УДК 577.35:576.33
DOI: https://doi.org/10.17721/1728.2748.2025.102.34-40

Данило КРАВЧУК, мол. наук. співроб.
ORCID ID: 0000-0003-4667-5348
e-mail: not.now.d@biph.kiev.ua
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

Олександр ЩЕГЛОВ, асп.
ORCID ID: 0009-0009-7772-3083
e-mail: ol.shchehlov@gmail.com
Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України, Київ, Україна

ФОТОКОНТРОЛЬОВАНЕ ВИВІЛЬНЕННЯ НІКОТИНУ З $RU(BPY)_2NIC_2$ ТА ЙОГО ВПЛИВ НА СКОРОЧЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ ТРАХЕЇ ЩУРА

Вступ. ***$Ru(bpy)_2Nic_2$, біпіридиновий комплекс рутенію, є світлочутливою сполукою, яка вивільняє нікотин під час опромінення видимим світлом (420–470 нм). Завдяки високому квантовому виходу (φ_s = 0,23) він забезпечує точний контроль над виділенням нікотину, пропонуючи цінний інструмент для вивчення активації нікотинового ацетилхолінового рецептора (нАХР) у біомедичних дослідженнях.***

Методи. ***У дослідженнях використовували метод високоефективної рідинної хроматографії та метод тензометричних вимірювань скорочень гладеньких м'язів трахеї щура.***

Результати. ***Експерименти на гладеньких м'язах трахеї показали, що $Ru(bpy)_2Nic_2$ індукує фазно-тонічне скорочення, причому нікотин запускає початкову фазу скорочення, а побічні продукти фотолізу активують P2X- і P2Y-пуринові рецептори та вивільнюють з епітеліальної тканини трахеї простагландини, які беруть участь у формуванні стійкого тонічного компоненту скорочення.***

Висновки. ***Загалом $Ru(bpy)_2Nic_2$ пропонує ефективне та кероване джерело нікотину для біомедичних досліджень із високою ефективністю фотолізу та здатністю генерувати біологічно відповідні концентрації нікотину за допомогою доступних джерел світла.***

Ключові слова: ***кейдж-сполуки, $Ru(bpy)_2Nic_2$-комплекси, нікотин, гладенькі м'язи трахеї, тензометричні вимірювання.***

Вступ

Кейдж-сполуки (caged compounds) – це група штучно синтезованих світлочутливих молекул, що дають змогу здійснювати контрольований вплив на клітини, тканини або біологічні процеси шляхом локального утворення біологічно активних компонентів при світловому опроміненні *in situ* (Ellis-Davies, & Graham, 2007). Вони мають фотолабільну захисну групу, приєднану до функціональної групи, яка робить усю молекулу біологічно інертною. Під час опромінення світлом ця захисна група відщеплюється, що спричинює вивільнення біологічно активного компонента, який, у свою чергу, викликає характерну його дію. Такий підхід дозволяє досягти високого рівня просторово-часового контролю над дією біологічно активної молекули на біологічну мішень.

На сьогодні синтезовано велику кількість кейдж-сполук різних класів біологічно активних молекул (іонів, нейромедіаторів, нуклеотидів, нуклеозидів, інозитолів, пептидів тощо) (Ellis-Davies, & Graham, 2007). Фотоліз більшості з них вимагає опромінення в ближньому ультрафіолетовому (УФ) діапазоні з піковою ефективністю близько 320–360 нм, що може бути потенційно шкідливим для живих об'єктів. У цьому контексті особливий інтерес становлять кейдж-сполуки на основі комплексів біс(2,2'-біпіридин)рутенію, які здатні вивільняти ліганди при опроміненні видимим світлом в діапазоні 400–500 нм, тим самим уникаючи шкідливого впливу УФ-випромінювання (Zayat et al., 2013). Серед них комплекс $Ru(bpy)_2Nic_2$, який під дією світла здатен контрольовано вивільняти нікотин, демонструє найвищий квантовий вихід (φ_s = 0,23) (Filevich et al., 2010). Поєднання фотоконтрольованого вивільнення з фармакологічною активністю нікотину як агоніста нікотинових ацетилхолінових рецепторів (нАХР) робить цей комплекс перспективним кандидатом для застосування в системах таргетної доставки лікарських засобів. Одним із потенційних носіїв $Ru(bpy)_2Nic_2$ можуть бути сцинтиляційні наночастинки, здатні випромінювати у видимому спектрі світло при рентгенівському опроміненні. У випадку, якщо цільова ділянка розташована в межах шлунково-кишкового тракту, джерело видимого світла може бути доставлене за допомогою оптоволокна.

Однак дані щодо короткотривалих ефектів як самого комплексу $Ru(bpy)_2Nic_2$, так і продуктів його фотолізу залишаються обмеженими. Це особливо актуально для гладеньких м'язів трахеї, де експресується α7-нАХР (Borkar et al., 2021). Нікотин за рахунок активації цих рецепторів викликає гіперреактивність дихальних шляхів через стимуляцію скорочувальної активності гладеньких м'язів (Borkar et al., 2021; Khalfaoui et al., 2023). У цьому контексті використання $Ru(bpy)_2Nic_2$ для дослідження впливу на скорочення гладеньких м'язів трахеї вважаємо перспективним напрямом. Зокрема, використання $Ru(bpy)_2Nic_2$ для локалізованого вивільнення нікотину дозволить застосовувати його при лікуванні злоякісних захворювань легень.

Метою роботи було вивчення впливу звичайного нікотину, $Ru(bpy)_2Nic_2$ та нікотину, вивільненого в результаті його фотолізу, на скорочення гладеньких м'язів трахеї щура.

Методи

Для експериментів брали трьохмісячних самців щурів лінії Вістар 250 ± 10 г. Вони піддавались евтаназії за рахунок поступового збільшення концентрації CO_2 у ємності, де перебував щур. Було дотримано протоколів відповідно до Директиви ЄС 2010/63/EU щодо експериментів на тваринах. Експериментальний протокол пройшов схвалення від Комітету з біоетики Інституту фізіології імені Богомольця згідно з дозволом № 1/25, наданим 08.01.2025. Щурів, які використовувалися в дослідженні, вирощували, утримували та доглядали у

© Кравчук Данило, Щеглов Олександр, 2025

ISSN 1728-3817 (Print), ISSN 2308-8036 (Online)

спеціалізованому тваринницькому закладі (віварії) інституту. Загалом було використано 12 щурів.

Потім виділяли зовнішню частину трахеї. Під стереомікроскопом трахею очищали від сполучної та жирової тканин. Потім трахею розрізали на сегменти із чотирьох кілець хрящів.

Для вимірювання скорочення гладеньких м'язів трахеї застосовували метод тензометрії. Для цього попередньо робочу камеру заповнювали розчином Кребса такого складу: 120 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, 1,2 мМ $MgCl_2$, 7 мМ HEPES, 5 мМ глюкози, pH 7,35 (скоригований NaOH). В експериментах використовували сегменти трахеї зі збереженим і видаленим епітелієм. Останній видаляли механічно. Сегмент трахеї вішали на два гачки, один з яких був зафіксований, а інший прикріплений до ємнісного датчика сили. Після цього препарату надавали початкове навантаження в 2 г і залишали в розчині урівноважуватись протягом 40 хв. Температура розчину була фіксованою, а саме 37 °C.

Під час експерименту дані скорочувальних відповідей гладеньких м'язів передавались на комп'ютер через АЦП Axon Instruments DigiData 1200 та відображались на моніторі в програмі Axon Instruments Clampex 8.0.

Для ініціації фотолізу $Ru(bpy)_2Nic_2$ був адаптований світлодіод високої потужності (LED) (Ekoras R7, Китай, 1300 лм, 6500 К), поєднаний із блоком живлення та електронним таймером. Спектр потужності джерела світла, дві смуги поглинання якого відповідають 420–470 нм і близько 532 нм, ідеально збігається зі спектрами поглинання $Ru(bpy)_2Nic_2$ (Filevich et al., 2010; Kravchuk et al., 2023). Для експериментів було підібрано відстань між сегментом траеї і джерелом світла в 10 см, що забезпечує 30 мВт потужності опромінення (Kravchuk et al., 2023).

(-)-Нікотин (Sigma-Aldrich) був розчинений як 1 мМ стоковий розчин, а $Ru(bpy)_2Nic_2$ (Abcam) – у дистильовані воді як 1 мМ стоковий розчин. Відповідні об'єми кожного основного розчину були додані безпосередньо в робочу камеру для досягнення бажаної кінцевої концентрації нікотину.

Вивільнення нікотину кількісно визначали за допомогою рідинної хроматографії високої роздільної здатності з оберненою фазою (ВЕРХ) на системі Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, США). Аналіз проводили на основі валідованої методики кількісного визначення нікотину (Tambwekar et al., 2003).

Використовували термостатично контрольовану хроматографічну колонку Inertsil ODS розміром 4,6 × 150 мм, 5 мкм (GL Sciences, Японія) при температурі 30 °C. Рухома фаза складалася з фосфатного буфера (10 мМ KH_2PO_4, pH 6,8) і метанолу у співвідношенні 35 : 65 % (о/о), яку подавали ізократично зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Детекцію здійснювали за допомогою УФ-детектора довжиною хвилі 259 нм, об'єм ін'єкції становив 10 мкл.

Статистичний аналіз та візуалізація проводилися в програмному середовищі R (R Core Team, 2021; RStudio Team, 2019). Дані нормалізувалися по амплітуді скорочення на тлі 90 мМ KCl. Для аналізу груп використовували непараметричний критерій знакових рангів Вілкоксона для двох залежних вибірок.

Результати

Ефективність фотолізу $Ru(bpy)_2Nic_2$ та вивільнення нікотину. Ефективність фотолізу $Ru(bpy)_2Nic_2$, викликаного світлом, і вивільнення зв'язаного нікотину було оцінено методом ВЕРХ із використанням попередньо встановлених концентрацій $Ru(bpy)_2Nic_2$ в розчині Кребса. По 1 мл кожного зразка було поміщено в ємності для опромінення. Зразки були попередньо розділені на дві групи. Перша група зразків мала фіксовану концентрацію $Ru(bpy)_2Nic_2$, а саме 400 мкМ, але різний час опромінення джерелом світла на відстані 10 см: 0, 15, 30, 120, 240 с. До другої групи належали зразки з однаковим часом опромінення, а саме 120 с, але з різною концентрацією $Ru(bpy)_2Nic_2$: 50, 100 та 400 мкМ. Потім у кожному зразку визначали концентрацію вільного нікотину методом ВЕРХ. З отриманих даних було побудовано відповідні залежності: для першої групи модельна крива була побудована шляхом підгонки до експериментальних даних за допомогою експоненційної функції (рис. 1, А), а для другої групи – за допомогою лінійної регресії (рис. 1, Б). Отримані результати свідчать про тенденцію до насичення концентрації вивільненого нікотину після 120 с світлового опромінення, при цьому максимальне значення становить приблизно 387 мкМ за заданих експериментальних умов. Це свідчить про те, що при фотолізі $Ru(bpy)_2Nic_2$ вивільняється лише одна молекула нікотину, тобто продуктами фотолізу є нікотин і $Ru(bpy)_2Nic$. Зазначимо також, що за фіксованої тривалості опромінення спостерігається лінійна залежність між вихідною концентрацією $Ru(bpy)_2Nic_2$ та концентрацією вивільненого нікотину.

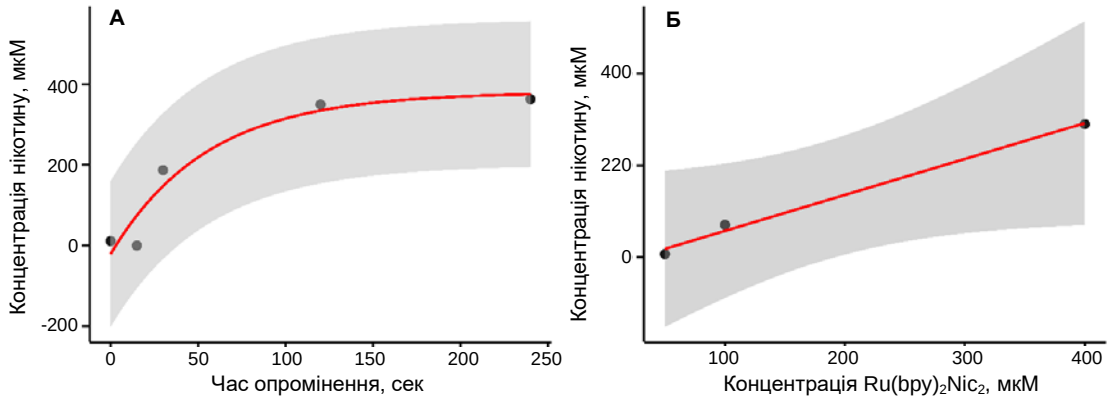

Рис. 1. Залежність концентрації нікотину, вивільненого в результаті фотолізу $Ru(bpy)_2Nic_2$:
А – залежність концентрації вивільненого нікотину від часу опромінення при початковій концентрації $Ru(bpy)_2Nic_2$ 400мкМ (стала часу 55,1 с); **Б** – лінійна залежність концентрації вивільненого нікотину від концентрації $Ru(bpy)_2Nic_2$ при опроміненні 120 с джерелом видимого світла (коефіцієнт нахилу 0,98). Сіра смуга на графіках – довірчий інтервал

Вплив $Ru(bpy)_2Nic_2$ на скорочення гладеньких м'язів трахеї щура. У гладеньких м'язах трахеї експресуються α7 та α3β4 нАХР (Borkar et al., 2021). У наших експериментах із вимірювання скорочення сегментів трахеї щура спочатку як позитивний контроль упродовж 3 хв аплікували 100 мкМ нікотину, а після 40 хв відмивання розчином Кребса додавали 400 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$ і опромінювали протягом 2 хв. Результати свідчать, що дія нікотину та $Ru(bpy)_2Nic_2$ сильно відрізняються (рис. 2). На відміну від транзієнтного характеру скорочення гладеньких м'язів трахеї у відповідь на дію 100 мкМ нікотину, скорочення гладеньких м'язів трахеї під дією 400 мкМ опроміненого джерелом видимого світла $Ru(bpy)_2Nic_2$ має фазно-тонічний характер скорочення, де фазна компонента плавно переходить у тонічне скорочення (рис. 2).

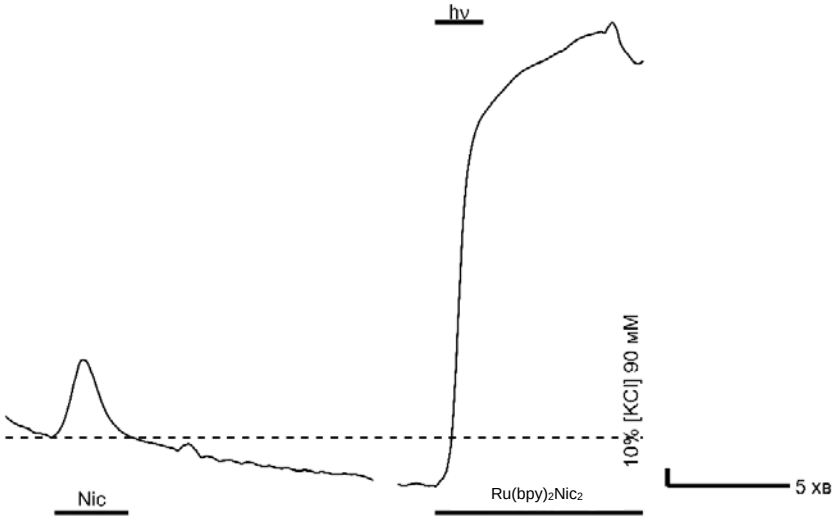

Рис. 2. Скорочення гладеньких м'язів трахеї щура зі збереженим епітелієм, викликане дією нікотину та $Ru(bpy)_2Nic_2$.
На лівому графіку відповідь на 100 мкМ нікотину (Nic). На правому графіку відповідь на дію опроміненого протягом 2 хв 400 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$. Усі дані нормовані на амплітуду скорочення 90 мМ KCl. Штрихова лінія вказує на вихідний рівень базального тонусу гладеньких м'язів трахеї. Символи hν над рискою у верхній частині рисунка – час опромінення $Ru(bpy)_2Nic_2$

Наступним кроком треба було визначити локалізацію рецепторів-мішеней для $Ru(bpy)_2Nic_2$, що викликають фазно-тонічне скорочення гладеньких м'язів трахеї. Спершу необхідно було визначити внесок епітеліальної тканини. Для цього було видалено епітеліальну тканину з трахеї перед проведенням експериментів. При аплікації 100 мкМ нікотину, а також 100 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$ з подальшим опроміненням протягом 2 хв спостерігали малої амплітуди фазні скорочення (рис. 3). Цей результат чітко свідчить про те, що всі основні процеси відбуваються в епітеліальній тканині трахеї, які потім формують фазно-тонічне скорочення, імовірно, через вивільнення біоактивних речовин, таких як простагландини та АТФ, які опосередковують скорочення гладеньких м'язів. Нікотин може взаємодіяти з нАХР епітеліальних клітин, стимулюючи каскад сигнальних шляхів, що зумовлюють секрецію цих медіаторів. Вивільнений АТФ, у свою чергу, може активувати P2X- та P2Y-пуринорецептори на поверхні гладеньких м'язових клітин, спричиняючи фазно-тонічне скорочення. Низькоамплітудні фазні скорочення після видалення епітелію вказують на те, що нікотин в обох випадках активує нікотинові ацетилхолінові рецептори безпосередньо на гладеньких м'язах трахеї. Треба зазначити, що реакція на нікотин за умов видалення епітелію значно менша, ніж за наявності останнього (Bucheimer, & Linden, 2004; Xu, & Cardell, 2014).

Отже, наші експерименти показали, що $Ru(bpy)_2Nic_2$ здатен активувати скорочення гладеньких м'язів трахеї не тільки за рахунок вивільненого нікотину при опроміненні, а й за рахунок вивільнення біологічно активних речовин з епітеліальних клітин.

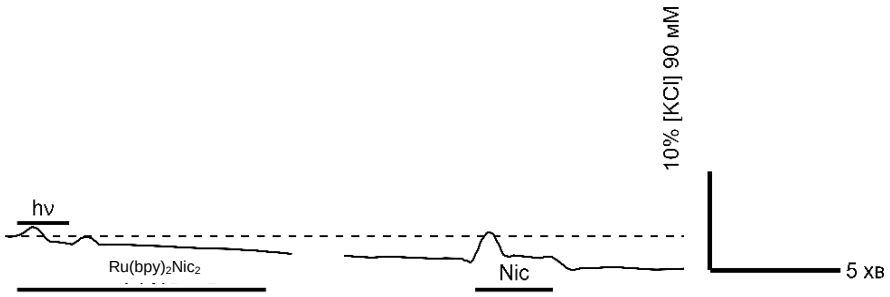

Рис. 3. Скорочення ГМ трахеї щура у відповідь на дію нікотину та $Ru(bpy)_2Nic_2$ за відсутності епітелію.
На лівому графіку відповідь на дію опроміненого протягом 2 хв 100 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$, на правому – відповідь на 100 мкМ нікотину (Nic). Усі дані нормовані на амплітуду скорочення 90 мМ KCl. Штрихова лінія вказує на початковий рівень базального тонусу гладеньких м'язів трахеї. Символи hν над рискою – час опромінення $Ru(bpy)_2Nic_2$

Щоб зрозуміти природу зазначеної реакції на дію опроміненого $Ru(bpy)_2Nic_2$, було проведено такі експерименти.

Наступним кроком було перевірено характер скорочення гладеньких м'язів трахеї на прикладання $Ru(bpy)_2Nic_2$, якщо заблокувати нАХР за допомогою гексаметонію. Для цього попередньо сегменти трахеї 40 хв витримували в розчині Кребса з 10 мкМ гексаметонію. Після цього аплікували 400 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$ та опромінювали одразу світлодіодним джерелом випромінювання протягом 2 хв (рис. 4).

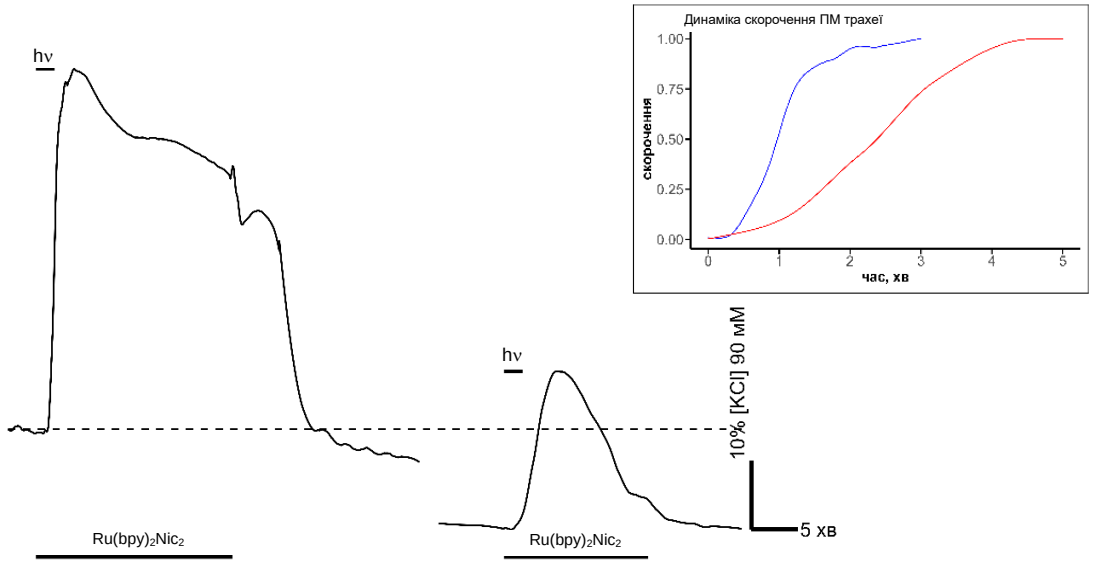

Рис. 4. Внесок нАХР у скороченні гладеньких м'язів трахеї щура на дію $Ru(bpy)_2Nic_2$.
Ліворуч – відповідь гладеньких м'язів трахеї на дію 400 мкМ опроміненого протягом 2 хв $Ru(bpy)_2Nic_2$ в контролі, праворуч – відповідь гладеньких м'язів на 400 мкМ опроміненого протягом 2 хв $Ru(bpy)_2Nic_2$ на тлі 10 мкМ гексаметонію.
На верхньому праворуч графіку зміни швидкості зростання скорочення гладеньких м'язів: синя крива – відповідь гладеньких м'язів трахеї на дію 400 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$, опроміненого протягом 2 хв у контролі; червона крива – відповідь гладеньких м'язів трахеї на дію 400 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$, опроміненого протягом 2 хв на тлі дії гексаметонію. Усі дані нормовані на амплітуду скорочення 90 мМ KCl. Штрихова лінія вказує на початковий рівень базального тонусу гладеньких м'язів трахеї. Символи hν над рискою – час опромінення $Ru(bpy)_2Nic_2$

Згідно з результатами відповідь на дію 400 мкМ опроміненого $Ru(bpy)_2Nic_2$ на тлі гексаметонію знизилась відносно контролю на 57 % ± 7 % (n=4, P<0,05) (рис. 4), а також спостерігалося зникнення стійкого тонічного компонента скорочення, характерного для відповіді на $Ru(bipy)_2Nic_2$. Останнє свідчить про те, що при опроміненні вивільнений нікотин бере участь у генерації швидкої фази скорочення. Графік у верхньому правому кутку на рис. 4 підтверджує це, а побічні продукти фотолізу $Ru(bpy)_2Nic_2$ беруть участь у формуванні фазно-тонічного компонента скорочення.

Далі постало питання, чи задіяні потенціалзалежні кальцієві канали мембрани гладеньком'язових клітин трахеї у скороченні викликаного $Ru(bpy)_2Nic_2$. Для цього було використано блокатор потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу нікардипін. Спочатку гладенькі м'язи трахеї піддавалися 40-хвилинному впливу 1 мкМ нікардипіну. Подальше додавання 400 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$ та опромінення світлодіодним джерелом світла протягом 2 хв не викликало скорочення гладеньких м'язів. Окрім цього, спостерігалось загальне падіння рівня базального тонусу на 11 % ± 4 % (n=4, P < 0,05) (рис. 5). Отже, скорочення гладеньких м′язів трахеї у відповідь на дію $Ru(bpy)_2Nic_2$ забезпечується входом кальцію через потенціалзалежні кальцієві канали L-типу мембрани гладеньком'язових клітин трахеї.

З літературних джерел відомо, що дія нікотину на гладенькі м′язи трахеї пов'язана не тільки з активацію нАХР, а й з вивільненням з епітеліальної тканини АТР і простагландинів (Bucheimer, & Linden, 2004; Xu, & Cardell, 2014). Тому далі постало питання, чи беруть участь пуринорецептори у формуванні тонічної компоненти скорочення гладеньких м'язів трахеї як відповідь на дію продуктів фотолізу $Ru(bpy)_2Nic_2$ (Satchell, 1984), а також чи залучені простагландини в механізмі відповіді гладеньких м'язів трахеї на продукти фотолізу $Ru(bpy)_2Nic_2$.

Спочатку заблокували циклооксигеназу 1/2 за допомогою 10 мкМ індометацину протягом 80 хв для пригнічення синтезу простагландинів (Meade et al., 1993). Результат показав, що на тлі пригнічення циклооксигенази 1/2 спостерігається зменшення рівня тонічної компоненти скорочення гладеньких м'язів трахеї на 72 % ± 9 % (n=5, P < 0,05) (рис. 6, А).

У наступному експерименті гладенькі м′язи витримували в розчині Кребса з 10 мкМ α,β-метилен АТФ і 100 мкМ Reactive Blue 2 протягом 60 хв для десенситезації інотропних P2X-пуринорецепторів і блокування метаботропних P2Y-пуринорецепторів. Як видно з рис. 6, Б, б, базальний тонус знизився на 32 % ± 3 % (n=4, P < 0,05), а максимальне значення скорочувальної відповіді на дію 100 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$ відповідає рівню контрольного значення в межах похибки (8,97 ± 0,8 мН, n=4). Після цього до розчину Кребса з 10 мкМ α,β-метилен АТФ та 100 мкМ Reactive Blue 2 додатково додали 10 мкМ індометацину й витримували 80 хв. Прикладання на їхньому тлі 100 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$ (рис. 6, Б, в) спричинювало незначне скорочення (0,50 ± 0,06 мН, n=4), яке, очевидно, формувалося за рахунок вивільненого нікотину. Результати цих експериментів показали, що найбільший внесок у формування тонічного компонента належить простагландинам. Внесок P2X- та P2Y-пуринорецепторів є, проте він, очевидно, маскується дією простагландинів.

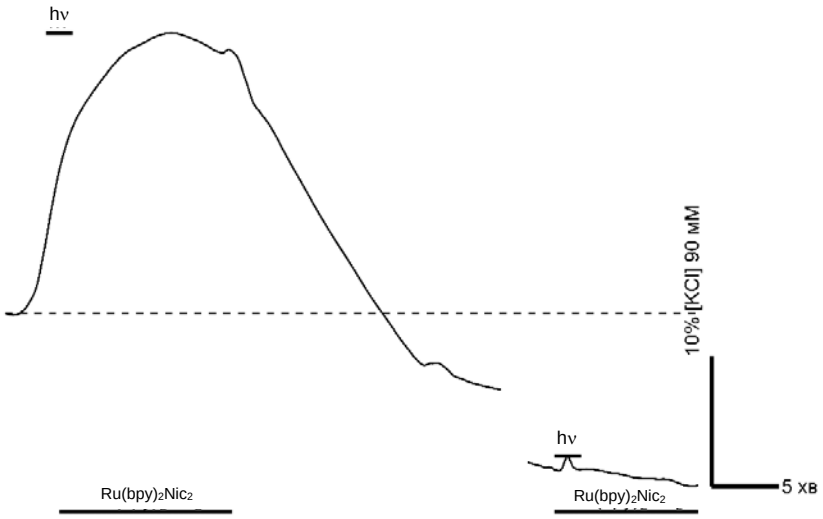

Рис. 5. Дія нікардипіну на скорочення гладеньких м'язів трахеї щура, викликане дією $Ru(bpy)_2Nic_2$.
На лівому графіку реакція гладеньких м'язів трахеї на дію 400 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$ в контролі, на правому – реакція гладеньких м'язів трахеї на прикладання 400 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$ на 40-й хв дії нікардипіну. Усі дані нормовані на амплітуду скорочення 90 мМ KCl.
Символи hν над рискою – час опромінення $Ru(bpy)_2Nic_2$

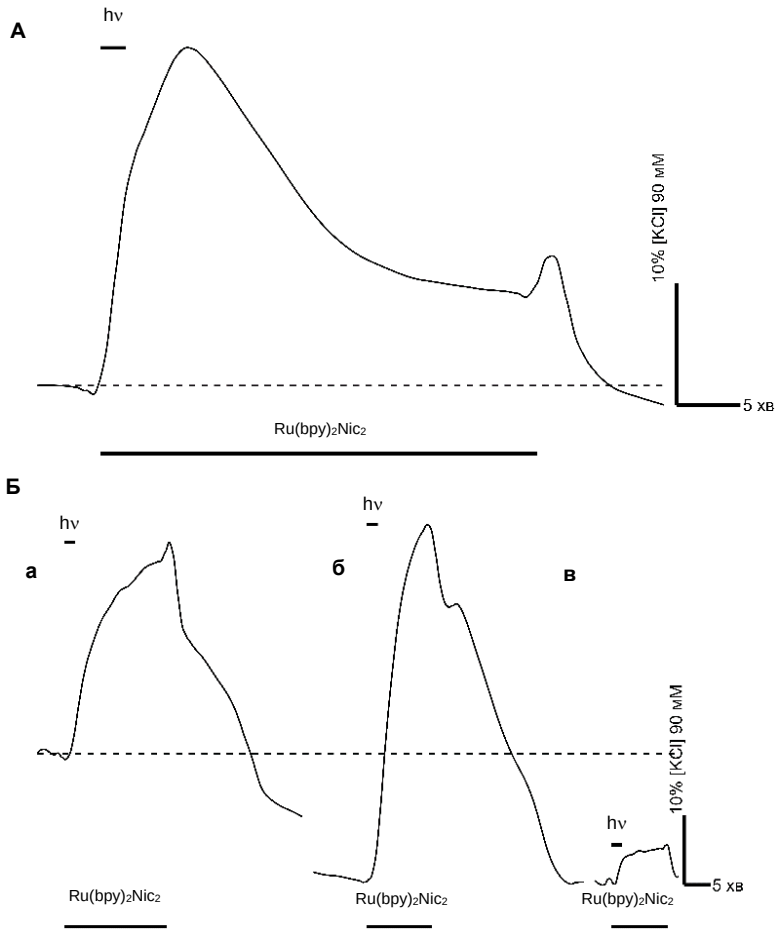

Рис. 6. Внесок простагландинів і пуринорецепторів у скорочення гладеньких м'язів трахеї щура, викликаного дію $Ru(bpy)_2Nic_2$.
А – реакція гладеньких м'язів трахеї на дію опроміненого 100 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$ на тлі 10 мкМ індометацину;
Б, а) – реакція гладеньких м'язів трахеї на дію опроміненого 100 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$ в контролі, **б)** – реакція гладеньких м'язів трахеї на дію 100 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$ на тлі 10 мкМ α, β-метилен АТФ і 100 мкМ Reactive Blue 2 (на зниженому базальному тонусі),
в) – реакція гладеньких м'язів трахеї на дію 100 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$ на тлі сумісної дії 10 мкМ α,β-метилен АТФ, 100 мкМ Reactive Blue 2 та 10 мкМ індометацину. Усі дані нормовані на амплітуду скорочення 90 мМ KCl.
Символи hν над рискою – час опромінення $Ru(bpy)_2Nic_2$

ISSN 1728-3817 (Print), ISSN 2308-8036 (Online)

Дискусія і висновки

У цій роботі ми кількісно визначили концентрацію вільного нікотину, який вивільняється в результаті фотолізу його кейдж-комплексу $Ru(bpy)_2$, за допомогою методу ВЕРХ і показали, що такий нікотин може бути використаний для коротко- і довгострокових біомедичних досліджень.

$Ru(bpy)_2$-комплекси, у яких захисна група видаляється під час фотолізу при опроміненні джерелом видимого світла, використовувалися для "закриття" низки біологічно активних сполук, включаючи інгібітор калієвих каналів 4-амінопіридин і нейромедіатори ГАМК, глутамат, серотонін, нікотин (Zayat et al., 2013). Такі комплекси мають важливу перевагу над сполуками, що активуються УФ-випромінюванням, оскільки запобігають шкідливому впливу УФ-світла на органи, тканини та клітини й потребують дешевих і легкодоступних джерел світла. Серед цих сполук при опроміненні біологічно безпечним світлом у діапазоні 420–470 та 532 нм із $Ru(bpy)_2Nic_2$ вивільняється вільний нікотин з одним із найвищих можливих квантових виходів φ_s = 0.23 (Filevich et al., 2010).

У наших експериментах опромінення 400 мкМ $Ru(bpy)_2Nic_2$ від світлодіодного джерела світла, спектр якого відповідає поглинанню $Ru(bpy)_2Nic_2$ і створює потужність опромінення 30 мВт, здатне вивільнити 387 мкМ нікотину при опроміненні тривалістю 120 с (рис. 1, А).

В експериментах на гладеньких м'язах зовнішньої частини трахеї щура показано, за рахунок чого формується фазно-тонічне скорочення під дією продуктів фотолізу $Ru(bpy)_2Nic_2$. Невідповідність реакції на нікотин та опромінений $Ru(bpy)_2Nic_2$ пов'язана з побічним продуктом фотолізу.

У першу чергу вивільнений нікотин бере участь у формуванні швидкої фази фазно-тонічного скорочення. Також у формуванні фазно-тонічного компонента скорочення беруть участь P2X- та P2Y-пуринорецептори через дію побічних продуктів фотолізу $Ru(bpy)_2Nic_2$.

Загалом результати нашого дослідження показують, що $Ru(bpy)_2Nic_2$ може бути хорошим джерелом вільного нікотину для коротко- і довгострокових біомедичних досліджень. Фотоліз $Ru(bpy)_2Nic_2$ є досить ефективним і може забезпечити біологічно релевантні концентрації нікотину при прийнятних концентраціях вихідного матеріалу з використанням простих, недорогих і доступних джерел світла.

Внесок авторів: Данило Кравчук – концептуалізація, аналіз даних, написання рукопису; Олександр Щеглов – проведення експериментів методом ВЕРХ, написання методики ВЕРХ.

Список використаних джерел

Borkar, N. A., Roos, B., Prakash, Y. S., Sathish, V., & Pabelick, C. M. (2021). Nicotinic α7 acetylcholine receptor (α7nAChR) in human airway smooth muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 706. https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108897

Bucheimer, R. E., & Linden, J. (2004). Purinergic regulation of epithelial transport. *Journal of Physiology,* 555(2), 311–321. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.056697

Ellis-Davies, & Graham, C. R. (2007). Caged compounds: Photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nature Methods*, 4(8), 619–628. https://doi.org/10.1038/nmeth1072

Filevich, O., Salierno, M., & Etchenique, R. (2010). A caged nicotine with nanosecond range kinetics and visible light sensitivity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(12), 1248–1251. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.08.003

Khalfaoui, L., Mukhtasimova, N., Kelley, B., Wells, N., Teske, J. J., Roos, B. B., Borkar, N. A., Zhang, E. Y., Sine, S. M., Prakash, Y. S., & Pabelick, C. M. (2023). Functional a7 nicotinic receptors in human airway smooth muscle increase intracellular calcium concentration and contractility in asthmatics. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, 325(1), L17–L29. https://doi.org/10.1152/ajplung.00260.2022

Kravchuk, D. I., Sotkis, G. V., Shcherbatiuk, M. M., Kravchuk, R. M., Nazarenko, V. G., Gorbyk, P. P., & Shuba, Y. M. (2023). Induction of A549 Nonsmall-Cell Lung Cancer Cells Proliferation by Photoreleased Nicotine. *Photochemistry and Photobiology*, 99(1), 78–82. https://doi.org/10.1111/php.13652

Meade, E. A., Smith, W. L., & DeWitt, D. L. (1993). Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Biological Chemistry*, 268(9), 6610–6614. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53294-4

R Core Team. (2021). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (4.1.2). https://www.R-project.org/.

RStudio Team. (2019). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. https://www.rstudio.com/.

Satchell, D. (1984). Purine receptors: classification and properties. *Trends in Pharmacological Sciences*, 5, 340–343. https://doi.org/1016/0165-6147(84)90464-4

Tambwekar, K. R., Kakariya, R. B., & Garg, S. (2003). A validated high performance liquid chromatographic method for analysis of nicotine in pure form and from formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(3), 441–450. https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00236-X

Xu, Y., & Cardell, L. O. (2014). Nicotine impairs cyclooxygenase-2-dependent kinin-receptor-mediated murine airway relaxations. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 275(1), 12–21. https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.12.013

Zayat, L., Filevich, O., Baraldo, L. M., & Etchenique, R. (2013). Ruthenium polypyridyl phototriggers: From beginnings to perspectives. In *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences,* 371, 1995. Royal Society. https://doi.org/10.1098/rsta.2012.0330

References

Borkar, N. A., Roos, B., Prakash, Y. S., Sathish, V., & Pabelick, C. M. (2021). Nicotinic α7 acetylcholine receptor (α7nAChR) in human airway smooth muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 706. https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108897

Bucheimer, R. E., & Linden, J. (2004). Purinergic regulation of epithelial transport. *Journal of Physiology,* 555(2), 311–321. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.056697

Ellis-Davies, & Graham, C. R. (2007). Caged compounds: Photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nature Methods*, 4(8), 619–628. https://doi.org/10.1038/nmeth1072

Filevich, O., Salierno, M., & Etchenique, R. (2010). A caged nicotine with nanosecond range kinetics and visible light sensitivity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(12), 1248–1251. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.08.003

Khalfaoui, L., Mukhtasimova, N., Kelley, B., Wells, N., Teske, J. J., Roos, B. B., Borkar, N. A., Zhang, E. Y., Sine, S. M., Prakash, Y. S., & Pabelick, C. M. (2023). Functional a7 nicotinic receptors in human airway smooth muscle increase intracellular calcium concentration and contractility in asthmatics. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, 325(1), L17–L29. https://doi.org/10.1152/ajplung.00260.2022

Kravchuk, D. I., Sotkis, G. V., Shcherbatiuk, M. M., Kravchuk, R. M., Nazarenko, V. G., Gorbyk, P. P., & Shuba, Y. M. (2023). Induction of A549 Nonsmall-Cell Lung Cancer Cells Proliferation by Photoreleased Nicotine. *Photochemistry and Photobiology*, 99(1), 78–82. https://doi.org/10.1111/php.13652

Meade, E. A., Smith, W. L., & DeWitt, D. L. (1993). Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Biological Chemistry*, 268(9), 6610–6614. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53294-4

R Core Team. (2021). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (4.1.2). https://www.R-project.org/.

RStudio Team. (2019). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. https://www.rstudio.com/.

Satchell, D. (1984). Purine receptors: classification and properties. *Trends in Pharmacological Sciences*, 5, 340–343. https://doi.org/1016/0165-6147(84)90464-4

Tambwekar, K. R., Kakariya, R. B., & Garg, S. (2003). A validated high performance liquid chromatographic method for analysis of nicotine in pure form and from formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(3), 441–450. https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00236-X

Xu, Y., & Cardell, L. O. (2014). Nicotine impairs cyclooxygenase-2-dependent kinin-receptor-mediated murine airway relaxations. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 275(1), 12–21. https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.12.013

Zayat, L., Filevich, O., Baraldo, L. M., & Etchenique, R. (2013). Ruthenium polypyridyl phototriggers: From beginnings to perspectives. In *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences,* 371, 1995. Royal Society. https://doi.org/10.1098/rsta.2012.0330

Отримано редакцією журналу / Received: 10.06.25
Прорецензовано / Revised: 13.07.25
Схвалено до друку / Accepted: 28.08.25

Danylo KRAVCHUK, Junior Researcher
ORCID ID: 0000-0003-4667-5348
e-mail: not.now.d@biph.kiev.ua
Taras Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Oleksandr SHCHEHLOV, PhD Student
ORCID ID: 0009-0009-7772-3083
e-mail: ol.shchehlov@gmail.com
Chuiko Institute of Surface Chemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

PHOTOCONTROLLED RELEASE OF NICOTINE FROM RU(BPY)$_2$NIC$_2$ AND ITS EFFECT ON RAT TRACHEAL SMOOTH MUSCLE CONTRACTION

B a c k g r o u n d . ***Ru(bpy)$_2$Nic$_2$, a bipyridine ruthenium complex, is a light-sensitive compound*** *capable of releasing* ***nicotine upon irradiation with visible light (420–470 nm). Given its high quantum yield (φ_s = 0.23), it offers precise control over nicotine release, making it a valuable tool for investigating nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) activation in biomedical research.***

M e t h o d s . ***High-performance liquid chromatography (HPLC) and tensometric analysis of rat tracheal smooth muscle contractions were used in this study.***

R e s u l t s . ***Experimental findings demonstrated that Ru(bpy)$_2$Nic$_2$ induces a phasic-tonic contraction pattern in rat tracheal smooth muscle. The phasic phase is initiated by nicotine, while photolysis by-products activate P2X and P2Y purinergic receptors and stimulate prostaglandin release from the tracheal epithelium, thereby contributing to the sustained tonic component of contraction.***

C o n c l u s i o n s . ***Overall, Ru(bpy)$_2$Nic$_2$ provides an efficient and controllable nicotine source for biomedical research, with high photolysis efficiency and the ability to generate biologically relevant nicotine concentrations using accessible light sources.***

K e y w o r d s : ***caged compounds, Ru(bpy)$_2$Nic$_2$ complexes, nicotine, tracheal smooth muscle, tensometric measurements.***

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results