Вірич Павло Анатолійович, аспірант кафедри біофі&shy;зики та медичної інформатики ННЦ &laquo;Інститут біології та медицини&raquo; Київського національного університету імені

Тараса Шевченка: &laquo;Вплив нових похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на брадикінін-індуковане скоро&shy;чення гладеньких м&rsquo;язів шлунка щурів&raquo; (03.00.02 - біофі&shy;зика). Спецрада Д 26.001.38 у Київському національному університеті імені Тараса Шевченка

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИСТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА

ШЕВЧЕНКА

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

ВІРИЧ ПАВЛО АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК 577.353.3

ВПЛИВ НОВИХ ПОХІДНИХ 3-ЗАМІЩЕНИХ 1,4-БЕНЗОДІАЗЕПІН-2-

ОНІВ НА БРАДИКІНІН-ІНДУКОВАНЕ СКОРОЧЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ

М’ЯЗІВ ШЛУНКУ ЩУРІВ

03.00.02 – біофізика

Подається на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,

результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник:

Мартинюк Віктор Семенович

доктор біологічних наук,

професор

Київ 2018

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ...................................................................... 16

ВСТУП........................................................................................................................ 18

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ........................................................................... 22

1.1. Особливості будови та функціонування гладеньких м’язів..................... 22

1.1.1. Рецептори гладеньком’язових клітин .................................................. 22

1.1.2. Іонні канали гладеньких м’язів шлунково-кишкового тракту .......... 24

1.1.3. Механізми скорочення гладеньких м’язів ........................................... 26

1.2. Характеристика та фармакологічні ефекти похідних бензодіазепінів ... 29

1.2. Кінін-калікреїнова система.......................................................................... 32

1.3. Участь кінін-калікреїнової системи у функціонуванні систем організму

та розвитку патологічних станів........................................................................... 36

1.3.1. Роль ККС у функціонуванні нервової системи................................... 36

1.3.2. Роль ККС у функціонуванні серцево-судинної системи.................... 38

1.3.3. Роль ККС у функціонуванні травної системи..................................... 40

1.3.4. Участь ККС у канцерогенезі ................................................................. 41

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ....................................... 44

2.1. Характеристика похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів ........... 44

2.2. Визначення токсичного впливу 3-заміщених 1,4-бензодіазенін-2-онів на

культуру міоцитів шлунку щурів ......................................................................... 46

2.3. Визначення впливу похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на

базальний рівень цитоплазматичного кальцію міоцитів шлунку щурів.......... 47

2.4. Реєстрація скорочень гладеньких м’язів шлунку щурів........................... 48

2.4.1. Брадикінін-індуковане скорочення ...................................................... 52

2.4.2. Карбахолін- та гіперкалій-індуковане скорочення............................. 53

2.5. Визначення впливу похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на

динаміку кальцієвої відповіді брадикінін-індукованого скорочення

гладеньких м’язів шлунку щурів.......................................................................... 54

2.6. Статистична та математична обробка отриманих результатів ................ 55

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ .................................................... 57

14

3.1. Визначення неспецифічного токсичного впливу 3-заміщених 1,4-

бензодіазепін-2-онів на суспензію клітин міоцитів шлунку щурів .................. 57

3.2. Вплив похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на базальний

рівень цитоплазматичного кальцію міоцитів смужок гладеньких м’язів

шлунку щурів.......................................................................................................... 60

3.3. Особливості брадикінін-індукованого скорочення гладеньких м’язів

шлунку щурів залежно від концентрації різних похідних 3-заміщених 1,4-

бенздіазепін-2-онів................................................................................................. 66

3.3.1. Вплив 3-ариламіно-1,2-дигідро-3H-1,4-бензодіазепін-2-онів на

механокінетичні показники скорочення гладеньких м’язів шлунку щурів.. 69

3.3.2. Вплив 3-алокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бензодіазепін-2-онів на

механокінетичні показники скорочення гладеньких м’язів шлунку щурів.. 74

3.3.3. Вплив 3-ариліден-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онів на

механокінетичні показники скорочення гладеньких м’язів шлунку щурів.. 77

3.4. Дія похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на механо-кінетичні

параметри брадикінін-індукованого скорочення гладеньких м’язів шлунку

щурів за присутності інгібіторів Са2+

-каналів .................................................... 79

3.4.1. Ефект 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів на брадикінін-індуковане

скорочення гладеньких м’язів шлунку щурів в присутності Gd3+

................. 80

3.4.2. Ефект 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів на брадикінін-індуковане

скорочення гладеньких м’язів шлунку щурів у присутності верапамілу ..... 88

3.4.3. Ефект 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів на брадикінін-індуковане

скорочення гладеньких м’язів шлунку щурів в присутності 2-

аміноетоксидифенілборату ................................................................................ 92

3.5. Вплив похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на розвиток

кальцієвої відповіді брадикінін-індукованого скорочення гладеньких м’язів

шлунку щурів.......................................................................................................... 96

3.5.1. Вплив 3-ариламіно-1,2-дигідро-3H-1,4-бензодіазепін-2-онів на

динаміку кальцієвої відповіді брадикінін-індукованого скорочення

гладеньких м’язів шлунку щурів....................................................................... 98

15

3.5.2. Вплив 3-алокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бензодіазепін-2-онів на динаміку

кальцієвої відповіді брадикінін-індукованого скорочення гладеньких м’язів

шлунку щурів .................................................................................................... 103

3.5.3. Вплив 3-ариліден-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онів на

динаміку кальцієвої відповіді брадикінін-індукованого скорочення

гладеньких м’язів шлунку щурів..................................................................... 106

3.6. Вплив 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів на потенціал- та карбахолініндуковане скорочення гладеньких м’язів шлунку щурів ............................... 107

3.6.1. Карбахолін-індуковане скорочення гладеньких м’язів шлунку

щурів ................................................................................................................ 108

3.6.2. Потенціал-індуковане скорочення гладеньких м’язів шлунку

щурів ................................................................................................................ 109

3.7. Порівняльний аналіз похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів з

найвищою біологічною активністю ................................................................... 111

УЗАГАЛЬНЕННЯ ................................................................................................... 119

ВИСНОВКИ............................................................................................................. 121

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ПОСИЛАНЬ............................................................ 123

ДОДАТОК................................................................................................................ 145

16

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БК – брадикінін

ГАМКa – рецептори гамма-аміномасляної кислоти а-типу

ДАГ – диацилгілцерол

ЕПР – ендоплазматичний ретикулум

КК1 – калікреїн 1

КК6 – калікреїн 6

ККС- кінін-калікреїнова система

ПД – потенціал дії

РАС – ренін-ангіотензинова система

СаМ – кальмодулін

СТСВН – спонтанні транзієнтні струми вхідного напрямку

цАМФ – циклічний аденозинмонофосфат

ШКТ –шлунково-кишковий тракт

B1R – bradykinin receptor 1

B2R – bradykinin receptor 2

CPI17 – C-kinase activated protein phosphatase 1

dA-BK-AC – des-Arg9

-bradykinin acetate

EDHF – endothelium derived hyperpolarizing factor

EKK – extracellular-signal regulated kinase

GFAP – glial fibrillary acidic protein

GPCR – G-protein coupled receptor

G-білок – гуанін зв’язуючий білок (guanine nucleotide-binding proteins)

IGF – insulin-like growth factor

IL-1-β – interleukin-1-beta

IP3 – інозитол-1,4,5-трифосфат

MAPK – mitogen activated protein kinase

MEK – mitogen activated protein kinase kinase

MLC – myosin litechain kinase

MYPT1 – miosin phosphatase target subunit 1

NBS - N-bromosuccinimide

17

NMDA

–

N

-methyl

-

D

-aspartate receptor

PGI2

– prostaglandin I2

PKC

– protein kinase C

PLC

– phospholipase C

PP1

– protein phosphatase 1

TNFα

– tumor necrosis factor alpha

ZIPK

– zipper

-interacting protein kinase

18

ВСТУП

Актуальність теми. Одним з пріоритетних напрямків сучасної біології та

медицини є пошук ефективних і безпечних для здоров’я лікарських засобів.

Перевага надається сполукам, які мають комплексну дію і мінімальні побічні

ефекти, що дозволяє знизити навантаження на організм і досягнути необхідного

лікувального ефекту. Однією з перспективних груп хімічних речовин є 3-

заміщені 1,4-бензодіазепін-2-они. Препарати на основі бензодіазепінів

володіють спектром необхідних якостей, що дозволяє застосовувати ці сполуки

снодійні, протисудомні, анорексигенні та анксіолітичні засоби [83]. Особливості

просторової структури молекули дозволяють їй взаємодіяти з алостеричними та

пептидзв’язуючими центрами білкових молекул, включаючи канали, рецептори

мембран, ензиматичні комплекси та інші структури клітин [14, 24, 55, 57, 176].

За останні роки знайдено похідні 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів, що

мають комплексну анксіолітичну та анальгетичну дію [2, 4, 7, 184]. Перший

ефект забезпечується зв’язуванням з GABAa-рецепторами [165]. Анальгетична

дія вивчена недостатньо і конкретні системи організму, які чутливі до дії цих

сполук не ідентифіковано [4]. Однією з них виступає кінін-калікреїнова система.

До переліку функцій, що вона контролює, входять серцево-судинний гомеостаз,

запалення, ноцицепція та ін. [16]. Посередниками виступають біологічно активні

пептиди та їх попередники [16]. Набір ензимів тканин та плазми крові забезпечує

контроль активності завдяки процесам синтезу та деградації пептидів [171, 180].

Дія активних похідних опосередковується двома типами рецепторів B1 та В2 [82,

96, 181]. Потенційно, вони можуть виступати мішенями впливу похідних 3-

заміщених 1,4-бензодіазепні-2-онів. Особливості структури сполук дозволяють

розчинятись у клітинних мембранах та взаємодіяти з розташованими в них

білковими комплексами. Модифікація хімічної структури речовин дозволяє

контролювати тип взаємодій та з’ясовувати механізми формування зв’язку з

клітинними мішенями.

Виходячи з цього, актуальним є пошук похідних 3-заміщених 1,4-

бензодіазепін-2-онів, які здатні впливати на активність кінін-калікреїнової

19

системи, тобто володіти потенційними протизапальними та знеболюючими

властивостями. Рецептори кінін-калікреїнової системи широко представлені у

різних тканинах організму [77, 152]. Для лабораторних досліджень in vitro

найбільш зручною моделлю виступають гладенькі м’язи. Вони володіють

широким спектром чутливості до регуляторних механізмів систем організму, що

дозволяє використовувати їх як об’єкт дослідження впливу потенційних

біологічно активних речовин на конкретні мішені. Присутність популяції

кінінових B2 рецепторів на міоцитах шлунку [53] забезпечує створення простої

моделі досліджень впливу похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на

брадикінін-індуковане скорочення гладеньких м’язів. Враховуючи значний

перелік побічних ефектів класичних знеболюючих та протизапальних засобів

морфінового та стероїдного рядів, такі дослідження є особливо актуальними

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконувалась згідно договору Фонду фундаментальних

досліджень за темами «Анальгетичні сполуки на основі 3-заміщених 1,4-

бенздіазепінів як нові фактори регуляції функцій гладеньких м’язів» (№ Ф64/19-

2015 (№ 15ДФ036-05)) та «Анальгетичні сполуки на основі 3-заміщених 1,4-

бенздіазепінів як нові фактори регуляції функцій гладеньких м’язів» (№ Ф64/40-

2016 (№ 16ДФ036-04)).

Мета і завдання досліджень. Метою роботи було дослідити вплив нових

похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на брадикінін-індуковане

скорочення гладеньких м’язів шлунку щурів.

Для досягнення цієї мети поставлені наступні завдання:

1. Визначити вплив нових похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-

онів на життєздатність суспензії міоцитів шлунку щурів.

2. Проаналізувати зміни базального рівня концентрації Са2+ в

цитоплазмі клітин гладеньких м’язів за присутності досліджуваних сполук.

3. Встановити особливості впливу похідних 3-заміщених 1,4-

бензодіазепін-2-онів на максимальну нормовану швидкість скорочення смужок

гладеньких м’язів за некумулятивного збільшення концентрації брадикініну.

20

4. Проаналізувати особливості змін максимальної нормованої

швидкості скорочення гладеньких м’язів при дії 3-заміщених 1,4-бензодіазепін2-онів за присутності блокаторів кальцієвих каналів: Gd3+, верапамілу, 2-

аміноетоксидифенілборату.

5. Визначити особливості змін динаміки кальцієвої відповіді

брадикінін-індукованого скорочення за присутності похідних 3-заміщених 1,4-

бензодіазепін-2-онів.

6. Проаналізувати дію похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів

на карбахолін- та потенціал-індуковані скорочення гладеньких м’язів.

Об’єкт дослідження: скорочення гладеньких м’язів.

Предмет дослідження: брадикінін-індуковане скорочення гладеньких

м’язів у присутності похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів.

Методи досліджень: цитогістохімічні, тензометричні, люмінесцентна та

конфокальна мікроскопія, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано інгібуючу

дію нових похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2онів на брадикінініндуковане скорочення гладеньких м’язів шлунку щурів. Серед досліджених

речовин ідентифіковано сполуки, що виявляють різний за механізмом

інгібуючий вплив відносно механо-кінетичних параметрів брадикінініндукованого скорочення та сприяють сповільненню кальцієвої відповіді.

Практичне значення результатів. Результати роботи можуть бути

використані для розробки нових лікарських препаратів комплексної дії на основі

досліджених похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів.

Отримані результати дозволяють умовно розділити досліджені похідні 3-

заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на три групи: потенційні конкурентні

інгібітори B2 рецепторів, неконкурентні (алостеричні) інгібітори та сполуки, що

не виявляють активності відносно брадикінін-індукованого скорочення.

Речовини першої групи потребують досліджень їх афінітету, констант

зв’язування/дисоціації, метаболізму в організмі для проведення доклінічних

досліджень і розробки препаратів комплексної дії. Сполуки другої групи можуть

виступати алостеричними регуляторами активності B2 рецепторів, що дозволяє

21

їх використання при дослідженнях ролі кінін-калікреїнової системи у

функціонуванні різних систем та органів.

Особистий внесок здобувача полягає у визначенні мети і завдань

досліджень разом з науковим керівником роботи, самостійному опрацюванні

літературних джерел за темою дисертації, оволодінні методиками виконання

досліджень та плануванні експериментів, виконанні експериментальної частини

дисертації і проведенні статистичної обробки даних. За участі наукового

керівника проведено аналіз та узагальнення отриманих результатів і підготовку

публікацій до друку.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної

роботи представлено на конференціях: XVIII Наукова молодіжна конференція

«Проблеми та досягнення сучасної хімії» (Одеса, 2016), XI Міжнародна

конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків,

2016), XIX Наукова молодіжна конференція «Проблеми та досягнення сучасної

хімії» (Одеса, 2017), XIII міжнародна наукова конференція студентів та

аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2017), XV Міжнародна наукова

конференція «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки» (Київ, 2017).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13

наукових праць, з них 5 статей у фахових виданнях, 7 тез доповідей на наукових

конференціях і 1 патентна заявка.

Обсяг і структура дисертації.

Дисертація складається зі вступу, 3 розділів, узагальнення результатів

досліджень, висновків, списку використаних літературних джерел, який містить

206 найменувань, в т.ч. 199 іноземною мовою. Дисертаційна робота викладена

на 144 сторінках, ілюстрована 48 рисунками і містить 1 таблицю.

ВИСНОВКИ

Проведеноаналіздіїпохіднихзаміщенихбензодіазепінонівна

брадикінініндукованескороченнягладенькихм’язівшлункущурів

Присутністьурозчиніінкубаціїновихпохіднихзаміщених

бензодіазепінонівуконцентраціїМневиявляєтоксичнихефектів

відносноміоцитівсуспензіїклітин

СполукиМХМХМХтаМХсприяють

зростаннюбазальногорівняконцентраціїкальціюната

відповідноРечовиниМХМХМХМХМХнезмінюютьвибранийпоказник

СполукиМХМХМХвиявляютьсхожістьдіїдо

конкурентногопептидногоінгібітора

брадикінінацетатуза

некумулятивногозбільшенняконцентраціїбрадикінінувдіапазоні

М

МХМХздатнісильнознижуватидозаприсутності

урозчиніінкубаціїМмаксимальнунормованушвидкістьбрадикінініндукованогоскорочення

Придодаванніурозчинінкубації·Мспостерігається

додатковезниженняскороченнядляМХМХМХ

відповідноізростаннярозслабленнядляМХМХМХМХМХМХ

тавідповідно

Заприсутностіурозчиніінкубаціїгладенькихм’язівверапамілу

·ММХсприяєдодатковомузниженнюбрадикінініндукованого

скороченнянаСполукиМХтаМХзабезпечуютьзниження

брадикінініндукованогоскороченнянатавідповіднопри

додаванніаміноетоксидифенілборату·Мурозчинінкубації

СполукиМХМХзнижуютьамплітудукальцієвої

відповідібрадикінініндукованогоскороченнянааМХтаМХздатнісильносповільнюватидинамікуцитзізниженняммаксимальної

йогоконцентраціїнаРечовинаМХвиявляєзмінисхожідо





брадикінінущоєможливимсвідченнямїїконкурентноївзаємодіїз

кініновимирецепторами

Досліджуваніпохіднізаміщенихбензодіазепінонівне

виявляютьактивностівідноснопотенціалтакарбахолініндукованихскорочень

гладенькихм’язівшлункущурів

СполукуМХмирекомендуємодляподальшихдосліджень

спорідненостідоаМХМХМХ–додатковоговивчення

їхвзаємодіїзмембранамиклітинибілковимиікаталітичнимикомплексами

залученимиупроцесбрадикінініндукованогоскорочення