

О.В. Цимбалюк, І.С. Войтешенко

**РЕЄСТРАЦІЯ І МЕХАНОКІНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ
СКОРОТЛИВОЇ АКТИВНОСТІ БАГАТОКЛІТИННИХ
ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ ПРЕПАРАТІВ ТРАВНОГО ТРАКТУ
ЩУРІВ**

(методичні розробки до лабораторних занять з нормативного курсу
«Анатомія та фізіологія людини і тварин»)

Київ – 2022

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Навчально-науковий інститут високих технологій
Кафедра молекулярної біотехнології та біоінформатики

О.В. Цимбалюк, І.С. Войтешенко

Методичні розробки до лабораторних занять «Реєстрація і механокінетичний аналіз скоротливої активності багатоклітинних гладеньком'язових препаратів травного тракту щурів» з нормативного курсу «Анатомія та фізіологія людини і тварин» (змістовий модуль «Фізіологія та анатомія травної системи») для студентів Навчально-наукового інституту високих технологій

Затверджено на засіданні
Вченої ради ННІ високих технологій,
протокол № 1 від 1 вересня 2022 року

Рецензент: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України Т.О. Векліч

1. Будова і фізіологічні властивості гладеньких м'язів

М'язи належать до збудливих тканин, оскільки здатні активно відповідати на подразнення зміною напруження (скорочуючись або розслаблюючись). На відміну від поперечно посмугованих (скелетних та серцевого м'язів), мікроскопічні зрізи гладеньких м'язів (ГМ) не виявляють структур з характерним чергуванням зон із різним пропусканням світла. Від ефективності скоротливої активності ГМ залежить функціонування багатьох внутрішніх органів, зокрема, шлунково-кишкового тракту, дихальної і сечостатевої систем, радужки ока та судин. Мембранний потенціал спокою гладеньком'язових клітин міститься в межах -35 – -70 мВ (міометрій в стані функціонального спокою має МП -40 мВ; судини: артерії -56 мВ та вени -66 мВ; шлунок -56 мВ). Гладенькі м'язи можуть бути спонтанно активними, або скорочуватись у відповідь на дію нервової або гормональної стимуляції. Так, для деяких ГМ, зокрема кишечника і міометрію, властиві спонтанні зміни мембранного потенціалу (пейсмейкерні потенціали та повільні хвилі деполяризації, на яких виникають потенціали дії). Головними іонами, які відповідають за розвиток потенціалу дії в гладеньких м'язах є Ca^{2+} та K^{+} . Умовою скорочення є збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, пороговою величиною якого є 10^{-7} М.

Властивості ГМ досліджують за допомогою ряду модельних систем: багатоклітинних препаратів, поодиноких клітин та їх фрагментів, окремих хімічно виділених ферментів, скоротливих і регуляторних білків.

Відомо, що іони кальцію нерівномірно розташовуються у цитоплазмі гладеньком'язових клітин. Так, у стані фізіологічного спокою більш, ніж 65% іонів Ca^{2+} клітини міститься на плазматичній мембрані або поблизу неї; при імпульсі збудження примембранна концентрація Ca^{2+} швидко зростає і досягає мілімолярних концентрацій за дуже короткий час: зростання відбувається в межах 20 мс, і досягає максимальних значень – за 50 – 100 мс.

Різноманітні фармакологічні чинники здатні викликати короткочасне або тривале локальне збільшення концентрації Ca^{2+} у різних ділянках міоплазми. У відповідь на аплікування збуджувальних нейромедіаторів або їх агоністів (синтетичних речовин, які здатні викликати такий самий клітинний ефект, як і нейромедіатор), та деяких фізіологічно активних речовин плазматична мембрана гладеньком'язової клітини деполяризується (Рис. 1). Загалом ця деполяризація пов'язана з відкриванням рецепторкерованих неселективних катіонних (чи хлорних) каналів, або закриттям калієвих каналів. Наслідком деполяризації є відкривання потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу, які забезпечують головну кількість Ca^{2+} . Іншим джерелом зростання концентрації іонів кальцію в міоцитах є його вивільнення з внутрішньоклітинних депо (ріанодин- та іонітолтрифосфат-чутливих пулів саркоплазматичного ретикулуму). Зв'язок між деполяризацією плазматичної мембрани та відкриттям потенціалкерованих каналів називають електромеханічним спряженням.

Найбільш простою моделлю для дослідження закономірностей реалізації електромеханічного спряження є гіперкалієва деполяризація плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Для цього у фізіологічному розчині здійснюють заміну частини іонів Na^+ на еквімолярну кількість іонів K^+ . Як відомо, мембранний потенціал спокою збудливих клітин (і, зокрема, гладеньком'язових) переважно забезпечується трансмембранною різницею концентрацій іонів K^+ . У ГМ внутрішньоклітинна концентрація K^+ у середньому становить 185 мМ, а $[\text{Na}^+]_i$ у середньому дорівнює 32 мМ. У випадку, коли замінити частину позаклітинних іонів Na^+ на калій, відбувається деполяризація плазматичної мембрани, яка спричиняє потенціал-керований вхід іонів Ca^{2+} до клітини. Відповідно, величина деполяризації і, як наслідок, сила скорочення (так зване гіперкалієве скорочення) пропорційна до кількості замінених іонів переважно залежить від надходження іонів кальцію з позаклітинного боку. Дійсно при видаленні іонів Ca^{2+} з омиваючого гладеньком'язові препарати розчину або

додаванні до нього блокаторів Ca^{2+} -каналів (верапамілу, ніфедипіну), м'яз втрачає здатність відповідати скороченням на аплікування гіперкалієвого розчину.

Фармакомеханічне спряження опосередковується трьома ключовими мембранними білками: рецептором, який активується зв'язуванням агоніста, гетеротримерним G-білком, що зв'язує сигнал між рецептором і ефекторним білком, та власне ефекторним білком – фосфоліпазою C. Фосфоліпаза C гідролізує молекули інозитольних фосфоліпідів, локалізованих в плазматичній мембрані, з утворенням вторинних посередників – інозитол-1,4,5-трифосфату (ІТФ) а діацилгліцеролу (ДАГ). ІТФ активує специфічні до нього кальцієві канали в мембрані саркоплазматичного ретикулуму, викликаючи вивільнення Ca^{2+} . ДАГ стимулює активність протеїнкінази C, яка фосфорилує велику кількість сигнальних білків та модулює активність деяких типів каналів.

Агоніст-викликане скорочення – двохфазне: зразу після активації м'яз генерує швидку скоротливу відповідь (так зване фазне скорочення), яка, після значного зниження напруження препарату, переходить у тривале підвищене значення напруження (так зване тонічне скорочення). Фазне скорочення частково пригнічується блокаторами Ca^{2+} -каналів, застосованими у концентраціях, достатніх для повного пригнічення гіперкалієвого скорочення. Інша, не пригнічена, частина фазного скорочення забезпечується іонами Ca^{2+} , які вивільняються з саркоплазматичного ретикулуму. Також виходом Ca^{2+} з цього кальцієвого депо та входом їх через Ca^{2+} -канали плазматичної мембрани пояснюється тонічне скорочення. З іншого боку, за даними Somlyo та інших дослідників, тонічне скорочення є залежним від активності Rho кінази (і інгібується відповідно інгібіторами цієї кінази). На користь останньої гіпотези свідчать дані про те, що карбахол-викликане тонічне скорочення не супроводжується збільшенням внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} .

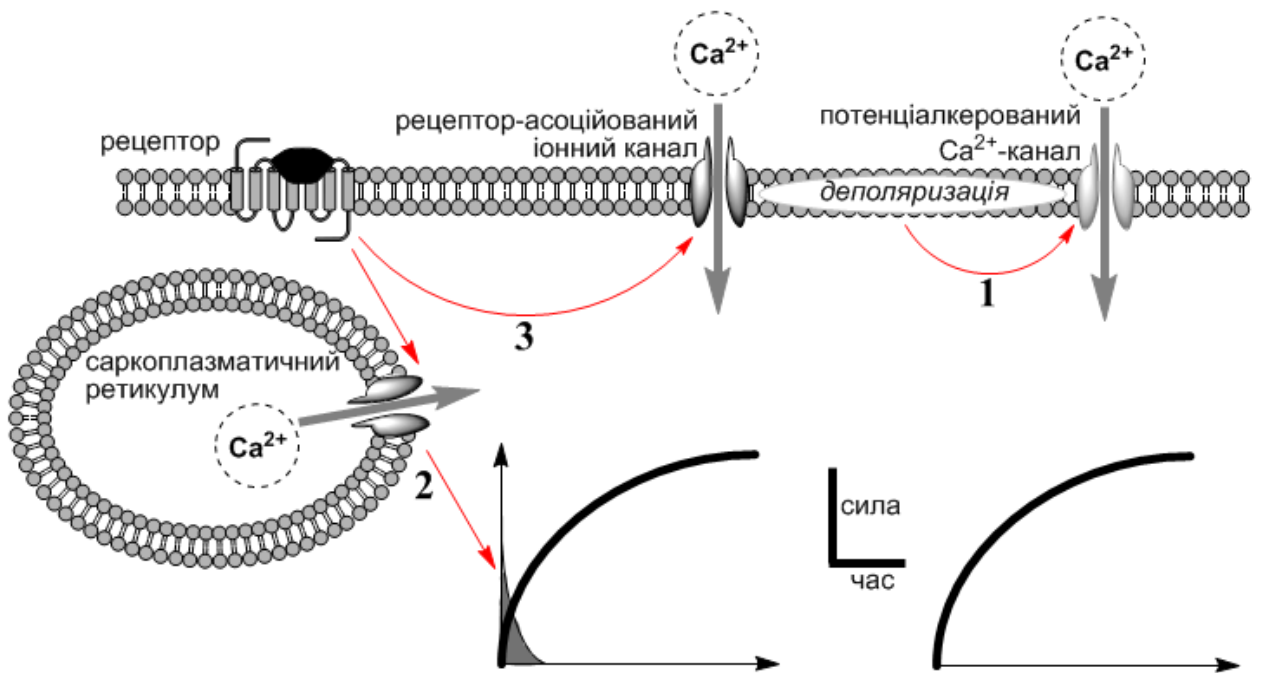


Рис. 1. Шляхи збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} , які забезпечують скорочення гладеньких м'язів. Деполаризація плазматичної мембрани гладеньком'язової клітини за допомогою гіперкалієвого розчину відкриває потенціалкеровані Ca^{2+} -канали, посилює вхід іонів Ca^{2+} , які забезпечують скорочення (1). Агоністи збуджувальних рецепторів спричиняють активацію вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо (саркоплазматичного ретикулуму) і, таким чином, активацію скорочення (2). Агоністи також активують рецептор-асоційовані іонні канали, вхід через які іонів Ca^{2+} підтримує скоротливу відповідь (3).

Гальмівні нейромедіатори та антагоністи (хімічно синтезовані речовини, ефект яких полягає у блокуванні проведення сигналу через відповідні рецептори) переважно спричиняють зниження внутрішньоклітинної концентрації вільного Ca^{2+} та пригнічення скорочення. Агоніст-викликане продукування циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) та циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ) спричиняє відповідно активування протеїнкіназ А і С. Ці кінази викликають зниження внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} та чутливості білків скоротливого апарату до іонів кальцію.

2. Дослідження скорочувальної активності гладеньких м'язів

Як згадувалось вище, однією з модельних систем, які дозволяють вивчати властивості гладеньких м'язів, є дослідження багатоклітинних препаратів (смужок гладеньком'язової тканини). Зокрема, широко використовується тензометрія – реєстрація спонтанної і викликанної скоротливої активності. Залежно від того, чи зафіксовані жорстко обидва кінці м'язового препарату, чи лише один, розрізняють відповідно ізометричний та ізотонічний режими скорочення (Рис. 2).

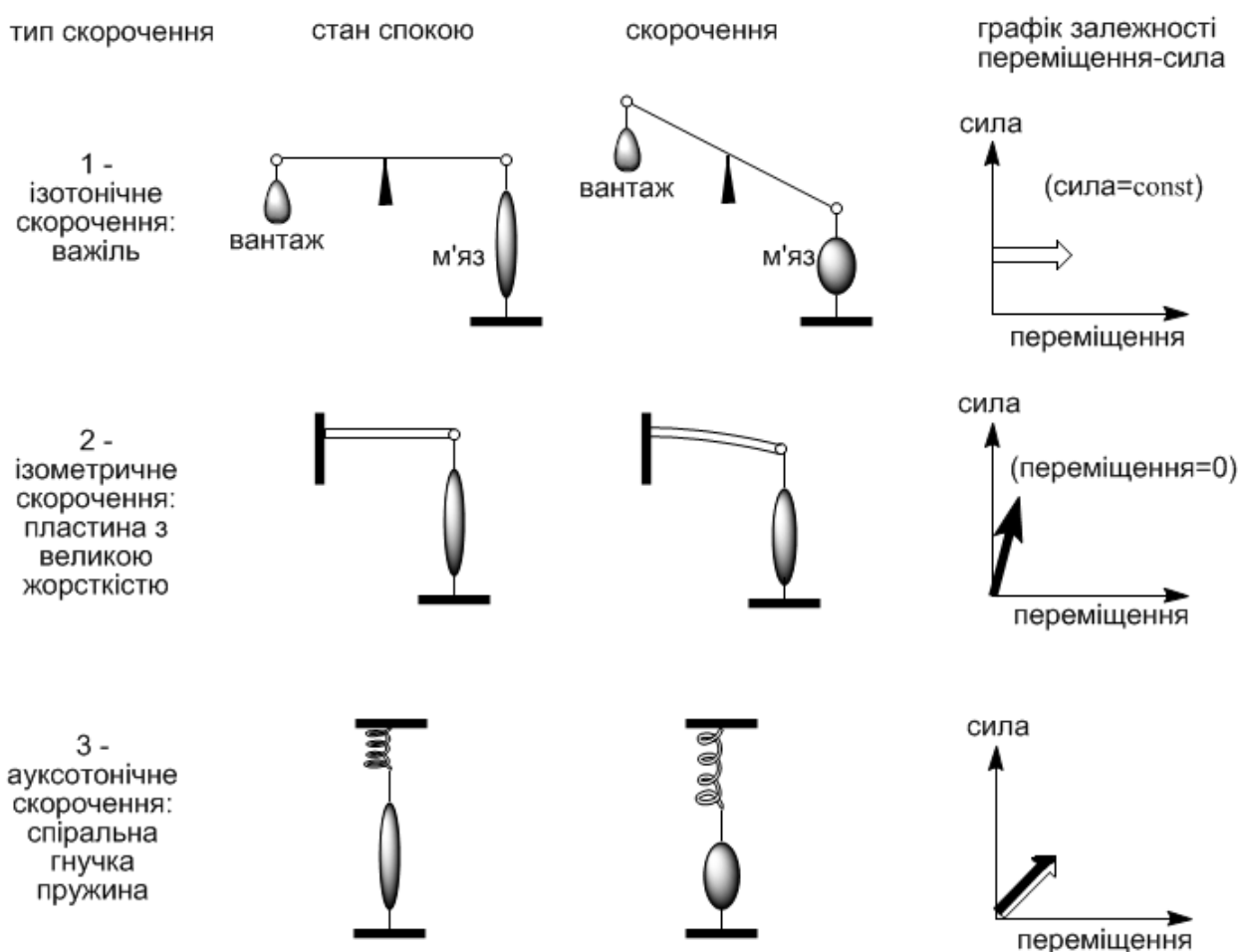


Рис. 2. Схеми фіксації, скоротливі реакції та графіки залежності переміщення-сила для гладеньком'язових препаратів у ізометричному (1), ізотонічному (2) та ауксотонічному (3) режимах реєстрації скорочення.

Реєстрація скорочення в ізометричному режимі. Коли м'язу початково задати довжину і не змінювати її в процесі експерименту,

реалізуються ізометричні умови. При ізометричному скороченні активований м'язовий препарат практично не змінює свою довжину, і дослідник реєструє зміну сили скорочення (мН або г) у часі. Дослідження скоротливої активності гладеньком'язових препаратів в умовах ізометричного режиму досить інформативне, і передбачає використання селективних агоністів і антагоністів окремих рецепторів, блокаторів каналів та інгібіторів окремих ферментів.

Реєстрація скорочення в ізотонічному режимі. Можна досліджувати зміну довжини м'язу, до якого прикладена постійна, початково задана сила. Це – ізотонічні умови. У режимі ізотонічного скорочення м'язовий препарат укорочується при постійному навантаженні. За цих умов визначають зміну довжини гладеньком'язової смужки порівняно з початковою без навантаження (L_0):

$$\Delta L = L - L_0$$

Гладеньком'язові клітини мають великий робочий діапазон: при максимальній активації вони можуть вкорочуватись до 20% від оптимальної довжини (L_0 , довжина максимального активного напруження) – $0,2L_0$, а при натягуванні вони можуть розтягуватись до трьох своїх початкових довжин ($\Delta L_{\max} = 3L_0$). Однак, робочий діапазон при довжинах, більших за L_0 , порівняно зі скелетними м'язами досить незначний, оскільки пасивне напруження препаратів достатньо велике і маскує активну відповідь м'язової смужки.

Реєстрація скорочення в ауксотонічному режимі. Можна також одночасно вимірювати як зміну довжини м'язу, так і зміну її сили, за умови, коли її довжина і прикладена сила початково відомі. Вимірювання ауксотонічних скорочень займає проміжне положення між реєстрацією ізотонічних та ізометричних скорочень. У цьому випадку датчик має лінійний діапазон співвідношення сили до переміщення.

Якщо розглядати ці три типи скорочень з біологічної точки зору, то можна сказати, що в умовах *in vivo* не існує ідеальних параметрів для

реалізації режимів ізотонічного та ізометричного скорочення. Найбільш приближені до інтактних умов скорочення в ауксотонічному режимі. Однак, при реєстрації скорочень в ізометричному режимі, коли гладеньком'язові препарати розтягнуті у півтора рази по відношенню до їх довжини у стані спокою, м'язова сила може досягнути максимального значення і у цьому є головна перевага даного режиму реєстрації скоротливої активності.

Табл. 1 Узагальнююча таблиця головних відмінностей між різними режимами реєстрації скоротливої активності гладеньком'язових препаратів

<i>Режим</i>	<i>Змінні параметри</i>	<i>Умови</i>
Ізотонічний	Переміщення	Сила постійна (зміна сили дорівнює 0)
Ізометричний	Сила	Переміщення дорівнює 0
Ауксотонічний	Сила і переміщення	Має місце зміна сили та переміщення

Лабораторна робота 1.

Реєстрація спонтанних і викликаних скорочень на прикладі гладеньких м'язів саесит щурів

Розчини, які використовуються в роботі:

Нормальний розчин Кребса (НРК, у мМ/л): NaCl - 120.4; KCl – 5.9; NaHCO₃ – 15.5; NaH₂PO₄ – 1.2; MgCl₂ -1.2; CaCl₂ – 2.5; глюкоза -11.5 (рН доводять до 7.4 розчинами NaOH або HCl).

Гіперкалієвий розчин (ГКР, у мМ/л): NaCl - 46.3; KCl – 80; NaHCO₃ – 15.5; NaH₂PO₄ – 1.2; MgCl₂ -1.2; CaCl₂ – 2.5; глюкоза -11.5 (рН доводять до 7.4 розчинами NaOH або HCl). У цьому випадку ГКР містить 80 мМ/л K⁺, але залежно від плану експерименту можна використовувати і іншу концентрацію іонів калію для того, щоб змоделювати різний ступінь деполяризації плазматичної мембрани.

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

Матеріали.

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

Обладнання. Блок-схему устаткування для реєстрації скоротливої активності (у ізометричному або ізотонічному режимах) представлено на рис. 3.

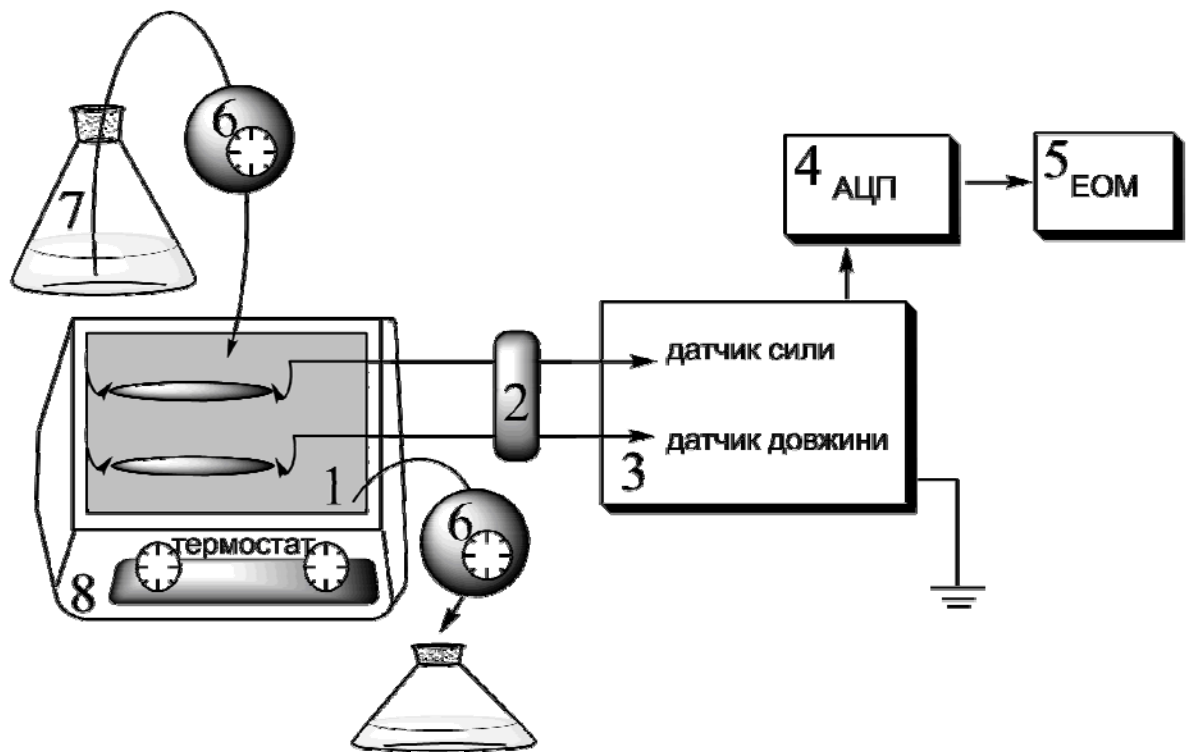


Рис. 3. Блок-схема устаткування для тензометричних експериментів на багатоклітинних препаратах гладеньких м'язів: 1 - робоча камера, заповнена робочим розчином, з гладеньком'язовими препаратами, які закріплено на гачках; 2 – датчики сили (за умови реєстрації в ізометричних умовах) та переміщення (за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

Виконання роботи. Приготування гладеньком'язових препаратів кільцевих м'язів сліпої кишки (саесит) щура. Після забору сліпої кишки необхідно помістити її в ванночку з розчином, зафіксувати сліпий кінець за допомогою препарувальної голки та надрізати кишку по внутрішній кривизні. Після розкривання кишки необхідно вимити її вміст у склянці, змінивши НРК (25 мл) декілька разів до прозорого розчину. Після того, як внаслідок промивання кишки розчин залишатиметься прозорим, можна приступати до наступного етапу: звільнення гладеньких м'язів від слизового шару.

Для цього на іншій підложці (чашка Петрі, залита парафіном) розміщують кишку так, щоб слизовий шар знаходився зверху і, не

розтягуючи її фіксують препарувальними голками (рис. 4). Потім обережно під бінокуляр за допомогою мікроножиць (допомагаючи мікропінцетом) зрізають шар слизової оболонки з площі кишки близько 2x2 см. Після цього нарізають м'язи на однакові гладеньком'язові препарати (ГМП). Нарізання проводять у напрямку розташування волокон на смужки довжиною близько 10 мм і з шириною 1.5 – 2.0 мм. Препарати переносять в склянку з чистим розчином НРК (об'єм 25 мл).

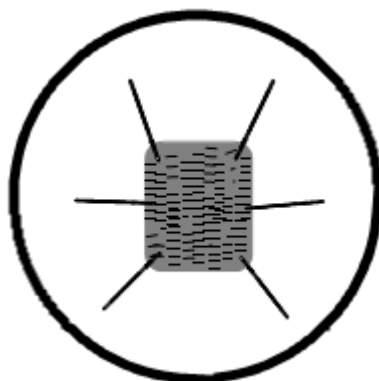


Рис. 4. Схема розташування фрагмента кишечника щура на препарувальній парафіновій підложці: м'яз зафіксовано за допомогою голок.

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

Друга система гачків фіксує інший ГМП в ізометричному режимі: один гачок жорстко закріплений в стінці, а інший є закріплений на датчику сили. Датчик сили розташовується на підставці, яка рухається у горизонтальній площині за допомогою мікрогвинта. Таким чином, дослідник може, рухаючи

підставку з датчиком сили, розтягувати препарат. Розтяг на певну довжину моделює постійне навантаження на м'яз. Вважається, що максимальне скорочення розвивають препарати, розтягнуті у півтора рази відносно їх довжини спокою (це відповідає навантаженню близько 1 г, тобто 10 мН).

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

Реєстрація скорочень ГМП в ізометричному і ізотонічному режимах.

Після вміщення препаратів в камеру і надання їм певного навантаження, систему залишають на 1 годину, після цього вони готові до виконання експерименту. Після цього терміну препарати генерують спонтанні скорочення з постійною частотою і амплітудою, а також відповідають скороченнями (з повторюваними параметрами) на стимулювання, зокрема, ГКР або збуджувальними агоністами (карбахолін) (Рис. 5 а і б). Тестом на можливість початку експерименту є повторювання скорочень з однаковими параметрами при аплікуванні ГКР декілька разів з фіксованим інтервалом відмивання НРК.

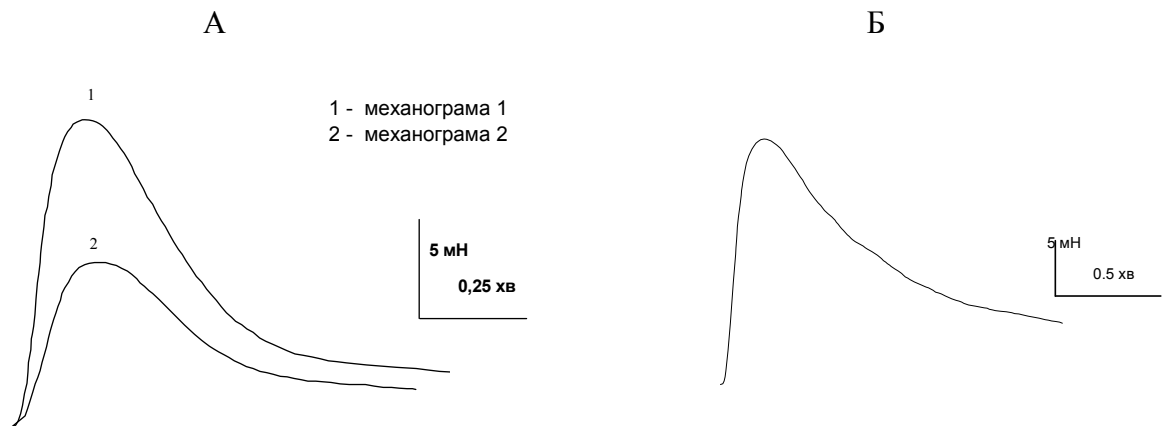


Рис. 5. Приклади скоротливих відповідей гладеньких м'язів сàесит щура: А – скорочення, викликані аплікуванням гіперкалієвого розчину (1 – 50 мМ, 2 – 80 мМ); Б – фрагмент ацетилхолін-викликаного скорочення (1 мкМ).

Моделювання деполаризації плазматичної мембрани. Найпростіший тест на життєздатність ГМП – деполаризація плазматичної мембрани гіперкалієвим розчином. Відомо, що трансмембранна різниця потенціалів гладеньком'язових клітин переважно обумовлюється градієнтом іонів K^+ . Тому заміна омиваючого м'язовий препарат розчину на розчин, в якому іони Na^+ частково замінені на іони K^+ , дозволяє змоделювати деполаризацію плазматичної мембрани – найпростішу модель електромеханічного спряження. Як уже згадувалось, активація скорочення при цьому спричиняють іони Ca^{2+} , які заходять в клітину через потенціалкеровані Ca^{2+} -канали L-типу. Зазвичай використовують ГКР з концентрацією іонів K^+ від 30 до 124 мМ/л.

Завдання:

1. Приготувати гладеньком'язові препарати саесум (шириною 1.5 мм та довжиною 12 мм), помістити їх у термостатовану (при 37 °C) камеру. На препарат, прикріплений до системи ізометричного датчика, надати постійного натягу, який відповідає 10 мН. На препарат, прикріплений до системи ізотонічного датчика, надати навантаження 10 мН. Протягом усього експерименту має підтримуватись постійне протікання НРК (5 мл/хв.). У такому стані залишити препарати на 45 хвилин.
2. Через 45-60 хв від надання препаратам постійного навантаження, зареєструвати спонтанні скорочення, які повинні мати постійні параметри (амплітуду і частоту).
3. Замінити НРК на гіперкалієвий розчин (з концентрацією іонів K^+ 80 ммоль/л) і зареєструвати скорочення. Після виходу скоротливої відповіді на постійний рівень, замінити гіперкалієвий розчин на НРК (відмивання препаратів) і залишити на 20-30 хв. Тестом на відмивання препаратів має бути відновлення спонтанних скорочень з раніше зареєстрованими параметрами. Повторити аплікування ГКР і наступне

відмивання. Скоротливі реакції на ГКР не повинні відрізнятись більше, ніж на 2,5-5,0 %.

4. Замінити ГКР на розчин агоніста мускаринових ацетилхолінових рецепторів – ацетилхоліну (10^{-6} моль/л) у НРК та зареєструвати скорочення. Після виходу скоротливої відповіді на постійний рівень, замінити розчин ацетилхоліну на НРК і провести відмивання препаратів протягом 20-30 хв. Дочекатись відновлення постійної амплітуди і частоти спонтанних скорочень і повторити аплікування розчину ацетилхоліну. Скоротливі реакції на аплікування ацетилхоліну не повинні відрізнятись більше, ніж на 2,5-5,0 %.

Лабораторна робота 2.

Дослідження дії невідомої речовини на гладенькі м'язи саесит щурів

Речовини, які при проведенні фармакологічних експериментів на ГМП спричиняють певний ефект, можна умовно поділити на три групи (Рис. 6):

- 1) **агоністи** – речовини, які викликають скорочення (зворотне). До агоністів, які діють на ГМ кишечника належать, зокрема, ацетилхолін, мускарін, гістамін, серотонін, які діють через специфічні рецептори клітинної мембрани.
- 2) **антагоністи** – речовини, які викликають розслаблення ГМП або пригнічують скорочення. Деякі з антагоністів блокують специфічні рецептори, через які агоністи викликали скорочення. Таким чином діють атропін, який блокує холінорецептори, мепірамін, що блокує рецептори гістаміну; метисергід є антагоністом серотоніну, викликаючи блокування серотонінових рецепторів (Табл.2).
- 3) **потенціюючі речовини** – речовини, які самостійно не викликають помітну реакцію, але посилюють дію деяких агоністів або антагоністів.

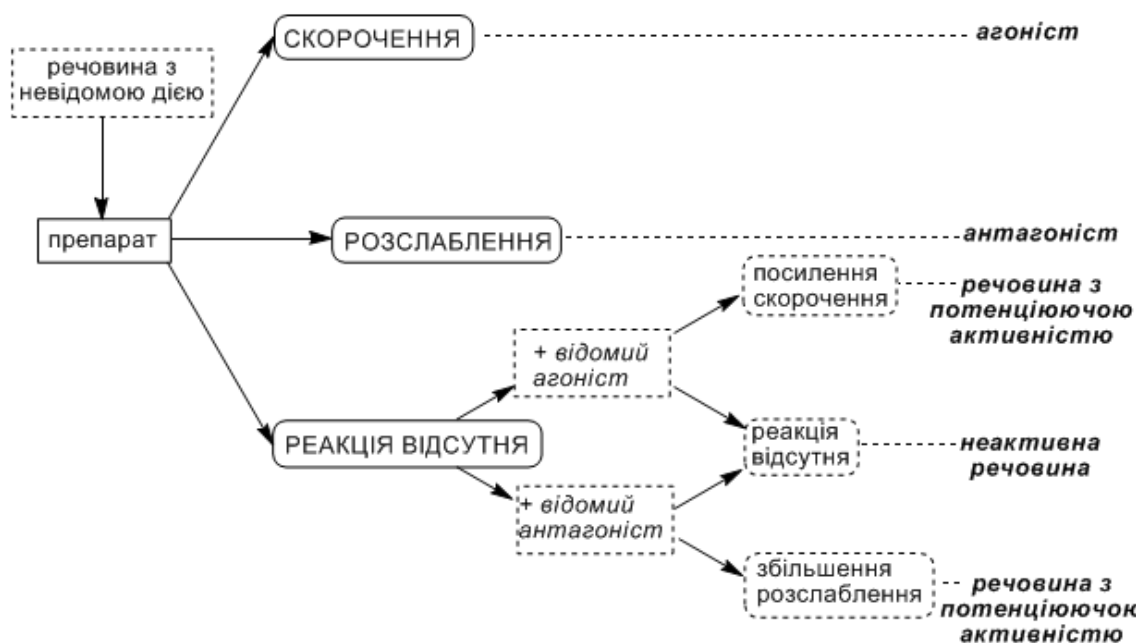


Рис.6. Схема експериментів по вивченню особливостей дії невідомої речовини на скоротливу активність гладеньких м'язів кишечника.

Табл.2 Ефективні субмаксимальні концентрації деяких агоністів і їх антагоністів для препаратів гладеньких м'язів кишечника

Агоніст		Антагоніст	
Речовина	Концентрація, моль/л	Речовина	Концентрація, моль/л
Ацетилхолін	$5 \cdot 10^{-6}$	Атропін	$5 \cdot 10^{-8}$
Гістамін	$5 \cdot 10^{-6}$	Мепірамін	$5 \cdot 10^{-8}$
Серотонін	$5 \cdot 10^{-6}$	Метисергід	$2 \cdot 10^{-7}$
Нікотин	$1 \cdot 10^{-6}$	Гексаметоній	$1 \cdot 10^{-6}$

Існує декілька підходів до з'ясування агоністичної та антагоністичної дії хімічних сполук. Найбільш простий спосіб виявити агоністичні властивості певної речовини – вплив цієї речовиною на м'яз без додавання яких-небудь інших речовин. Про можливі антагоністичні якості хімічної речовини свідчить такий тест: початково варто подіяти на м'язовий препарат досліджуваною речовиною, а потім до системи додати агоніст. У випадку, коли типова дія агоніста за цих умов буде пригнічена, є підстави далі досліджувати речовину для підтвердження її властивостей антагоніста.

При дослідженні дії невідомої речовини на ГМП зазвичай використовують різні способи збільшення концентрацій: зазвичай концентрації підвищують на 10 (10, 20, 30 і далі), у два рази (1, 2, 4, 8 і далі) або логарифмічно (1, 3, 10 і далі). При побудові залежностей концентрація-ефект краще використовувати останній спосіб збільшення концентрацій речовини.

Зазвичай також використовують різний час експозиції досліджуваної речовини у ванночці з ГМП. Умовно за часом експозиції можна поділити на короткотривалу (близько 30 с) та довготривалу (від 2 хвилин і більше). Перевагою короткотривалого режиму експозиції агоніста є можливість його повторного внесення через короткі проміжки часу, внаслідок чого не встигають виникати спонтанні скорочення. Уникання спонтанної скоротливої

активності ГМП може мати значну важливість (так, за необхідності препарати охолоджують зниженням температури омиваючого розчину). У випадку коротко часової експозиції єдиним параметром, який можна зареєструвати, є амплітуда скорочення. При тривалій експозиції дослідник має змогу розглядати кінетичні характеристики скоротливих відповідей і внаслідок цього отримувати максимальну кількість інформації про процес скорочення. Однак, режим тривалої експозиції передбачає тривалий час відмивання ГМП від діючого агоніста для відновлення скорочень з постійними параметрами (дозволене варіювання не повинно перевищувати 2,5%).

Дослідження речовини з невідомою дією на гладенькі м'язи. Як уже згадувалось, невідома хімічна сполука, яка гіпотетично справляє вплив на гладенькі м'язи, може виявитись агоністом, антагоністом або речовиною, що потенціює вплив інших речовин.

У тому випадку, коли речовина викликає скорочення ГМП, її можна класифікувати як агоніст. При виборі концентрації речовини варто обмежуватись концентраціями не вище $2 \cdot 10^{-5}$ М; вищі концентрації речовин часто справляють пошкоджуючу дію на препарат. Тестом на те, що препарат зазнав пошкодження, є нездатність відновити скоротливі відповіді з постійною амплітудою. Як згадувалось вище, в нормі розкид амплітуди не повинен перевищувати 2,5%. Коли речовина у концентрації $2 \cdot 10^{-5}$ М не викликає скорочення, її не можна вважати агоністом. Коли ГМП скорочується, по-перше, досліджують ефективність впливу речовини, будуючи криву концентрація-ефект, і, по-друге, проводячи досліди з відомими антагоністами окремих типів рецепторів визначають механізм дії речовини. Але коли для активації ГМП треба використовувати високу концентрацію речовини, її ефект ймовірніше за все є неспецифічним (одне з виключень – кофеїн, який активує р'янодин-чутливі Ca^{2+} -канали ендо(сарко)плазматичного ретикулуму в концентраціях понад 10 мМ). Коли результати експериментів з використанням антагоністів після дії агоніста на

фоні дії антагоніста співпадають, можна вважати, що речовина володіє тим же механізмом дії, що і використаний стандартний агоніст.

Тестування агоністичної дії. Наведемо типову схему експериментів, які дозволяють довести приналежність невідомих фармакологічних речовин до агоністів певних рецепторів (на прикладі мускаринових холінорецепторів) (табл. 3 і 4).

Тестування антагоністичної дії. Коли досліджувана речовина не викликає скорочення ГМП, наступний етапом є з'ясування, чи не є вона антагоністом до якихось рецепторів. Як і у випадку попередніх експериментів, порівняння можливого антагоністичного ефекту проводять, використовуючи відомі антагоністи (табл. 5 і 6). Коли у процесі експериментів припускається антагонізм невідомої речовини, варто будувати криву концентрація-ефект.

Найчастіше, хоча речовина і впливає на скоротливу активність, її не можна віднести до агоністів або антагоністів певних рецепторів. У цьому випадку (залежно від хімічних властивостей речовини та здатності перетинати плазматичну мембрану) припускають, що ця сполука впливає на сигнальні шляхи проведення збудження або гальмування, або на іонні канали чи системи активного транспорту іонів.

Тестування потенціюючої дії. Розглянемо алгоритм дослідження потенціюючої (відносно інших сполук з відомим механізмом дії) активності невідомої речовини. Перед початком безпосереднього дослідження впливу невідомої речовини проводять реєстрацію скоротливої відповіді м'язового препарату на відомий агоніст, повторюючи етапи додавання агоніста і відмивання препарату від нього (як показано в табл.3) до забезпечення гарного відтворення скорочень з постійними параметрами (надалі приймається за контроль). Після відмивання агоніста, у омиваючий розчин додають досліджувану речовину в концентрації, що не перевищує $1 \cdot 10^{-5}$ М. Потім, не відмиваючи препарат додають той самий агоніст, ефект якого уже реєстрували на даному ГМП, і спостерігають, чи не змінилась амплітуда

Табл. 3 *Схема експерименту по дослідженню речовини, яка володіє агоністичною дією (наприклад, до холінорецепторів) із застосуванням короткотривалої експозиції*

Час від початку експерименту, хв.	Тривалість, хв.	Процедура	Реакція	Цикл експерименту
Підготовчий цикл: препарат помістити в камеру, надати необхідного навантаження і залишити у стані спокою на 45-60 хв.				
0	0,5	Додати ацетилхолін (АХ) і експонувати	Субмаксимальне скорочення	I
	4	Відмивання	Розслаблення препарату до базального рівня	
4,5	0,5	Додати АХ і експонувати	Субмаксимальне скорочення (така ж амплітуда, як і у циклі I)	II
	4	Відмивання	Розслаблення препарату до базального рівня	
9	Повторити один або два рази (при необхідності повторити більше) цикл II			
13,5	0,5	Додати досліджувану речовину (X)	Скорочення ГМП	III
	4	Відмивання	Розслаблення препарату до базального рівня	
18	4,5	Повторити цикл II	Така ж амплітуда скорочення, як і в циклах I і II	IV
22,5	4,5	Повторити цикл III, збільшивши або зменшивши концентрацію X	Амплітуда скорочення змінюється пропорційно до концентрації X	V
27	4,5	Повторити цикл II	Така ж амплітуда скорочення, як і в циклах I і II	VI
31,5	Продовжувати дослідження з різними концентраціями речовини X, чергуючи цикли V та VI			

Табл. 4 *Схема експерименту по дослідженню речовини X, яка володіє агоністичною активністю, із застосуванням тривалої експозиції*

Час від початку експерименту, хв.	Тривалість, хв.	Процедура	Реакція	Цикл експерименту
Підготовчий етап: препарат помістити в камеру, надати йому необхідного навантаження і залишити на 45-60 хв.				
0	2	Додати ацетилхолін (АХ) і експонувати	Субмаксимальне скорочення, кінцева величина скорочення - субмаксимальна	I
	6	Відмивання	Розслаблення препарату до базального рівня	
8	2	Додати АХ і експонувати	Субмаксимальне скорочення (така ж амплітуда, як і у циклі I)	II
	6	Відмивання	Розслаблення препарату до базального рівня	
16	2	Додати досліджувану речовину (X)	Скорочення ГМП	III
	6	Відмивання	Розслаблення препарату до базального рівня	
24	8	Повторити цикл II	Така ж амплітуда скорочення, як і в циклах I і II	IV
32	8	Повторити цикл III, збільшивши або зменшивши концентрацію X	Амплітуда скорочення змінюється пропорційно до концентрації X	V
40	8	Повторити цикл II	Така ж амплітуда скорочення, як і в циклах I і II	VI
48	Продовжувати дослідження з різними концентраціями речовини X, чергуючи цикли V та VI			

Табл.5 Схема експерименту по дослідженню речовини У, яка володіє антагоністичною дією, за умови застосування короткої експозиції.

Час від початку експерименту, хв.	Тривалість, хв.	Процедура	Реакція	Цикл експерименту
Попередній етап: необхідно помістити препарат у камеру, надати йому необхідного навантаження і залишити на 45-60 хв.				
0	0,5	Додати ацетилхолін (АХ), і експонувати АХ	Субмаксимальне скорочення	I
	4	відмивання	Розслаблення препарату до базального рівня	
4,5	0,5	Додати ацетилхолін (АХ), і експонувати АХ	Субмаксимальне скорочення (така ж амплітуда, як і у циклі I)	II
	4	Відмивання	Розслаблення препарату до базального рівня	
9	Повторити один або два рази (при необхідності повторити більше) цикл II			
13,5	0,5	Додати атропін	Напруження препарату зберігається на базальному рівні	III
	0,5	Додати АХ	Амплітуда скорочення значно менша, ніж у випадку циклів I і II	
	4	Відмивання	Розслаблення препарату до базального рівня	
18,5	4,5	Повторювати цикл II доти, поки амплітуда скорочення не відтворить амплітуду циклів I та II	Така ж амплітуда скорочення, як і в циклах I і II	IV
23	0,5	Додати речовину У	Напруження препарату зберігається на базальному рівні	V
	0,5	Додати АХ	Амплітуда скорочення менша, ніж у циклах I та II, і, можливо, менша, ніж у циклі III	
	4	Відмивання	Розслаблення препарату до базального рівня	
28	4,5	Повторювати цикл II до тих пір, доки амплітуда скорочення не відтворить амплітуду циклів I та II	Така ж амплітуда скорочення, як і в циклах I і II	VI
32,5	Продовжувати дослідження з різними концентраціями речовини Х, чергуючи цикли V та VI, але кількість скорочень не повинна перевищувати 10.			

Табл. 6 *Схема експерименту по дослідженню речовини У, яка володіє антагоністичною дією, за умови застосування довготривалої експозиції (на прикладі атропіну, який володіє антагоністичною активністю відносно мускаринових холінорецепторів)*

Час від початку експерименту, хв.	Тривалість, хв.	Процедура	Реакція	Цикл експерименту
Попередній етап: необхідно помістити препарат у камеру, надати йому необхідного навантаження і залишити на 45-60 хв.				
0	2	Додати ацетилхолін (АХ), і експонувати	Субмаксимальне скорочення	I
	6	відмивання	Розслаблення препарату до базального рівня	
8	2	Додати ацетилхолін (АХ), і експонувати	Субмаксимальне скорочення (така ж амплітуда, як і у циклі I)	II
	6	Відмивання	Розслаблення препарату до базального рівня	
16	Повторити один або два рази (при необхідності повторити більше) цикл II			
24	2	Додати атропін	Напруження препарату зберігається на базальному рівні	III
	2	Додати АХ	Амплітуда скорочення значно менша, ніж у випадку циклів I і II	
	6	Відмивання	Розслаблення препарату до базального рівня	
34	8	Повторювати цикл II доти, поки амплітуда скорочення не відтворить амплітуду циклів I та II	Така ж амплітуда скорочення, як і в циклах I і II	IV
42	2	Додати речовину У	Напруження препарату зберігається на базальному рівні	V
	2	Додати АХ	Амплітуда скорочення менша, ніж у циклах I та II, і, можливо, менша, ніж у циклі III	
	6	Відмивання	Розслаблення препарату до базального рівня	
52	8	Повторювати цикл II до тих пір, доки амплітуда скорочення не відтворить амплітуду циклів I та II	Така ж амплітуда скорочення, як і в циклах I і II	VI
60	Продовжувати дослідження з різними концентраціями речовини У, чергуючи цикли III та IV. Варіювати концентрації антагоніста або досліджуваної речовини У, чергуючи кожний цикл з циклом VI, але кількість скорочень не повинна перевищувати 10.			

скорочення порівняно з контрольною. Коли амплітуда скорочення в присутності досліджуваної речовини збільшилась, необхідно перевірити, чи не був такий ефект помилковим. Для цього треба ретельно тривалий час відмивати препарат і повторити стимулювання чистим агоністом. Коли повторні проби підтвердять підвищення скорочень в присутності відомого агоніста, необхідно повторити аналогічні експерименти з іншими відомими агоністами.

Аналогічним чином тестується також здатність речовин потенціювати дію антагоністів.

Завдання:

1. Використовуючи розчин ацетилхоліну гідрохлориду (АХ, $5 \cdot 10^{-6}$ М/л) та ГКР (80 мМ/л) необхідно зареєструвати скоротливі відповіді ГМП, використовуючи схему експерименту, наведену в табл. 4. Повторюючи аплікування АХ і ГКР, добитись скорочень з постійними параметрами.
2. Використовуючи розчини АХ ($5 \cdot 10^{-6}$ М/л) та атропіну гідрохлориду (АТ, 10^{-6} М/л), дослідити антагоністичну дію атропіну за схемою експерименту, наведеною в табл. 6.

Лабораторна робота 3.

Дослідження фармакологічних властивостей дії агоністів та антагоністів на гладеньком'язові препарати саесит щура: криві концентрація-ефект

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

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

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

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

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

Як для агоністів, так і для антагоністів графіки залежностей концентрація-ефект у напівлогарифмічній шкалі матимуть лінійну ділянку (відповідає значенням 30-70% ефекту) і два нелінійні фрагменти (від 0 до 30% та від 70 до 100% ефекту). Тому для порівняння дії різних речовин зазвичай використовують середню частину графіка. На шкалі графіка позначають п'ять інформативних значень концентрацій (Рис. 7):

- 1) **Мінімальна ефективна концентрація** – це концентрація речовини, яка викликає мінімальне скорочення ГМП.
- 2) **EC₅₀ (середня ефективна концентрація)** – це концентрація речовини, яка викликає скорочення, яке дорівнює половині максимального. Цей показник найчастіше використовують для того, щоб показати фармакологічну активність речовини. Важливим є те, що цей показник знаходиться на лінійній ділянці кривої концентрація-ефект.
- 3) **Субмаксимальна концентрація** – це концентрація речовини, яка викликає скорочення ГМП на рівні 95-99% від максимального. У

дослідах на ізольованих органах дуже важливо знати цю концентрацію, оскільки її перевищення спричиняє незворотне пошкодження препарату.

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

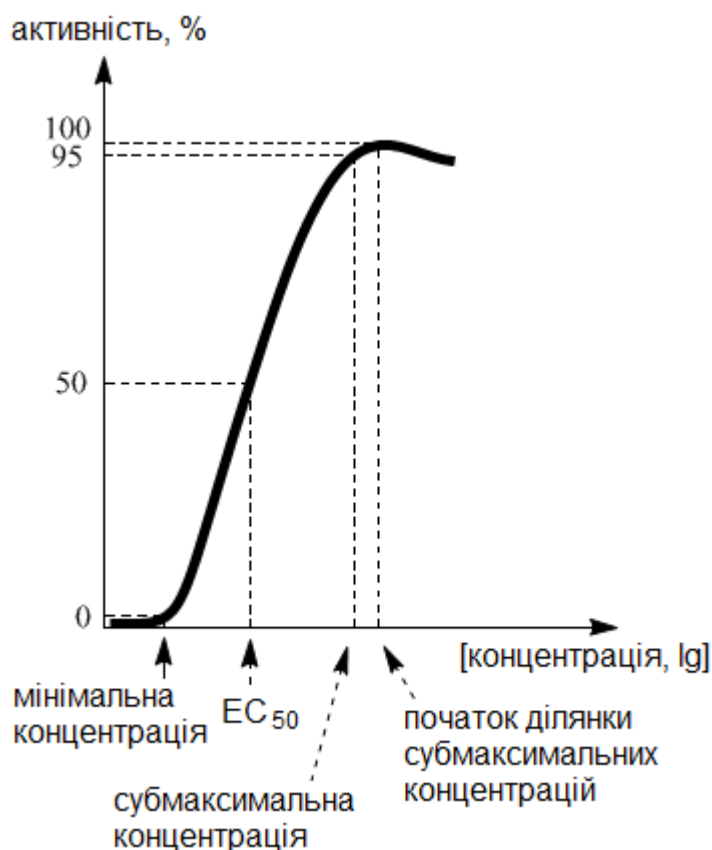


Рис. 7. Схематичне представлення кривої концентрація-ефект.

Отже, найбільш показовою для опису фармакологічних якостей речовини є показник EC_{50} . Але при порівнянні ефекту двох агоністів одного і того ж рецептора варто порівнювати криві концентрація-ефект на усьому діапазоні концентрацій, оскільки кути нахилу цих кривих можуть відрізнятися при однакових значеннях EC_{50} . Також криві концентрація-ефект для агоністів різних рецепторів можуть співпадати, при відмінностях у механізмі дії (ацетилхолін і гістамін). Щоб можна було відрізнити дві речовини, які викликають подібні скоротливі відповіді, використовують специфічні антагоністи. Наприклад, для гістамінових рецепторів селективний

антагоніст мепірамін, для мускаринових холінорецепторів – атропін; атропін також пригнічує скорочення, викликані гістаміном, але у сто разів менш ефективно, ніж мепірамін.

Завдання:

1. Використовуючи розчин АХ, побудуйте залежність концентрація-ефект. Для цього спочатку приготуйте розчини з концентрацією АХ від 10^{-10} до 10^{-2} М. Для визначення скоротливої відповіді використайте основу зі схеми експериментів з короткочасною або тривалою експозицією (Табл. 3 або 4). Відмінність постановки експерименту полягає у тому, що варто починати діяти на препарат мінімальною концентрацією АХ і, відмиваючи АХ після кожного збільшення концентрації, довести концентрацію агоніста до 10^{-2} М (рис. 8). Заповніть таблицю (табл. 7).

Табл. 7. Залежність концентрація-ефект скоротливих відповідей на аплікацію ацетилхоліну (АХ) гладеньком'язових смужок саесит щурів.

Концентрація АХ, М	Скоротлива відповідь, зареєстрована у ізометричному режимі, мН	Активність, %
10^{-8}		
$5 \cdot 10^{-8}$		
10^{-7}		
..
10^{-3}		

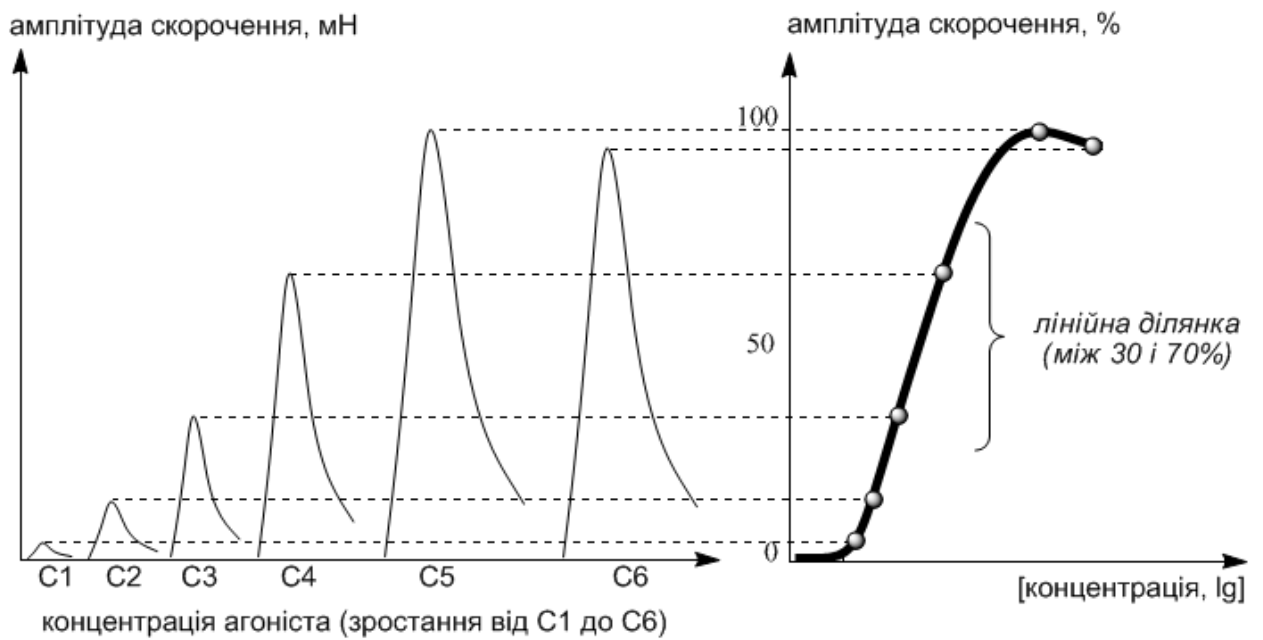


Рис. 8. Побудова кривої конентрація-ефект для агоніста. Зліва від цієї кривої схематично показано скоротливі відповіді на аплікацію зростаючих (від C1 до C6) концентрацій агоніста. Права частина рисунка схематично зображає залежність концентрація-ефект, де відповідні амплітуди скорочень переведені у % відносно субмаксимальної концентрації і показані точками.

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

Заповніть таблицю (табл. 8).

Табл. 8. Залежність концентрація-ефект ацетилхолін-викликаних (10^{-5} моль/л) скоротливих відповідей на аплікацію атропіну (АТ) гладеньком'язових смужок саесит щурів:

Концентрація АХ, М	Скоротлива відповідь, зареєстрована у ізометричному режимі, мН	Активність, %
10^{-9}		
$5 \cdot 10^{-9}$		
10^{-8}		
..
10^{-5}		

Принцип побудови залежності концентрація-ефект у цьому випадку реалізується за алгоритмом, зображеним на рис. 8.

Лабораторна робота 4.

Дослідження кінетичних властивостей скоротливих відповідей гладеньком'язових препаратів

Як можна було помітити, ізометричне скорочення гладеньких м'язів (спонтанне чи викликане), якщо його розглядати як дві окремі фрагменти (до максимального значення і після) має дві точки з максимальною швидкістю. Називатимемо фрагмент скоротливої відповіді від початку розвитку скорочення до максимального значення сили фазою скорочення. Відповідно, інша частина скоротливої відповіді отримає назву фаза розслаблення (рис. 9).

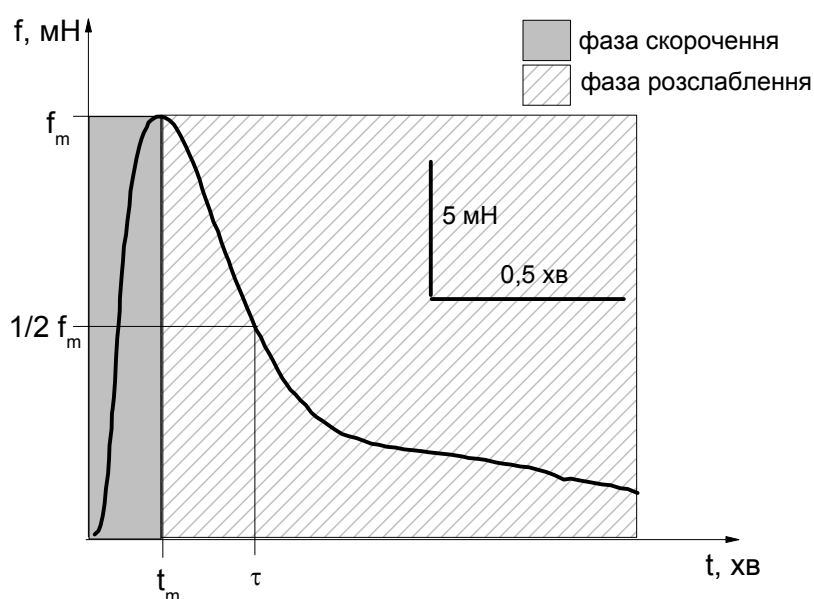


Рис. 9. Умовний поділ скоротливої відповіді на фази скорочення та розслаблення. Границя поділу – максимальне скорочення (f_m), яке спостерігається в час t_m . Також на графіку показаний характеристичний час τ , при якому сила скорочення досягає напівмаксимального значення ($1/2f_m$).

Тоді можна сказати, що і фаза скорочення, і фаза розслаблення являють собою S-подібні криві, які математично можна описати загальною формулою:

$$f = f_m \frac{\tau^n}{\tau^n + t^n} \quad (1)$$

де: f – миттєва (в момент часу t) сила

f_m – максимальна сила

τ – характеристичний час ($f = 0,5 f_m$)

n – логарифмічний коефіцієнт крутизни механокінетичної кривої

Для фаз скорочення і розслаблення, ця формула матиме вигляд відповідно:

$$f_c = f_m \frac{\tau_c^{n_c}}{\tau_c^{n_c} + t_c^{n_c}} \quad \text{та} \quad f_r = f_m \frac{\tau_r^{n_r}}{\tau_r^{n_r} + t_r^{n_r}}$$

З метою спрощення процедури аналізу лінеаризуємо рівняння (1):

$$\frac{f}{f_m} = \frac{\tau^n}{\tau^n + t^n}$$

$$\ln\left(\frac{f_m - f}{f}\right) = -n \ln \tau + n \ln t \quad (2).$$

Маємо лінійну залежність між лівою частиною рівняння (2) та $\ln(t)$ (Рис. 10).

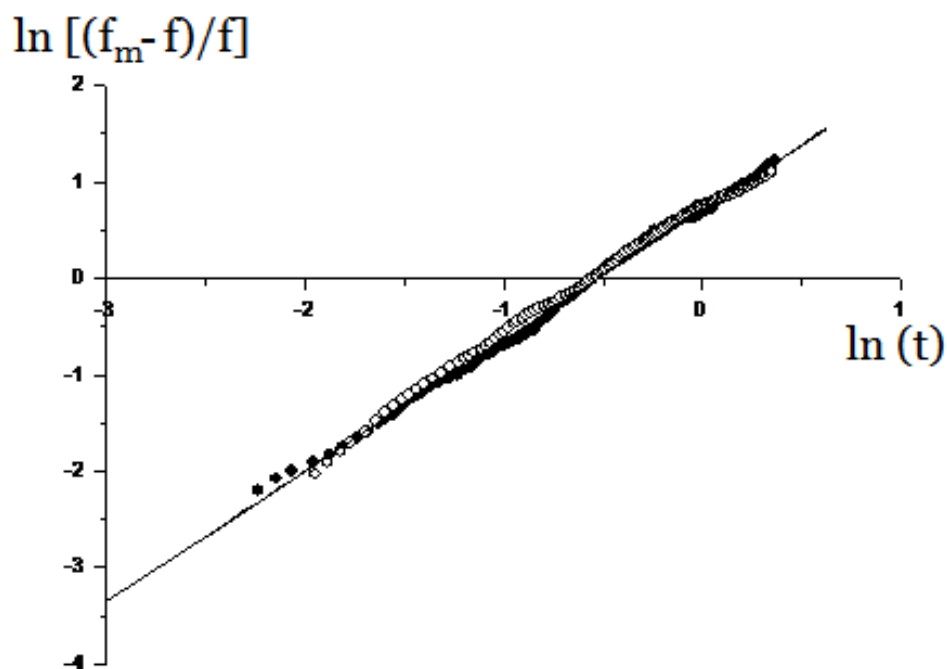


Рис. 10. Приклад лінеаризації окремої фази розслаблення в координатах $\{ \ln [(f_m - f)/f] ; \ln(t) \}$.

З графіка, відповідно до рівняння (2), визначаємо коефіцієнт n :

$$n = \pm d \left[\ln \left(\frac{f_m - f}{f} \right) \right] / d \ln t \quad (3)$$

де знак у правій частині залежить від того, лінеаризація якої частини механокінетичної кривої здійснюється: «+» для фази розслаблення та «-» для фази скорочення.

Характеристичний час τ легко визначити з лінеаризованої кривої (Рис. 7) як точку перетину графіка з віссю абсцис.

Відповідно до вихідного рівняння (1), миттєва швидкість процесу розслаблення розраховуватиметься як:

$$v = -\frac{df}{dt} = f_m \frac{n \cdot \tau^n \cdot t^{n-1}}{(\tau^n + t^n)^2} \quad (4)$$

Кінетичний аналіз проводиться для встановлення кількісних показників, за допомогою яких можна було б здійснювати адекватне порівняння однієї вибірки або різних вибірок даних, навіть якщо вони напрацьовані різними дослідниками на препаратах, які мають неоднакові розміри і які одержані від різних тварин. У даному випадку ключовим розрахунковим критерієм є нормована (відносно максимальної сили скорочення) максимальна швидкість. Цей параметр визначають окремо для фаз скорочення та розслаблення.

Максимальна швидкість пов'язана з показниками n , f_m і τ за формулою (5):

$$V = \frac{f_m}{\tau} \frac{(n-1)^{\frac{n-1}{n}} \cdot (n+1)^{\frac{n+1}{n}}}{4n} \quad (5)$$

Відповідно, поділивши цей показник на максимальну силу скоротливої відповіді ($V_n = V/f_m$), одержимо нормовану максимальну швидкість (6):

$$V_n = \pm \frac{1}{f_m} \frac{df}{dt} = \left| -\frac{(n-1)^{\frac{n-1}{n}} \cdot (n+1)^{\frac{n+1}{n}}}{4n\tau} \right|, \quad (6)$$

де знак у правій частині залежить від того, аналіз якої частини

механокінетичної кривої здійснюється: «+» для фази розслаблення та «-» для фази скорочення.

Завдання:

1. Здійсніть реєстрацію АХ-викликаних скорочень (концентрації АХ 0,1 мкМ, 1 мкМ та 10 мкМ). Відповідно до рівняння (2) лінеаризуйте окремо фази скорочень та розслаблень цих скоротливих відповідей. Побудуйте два графіки: на першому зобразіть три лінійні залежності фаз скорочення для трьох концентрацій АХ, а на другому – відповідні графіки для фаз розслаблення. З лінеаризованих графіків знайдіть значення коефіцієнтів n і τ (для кожної концентрації АХ). Розрахуйте показники нормованих максимальних швидкостей V_n по кожній парі коефіцієнтів n і τ . Зробіть висновки щодо одержаних значень нормованих максимальних швидкостей.
2. Здійсніть реєстрацію АХ-викликаних скорочень (концентрація АХ 1 мкМ) при двох температурах 37 та 27°C. Відповідно до рівняння (2) лінеаризуйте окремо фази скорочень та розслаблень цих скоротливих відповідей. Побудуйте два графіки: на першому зобразіть лінійні залежності фаз скорочення, а на другому – відповідні графіки для фаз розслаблення. З лінеаризованих графіків знайдіть значення коефіцієнтів n і τ . Розрахуйте показники нормованих максимальних швидкостей V_n по кожній парі коефіцієнтів n і τ . Зробіть висновки щодо чутливості значень нормованих максимальних швидкостей до впливу на м'язи фізико-хімічних факторів.

Перелік скорочень

АХ	- ацетилхолін
ГМП	- гладеньком'язовий препарат
НРК	- нормальний розчин Кребса
НБР	- номінально безкальцієвий розчин
ГКР	- гіперкалієвий розчин

Список рекомендованої літератури

1. Клевець М.Ю. Фізіологія людини і тварин. Книга 1. Фізіологія нервової, м'язової і сенсорних систем: Навчальний посібник. – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2012. – 312 с.
2. Клевець М.Ю., Манько В.В. Фізіологія людини і тварин. Книга 2. Фізіологія вісцеральних систем: Навчальний посібник. – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2002. – 233 с.
3. Давидовська Т.Л., Цимбалюк О.В., Грабчук Г.П. Войтешенко І.С. Нипорко О.Ю., Федоренко Т.В. Науменко А.М. Латишенко Л.А. Фізика біосистем у формулах, термінах, схемах. Київ, Видавництво ЦП "КОМПРИНТ" 2017 р., 210 с.
4. Фізіологія. За ред. В.Г.Шевчука. Навчальний посібник. Вінниця: Нова книга. 2005. – 564 с.
5. Seeley's essential of anatomy & physiology, 8th edition, McGraw-Hill Education, 2016, 690 p.

Зміст

1	Будова і фізіологічні властивості гладеньких м'язів	3
2	Дослідження скорочувальної активності гладеньких м'язів	7
	Лабораторна робота 1. Реєстрація спонтанних і викликаних скорочень на прикладі гладеньких м'язів саесум щурів	10
	Лабораторна робота 2. Дослідження дії невідомої речовини на гладенькі м'язи саесум щурів	16
	Лабораторна робота 3. Дослідження фармакологічних властивостей дії агоністів та антагоністів на гладеньком'язові препарати саесум щура: криві концентрація-ефект	24
	Лабораторна робота 4. Дослідження кінетичних властивостей скоротливих відповідей гладеньком'язових препаратів	31
	Перелік скорочень	35
	Список рекомендованої літератури	36