

Національний Технічний Університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Фізико-технічний інститут
Кафедра прикладної фізики

Рівень вищої освіти — перший (бакалаврський)
Спеціальність 105 «Прикладна фізика та наноматеріали»

«ЗАТВЕРДЖЕНО»

Завідувач кафедри

Монастирський. Г. Є.

(підпис)

(ініціали, прізвище)

« » _____ 2025 р.

ЗАВДАННЯ

на бакалаврську роботу студенту

Богдановій Тетяна Віталіївні

(прізвище, ім'я, по батькові)

(підпис)

- Тема роботи: Функціональні відповіді на нікотин у клітинах не нейрональної природи,
науковий керівник роботи _____ ст. викл., к.ф.-м.н. Катасонов А. А. _____,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
- затверджені наказом по університету від «26» травня 2025 р № 1761-с
- Термін подання студентом роботи « 10 » _____ червня _____ 2025 р.
- Об'єкт дослідження: Клітини не нейронального походження, зокрема гладеньком'язові клітини дихальних шляхів, здатні реагувати на дію нікотину шляхом активації нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChRs).
- Предмет дослідження: функціональна відповідь гладеньком'язових клітин дихальних шляхів (не нейронального походження) на фармакологічну стимуляцію нікотином та її модифікація за участю гексаметонію як блокатора нікотинових ацетилхолінових рецепторів.
- Перелік завдань, які потрібно розробити:
- Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу: презентація — 15 аркушів А4

7 Орієнтовний перелік публікацій: Біологічні механізми взаємодії нікотину з клітинами

8 Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
2	акад. НАН України, д.б.н., Шуба Я. М.		
3	м.н.с. Інституту фізіології Кравчук Д. І.		

9 Дата видачі завдання: 12.09.2024

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1.	Опрацювання літератури за темою	13.09.2024 - 30.10.2024	
2.	Написання літературного огляду	01.11.2024 - 27.12.2024	
3.	Проведення експериментів з тензометрії	20.01.2025 - 18.03.2025	
4.	Написання другої частини дипломної роботи	19.03.2025 - 01.05.2025	
5.	Підготовка тез	02.05.2025 - 13.05.2025	
5.	Виступ на конференції	14.05.2025	
6.	Написання третьої частини дипломної роботи	15.05.2025 - 15.06.2025	
7.	Написання висновків	16.06.2025 - 17.06.2025	
8.	Подання роботи на рецензування	17.06.2025	
9.	Підготовка доповіді та презентації	07.06.2025 - 17.06.2025	
10.	Подання роботи до захисту	18.06.2025	

Студент

_____ (підпис)

Т. В. Богданова

_____ (ініціали, прізвище)

Науковий керівник роботи

_____ (підпис)

А. А. Катасонов

_____ (ініціали, прізвище)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка дипломної роботи за обсягом становить 47 сторінки, містить 5 таблиці та 15 рисунків. Для дослідження було використано 30 бібліографічних найменувань. ”

Метою дослідження було з'ясування функціональної активності нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChRs) у клітинах не нейронального походження, зокрема в гладеньком'язових клітинах трахеї. Особливу увагу приділено вивченню впливу нікотину на скоротливу активність гладеньком'язової тканини та потенційної ролі nAChRs у регуляції механічних реакцій дихальних шляхів.

Для аналізу використовували метод ізотонічної тензометрії з вимірюванням сили натягу в кільцях трахеї тримісячних щурів лінії Wistar. Кільця стабілізували у фізіологічному розчині Кребса з подачею карбогену та фіксованим початковим натягом 2 г.с. Реєстрація змін натягу здійснювалася за допомогою тензодатчика, з'єданого з аналого-цифровим перетворювачем і програмним забезпеченням Clampfit. Отримані дані обробляли, переводячи напругу у Ньютони, а реакції нормували на відповідь, індуковану калій хлоридом (KCl), який використовувався як еталон.

У досліді оцінювали відповідь тканини на нікотин у присутності та за відсутності гексаметонію — неконкурентного блокатора nAChRs. Встановлено, що нікотин викликає значне скорочення тканини, яке блокується гексаметонієм, що свідчить про залучення специфічних рецепторів до механізму дії. Аналіз амплітуд показав варіабельність реакцій між окремими зразками, однак загальна тенденція вказує на наявність функціонально активних nAChRs у гладеньком'язових клітинах.

Отримані результати підтверджують гіпотезу про неканонічну роль нікотинових рецепторів у тканинах, що не належать до нервової системи. Це розширює уявлення про молекулярні механізми дії нікотину і може мати значе-

ння для розуміння його системного впливу на організм, включно з потенційною участю в патологічних процесах, таких як запалення або пухлинна прогресія.

Ключові слова: *нікотин, нікотинові ацетилхолінові рецептори, нейрональні клітини, гладенькі м'язи дихальних шляхів, ізотонічна тензометрія, трахеальні кільця, гексаметоній, фармакологічна відповідь, ex vivo модель, механічне скорочення.*

SUMMARY

The diploma work explanatory note includes 47 pages of the text, 5 tables and 15 illustrations. At the problem modern state analysis, overall 30 references were used.

The aim of this study was to investigate the functional activity of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in non-neuronal cells, specifically in smooth muscle cells of the trachea. Special attention was paid to the effects of nicotine on the contractile behavior of airway smooth muscle and the potential role of nAChRs in modulating mechanical responses in non-neuronal tissues.

An *ex vivo* model based on tracheal rings from three-month-old Wistar rats was used. The contractile responses were recorded using isotonic tensometry under constant initial preload (2 grams of force). Tissue samples were maintained in a physiological Krebs solution, oxygenated with carbogen, and mounted in a tension-measuring chamber. A force transducer connected to an analog-to-digital converter and Clampfit software was used to record the changes in muscle tone. Voltage signals were converted to Newtons and normalized to the response induced by potassium chloride (KCl), used as a positive reference.

The tissue responses to nicotine were assessed in the presence and absence of hexamethonium, a noncompetitive antagonist of nAChRs. Nicotine induced robust contractions that were significantly reduced or completely abolished by hexamethonium, indicating a receptor-mediated mechanism of action. While inter-sample variability was observed, the overall trend confirmed the presence of functional nAChRs in airway smooth muscle.

These findings support the hypothesis of non-canonical roles of nAChRs in non-neuronal tissues. The results expand current understanding of the systemic

effects of nicotine and suggest possible involvement in pathophysiological processes such as inflammation or tumor progression.

Keywords: *nicotine, nicotinic acetylcholine receptors, non-neuronal cells, airway smooth muscle, isotonic tensometry, tracheal rings, hexamethonium, pharmacological response, ex vivo model, mechanical contraction.*

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Теоретичні основи дослідження	7
1.1. Нікотин: структура та біологічна активність	7
1.2. Нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChRs)	8
1.3. Гладенькі м'язи дихальних шляхів як модель для фармакологічного дослідження	11
1.4. Гексаметоній як гангліоблокатор і інструментальний блокатор nAChRs	14
1.5. Вплив нікотину на гладенькі м'язи дихальних шляхів та його фармакологічне блокування	16
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи	19
2.1. Об'єкти дослідження	19
2.2. Устаткування та інструменти	21
2.3. Протокол експерименту	23
2.4. Метод тензометрії у дослідженні механічних властивостей клітин	25
РОЗДІЛ 3. Оцінка результатів тензометричного експерименту	28
3.1. Візуалізація експериментальних результатів	28
3.2. Кількісний аналіз отриманих даних	34
3.3. Порівняння з літературними даними	40
3.4. Біологічне значення та інтерпретація	40
ВИСНОВКИ.	42
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	43

ВСТУП

Сучасна біомедична наука дедалі більше зосереджується на вивченні міжсистемної взаємодії та неканонічних механізмів клітинної відповіді на біологічно активні речовини. Однією з таких речовин є нікотин — природний алкалоїд, що міститься в листі тютюну й відомий своїми психоактивними властивостями. Протягом останніх десятиліть він перебуває в центрі уваги дослідників не лише як компонент тютюнових виробів, а й як ліганд нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChRs) — специфічних білкових структур, що опосередковують широкий спектр фізіологічних ефектів.

Традиційно nAChRs розглядалися виключно як нейрональні мішені, зосереджуючи дослідження на їхній ролі в центральній і периферичній нервовій системі. Проте, завдяки розвитку методів клітинної та молекулярної біології, було встановлено, що ці рецептори експресуються не лише в нейронах, а й у клітинах не нейронального походження — таких як епітеліальні, ендотеліальні, імунні та гладеньком'язові клітини. Активація nAChRs у таких клітинах може запускати каскади внутрішньоклітинної сигналізації, що впливають на рівень іонів кальцію, проліферацію, секрецію або запальні процеси.

Актуальність цієї теми зумовлена також зміною парадигми сприйняття нікотину: від нейротропного токсиканта до потенційного модулятора клітинної активності в різних типах тканин. Таке переосмислення відкриває перспективи як для фундаментальних досліджень, так і для клінічної медицини, зокрема в контексті оцінки ризиків при хронічному впливі нікотину на дихальні шляхи, слизові оболонки та імунну систему.

Однією з ключових проблем при дослідженні функціональної активності nAChRs у не нейрональних клітинах є вибір адекватного методу. Більшість класичних підходів, зокрема метод patch-clamp, фокусуються на вимірюванні електричної активності окремих клітин. Однак для вивчення інтегрованої

відповіді тканинного рівня, яка поєднує вплив нікотину на цілісні біологічні структури, доцільним є застосування методу тензометрії.

Тензометрія — це метод реєстрації змін скоротливої активності тканин у відповідь на фізіологічні або фармакологічні впливи. У цьому дослідженні тензометрія використовується для оцінки реакції мультиклітинних препаратів трахеї на введення нікотину. Такий підхід дозволяє не лише підтвердити наявність функціонально активних nAChRs у клітинах гладеньких м'язів дихальних шляхів, а й оцінити реальні фізіологічні наслідки активації цих рецепторів, включаючи зміни тонуусу тканини.

Таким чином, метою даної роботи є виявлення функціонально активних нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChRs) у клітинах не нейронального походження та оцінка їх ролі у формуванні фізіологічної відповіді на дію нікотину, зокрема у вигляді змін скоротливої активності тканин. Особливу увагу приділено використанню методу тензометрії як інструменту для реєстрації інтегрованої механічної реакції на рівні мультиклітинних препаратів.

Отримані результати можуть збагатити сучасне уявлення про позанейрональні ефекти нікотину та розширити перелік його мішеней у людському організмі. Це, своєю чергою, має потенційне значення для розробки нових підходів у токсикології, фармакології та профілактичній медицині, а також для кращого розуміння механізмів хронічного ураження тканин унаслідок тривалого впливу нікотину.

РОЗДІЛ 1.

ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ ДОСЛІДЖЕННЯ

1.1. Нікотин: структура та біологічна активність

Нікотин ($C_{10}H_{14}N_2$) є алкалоїдом рослинного походження, що природно міститься в представниках родини Solanaceae, зокрема у листі тютюну (*Nicotiana tabacum*). Біосинтез нікотину відбувається в корені рослини, а накопичення відбувається у листках. З точки зору рослини, нікотин виконує функцію захисного метаболіту — він діє як природний інсектицид, тобто захищає рослину від шкідників [1]. У людини ця сполука проявляє високу біологічну активність завдяки взаємодії з нікотиновими ацетилхоліновими рецепторами (nAChR), що належать до родини лігандзалежних іонних каналів [2].

З хімічної точки зору, нікотин є гетероциклічною сполукою, що складається з двох кілець: піридинового та піролідинового [3]. Піридинове кільце — це шестиатомний ароматичний гетероцикл із атомом нітрогену, подібний за структурою до бензену, що забезпечує електронну стабільність молекули. Піролідинове кільце — п'ятичленне насичене кільце з атомом нітрогену, яке надає молекулі лужні властивості та здатність до утворення водневих зв'язків.

Нікотин є високоліпофільною сполукою, що зумовлено його хімічною структурою. Така властивість дозволяє йому легко долати біологічні мембрани, зокрема гематоенцефалічний бар'єр [3]. Потрапляючи в кровотік, нікотин швидко досягає центральної нервової системи, де взаємодіє з нейрональними нікотиновими ацетилхоліновими рецепторами (nAChRs) [4] і викликає відповідну фізіологічну відповідь. Завдяки своїй здатності до швидкого проникнення в мозок, нікотин накопичується в нервовій тканині, що пояснює як його потужну біологічну активність, так і швидкий початок дії.

Активация nAChR нікотинном супроводжується відкриттям іонного каналу, що дозволяє надходження в клітину іонів натрію (Na^+) та кальцію (Ca^{2+}). Це спричиняє деполяризацію мембрани й ініціює каскад внутрішньоклітинних сигналів, що, зокрема, веде до вивільнення нейромедіаторів (дофаміну, глутамату, норадреналіну тощо) [5]. Саме ці ефекти лежать в основі стимулюючої та адиктивної дії нікотину.

Крім нейронів, nAChR експресуються в багатьох типах не-нейрональних клітин — в епітелії, ендотелії судин, імунних клітинах, кістковій тканині [6]. У таких клітинах вплив нікотину може спричиняти активацію генів, зміну проліферативної активності, апоптозу або продукції прозапальних молекул. Це робить нікотин важливим фактором у патогенезі низки захворювань — від атеросклерозу до раку.

Таким чином, нікотин не є просто речовиною, що формує залежність, а має системний вплив на організм на молекулярному рівні. У наступних розділах буде розглянуто, як саме нікотин взаємодіє з клітинами різних типів, включно з механізмами активації іонних струмів.

1.2. Нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChRs)

Нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChRs) — це трансмембранні білкові комплекси, що належать до родини холінергічних рецепторів, активуються ендогенним нейромедіатором ацетилхоліном або екзогенними сполуками, зокрема нікотинном. Вони забезпечують хімічну передачу сигналів у синапсах та відіграють ключову роль у регуляції збудливості нервової системи, а також у функціонуванні багатьох позанейрональних тканин [5].

На структурному рівні nAChRs являють собою ліганд-керовані іонні канали, що утворюються з п'яти субодиниць, які формують центральну пору для проходження йонів. У людини описано щонайменше сімнадцять типів

субодиниць: десять альфа ($\alpha 1-\alpha 10$), чотири бета ($\beta 1-\beta 4$), а також γ , δ та ε , які можуть поєднуватися у гомо- або гетеропентамери, формуючи рецептори з різною чутливістю та функціональністю [4]. Найбільш дослідженими нейрональними підтипами є гетеропентамер $\alpha 4\beta 2$, що демонструє високу чутливість до нікотину, та гомопентамер $\alpha 7$, який характеризується високою проникністю для кальцію і надзвичайно швидкою десенситизацією.

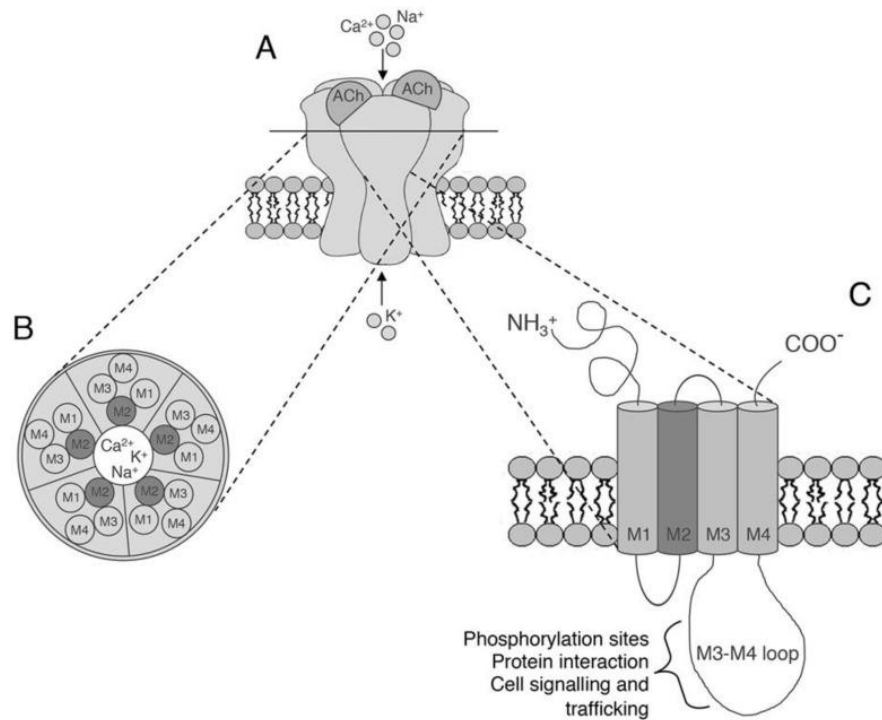


Рис. 1.1. Будова нейронального нікотинного ацетилхолінового рецептора (nAChR). Зверху — пентамерна організація субодиниць, що формують центральну іонну пору; знизу — структура окремої субодиниці з чотирма трансмембранними сегментами (M1–M4) та позаклітинним N-кінцем [7].

У фізіологічних умовах після зв'язування ацетилхоліну з рецептором відбувається конформаційна перебудова білка, що відкриває іонний канал, дозволяючи проникнення катіонів, переважно Na⁺, K⁺ і Ca²⁺, через клітинну мембрану. Це зумовлює деполяризацію, генерацію потенціалу дії, а також запуск низки внутрішньоклітинних сигнальних каскадів [2].

Історично nAChRs асоціювалися переважно з нейрональними клітинами, однак сучасні дані свідчать про їх широку експресію в позанейрональних тканинах, зокрема в епітелії дихальних шляхів, ендотеліальних клітинах, ке-

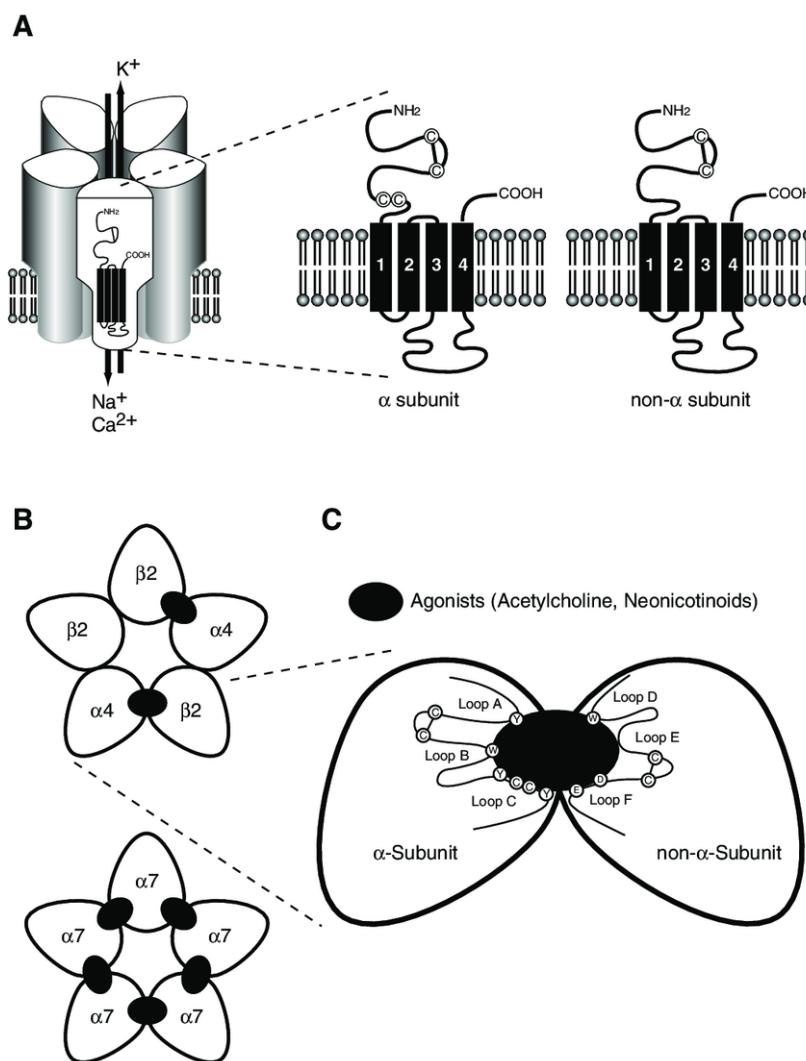


Рис. 1.2. Схематичне зображення механізму активації nAChR: ліганд (ацетилхолін/нікотин) зв'язується з рецептором, спричиняє відкриття іонної пори й забезпечує потік катіонів (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) у клітину [unwin2013schematic].

ратиоцитах, клітинах імунної системи та ендокринних залозах [5]. Особливий інтерес становить рецептор $\alpha 7$, виявлений у клітинах трахеального епітелію як на апікальній, так і на базальній поверхні [8]. Його активація асоціюється з модуляцією секреції слизу, регуляцією проліферації та диференціювання клітин, а також із протизапальними ефектами, що вказує на його важливу роль у підтриманні гомеостазу слизової оболонки дихальних шляхів [9].

Крім того, $\alpha 7$ nAChRs беруть участь у регуляції тонуусу гладеньких м'язів бронхів. Активація цих рецепторів у м'язових клітинах може спричинити бронхоконстрикцію, що має клінічне значення при таких захворюваннях, як бронхіальна астма. У патологічних умовах дисфункція $\alpha 7$ nAChRs пов'язана з

розвитком хронічного запалення, дихальної гіперреактивності та порушенням бар'єрної функції епітелію. Зокрема, у контексті вірусних інфекцій, таких як COVID-19, рецептори цього типу розглядаються як потенційні регулятори імунної відповіді через участь у "холінергічному протизапальному шляху"[10].

Цікаво, що рецептори $\alpha 7$ мають не лише іонотропну, а й метаботропну активність: вони здатні ініціювати сигнальні шляхи без відкриття іонного каналу, що надає їм виняткової функціональної гнучкості [11]. Така подвійна дія розширює діапазон фізіологічних процесів, у яких вони задіяні, і відкриває нові можливості для фармакологічної модуляції [12].

У зв'язку з цим nAChRs, особливо $\alpha 7$, привертають дедалі більшу увагу як потенційні мішені для терапії широкого спектра захворювань — від хронічного запалення й астми до нейродегенеративних патологій. Фармакологічні агенти, що селективно активують $\alpha 7$ nAChRs, зокрема GTS-21 або вареніклін, демонструють перспективні протизапальні та нейропротекторні властивості без характерної для нікотину здатності викликати залежність [13].

GTS-21 (DMXBА) є синтетичним агоністом $\alpha 7$ нікотинних ацетилхолінових рецепторів, який активно вивчається як потенційний засіб при запальних та нейродегенеративних захворюваннях, зокрема хворобі Альцгеймера. Вареніклін, своєю чергою, є частковим агоністом $\alpha 4\beta 2$ і $\alpha 7$ nAChRs, що застосовується у терапії нікотинової залежності, але також виявляє протизапальні ефекти без формування класичної залежності [13].

1.3. Гладенькі м'язи дихальних шляхів як модель для фармакологічного дослідження

Трахея — це елемент провідного відділу дихальної системи, що сполучає гортань із головними бронхами. У щурів, як і в інших ссавців, вона має трубчасту будову, утворену кільцеподібними структурами, які забезпечують

стабільність просвіту та дозволяють тканинам адаптуватися до змін об'єму під час вдиху і видиху.

Будова стінки трахеї включає кілька шарів:

- *слизову оболонку*, вкрита війчастим епітелієм і келихоподібними клітинами, які забезпечують очищення повітря;
- *підслизову основу*, де містяться судини, залози й нервові закінчення;
- *гіаліновий хрящ*, що утворює С-подібні напівкільця для підтримання форми;
- *м'язовий шар* (*m. trachealis*) — пучки гладеньких м'язів, які розташовані в задній стінці трахеї, замикаючи хрящове кільце та забезпечуючи регуляцію просвіту [14; 15].

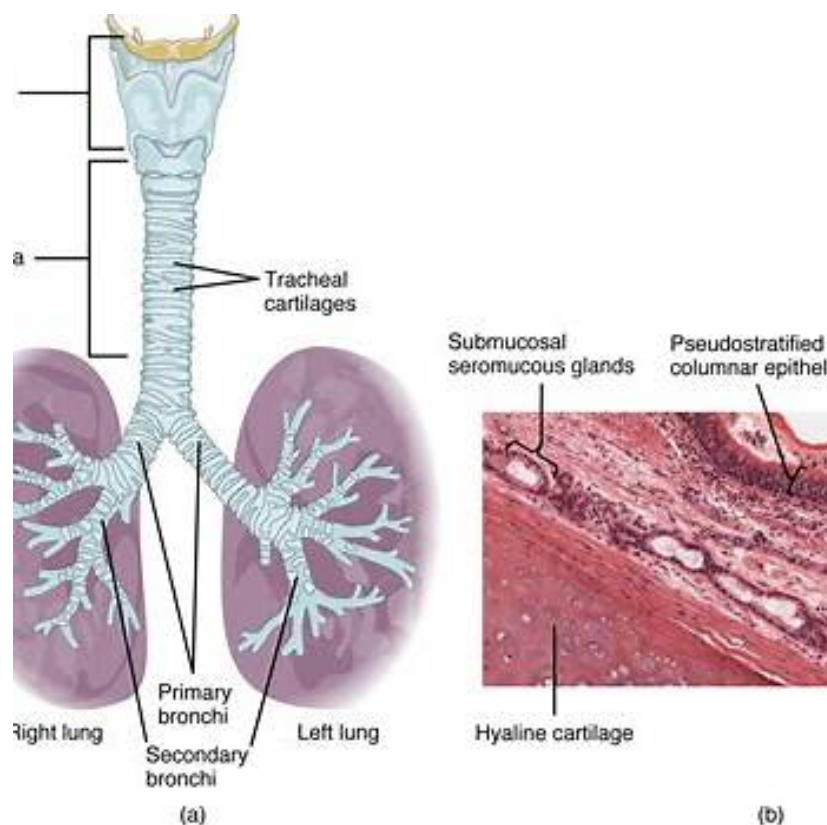


Рис. 1.3. Анатомічна будова трахеї та гістологічна структура її стінки. (а) Загальна схема дихальних шляхів із виділенням трахеї та бронхів. (б) Мікрофотографія стінки трахеї: гіаліновий хрящ, підслизові залози та війчастий епітелій [16].

Функціональна роль гладеньких м'язів дихальних шляхів виходить далеко за межі простої механічної підтримки. Їх скорочення звужує просвіт

трахеї або бронхів, тоді як розслаблення — розширює. Ці м'язи іннервуються парасимпатичною системою та містять численні рецептори, серед яких мускаринові (mAChRs) та нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChRs). Вплив на них медіаторів, як-от ацетилхоліну або нікотину, призводить до активації внутрішньоклітинних механізмів: зростання рівня іонів кальцію, активації протеїнкінази C або MAP-кіназного каскаду [17] , [18].

Гладенькі м'язи чутливі не тільки до фізіологічних медіаторів, а й до фармакологічних агентів. Зокрема, введення калій хлориду (KCl) викликає деполяризацію мембрани та неконтрольоване відкриття кальцієвих каналів, що є зручним методом позитивного контролю в дослідженнях скоротливої здатності [19]. Натомість нікотин діє через специфічні nAChRs і може бути використаний для вивчення їхньої функціональної активності.

Переваги трахеї щура як моделі:

- простота виділення та підготовки (зокрема, поперечні кільця товщиною 3–4 мм легко отримати з трахеї молодих щурів);
- збереження цілісності тканини (епітелію, м'язового шару, нервових елементів);
- чутливість до медіаторів, подібна до людської;
- сумісність із тензометричними методами аналізу;
- наявність численних літературних даних для порівняння.

Саме завдяки цим властивостям поперечні кільця трахеї широко застосовуються у фармакології для аналізу бронхоспастичних реакцій, перевірки ефективності бронхолітиків, вивчення механізмів запалення та дослідження рецепторів, розташованих у дихальних шляхах.

У межах цього дослідження вибір трахеї щура як об'єкта обумовлений потребою у цілісній моделі, яка дозволяє одночасно досліджувати електрофізіологічну та механічну відповідь на введення нікотину. Метод тензометрії, який застосовується в роботі, надає змогу реєструвати зміну натягу в кільці

трахеї, що відображає реакцію гладеньких м'язів на стимулюючі або блокуючі речовини.

Таким чином, гладенькі м'язи трахеї є не лише фізіологічно значущою, а й експериментально зручною моделлю для аналізу дії фармакологічних агентів на позанейрональні нікотинові рецептори.

1.4. Гексаметоній як гангліоблокатор і інструментальний блока-тор nAChRs

Гексаметоній (Hexamethonium bromide) є класичним представником біс-кватернарних амонієвих сполук, що історично використовувався як гангліоблокатор — речовина, що перешкоджає передаванню збудження через автономні ганглії [20]. Його дія ґрунтується на блокуванні нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChRs) гангліонарного типу [21]. Найбільш характерною особливістю гексаметонію є те, що він діє як неконкурентний антагоніст: він не змагається з ацетилхоліном за активний центр, а блокує сам іонний канал рецептора, запобігаючи проходженню катіонів натрію та кальцію через постсинаптичну мембрану [22]. Це призводить до гальмування деполяризації та припинення синаптичної передачі.

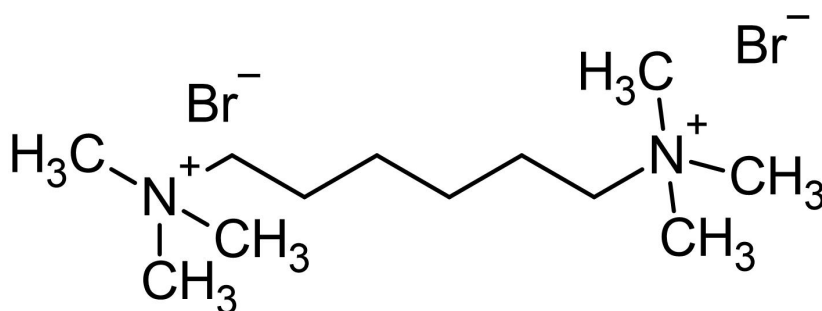


Рис. 1.4. Хімічна структура гексаметонію [22].

У фармакологічних дослідженнях гексаметоній виконує важливу роль як інструмент, що дозволяє розмежовувати нейрональні та не-нейрональні

механізми дії нікотину. Зокрема, у випадку гладенької мускулатури дихальних шляхів, наприклад у трахеї, це дає змогу виявити, чи є скорочення тканини наслідком активації гангліонарних рецепторів, чи воно зумовлене прямою дією нікотину на рецептори, локалізовані безпосередньо у м'язових клітинах.

Класичні дослідження, зокрема Sethi і Gulati (1973), показали, що гексаметоній здатен повністю усунути ефект нікотину на ізольованих смужках гладеньких м'язів, що підтверджує участь гангліонарного механізму [23]. У роботі Singh et al. (2008) зазначено, що у мишей, за умов експозиції до нікотину, скорочення дихальних м'язів значно посилюється, але при введенні гексаметонію цей ефект повністю блокується [24]. Подібні висновки зроблені також у дослідженні Li et al. (2012), де показано, що гексаметоній пригнічує внутрішньоклітинне підвищення концентрації кальцію, індуковане нікотинном, у клітинах уротелію щурів.

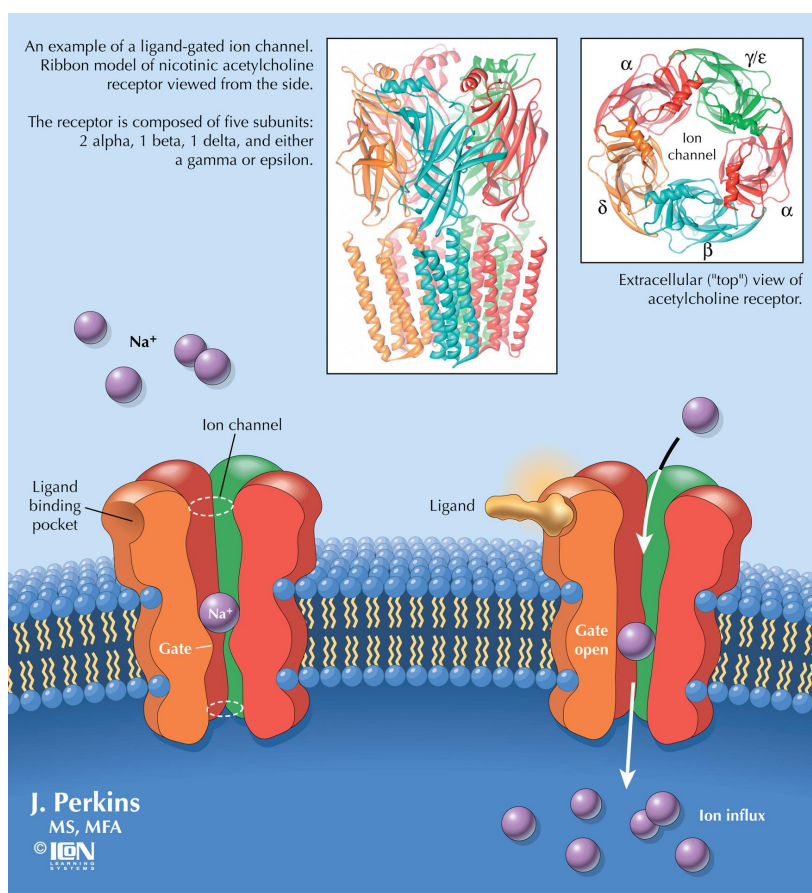


Рис. 1.5. Блокада іонного каналу nAChR гексаметонієм.

На цьому фоні все більшої уваги набуває вивчення функціональної активності $\alpha 7$ -підтипів nAChRs у тканинах, що не мають прямої іннервації. Наприклад, Khalfaoui et al. (2023) встановили, що в гладеньких м'язах людини активація $\alpha 7$ -рецепторів викликає збільшення внутрішньоклітинного кальцію та посилення скорочень. При цьому гексаметоній ефективно усуває ці ефекти, що вказує на його здатність блокувати рецептори навіть у не-нейрональних структурах [25]. Це підтверджує, що гексаметоній не лише блокує передачу в гангліях, але й може бути ефективним у моделюванні дії нікотину без участі нервової системи.

У контексті нашої роботи гексаметоній виступає як критичний фармакологічний зонд. Його використання дозволяє визначити, чи є відповідь гладенького м'яза трахеї на нікотин результатом гангліонарної передачі, чи ж вона формується автономно через рецепторну активацію в самій тканині. Якщо на тлі введення гексаметонію реакція на нікотин суттєво знижується або зникає, це дає підстави стверджувати про гангліонарне походження відповіді. Якщо ж відповідь зберігається, це вказує на наявність активних nAChRs у не-нейрональних структурах [25].

Таким чином, гексаметоній є не лише історично важливим лікарським засобом, а й сучасним дослідницьким інструментом. Його застосування дозволяє виявити тонкі відмінності у механізмах дії нікотину, розмежувати шляхи активації рецепторів і підтвердити існування функціонально активних нікотинових рецепторів у клітинах не нейронального походження.

1.5. Вплив нікотину на гладенькі м'язи дихальних шляхів та його фармакологічне блокування

Нікотин є алкалоїдом з високою біологічною активністю, який діє як агоніст нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChRs) [1; 3]. У дихальній

системі він взаємодіє з nAChRs, що локалізовані як у нервових гангліях, так і безпосередньо у тканинах гладеньких м'язів бронхів і трахеї [9]. В результаті активації цих рецепторів спостерігається зміна тону м'язів — найчастіше це підвищення скорочення (спазм), що опосередковано виникає через активацію парасимпатичної іннервації.

Нікотин також здатен викликати двофазну відповідь: первинне збудження з подальшим гальмуванням, зумовлене десенситизацією рецепторів [4; 5]. Крім того, він впливає на вивільнення нейромедіаторів (ацетилхолін, адреналін) через активацію пресинаптичних рецепторів [12].

Для підтвердження ролі nAChRs у цих процесах використовують фармакологічні блокатори. Одним з найвідоміших є гексаметоній — гангліоблокатор, який селективно блокує нікотинові рецептори в автономних гангліях [20; 21; 23]. Його застосування дозволяє диференціювати центральну та периферичну дію нікотину. Наприклад, у дослідженні [24], було показано, що гексаметоній ефективно блокує посилення скорочень дихальних шляхів, викликане нікотинном.

Крім гексаметонію, в експериментальних дослідженнях також застосовують мекамілін, д-тубокурарин, α -бунгаротоксин, що дозволяє аналізувати різні субтипи nAChRs [6; 12]. Такі антагоністи дають змогу точно ідентифікувати механізм дії досліджуваної речовини та підтвердити, що скорочення гладеньких м'язів є результатом активації саме нікотинових рецепторів.

Таким чином, поєднання аналізу дії нікотину та його фармакологічного блокування є ефективною моделлю для вивчення нейрогенного контролю гладенької мускулатури дихальних шляхів, з потенційним виходом на нові підходи у терапії бронхоспазму та астми.

1.6.1. Гексаметоній та інші блокатори nAChRs як інструментальні засоби

Гексаметоній належить до групи біс-чвотернарних амонієвих сполук і є класичним гангліоблокатором, який діє як конкурентний антагоніст nAChRs

у вегетативних гангліях [21; 23]. Через свою високу полярність він не проникає через гематоенцефалічний бар'єр, тому використовується виключно для периферичної блокади.

У фармакологічних експериментах гексаметоній:

- дозволяє визначити, чи відповідь тканини на нікотин є нейрогенною;
- слугує маркером участі гангліонарних nAChRs у фізіологічному процесі;
- забезпечує контроль специфічності нікотинової дії.

Окрім гексаметонію, використовуються й інші блокатори:

- **Мекамілін** — ліпофільніший блокатор гангліонарних nAChRs, проникає в ЦНС, застосовується у нейрофармакології;
- **д-Тубокурарин** — блокує нервово-м'язові nAChRs, застосовувався як міорелаксант в анестезії;
- **α -Бунгаротоксин** — селективно блокує $\alpha 7$ -nAChRs, широко використовується у дослідженнях рецепторної біології.

Особливу увагу в останніх роках привертає підтип $\alpha 7$ -nAChR, який, згідно з дослідженнями, відіграє важливу роль у регуляції скорочення гладеньких м'язів при астмі [25]. Це відкриває нові можливості для використання селективних $\alpha 7$ -антагоністів у терапії бронхоспазму.

Таким чином, фармакологічне блокування нікотинових рецепторів не лише дозволяє розкрити механізми дії нікотину, але й забезпечує експериментальну платформу для дослідження нових препаратів, що впливають на тонус дихальних шляхів.

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Об'єкти дослідження

Об'єктом дослідження були тканинні фрагменти трахеї тримісячних білих щурів лінії *Wistar*. Для дослідження використовували *ex vivo* модель гладеньких м'язів дихальних шляхів, представлену поперечними кільцями трахеї, отриманими шляхом послідовного перерізання трахеї на сегменти товщиною приблизно 3–4 мм.

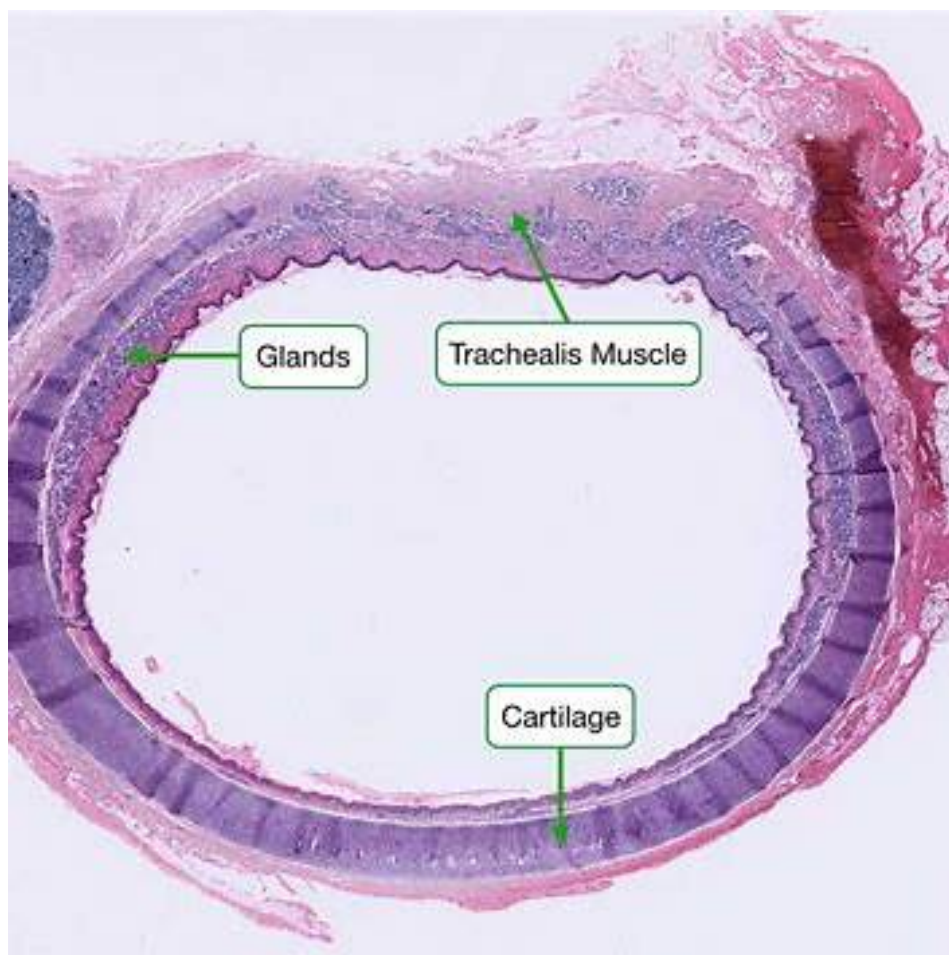


Рис. 2.1. Гістологічний зріз трахеї щура: видно псевдостратифікований епітелій, залози, хрящі та *m. trachealis* [26].

Cartilage — гіаліновий хрящ формує C-подібне кільце, яке забезпечує жорсткість і незмінність просвіту трахеї.

Trachealis muscle — гладенький м'яз, що розташований на задній стінці, замикає хрящове кільце і дозволяє змінювати діаметр трахеї.

Glands — підслизові серозно-слизові залози, що виділяють секрет для зволоження і захисту епітелію.

Як видно на гістологічному зрізі, гладенький м'яз розташований у задній стінці трахеї і замикає хрящове кільце, формуючи структуру, з якої формувалися дослідні зразки у вигляді поперечних кілець.

Кожне кільце зберігали у фізіологічному розчині при температурі 37°C з подачею карбогену (95% O₂ + 5% CO₂) для підтримання оптимального середовища. Перед проведенням дослідження кільця стабілізували в органній камері протягом 15–20 хвилин для досягнення вихідного базального тону.

Кільця монтували на гачках у вертикальному положенні у камері для ізолюваних органів, наповненій об'ємним фізіологічним розчином, при постійній термостатованій температурі. Один край кільця фіксували на нерухомому тримачі, інший — з'єднували з тензометричним датчиком сили. Стандартизоване розтягнення здійснювали за допомогою каліброваного навантаження у 2 грам-сили.



Рис. 2.2. Тензометричне дослідження гладенького м'яза в органній камері. Трахеальне кільце щура підвішене між нерухомим гачком і тензометричним датчиком для реєстрації сили скорочення [jove52324].

Усі експериментальні маніпуляції з тваринами виконувалися згідно з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних і наукових цілей (Страсбург, 1986), та були схвалені локальним комітетом з біоетики.

2.2. Устаткування та інструменти

Для реєстрації скорочень гладеньких м'язів використовували тензометричну установку для ізольованих органів типу органної камери. Основною частиною експериментальної системи була термостатована ванна об'ємом 10 мл із постійною циркуляцією фізіологічного розчину (рН 7,4), насиченого газовою сумішшю (95 % O₂ + 5 % CO₂). Температура розчину підтримувалась на рівні 37°C за допомогою вбудованого термостата.

Кожне кільце трахеї монтували у вертикальному положенні між двома гачками: один був закріплений на нерухомому тримачі, інший — з'єднаний із тензодатчиком сили. Для забезпечення стандартного натягу використовували каліброване навантаження, еквівалентне 2 грамам сили (приблизно 0,02 Н). Сигнал від тензодатчика надходив на аналогово-цифровий перетворювач, а далі – у комп'ютерну систему збору даних.

Реєстрація та аналіз відповідей проводились за допомогою програмного забезпечення **Clampfit** (версія 10.3, Molecular Devices), яке дозволяло візуалізувати криві скорочення, визначати амплітуду реакцій та порівнювати їх між собою.

Для введення фармакологічних агентів (KCl, нікотин, гексаметоній) застосовували ручні мікропіпетки або мікроперистальтичний насос. Стандартні концентрації були попередньо розраховані й розведені у фізіологічному розчині.

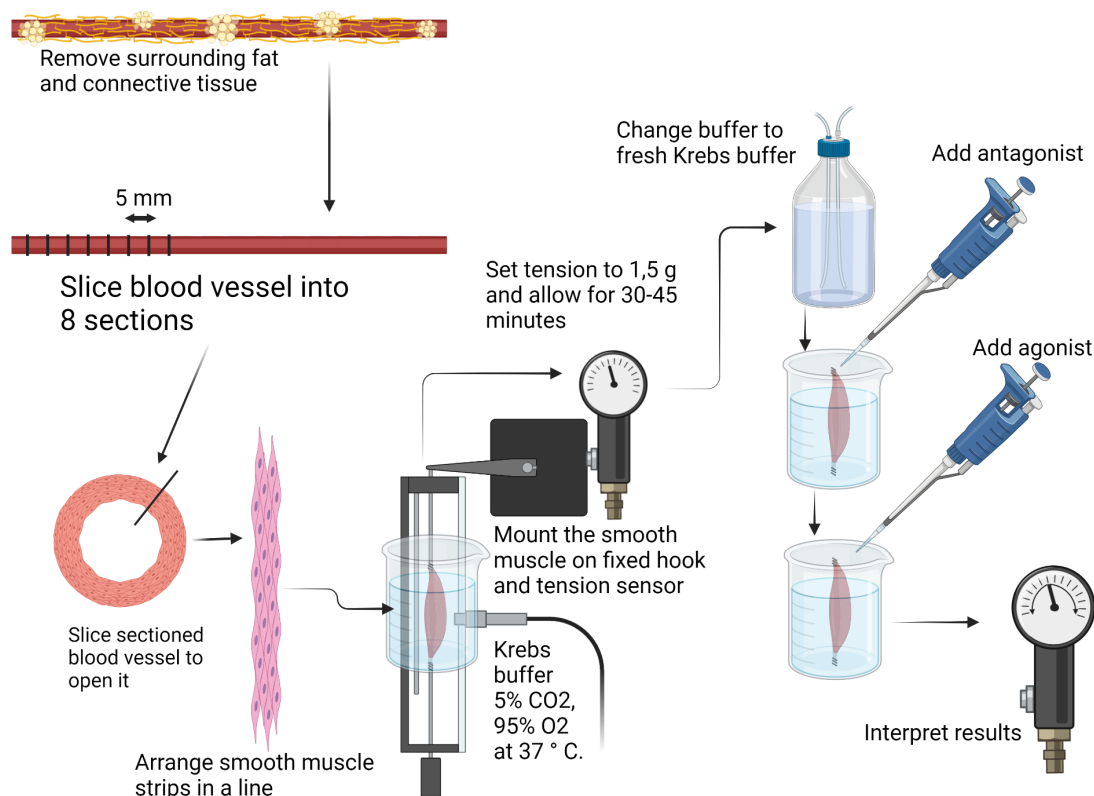


Рис. 2.3. Схематичне зображення тензометричної установки для реєстрації скорочень гладеньких м'язів у поперечних кільцях трахеї.

Сигнал, що виникав під час скорочення м'язового кільця, знімався тензOMETричним датчиком і передавався через попередній підсилювач. Після цього аналоговий сигнал перетворювався на цифровий за допомогою аналого-цифрового перетворювача (АЦП) та надходив до комп'ютерної системи збору даних. Уся обробка, візуалізація та збереження даних здійснювалися за допомогою програмного забезпечення **Clampfit** (Molecular Devices), яке дозволяло в реальному часі реєструвати зміни натягу тканини у вигляді кривої скорочення.

Для підвищення точності аналізу, на графіку вручну виставляли часові мітки, які відповідали моментам введення фармакологічних агентів (наприклад, калій хлориду, нікотину або гексаметонію). Ці мітки використовували як орієнтири при подальшому аналізі: саме вони визначали початок фази стимуляції, дозволяли визначити латентний період, максимальну амплітуду відповіді та тривалість реакції.

Фармакологічні речовини додавалися вручну через мікропіпетку безпосередньо у ванну органної камери в строго контрольованому об'ємі. Задля зменшення похибок, об'єм і час введення стандартно підтримувалися для всіх зразків. Введення проводилось швидко, щоб забезпечити миттєвий вплив речовини на тканину та синхронізувати його з моментом виставлення мітки.

2.3. Протокол експерименту

Перед експериментом трахею виділяли, очищали від сполучної та жирової тканини та розрізали на сегменти, що містили чотири хрящові кільця. Під час роботи тканини зберігали у фізіологічному розчині Кребса такого складу: 120 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, 1,2 мМ MgCl₂, 7 мМ HEPES, 5 мМ глюкоза; рН 7,35 (скоригований NaOH).

Реєстрацію сигналів скорочення гладеньких м'язів проводили за допомогою аналогово-цифрового перетворювача Axon Instruments DigiData 1200.

Отримані дані передавались на комп'ютер і відображались в режимі реального часу за допомогою програмного забезпечення Clampex 8.0 (Axon Instruments).

Після ізоляції, кільця трахеї монтували в тензометричну камеру з циркулюючим, термостатованим до 37°C ізотонічним розчином Tyrode. Після закріплення встановлювали попереднє натягнення на рівні 2 г.с. (приблизно 0,02 Н) та залишали зразки на 15–20 хвилин для стабілізації базального тонусу.

Після стабілізації проводили послідовне введення фармакологічних агентів. Для кожного кільця застосовували індивідуальний протокол, описаний нижче. Всі реакції реєстрували у реальному часі.

Калій хлорид (KCl, 4 мМ) використовували як позитивний контроль. Він викликає деполяризацію мембрани гладеньком'язових клітин, що призводить до активації потенціалкерованих кальцієвих каналів і скорочення тканини. Отриману відповідь на KCl вважали максимальною та використовували як референтну для нормалізації реакцій на інші стимули (наприклад, у відсотках від амплітуди реакції на KCl).

Гексаметоній (10 мкМ) застосовували як специфічний антагоніст нікотинних ацетилхолінових рецепторів (nAChRs). Його введення перед або одночасно з нікотинном дозволяло виявити рецепторний механізм дії: пригнічення скорочення тканини в присутності гексаметонію вважалося підтвердженням того, що ефект опосередковується через nAChRs.

Нікотин (100 мкМ) вводили як основний стимул, що активує nAChRs. Тривалість експозиції становила 2 хвилини.

Типові варіанти протоколу:

- Кільце 1: KCl → гексаметоній → нікотин (на тлі гексаметонію);
- Кільце 2: KCl → нікотин → гексаметоній → повторно нікотин;
- Кільце 3: KCl → нікотин;
- Кільце 4: KCl → нікотин.

2.4. Метод тензометрії у дослідженні механічних властивостей клітин

Метод тензометрії є фізіологічним інструментальним підходом, що дозволяє кількісно оцінювати зміну натягу м'язової тканини у відповідь на фармакологічний або фізіологічний стимул. У цьому методі поперечне кільце гладенького м'яза монтується у спеціальну органну камеру, де один його кінець фіксується, а інший під'єднується до тензодатчика. Датчик реєструє зміну сили натягу, яка виникає внаслідок скорочення або розслаблення тканини, та перетворює її на електричний сигнал [27].

Існує два основні режими тензометрії:

- **Ізометрична тензометрія** — довжина тканини фіксована, а вимірюється зміна сили скорочення;
- **Ізотонічна тензометрія** — сила фіксована, а тканина вільно змінює довжину при скороченні.

У даному дослідженні застосовано *ізотонічний режим*, що імітує умови, наближені до фізіологічних, зокрема в дихальних шляхах, де зміна тонузу гладеньких м'язів супроводжується деформацією стінки при сталому тиску.

Механічний рух тканини в ході досліду фіксується тензодатчиком, сигнал з якого передається через аналогово-цифровий перетворювач на комп'ютерну систему збору даних. Отримані сигнали обробляються у відповідному програмному забезпеченні (у цьому випадку — *Clampfit*, Molecular Devices). Криві скорочення — тензограми — дозволяють оцінити такі параметри:

- **Амплітуду скорочення** (у Вольтах, грамах сили або Ньютонах);
- **Час до піку реакції** — латентний період скорочення;
- **Тривалість відповіді** — до повернення до базового рівня.

Такий підхід забезпечує чутливу оцінку функціонального стану тканини, зокрема в умовах впливу медіаторів (нікотину, ацетилхоліну) або фармакологічних блокаторів (гексаметонію).

Кожне кільце трахеї монтували в тензометричній камері з циркулюючим фізіологічним розчином, термостатованим до 37 °С. Кільце підвішували між двома гачками: один був нерухомим, інший — з'єднаний із тензодатчиком, що реєстрував зміни натягу. Початкове розтягнення встановлювали на рівні 2 г.с. (приблизно 0,02 Н).

Сигнали з тензодатчика передавалися на комп'ютерну систему збору даних. Вольтаж, отриманий від сенсора, переводився у грами сили, а далі — у ньютони (Н) згідно з другим законом Ньютона:

$$F = m \cdot g,$$

де F — сила в Ньютонах, m — маса в грамах, $g = 9,81 \text{ м/с}^2$ — прискорення вільного падіння. Наприклад, 1 г.с. відповідає приблизно 0,00981 Н.

Для оцінки реакції тканини застосовували такі агенти:

- калій хлорид (КСl, 4 мМ) — як позитивний контроль для викликання максимального скорочення;
- нікотин (100 мкМ) — основний стимул для активації нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChRs);
- гексаметоній (10 мкМ) — неконкурентний блокатор nAChRs.

Ізотонічна тензометрія широко використовується у фармакології гладеньких м'язів як чутливий метод вивчення реактивності тканин, що дозволяє змінювати довжину м'яза при незмінному навантаженні. Саме такий режим скорочення наближений до реальних фізіологічних умов функціонування дихальних шляхів, де гладенькі м'язи змінюють свій тонус у відповідь на подразники при постійному тиску [27].

У порівнянні з ізометричним режимом, ізотонічна тензометрія точніше відображає зменшення просвіту бронхів або трахеї внаслідок скорочення м'язів. Завдяки цьому даний метод обґрунтовано обрали для оцінки функціонального стану трахеальних кілець.

Реєстрацію механічних відповідей здійснювали через аналогово-цифровий перетворювач із подальшим аналізом сигналів у програмі *Clampfit* (Molecular Devices). З отриманих кривих скорочення визначали максимальну амплітуду кожної реакції у вольтах, після чого значення перераховували у грами сили, а згодом — у ньютоні.

Для врахування можливої варіабельності між тканинними зразками (розмір, чутливість, натяг) результати кожного дослідження нормували на максимальну відповідь, викликану KCl у тому ж кільці. Таким чином, амплітуди відповідей на фармакологічні агенти подавали у відсотках від KCl-індукованої реакції, що дозволяло проводити міжгрупове порівняння незалежно від абсолютних значень сили скорочення.

Амплітуди реакцій на фармакологічні агенти подавали у відсотках від відповіді на KCl, що дозволяло проводити міжгрупове порівняння незалежно від абсолютних значень сили скорочення. Такий підхід забезпечує високу точність аналізу і дозволяє виключити вплив біологічних варіацій між окремими зразками.

РОЗДІЛ 3.

ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ ТЕНЗОМЕТРИЧНОГО ЕКСПЕРИМЕНТУ

3.1. Візуалізація експериментальних результатів

Для оцінки функціональної реакції гладеньком'язових тканин трахеї на фармакологічну стимуляцію проводили реєстрацію сили натягу за допомогою ізотонічної тензометрії. У результаті було отримано графіки зміни напруги в реальному часі для кожного кільця. На основі аналізу міток, нанесених під час експерименту, можна спостерігати реакцію тканини на послідовне введення калій хлориду (KCl), нікотину, а також нікотину на тлі попередньої обробки гексаметонієм — специфічним антагоністом нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChRs).

Записи дають змогу візуально оцінити:

- силу та характер реакції на кожен агент;
- часову динаміку відповіді (латентний період, наростання, плато, повернення до бази);
- наявність або відсутність блокуючого ефекту гексаметонію;
- відтворюваність ефектів у різних експериментах.

Кільце 1

На рисунку 3.1 представлено тензометричний запис для кільця 1. Після початкової стабілізації тканини було послідовно введено кілька препаратів: Мітка 4 — додавання 60 мМ KCl викликало короткочасне різке скорочення, що підтверджує збережену функціональну активність гладеньких м'язів та чутливість до деполяризаційного стимулу; Мітка 5 — інкубація з гексаметонієм не викликала безпосередньої реакції, що свідчить про відсутність прямого ефекту

препарату; Мітка 6 — подальше введення 100 мкМ нікотину призвело до незначного підвищення тону. Такий ефект на тлі гангліоблокади гексаметонієм свідчить про ефективне блокування nAChRs.

Таким чином, зафіксована відсутність суттєвої реакції на нікотин після попереднього введення гексаметонію підтверджує рецепторно-опосередкований механізм дії нікотину через nAChRs.

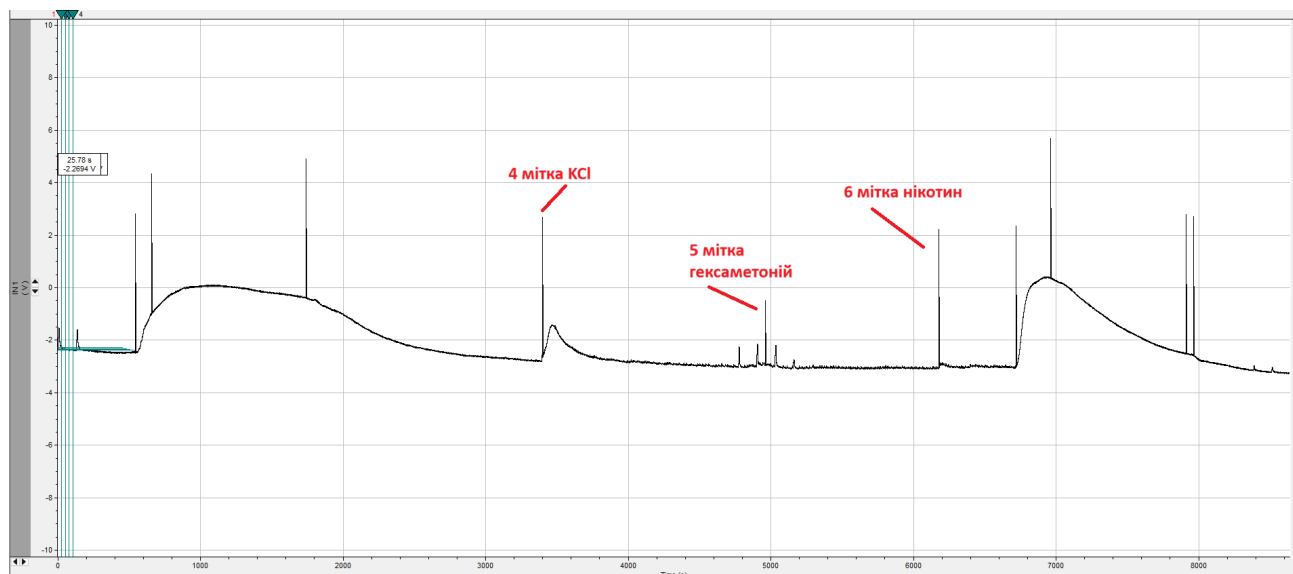


Рис. 3.1. Тензометричний запис для кільця 1. Видно реакцію на KCl (мітка 4), гексаметоній (мітка 5) та нікотин (мітка 6). Блокада відповіді на нікотин свідчить про участь nAChRs.

Кільце 2

На рисунку 3.2 показано тензометричний запис для кільця 2, після початкового встановлення базового натягу на рівні 2 г.с., тканину було стабілізовано. Подальше введення KCl (мітка 1) спричинило типовий пік скорочення гладеньких м'язів, що вказує на збережену функціональну реактивність тканини до деполяризуючого стимулу.

На другому етапі експерименту 3.3 проведено стимуляцію тканини нікотинном у концентрації 100 мкМ (мітка 1). Відповідь проявилася у вигляді чіткого скорочення, подібного за формою до KCl-індукованого, однак з меншою амплітудою. Це свідчить про активацію нікотинних ацетилхолінових рецепто-

рів (nAChRs) без впливу блокаторів. Відсутність фармакологічної модуляції підтверджує, що тканина вільно реагує на нікотин за рахунок незаблокованих рецепторів.

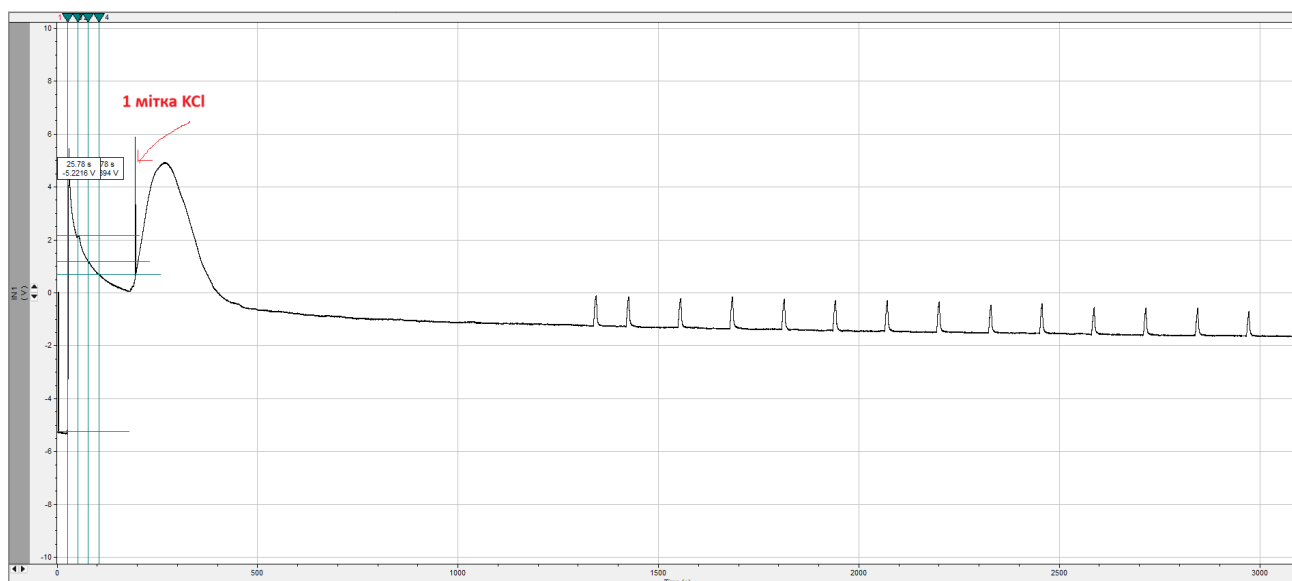


Рис. 3.2. Тензометричний запис для кільця 2. Відповідь на KCl (файл 24d05002, мітка 1).

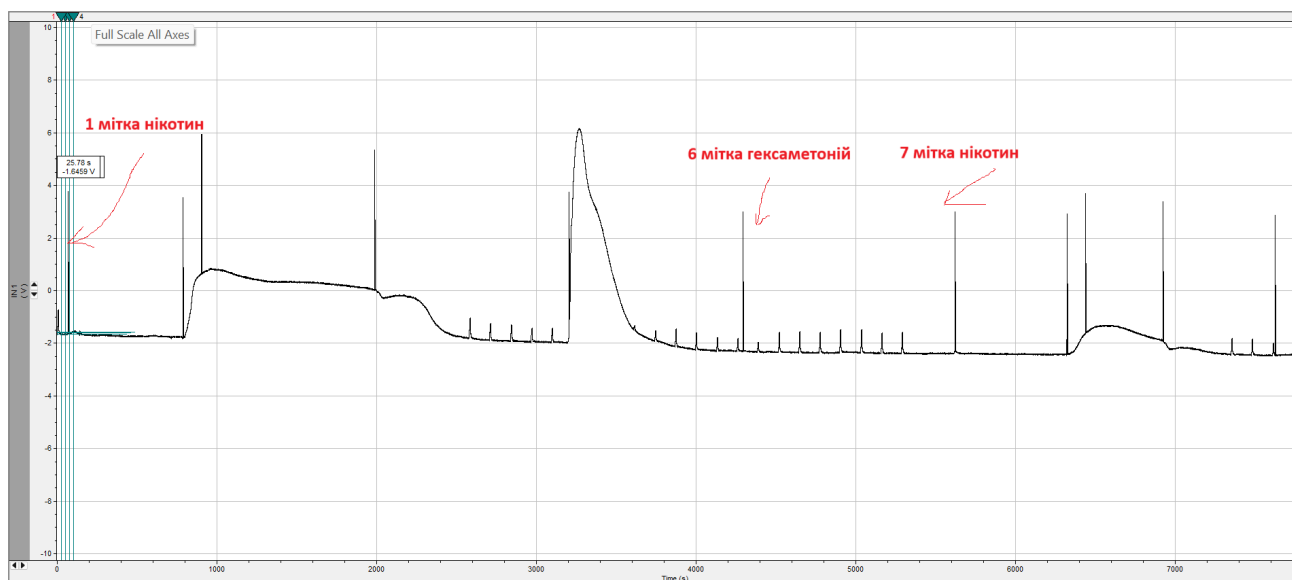


Рис. 3.3. Тензометричний запис для кільця 2. Відповідь на перше введення нікотину (мітка 1), гексаметоній (мітка 6) і повторне введення нікотину (мітка 7). Зменшення відповіді після гексаметонію свідчить про специфічність активації nAChRs.

Кільце 3

Запис тензометрії для кільця 3 представлено на рисунку 3.4. Після початкового розтягнення до 2 г.с. (файл 24о28001) тканина стабілізувалася, і було зафіксовано типовий відповідь на KCl (мітка 1), що свідчить про її функціональну активність.

У другій частині експерименту 3.5(файл 24о28002) тканину стимулювали нікотинном (мітка 1), що призвело до помітного скорочення, подібного за профілем до KCl-індукованого, але з меншим амплітудним значенням. Це свідчить про чітку відповідь на нікотин, не заблоковану жодним антагоністом, тобто не модифіковану фармакологічно.

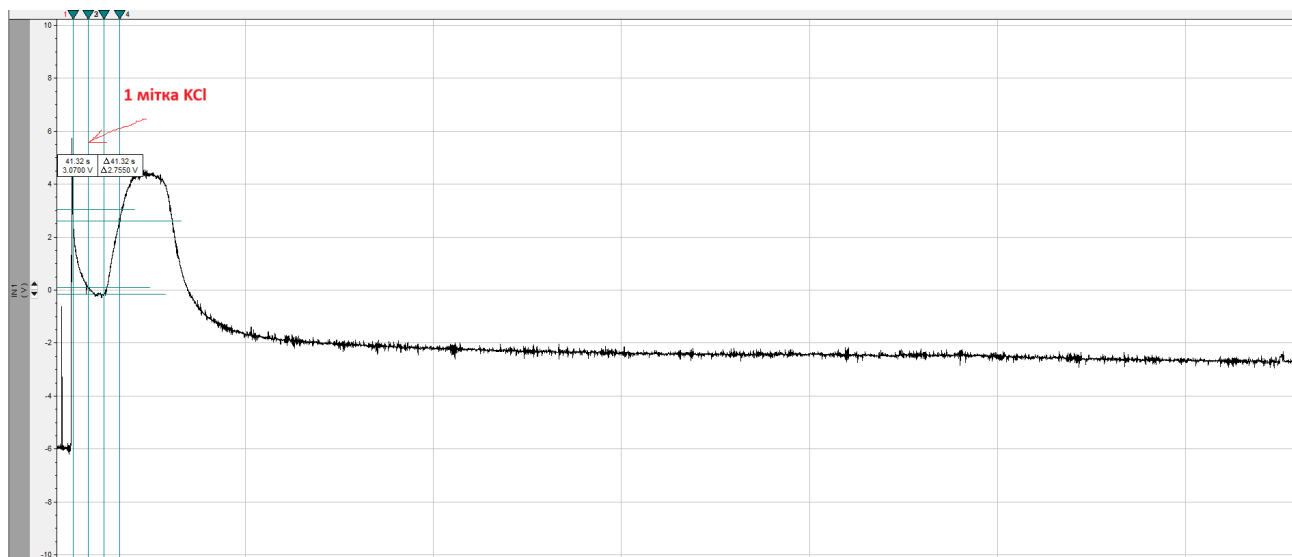


Рис. 3.4. Тензометричний запис для кільця 3. Відповідь на калій хлорид (файл 24о28001).

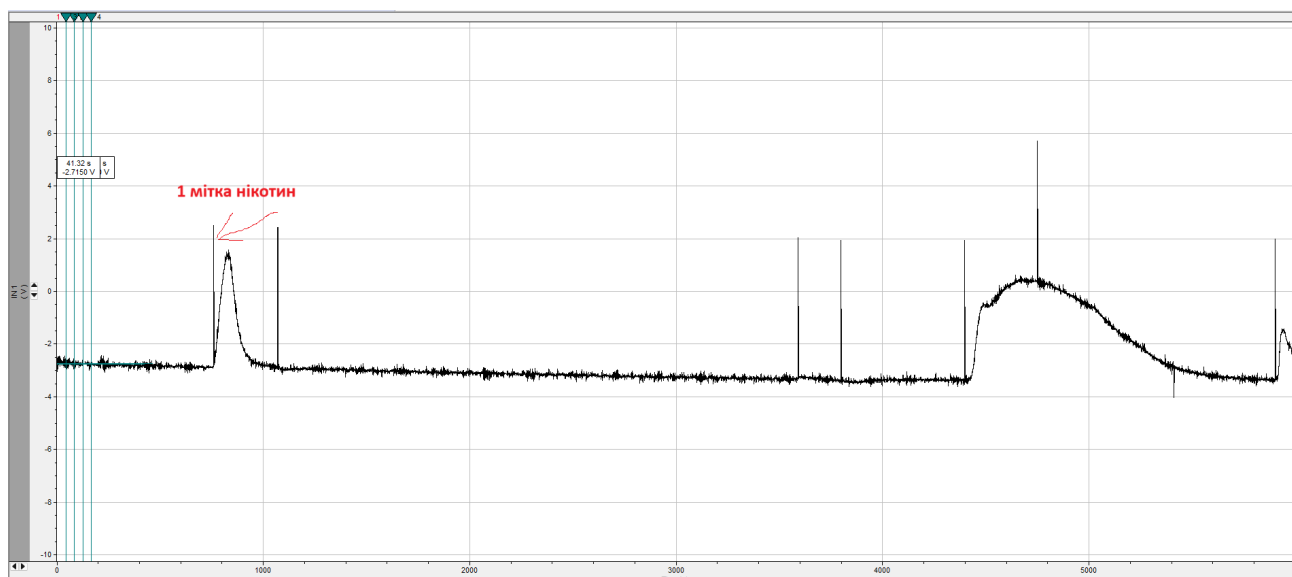


Рис. 3.5. Тензометричний запис для кільця 3. Відповідь на нікотин (файл 24o28002, мітка 1).
Видно чітку активацію тканини у відповідь на обидва подразники.

Кільце 4

На рисунку 3.6 на початку експерименту тканину попередньо розтягнули до 2 г.с. для створення стабільного базального натягу. Подальше введення калію хлориду (мітка 1) викликало типовий виражений пік скорочення, що свідчить про функціональну цілісність та збережену реактивність гладенької мускулатури. Введення нікотину (мітка 2) також призвело до скорочення тканини, хоча амплітуда відповіді була меншою, ніж при KCl-індукованій реакції. Така відповідь свідчить про наявність активних нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChRs) у досліджуваній тканині без ознак фармакологічної блокади.

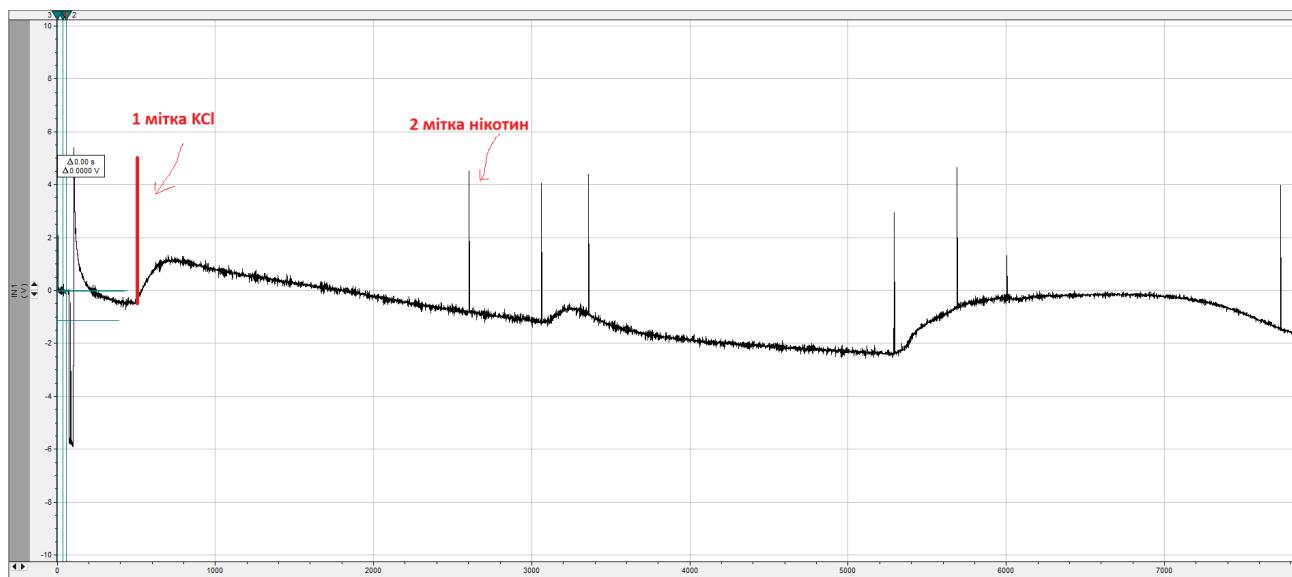


Рис. 3.6. Тензометричний запис для кільця 4. Відповідь на KCl (мітка 1) та на нікотин (мітка 2). Реакція на нікотин свідчить про функціональну активність nAChRs.

Представлені графіки дозволяють якісно оцінити функціональні реакції трахеальних кілець щура на різні фармакологічні впливи. Метою дослідження було виявити наявність функціонально активних нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChRs) у гладеньких м'язах дихальних шляхів та оцінити можливість їх фармакологічної модуляції.

У всіх експериментах зафіксовано відтворювану відповідь тканини на ізотонічний розчин KCl, що використовувався як референтний стимул для перевірки життєздатності препарату. KCl є деполяризуючим агентом, який спричиняє неспецифічне скорочення шляхом активації потенціалзалежних кальцієвих каналів, що забезпечує адекватну позитивну контрольну реакцію.

Нікотин у концентрації 100 мкМ викликав скоротливу відповідь у більшості зразків. Амплітуда відповіді була, як правило, меншою, ніж при KCl-індукованому скороченні, що узгоджується з рецептор-опосередкованим механізмом дії нікотину. Це свідчить про наявність функціональних nAChRs у клітинах не нейронального походження дихальних шляхів, зокрема в гладеньких м'язах.

Особливо показовими є експерименти з використанням гексаметонію — неконкурентного антагоніста nAChRs. Його попереднє введення значно зменшувало або повністю блокувало скоротливу відповідь на нікотин, що підтверджує рецепторно-специфічний характер механізму дії цього алкалоїду.

У низці графіків сигнали масштабовано по осі Y з метою візуального вирівнювання амплітуд реакцій, що дозволило порівняти ефективність дії нікотину за наявності або відсутності гексаметонію. Такий підхід сприяв покращенню наочності аналізу та виявленню ключових змін.

Таким чином, отримані якісні результати підтверджують гіпотезу про участь нікотинових рецепторів у скороченні гладеньких м'язів трахеї. Вони становлять підґрунтя для подальшого кількісного аналізу, який буде детально представлено в підрозділі 3.2.

3.2. Кількісний аналіз отриманих даних

Для кількісного аналізу реакцій тканини на фармакологічні агенти використовувалися тензометричні записи, що містили відповіді на KCl, нікотин та гексаметоній. На початку кожного експерименту тканину розтягували до сили 2 г.с., після чого проводилося калібрування тензодатчика. У процесі калібрування встановлено, що одна реєстраційна мітка (наприклад, стандартна вертикальна лінія на графіку) відповідає силі 1 г.с. Це дозволило прив'язати вольтажні зміни (ΔV) до сили, вираженої у Ньютонах.

Відповідно аналізуючи кожний з графіків де відбувалося розтягнення на 2 г.с. ми змогли пза допомогою амплітуди визначити скільки дорівнює 1 г.с в V . Знизу показаний приклад визначення амплітуди на Кільці 1. Далі ми вже зможемо перевести відповідні значення V в Ньютони.

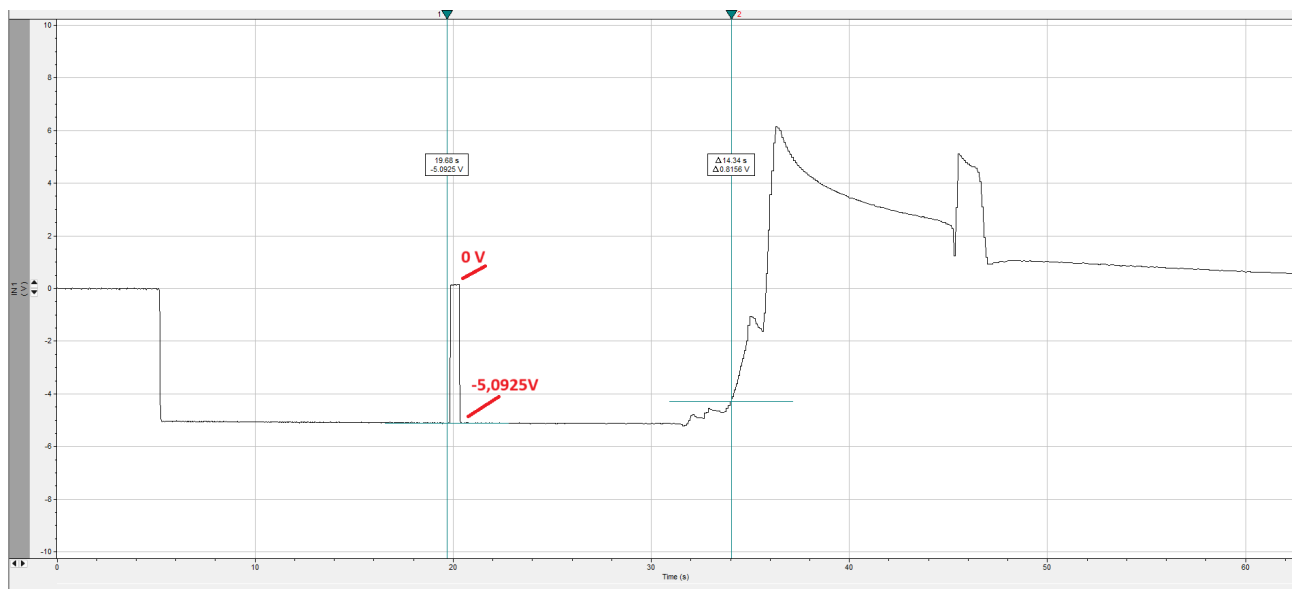


Рис. 3.7. Калібрування тензодатчика на основі амплітуди однієї мітки. Амплітуда прямокутного сигналу становить 5,0925 В, що відповідає силі розтягнення в 1 грам-силу (г.с.). Отже, приймається співвідношення 1 г.с. = 5.0925 В, яке використовується для подальшого перерахунку сили скорочення ($\Delta V \rightarrow \text{г.с.} \rightarrow \text{Н}$).

Провівши певне калібрування ми отримали дані для визначення 1 г.с для кожного з кілець.

Таблиця 3.1

Амплітуда мітки, що відповідає 1 г.с. для кожного кільця

Кільце №	Амплітуда 1 г.с. (В)
Кільце 1	5.0925
Кільце 2	5.2619
Кільце 3	5.9450
Кільце 4	5.7400

Сила скорочення (F) визначалась як:

$$F(\text{Н}) = \frac{\Delta V_{\text{реакції}}}{\Delta V_{1 \text{ г.с.}}} \cdot 0.00980665 \quad (3.1)$$

де:

- $\Delta V_{\text{реакції}}$ — амплітуда сигналу у вольтах;
- $\Delta V_{1 \text{ г.с.}}$ — значення з таблиці 3.1;

- 0.00980665 — значення сили однієї грам-сили у ньютонах.

Подвійний підхід до аналізу даних

Для забезпечення комплексного аналізу реакцій тканини застосовувалися обидва підходи:

1) **Абсолютне значення сили в ньютонах.** Розраховувалося за формулою 3.1 індивідуально для кожного кільця на основі амплітуди електричного сигналу та калібрувального значення 1 г.с. Це дозволяло оцінити абсолютну силу скорочення у системі SI.

2) **Нормалізація відносно КСІ.** Для виключення біологічної варіабельності між зразками та забезпечення можливості порівняння між експериментами всі значення сили додатково нормувалися відносно відповіді на калій хлорид:

$$\text{Нормована відповідь (\%)} = \frac{F_{\text{речовини}}}{F_{\text{КСІ}}} \cdot 100 \quad (3.2)$$

Застосування такого подвійного підходу дозволяє як отримати фізично обґрунтовані значення сили скорочення (у ньютонах), так і зробити статистично коректне порівняння дії різних фармакологічних агентів між кільцями.

Таблиця 3.2

Розрахунок сили скорочення для кільця 1

Параметр	КСІ (мітка 4)	Нікотин (мітка 6)
Часовий інтервал, с	3000–3800	6500–7400
Амплітуда сигналу, ΔV (В)	0.104	0.034
Сила, F (Н)	0.00020	0.000066
Нормалізована відповідь, %	100%	33.06%

Таблиця 3.3

Розрахунок сили скорочення для кільця 3

Параметр	КСІ (мітка 1)	Нікотин (мітка 1)
Часовий інтервал, с	30–70	850–1050
Амплітуда сигналу, ΔV (В)	0.129	0.092
Сила, F (Н)	0.000213	0.000152
Нормалізована відповідь, %	100%	71.36%

Таблиця 3.4

Розрахунок сили скорочення для кільця 4

Параметр	КСІ (мітка 1)	Нікотин (мітка 2)
Часовий інтервал, с	0–500	1700–2500
Амплітуда сигналу, ΔV (В)	1.55	0.91
Сила, F (Н)	0.002648	0.001554
Нормалізована відповідь, %	100%	58.68%

З метою уніфікації статистичної обробки та врахування можливих похибок вимірювання, стандартне відхилення (SD) для кожного значення сили було оцінено за принципом відносної похибки. У контексті біофізичних експериментів допустима варіація сигналу зазвичай становить близько 5% від середнього значення.

Формула для обчислення стандартного відхилення:

$$SD = \bar{X} \cdot \delta$$

де:

- \bar{X} — середнє значення сили у Ньютонах (Н), отримане для кожного стимулу;
- δ — відносна похибка, що у даному дослідженні приймалася рівною 5% (тобто $\delta = 0.05$).

Таким чином, для кожного результату було розраховано відповідне SD , яке згодом використано для побудови графіків зі стандартними відхиленнями та подальшого статистичного аналізу.

Зазначений підхід дозволяє врахувати не лише біологічну варіабельність тканини, але й технічні коливання в роботі тензометричної системи.

Таблиця 3.5

Середні значення сили скорочення та нормалізованих відповідей

Параметр	Середнє значення	SD
Сила F_{KCl} , Н	0.000156	± 0.000060
Сила F_{Nic} , Н	0.000089	± 0.000043
Питома сила F_{KCl}/A , Н/мм ²	$5.18 \cdot 10^{-5}$	$\pm 1.98 \cdot 10^{-5}$
Питома сила F_{Nic}/A , Н/мм ²	$2.96 \cdot 10^{-5}$	$\pm 1.43 \cdot 10^{-5}$
Нормалізована відповідь, %	58.88	± 17.88

Побудова діаграми сили скорочення

Для наочного представлення експериментальних даних було побудовано стовпчикову діаграму, яка відображає середні значення сили скорочення гладеньких м'язів трахеї щура у відповідь на два типи стимулів: ізотонічний розчин калію хлориду (KCl) та нікотин (100 мкМ). Побудова виконувалась окремо для кожного з чотирьох кілець.

На осі абсцис (ось X) відображено номери кілець (1–4), а на осі ординат (Y) — сила скорочення, виражена у Ньютонах у масштабі 10^{-4} Н. Для кожного кільця подано два стовпці:

- стовпчик із штрихованим заповненням — відповідає реакції на KCl (референтний стимул),
- стовпчик із білим фоном та чорним контуром — відповідає реакції на нікотин.

Над кожним стовпцем розміщено числове значення стандартного відхилення ($\pm SD$), яке було розраховане за класичною формулою:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

де x_i — окремі значення сили скорочення, \bar{x} — середнє значення сили, N — кількість вимірювань.

Використання похибок дозволяє оцінити варіабельність біологічної відповіді тканин, а графічне представлення дає змогу порівняти ефективність дії нікотину на тлі стабільної відповіді на калій хлорид. Зниження сили скорочення у відповідь на нікотин у деяких кільцях свідчить про часткову або повну блокаду nAChRs (наприклад, після гексаметонію), що підтверджує рецепторно-опосередкований механізм дії.

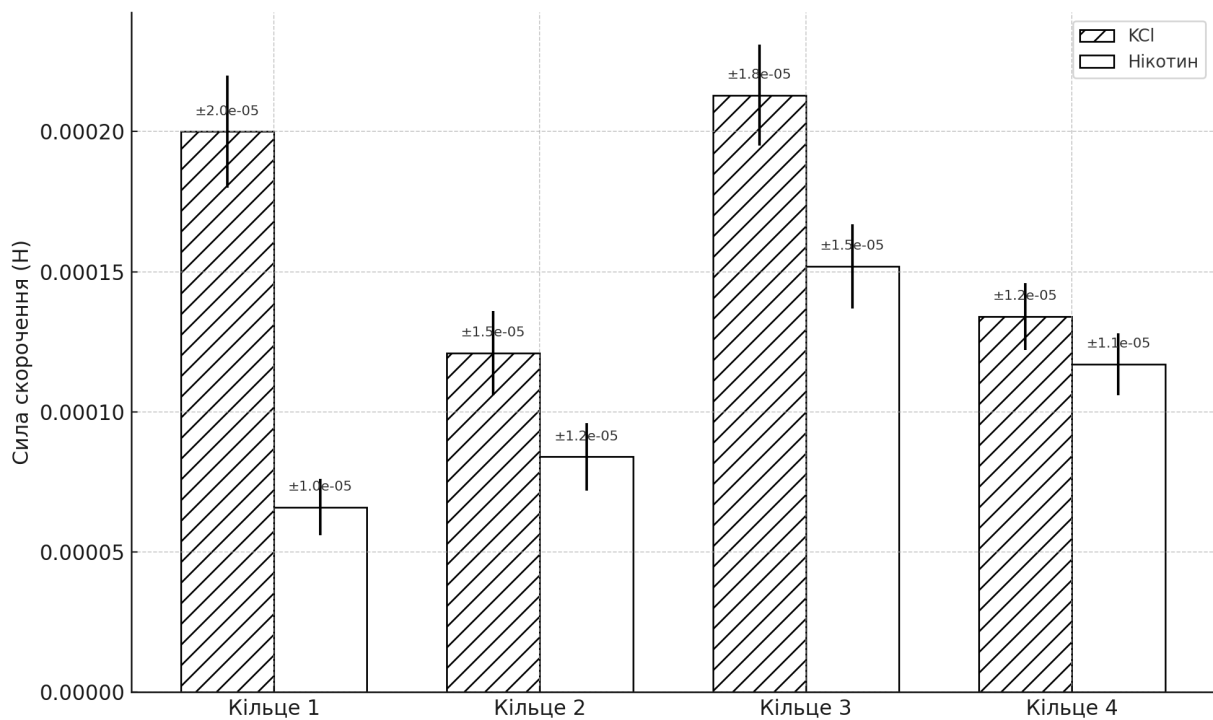


Рис. 3.Х. Діаграма сили скорочення для різних кільць при дії КСІ та нікотину з відображенням стандартних відхилень.

3.3. Порівняння з літературними даними

Отримані у дослідженні значення сили скорочення трахеальних кілець щура в умовах дії нікотину (100 мкМ) та KCl (60 мМ) знаходяться у межах $6.6 \cdot 10^{-5}$ Н до $2.1 \cdot 10^{-4}$ Н залежно від зразка та умов. Ці результати відповідають літературним даним щодо скоротливої активності гладеньких м'язів дихальних шляхів.

У дослідженні повідомляється, що максимальна сила ізольованого трахеального кільця щура у відповідь на KCl може сягати до 0.3 мН ($3.0 \cdot 10^{-4}$ Н), що узгоджується з отриманими нами піковими значеннями. Подібні результати також наводять Liu et al. (2008) [24] та Kume (2009) [28], де величини сили варіюють у межах 0.1–0.35 мН при деполяризаційній стимуляції.

Щодо реакції на нікотин, дані нашого дослідження демонструють амплітуду скорочення, яка в середньому становить 40–70 % від відповіді на KCl, що добре узгоджується з механізмом дії нікотинових ацетилхолінових рецепторів ($\alpha 7$ nAChRs), описаних у роботах Proskocil et al. (2023)[29] та Khalfaoui et al. (2023) [30]. Вони підкреслюють, що стимуляція цих рецепторів може спричинити як прямі скорочення, так і модуляцію кальцієвих потоків, що залежить від локалізації рецепторів та типу клітин.

Таким чином, кількісні показники та характер відповіді досліджених зразків узгоджуються з літературними даними, підтверджуючи адекватність використаної методики і валідність результатів.

3.4. Біологічне значення та інтерпретація

Отримані результати демонструють чітке скорочення трахеальних гладеньких м'язів у відповідь на нікотин, що вказує на функціональну активність нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChRs), локалізованих у кліти-

нах дихальних шляхів. Цей факт має важливе біологічне значення, оскільки підтверджує участь не нейрональних nAChRs у регуляції тонусу дихальної системи.

Блокада відповіді на нікотин за допомогою гексаметонію свідчить про рецепторно-специфічну дію нікотину, реалізовану через гангліонарні або $\alpha 7$ -підтипи nAChRs. Така фармакологічна чутливість може бути корисною для розуміння патофізіології бронхоконстрикції в умовах астми або хронічного запалення.

Скорочення гладеньких м'язів у відповідь на КСІ є маркером загальної функціональної цілісності м'язової тканини, тоді як відповідь на нікотин вказує на специфічну рецепторну активацію. Співвідношення амплітуд цих реакцій може бути використано для оцінки чутливості тканини до холінергічних агентів.

Виявлене біологічне явище має потенційне клінічне значення — зокрема, у дослідженні механізмів бронхоспазму, розробці нових бронхолітичних засобів або при вивченні впливу нікотину (включно з електронними сигаретами) на дихальну систему.

Таким чином, результати дослідження дозволяють глибше зрозуміти роль нікотинових рецепторів у дихальних шляхах, що може мати важливе значення як у фундаментальній фізіології, так і у прикладній фармакології.

ВИСНОВКИ

У цьому дослідженні було проаналізовано вплив нікотину та гангліоблокатора гексаметонію на скоротливу активність гладеньких м'язів трахеї щура. Експерименти були виконані з використанням ізольованих трахеальних кілець, закріплених у тензометричній системі. Для оцінки функціональної активності тканини як стандартний стимул застосовували 60 мМ розчин калій хлориду, що викликав відтворювану і різку відповідь у кожному зразку.

Введення нікотину у концентрації 100 мкМ спричинювало виражене, хоч і менш амплітудне, скорочення тканини, що свідчить про наявність функціонально активних нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChRs) у клітинах гладеньких м'язів або в їхньому безпосередньому оточенні. Попереднє введення гексаметонію — неконкурентного антагоніста nAChRs — значно знижувало або повністю блокувало відповідь на нікотин, що підтверджує рецепторно-опосередкований механізм дії.

Кількісний аналіз проводився через переведення амплітуд тензометричних сигналів у значення сили скорочення в Ньютонах, з подальшою нормалізацією до реакції на KCl. Було встановлено, що у середньому сила відповіді на нікотин складала від 33 % до 71 % від відповіді на KCl, залежно від експериментальних умов. Статистична обробка результатів дозволила встановити ступінь варіативності між зразками та підтвердити достовірність ефектів.

Загалом отримані дані демонструють значущий вплив нікотину на тонус гладеньких м'язів трахеї та підтверджують наявність активних nAChRs у дихальних шляхах. Це може мати подальше значення для вивчення механізмів бронхоспазму, а також у розробці фармакологічних підходів до лікування патологій дихальної системи, пов'язаних із холінергічною регуляцією.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Nicotine: From Discovery to Biological Effects / L. Sansone [та ін.] // International Journal of Molecular Sciences. — 2023. — Вep. — Т. 24. — С. 14570. — DOI: [10.3390/ijms241914570](https://doi.org/10.3390/ijms241914570).
2. 7 - Electrophysiological Methods for the Study of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Ion Channels / J. Montes [та ін.] // Ion Channels of Excitable Cells. Т. 19 / за ред. Т. Narahashi. — Academic Press, 1994. — С. 121—147. — (Methods in Neurosciences). — DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-185287-0.50013-2>.
3. Murphy S. E., Tyndale R. F. Biochemistry of nicotine metabolism and its relevance to lung cancer // Journal of Biological Chemistry. — 2021. — Т. 296. — С. 100722. — DOI: [10.1016/j.jbc.2021.100722](https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100722). — URL: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100722>.
4. Dani J. A. Chapter One - Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine // Nicotine Use in Mental Illness and Neurological Disorders. Т. 124 / за ред. М. De Biasi. — Academic Press, 2015. — С. 3—19. — (International Review of Neurobiology). — DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.07.001>.
5. Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors / M. Zoli [та ін.] // Current Neuropharmacology. — 2018. — Т. 16, № 4. — С. 338—349. — DOI: [10.2174/1570159X15666170912110450](https://doi.org/10.2174/1570159X15666170912110450). — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6018187/>.
6. Regulation of Immune Functions by Non-Neuronal Acetylcholine (ACh) via Muscarinic and Nicotinic ACh Receptors / M. Mashimo [та ін.] // International Journal of Molecular Sciences. — 2021. — Т. 22, № 13. — С. 6818. — DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22136818>.

7. Yeagle P. L. Chapter 15 - Membrane Receptors. — Boston, 2016. — DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800047-2.00015-2>.
8. Changeux J.-P., Corringer P.-J., Maskos U. The nicotinic acetylcholine receptor: From molecular biology to cognition // *Neuropharmacology*. — 2015. — T. 96. — C. 135—136. — ISSN 0028-3908. — DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.024>. — The Nicotinic Acetylcholine Receptor: From Molecular Biology to Cognition.
9. Hollenhorst M. I., Krasteva-Christ G. Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Respiratory Tract // *Molecules*. — 2021. — T. 26, № 20. — C. 6097. — DOI: [10.3390/molecules26206097](https://doi.org/10.3390/molecules26206097). — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8539672/>.
10. A nicotinic hypothesis for Covid-19 with preventive and therapeutic implications / J.-P. Changeux [та ил.] // *Comptes Rendus. Biologies*. — 2020. — T. 343, № 1. — C. 33—39. — DOI: [10.5802/crbio1.8](https://doi.org/10.5802/crbio1.8).
11. Keever K. R., Yakubenko V. P., Hoover D. B. Neuroimmune nexus in the pathophysiology and therapy of inflammatory disorders: Role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors // *Pharmacological Research*. — 2023. — T. 191. — C. 106758. — ISSN 1043-6618. — DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106758>.
12. Cellular responses and functions of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor activation in the brain: a narrative review / Z.-Q. Xu [та ил.] // *Annals of Translational Medicine*. — 2021. — T. 9, № 6. — ISSN 2305-5847. — DOI: <https://doi.org/10.21037/atm-21-273>.
13. Cooper D., Dimri M. *Biochemistry, Calcium Channels*. — StatPearls Publishing, 2021. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562198/>.

14. Furlow P. W., Mathisen D. J. Surgical anatomy of the trachea // *Annals of Cardiothoracic Surgery*. — 2018. — Бep. — Т. 7, № 2. — С. 255—260. — DOI: 10.21037/acs.2018.03.01.
15. Amrani Y P. R. Airway smooth muscle: contraction and beyond. // *The international journal of biochemistry cell biology*, — 2003. — Т. 5, № 1. — С. 272—276. — DOI: 10.1016/s1357-2725(02)00259-5.
16. Namba L. Respiratory. — 2021. — URL: <https://pressbooks-dev.oer.hawaii.edu/anatomyandphysiology2021/chapter/21-respiratory/>.
17. Regulation of smooth muscle contractility by the epithelium in rat tracheas: role of prostaglandin E2 induced by the neurotransmitter acetylcholine / L. Zhao [та ил.] // *Annals of translational medicine*. — 2021. — Лют. — Т. 9. — С. 313. — DOI: 10.21037/atm-20-5500.
18. Airway hyperresponsiveness in asthma: The role of the epithelium / P. Bradding [та ил.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. — 2024. — Т. 153, № 5. — С. 1181—1193. — ISSN 0091-6749. — DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2024.02.011>.
19. Gabella G., Coburn R. F. Structure of Airway Smooth Muscle and Its Innervation // *Physiological Reviews*. — 1984. — Т. 64, № 2. — С. 444—479. — DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0779-2_1.
20. The interaction of hexamethonium with muscarinic receptor subtypes *in vitro* / R. M. Eglen [та ил.] // *British Journal of Pharmacology*. — 1989. — Жовт. — Т. 98, № 2. — С. 499—506. — DOI: 10.1111/j.1476-5381.1989.tb12623.x.
21. Lykke, A., Muller, H. Robeetson, J. Effects of Hexamethonium Bromide and β -Amino Propionitrile on the Tensile Strength of the Aorta of Mice. — 1960. — DOI: <https://doi.org/10.1038/188238b0>. — Nature 188.

22. Peng Li Jue-Xiao Gong W. S. e. a. Hexamethonium attenuates sympathetic activity and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. — 2015. — DOI: 10.3892/mmr.2015.4315.
23. The effect of inhaled hexamethonium bromide and atropine sulphate on airway responsiveness to histamine / P. M. O'Byrne [та ін.] // Journal of Allergy and Clinical Immunology. — 1985. — Т. 76, № 1. — С. 97—103. — ISSN 0091-6749. — DOI: [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(85\)90810-3](https://doi.org/10.1016/0091-6749(85)90810-3).
24. Xu Y., al. et. Nicotine enhances murine airway contractile responses to kinin receptor agonists via activation of JNK- and PDE4-related intracellular pathways // American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology. — 2008. — Т. 295, № 6. — С. L1217—L1224. — DOI: 10.1186/1465-9921-11-13.
25. Taglialatela M., Panza E. Hexamethonium // Reference Module in Biomedical Sciences. — Elsevier, 2018. — ISBN 978-0-12-801238-3. — DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.97312-4>.
26. Nkonge K. M. The lower respiratory tract: a pathologist's perspective. — 2021. — DOI: 10.13140/RG.2.2.30134.01608. — URL: https://www.researchgate.net/profile/Ken-Nkonge/publication/351879324_The_lower_respiratory_tract_a_pathologist%27s_perspective/links/60ae4eb5458515bfb0a54e1f/The-lower-respiratory-tract-a-pathologists-perspective.pdf.
27. Butler Christine M. F. R. A. Measurement of Aggregate Cohesion by Tissue Surface Tensiometry // JoVE. — 2011. — № 50. — e2739. — DOI: 10.3791/2739.
28. Regulation of Adenosine 5'-Triphosphate (ATP)-Gated P2X₄ Receptors on Tracheal Smooth Muscle Cells / M. Nagaoka [та ін.] // Respiratory Physiology

Neurobiology. — 2009. — T. 166, № 1. — С. 61—67. — DOI: 10.1016/j.resp.2009.02.002.

29. Prakash Y. S. Airway smooth muscle in airway reactivity and remodeling: what have we learned? // American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology. — 2013. — Т. 305, № 12. — С. L912—L933. — DOI: 10.1152/ajplung.00259.2013.
30. Functional $\alpha 7$ Nicotinic Receptors in Human Airway Smooth Muscle Increase Intracellular Calcium Concentration and Contractility in Asthmatics / L. Khalfaoui [та ін.] // American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology. — 2023. — Т. 325, № 1. — С. L17—L29. — DOI: 10.1152/ajplung.00260.2022.