделювання за гомологією та конформаційний пошук. Для реконструкції корової частини білків (трансмембранний та внутрішньоклітинного доменів) було використано моделювання за гомологією з використанням веб-сервісу Swiss-Model (https://swissmodel.expasy.org/) [82], структуру N-термінальних екстрацелюлярних доменів було реконструйовано за допомогою веб-сервісу Robetta (https://robetta.bakerlab.org/) з викристанням методу прогнозування міжзалишкової орієнтації [83]. Послідовність мускаринового рецептору ацетилхоліну третього типу людини отримано з банку білкових послідовностей UniProt (https://www.uniprot.org/) [84], код доступу P20309. Як шаблон для реконструкції за гомологією було використано просторову структуру мускариного рецептора ацитилхоліну М3 *Rattus norvegicus* (код доступа Міжнародного Банку Білкових структур Protein Data Bank [85] 4DAJ). Послідовність мускаринового рецептору ацетилхоліну другого типу людини також було отримано з банку UniProt, код доступу P08172. Як шаблон для реконструкції за гомологією було використано просторову структуру мускариного рецептора ацетилхоліну М3 людини, код доступа 3UON.

В результаті реконструкції були отримано два варіанти просторової структури повнорозмірного мускариного рецептора ацитилхоліну М3 людини.

Основні відмінності цих моделей зосереджені в N-термінальному домені рецептора (перші шістдесят амінокислотних залишків). В першому варіанті структури цей домен не компактизується і формує дві невеликі метастабільні спіралі (5 по 8 та з 39 по 46 амінокислотний залишки), що просторово не контактують одна з одною (рис 6.1). У другому варіанті структура N-кінцевого домена є більш компактною, він формує область all-alpha згортки, що містить три спіральні елементи (з 23 по 31, з 33 по 45 та з 48 по 53 залишки), які, на відміну від спіральних елементів у першому типі структури, взаємодіють між собою (рис. 6.2). Компактна частина N-кінцевого домена в цьому варіанті розташовується близько до трансмембранного домену, проте не перешкоджає його взаємодії з природними ефекторами цього рецептора, зокрема, з ацетилхоліном.

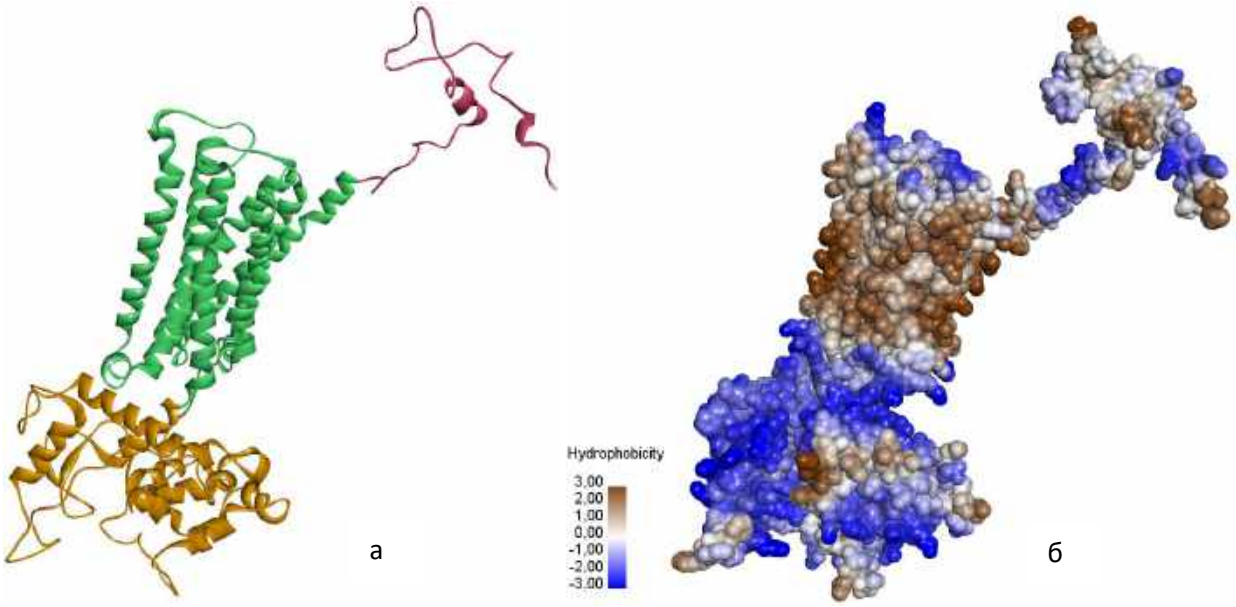


Рис. 6.1 (а) Стрічкова діаграма просторової структури М3 рецептора ацетилхоліну людини з невпорядкованим N-термінальним доменом. Позаклітинний, трансмембранний та внутрішньоклатинний домени забарвлені відповідно, в малиновий, зелений та коричневий колір. (б) Молекулярна поверхня структури М3 рецептора ацетилхоліну людини. Поверхню забарвлено за гідрофобними/гідрофільними властивостями.

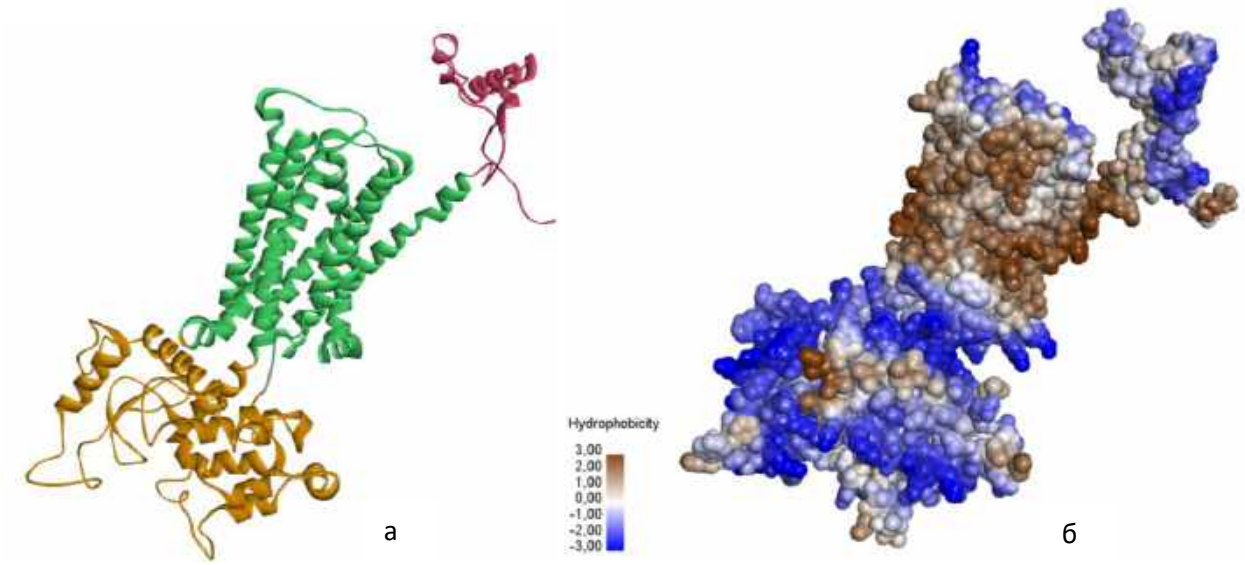


Рис. 6.2 (а) Стрічкова діаграма просторової структури М3 рецептора ацетилхоліну людини з компактизованим N-термінальним доменом. Позаклітинний, трансмембранний та внутрішньоклатинний домени забарвлені відповідно, в малиновий, зелений та коричневий колір. (б) Молекулярна поверхня структури М3 рецептора ацетилхоліну людини. Поверхню забарвлено за гідрофобними/гідрофільними властивостями.

У випадку М2 рецептора людини позаклітинний домен фактично представлений лише одною альфа-спіраллю (рис. 6.3). Внутрішньоклітинний домен цього рецептора, на відміну віду випадку М3 рецептора, формує досить щильний контактний інтерфейс з трансмембранним доменом, утворючи фактично єдину глобулярну структуру (хоча домени і розрізнюються за типами упаковки).

В цілому, отримані варіанти просторої структури є якісними згідно метрик сервіса MolPrbity (http://molprobity.biochem.duke.edu), не містять клеш-контактів та стеричних напружень, і були успішно використані при подальшому виконанні проекту, зокрема, для ідентифікації потенційних сайтів зв’язування низькомолекулярних сполук на поверхні *mAChRs*.

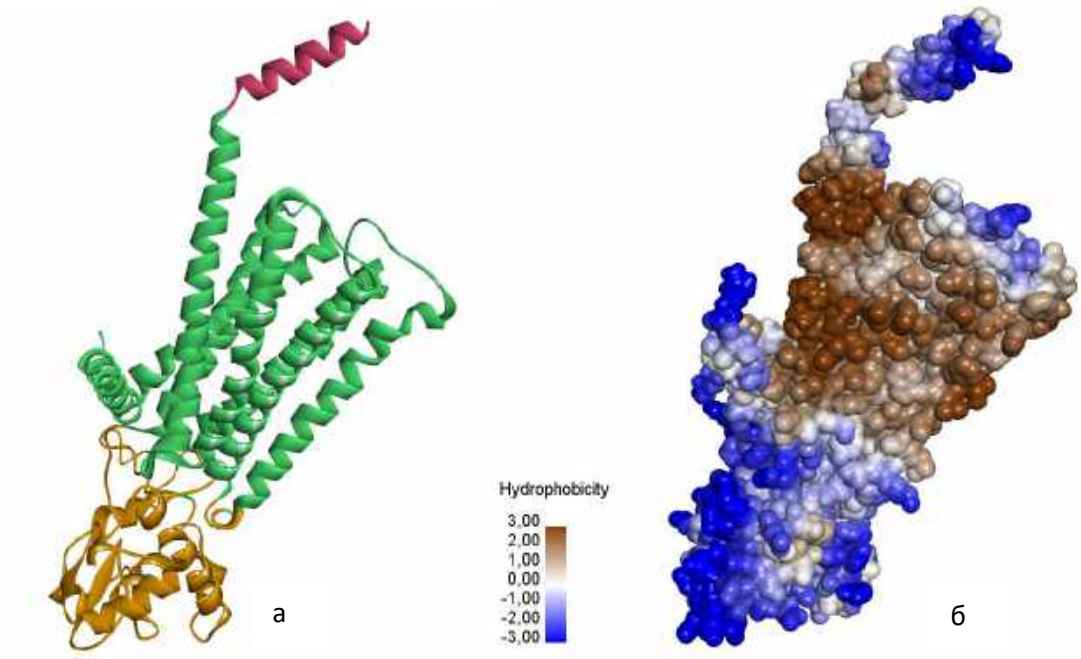


Рис. 6.3 (а) Стрічкова діаграма просторової структури М2 рецептора ацетилхоліну людини. Позаклітинний, трансмембранний та внутрішньоклатинний домени забарвлені відповідно, в малиновий, зелений та коричневий колір. (б) Молекулярна поверхня структури М2 рецептора ацетилхоліну людини. Поверхню забарвлено за гідрофобними/гідрофільними властивостями.

РОЗДІЛ 7. Ідентифікація сайтів зв'язування органічних сполук на поверхні mAChRs

7.1 Області зв'язування на поверхні М3 рецептора

Для визначення локалізації сайтів зв'язування органічних сполук на поверхні мускаринових ацетилхолінових рецепторів 3 типу було використано обидва варіанти реконструйованої структури. Як зазначалося вище, отримані моделі мають схожу просторову організацію, за виключоренням структури N-термінальних позаклітинних доменів. Модель 2 має більш впорядкований і компктніший N-термінальний домен порівняно з таким у моделі 1 (див. Рис. 7.1).

Рис. 7.1. Суперпозиція моделей 1 (жовтий колір) і 2 (синій колір) просторової структури рецептора М3

Локалізацію сайтів зв'язування визначали за допомогою трьох пакетів програмнного забезпечення: CAVER (http://www.caver.cz/), Discovery Studio

Visualizer (https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download) та SeeSAR (https://www.biosolveit.de/products/seesar/). Оскільки обидві моделі М3 рецептора структурно подібні, результат роботи цих трьох програм видав схожий результати, а отже він є максимально точний.

Всього на молекулярній поверхні М3 знайдено 10 імовірних сайтів зв'язування з низькомолекулярними органічними сполуками. Для подальшого дослідження всі знайдені сайти характеризувались за об'ємом, адже саме ця геометрична характеристика є однією з найбільш важливих. Як правило, сайтом зв'язування є найбільша за об'ємом кишеня. Отже було знайдено 10 імовірних сайтів зв'язування з об'ємом від 100 до майже 600 $Å^3$. На першому етапі ми відкинули 3 сайти, об'єм яких менше 150 $Å^3$. Сайти (див. рис. 2), що мають достатній об'єм для розміщення ліганду аналізувались відносно структури рецептора М3.

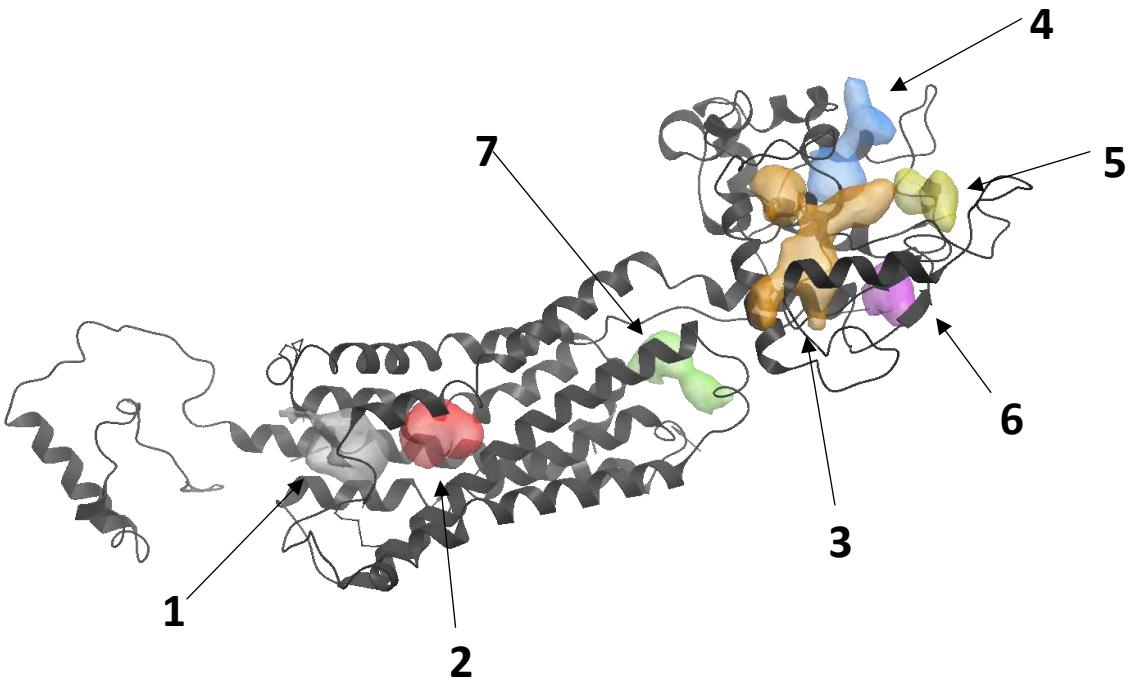


Рис. 7.2. Локалізація сайтів зв'язування малих органічних сполук на поверхні мускаринового ацетилхолінового рецептору 3 типу.

Два знайдені сайти, що знаходяться в основі трансмембранних доменів (сірий (1) та червоний (2) кольори, рис. 7.2) співпали із сайтом зв'язування ацетилхоліну, що описаний в літературі [86]. Сайт 1 утворюють наступні

амінокислотні залишки: Phe124, Tyr127, Trp143, Leu144, Tyr148, Cys220, Leu222, Leu225, Ser226, Pro228, Thr231, Tyr506, Val510, Asn513, Ile520, Lys522, Trp525, Asn526, Tyr529. Сайт 2 утворюють амінокислотні залишки: Ile116, Asp147, Tyr148, Ser151, Asn152, Val155, Trp199, Leu225, Thr231, Thr234, Ala235, Ala238, Phe239, Trp503, Tyr506, Asn507, Val510, Tyr529, Cys532, Tyr533. Об'єм цих сайтів становить 397 та 368 $Å^3$, відповідно. Надалі сайти 1 та 2 будуть розглядатися як один великий інтерфейс взаємодії ліганду з рецептором.

Якщо врахувати об'єднання сайтів 1 та 2 в один, сайт 3 є наступним за об'ємом (світло-коричневий колір, рис. 7.2). Об'єм сайту 3 становить 587-641 $Å^3$, залежно від досліджуваної гомологічної моделі. Саме цей сайт викликає найбільшу зацікавленість як інтерфейс алостеричної модуляції активності М3 рецептора. Цей інтерфейс формують амінокислотні залишки Arg287, Ser288, Ser290, Gln296, Arg301, Met326, Asp329, His330, Ala343, Asn347, Ser348, Ser350, Ser351, Glu354, Asp355, Ser358, Glu359, Ile363, Tyr364, Val367, Leu370, Ser374, His405, Lys406, Ala409, Gln410.

Наступним за розміром іде сайт 4. Його об'єм становить 251 $Å^3$. Сайт формують альфа спіралями, що утворені амінокислотними залишками: Val400, Ala404, Ser412, Met413, Asp415, Gly416, Asn418, Cys419, Ala446, Pro454, Phe457, Phe466, Lys469, Thr470, Gln473. Поверхня що утворює інтерфейс взаємодує є гідрофобною і ймовірно буде гіршою ніж у інших сайтів, але остаточне рішення про використання сайту 3 буде прийнято під час тестових запусків молекулярного докінгу.

Сайти 5 та 6 розташовуються в безпосередній близькості одне від одного та мають об'єм 158 та 166 $Å^3$, відповідно. Сайт 5 утворюють амінокислотні залишки Gln268, Ser270,Glu277, Phe279, His281, Cys289, Leu462, Lys464, Arg465. Сайт 6 утворюють His281, Thr283, Ser285, Arg301, Gly308, Arg309, Gln408, Ser456, Phe457, Ala460. Дані сайти утворені нерегулярними вторинними структурами, що робить їх дуже рухомими і непридатними для подальшого моделювання.

Останній сайт зв’язування, який варто розглянути є сайт 7 (рис. 7.2). Його об’єм становить 164 $Å^3$, а його поверхню утворюють амінокислотні залишки Thr100, Asn103, Arg165, Arg176, Arg179, Arg260, Lys486, Lys487, Gln490, Asn547. Сайт 7 частково утворена невпорядкованими елементами вторинної структури М3, і частково – альфа-спіралями трансмембранного домену. Саме тому він в цілому є більш жорсткий ніж сайти 5 та 6, і може розглядатись як перспективний для молекулярного докінгу.

Мапи для майбутнього молекулярного докінгу будуть побудовані для сайтів 1,2 3, 4 та 7. Сайти 5 та 6 розглядатись не будуть.

7.2 Області зв’язування на поверхні М2 рецептора

Локалізацію сайтів зв’язування на поверхні М2 рецептора було визначено за допомогою вищезазначених інструментів CAVER Discovery Studio Visualizer та SeeSAR.

Аналіз поверхні мускаринового ацетилхолінового рецептору 2 типу виявив 6 імовірних сайтів зв’язування, один з яких мав об’єм меншим за 150 $Å^3$, тому до розгляду залишається 5 сайтів зв’язування.

Сайт 1 та 2 співпадають з місцем зв’язування ацетилхоліну та відомих антагоністів і в майбутньому розглядатимуться як один інтерфейс взаємодії. Об’єм сайтів 1 та 2 становить 172 та 351 $Å^3$, що в сумі становить 523 $Å^3$ і є найбільшим сайтом на поверхні рецептору. Сайт утворюють амінокислотні залишки Asp103, Tyr104, Ser107, Asn108, Val111, Trp155, Phe181, Thr187, Thr190, Ala191, Ala194, Phe195, Trp400, Tyr403, Asn404, Val407, Tyr426, Cys429, Tyr430, Tyr80, Tyr83, Thr84, Gly87, Trp99, Lys100, Cys176, Tyr177, Phe181, Thr187, Tyr403, Asn410, Asn419, Trp422, Tyr426.

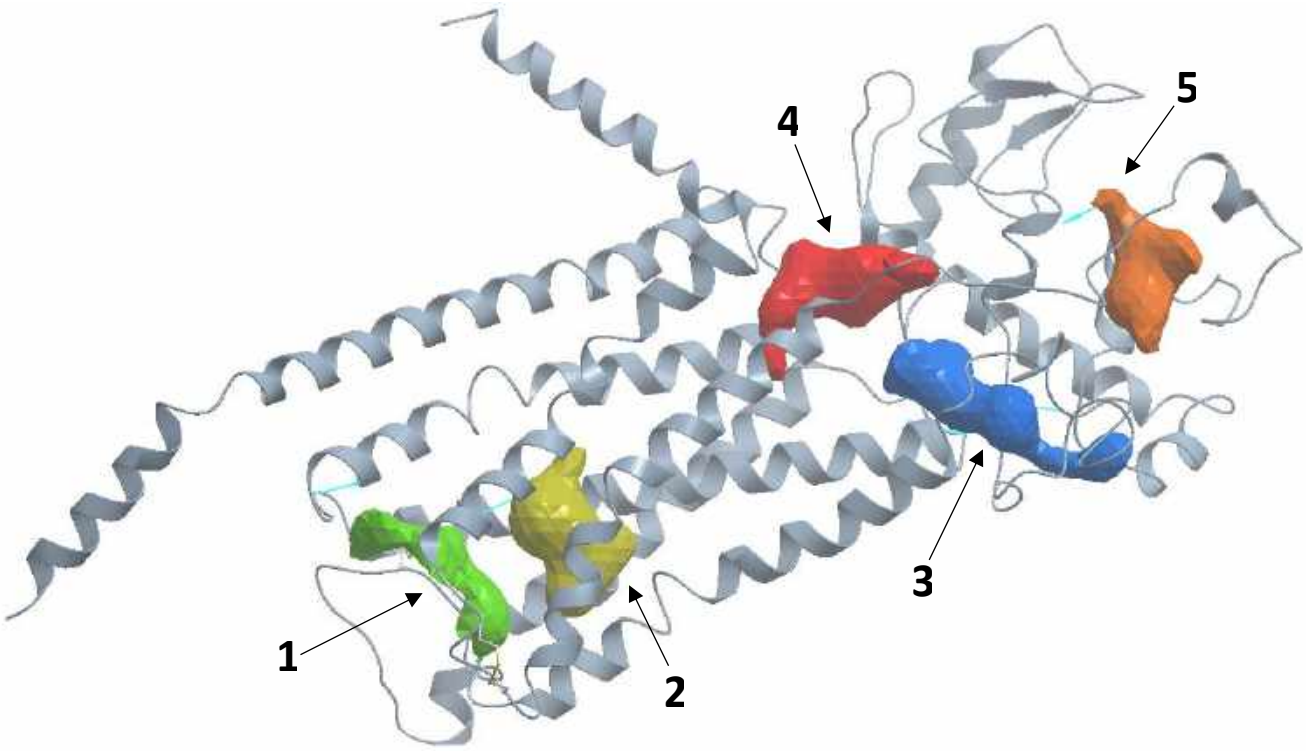


Рис. 7.3. Локалізація сайтів зв’язування малих органічних сполук на поверхні мускаринового ацетилхолінового рецептору 2 типу.

Наступним за величино іде сайт 3 (рис. 3), його об’єм становить 381 $Å^3$, але незважаючи на значний розмір, він утворений невпорядкованими вторинними структурами, тому імовірніше за все потенційні інгібітори не зможуть зафіксуватись в ньому. В той самий час, сайт 4 має жорстку конструкцію та достатній об’єм і може бути розглянутий як сайт алостеричного інгібування мускаринового ацетилхолінового рецептору 2 типу. Об’єм сайту 2 становить 284 $Å^3$, а його поверхню утворюють амінокислотні залишки Thr56, Asn58, Asn59, Phe61, Leu62, Ile117, Ser250, Gln303, Asp304, Thr307, Val308, Pro379, Arg381, Lys383, Val385, Thr388, Ile389, Asn444.

Сайт 5 має достатній об’єм, щоб також розглядатись як алостеричний сайт інгібування – 252 $Å^3$, але через те, що він сформований переважно неструктурованими елементами вторинної структури, розглядатись при подальших дослідженнях не буле.

Таким чином, аналіз просторової структури мускаринового ацетилхолінового рецептору М2 показав, що на поверхні даного білка присутньо 5 імовірних сайтів зв’язування з органічними молекулами. Детальний аналіз кожного сайту виділив що сайти 1 та 2 будуть вважатись як один та відносно нього буде проведений молекулярний докінг. А також сайт 4 теж підходить як таргет для проведення віртуального скринінгу.

Відповідно, на наступних етапах виконання проекту проти кожного виявленого сайту на поверхні мускаринових рецепторів ацетилхоліну М2 і М3 буде проведений молекулярний докінг та відібрано сполуки для подальшого біологічного тестування.

РОЗДІЛ 8. Молекулярний докінг колекції органічних сполук в знайдені сайти зв'язування антагоністів та агоністів

Для молекулярного докінгу використано колекцію сполук відділу біомедичної хімії, що налічувала більше 150 тис. сполук. Цю скринінгову колекцію було фільтровано за правилом Ліпінського та від реакційноздатних сполук. Структури сполук були мінімізовані (100 кроків мінімізації) та протоновані (pH = 7) за допомогою програми OpenBabel 2.4.0 у силовому полі MMFF94 (mmff94) з використанням алгоритму спряжених градієнтів.

Для проведення процедури рецепторно-орієнтованого гнучкого докінгу колекції органічних сполук було використано пакет програм Autodock 4.2.6 [88]. Підготовку лігандів проводили за допомогою програми Vega ZZ [89].

Для проведення розрахунків у програмі Autodock вхідні формати даних рецепторів mAChR2 та mAChR3 (просторові структури, отримані на попередньому етапі проекту) та лігандів конвертували у спеціальний формат PDBQT. Цей формат містить координати атомів та часткові заряди. Формування файлів PDBQT для лігандів проводили за допомогою програми Vega із додаванням атомних типів AUTODOCK та зарядів Гайстегера, та видаленням Гідрогену у неполярних атомів. Карти рецептору готували в програмах MGL Tools та AutoGrid з пакету Autodock. Також для кожного ліганду було сформовано файли DPF програмою MGL Tools. В цих файлах містяться налаштування для процедури докінгу.

Встановлено наступні параметри докінгу: крок поступального руху дорівнював 2 Å, кут кватерніону – 50°, торсійний кут – 50°. Ступінь торсійної свободи і коефіцієнт складали відповідно 2 і 0,274. Толерантність кластеру – 2 Å. Зовнішня енергія решітки – 1000, максимальна початкова енергія – 0, максимальне число спроб – 10 000. Число структур у популяції – 300, максимальне число етапів оцінки енергії – 1 000 000, максимальне число генерацій – 27 000, кількість структур, які переходять до наступної генерації – 1, рівень генної мутації – 0,02, рівень кросоверу – 0,8, спосіб кросоверу –

арифметичний. α-Параметр розподілу Гауса дорівнював 0, β-параметр розподілу Гауса – 1. Кількість ітерацій генетичного алгоритму-пошуку Ламарка дорівнює 10 для кожного ліганду.

Візуальний аналіз взаємодії сполук із амінокислотними залишками сайтів зв'язування рецепторів mAChR2 і mAChR3 проводили у програмі Discovery Studio Visualizer 4.0 (https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download).

Для докінгу було обрано по два аналогічні сайти на рецепторах M2 і M3. Перший сайт – це об'єднаний карман з ділянки, що знаходиться в складці, сформованій спірально закрученими трансмембранними доменами, з якою зв'язується ацетилхолін, а також ділянки, розташованої вище, між петлями, що зв'язують трансмембранні домени. Другий – на зворотній, внутрішньоклітинній частині, сформованій трансмембранними доменами.

В рецепторі mAChR3 сайт зв'язування ацетилхоліну утворюють амінокислотні залишки: Phe124, Tyr127, Trp143, Leu144, Tyr148, Cys220, Leu222, Leu225, Ser226, Pro228, Thr231, Tyr506, Val510, Asn513, Ile520, Lys522, Trp525, Asn526, Tyr529, Ile116, Asp147, Tyr148, Ser151, Asn152, Val155, Trp199, Leu225, Thr231, Thr234, Ala235, Ala238, Phe239, Trp503, Tyr506, Asn507, Val510, Tyr529, Cys532, Tyr533. Об'єм сайту становить 765 $Å^3$. Алостеричний сайт зв'язування на зворотній, внутрішньоклітинній частині рецептору формують амінокислотні залишки Arg287, Ser288, Ser290, Gln296, Arg301, Met326, Asp329, His330, Ala343, Asn347, Ser348, Ser350, Ser351, Glu354, Asp355, Ser358, Glu359, Ile363, Tyr364, Val367, Leu370, Ser374, His405, Lys406, Ala409, Gln410. Об'єм сайту зв'язування становить 641 $Å^3$.

Подібну структуру сайтів зв'язування має і рецептор mAChR2, оскільки обидві гомологічні моделі будувалися на основі одного кристалу, а також вони мають дуже подібні амінокислотні послідовності. Ці гомологічні моделі було взято для створення мап для докінгу.

При розробці мап сайт зв'язування ацетилхоліну mAChR3 бокс мав центр в геометричному центрі оригінального інгібітора, розміри боксу були

встановлені так, щоб охопити амінокислотні залишки в радіусі 5 Å від ліганду. Грід-решітки прораховувалися для органічних атомів (C, O, N, P, Br, Cl, F, H, I, S), роздільна здатність решітки становила 0,186 Å. Аналогічно будувалися мапи і для алостеричного сайту зв'язування, лише центр боксу встановлявся в геометричному центрі сайту, так як в ньому немає ніякого ліганду. Розташування грід-решітки на поверхні mAChR3 показано на рисунку 8.1.

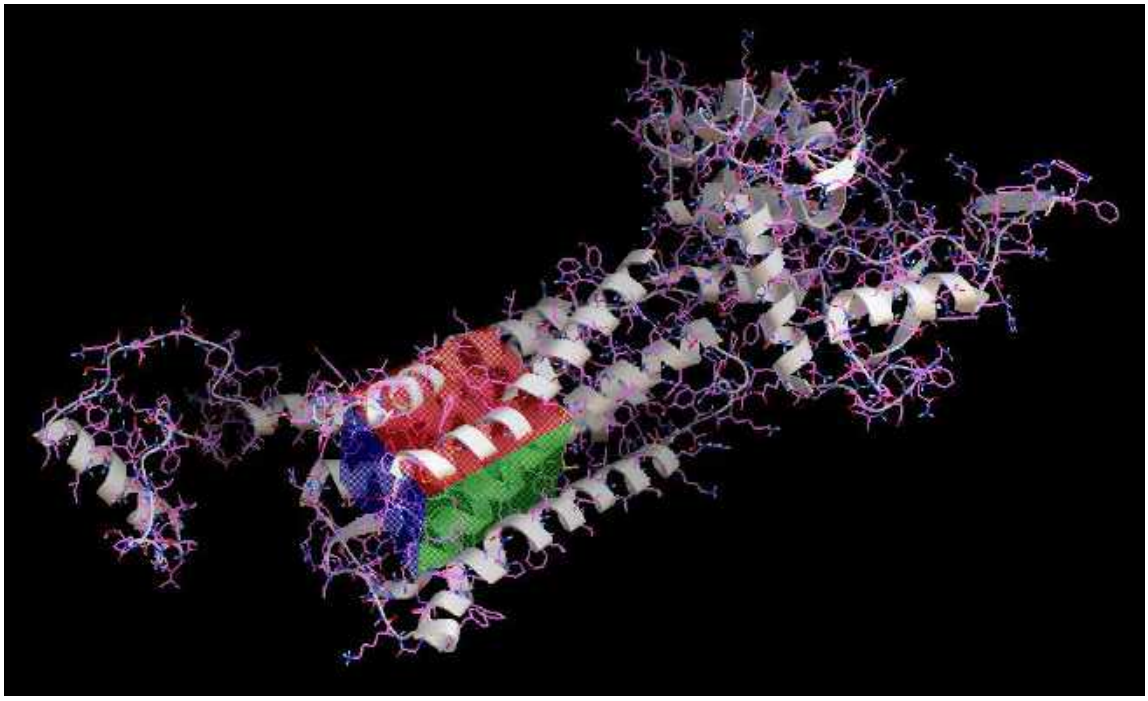
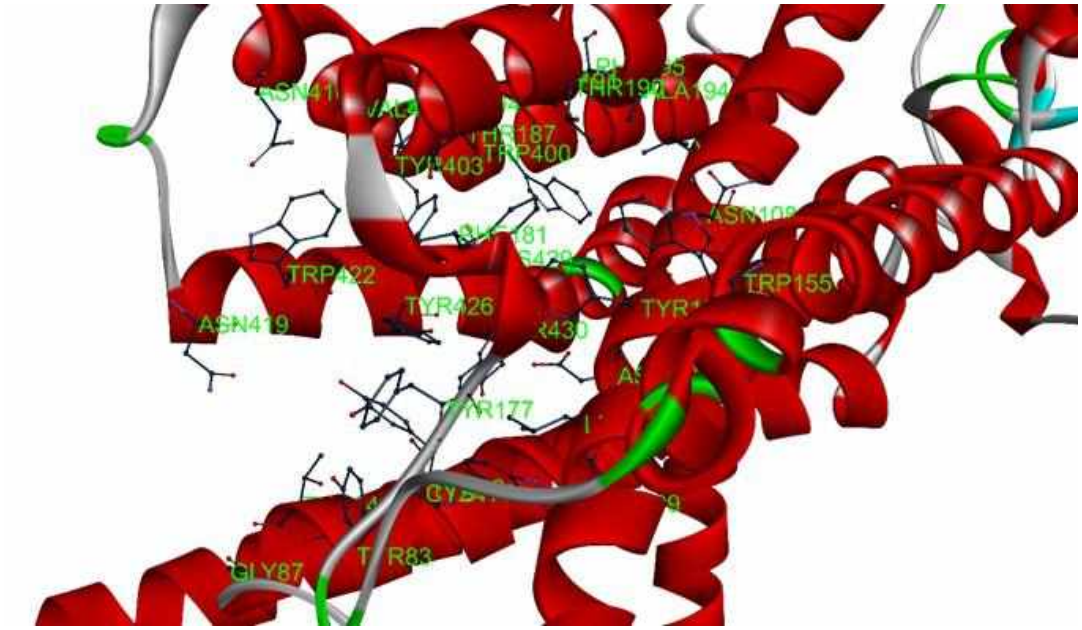


Рис. 8.1. Розташування в просторі рецептора mAChR3 решітки для докінгу колекції низькомолекулярних органічних сполук.

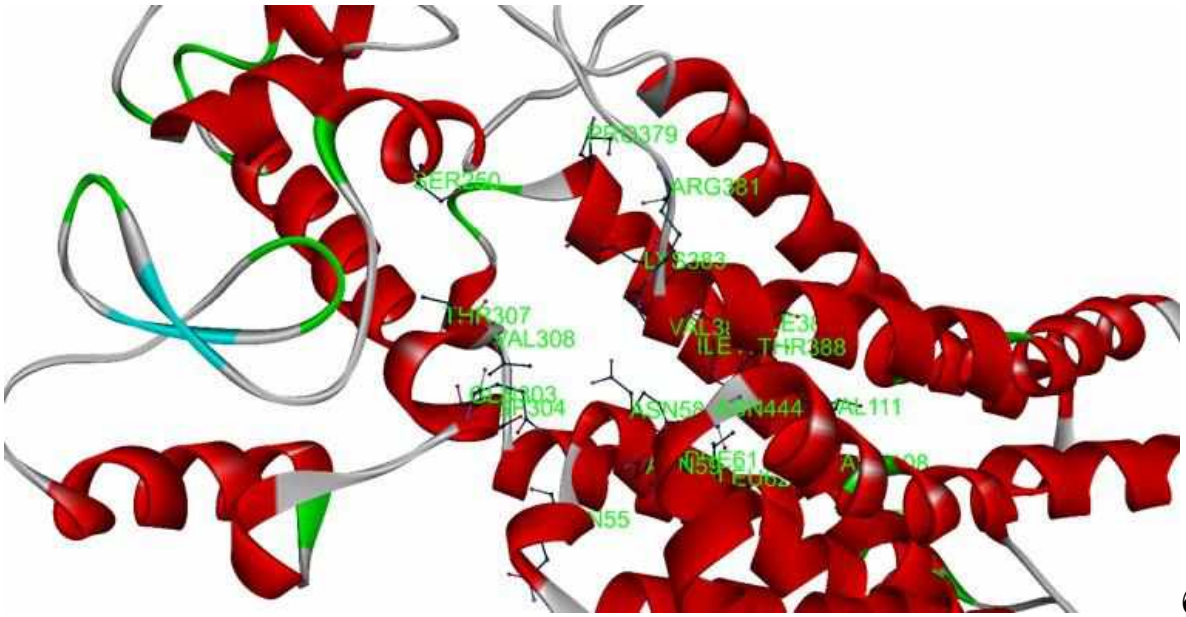
Після проведення докінгу, сполуки було ранжовано та відібрано близько топ 2% сполук (3000 сполук) для візуальної оцінки взаємодій. Основними критеріями відбору були показник скору, наявність міжмолекулярних водневих зв'язків та гідрофобних взаємодій з ключовими амінокислотними залишками та візуальний аналіз комплексів сполук з активним сайтом mAChR3. Візуальний аналіз є важливим кроком, який дозволяє виявляти розрахункові помилки щодо позиції ліганду в активному центрі та міжмолекулярних фізико-хімічних контактів. При візуальному аналізі враховували такі фактори, як комплементарність поверхні лігандів до

поверхні рецептора, відповідність позицій заряджених груп, коректність торсійних кутів, стекінг-взаємодія, тощо.

Для двох сайтів mAChR2 (сайт зв’язування ацетилхоліну, V = 351 Å^3 + сайт зв'язування антагоністів, V = 172 Å^3; сайт на внутрішньоклітинній частині, V = 381 Å^3 , рис. 8.2) було побудовано мапи для проведення молекулярного докінгу по аналогічній процедурі як і для mAChR3 (рис. 8.3), а також продоковано 150 тисяч сполук в ці сайти. Результати ранжовано, відфільтровано та підготовлено до візуальної оцінки.



а



б

Рис. 8.2 (а) Структура сайту зв’язування mAChR2 з ацетилхоліном, вид збоку. (б) структура алостеричного сайту mAChR2, вид спереду.

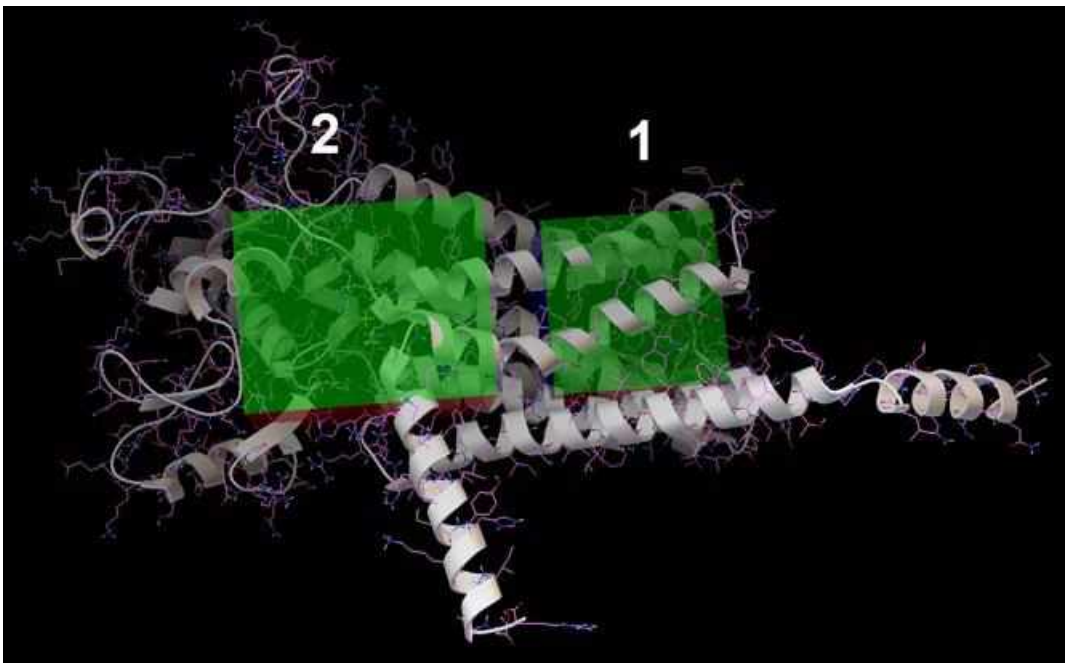


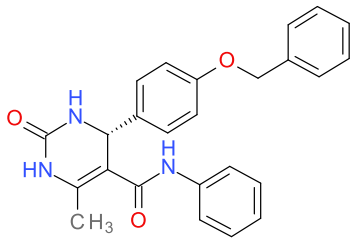
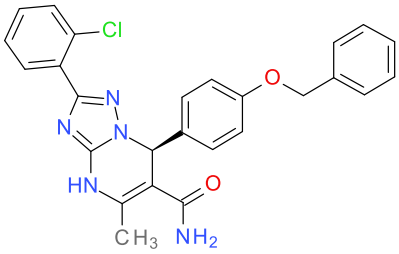
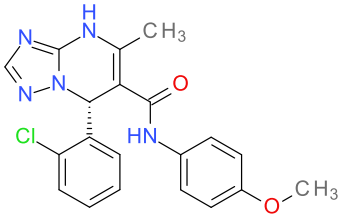
Рис. 8.3. Розташування грід-решіток сайту зв’язування з ацетилхоліном (1) та алостеричного сайту (2) mAChR2.

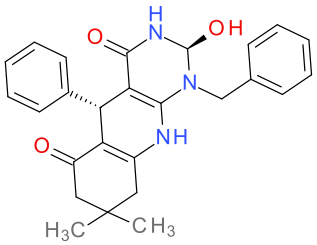
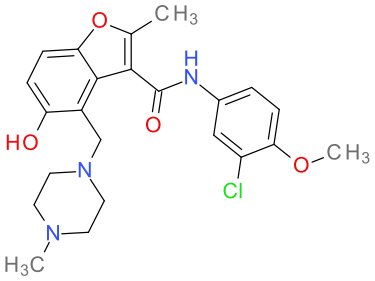
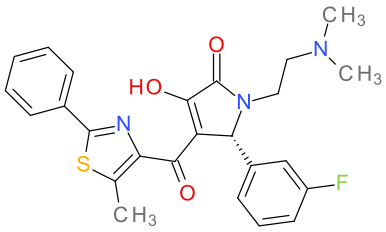
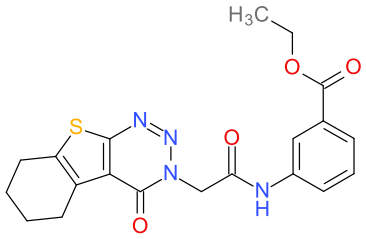
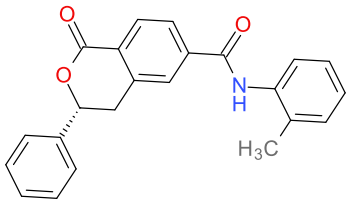
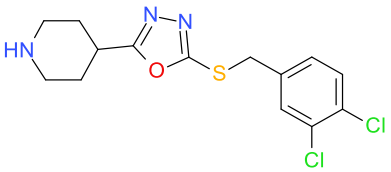
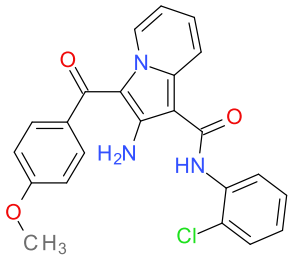
РОЗДІЛ 9. Відбір лігандів для дослідження їх інгібувальної активності щодо mAChRs.

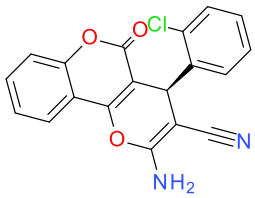
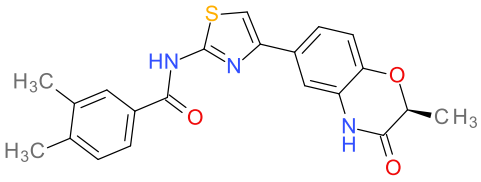
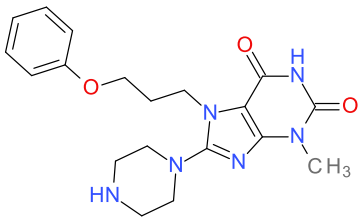
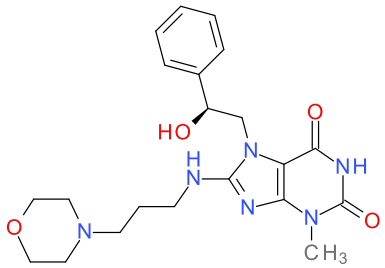
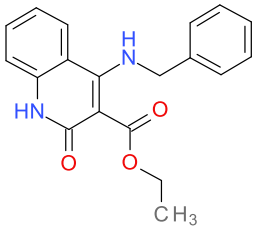
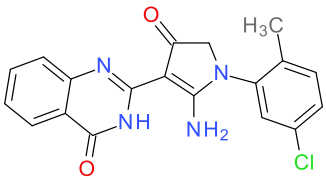
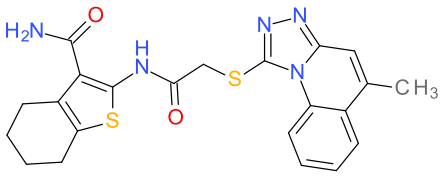
На основі даних, отриманих при виконанні попереднього завдання, за допомогою візульного аналізу отриманих комплексів мускаринових рецепторів ацетилхоліну з урахуванням значень скорінгових (оціночних) функцій для подальшої оцінки інгібувальної активності щодо mAChRs за допомогою біологічного тестування було обрано 23 сполуки. Структури та значення скорінгової функції відібраних сполук зазначені в таблиці 9.1.

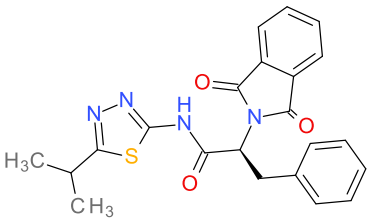
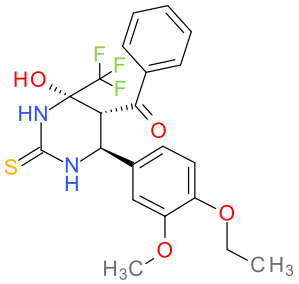
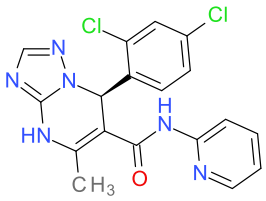
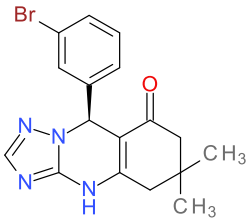
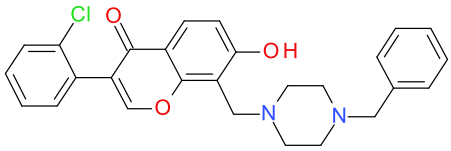
Таблиця 9.1.

Структури та значення скорінгової функції відібраних сполук.

Номер сполуки	Структура	Значення скорингової функції, ккал/моль
255891		-10,14
271619		-12,09
274339		-11,45

281224		-12,84
643722		-11,33
763611		-11,22
765636		-11,51
767560		-11,62
847486		-10,37
860127		-11,98

995717		-11,65
1069358		-11,41
7560175		-10,54
7560419		-10,90
7563008		-11,07
36313		-11,48
57882		-11,48

80310		=11,66
112452		-11,74
151475		-11,57
151689		-11,41
208998		-11,82

Незважаючи на спільність сайту взаємодії – всі найкращи сполуки виявилися конкурентами ацетилхоліну, причому найкращі значення скорінгових функцій отримані для їх взаємодії з М3 рецептором, патерни їх взаємодії з молекулою рецептора мають виражений індивідуальний характер. Приклади способів взаємодії з сайтом зв'язування ацетилхоліну mAChR3 із сполуками з найкращими показниками скорингової функції наведено на рис 9.1.

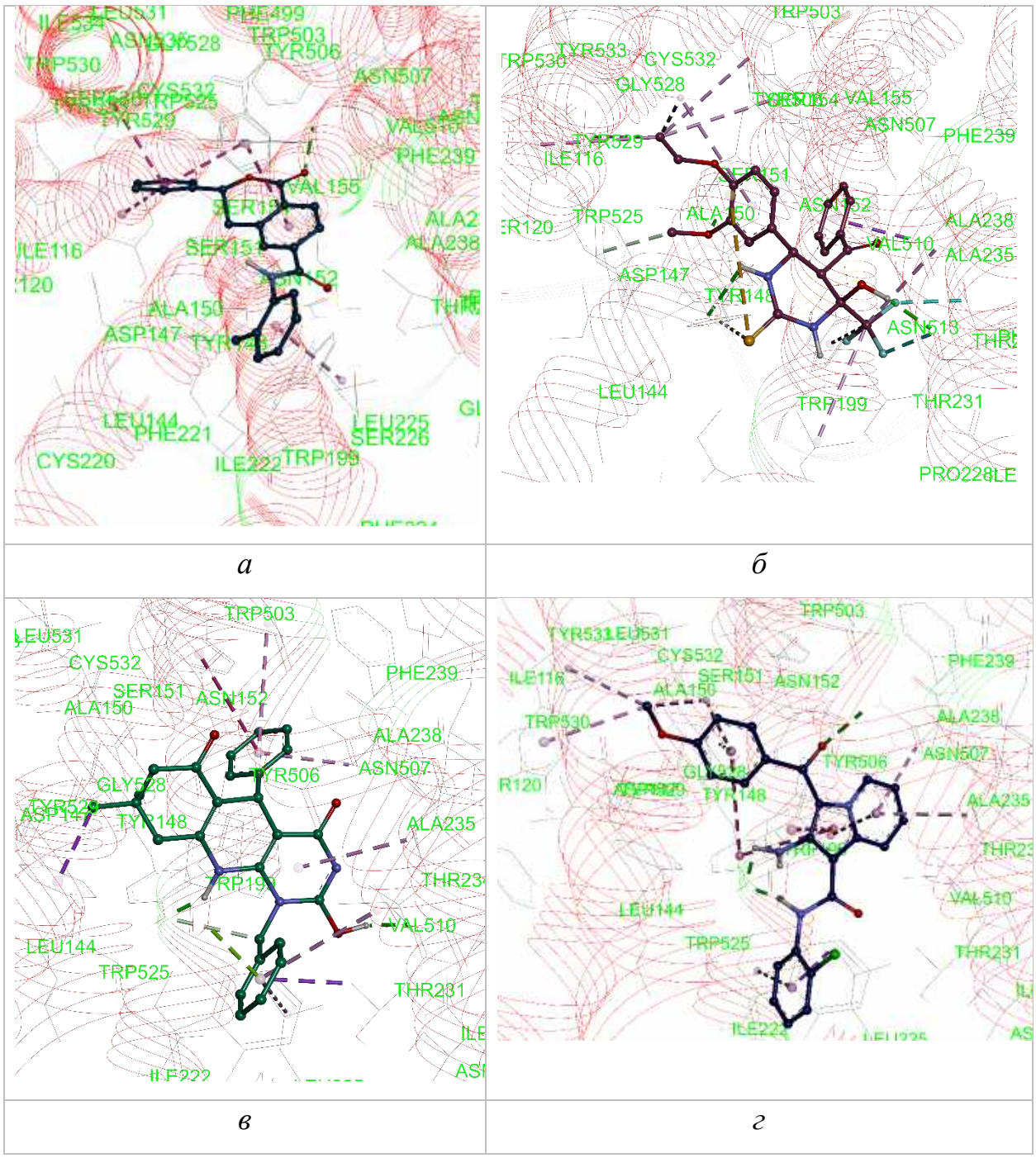


Рис. 9.1. Просторова організація взаємодії в комплексах сполук 767560 (а), 112452 (б), 281224 (в), 860127 (г) із сайтом зв’язування ацетилхоліну mAChR3. Водневі зв’язки зазначені зеленими пунктирними лініями, гідрофобні – фіолетовими.

РОЗДІЛ 10. Вивчення фармакологічних і кінетичних ефектів і параметрів дії сполук-інгібіторів на інтактних багатоклітинних препаратах дихальних шляхів щурів та мурчаків.

10.1 Методологія дослідження

Експерименти проводили на самцях щурів лінії Wistar та нелінійних мурчаках обох статей (вага тварин була в межах 230-250 та 350-500 г, відповідно). Усі маніпуляції з тваринами здійснювали згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Тестування речовин-інгібіторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів здійснювалось методом тензометрії у ізометричному режимі на мультиклітинних препаратах трахеї, що являють собою кільця з інтактною слизовою оболонкою, та містили не менше 4 хрящових кілець. У експериментах використовували фрагменти трахеї від початку біфуркації до ділянки на 1-1.5 см вище біфуркації.

Кільця трахеї вміщували в робочу камеру (об'єм 2 мл) з барботованим оксигенованою газовою сумішшю проточним розчином Кребса (швидкість протікання - 5 мл/хв), термостатовану при 37°С. Препарату трахеї надавали пасивний натяг на рівні 10 мН і залишали на 1 годину; дослідження починали після реєстрації декількох відтворюваних скорочень на аплікування гіперкалєвого розчину, адреналіну (10^{-6} М) та ацетилхоліну (10^{-6} М). Скоротливу активність досліджували в ізометричному режимі за допомогою ємнісного датчика сили; підсилений сигнал реєстрували за допомогою АЦП.

В дослідах використовували розчин Кребса (мМ): 120,4 NaCl; 5,9 KCl; 15,5 $NaHCO_3$; 1,2 NaH_2PO_4; 1,2 $MgCl_2$; 2,5 $CaCl_2$; 11,5 глюкоза; pH розчину становив 7,4.

Відповідно до технічного завдання, із використанням відомих ефекторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів: неселективного агоніста ацетилхоліну (разова концентрація 10^{-4} М та діапазон концентрацій 10^{-10} – 10^{-}

^{3} М), селективного агоніста M_3-холінорецепторів цевімеліну (разова концентрація 10^{-4} М) та селективного агоніста M_2-холінорецепторів AF-DX 116 (разова концентрація 10^{-4} М), а також неселективного антагоністу іпратропію (разова концентрація 10^{-6} М та діапазон концентрацій 10^{-10} – 10^{-3} М) у звітній період нами було здійснено біологічне тестування сполук – потенційних інгібіторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів. Перевірку клітинних механізмів дії сполук здійснювали із використанням неселективних і селективних ефекторів адренорецепторів (адреналіну, норадреналіну, фентоламіну, пропранололу, ізопротеренолу, метопрололу, сальбутамолу) та нікотинових холінорецепторів (нікотину), блокаторів вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо (2-APB, кофеїну і тапсигаргіну), ефекторів іонних каналів плазматичної мембрани (Bay K 8644, ніфедипіну) та інгібітора фосфоліпази С (U-73122).

Для встановлення характеру взаємодії досліджуваної речовини з мускариновими ацетилхоліновими рецепторами були зареєстровані криві «концентрація агоніста-ефект» ацетилхолін-індукованих скорочень на різних концентрацій антагоніста. Надалі для встановлення величини афінності сполуки-антагоніста використовували рівняння регресії Шілда. Відповідно до методу Шілда антагоніст-індукований паралельний зсув кривих «концентрація-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 [74,90].

Аналіз кінетичних закономірностей процесів скорочення-розслаблення проводили окремо на рівні фаз скорочення та розслаблення повної механокінетичної кривої із використанням модифікованого методу Костеріна С.О. та Бурдиги Ф.В. [91].

Експериментальні дані аналізували із використанням програми OriginPro2018. Перевірку вибірок на їх приналежність до нормально розподілених генеральних сукупностей здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Уілка. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми

величинами вибірок використовували парний 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; коефіцієнти детермінації (R^2) були не нижчими за 0,9. Результати представлені як середнє арифметичне ± стандартна похибка середнього (M±SEM), *n* – кількість дослідів.

10.2. Результати та їх обговорення

Для фармакологічного тестування в умовах *in vitro* на мультиклітинних гладеньком'язових препаратах кілець трахеї щурів і мурчаків попереднім скринінгом *in silico* було обрано 23 органічні сполуки з передбаченою холінолітичною активністю. У першій серії експериментів тестували реакцію ГМП трахеї на аплікування ацетилхоліну (10^{-4} М) за умови попередньої дії на препарати тестованих сполук (усі у концентрації 10^{-4} М) упродовж 10 хв. Таким чином, було встановлено 8 сполук зі здатністю пригнічувати ацетилхолінові скорочення, їх шифри: 151689, 767560, 112452, 151475, 208998, 765636, 271619 та 7560419 (Рис. 10.1).

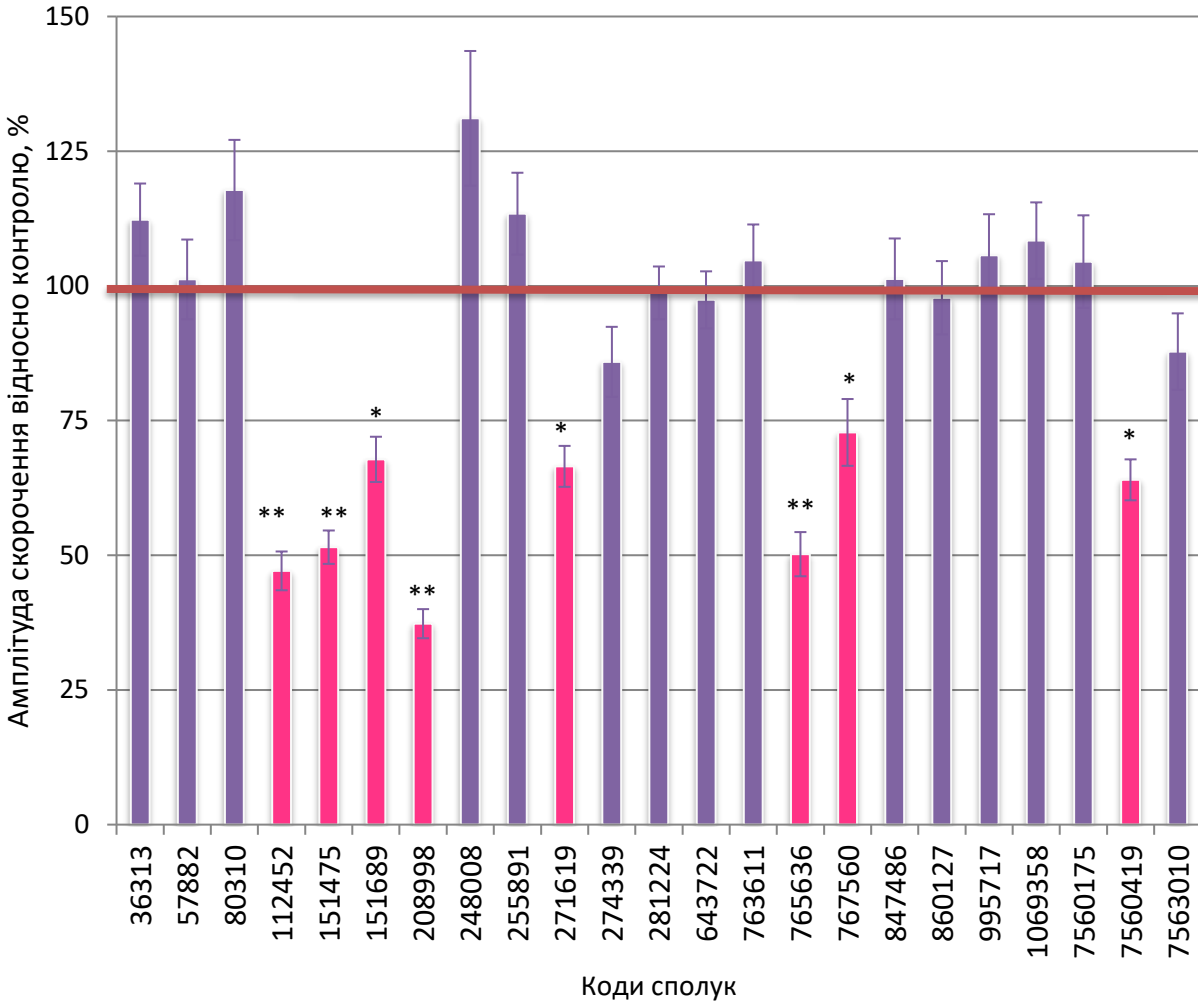


Рис. 10.1 Зміни амплітуди ацетилхолін-індукованих (10^{-5} М) скорочень препаратів трахеї щурів сполуками (використано у концентрації 10^{-4} М, час попередньої інкубації 10 хв). За 100 % прийнято контрольні значення (n = 7). ** - $p < 0,01$ та * - $p < 0,05$ – різниця достовірна щодо контролю.

У наступній серії експериментів було зареєстровано ацетилхолін-викликані скорочення препаратів трахеї щурів за дії обраних (шифри **151689, 767560, 112452, 151475, 208998, 765636, 271619 та 7560419**) сполук (усі речовини використовували в концентрації 10^{-4} М) на тлі попередньої інкубації ГМП з відомим антагоністом холінорецепторів іпратропієм (використано у концентрації 10^{-6} М). Оскільки на тлі іпратропію усі протестовані сполуки не впливали на базальне напруження і скорочувальну реакцію ГМП (дані не

проілюстровано), тож можна стверджувати, що ці речовини є тропними до мускаринових холінорецепторів.

Зазначені сполуки не впливали на реакції ГМП на аплікацію агоніста нікотинових холінорецепторів нікотину (використана концентрація 10^{-6} М, дані не проілюстровано), що користь припущення щодо селективної дії протестованих речовин саме на мускаринові ацетилхолінові рецептори.

Також було встановлено здатність обраних сполук та відомого неселективного інгібітора мускаринових холінорецепторів іпратропію броміду (у всіх випадках використано концентрацію 10^{-6} М, тривалість попередньої інкубації на тлі тестованої речовини 10 хв) пригнічувати скорочення ГМП трахеї, активованих селективним агоністом M_3-холінорецепторів цевімеліну (фіксована концентрація 10^{-4} М). Найбільші інгібіторні властивості щодо M_3-холінорецепторів були виявлені для сполук з кодами **151689, 767560 та 112452** (Рис. 10.2).

З метою перевірки наявності можливих додаткових клітинних мішеней сполук з передбаченою інгібіторною здатністю щодо мускаринових холінорецепторів (шифри151689, 767560, 112452, 151475, 208998, 765636, 271619 та 7560419) та іпратропію броміду було здійснено аналіз кінетики процесу скорочення-розслаблення агоніст-індукованих скорочень за модифікованим методом Костеріна-Бурдиги, який передбачає розрахунок нормованих на амплітуду максимальних швидкостей фаз скорочення (V_{nc}) та розслаблення (V_{nr}). Так, фаза зростання м'язового напруження («фаза скорочення») та його зниження («фаза розслаблення») у випадку скорочень препаратів трахеї, активованих аплікуванням цівемеліну (10^{-4} М), 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 $хв^{-1}$. Механокінетичним аналізом не виявлено жодної речовини, яка б змінювала кінетичні властивості цівімелін-активованих скорочень (Рис. 10.3 А, Б).

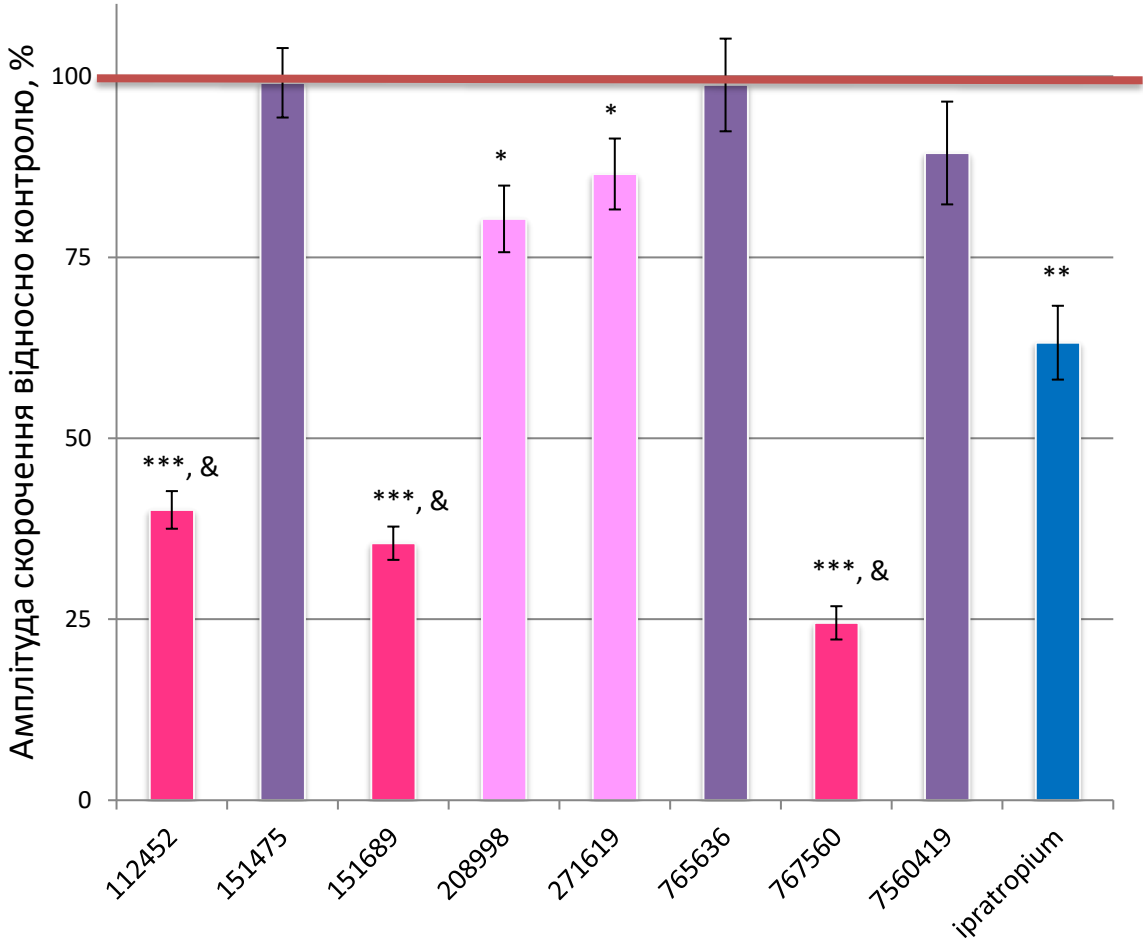


Рис. 10.2. Зміни амплітуди цівімелін-індукованих (10^{-4} М) скорочень препаратів трахеї щурів сполуками-інгібіторами мускаринових холінорецепторів (використано у концентрації 10^{-6} М, час попередньої інкубації 10 хв). За 100 % прийнято контрольні значення (n = 7).

*** - $p < 0{,}001$, ** - $p < 0{,}01$ та * - $p < 0{,}05$ – різниця достовірна щодо контролю; & - $p < 0{,}05$ - достовірно нижче, ніж за дії іпратропію броміду.

Надалі було зареєстровано та проаналізовано криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» у випадку дії обраних сполук; визначено тип інгібування, показники афінності і IC_{50} (Рис. 10.4-10.11).

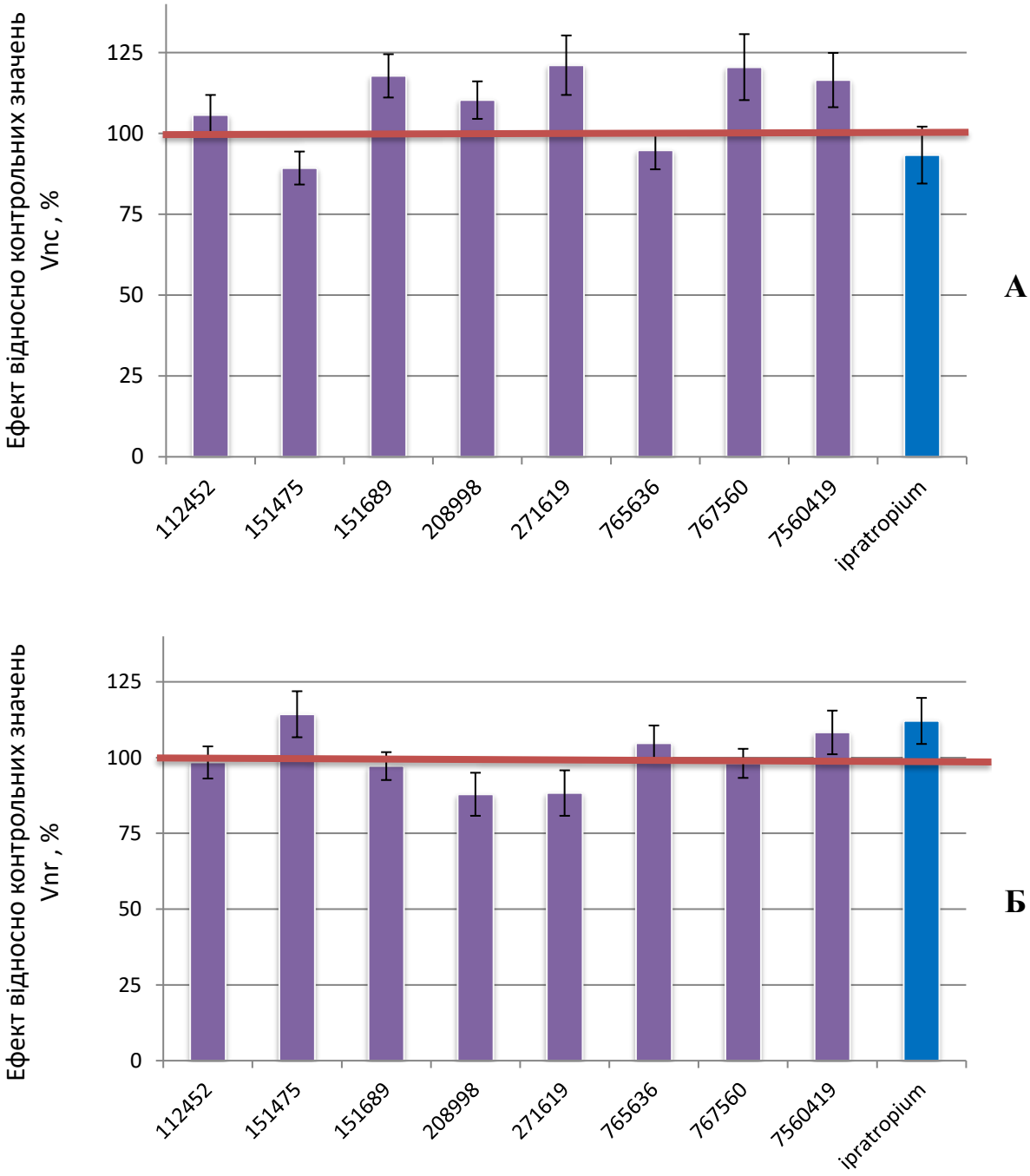
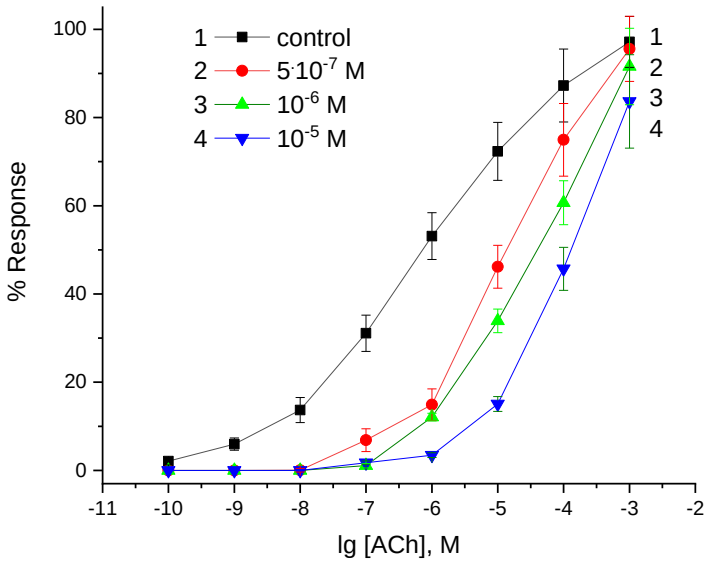


Рис. 10.3. Зміни нормованих максимальних швидкостей фази скорочення (А) та фази розслаблення (Б) цівімелін-індукованих (10^{-4} М) скорочень препаратів трахеї щурів сполуками-інгібіторами мускаринових холінорецепторів (використано у концентрації 10^{-6} М, час попередньої інкубації 10 хв). За 100 % прийнято контрольні значення (n = 7).

Для сполуки з кодом **271619** показник кута нахилу лінії регресії Шілда (0,86 ± 0.12, коефіцієнт детермінації R^2 = 0.98) вказує на конкурентний

механізм дії цієї речовини (Рис. 10.4 А, Б). Велична афінності цієї сполуки pK_B становила 6,62±0.71 та $IC_{50} = 2{,}40 \cdot 10^{-7}$ М.

А



Б

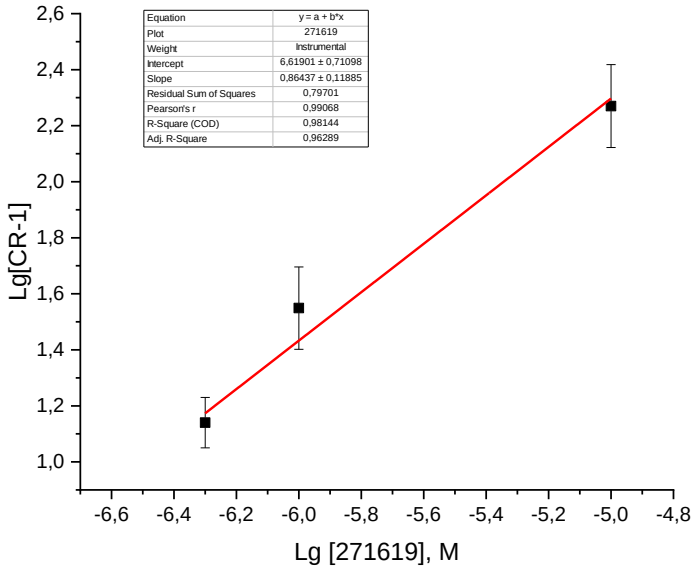
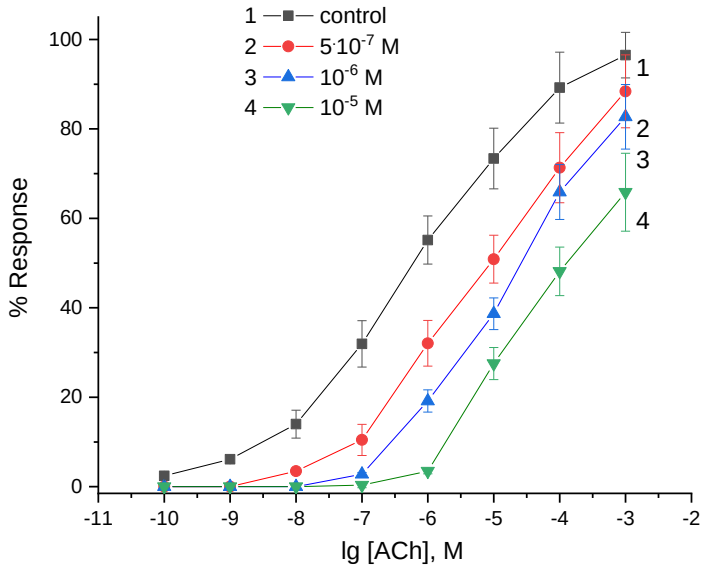


Рис. 10.4. **А** - криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» за дії сполуки **271619** у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів: крива 1 – контроль (діапазон концентрацій 10^{-10} – 10^{-3} М), криві 2-4 – на тлі **271619** у концентраціях $5 \cdot 10^{-7}$ М, 10^{-6} М та 10^{-5} М, відповідно. Показник амплітуди скорочень за дії антагоністів перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10^{-4} М), прийнятим за 100 %. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Б - Графік Шілда для за дії сполуки **271619**. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Для сполуки з кодом **151475** показник кута нахилу лінії регресії Шілда (1.04 ± 0.15, коефіцієнт детермінації $R^2 = 0.98$) також вказує на конкурентний механізм дії цієї речовини (Рис. 10.5 А, Б). Велична афінності цієї сполуки pK_B становила 7,61±0.91 та $IC_{50} = 2{,}45 \cdot 10^{-8}$ М.

А



Б

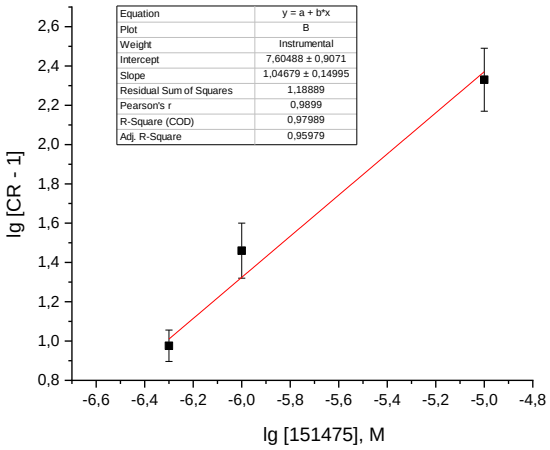


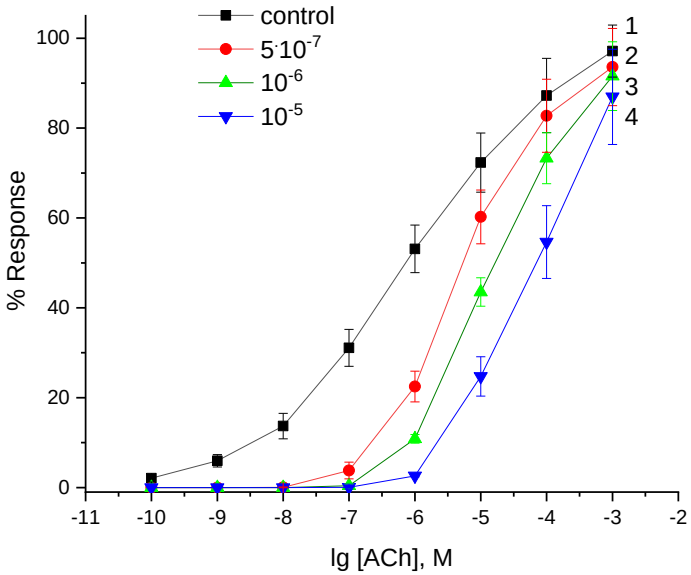
Рис. 10.5. А - криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» за дії сполуки **151475** у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів: крива 1 – контроль (діапазон концентрацій 10^{-10} – 10^{-3} М), криві 2-4 – на тлі **151475** у концентраціях $5 \cdot 10^{-7}$ М, 10^{-6} М та 10^{-5} М, відповідно. Показник амплітуди

скорочень за дії антагоністів перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10^{-4} М), прийнятим за 100 %. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Б - Графік Шілда для за дії сполуки **151475**. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Для сполуки з кодом **151689** показник кута нахилу лінії регресії Шілда (0.86 ± 0.13, коефіцієнт детермінації $R^2 = 0.98$) також вказує на конкурентний механізм дії цієї речовини (Рис. 10.6 А, Б). Велична афінності цієї сполуки pK_B становила 6,33±0.80 та $IC_{50} = 4{,}68 \cdot 10^{-7}$ М.

А



Б

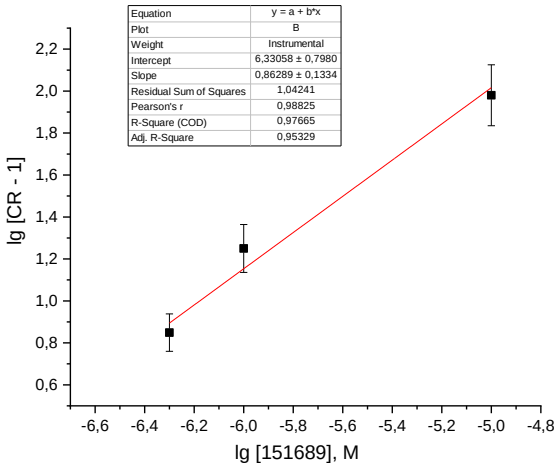


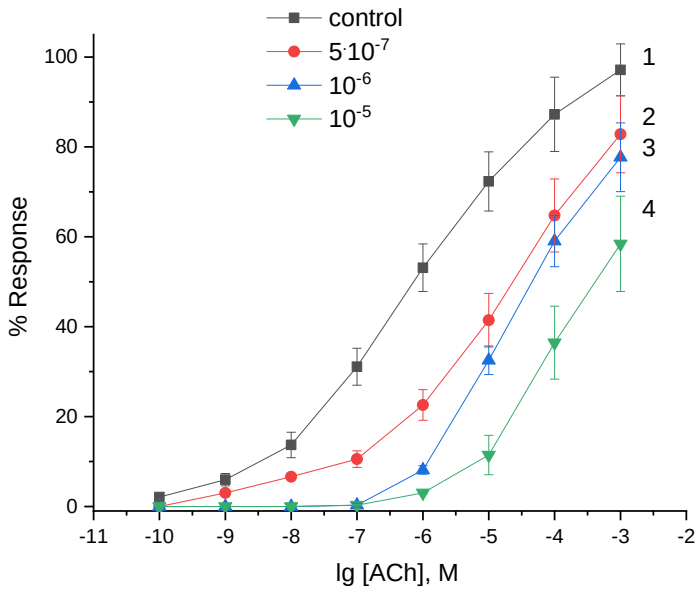
Рис. 10.6. **А** - криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» за дії сполуки **151689** у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів: крива

1 – контроль (діапазон концентрацій 10^{-10} – 10^{-3} М), криві 2-4 – на тлі **151689** у концентраціях $5 \cdot 10^{-7}$ М, 10^{-6} М та 10^{-5} М, відповідно. Показник амплітуди скорочень за дії антагоністів перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10^{-4} М), прийнятим за 100 %. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Б - Графік Шілда для за дії сполуки **151689**. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Для сполуки з кодом **208998** показник кута нахилу лінії регресії Шілда (0.99 ± 0.04, коефіцієнт детермінації $R^2 = 0.99$) також вказує на конкурентний механізм дії цієї речовини (Рис. 10.7 А, Б). Велична афінності цієї сполуки pK_B становила 7,68±0.25 та $IC_{50} = 2{,}09 \cdot 10^{-8}$ М.

А



Б

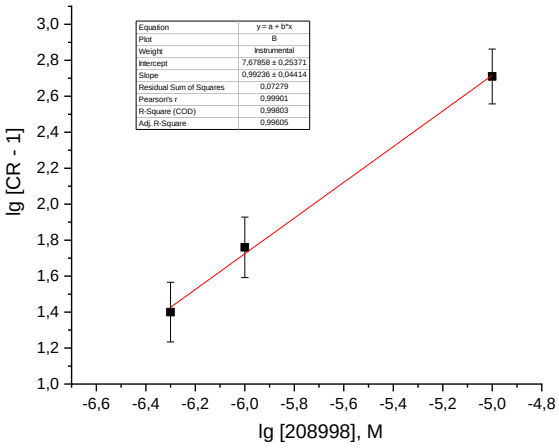
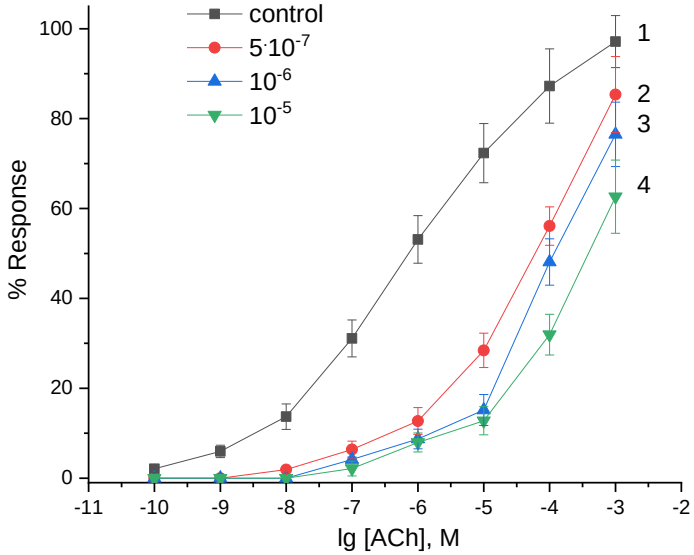


Рис. 10.7. А - криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» за дії сполуки **208998** у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів: крива 1 – контроль (діапазон концентрацій 10^{-10} – 10^{-3} М), криві 2-4 – на тлі **208998** у концентраціях $5 \cdot 10^{-7}$ М, 10^{-6} М та 10^{-5} М, відповідно. Показник амплітуди скорочень за дії антагоністів перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10^{-4} М), прийнятим за 100 %. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Б - Графік Шілда для за дії сполуки **208998**. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Для сполуки з кодом **767560** показник кута нахилу лінії регресії Шілда (0.88 ± 0.12, коефіцієнт детермінації $R^2 = 0.98$) також вказує на конкурентний механізм дії цієї речовини (Рис. 10.8 А, Б). Велична афінності цієї сполуки pK_B становила 7,28±0.70 та $IC_{50} = 5{,}25 \cdot 10^{-8}$ М.

А



Б

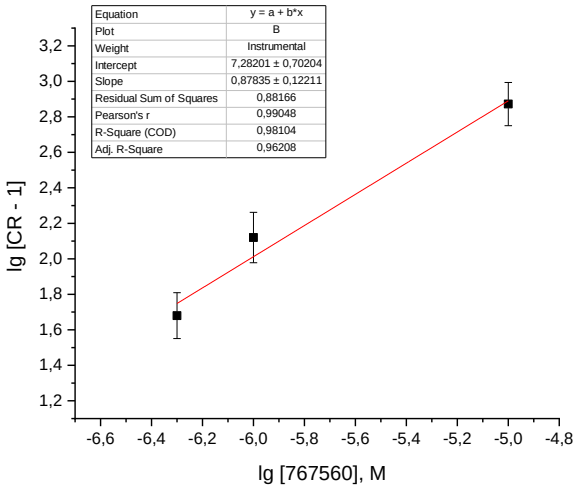
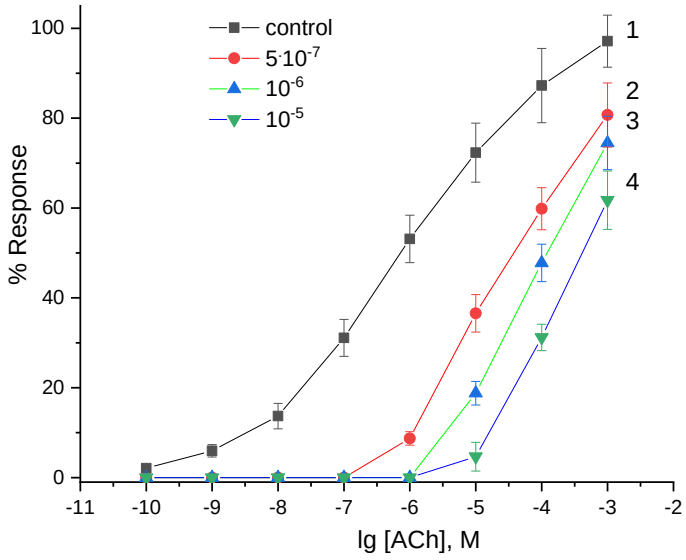


Рис. 10.8. **А** - криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» за дії сполуки **767560** у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів: крива 1 – контроль (діапазон концентрацій 10^{-10} – 10^{-3} М), криві 2-4 – на тлі **767560** у концентраціях $5 \cdot 10^{-7}$ М, 10^{-6} М та 10^{-5} М, відповідно. Показник амплітуди скорочень за дії антагоністів перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10^{-4} М), прийнятим за 100 %. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Б - Графік Шілда для за дії сполуки **767560**. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Для сполуки з кодом **112452** показник кута нахилу лінії регресії Шілда (0.81 ± 0.05, коефіцієнт детермінації $R^2 = 0.99$) також вказує на конкурентний механізм дії цієї речовини (Рис. 10.9 А, Б). Велична афінності цієї сполуки pK_B становила 6,79±0.26 та $IC_{50} = 1{,}62 \cdot 10^{-7}$ М.

А



Б

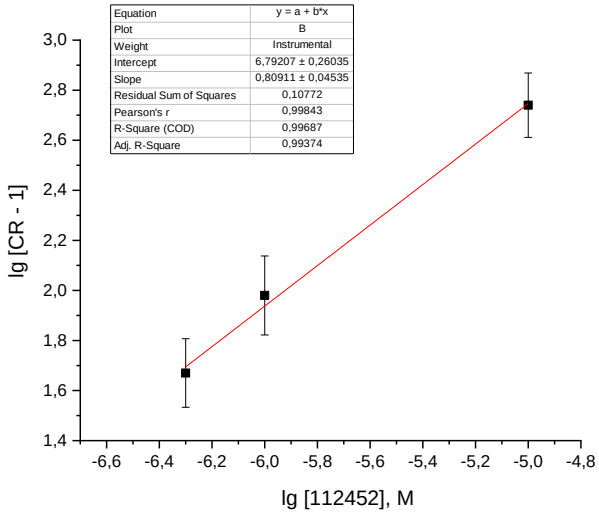
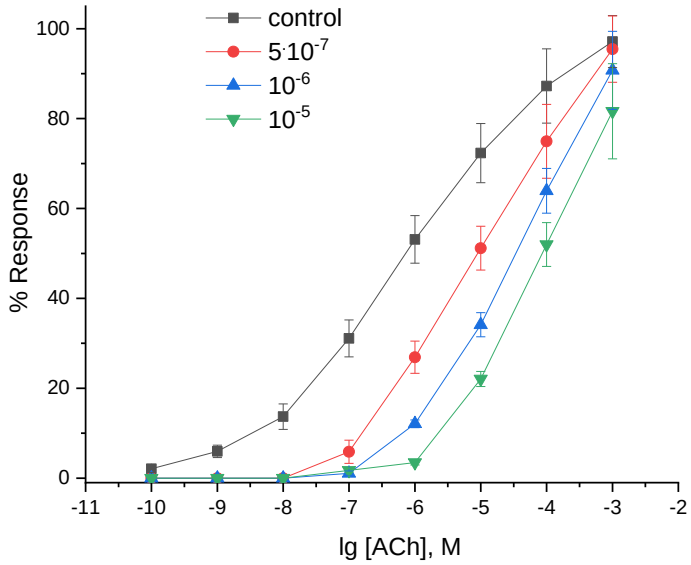


Рис. 10.9. **А** - криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» за дії сполуки **112452** у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів: крива 1 – контроль (діапазон концентрацій 10^{-10} – 10^{-3} М), криві 2-4 – на тлі **112452** у концентраціях $5 \cdot 10^{-7}$ М, 10^{-6} М та 10^{-5} М, відповідно. Показник амплітуди скорочень за дії антагоністів перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10^{-4} М), прийнятим за 100 %. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Б - Графік Шілда для за дії сполуки **112452**. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Для сполуки з кодом **765636** показник кута нахилу лінії регресії Шілда (0.90 ± 0.06, коефіцієнт детермінації $R^2 = 0.99$) також вказує на конкурентний механізм дії цієї речовини (Рис. 10.10 А, Б). Велична афінності цієї сполуки pK_B становила 6,68±0.39 та $IC_{50} = 2{,}09 \cdot 10^{-7}$ М.

А



Б

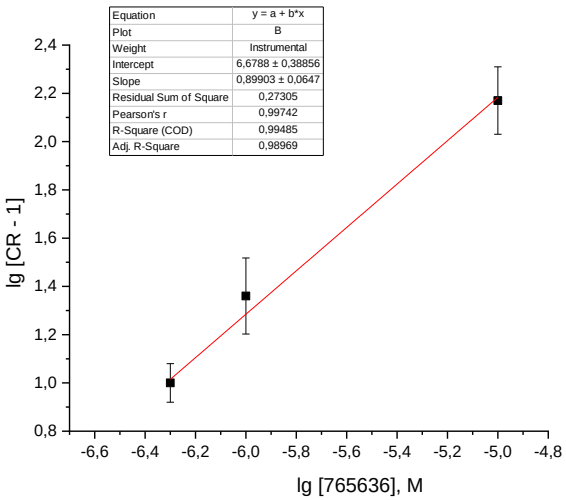


Рис. 10.10. **А** - криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» за дії сполуки **765636** у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів: крива 1 – контроль (діапазон концентрацій 10^{-10} – 10^{-3} М), криві 2-4 – на тлі **765636** у концентраціях $5 \cdot 10^{-7}$ М, 10^{-6} М та 10^{-5} М, відповідно. Показник амплітуди

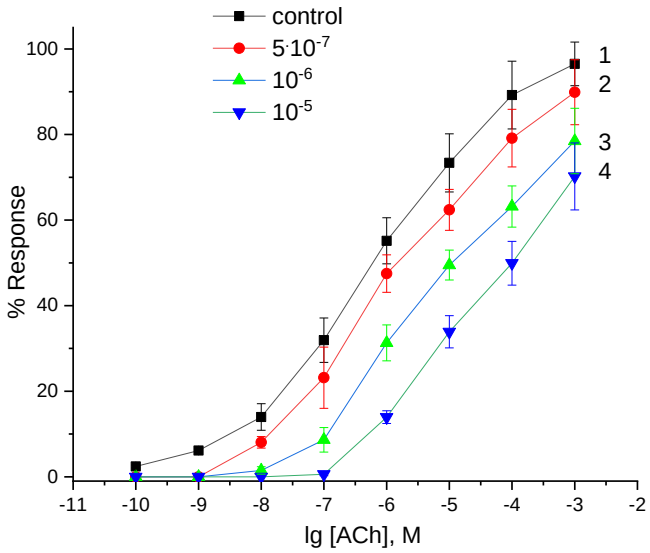
скорочень за дії антагоністів перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10^{-4} М), прийнятим за 100 %. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Б - Графік Шілда для за дії сполуки **765636**. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Для сполуки з кодом **7560419** показник кута нахилу лінії регресії Шілда (1.26 ± 0.19, коефіцієнт детермінації $R^2 = 0.97$) також вказує на конкурентний механізм дії цієї речовини (Рис. 10.11 А, Б). Велична афінності цієї сполуки pK_B становила 6,56±0.57 та $IC_{50} = 2{,}75 \cdot 10^{-7}$ М.

Для відомого неселективного конкурентного антагоніста мускаринових холінорецепторів іпратропію броміду показник кута нахилу лінії регресії Шілда (0.79 ± 0.07, коефіцієнт детермінації $R^2 = 0.99$) (Рис. 10.12 А, Б), велична афінності pK_B становила 9,14±0.62 та $IC_{50} = 7{,}24 \cdot 10^{-10}$ М.

А



Б

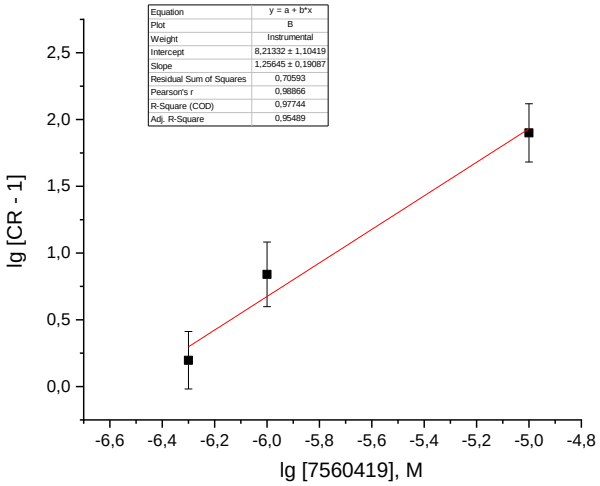
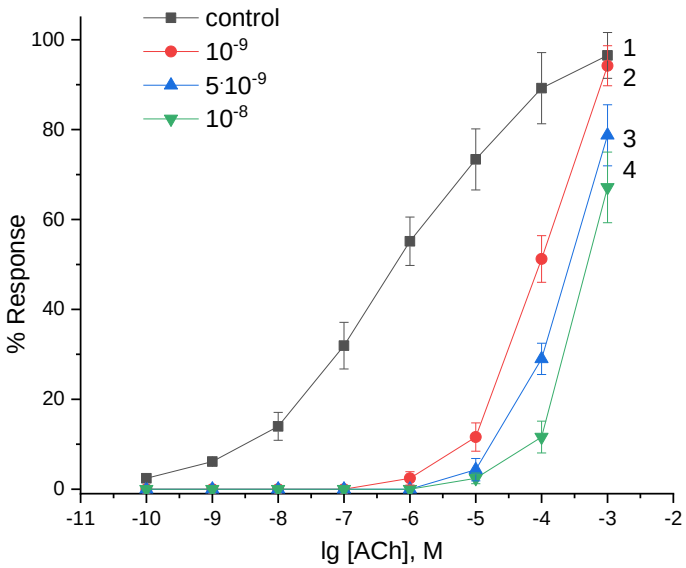


Рис. 10.11. **А** - криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» за дії сполуки **7560419** у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів: крива 1 – контроль (діапазон концентрацій 10^{-10} – 10^{-3} М), криві 2-4 – на тлі **7560419** у концентраціях $5 \cdot 10^{-7}$ М, 10^{-6} М та 10^{-5} М, відповідно. Показник амплітуди скорочень за дії антагоністів перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10^{-4} М), прийнятим за 100 %. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Б - Графік Шілда для за дії сполуки **7560419**. Дані представлені як M±SEM, n=7.

А



Б

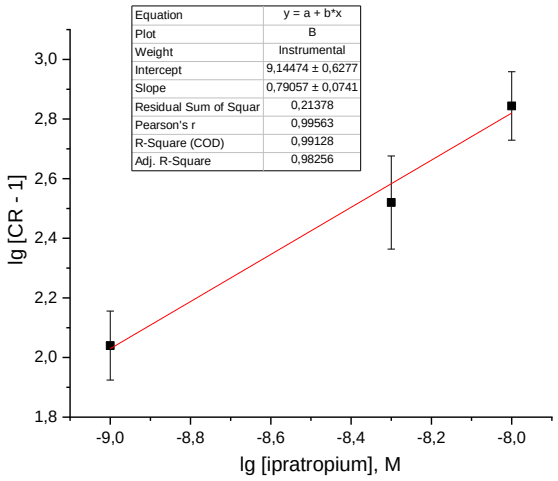


Рис. 10.12. **А** - криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» за дії іпратропію броміду у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів: крива 1 – контроль (діапазон концентрацій 10^{-10} – 10^{-3} М), криві 2-4 – на тлі іпратропію броміду у концентраціях 10^{-9} М, $5 \cdot 10^{-9}$ М, та 10^{-8} М, відповідно. Показник амплітуди скорочень за дії антагоністів перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10^{-4} М), прийнятим за 100 %. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Б - Графік Шілда для за дії іпратропію броміду. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Тож передбачені сполуки (151689, 767560, 112452, 151475, 208998, 765636, 271619 та 7560419) володіють меншою афінністю і характеризуються вищими значеннями IC_{50} порівняно з відомою сполукою іпратропію броміду, який є активною речовиною лікарських препаратів для терапії бронхіальної астми і ХОЗЛ (дані систематизовано в табл. 10.1).

Таблиця 10.1.

Фармакологічні ефекти сполук-антагоністів мускаринових ацетилхолінових рецепторів за їх дії на гладенькі м'язи трахеї щурів. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Шифр сполуки	**pK_B**	**IC_{50}, M**	**Нахил графіка Шілда**
271619	6,62 ± 0.71	$2{,}40 \cdot 10^{-7}$	0,86 ± 0.12
151475	7,61 ± 0.91	$2{,}45 \cdot 10^{-8}$	1.04 ± 0.15
151689	6,33 ± 0.80	$4{,}68 \cdot 10^{-7}$	0.86 ± 0.13
208998	7,68 ± 0.25	$2{,}09 \cdot 10^{-8}$	0.99 ± 0.04
767560	7,28 ± 0.70	$5{,}25 \cdot 10^{-8}$	0.88 ± 0.12
112452	6,79 ± 0.26	$1{,}62 \cdot 10^{-7}$	0.81 ± 0.05
765636	0.90 ± 0.06	$2{,}09 \cdot 10^{-7}$	6,68 ± 0.39
7560419	1.26 ± 0.19	$2{,}75 \cdot 10^{-7}$	6,56 ± 0.57
іпратропію бромід	9,14 ± 0.62	$7{,}24 \cdot 10^{-10}$	0.79 ± 0.07

Проте варто відзначити, що сполуки з кодами **767560**, **151475** та **112452** за однакових концентрацій достовірно ефективніше пригнічують проведення сигналу через M_3-холінорецептори порівняно з іпратропієм бромідом (Рис. 10.2).

Встановлено, що речовини з кодами **151689, 767560, 112452, 151475, 208998, 767536, 271619 та 7560419** не мають суттєвого 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 показано, що перераховані вище сполуки діють на внутрішньоклітинний каскад передавання сигналу через мускаринові холінорецептори M_3-типу.

Як відомо, у дихальних шляхах людини експресуються мускаринові ацетилхолінові рецептори M_1-, M_2- та M_3-типів, причому M_1-тип рецепторів (як і M_2 та M_3) характерний для епітеліальних клітин, який вистилає дихальні шляхи, тоді як рецептори M_2- та M_3-типів приймають безпосередню участь у регуляції просвіту повітроносних шляхів [4,74,92,93]. Фізіологічними функціями M_2-холінорецепторів, які розташовуються і в гладеньком'язових клітинах, і у постгангліонарних парасимпатичних нейронах, є, відповідно, обмеження β_2-адренорецептор-опосередкованого розслаблення гладеньких м'язів за рахунок зменшення внутрішньоклітинної концентрації цАМФ, та пригнічення вивільнення нейромедіатора ацетилхоліну з нервових закінчень постгангліонарних нейронів [13,74,94]. Втім, за дії неселективних антагоністів мускаринових холінорецепторів (атропіну, іпратропію броміду) результуючим ефектом пригнічення M_2-холінорецепторів є бронхоконстрикція за рахунок саме зняття негативного зворотного зв'язку регуляції вивільнення ацетилхоліну. Хоча у мембранах гладеньком'язових клітин M_2-тип рецепторів за кількістю суттєво переважає M_3-холінорецептори, останні тут є функціонально головним типом ацетилхолінових рецепторів, що забезпечують їх скорочення та звуження просвіту дихальних шляхів, а також регуляцію секреторної активності слизових залоз [4, 74, 95-97].

Також при розробці новітніх препаратів для терапії бронхіальної астми і ХОЗЛ надзвичайно важливо мати на увазі, що постгангліонарні M_2-холінорецептори є дуже чутливими до загального стану дихальної системи

людини, а різноманітні несприятливі чинники (як то вірусні інфекції, респіраторні пошкоджувальні фактори, індуктори запалення тощо) суттєво пригнічують функціональну роль цих рецепторів (зокрема, за рахунок дії ендогенних антагоністів та зниження експресії рецепторів) [56,74, 98]. 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 бронхіальної астми і ХОЗЛ [74, 94].

Тож, хоча наразі найбільш вживаним в Україні препаратом проти ХОЗЛ і бронхіальної астми з М-холінолітичною активністю є SAMA-препарат іпратропія бромід (ipratropium, зазвичай у дозі 0,25-0,5 мг) [99, 100], не викликає сумніву, що оптимальною стратегією терапії обструктивних явищ в дихальних шляхах холінолітичними препаратами (точніше препаратів з властивостями антагоністів мускаринових холінорецепторів тривалої дії – LAMA) є використання саме M_3-селективних антагоністів [74, 101]. Актуальні протоколи терапії ХОЗЛ (США, країни ЕС) і астми включають використання таких LAMA: тіотропій (tiotropium, лікування астми, рекомендовано у дозі 5 або 18 мкг залежно від способу функціонування нібулайзера, один раз на добу) та аклідіній (aclidinium, рекомендовано у дозі 400 мкг двічі на добу), глікопірроній (glycopyrronium, рекомендовано у дозі 50 мкг один раз на добу), умеклідіній (umeclidinium, лікування ХОЗЛ і можливе застосування для лікування астми, рекомендовано у дозі 62,5 мкг один раз на добу) [4, 56, 102]. За даними мета-аналізу [56], для новітніх препаратів LAMA (аклідінію, глікопірронію і глікопірронію) не виявлено достовірних терапевтичних переваг щодо більш раннього тіотропія броміду (єдиного LAMA-препарату терапії ХОЗЛ до 2012 року).

Так, натепер активною речовиною препаратів для терапії неконтрольованої астми є тіотропія бромід – структурний аналог іпратропія броміду, який є функціональними антагоністом саме M_3-холінорецепторів,

оскільки хоча і зв’язується з M_2-рецепторами, але дисоціює з останніх на порядок швидше, аніж з рецепторів M_3-типу. Також порівняно з іпратропієм, тіатропій бромід має менші пероральну біодоступність і системні побічні ефекти, та збільшений період напіввиведення з організму пацієнтів [102-104]. Разом з тим, використання тіатропія броміду для терапії стабільної астми може бути неефективним внаслідок недостатньої дози препарату, тоді як її підвищення призводить до появи побічних ефектів [74, 105].

Отже, відповідно до технічного завдання, у звітній період на препаратах трахеї щурів і мурчаків нами було здійснено біологічне тестування сполук з передбаченою інгібувальною активністю щодо мускаринових холінорецепторів: вивчено їхні фармакологічні та кінетичні ефекти і параметри. Нами встановлено, що з сполуки кодами **767560**, **151475** та **112452** достатньо ефективно (середні значення IC_{50} становлять $5{,}25\cdot10^{-8}$ М, $,45\cdot10^{-8}$ М та $1{,}62\cdot10^{-7}$ М, відповідно) за однакових концентрацій достовірно суттєвіше пригнічують проведення сигналу саме через M_3-холінорецептори порівняно з іпратропієм бромідом, не маючи суттєвого впливу на M_2-холінорецептори. Тому результати наших досліджень з розробки препаратів з холінолітичною активністю, отримані на даному етапі виконання проекту є надзвичайно важливими і обнадійливими. Тож маємо всі підстави вважати зазначені сполуки перспективними попередниками холінолітичних препаратів нового покоління зі спрямованою дією на M_3-холінорецептори.

РОЗДІЛ 11. Аналіз залежності активності від хімічної структури та створення стратегії оптимізації активності та селективності сполук

Рецепторно-орієнтовані фармакофорні моделі будували за допомогою програми Discovery Studio Visualizer 4.0.

На основі міжмолекулярних зв'язків між селективними активними сполуками і рецептором mAChR3 було побудовано фармакофорні моделі. До неї були накладені ліганди з попарного вирівнювання.

Радіуси фармакофорних точок встановлювалися по замовчуванню: для ароматичних точок – 1,2 Å, для гідрофобних – 1 Å, для заряджених – 1 Å, для донорів і акцепторів водневого зв'язку – 0,9 Å.

Моделі, відредаговані в програмі Discovery Studio Visualizer 4.0 зберігали у форматі .CHM. За допомогою програми PharmDeveloper, що була розроблена нами раніше [106, 107], проводили конвертацію файлів із формату .CHM у формат .QUERY для подальшої роботи у цій програмі.

У PharmDeveloper фармакофорні точки моделі усереднювалися. Усереднювалися лише мінімум три точки, що знаходилися на відстані не більше 1,5 Å. Інші точки видалялися.

На першому етапі було проаналізовано спосіб взаємодії орігінального ліганда mAChRs тіотропія, що використовується як лікарський засіб. У випадку взаємодії з M3 рецептором цей ліганд розміщений в ацетилхолін зв'язуючій ділянці (рис. 11.1). Обидва його тіофенові залишки утворюють численні гідрофобні та стекінгові взаємодії з амінокислотними залишками – Ala235, Tyr148, Ala238, Trp199, а також один з метилових замісників утворює гідрофобну взаємодію з Tyr529. Кето-група утворює водневий зв'язок з Asn507, з цією ж амінокислотою є ще один водневий зв'язок – з гідроксильною групою ліганда (поряд з кето-групою).

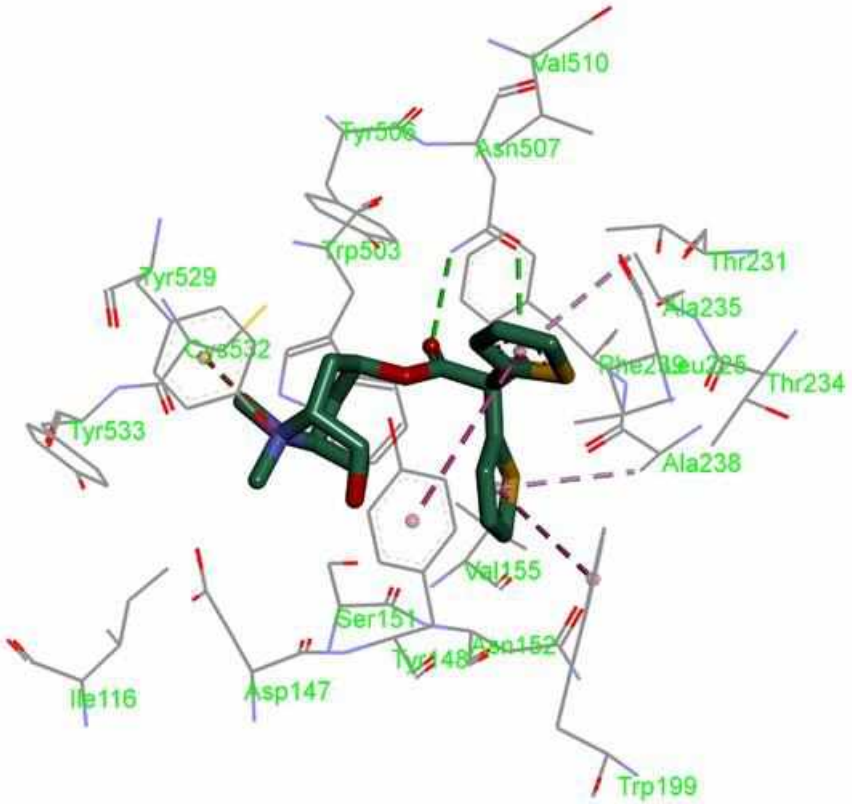


Рис. 11.1. 3D діаграма взаємодії тіотропія з М3 рецептором ацетилхоліну.

На основі отриманої інформації побудовано фармакофорну модель, що описує цю взаємодію М3 з тіотропієм (рис. 11.2):

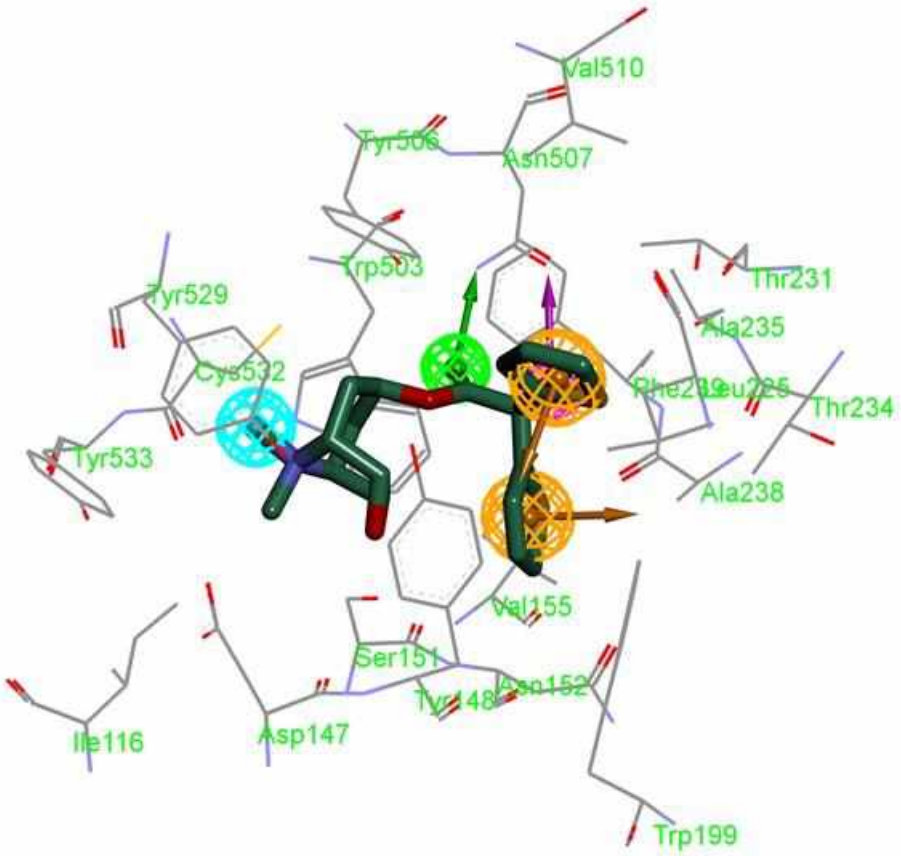


Рис. 11.2 Фармакофорна модель взаємодії mAChR3 з тіотпропієм. Гідрофобні і стекінгові взаємодії тіофенів позначено ароматичними фармакофорними точками з направленим вектором (позначені помаранчевими точками з векторами), гідрофобна точка побудована на метилі (блакитного кольору точка), акцептор водневого зв’язку (зелений вектор) – на кето-групі, донор (пурпуровий вектор) – на гідроксильній групі

Аналогічний аналіз і побудову фармакофорних моделей зроблено і для лігандів 112452, 151689 і 767560. Показано, що вони мають подібний спосіб зв’язування як у рецептора M3 з оригінальним лігандом.

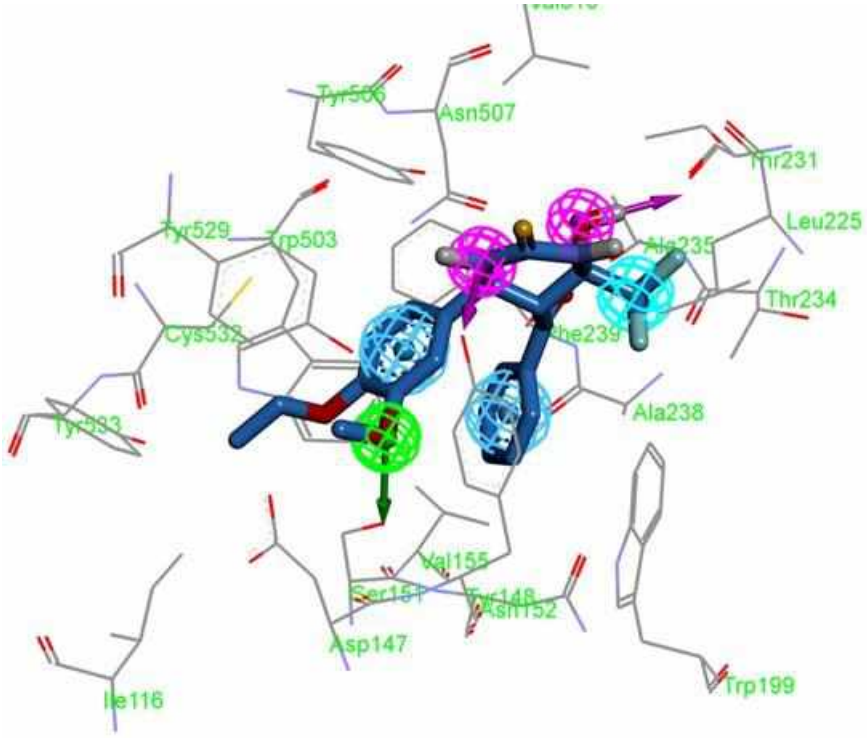


Рис. 11.3 Фармакофорна модель взаємодії mAChR3 з речовиною 112452. Позначення аналогічні до рис. 4.2, синіми точками зображено ароматичні точки без вектора.

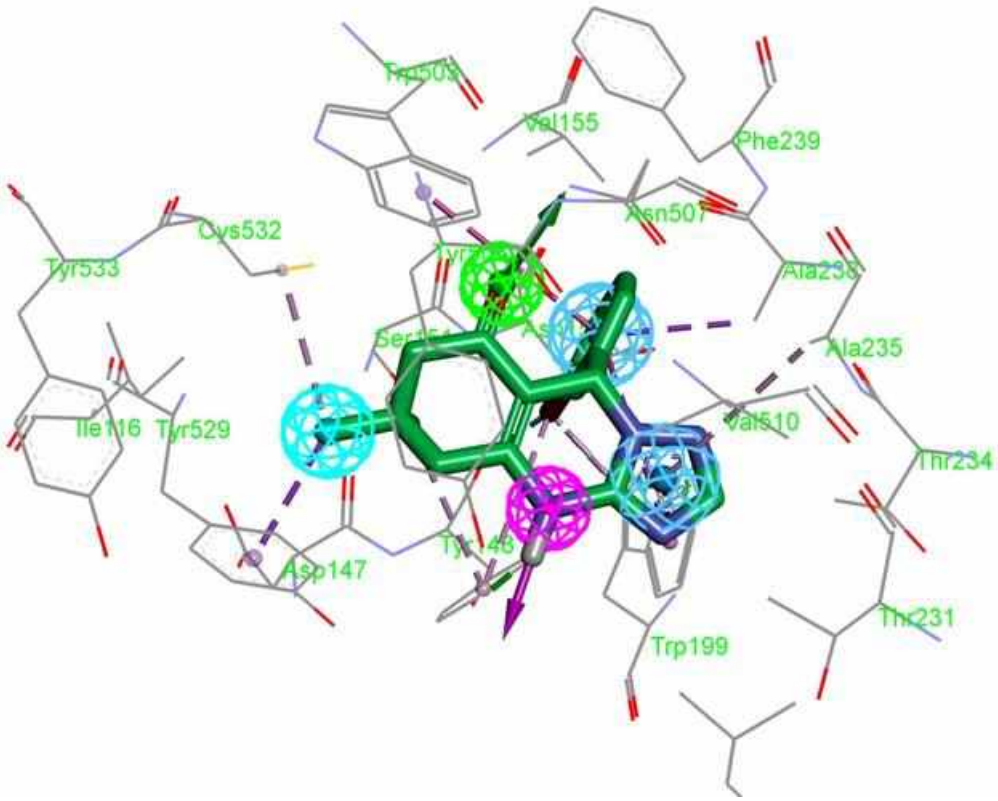


Рис. 11.4 Фармакофорна модель взаємодії mAChR3 з речовиною 151689.

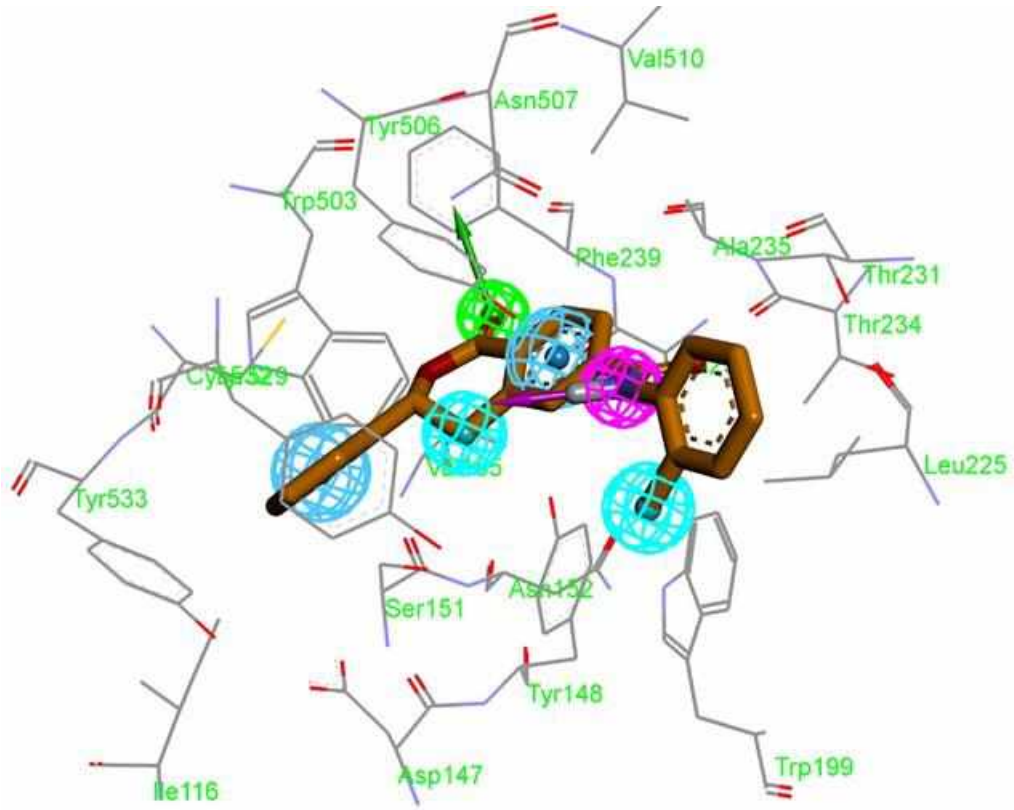


Рис.11.5 Фармакофорна модель взаємодії mAChR3 з речовиною 767560.

Для всіх моделей було зроблено геометричне усереднення фармакофорних точок однакових типів. Усереднювалися лише мінімум три точки, що знаходилися на відстані не більше 1,5 Å. Інші точки видалялися.

Таким чином було отримано узагальнюючу модель, що описує спосіб зв’язування усіх чотирьох моделей. Фармакофорна модель містить шість фармакофорних точок: три ароматичні точки без вектора, одна – гідрофобна, один – донор і один – акцептор водневого зв’язку:

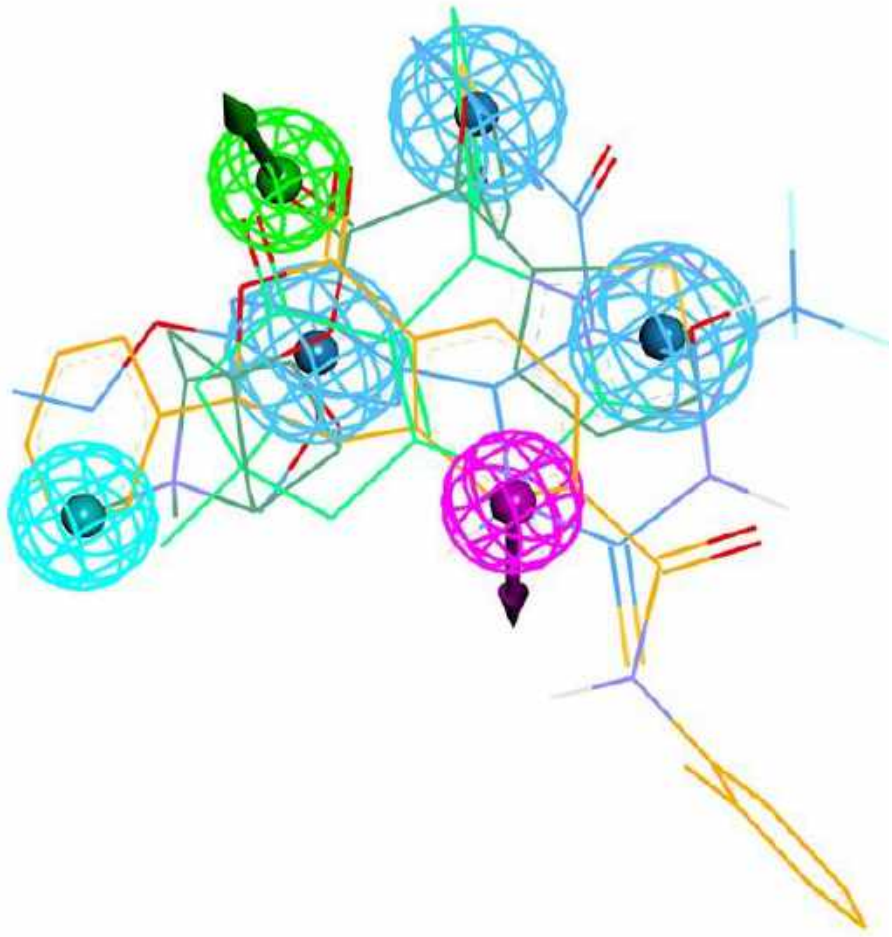


Рис. 11.6 Узагальнена фармакофорна модель взаємодії М3 мускаринового рецептора ацетилхоліну з селективними інгібіторами.

Всі вище згадані ліганди є селективними по відношенню до рецептора М3. Вірогідно, якщо сполука відповідає узагальнюючій фармакофорній моделі, то вона буде потенційно селективною щодо М3. Щоб це перевірити, було накладено на модель низку інших активних (5 молекул), але не селективних щодо М3 лігандів. Показано, що всі вони лише частково відповідають моделі. Всі вони не відповідають як мінімум одній точці моделі і часто слабо перекриваються з іншими точками.

Отже, щоб ідентифікувати активні сполуки, селективні щодо рецептора М3, слід обирати ліганди, що максимально точно відповідатимуть всім точкам узагальнюючої моделі. При цьому спрямування гідрофобних фрагментів не дуже принципове, бо у всіх досліджених лігандах, вони розміщувалися по

різному, але вони повинні утворювати гідрофобні взаємодії з рецептором так, як оригінальний ліганд тіотропій.

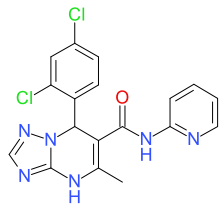
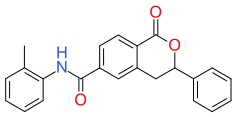
Як зазначалося вище, сполуки 767560, 151475 та 112452 за однакових концентрацій достовірно ефективніше пригнічують проведення сигналу саме через М3-холінорецептори порівняно з іпратропієм бромідом. Оскільки оптимальною терапією обструктивних явищ в дихальних шляхах холінолітичними препаратами є використання саме М3-селективних антагоністів, то подальшу оптимізацію сполук було вирішено проводити на основі знайдених класів сполук, які проявили найбільші інгібіторні властивості щодо М3-холінорецепторів. Відповідно каркасами для подальшої оптимізації сполук були обрані 7-феніл-4,7-дигідро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]піримідин-6-карбальдегід, [4-гідрокси-6-феніл-2-тіоксо-4-(трифторметил)гексагідропіримідин-5-іл]-фенілметанон та аміди 1-оксо-3-феніл-ізохроман-6-карбонової кислоти.

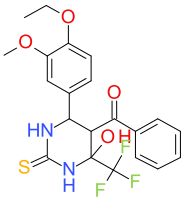
РОЗДІЛ 12. Оптимізація фізико-хімічних параметрів найбільш селективних та активних інгібіторів mAChRs для покращення біодоступності та зменшення токсичності сполук.

Для зменшення токсичності сполук, їх побічної дії, а саме впливу сполук на інші ферменти нам необхідно розробити сполуки з селективною дією на мускаринові холінорецептори M_3-типу. За результатами попереднього етапу роботи 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 нами було показано, що три сполуки **767560**, **151475** та **112452** діють на внутрішньоклітинний каскад передавання сигналу через мускаринові холінорецептори M_3-типу. Знайдені сполуки є селективними, не мають суттєвого впливу на нікотинові холінорецептори і адренорецептори дихальних шляхів щурів і мурчаків і за однакових концентрацій достовірно ефективніше пригнічували проведення сигналу саме через M_3-холінорецептори порівняно з іпратропієм бромідом. Тому на цьому етапі нами була проведена оптимізація цих сполук для покращення їх біодоступності. Дані активності і фізико-хімічні властивості цих сполук наведено в таблиці 12.1.

Таблиця 112.1.

Результати дослідження активності та ключових властивостей сполук **767560**, **151475** та **112452**

Код сполуки	**Структура**	**pK$_B$**	**IC$_{50}$, M**	**ClogP**	**ClogS**
151475		7,61 ± 0.91	$2{,}45 \cdot 10^{-8}$	3.5	-5.8
767560		7,28 ± 0.70	$5{,}25 \cdot 10^{-8}$	4.6	-6.4

112452		6,79 ± 0.26	$1,62 \cdot 10^{-7}$	4.5	-7.8

Оптимізація була спрямована на покращення фізико-хімічних властивостей сполук, а саме зменшення ліпофільності сполук, шо в свою чергу також має сприяти селективності дії сполук за рахунок більш специфічних взаємодій, та збільшення розчинності сполук у воді. При оптимізації сполук використовувались розрахункові значення ліпофільності сполук (CLogP) та їх розчинності у воді (CLogS). Оптимізація проводилась за допомогою методів комп'ютерного моделювання. Враховувалась розраховані програмою молекулярного докінгу енергії зв'язування для кожного комплексу ліганд-рецептор, відповідність сполук до фармакофорної моделі і збереження взаємодії з ключовими амінокислотними залишками сайту mAChR3, щоб оптимізація фізико-хімічних властивостей сполук відбувалась без втрати активності сполук.

При оптимізації сполуки **112452** (клас [4-гідрокси-6-феніл-2-тіоксо-4-(трифторметил)гексагідропіримідин-5-іл]-фенілметанони) проводилась модифікація замісників на фенілі в шостому положенні гетероциклу. Також було проведено заміну тіоксо групи в другому положенні гетероциклу на оксо групу. Дана заміна не значно змінює взаємодію даного класу сполук з сайтом mAChR3 але значно покращує фізико-хімічні характеристики сполук, що видно на прикладі сполук **112452** та **205668** які мають значення CLogP 4,5 і 3,2 та CLogS -7,8 і -6,2 відповідно.

Відповідність сполук до фармакофорної моделі можна подивитись на прикладі сплуки **154350** – рис 12.1.

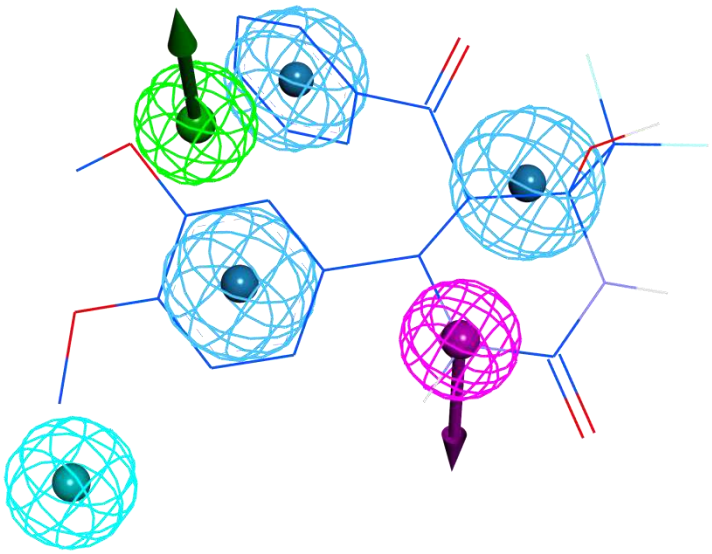


Рисунок 12.1. Відповідність сполуки 154350 узагальнюючій фармакофорній моделі. Блакитним кольором позначено гідрофобну фармакофорну точку, синім – ароматичні точки без вектора, малиновим – донор водневого зв'язку, зеленим – акцептор водневого зв'язку.

Також порівнювались комплекси сполук, отримані методом молекулярного докінгу. Для прикладу на рисунку зображено спосіб взаємодії сполук **112452** та **154350**. Структури цих сполук містять дві відмінності. Сполука **112452** містить 4-етокси-3-метокси-фенільний фрагмент, а сполука **154350** – містить 3,4-диметоксифенільний фрагмент. Другою відмінністю є наявність Оксигену в другому положенні гексагідропіримідину в сполуки **154350** замість Сульфуру в сполуці **112452**. Через такі заміни, сполука **154350** має менші показники LogP та LogS – 2,8 та -5,9 відповідно, а сполука **112452** – 4,5 та -7,8 відповідно. При таких змінах фізико-хімічних параметрів сполук, вони зберегли взаємодії з рецептором, що відповідають за їх активність, а саме: водневі зв'язки з Ser151, Tyr148 та Val510; а також гідрофобні взаємодії з Ala238, Cys532, Trp199, Ala235, Leu225 та Tyr148.

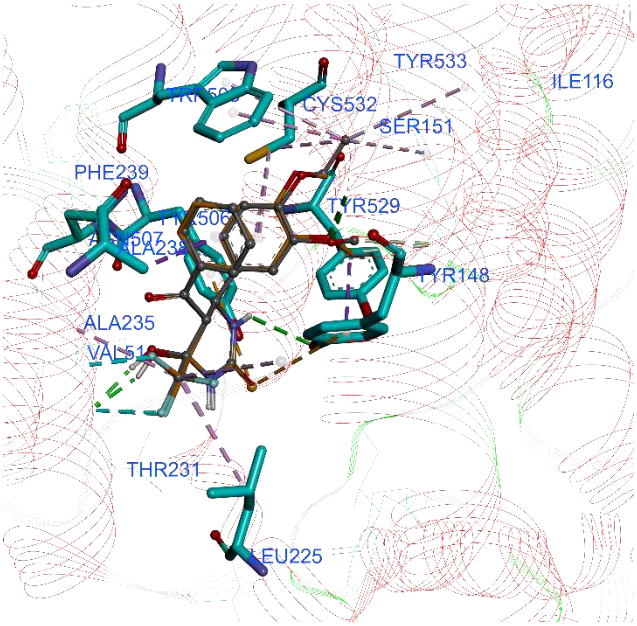
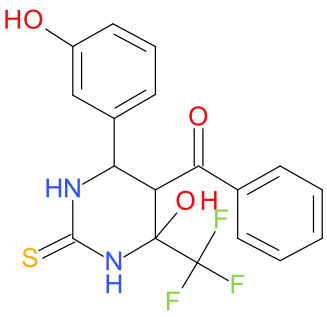


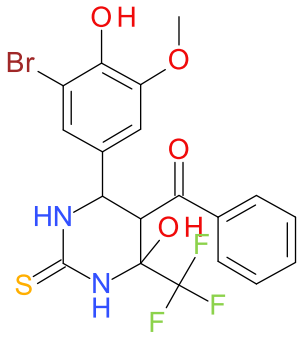
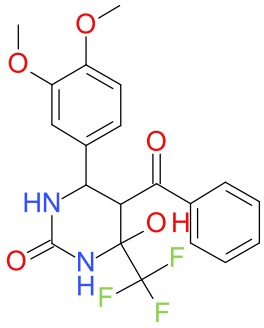
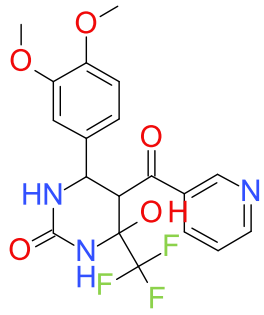
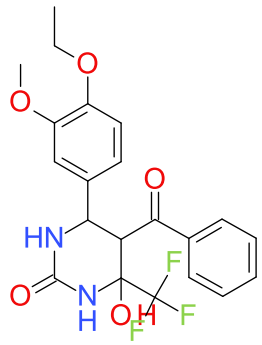
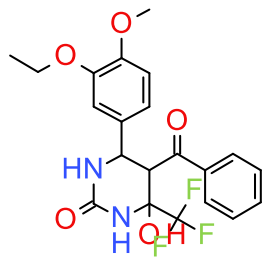
Рис. 12.2. Комплекс сполук **112452** (сіра) та **154350** (оранжева) з мускариновим рецептором ацетилхоліну III типу. Водневі зв'язки позначені зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими пунктирними лініями.

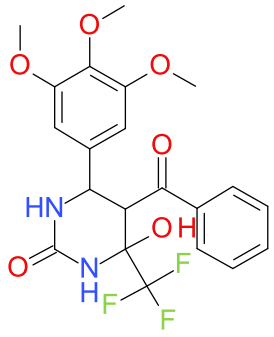
Структури і фізико-хімічні властивості всіх оптимізованих сполук цього класу наведено в таблиці.

Таблиця 12.2.

Структури і фізико-хімічні властивості оптимізованих [4-гідрокси-6-феніл-2-тіоксо-4-(трифторметил)гексагідропіримідин-5-іл]-фенілметанонів.

Код сполуки	**Структура**	**CLogP**	**CLogS**
112444		3.9	-6.9

112464		4.6	-7.9
154350		2.8	-5.9
154402		1.7	-5.5
205668		3.2	-6.2
205670		3.2	-6.1

154349		2.8	-5.9

При оптимізації сполуки **151475** (клас 7-феніл-4,7-дигідро-[1,2,4]триазоло[1,5-a]піримідин-6-карбальдегіди) проводилась модифікація замісників на фенілі в сьомому положенні гетероциклу. Зменшували кількість галогенів і вводили більш гідрофільні замісники. Також модифікували замісники в шостому положенні гетероциклу.

На рисунку 12.3 для порівняння зображено спосіб взаємодії сполук **151475** та **146539**. Як видно з представленої схеми, дані сполуки мають схожий спосіб взаємодії. [1,2,4]триазоло[1,5-a]піримідиновий фрагмент формує водневий зв'язок з Asn507 та гідрофобні взаємодії з Ala235 та Ala238. 2-піридилкарбомаіловий фрагмент сполук **151475** та **146539** займають подібне положення в активному сайті мускаринового рецептору та утворюють водневі зв'язки Tyr148 та гідрофобні взаємодії з Leu225. Відмінність в структурі та способі взаємодії цих сполук з активним сайтом це 2,4-дихлорфенільний (сполука **151475**) та 3-гідроксифенільний (сполука **146539**) фрагмент. Площини фенільних кілець знаходяться в ортогональному положенні. Гідрофобна взаємодія з амінокислотним залишком Tyr148 збереглась у обох сполук. Гідрофобні взаємодії з амінокислотним залишком Cys532 сполуки **146539** зникають порівняно з сполукою **151475**. Однак наявність додаткового донора водневого зв'язку у сполуки **146539** робить можливим формування водневого зв'язку з Ser151. Також сполука **146539** формує гідрофобну взаємодію з Trp503.

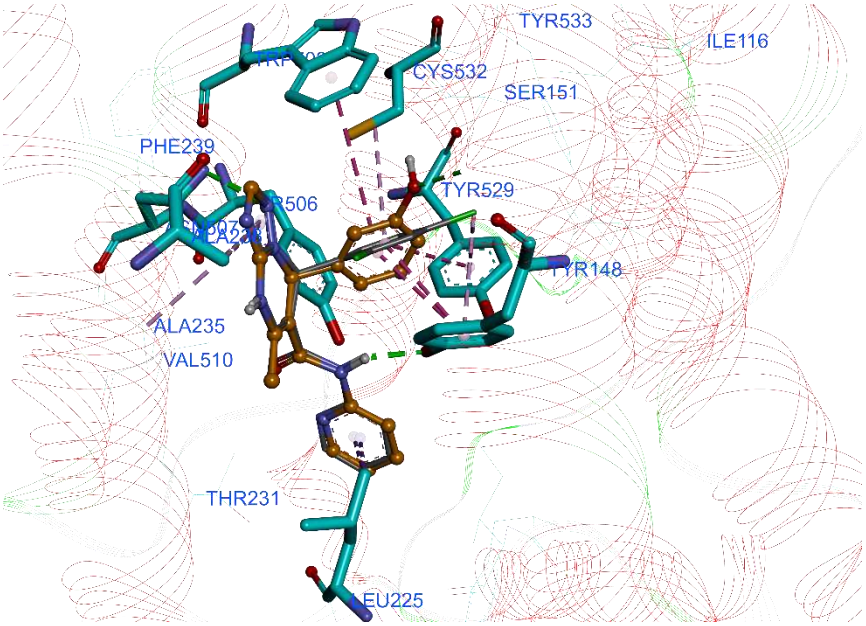
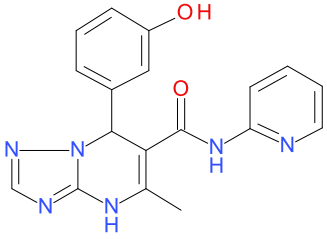


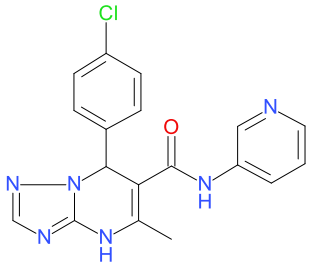
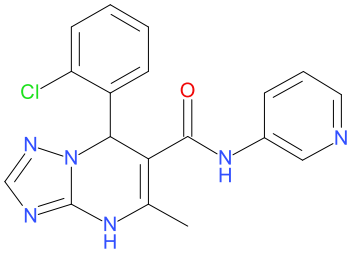
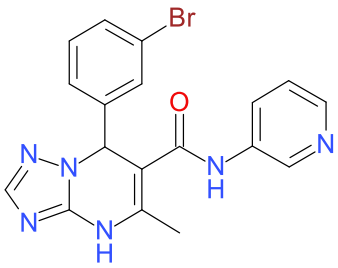
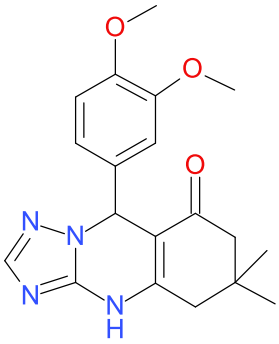
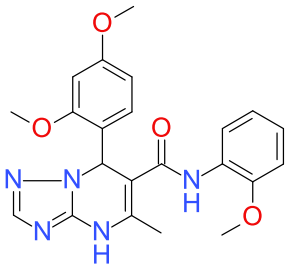
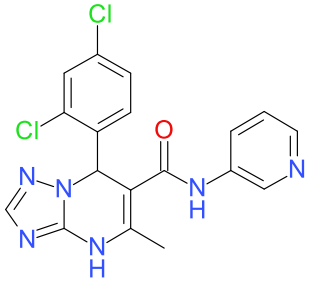
Рис. 12.3. Комплекс сполук **151475** (сіра) та **146539** (оранжева) з мускариновим рецептором ацетилхоліну III типу. Водневі зв'язки позначені зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими пунктирними лініями.

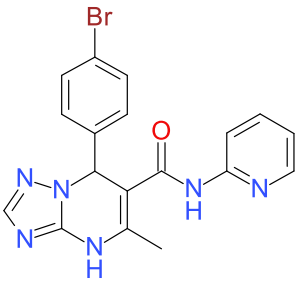
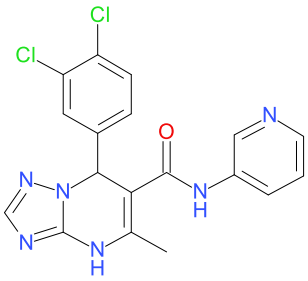
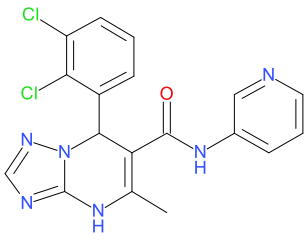
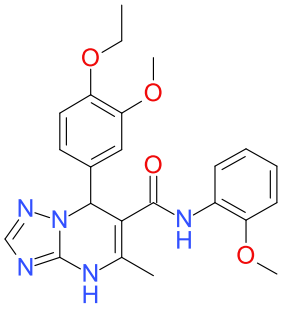
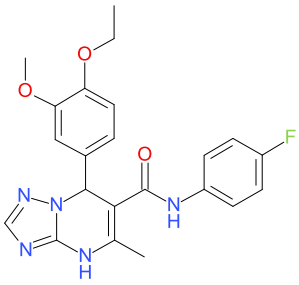
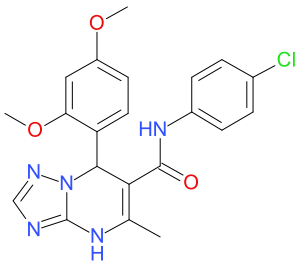
Структури і фізико-хімічні властивості всіх оптимізованих сполук даного класу наведено в таблиці 12.3.

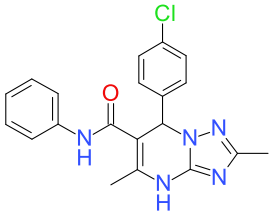
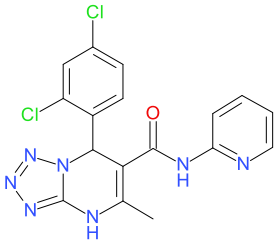
Таблиця 12.3.

Структури і фізико-хімічні властивості оптимізованих 7-феніл-4,7-дигідро-[1,2,4]триазоло[1,5-a]піримідин-6-карбальдегідів

Код сполуки	**Структура**	**CLogP**	**CLogS**
146539		1.9	-3.7

146494		2.3	-5
151456		2.3	-5
151505		2.4	-5.3
151685		2.5	-4
312678		2.7	-4.9
151477		2.9	-5.8

151486		2.9	-5.3
249682		2.9	-5.8
249724		2.9	-5.8
236817		3.1	-5.2
274154		3.3	-5.4
412031		3.4	-5.6

7569386		3.4	-5.8
151594		2.8	-5.6

При оптимізації сполуки **767560** (клас аміди 1-оксо-3-феніл-ізохроман-6-карбонової кислоти) проводилась модифікація замісників на фенілі амідної групи. Для прикладу на рисунку зображено спосіб взаємодії сполук **767560** та **767571**. Представлені сполуки мають відмінність в будові лише одного замісника, а саме заміщенні 2-метилфенільного фрагменті на 3-ацетилфенільний. Така заміна не вплинула на формування взаємодій із рецептором. Водневі зв'язки утворені з амінокислотними залишками Asn507, Tyr506, Tyr14. Гідрофобні взаємодії утворюються з амінокислотними залишками Leu225, Trp503,Tyr533, Tyr529. Однак, при такій заміні було покращено параметр ліпофільості. Так LogP сполуки **767560** становить 4,6, а сполуки **767571** – 3.9.

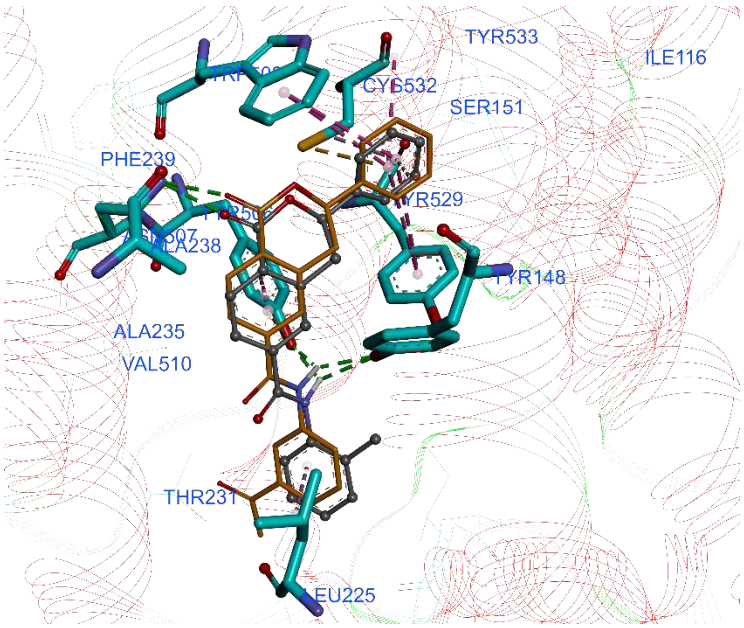
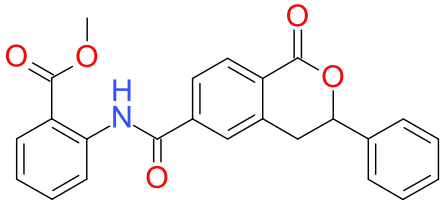
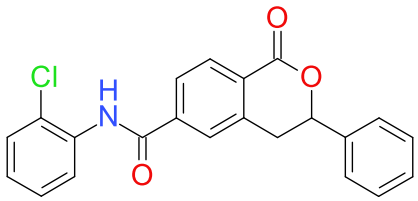


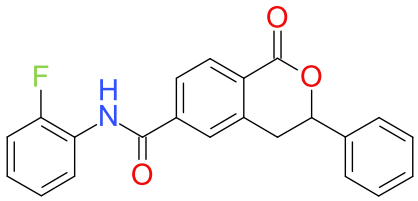
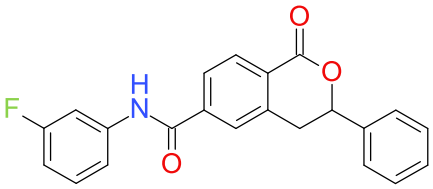
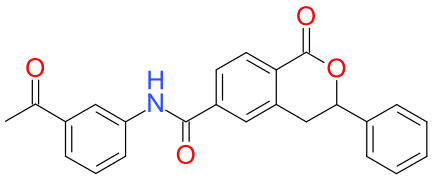
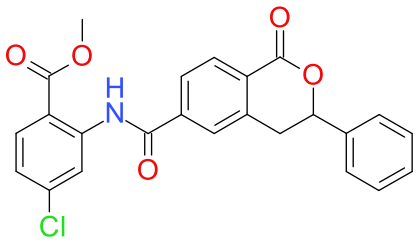
Рис. 12.4. Комплекс сполук **767560** (сіра) та **767571** (оранжева) з мускариновим рецептором ацетилхоліну III типу. Водневі зв'язки позначені зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими пунктирними лініями.

Структури і фізико-хімічні властивості всіх оптимізованих сполук даного класу наведено в таблиці.

Таблиця 12.4.

Структури і фізико-хімічні властивості оптимізованих амідів 1-оксо-3-феніл-ізохроман-6-карбонової кислоти.

Код сполуки	**Структура**	**CLogP**	**CLogS**
767538		4	-6.2
767541		4.8	-6.7

767557		4.4	-6.1
767564		4.4	-6.1
767571		3.9	-6.4
767576		4.7	-7

РОЗДІЛ 13. Біологічне тестування оптимізованих сполук з високою інгібувальною активністю щодо mAChRs, покращенною біодоступністю та зменшеною токсичністю: встановлення фармакологічних і кінетичних ефектів і параметрів дії сполук

На наступному етапі досліджень було проведено біологічне тестування оптимізованих сполук з покращеними інгібувальною активністю щодо mAChRs і біодоступністю. Для фармакологічного тестування на мультиклітинних ГМП кілець трахеї щурів попереднім скринінгом *in silico* було обрано 25 органічних сполук з передбаченими покращеними холінолітичними властивостями. У першій серії експериментів тестували реакцію препаратів трахеї на аплікування ацетилхоліну (10^{-4} М) за умови попередньої дії на препарати тестованих сполук (усі у концентрації 10^{-4} М) упродовж 10 хв. Таким чином, було встановлено 3 сполуки зі здатністю пригнічувати ацетилхолінові скорочення понад 50%, їх шифри: 249682, 154350 та 151685 (Рис. 13.1).

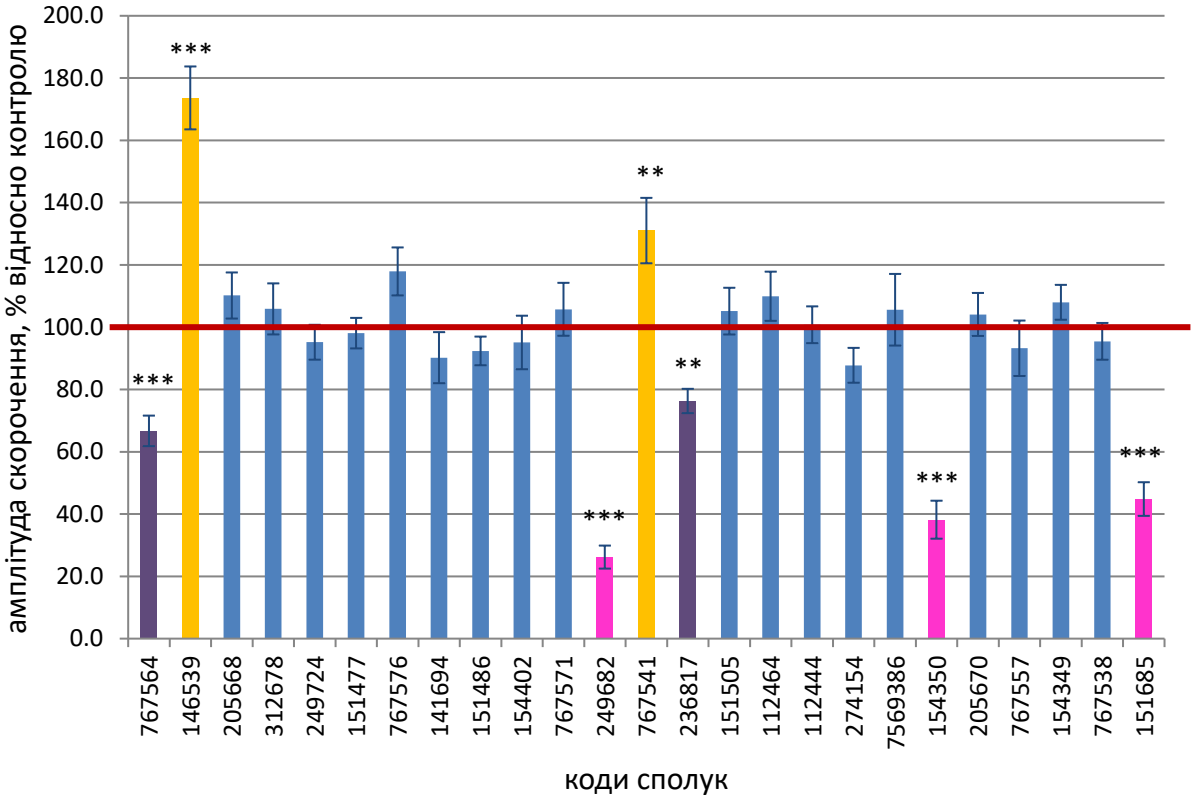


Рис. 13.1. Зміни амплітуди ацетилхолін-індукованих (10^{-5} М) скорочень препаратів трахеї щурів сполуками з передбаченою холінолітичною активністю (використано у концентрації 10^{-4} М, час попередньої інкубації 10 хв). Дані представлені як M±SEM. За 100 % прийнято контрольні значення (n = 6).

*** - $p < 0{,}001$ та ** - $p < 0{,}01$ – різниця достовірна щодо контролю.

Також звертають на себе увагу сполуки з кодами **156539** та **767541**, які спричиняли достовірне підвищення сили ацетилхолін-індукованих скорочень. Ефективність даних сполук також перевіряли на препаратах кільцевих ГМП антрального відділу шлунку щурів. Було встановлено, що зазначені речовини також посилювали ацетилхолін-індуковані скорочення шлунку у однаковій мірі, що й у випадку препаратів трахеї. Оскільки відомо, що у тканині м'язів шлунку щурів експресуються mAChRs підтипів М2 і М3 у співвідношеннях, подібних до ГМ дихальних шляхів, отримані результати підтверджують передбачення, що сполуки 156539 та 767541 є холіноміметиками [108, 109].

Тож зазначені речовини можуть бути у подальшому використані для розробки активаторів mAChRs, зокрема для терапії патологій, які супроводжуються недостатньою скорочувальною активністю вісцеральних ГМ, наприклад, гастропарезів [110, 111, 112].

У наступній серії експериментів було зареєстровано ацетилхолін-викликані скорочення препаратів трахеї щурів за дії обраних сполук-антагоністів mAChRs (шифри **249682**, **154350** та **151685;** у всіх випадках речовини використовували в концентрації 10^{-4} М) на тлі попередньої інкубації ГМП з відомим антагоністом холінорецепторів іпратропієм (використано у концентрації 10^{-6} М, тривалість передінкубації 10 хв). Оскільки на тлі іпратропію усі протестовані сполуки не впливали на базальне напруження і скорочувальну реакцію ГМП (дані не проілюстровано), тож можна стверджувати, що зазначені речовини діють саме на mAChRs.

також сполуки **249682**, **154350** та **151685** не впливали на реакції ГМП на аплікацію агоніста нікотинових холінорецепторів нікотину (використана концентрація 10^{-6} М, дані не проілюстровано), що користь припущення щодо селективної дії протестованих речовин саме на мускаринові ацетилхолінові рецептори.

У наступній серії експериментів було встановлено здатність обраних сполук **249682**, **154350** та **151685** (у всіх випадках використано концентрацію 10^{-6} М, тривалість попередньої інкубації на тлі тестованої речовини 15 хв) пригнічувати скорочення ГМП трахеї, активованих селективним агоністом M_3-холінорецепторів цевімеліном (фіксована концентрація 10^{-4} М) (Рис. 13.2).

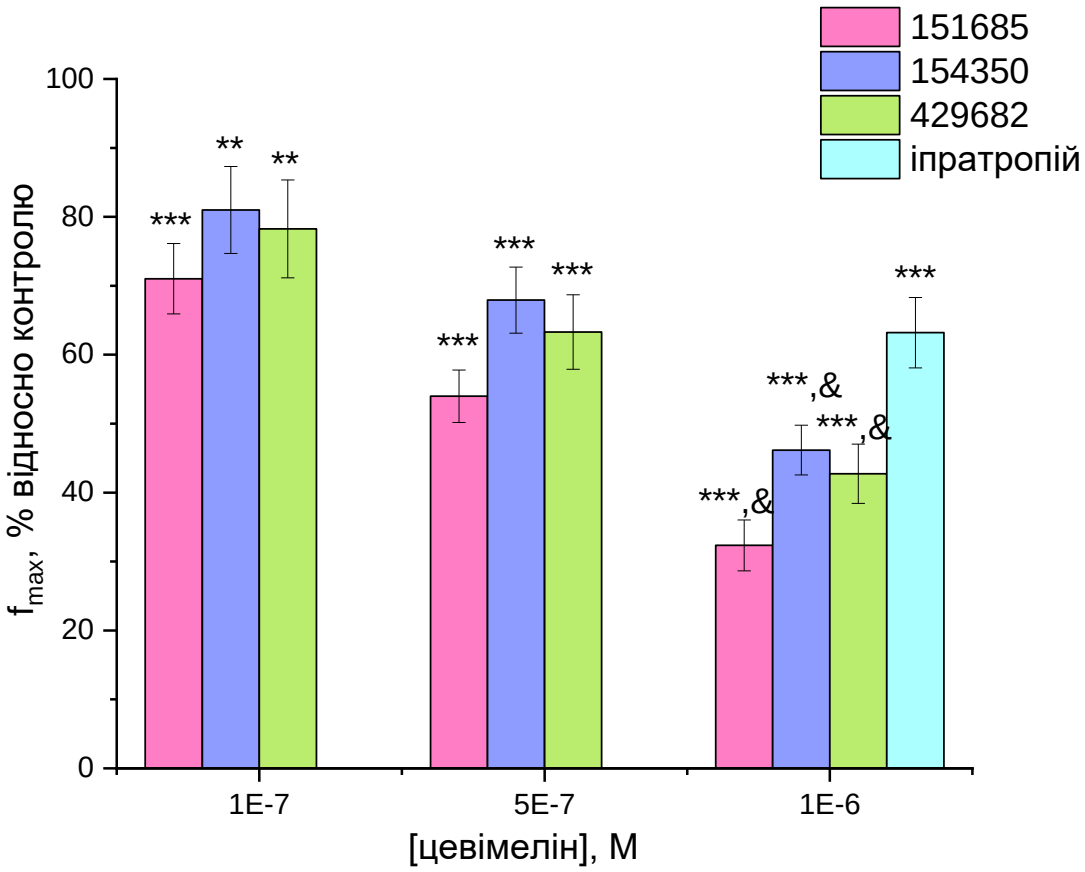


Рис. 13.2. Зміни амплітуди цевімелін-індукованих (10^{-4} М) скорочень препаратів трахеї щурів сполуками-інгібіторами мускаринових холінорецепторів **151685**, **154350**, **429682** та **іпратропієм бромідом** (використано у концентраціях 10^{-7} М, $5 \cdot 10^{-6}$ М та 10^{-6} М, час попередньої інкубації 10 хв). Дані представлені як М±SEM. За 100 % прийнято контрольні значення (n = 7).

*** - $p < 0{,}001$, **-$p < 0{,}01$ – різниця достовірна щодо контролю; & - $p < 0{,}01$ - різниця достовірна щодо іпратропію броміду.

Найбільш ефективною виявилась сполука **151685**, за присутності в омиваючому ГМП у концентрації 1 мкМ амплітуда цевімелін-викликаного скорочення становила у середньому 32,3% щодо контролю. Втім усі три відібрані сполуки (**249682**, **154350** та **151685**) у концентрації 1 мкМ були достовірно більш ефективними порівняно з іпратропієм бромідом (Рис. 13.2).

Втім, у наступній серії експериментів було показано, що відомий селективний антагоніст M_3-холінорецепторів 4-DAMP (було використано у концентраціях 10^{-10} М, $5 \cdot 10^{-10}$ М та 10^{-9} М, час попередньої інкубації 30 хв) достовірно суттєвіше пригнічує цевімелін-викликані скорочення (Рис. 13.3). Так аналогічне інгібування (близько 2/3 відносно контролю) спричиняв 4-DAMP у концентрації $5 \cdot 10^{-10}$ М, тоді як сполука **151685**, мала таку ж ефективність у концентрації 10^{-6} М.

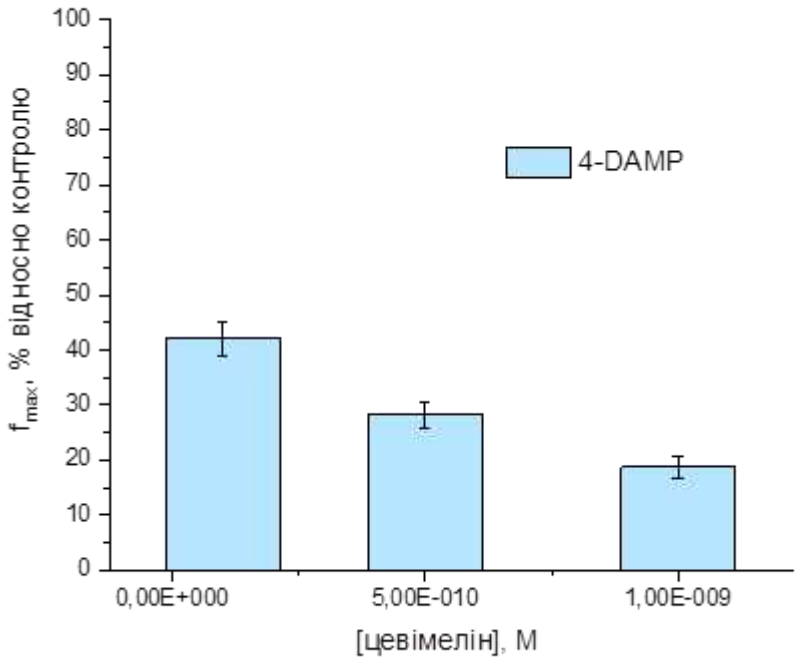


Рис. 13.3. Зміни амплітуди цевімелін-індукованих (10^{-4} М) скорочень препаратів трахеї щурів селективним антагоністом M_3-холінорецепторів 4-DAMP (використано у концентраціях 10^{-10} М, $5 \cdot 10^{-10}$ М та 10^{-9} М, час попередньої інкубації 30 хв). Дані представлені як M±SEM. За 100 % прийнято контрольні значення (n = 6).

Для перевірки наявності можливих додаткових клітинних мішеней сполук з передбаченою інгібіторною здатністю щодо мускаринових холінорецепторів (шифри **249682**, **154350** та **151685**) було здійснено ряд експериментів.

Для зазначених сполук та іпратропію броміду було проведено аналіз кінетики процесу скорочення-розслаблення агоніст-індукованих скорочень за модифікованим методом Костеріна-Бурдиги [91] з розрахунком максимальних швидкостей фаз скорочення (V_{nc}) та розслаблення (V_{nr}). Механокінетичним аналізом встановлено, що ці сполуки не змінювали кінетичні властивості цівімелін-активованих скорочень (Рис. 13.4), тож, ймовірно, не мають суттєвого впливу на інші клітинні системи, задіяні в реалізації процесів скорочення-розслаблення.

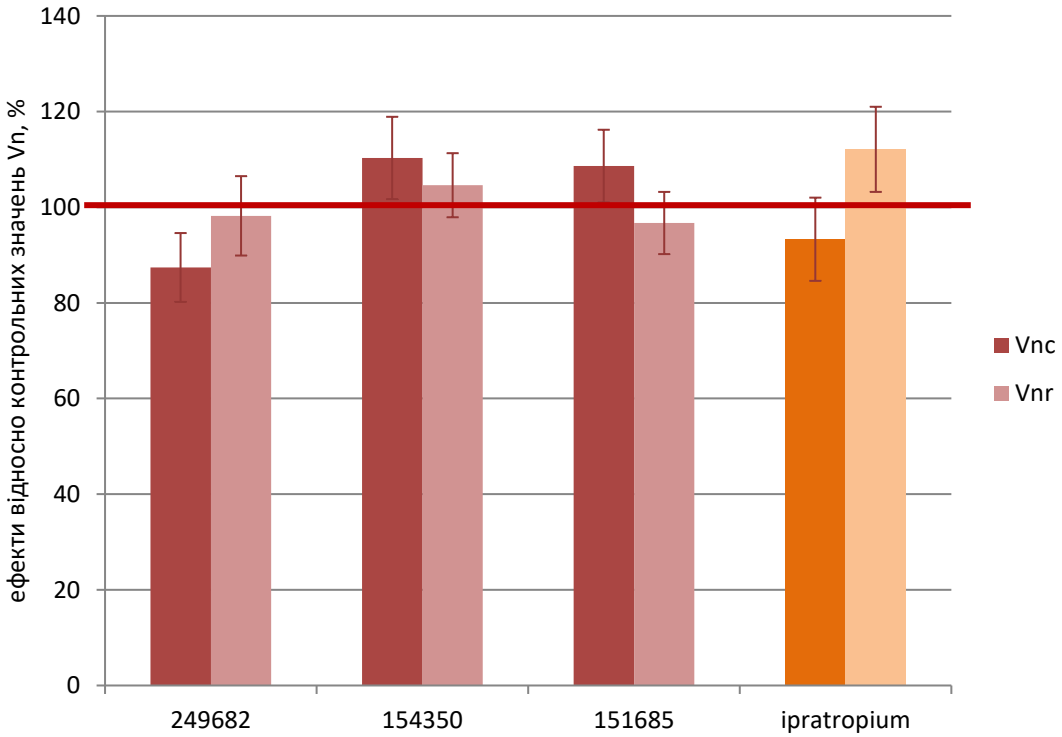


Рис. 13.4. Зміни нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення (Vnc) та розслаблення (Vnr) цевімелін-індукованих (10-4 М) скорочень препаратів трахеї щурів сполуками-інгібіторами мускаринових холінорецепторів 249682, 154350, 151685 та іпратропію броміду (усі в концентрації 10-6 М, час попередньої інкубації 10 хв). Дані представлені як M±SEM. За 100 % прийнято контрольні значення (n = 7).

У наступній серії експериментів було встановлено, що сполуки **249682**, **154350** та **151685** ($5 \cdot 10^{-7}$ М, час попередньої інкубації 15 хв) не мають суттєвого впливу на реакції базального напруження і модуляції скорочувальної активності, опосередкованих через нікотинові холінорецептори і адренорецептори дихальних шляхів (дані не проілюстровано).

Також із використанням інгібітора фосфоліпази С (U-73122) та блокатора інозитол-1,4,5-трифосфат-чутливих (IP_3) Ca^{2+}-каналів саркоплазматичного ретикулуму (2-APB) встановлено, що ефекти сполук **249682**, **154350** та **151685** (застосована концентрація $5 \cdot 10^{-7}$ М, час попередньої інкубації 15 хв) реалізуються у IP_3-залежний спосіб, а скорочення, які активуються ацетилхоліном на тлі інгібування фосфоліпази С та на тлі блокування IP_3-чутливих Ca^{2+}-каналів не змінюються за присутності цих сполук в омиваючому ГМП розчині (дані не проілюстровано).

Сполуки **249682**, **154350** та **151685** (використані у концентрації $5 \cdot 10^{-7}$ М, час попередньої інкубації 15 хв) не змінювали ацетилхолін-індуковані (10^{-5} М) скорочувальні реакції за умов попередньої інкубації ГМП трахеї з антагоніст M_3-холінорецепторів 4-DAMP (було використано у концентрації 10^{-9} М, час попередньої інкубації 30 хв), тож ці сполуки є холінолітиками, які діють саме на mAChRs M_3-типу.

Було встановлено, що ефекти сполук **249682** і **154350** (застосовані у концентрації $5 \cdot 10^{-7}$ М, час попередньої інкубації 15 хв) щодо ацетилхолін-індукованих (10^{-5} М) скорочень не зазнають змін за попереднього блокування mAChRs M_2-типу AF-DX-116 (10^{-7} М). Втім, за дії **151685** ($5 \cdot 10^{-7}$ М, час попередньої інкубації 15 хв) на тлі AF-DX-116 спостерігалось деяке (у середньому на 17,4 %) підвищення амплітуди ацетилхолін-індукованого (10^{-5} М) скорочення.

Ацетилхолін-індуковане скорочення кільцевих ГМ шлунку і кишечнику має два виражені компоненти – фазний і тонічний, де фазне скорочення опосередковується вивільненням іонів Ca^{2+} через IP_3-активовані канали

саркоплазматичного ретикулуму внаслідок активації mAChRs M_3-підтипу, а тонічне – пов'язане з процесами активації mAChRs M_2-підтипу [113-115]. Тож у наступній серії експериментів було досліджено ефекти **151685** ($5 \cdot 10^{-7}$ М, час попередньої інкубації 15 хв) на ацетилхолін-індуковані (10^{-5} М) скорочення кільцевих ГМП антрального відділу шлунку щурів. Встановлено, що за даних умов спостерігається деяке підвищення тонічної складової на тлі значного пригнічення фазного скорочення (Рис. 13.5).

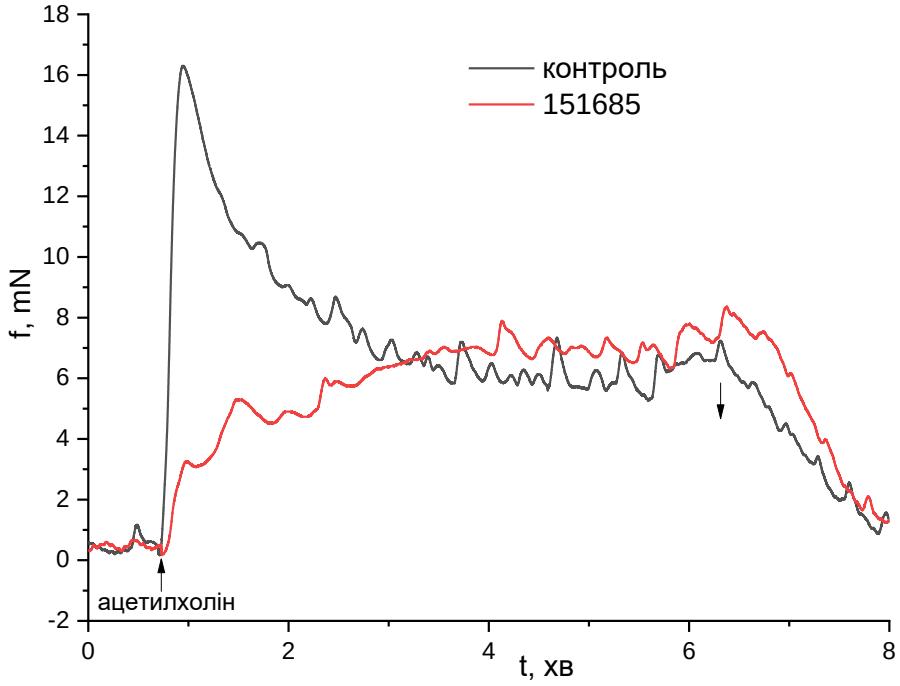


Рис. 13.5. Порівняння ізометричних скорочень кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щура, індукованих аплікацією ацетилхоліну (10 мкМ) у контролі та за дії сполуки 151685 (5·10-7 М, час попередньої інкубації 15 хв). Усі експерименти проведені на тлі дії розчинника DMSO (0,1%). Наведено типові механограми. Стрілками показано момент початку дії ацетилхоліну та його відмивання.

Також на прикладі сполуки **249682** ($5 \cdot 10^{-7}$ М, час попередньої інкубації 15 хв) із використанням ГМП антрального відділу шлунку щурів досліджували відмивання гладеньких м'язів та відновлення їх ацетилхолін-індукованих (10^{-5} М) скорочень. Встановлено, що за період 40 хв відбувається часткове (у

середньому до 21,5 %) часо-залежне відновлення амплітуди фазного скорочення (Рис. 13.6).

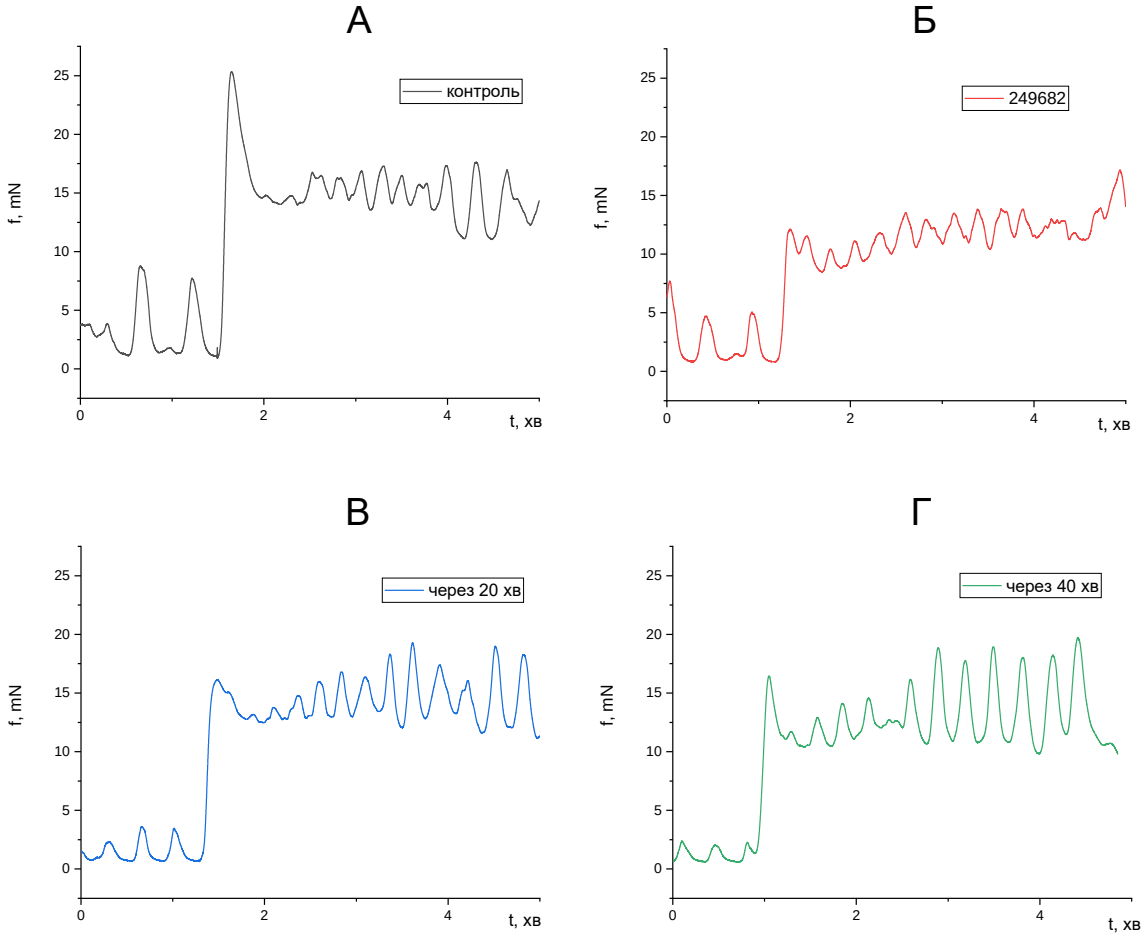


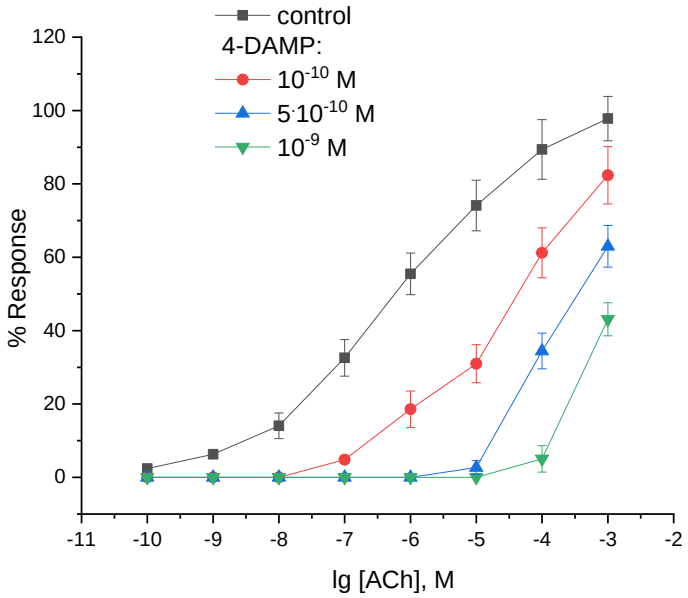
Рис. 13.6. Порівняння ізометричних скорочень кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щура, індукованих аплікацією ацетилхоліну (10 мкМ) у контролі (А), за дії сполуки 249682 (5·10-7 М, час попередньої інкубації 15 хв) (Б), а також через 20 хв (В) та через 40 хв (Г) припинення дії сполуки 249682. Усі експерименти проведені на тлі дії розчинника DMSO (0,1%). Наведено типові механограми.

Надалі було зареєстровано та проаналізовано криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» у випадку дії 4-DAMP та обраних сполук; визначено тип інгібування, показники афінності та IC_{50} (Рис. 13.7-13.10).

Для 4-DAMP (застосовані концентрації 10^{-10} М, $5\cdot10^{-10}$ М та 10^{-9} М, час попередньої інкубації 30 хв) показник кута нахилу лінії регресії Шілда (1,55 ±

0.18, коефіцієнт детермінації R^2 = 0.96) підтверджує конкурентний механізм дії цієї речовини (Рис. 13.7). Велична афінності цієї сполуки pK_B становила 10,91±1.72 та IC_{50} = 1,23·10^{-10} М. Отримані нами результати цілком узгоджуються з даними літературних джерел [116-118].

А



Б

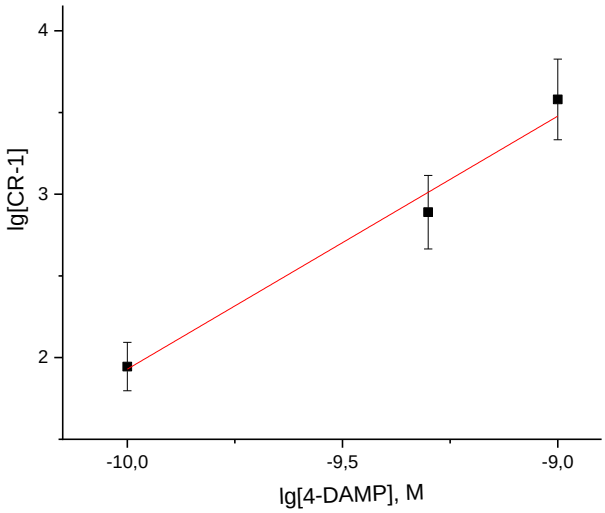
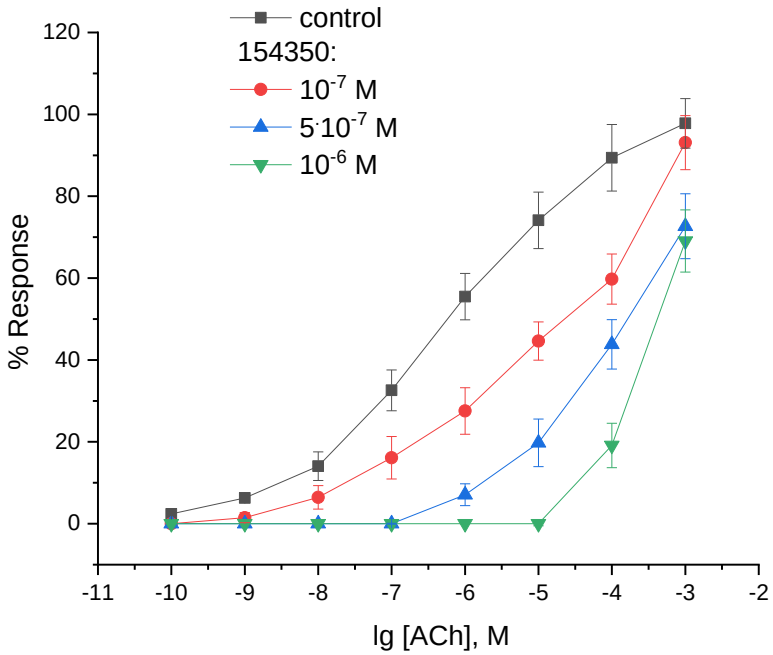


Рис. 13.7. А - Криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» за дії сполуки 4-DAMP (застосовані концентрації 10-10 М, 5·10-10 М та 10-9 М, час попередньої інкубації 30 хв) у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів. Показник амплітуди скорочень перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10-4 М), прийнятим за 100 %. Дані представлені як M±SEM, n=5.

Б - Графік Шілда для за дії сполуки 4-DAMP. Дані представлені як M±SEM, n=5.

Для сполуки **154350** (застосовані концентрації 10^{-7} М, $5 \cdot 10^{-7}$ М та 10^{-6} М, час попередньої інкубації 15 хв) показник кута нахилу лінії регресії Шілда (1,15 ± 0.05, коефіцієнт детермінації R^2 = 0.99) вказує на конкурентний механізм дії цієї речовини (Рис. 13.8). Велична афінності сполуки **154350** pK_B становила 8.96 ± 0.35 та $IC_{50} = 3{,}09 \cdot 10^{-9}$ М.

А



Б

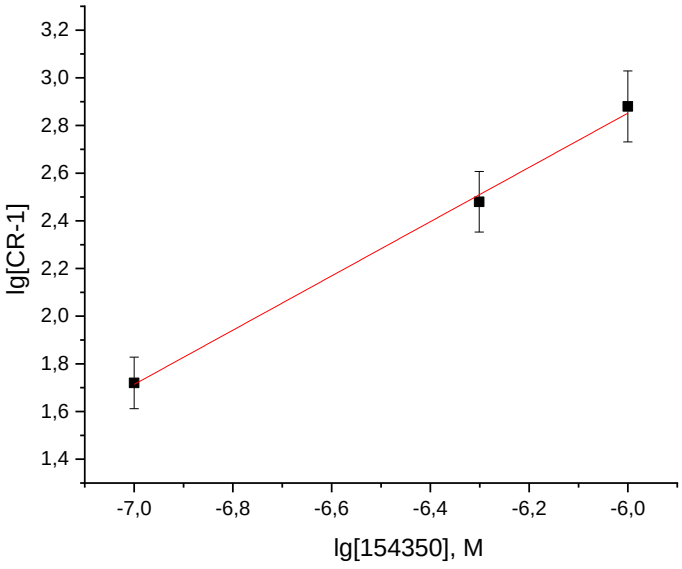
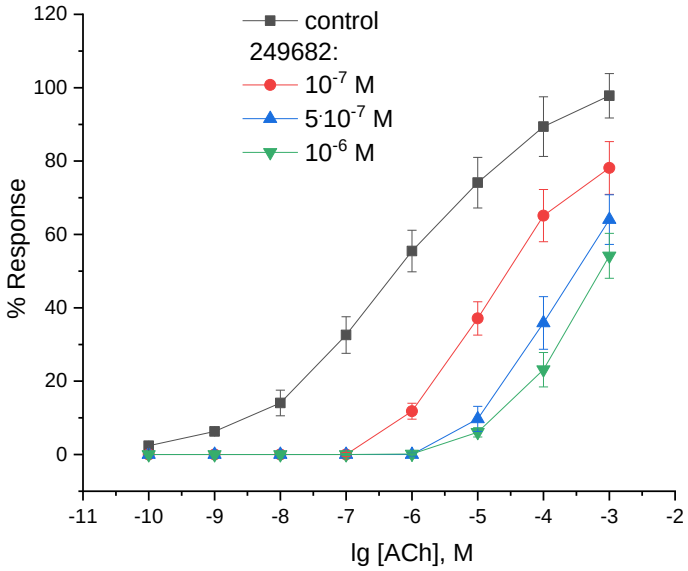


Рис. 13.8. А - Криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» за дії сполуки 154350 (застосовані концентрації 10-7 М, 5·10-7 М та 10-6 М, час попередньої інкубації 15 хв) у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів. Показник амплітуди скорочень перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10-4 М), прийнятим за 100 %. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Б - Графік Шілда для за дії сполуки **154350**. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Для сполуки **249682** (застосовані концентрації 10^{-7} М, $5 \cdot 10^{-7}$ М та 10^{-6} М, час попередньої інкубації 15 хв) показник кута нахилу лінії регресії Шілда (1.14 ± 0.18, коефіцієнт детермінації R^2 = 0.99) вказує на конкурентний механізм дії цієї речовини (Рис. 13.9). Велична афінності сполуки **249682** pK_B становила 9.33 ± 0.84 та IC_{50} = $3{,}72 \cdot 10^{-9}$ М.

А



Б

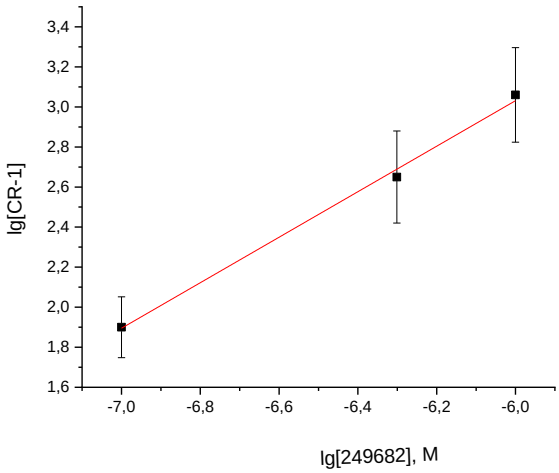
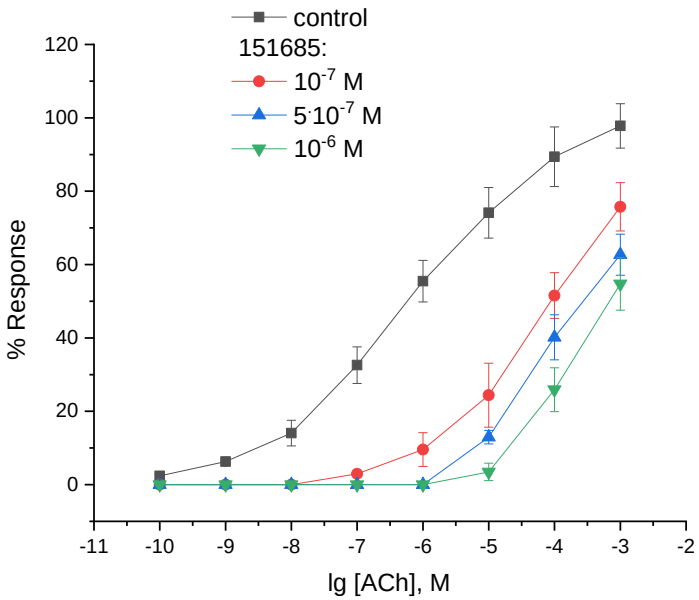


Рис. 13.9. Криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» за дії сполуки 249682 (застосовані концентрації 10-7 М, 5·10-7 М та 10-6 М, час попередньої інкубації 15 хв) у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів. Показник амплітуди скорочень перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10-4 М), прийнятим за 100 %. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Б - Графік Шілда для за дії сполуки 249682. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Для сполуки **151685** (застосовані концентрації 10^{-7} М, $5\cdot10^{-7}$ М та 10^{-6} М, час попередньої інкубації 15 хв) показник кута нахилу лінії регресії Шілда (0.73 ± 0.08, коефіцієнт детермінації R^2 = 0.97) вказує на конкурентний механізм дії цієї речовини (Рис. 13.10). Велична афінності сполуки **151685** pK_B становила 10.02 ± 0,73 та $IC_{50} = 3{,}39\cdot10^{-10}$ М.

А



Б

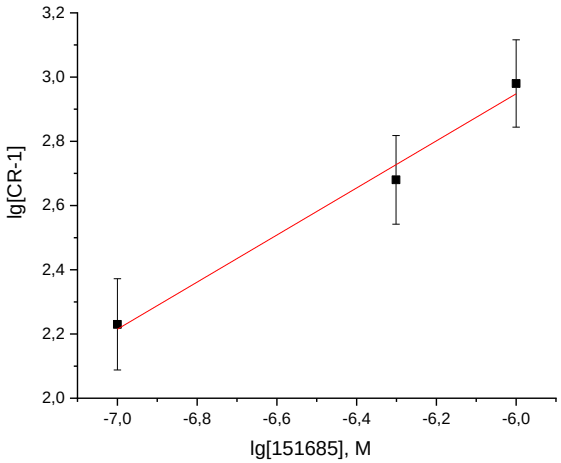


Рис. 13.10. Криві «концентрація ацетилхоліну-ефект» за дії сполуки 151685 (застосовані концентрації 10-7 М, 5·10-7 М та 10-6 М, час попередньої інкубації 15 хв) у випадку активації скорочень гладеньких м'язів трахеї щурів. Показник амплітуди скорочень перераховано у % порівняно з ацетилхолін-викликаним скороченням у контролі (10-4 М), прийнятим за 100 %. Дані представлені як М±SEM, n=7.

Б - Графік Шілда для за дії сполуки 151685. Дані представлені як М±SEM, n=7.

Отже, на ГМП було здійснено біологічне тестування сполук з покращеною інгібувальною активністю щодо mAChRs: вивчено їхні фармакологічні та кінетичні ефекти і параметри. Встановлено, що з сполуки

кодами **154350**, **249682** та **151685** характеризуються здатністю інгібувати ацетилхолін-індуковані скорочувальні реакції (середні значення IC_{50} становлять $3{,}09 \cdot 10^{-9}$ М, = $3{,}72 \cdot 10^{-9}$ М та $3{,}39 \cdot 10^{-10}$ М, відповідно) співвідносною до ефективності одного із найбільш застосованих в Україні препаратів для терапії астми і ХОЗЛ іпратропію броміду ($7{,}24 \cdot 10^{-10}$ М) (табл. 13.1). Важливо, що за однакових концентрацій сполуки **154350**, **249682** та **151685** достовірно суттєвіше пригнічують проведення сигналу саме через M_3-холінорецептори порівняно з іпратропієм бромідом, не маючи значного впливу на M_2-холінорецептори.

Таблиця 13.1.

Фармакологічні ефекти сполук-антагоністів мускаринових ацетилхолінових рецепторів за їх дії на гладенькі м’язи трахеї щурів. Дані представлені як M±SEM, n=7.

Шифр сполуки	**pK_B**	**IC_{50}, M**	**Нахил графіка Шілда**
154350	8.96 ± 0.35	$3.09 \cdot 10^{-9}$	1.15 ± 0.05
249682	9.33 ± 084	$3.72 \cdot 10^{-9}$	1.14 ± 0.18
151685	10.02 ± 0.73	$3.39 \cdot 10^{-10}$	0.73 ± 0.08
іпратропію бромід	9.14 ± 0.62	$7.24 \cdot 10^{-10}$	0.79 ± 0.07

Тож є всі підстави рекомендувати сполуки **154350**, **249682** та **151685** на продовження доклінічних випробувань в якості препаратів нового покоління для терапії астми і ХОЗЛ зі спрямованою дією на M_3-холінорецептори.

РОЗДІЛ 14. ОБГОВОРЕННЯ

Як відомо, у дихальних шляхах людини експресуються мускаринові ацетилхолінові рецептори M_1-, M_2- та M_3-типів, причому M_1-тип рецепторів (як і M_2 та M_3) характерний для епітеліальних клітин, який вистилає дихальні шляхи, тоді як рецептори M_2- та M_3-типів приймають безпосередню участь у регуляції просвіту повітроносних шляхів [4, 74, 92]. Фізіологічними функціями M_2-холінорецепторів, які розташовуються і в гладеньком'язових клітинах, і у постгангліонарних парасимпатичних нейронах, є, відповідно, обмеження β_2-адренорецептор-опосередкованого розслаблення гладеньких м'язів за рахунок зменшення внутрішньоклітинної концентрації цАМФ, та пригнічення вивільнення нейромедіатора ацетилхоліну з нервових закінчень постгангліонарних нейронів [74, 76, 94]. Втім, за дії неселективних антагоністів мускаринових холінорецепторів (атропіну, іпратропію броміду) результуючим ефектом пригнічення M_2-холінорецепторів є бронхоконстрикція за рахунок саме зняття негативного зворотного зв'язку регуляції вивільнення ацетилхоліну. Хоча у мембранах гладеньком'язових клітин M_2-тип рецепторів за кількістю суттєво переважає M_3-холінорецептори, останні тут є функціонально головним типом ацетилхолінових рецепторів, що забезпечують їх скорочення та звуження просвіту дихальних шляхів, а також регуляцію секреторної активності слизових залоз [4,74, 95-97].

Також при розробці новітніх препаратів для терапії бронхіальної астми і ХОЗЛ надзвичайно важливо мати на увазі, що постгангліонарні M_2-холінорецептори є дуже чутливими до загального стану дихальної системи людини, а різноманітні несприятливі чинники (як то вірусні інфекції, респіраторні пошкоджувальні фактори, індуктори запалення тощо) суттєво пригнічують функціональну роль цих рецепторів (зокрема, за рахунок дії ендогенних антагоністів та зниження експресії рецепторів) [56, 74, 98]. 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 бронхіальної астми і ХОЗЛ [74, 94].

Тож, хоча наразі найбільш вживаним в Україні препаратом проти ХОЗЛ і бронхіальної астми з М-холінолітичною активністю є SAMA-препарат іпратропія бромід (ipratropium, зазвичай у дозі 0,25-0,5 мг) [99, 100], не викликає сумніву, що оптимальною стратегією терапії обструктивних явищ в дихальних шляхах холінолітичними препаратами (точніше препаратів з властивостями антагоністів мускаринових холінорецепторів тривалої дії – LAMA) є використання саме M_3-селективних антагоністів [74, 101]. Актуальні протоколи терапії ХОЗЛ (США, країни ЕС) і астми включають використання таких LAMA: тіотропій (tiotropium, лікування астми, рекомендовано у дозі 5 або 18 мкг залежно від способу функціонування нібулайзера, один раз на добу) та аклідіній (aclidinium, рекомендовано у дозі 400 мкг двічі на добу), глікопірроній (glycopyrronium, рекомендовано у дозі 50 мкг один раз на добу), умеклідіній (umeclidinium, лікування ХОЗЛ і можливе застосування для лікування астми, рекомендовано у дозі 62,5 мкг один раз на добу) [4, 56, 102]. За даними мета-аналізу [56], для новітніх препаратів LAMA (аклідінію, глікопірронію і глікопірронію) не виявлено достовірних терапевтичних переваг щодо більш раннього тіотропія броміду (єдиного LAMA-препарату терапії ХОЗЛ до 2012 року).

Так, натепер активною речовиною препаратів для терапії неконтрольованої астми є тіотропія бромід – структурний аналог іпратропія броміду, який є функціональними антагоністом саме M_3-холінорецепторів, оскільки хоча і зв’язується з M_2-рецепторами, але дисоціює з останніх на порядок швидше, аніж з рецепторів M_3-типу. Також порівняно з іпратропієм, тіатропій бромід має менші пероральну біодоступність і системні побічні ефекти, та збільшений період напіввиведення з організму пацієнтів [102-104]. Разом з тим, використання тіатропія броміду для терапії стабільної астми може

бути неефективним внаслідок недостатньої дози препарату, тоді як її підвищення призводить до появи побічних ефектів [74, 105].

Підчас проміжного етапу виконання проєкту на препаратах трахеї щурів і мурчаків нами було здійснено біологічне тестування сполук з передбаченою інгібувальною активністю щодо мускаринових холінорецепторів: вивчено їхні фармакологічні та кінетичні ефекти і параметри. Нами встановлено, що з сполуки кодами **767560**, **151475** та **112452** достатньо ефективно (середні значення IC_{50} становлять $5{,}25 \cdot 10^{-8}$ М, $,45 \cdot 10^{-8}$ М та $1{,}62 \cdot 10^{-7}$ М, відповідно) за однакових концентрацій достовірно суттєвіше пригнічують проведення сигналу саме через M_3-холінорецептори порівняно з іпратропієм бромідом, не маючи суттєвого впливу на M_2-холінорецептори. Тому результати наших досліджень з розробки препаратів з холінолітичною активністю, отримані на проміжному етапі виконання проекту можна вважати надзвичайно важливими і обнадійливими.

Надалі із використанням ГМП трахеї щурів, а також із залученням до окремих експериментів препаратів антрального відділу шлунку щурів, було здійснено біологічне тестування сполук з покращеною інгібувальною активністю щодо mAChRs: вивчено їхні фармакологічні та кінетичні ефекти і параметри. Встановлено, що з сполуки кодами **154350**, **249682** та **151685** характеризуються здатністю інгібувати ацетилхолін-індуковані скорочувальні реакції (середні значення IC_{50} становлять $3{,}09 \cdot 10^{-9}$ М, = $3{,}72 \cdot 10^{-9}$ М та $3{,}39 \cdot 10^{-10}$ М, відповідно) співвідносною до ефективності одного із найбільш застосованих в Україні препаратів для терапії астми і ХОЗЛ іпратропію броміду (значення IC_{50} у середньому $7{,}24 \cdot 10^{-10}$ М). Надзвичайно важливо, що за однакових концентрацій сполуки **154350**, **249682** та **151685** достовірно суттєвіше пригнічують проведення сигналу саме через M_3-холінорецептори порівняно з іпратропієм бромідом, не маючи значного впливу на M_2-холінорецептори.

Можна рекомендувати сполуки **154350**, **249682** та **151685** на продовження доклінічних випробувань в якості активних речовин препаратів

нового покоління для терапії астми і ХОЗЛ зі спрямованою дією на M_3-холінорецептори.

ВИСНОВКИ

1. Проведено відпрацювання та оптимізацію протоколів структурного аналізу *in silico*, зокрема,тконформаційного аналізу із деталізацією фізико-хімічних характеристик лігандів, особливу увагу приділено ідентифікації та енергетиці водневих зв'язків, що забезпечать якісний підхід до раціонального дизайну інгібіторів мускаринових рецепторів ацетилхоліну.

2. Налаштовано апаратне забезпечення для проведення високопропускного віртуального скринінгу та відлагоджено протокол молекулярного докінгу програмним пакетом AutoDock на основі bash-скрипта, що буде використано для скринінгової процедури.

3. Із застосуванням реєстрації і аналізу кривих «концентрація-ефект» для відомих агоністів і антагоністів мускаринових ацетилхолінових рецепторів здійснено відпрацювання, оптимізацію і стандартизацію протоколів біологічного тестування сполук – потенційних інгібіторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів.

4. Було розроблено стратегію оптимізації сполук-інгібіторів, що включає в себе як оптимізацію активності сполук, так і оптимізацію фізико-хімічних властивостей цих сполук, що є важливим фактором для подальшого використання розроблених сполук для розробки на їх основі лікарських препаратів..

5. Вперше реконструйовано просторову структуру повнорозмірних мускаринових рецепторів ацетилхоліну M3 і M2. Основні відмінності структури двох типів рецепторів стосуються організації їх позаклітинних N-термінальних доменів – регулярна альфа-спіраль у випадку M2, альтернативні конформації різного ступеня впорядкованості у випадку M3. Отримані моделі характризуються високою якістю згідно метрик MolProbity і можуть бути використані для подальншої реконструкції комплексів mAChRs з низькомолекулярними органічними сполуками.

6. На поверхні мускаринових рецепторів ацетилхоліну М3 і М2 ідентифіковано відповідно 7 і 5 областей розташування сайтів специфічного зв’язування низькомолекулярних органычних сполук. По дві з них є відомими областями розташування сайтів зв’язування ацетилхоліну та антагоністів відповідних рецепторів, інші області ідентифіковано вперше і з урахуванням особливості їх структурної організації можуть розглядатись як потенційні сайти алостеричної регуляції активності mAChRs.

7. З використанням протокол молекулярного докінгу програмним, відпрцьованого на попередньму етапі дослідження, було проведено молекулярноий докінг колекції органічних сполук (понад 150000) в знайдені сайти зв’язування антагоністів та агоністів.

8. На основі значень скорінгових (оціночних) функцій, що характризують спорідненість ліганду до рецептора *in silico,* та результатів візувального аналізу оьриманих комплексів було сформовано бібліотеку сполук – потенційних інгібіторів мускаринових рецепторів ацетилхоліну. 23 сполуки, що характеризувались найнижчими значеннями скорінгової функції, було відібрано для дослідження їх інгібувальної активності щодо mAChRs.

9. В результаті дослідження фармакологічних і кінетичних ефектів і параметрів дії обраних на інтактних багатоклітинних препаратах дихальних шляхів було встановлено, що 8 з 23 досліджуваних сполук проявляють інгібувальну активність щодо мускаринових рецепторів ацетилхоліну з константами інгібування IC_{50} в межах від $4{,}68 \cdot 10^{-7}$ до $2.09 \cdot 10^{-8}$.

10. 3 досліджувані сполуки виявились не лише ефективними, а і **селективними** інгібіторами рецепторів М3 mAChRs (середні значення IC_{50} становлять $5{,}25 \cdot 10^{-8}$ М, $,45 \cdot 10^{-8}$ М та $1{,}62 \cdot 10^{-7}$ М, відповідно). Селективні інгібітори М3 рецепторів виявлені вперше і можуть розглядатись як прототипи лікрських препаратів проти ХОЗЛ та астми.

11. На основі аналізу залежності активності від хімічної структури було створено фармакофону модель активності виявлених сполук, що включає 6

фармакофорних точок - три ароматичні точки без вектора, одна – гідрофобна, один – донор і один – акцептор водневого зв’язку.

12. Створено стратегію оптимізації активності та селективності сполук на основі знайдених класів сполук, які проявили найбільші інгібіторні властивості щодо М3-холінорецепторів. Відповідно, каркасами для подальшої оптимізації сполук були обрані 7-феніл-4,7-дигідро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]піримідин-6-карбальдегід, [4-гідрокси-6-феніл-2-тіоксо-4-(трифторметил)гексагідропіримідин-5-іл]-фенілметанон та аміди 1-оксо-3-феніл-ізохроман-6-карбонової кислоти.

13. В результаті застосування процедури оптимізації було створено нову бібліотеку сполук з покращеною біодоступністю, в межах якої виявлено 5 нових речовин – інгібіторів mAChRs рецепторів, 3 з яких є високоселективними цодо М3-рецепторів.

14. Контанти інгібування сполук з покращеною біодоступністю складають $3{,}09 \cdot 10^{-9}$ М, $3{,}72 \cdot 10^{-9}$ М та $3{,}39 \cdot 10^{-10}$ М, що відповідає константам ігібування, характерним для лікарських засоібів ісвідчить про ефективність обраної стретегії вдосконалення інгібіторів. Таким чином, розроблені селективні інгібітори М3 рецепторів можуть розглядатись як готові прототипи лікарських препаратів проти ХОЗЛ та астми, які можна використовувати в предклінічних дослідженнях.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Updated 2017. Available from: http://www.ginasthma.org
2. 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.
3. Mari Hikichi, Shu Hashimoto, Yasuhiro Gon Asthma and COPD overlap pathophysiology of ACO. Allergology International 67. 2018. 179e186.
4. 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..
5. Campo P, Rodríguez F, Sánchez-García S, Barranco P, Quirce S, Pérez-Francés C, Gómez-Torrijos E, Cárdenas R, Olaguibel JM, Delgado J; Severe Asthma Workgroup; SEAIC Asthma Committee. Phenotypes and endotypes of uncontrolled severe asthma: new treatments. J Investig Allergol Clin Immunol. 2013;23(2):76-88.
6. 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)
7. 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.
8. 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 (дата звернення: 09. 12. 2020).

9. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). 2017 Global Strategy for Prevention, Diagnosis and Management of COPD. Available from: http://goldcopd.org. (дата звернення: 09. 12. 2020).
10. Клінічний протокол надання медичної допомоги хворим на хронічне обструктивне захворювання легень. Додаток до наказу МОЗ №128 від 19-03-2007. http://www.ifp.kiev.ua/doc/staff/MOZ-128-19032007.pdf (дата звернення: 09. 12. 2020).
11. The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) http://www.goldcopd.org.
12. 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
13. Gosens, R., Zaagsma, J., Meurs, H., & Halayko, A. J. (2006). Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. Respiratory research, 7(1), 73. https://doi.org/10.1186/1465- 9921-7-73.
14. Pérez de Llano L, Cosío BG, Miravitlles M, Plaza V; CHACOS study group. Accuracy of a New Algorithm to Identify Asthma-COPD Overlap (ACO) Patients in a Cohort of Patients with Chronic Obstructive Airway Disease. Arch Bronconeumol. 2018 Apr;54(4):198-204. English, Spanish. doi: 10.1016/j.arbres.2017.10.007.
15. Pavord ID, Beasley R, Agusti A, Anderson GP, Bel E, Brusselle G, Cullinan P, Custovic A, Ducharme FM, Fahy JV, Frey U, Gibson P, Heaney LG, Holt PG, Humbert M, Lloyd CM, Marks G, Martinez FD, Sly PD, von Mutius E, Wenzel S, Zar HJ, Bush A. After asthma: redefining airways diseases. Lancet. 2018 Jan 27;391(10118):350-400. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30879-6.
16. Kumar RK. Bronchial asthma: recent advances. Indian J Pediatr. 2000 Apr;67(4):293-8. doi: 10.1007/BF02758176.
17. Huang J, Pansare M. New Treatments for Asthma. Pediatr Clin North Am. 2019 Oct;66(5):925-939. doi: 10.1016/j.pcl.2019.06.001.

18. Magnussen H. Inhalation therapy for bronchial asthma: strategies and targets. Curr Opin Pulm Med. 2003 Apr;9 Suppl 1:S3-7. doi: 10.1097/00063198-200304001-00002.
19. Cavazos Galván M. Asthma in emergency department. Guidelines, physicians and patients. Rev Alerg Mex. 2006 Jul-Aug;53(4):136-43.
20. Zeng Z, Mukherjee A, Varghese AP, Yang XL, Chen S, Zhang H. Roles of G protein-coupled receptors in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2020; 26(12): 1242-1261
21. Ilyaskina O.S., Lemoine H., Bünemann M. Lifetime of muscarinic receptor–G-protein complexes determines coupling efficiency and G-protein subtype selectivity. PNAS Latters, 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.
23. Ishii M, Kurachi Y. Muscarinic acetylcholine receptors. Curr Pharm Des. 2006;12(28):3573-81. doi: 10.2174/138161206778522056.
24. Tobin G, Giglio D, Lundgren O. Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. J Physiol Pharmacol. 2009 Mar;60(1):3-21.
25. Lee HW, Park J, Jang EJ, Lee CH. Comparisons of exacerbations and mortality among LAMA/LABA combinations in stable chronic obstructive pulmonary disease: systematic review and Bayesian network meta-analysis. Respir Res. 2020 Nov 25;21(1):310. doi: 10.1186/s12931-020-01540-8.
26. 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
27. 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

28. Michel MC, Teitsma CA. Polymorphisms in human muscarinic receptor subtype genes. Handb Exp Pharmacol. 2012;(208):49-59. doi: 10.1007/978-3-642-23274-9_3.
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. Miravitlles 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. M_3-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, Brichetto 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. Joos GF. The role of neuroeffector mechanisms in the pathogenesis of asthma. Curr Allergy Asthma Rep. 2001 Mar;1(2):134-43. doi: 10.1007/s11882-001-0081-8.
47. Kilbinger H, von Bardeleben RS, Siefken H, Wolf D. Prejunctional muscarinic receptors regulating neurotransmitter release in airways. Life Sci. 1995;56(11-12):981-7. doi: 10.1016/0024-3205(95)00037-7.
48. Pera T, Penn RB. Crosstalk between beta-2-adrenoceptor and muscarinic acetylcholine receptors in the airway. Curr Opin Pharmacol. 2014 Jun;16:72-81. doi: 10.1016/j.coph.2014.03.005..
49. Joos GF, Germonpré PR, Pauwels RA. Neural mechanisms in asthma. Clin Exp Allergy. 2000 Jun;30 Suppl 1:60-5. doi: 10.1046/j.1365-2222.2000.00100.x.
50. 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.
51. Ehlert FJ. Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and urinary bladder smooth muscle. Life Sci. 2003 Dec 5;74(2-3):355-66. doi: 10.1016/j.lfs.2003.09.023.
52. Barnes PJ. Muscarinic receptors in airways: recent developments. J Appl Physiol (1985). 1990 May;68(5):1777-85. doi: 10.1152/jappl.1990.68.5.1777.
53. 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.
54. 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..

55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. Bader, R.F.W. (1990). Atoms in molecules: A quantum theory. Oxford: Oxford University Press.
60. A. M. Naumenko, L. M. Shapoval, A. Yu. Nyporko, M. I. Voiteshenko, A. V. Tsymbalyuk, V. F. Sagach & T. L. Davydovska. Computer Simulation of Molecular Interaction Between Baclofen and the GABAB Receptor, Neurophysiology, 2017, 49(1), pp. 2–7.
61. Brovarets, O.O., Voiteshenko, I.S., Pérez-Sánchez, H., Hovorun, D.M. A QM/QTAIM research under the magnifying glass of the DPT tautomerisation of the wobble mispairs involving 2-aminopurine, New Journal of Chemistry, 2017, 41(15), pp. 7232–7243.
62. 61. Brovarets, O.O., Voiteshenko, I.S., Hovorun, D.M. Physico-chemical profiles of the wobble ↔ Watson-Crick G∗·2AP(w) ↔ G·2AP(WC) and A·2AP(w) ↔ A∗·2AP(WC) tautomerisations: A QM/QTAIM comprehensive survey, Physical Chemistry Chemical Physics, 2017, 20(1), pp. 623–636.

63. Brovarets, O.O., Voiteshenko, I.S., Pérez-Sánchez, H., Hovorun, D.M. A QM/QTAIM detailed look at the Watson–Crick↔wobble tautomeric transformations of the 2-aminopurine·pyrimidine mispairs, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2018, 36(7), pp. 1649–1665.
64. Mykuliak VV, Voiteshenko IS, Kornelyuk AI. MD simulations of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase in complex with SB-219383 inhibitor using QM/MM approach. Dopov. Nac. akad. nauk Ukr. 2016, 1:99-104.
65. Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., & Cheeseman, J.R., ... Pople, J.A. (2010). GAUSSIAN 09 (Revision B.01). Wallingford CT: Gaussian Inc.
66. Frank Neese, Frank Wennmohs, Ute Becker, and Christoph Riplinger. The ORCA quantum chemistry program package, J. Chem. Phys. 152, 224108 (2020).
67. Keith, T.A. (2010). AIMAll (Version 10.07.01). Retrieved from aim.tkgristmill.com.
68. Matta, C.F., Hernández-Trujillo, J. Bonding in polycyclic aromatic hydrocarbons in terms of the electron density and of electron delocalization. J. Phys. Chem. A, 2005, 109, 10798-10798.
69. Espinosa, E., Molins, E., & Lecomte, C. Hydrogen bond strengths revealed by topological analyses of experimentally observed electron densities. Chem. Phys. Lett., 1998, 285, 170–173.
70. Emami B., Shakeri F., Ghorani V., Boskabady M. Relaxant effect of *Curcuma longa* on rat tracheal smooth muscle and its possible mechanisms. Pharmaceutical Biology, 2017. 55 (1): 2248–2258. https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1400079
71. Stevens L.A., Chapple C.R., Chess-Williams R. Human Idiopathic and Neurogenic Overactive Bladders and the Role of M2 Muscarinic Receptors in Contraction. European urology 52 (2007) 531–538.

72. Pavlovsky V.I., Tsymbalyuk O.V., Martynyuk V.S., Kabanova T.A., Semenishyna E.A., Khalimova E.I., Andronati S.A. Analgesic Effects of 3-Substituted Derivatives ol 1,4-Benzodiazepines and their Possible Mechanisms Neurophysiology. 2013. 45(5/6): 427-432.
73. Stacy Gelhaus Wendell, Hao Fan, Cheng Zhang G Protein–Coupled Receptors in Asthma Therapy: Pharmacology and Drug Action. Pharmacological reviews. 2020. 72: 1–49.
74. Moulton B.C., Fryer A.D. Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; findingdrugs that actually work in asthma and COPD. British Journal of Pharmacology. 2011, 163: 44–52.
75. Chin Kook Rhee, Hajime Yoshisue, Rahul Lad. Fixed-Dose Combinations of Long-Acting Bronchodilators for the Management of COPD: Global and Asian Perspectives. Adv Ther (2019) 36:495–519.
76. Gosens R., Zaagsma J., Meurs H., Halayko A.J. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. Respiratory Research 2006, 7:73 doi:10.1186/1465-9921-7-73
77. Kistemaker LE, Bos IS, Menzen MH, Maarsingh H, Meurs H, Gosens R Combination therapy of tiotropium and ciclesonide attenuates airway inflammation and remodeling in a guinea pig model of chronic asthma. Respir Res 2016. 17: 13.
78. Pera T., Penn R.B. Bronchoprotection and bronchorelaxation in asthma: new targets, and new ways to target the old ones. Pharmacol Ther. 2016. 164:82–96.
79. Disse B, Speck GA, Rominger KL, Witek TJ Jr, Hammer R: Tiotropium (Spiriva): mechanistical considerations and clinical profile in obstructive lung disease. Life Sci 1999, 64:457-464.
80. Milchert M., Spassov A., Meissner K., Nedeljkov V., Lehmann C., Wendt M., Loster B.W., Mazurkiewicz-Janik M., Gedrange T., Pavlovic D. Skeletal Muscle Relaxants Inhibit Rat Tracheal Smooth Muscle Tone In Vitro // Journal Of Physiology And Pharmacology. 2009, 60 (Suppl 8), 5-11.

81. Haddad El-Bdaoui, Patel H., Keeling J.E., Yacoub M.H., Barnes P.J., Belvisi M.G. Pharmacological characterization of the muscarinic receptor antagonist, glycopyrrolate, in human and guinea-pig airways. British Journal of Pharmacology (1999) 127, 413 – 420.
82. Zi-Yang Chana, Kayatri Govindarajub, Premanand Krishnana, Yun-Yee Lowc, Kam-Weng Chongc, Kien-Thai Yongd, Kang-Nee Tingb, Kuan-Hon Lim. Diphenethylpiperidine alkaloids with tracheal smooth muscle relaxation activity from *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don. Phytochemistry Letters 30 (2019) 93–98.
83. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic Acids Res. 2018. 46(W1), W296-W303.
84. Yang J., Anishchenko I., Park H., Peng Z., Ovchinnikov S., Baker D. Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations. Proc Natl Acad Sci USA . 2020 Jan 21;117(3):1496-1503. doi: 10.1073/pnas.1914677117.
85. The UniProt Consortium UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. Nucleic Acids Res. 47:D506-515 (2019). https://doi.org/10.1093/nar/gky1049
86. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. The Protein Data Bank Nucleic Acids Research, 2000. 28: 235-242.
87. Jakubík J., E El-Fakahany E. Allosteric Modulation of Muscarinic Acetylcholine Receptors. Pharmaceuticals (Basel). 2010 Aug 30;3(9):2838-2860. doi: 10.3390/ph3092838.
88. Morris G., Huey R., Lindstrom W.et al. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J. Comput. Chem. 30, 2785–2791.

89. Pedretti A., Villa L., Vistoli G. (2004) VEGA – an open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. J. Comput. Aided Mol. Des. 18, 167–173.
90. 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
91. Burdyga, V., & Kosterin, S. A. (1991). Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. General physiology and biophysics, 10(6), 589–598
92. Kistemaker LE, Gosens R. (2015) Acetylcholine beyond bronchoconstriction: roles in inflammation and remodeling. Trends Pharmacol Sci 36:164–171.
93. Bradley SJ, Wiegman CH, Iglesias MM, Kong KC, Butcher AJ, Plouffe B, Goupil E, Bourgognon JM, Macedo-Hatch T, LeGouill C, et al. (2016) Mapping physiological G protein-coupled receptor signaling pathways reveals a role for receptor phosphorylation in airway contraction. Proc Natl Acad Sci USA 113:4524–4529.
94. Schramm CM, Arjona NC, Grunstein MM. (1995) Role of muscarinic M2 receptors in regulating beta-adrenergic responsiveness in maturing rabbit airway smooth muscle. Am J Physiol 269:L783–L790.
95. Kistemaker, L. E., Bos, S. T., Mudde, W. M., Hylkema, M. N., Hiemstra, P. S., Wess, J., Meurs, H., Kerstjens, H. A., & Gosens, R. (2014). Muscarinic M_3 receptors contribute to allergen-induced airway remodeling in mice. American journal of respiratory cell and molecular biology, 50(4), 690–698. https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0220OC
96. Kang, J. Y., Rhee, C. K., Kim, J. S., Park, C. K., Kim, S. J., Lee, S. H., Yoon, H. K., Kwon, S. S., Kim, Y. K., & Lee, S. Y. (2012). Effect of tiotropium bromide on airway remodeling in a chronic asthma model. Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology, 109(1), 29–35. https://doi.org/10.1016/j.anai.2012.05.005

97. Kistemaker LE, Oenema TA, Meurs H, Gosens R. Regulation of airway inflammation and remodeling by muscarinic receptors: perspectives on anticholinergic therapy in asthma and COPD. Life Sci. 2012;91:1126–1133
98. Calzetta, L., Coppola, A., Ritondo, B. L., Matino, M., Chetta, A., & Rogliani, P. (2021). The Impact of Muscarinic Receptor Antagonists on Airway Inflammation: A Systematic Review. International journal of chronic obstructive pulmonary disease, 16, 257–279. https://doi.org/10.2147/COPD.S285867
99. Фещенко Ю.И., Яшина Л.А. Терапия обострения бронхиальной астмы. Укр. пульмон. журн., 2000, - № 2, дополнение: 46-49.
100. Gavaldà, A., Ramos, I., Carcasona, C., Calama, E., Otal, R., Montero, J. L., Sentellas, S., Aparici, M., Vilella, D., Alberti, J., Beleta, J., & Miralpeix, M. (2014). The *in vitro* and *in vivo* profile of aclidinium bromide in comparison with glycopyrronium bromide. Pulmonary pharmacology & therapeutics, 28(2), 114–121. https://doi.org/10.1016/j.pupt.2014.05.005
101. Alagha, K., Palot, A., Sofalvi, T., Pahus, L., Gouitaa, M., Tummino, C., Martinez, S., Charpin, D., Bourdin, A., & Chanez, P. (2014). Long-acting muscarinic receptor antagonists for the treatment of chronic airway diseases. Therapeutic advances in chronic disease, 5(2), 85–98. https://doi.org/10.1177/2040622313518227
102. Cruz A. A. (2018). Tiotropium: from COPD to young children with asthma?. The Lancet. Respiratory medicine, 6(2), 80–82. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30010-9
103. Kerstjens, H. A., & O'Byrne, P. M. (2016). Tiotropium for the treatment of asthma: a drug safety evaluation. Expert opinion on drug safety, 15(8), 1115–1124. https://doi.org/10.1080/14740338.2016.1199682
104. Dusser, D., & Ducharme, F. M. (2019). Safety of tiotropium in patients with asthma. Therapeutic advances in respiratory disease, 13, 1753466618824010. https://doi.org/10.1177/1753466618824010

105. Meng, J. F., Li, H., Luo, M. J., & Li, H. B. (2019). Efficacy of tiotropium in treating patients with moderate-to-severe asthma: A meta-analysis and systematic review based on 14 randomized controlled trials. Medicine, 98(33), e16637. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000016637.

106. Starosyla S., Volynets G., Protopopov M. et al. (2016)The development of algorithm for pharmacophore model optimization and rescoring of pharmacophore screening results. Ukr. Bioorg. Acta. 1, 24–34

107. Starosyla S., Volynets G., Bdzhola V., Yarmoluk S. (2016) Ukrainian certificate of registration of copyright for software “PharmDeveloper” № 70098.

108. He B, Qu Z, Tian Z, Zhao K, Wei L, Ma L. 7,8-dihydroxyflavone enhanced cholinergic contraction of rat gastric smooth muscle via augmenting muscarinic M3 receptor expression. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2018 Nov;45(11):1170-1180. doi: 10.1111/1440-1681.12999. Epub 2018 Jul 17. PMID: 29927500

109. Lin S, Kajimura M, Takeuchi K, Kodaira M, Hanai H, Kaneko E. Expression of muscarinic receptor subtypes in rat gastric smooth muscle: effect of M3 selective antagonist on gastric motility and emptying. Dig Dis Sci. 1997 May;42(5):907-14. doi: 10.1023/a:1018808329603. PMID: 9149041.

110. Schuurkes JA. Pharmacotherapy of gastrointestinal motor disorders. Rev Gastroenterol Mex. 1994 Apr-Jun;59(2):165-70. PMID: 7991970.

111. Bharucha AE, Kudva YC, Prichard DO. Diabetic Gastroparesis. Endocr Rev. 2019 Oct 1;40(5):1318-1352. doi: 10.1210/er.2018-00161. PMID: 31081877; PMCID: PMC6736218.

112. Sullivan A, Temperley L, Ruban A. Pathophysiology, Aetiology and Treatment of Gastroparesis. Dig Dis Sci. 2020 Jun;65(6):1615-1631. doi: 10.1007/s10620-020-06287-2. PMID: 32350720.

113. Alom F., Miyakawa M., Matsuyama H., Nagano H., Tanahashi Y., Unno T. Possible antagonistic effects of the TRPC4 channel blocker ML204

on M2 and M3 muscarinic receptors in mouse ileal and detrusor smooth muscles and atrial myocardium. J Vet Med Sci. 2018; 80(9): 1407-1415. doi: 10.1292/jvms.18-0197.

114. Kitazawa T, Hashiba K, Cao J, Unno T, Komori S, Yamada M, Wess J, Taneike T. Functional roles of muscarinic M2 and M3 receptors in mouse stomach motility: studies with muscarinic receptor knockout mice. Eur J Pharmacol. 2007 Jan 12;554(2-3):212-22. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.10.013. Epub 2006 Oct 17. PMID: 17113073.

115. Wrzos HF, Tandon T, Ouyang A. Mechanisms mediating cholinergic antral circular smooth muscle contraction in rats. World J Gastroenterol. 2004 Nov 15;10(22):3292-8. doi: 10.3748/wjg.v10.i22.3292. PMID: 15484303; PMCID: PMC4572298.

116. Takahashi T, Kurosawa S, Owyang C. Regulation of PI hydrolysis and cAMP formation by muscarinic M3 receptor in guinea pig gallbladder. Am J Physiol. 1994 Oct;267(4 Pt 1):G523-8. doi: 10.1152/ajpgi.1994.267.4.G523. PMID: 7943317.

117. Rhee JC, Rhee PL, Park MK, So I, Uhm DY, Kim KW, Kang TM. Muscarinic receptors controlling the carbachol-activated nonselective cationic current in guinea pig gastric smooth muscle cells. Jpn J Pharmacol. 2000 Apr;82(4):331-7. doi: 10.1254/jjp.82.331. PMID: 10875753.

118. Lindqvist S, Hernon J, Sharp P, Johns N, Addison S, Watson M, Tighe R, Greer S, Mackay J, Rhodes M, Lewis M, Stebbings W, Speakman C, Evangelista S, Johnson I, Williams M. The colon-selective spasmolytic otilonium bromide inhibits muscarinic M(3) receptor-coupled calcium signals in isolated human colonic crypts. Br J Pharmacol. 2002 Dec;137(7):1134-42. doi: 10.1038/sj.bjp.0704942. PMID: 12429587; PMCID: PMC1573573.