

О Г Л Я Д И

УДК 577.27

НИКОТИНОВІ РЕЦЕПТОРИ НЕЙРОННОГО ТИПУ: БУДОВА І ФУНКЦІЇ У КЛІТИНАХ РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ

М. В. СКОК

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: skok@biochem.kiev.ua

В обзоре приведены современные данные литературы о субъединичной структуре и функциях никотиновых ацетилхолиновых рецепторов нейронного типа в возбудимых (мозг и вегетативные ганглии) и невозбудимых (эпителий дыхательных путей, эндотелий сосудов, кожа, кровь) тканях. Особое внимание уделено экспрессии и роли никотиновых рецепторов в клетках иммунной системы.

К л ю ч е в ы е с л о в а: никотиновый ацетилхолиновый рецептор, мозг, ганглии, невозбудимые клетки, лимфоциты.

Нікотинові ацетилхолінові рецептори (нАХР), як і рецептори γ -аміномасляної кислоти, гліцину та 5-НТ₃-серотоніну, належать до суперсімейства іонних каналів, що відкриваються лігандами [1]. Всі нАХР поділяють на дві великі групи: м'язові, що містяться у скелетних м'язах різних тварин і електричних органах риб, та нейронні, які виявлено в нейронах центральної та автономної нервової системи і в деяких незбудливих клітинах [2–5]. М'язові нАХР однакові в усіх м'язах особин певного виду, а нейронні – утворюються за різних комбінацій субодиниць. Їм притаманна неоднакова фармакологічна чутливість та функції як у різних частинах мозку, так і в автономних гангліях різної локалізації [6–7].

Історично нАХР м'язового типу був першим клітинним рецептором, будову якого детально вивчили, перш за все, завдяки великій кількості їх в електричних органах риб. На прикладі цього рецептора було визначено загальні принципи організації нАХР, в т.ч. і нейронного типу.

1. Загальні принципи організації і функціонування нАХР

Нікотинові рецептори є пентамерними білками з молекулярною масою близько 300 кДа. Субодиниці нАХР об'єднуються навколо іонного каналу у вигляді “бочки”. Ацетилхолін зв'язується в кишені (порожнині) її зовнішньоклітинної частини, розташованій на межі двох субодиниць. Згідно з даними електронної мікроскопії, субодиниці цього рецептора, виділеного з електричного органу ската *Torpedo marmorata*, завдовжки 12 нм, виступають над мембраною майже на 6 нм,

в той час як цитоплазматична частина їх становить лише 2 нм. Субодиниці розташовані перпендикулярно до мембрани навколо осі симетрії і оточують пору (канал) з діаметром у верхній частині 1,0–1,5 нм, який звужується донизу. Сайт зв'язування ацетилхоліну розташований на відстані близько 3,0 нм над мембраною [8].

М'язовий тип рецептора включає п'ять детермінованих субодиниць – $\alpha 1$, $\beta 1$, γ та δ/ϵ , які названо за порядком збільшення їхньої молекулярної маси, що становить 38, 50, 57 і 64 кДа відповідно [5]. З відкриттям нейронних нАХР α -субодиницями стали називати білки, в молекулі яких є два залишки цистеїну, розташованих, як і у м'язового рецептора, в положеннях 192 і 193. Вони необхідні для утворення сайту зв'язування ацетилхоліну. Субодиниці, які не мають цієї пари цистеїнів, називають структурними або β -субодиницями. В мозку людини ідентифіковано гени дев'яти субодиниць: $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$. Опубліковано також дані стосовно наявності в деяких видів тварин генів $\alpha 8$ -, $\alpha 9$ - та $\alpha 10$ -субодиниць [9]. Їхня молекулярна маса варіює від 50 ($\beta 2$) до 75 ($\alpha 4$) кДа.

В усіх субодиницях нАХР виявлено велику зовнішньоклітинну N-кінцеву послідовність із петлею, утвореною дисульфідним зв'язком, і сайти N-глікозилювання; три трансмембранні ділянки (M1–M3), розташовані відразу після зовнішньоклітинного домену; великий цитоплазматичний домен, що містить сайти фосфорилювання; четвертий трансмембранний домен (M4) та короткий C-кінцевий зовнішньоклітинний хвіст.

Сайти зв'язування головних агоністів і антагоністів містяться в N-кінцевому зовнішньоклітинному домені. Іонний канал сформовано

трансмембранними ділянками, а передача сигналу від рецептора всередину клітини і зв'язування з цитоскелетом опосередковується великим цитоплазматичним доменом. Субодиниці поєднуються одна з одною нековалентно ділянками N-кінцевого зовнішньоклітинного і великого цитоплазматичного доменів [5].

За штучної експресії різних комбінацій генів субодиниць nAChR в гетерологічних системах — ооцитах жаби *Xenopus* або клітинах ембріональної нирки людини — було визначено, які саме комбінації субодиниць причетні до утворення функціонального рецептора. Так, було виявлено, що субодиниці $\alpha 7$, $\alpha 8$ і $\alpha 9$ можуть утворювати гомопентамерні рецептори, в той час як інші субодиниці об'єднуються в гетеропентамер, що, зазвичай, містить дві α - і три β -субодиниці. Субодиниці $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ та $\alpha 6$ можуть контактувати з $\beta 2$ - або $\beta 4$ -субодиницями [10]; $\alpha 5$ -субодиниця здатна поєднуватись із комплексами $\alpha 3\beta 4$ або з $\alpha 4\beta 2$ [11], але не утворює функціональних рецепторів у комбінації тільки з $\beta 2$ - і $\beta 4$ -субодиницями [12]. Субодиниця $\beta 3$, якій притаманна висока гомологія в послідовності амінокислот з $\alpha 5$ -субодиницею, вірогідно, поводить себе аналогічно [13]. Субодиниця $\alpha 7$ може комбінуватись також із $\alpha 5$ - та $\beta 2$ -субодиницями, утворюючи гетеропентамер [14]. Оскільки центр зв'язування ацетилхоліну міститься на межі між α - і не α -субодиницями, то порядок розміщення субодиниць навколо каналу в гетеромерних nAChR є таким: $\alpha 3\beta 4\alpha 3\beta 4\beta 4$, $\alpha 4\beta 2\alpha 4\beta 2\beta 2$, $\alpha 4\beta 2\alpha 4\beta 2\alpha 5$ або $\alpha 3\beta 4\alpha 3\beta 2\alpha 5$. Відповідно, у м'язових і гетеромерних нейронних nAChR виявлено два, а у гомомерних — п'ять центрів зв'язування ацетилхоліну.

Приєднання двох молекул ацетилхоліну зумовлює конформаційні зміни в молекулі nAChR. Вважають, що субодиниці, орієнтовані навколо іонного каналу, повертаються проти годинникової стрілки, внаслідок чого діаметр центральної пори (каналу) збільшується. М'язовий тип nAChR проникний, переважно, для Na^+ , в той час як нейронні nAChR, передусім гомомерних субтипів, характеризуються, крім того, й істотною проникністю для Ca^{2+} [15]. Канал залишається відкритим протягом мілісекунд, а потім рецептор переходить у стан десенситизації, для якого притаманна висока афінність до агоністів, але закритий канал [16–17]. За нормальних умов ацетилхолін швидко відокремлюється від рецептора і руйнується ацетилхолінестеразою, після чого рецептор знов повертається в чутливий до активації стан. За постійної присутності агоніста більшість nAChR переходить у десенситизаційний стан, який може бути досягнуто навіть без проміжного стану відкритого каналу. Десенситиза-

ція є загальною властивістю рецепторів суперсімейства, до якого належить nAChR.

2. Будова і функції nAChR у центральній нервовій системі

2.1. Субодиничний склад nAChR мозку

Методом гібридизації *in situ* в мозку виявлено мРНК субодиниць nAChR: $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 3$ і $\beta 4$, причому вони нерівномірно розподіляються в різних ділянках мозку. Так, у корі мозку було ідентифіковано переважно субодиниці $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$ і $\beta 2$, в таламусі — $\alpha 3$, $\alpha 5$ і $\beta 4$, в гіпокампі — $\alpha 3$, $\alpha 7$ і $\beta 2$. Найпоширенішою виявилася $\beta 2$ -субодиниця, наявність якої констатовано майже в усіх відділах мозку [18]. Субодиниця $\alpha 3$ локалізується в таламусі і в більшості частин кори [19–22], а субодиниця $\alpha 4$ зустрічається частіше, ніж $\alpha 3$ [22].

Наявність мРНК субодиниць nAChR корелює з даними авторадіографії щодо зв'язування радіоактивних агоністів та антагоністів. Таким способом було ідентифіковано, принаймні, два типи сайтів зв'язування: з високою афінністю до [^{125}I] α -бунгаротоксину (α -БГТ) і низькою до [^3H]нікотину та ацетилхоліну (перший) і, навпаки, з високою афінністю до [^3H]нікотину та [^3H]епібатидину і низькою — до [^{125}I] α -БГТ (другий), що відповідали гомомерним і гетеромерним nAChR [23]. У подальших експериментах було з'ясовано, що гетеромерні nAChR за афінністю до нікотину і епібатидину можна розділити на дві групи [24]. Таким чином, використання аналізу зв'язування радіоактивних лігандів дозволило визначити три субтипи nAChR в мозку: один гомомерний, вірогідно $\alpha 7$, і, принаймні, два гетеромерних [8]. За допомогою електрофізіологічних підходів, таких як “петч-клемп”, було класифіковано чотири типи мембранних струмів, індукованих у мозку щурів ацетилхоліном [25]. Перший тип струму виявлено у 83% нейронів; він характеризувався швидким розпадом, блокувався α -БГТ та метиллікаконітином (МЛА) і належав до $\alpha 7$ nAChR. Другий тип, який було ідентифіковано у 10% нейронів, розділявся на дві компоненти — зі швидким та повільним розпадом і блокувався МЛА та дигідро- β -еритроїдином (ДГ β Е), внаслідок чого його було віднесено до суміші $\alpha 4\beta 2$ і $\alpha 7$ nAChR. Третньому типу струмів (у 5% нейронів) був властивий повільний розпад і блокування ДГ β Е, тобто він належав до $\alpha 4\beta 2$ nAChR. І, нарешті, четвертий тип струмів, який було зареєстровано у 2% нейронів, характеризувався повільним розпадом, його було віднесено до $\alpha 3\beta 4$ nAChR.

Дані, одержані електрофізіологічними методами, підтверджено експериментами з мутант-

ними мишами, нокаутованими (дефіцитними) за генами $\alpha 3$ - [26], $\alpha 4$ - [27], $\alpha 7$ - [28], $\alpha 9$ - [29], $\beta 2$ - [30] і $\beta 4$ - [26] субодиниць nAChR. Так, у мозку мишей, нокаутованих за геном $\alpha 7$ -субодиниці, не виявлено сайтів зв'язування α -БГТ, але при цьому не змінювалась здатність до високоафінного зв'язування нікотину. Крім того, у мутантних мишей не реєструвались швидкі, індуковані нікотинном, струми в гіпокампі, що блокувались МЛІА. Таким чином, було підтверджено наявність у мозку nAChR типу 1 ($\alpha 7$).

Навпаки, миші, нокаутовані за генами $\alpha 4$ - і $\beta 2$ -субодиниць, зберігали сайти зв'язування α -БГТ, але втрачали високоафінні сайти зв'язування нікотину та епібатидину у більшості відділів мозку, що підтверджує наявність в ньому $\alpha 4\beta 2$ nAChR (типу 2). Низький рівень зв'язування, що залишався в $\alpha 4$ -нокаутів, було віднесено до $\alpha 3\beta 2$ або $\alpha 6\beta 2$ nAChR [31, 26]. Крім того, за афінності зв'язування агоністів у мишей, нокаутованих за геном $\beta 2$ - субодиниці, ідентифікували рецептори типу 3 ($\alpha 3\beta 4$) і 4 ($\alpha 2\beta 4$ або $\alpha 4\beta 4$). Такий склад їх підтверджувався також даними гібридизації *in situ*.

Отже, виявилось, що в мозку є nAChR, принаймні, чотирьох субтипів: гомомерні $\alpha 7$ і гетеромерні $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ та $\alpha 2\beta 4$ ($\alpha 4\beta 4$), більшу частину їх становлять рецептори $\alpha 7$ і $\alpha 4\beta 2$. Хоча ці дані було одержано в експериментах з мозком гризунів, використання комп'ютерної томографії *in vivo* і розподілу мРНК та сайтів зв'язування специфічних лігандів *post mortem*, вважають, що подібний склад nAChR властивий також мозку людини.

2.2. Функції nAChR в мозку

В нервово-м'язових синапсах скелетних м'язів nAChR виконують класичну постсинаптичну роль, тобто посилюють незначні струми в нервовому волокні для індукції потенціалу дії в м'язовому волокні, що є ключовим механізмом скорочення м'язів.

На відміну від м'язів, у багатьох ділянках мозку nAChR локалізуються як постсинаптично, так і пресинаптично. Активація пресинаптичних nAChR зумовлює деполаризацію мембрани і надходження у клітину іонів Са, що полегшує вивільнення багатьох нейромедіаторів, зокрема ацетилхоліну, допаміну, серотоніну, γ -аміномасляної кислоти та глутамату, які безпосередньо або опосередковано впливають на здійснення багатьох видів поведінки [32]. Тому пропонується вважати, що головна роль nAChR у мозку полягає в модуляції збудливості нейронів, в т.ч. і шляхом впливу на діяльність інших рецепторів. Розподіл nAChR на пресинаптичні і постсинаптичні не

пов'язаний з певними субтипами рецептора: один субтип (наприклад $\alpha 7$) зустрічається як у пресинаптичних, так і постсинаптичних рецепторах. Характерною ознакою нейронних nAChR, яка відрізняє їх від м'язових рецепторів, є внутрішнє спрямлення залежності струм – напруга: ці іонні канали відкриваються тільки за негативних значень мембранного потенціалу. Відповідно, вони можуть бути активовані лише тоді, коли нейрон перебуває “у спокої”. Ця властивість залежить від внутрішньоклітинних факторів, таких як наявність іонів Mg і/або поліамінів сперміну та спермідину [33].

Функції nAChR центральної нервової системи виявляються, перш за все, при вивченні дії на неї нікотину, який є потужним модулятором функцій мозку. Він посилює іонні струми і вивільнення нейромедіаторів, що впливає на функціонування нейронів мозку і модулює поведінку істоти. Введення нікотину в організм десинхронізує електроенцефалограму [34], збільшує кровопостачання та утилізацію глюкози в мозку [35]. У людей нікотин загострює увагу і розумові здібності [36], а також прискорює реагування на ті чи інші чинники та поліпшує здатність стримувати неадекватні реакції [37]. Нікотин інтенсифікує швидкість і точність моторних реакцій та поліпшує виконання складних психомоторних завдань, зокрема таких, як керування автомобілем [38].

Інформацію про роль нікотину у процесах пам'яті було одержано в експериментах з вивчення поведінки нокаутованих мишей. Зокрема, в тесті пасивного уникання (вимірювали час затримки перед виконанням високовірогідної відповіді, за яку в попередніх тренувальних експериментах тварину було покарано) миші, нокаутовані за геном субодиниці $\beta 2$, значно відрізнялись від тварин дикого типу. Хронічне надходження в організм низьких доз нікотину (0,01 мг/кг маси) істотно підвищувало здатність до виконання тесту в мишей дикого типу, але ніяк не впливало на здібності мутантних мишей. Результати цих експериментів показали, що нікотин позитивно діє на процеси пам'яті і його дію опосередковано nAChR $\alpha 4\beta 2$ -субтипу [39].

Наведені дані свідчать, що nAChR мозку відіграють важливу роль у процесах пам'яті і розумових здібностях. Цю думку також підтверджують дані щодо значного зниження кількості nAChR у мозку людей, хворих на нейродегенеративні хвороби Паркінсона і Альцгеймера [6, 40].

3. Будова і функції nAChR в автономній нервовій системі

Нікотин підвищує частоту биття серця і кров'яний тиск [41–42], що свідчить про наявність

НАХР в автономній нервовій системі. Дійсно, їх було виявлено в усіх автономних гангліях та сплетіннях [7]. Вони опосередковували швидку синаптичну передачу і, крім того, могли взаємодіяти з іншими рецепторами, зокрема з рецепторами до АТР [43–44].

За допомогою генетичного (полімеразна ланцюгова реакція, гібридизація *in situ*), фармакологічного (селективність, провідність і кінетика відкриття іонного каналу) та імунохімічного (використання специфічних антитіл) підходів було з'ясовано, що в автономній нервовій системі містяться такі субодиниці НАХР, як $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ і $\beta 4$ [7].

Основними субтипами гангліонарних НАХР вважають гетеромерний $\alpha 3\beta 4$ і гомомерний $\alpha 7$ [45–46]. Показано, що пептидні мотиви великого цитоплазматичного домену субодиниці $\alpha 3$ визначають її локалізацію саме в синапсах нейронів [47]. Субтип $\alpha 3\beta 4$ міститься в нейронах верхнього шийного ганглія щура і в циліарному ганглії курчати [48–49], хоча, згідно з даними інших авторів, в останньому випадку у складі рецептора ідентифіковано також $\alpha 5$ -субодиницю, тобто утворюється пентамер $(\alpha 3)_2(\beta 4)_2 \alpha 5$, а у 20% нейронів виявлено також $\beta 2$ -субодиницю [50]. В деяких гангліях є субтип $\alpha 3\beta 2$ [51]. Тип β -субодиниці відіграє важливу роль у функціонуванні рецептора: $\alpha 3\beta 4$ і $\alpha 3\beta 2$ НАХР, експресовані в гетерологічній системі, мали неоднакові фармакологічні та функціональні властивості [52]. В парасимпатичних нейронах щура було зареєстровано мембранні струми, що відповідали рецепторам субтипів $\alpha 3\beta 4$ і $\alpha 3\beta 2$ [53]. Субтип НАХР, що містить $\alpha 3$ -субодиницю, бере участь у безпосередній синаптичній передачі в гангліях, пропускаючи у клітину як одновалентні (Na^+), так і двовалентні (Ca^{2+}) катіони [54]. Нами було встановлено, що $\alpha 3$ -субодиниці НАХР містяться у верхньому шийному і інтракардіальному гангліях щура [55], підслизовому сплетінні [56] та нижньому брижовому ганглії [57–58] морської свинки, де вони задіяні в синаптичній передачі. У верхньому шийному і нижньому брижовому гангліях $\alpha 3$ -субодиниці, вірогідно, об'єднуються з $\alpha 5$ -субодиницями, а в інтракардіальному ганглії, принаймні, частина НАХР містить тільки $\alpha 3$ -субодиницю. Використавши в експериментах $\beta 2$ - і $\beta 4$ -специфічні антитіла, ми встановили, що нейрони нижнього брижового ганглія містять $\alpha 3\beta 4$ - і $\alpha 3\beta 2\beta 4$ -субтипи НАХР [59].

В циліарному ганглії курчати ідентифіковано здебільшого НАХР $\alpha 7$ -субтипу [60]. Навпаки, в інтракардіальному ганглії щура і у клітинах феохромоцитомі РС-12 ми виявили значно меншу кількість $\alpha 7$ -позитивних нейронів, ніж $\alpha 3/\alpha 5$ -по-

зитивних клітин (РС-12) або $\alpha 4$ -позитивних клітин (інтракардіальний ганглії). Субодиниця $\alpha 7$ притаманна нейронам верхнього шийного ганглія щура [55, 62], підслизового сплетіння [56] і нижнього брижового ганглія [57–58] морської свинки. У верхньому шийному ганглії $\alpha 7$ -специфічні антитіла мітили всі 100% клітин, а в підслизовому сплетінні – лише 4%. Як зазначалося вище, $\alpha 7$ -субодиниці утворюють функціональні гомопентамери, значно проникливіші для іонів Ca , ніж інші субтипи НАХР. Це означає, що $\alpha 7$ -НАХР можуть впливати на Ca^{2+} -залежні події в автономних гангліях [63]. Дійсно, було встановлено, що, на відміну від $\alpha 3\beta 4$ НАХР, $\alpha 7$ -субтип рецептора, локалізований як пост-, так і пресинаптично, не тільки безпосередньо опосередковує передачу, але й модулює вивільнення інших медіаторів, відіграючи важливу роль у регуляції росту і диференціації нейронів [64]. Крім того, встановлено, що $\alpha 7$ -субодиниця може включатися до складу, принаймні, трьох субтипів гетеромерних НАХР, роль яких в автономних гангліях ще не з'ясовано [56, 65].

На відміну від нейронів мозку, де головним гетеромерним субтипом НАХР вважають $\alpha 4\beta 2$, дані стосовно наявності $\alpha 4$ -субодиниці в автономних гангліях неоднозначні [7]. За допомогою $\alpha 4$ -специфічних антитіл ми виявили $\alpha 4$ -субодиниці у верхньому шийному та інтракардіальному гангліях щура [55], але не в підслизовому сплетінні і не в нижньому брижовому ганглії морської свинки [56–58]. При цьому в інтракардіальному ганглії відсоток $\alpha 4$ -позитивних клітин був вищим (понад 40%) , ніж $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ - або $\alpha 7$ -позитивних нейронів, в той час як у верхньому шийному ганглії $\alpha 4$ -позитивне забарвлення спостерігалися у вдвічі меншій кількості клітин, ніж $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ - або $\alpha 7$ -позитивне, і мітяться здебільшого “малі” нейрони [55].

Оскільки епітоп одержаних нами $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ - і $\alpha 7$ -специфічних антитіл перекривається зі сайтом зв'язування ацетилхоліну [66], ці антитіла були функціонально активними і блокували мембранні струми, індуковані як аплікацією ацетилхоліну [55–56, 67], так і подразненням відповідних пресинаптичних нервів [57, 68]. Останні дані свідчать, що НАХР беруть безпосередню участь у синаптичній передачі в інтракардіальному та нижньому брижовому гангліях. Послідовне додавання антитіл неоднакової специфічності зумовлює блокування різних субтипів НАХР, що дозволило визначити частку кожного з них в інтегральній відповіді, а також взаємне розташування різних субтипів НАХР на клітинах. Так, було з'ясовано, що на нейронах верхнього шийного ганглія субодиниці $\alpha 3$, $\alpha 5$ і $\alpha 7$ містяться досить далеко одна від одної, а $\alpha 4$, навпаки, по-

близу $\alpha 3$ -субодиниць [67].

Згідно з результатами імунохімічних і електрофізіологічних досліджень, кожний нейрон автономного ганглія звичайно експресує декілька субтипів nAHP [65]. Нейрони всередині ганглія і нейрони різних гангліїв відмінні за субодиничним складом рецепторів [62]. Це свідчить про функціональну гетерогенність автономних нейронів.

Особливі властивості nAHP в автономних гангліях було показано при вивченні впливу на них різноманітних блокаторів. Так, за ефектом локальних анестетиків рецептори культивованих нейронів інтракардіального ганглія щура відрізнялися як від nAHP скелетних м'язів, так і від $\alpha 4\beta 2$ nAHP мозку [69]. Більше того, нейрони симпатичних та парасимпатичних гангліїв були неоднаковими за чутливістю до блокаторів з аліфатичними радикалами [70].

Активність nAHP мозку та м'язів регулюється внутрішньоклітинними протеїнкіназами A і C, а також тирозиновими кіназами, які фосфорилують амінокислотні залишки великого цитоплазматичного домену. Аналіз спектра модуляторів цих ферментів показав, що, принаймні, в нейронах верхнього шийного ганглія і підслизового сплетіння активність nAHP не залежала від активності протеїнкіназ A та C, але пригнічувалась підвищеною концентрацією внутрішньоклітинного Ca^{2+} і, частково, регулювалася тирозиновими кіназами [71].

Наведені дані свідчать, що nAHP в автономній нервовій системі відмінні від nAHP м'язів і мозку за будовою та функціональними властивостями. Подібно до nAHP мозку, в автономних гангліях виявлено численні субтипи рецепторів, причому кожний нейрон може експресувати декілька субтипів. Ганглії, що контролюють різні фізіологічні процеси, неоднакові за складом nAHP, однак виявити зв'язок між певною функцією і будовою nAHP поки що неможливо.

4. Будова і функції nAHP в незбудливих клітинах

4.1. Ацетилхолін як універсальний медіатор

Ацетилхолін відомий як нейротрансмітер у центральній та автономній нервовій системі ссавців. На сьогодні дані літератури свідчать, що він досить поширений в про- і еукаріотичних незбудливих клітинах [72]. Ацетилхолін було виявлено в бактеріях, водоростях, простіших та в примітивних рослинах, що свідчить про його дуже ранню появу в еволюційному процесі. У людини ацетилхолін і фермент, який його синтезує – холинацетилтрансфераза – були ідентифіковані в епітеліальних клітинах дихальних шляхів, шлункового і сечостатевого тракту, шкірі,

ендотелії судин і клітинах крові. На відміну від нейронів, де ацетилхолін міститься у везикулах і виділяється з них за екзоцитозу у відповідь на електричний стимул, в незбудливих клітинах він локалізується безпосередньо в цитоплазмі і постійно вивільнюється назовні, діючи як локальний гормон. За наявності ацетилхоліну завжди експресується ацетилхолінстераза – фермент, який розщеплює цей медіатор і, отже, запобігає його дії як класичного гормону [73].

У крові декількох видів ссавців, у т.ч. і у людини, підтримується певний постійний рівень ацетилхоліну. Близько 60% його синтезується лейкоцитами [74]. Він виявлений в лімфоцитах тимуса, селезінки і периферичної крові [75]. Лімфоцитам притаманна також холинацетилтрансферазна і ацетилхолінстеразна активність [76].

Ацетилхолін, продукований не нервовими клітинами, діє на них як автокринним, так і паракринним шляхом. Оскільки ацетилхолін є еволюційно древньою молекулою, то він регулює або модулює такі первинні клітинні функції, як мітоз, диференціація, організація цитоскелета, міжклітинні контакти, адгезія та рухливість [72]. Вплив ацетилхоліну на незбудливі клітини свідчить про наявність на них специфічних рецепторів. І дійсно, на таких клітинах було ідентифіковано як мускаринові, так і нікотинові ацетилхолінові рецептори.

4.2. nAHP на незбудливих клітинах

Нікотинові рецептори нейронного типу спочатку виявили на клітинах декількох ліній пухлин: епітеліальній карциномі шийки матки (HeLa), епідермоїдній карциномі шкіри, аденокарциномі легенів, гепатомі і гліобластомі [77]. Пізніше nAHP $\alpha 7$ -субтипу та м'язові nAHP ідентифікували у клітинах дрібноклітинної карциноми легенів [78]. Активація $\alpha 7$ nAHP стимулювала проліферацію клітин. Через наявність nAHP на пухлинних клітинах різного походження виникало питання, чи є їхня поява ознакою злоякісного переродження клітин? Однак пізніше nAHP було виявлено в багатьох нетрансформованих тканинах. Перш за все, увагу привернули органи і тканини, на які діє при палінні нікотин – епітелій дихальних шляхів, ендотелій судин та шкіра.

Епітеліальні клітини бронхів, легенів та підслизових залоз експресують гени $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ -, $\alpha 4$ - і $\alpha 7$ -субодиниць nAHP і мають близько 630 сайтів зв'язування радіоактивного епібатидину на одну клітину. Паління тютюну (у людей) або додавання нікотину у культуру клітин підвищувало кількість сайтів зв'язування епібатидину, що свідчило про збільшення кількості функціональ-

них рецепторів на клітинах. Сигнал, який проходив крізь ці рецептори, залежав від Ca^{2+} і впливав на адгезію та рухливість клітин [79]. Епітеліальні клітини бронхів також містили декілька тисяч сайтів зв'язування α -БГТ, тобто кількість гомомерних $\alpha 7$ -субтипів nAChR перевищувала таку гетеромерних рецепторів. В електрофізіологічних експериментах із використанням методу “петч-клемп” було виявлено наявність повноцінних іонних каналів [80]. Холінергічні антагоністи спричинювали зміни форми клітин та міжклітинних контактів, тобто nAChR у цих клітинах брали участь у регуляції функціонування цитоскелета і міжклітинної адгезії.

Ендотеліальні клітини судин експресують гени $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ -, $\alpha 7$ -, $\beta 2$ - і $\beta 4$ -субодиноць nAChR і мають близько 900 сайтів зв'язування епібаїдину на клітину. В них також є сайти зв'язування α -БГТ, тобто вони містять як гетеромерні, так і гомомерні nAChR. Електрофізіологічні характеристики цих рецепторів схожі на такі в автономних гангліях [80–81].

Кератиноцити шкіри також експресують гени $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ -, $\alpha 6$ -, $\alpha 7$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ - і $\beta 4$ -субодиноць nAChR. В недиференційованих кератиноцитах у культурі було виявлено близько 5500 сайтів зв'язування нікотину на клітину, а в щойно виділених із шкіри – близько 35400 сайтів, тобто функціональних nAChR на клітину. Вони також формують повноцінні канали, якими транспортуються іони крізь мембрану. Сигнал від nAChR у кератиноцитах, опосередкований Ca^{2+} , впливає на проліферацію, адгезію, міграцію та диференціацію клітин. Залежно від стадії диференціації кератиноцити здатні експресувати різні субтипи nAChR [82].

Нікотинові рецептори було ідентифіковано і в епітелії ротової порожнини та стравоходу, які також уражуються при палінні [83]. Таким чином, деякі токсичні ефекти нікотину можуть бути опосередковані nAChR дихальних шляхів, судин і верхньої частини шлунково-кишкового тракту – тканин, що першими контактують із димом цигарок при палінні.

4.3. nAChR в імунній системі

4.3.1. Експресія nAChR в лімфоцитах

Перші відомості про наявність рецепторів до ацетилхоліну на лімфоцитах опубліковано в 70-х роках 20-го століття, коли було виявлено, що холінергічний агоніст карбамоїлхолін впливав на проліферацію, цитотоксичну активність і кількість клітин, які продукують антитіла в лімфоцитах периферичної крові [84–86]. Спочатку вважали, що лімфоцити містять, переважно, ацетилхолінові рецептори мускаринового типу

[84]. Експресію генів декількох субтипів мускаринових рецепторів у лімфоцитах периферичної крові пізніше було підтверджено методом полімеразної ланцюгової реакції [87]. Один із ефектів карбамоїлхоліну – вплив на проліферацію Т-лімфоцитів – блокувався α -БГТ і тубокурарином [85], унаслідок чого вперше виникло питання щодо наявності на них nAChR. Пізніше було встановлено, що лімфоцити периферичної крові експресують гени субодиноць nAChR $\alpha 2$ - $\alpha 7$ і $\beta 2$ - $\beta 4$ [88, 89].

Деякі дослідження було здійснено на клітинах лімфоїдних органів тварин. У тимусі ідентифіковано сайти зв'язування α -БГТ [90] і nAChR-специфічних антитіл [91–92]. В інших роботах було констатовано наявність у тимусі nAChR м'язового типу, чим логічно пояснювалась участь тимуса в патогенезі міастенії [93–94]. Однак виявилось, що в тимусі експресовано неповний набір транскриптів генів м'язового nAChR: тимус майже не містив δ -субодиноць [95]. Транскрипти нейронних субтипів nAChR, зокрема мРНК $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 4$ - [96] і $\alpha 7$ -субодиноць, також ідентифіковано в тимусі [97]. Проте дані стосовно типів клітин, які експресують nAChR у тимусі, досить суперечливі. В деяких експериментах наявність nAChR показано тільки в епітеліальних або міоїдних клітинах [94, 98–99]. Пізніше транскрипти субодиноць nAChR було виявлено також у Т-лімфоцитах тимуса, причому незрілі $\text{CD}4^+8^+$ Т-лімфоцити містили більше транскриптів субодиноць $\alpha 3$, $\alpha 5$ і $\beta 4$, ніж зрілі тимоцити [100].

У селезінці серед $\text{CD}3^+$ Т-лімфоцитів і $\text{B}220^+$ В-лімфоцитів було виявлено 22–25% клітин, які зв'язували α -БГТ [100]. В лімфовузлах ідентифіковано 1500 – 1800 сайтів зв'язування нікотину на один Т-лімфоцит порівняно з 250 сайтами на один тимоцит. Культивування клітин *in vitro* спричинювало зменшення кількості сайтів зв'язування нікотину, а стимуляція ад'ювантом, навпаки, збільшення їх (до 7500 сайтів на клітину) [101]. Транскрипт $\alpha 3$ -субодиноць було виявлено в лініях Т-лімфоцитів [102].

Паління тютюну призводить до появи високоафінних сайтів зв'язування нікотину на лейкоцитах крові [103], причому їхня кількість корелює з кількістю цигарок, випалених за день [104]. Це означає, що nAChR, які експресовано в лімфоцитах, подібно до nAChR мозку, чутливі до нікотину і набувають стану десенситизації.

Нікотин і карбахол спричинювали зміну в концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} в Т-лімфоцитах клітинної лінії “Jurkat” та лімфоцитах периферичної крові, стимульованих фітогем-аглютинином [105]. Підвищення концентрації Ca^{2+} відбувалось за активації тирозинових кіназ

і фосфорилюванні фосфоліпази $C\gamma$ [106]. На відміну від кератиноцитів, епітеліальних і ендотеліальних клітин, в літературі відсутні дані щодо змін в електричному потенціалі мембран лімфоцитів за дії на них агоністів НАХР.

Переважну кількість досліджень експресії і ролі НАХР було проведено на Т-лімфоцитах [101–108]. Більше того, на В-лімфоцитах не виявлено сайтів зв'язування нікотину і змін у концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} за дії нікотину [105], що викликало сумнів щодо наявності функціональних НАХР на В-лімфоцитах. Ми показали присутність НАХР на В-лімфоцитах, виділених із селезінки миші, і на гібридомах – гібридах нормальних В-лімфоцитів і клітин мієломи Х63-Аg8 [109]. Ці клітини зв'язували $\alpha 4$ - і $\alpha 7$ -специфічні антитіла, а також радіоактивні ліганди – епібатидин і α -БГТ, тобто містили як гомомерні, так і гетеромерні НАХР. Хронічна дія нікотину на культуру клітин спричинювала підвищення кількості обох субтипів НАХР [110].

Одержані дані свідчать, що як Т-, так і В-лімфоцити експресують декілька субтипів НАХР, принаймні ті, що містять субодиниці $\alpha 4$ і $\alpha 7$. Отже, склад НАХР у лімфоцитах, на відміну від клітин шкіри і дихальних шляхів, виявився ближчим до такого в мозку, ніж до автономних гангліїв. Активація НАХР у лімфоцитах призводить не стільки (якщо взагалі призводить) до змін мембранного потенціалу клітин, як до внутрішньоклітинної передачі сигналу поліфосфатидилінозитольним шляхом. Численні дослідження були спрямовані на з'ясування функцій цих рецепторів в лімфоцитах.

4.3.2. Функції НАХР в лімфоцитах

Майже 30 років тому було показано, що у тварин, які вдихали дим цигарок, пригнічувалась первинна гуморальна імунна відповідь [111] і підвищувалась сприйнятливість до інфекційних агентів [112]. Ефект стосувався відповіді як на Т-залежні, так і Т-незалежні антигени [113]. Уражувалися, переважно, клітини, які продукують антитіла, в лімфовузлах, найближчих до шляхів вдихання диму. В цих експериментах не спостерігалось впливу нікотину на Т-лімфоцити, а тому було запропоновано, що головною мішенню нікотину є В-лімфоцити [114]. Це підтверджувалось даними про те, що хронічне вдихання диму пригнічувало відповідь В-лімфоцитів на ліпополісахарид і антиімуноглобулінові антитіла [115]. Пізніше, однак, було показано, що введення нікотину під шкіру крізь імплантовані мініосмотичні насоси знижувало Т-залежну імунну відповідь та проліферацію Т-лімфоцитів, зумовлену антитілами проти комплексу CD3.

Аналіз клітинного циклу свідчив, що нікотин призводив до “арешту” Т-лімфоцитів у G_0/G_1 -фазі. При цьому як Т-, так і В-лімфоцити втрачали здатність відповідати на сигнали, опосередковані їхніми антигенспецифічними рецепторами [107]. Оброблені ніотином Т-лімфоцити втрачали здатність підвищувати рівень внутрішньоклітинного інозитолтрифосфату у відповідь на сигнал, переданий антигенспецифічним рецептором, але не змінювали характер відповіді на токсини холери або коклюшу, що діють на клітину за участі рецепторів іншого типу. Автори дійшли висновку, що хронічне введення нікотину призводило до анергії Т-лімфоцитів, тобто сигнал крізь ніотиновий рецептор якимось чином впливав на діяльність антигенспецифічного рецептора [108]. Хронічна дія нікотину супроводжувалась постійною активацією тирозинових кіназ і фосфоліпази $C\gamma$ у спленоцитах та лімфоцитах периферичної крові [116].

Ми показали, що нікотин прискорював проліферацію клітин гібридами, знижуючи водночас кількість продукованих антитіл. Навпаки, токсини змії, специфічні блокатори $\alpha 7$ НАХР, пригнічували проліферацію гібридами і сприяли продукуванню антитіл. Клітини, які активно ділилися, мали більше поверхневих $\alpha 4$ - і $\alpha 7$ -НАХР порівняно із клітинами у стані спокою [110]. Таким чином, принаймні $\alpha 7$ НАХР, беруть участь у регуляції проліферації В-лімфоцитів. Блокувальний ефект токсинів за відсутності екзогенних агоністів свідчив про наявність ендogenous ацетилхоліну в культурі лімфоцитів.

Дослідження, проведені на людині, підтвердили дані, одержані на тваринах. Так, у курців виявлено знижені титри антитіл до вірусу грипу і менший рівень сироваткових імуноглобулінів більшості класів [117], за винятком IgE, який був істотно вищим, ніж у осіб, що не палять [118]. Більшість дослідників доповідали також про лейкоцитоз крові зі збільшенням кількості всіх популяцій лімфоцитів при палінні [119]. Ці дані узгоджуються із встановленою пропроліферативною активністю нікотину для інших типів незбудливих клітин: ендотелія судин, кератиноцитів та епітеліальних клітин дихальних шляхів, що є визначальним чинником канцерогенної дії нікотину при палінні [120–121].

З іншого боку, паління знижує ризик захворювань запального типу, зокрема автоімунних – виразкового коліту, хвороби голуб'ятників, саркоїдозу легень у фермерів, деяких алергічних захворювань [122]. Було показано, що нікотину притаманні протизапальні властивості [106], зокрема зниження продукції прозапальних цитокінів [123]. Останнім часом було з'ясовано, що цей

ефект нікотину опосередковано нАХР, експресованими на макрофагах. Ацетилхолін та нікотин істотно знижували вивільнення інтерлейкінів 1, 6 та 18 і фактора некрозу пухлин у культурі макрофагів, стимульованих ліпополісахаридом. [124]. Пізніше належність відповідного рецептора до $\alpha 7$ -субтипу нАХР було підтверджено в досліджах із вивчення зв'язування α -БГТ і введення антисмислових олігонуклеотидів. Макрофаги мишей, нокаутованих за геном $\alpha 7$ -субодиниці, не відповідали на холінергічні агоністи [125]. Принциповим положенням двох останніх досліджень було те, що за фізіологічних умов ефект ацетилхоліну спостерігався під час стимуляції вагусного нерва. Це свідчило про наявність парасимпатичного шляху регуляції процесу запалення і фактично означало, що нАХР на клітинах крові (в цьому випадку на макрофагах) можуть реагувати на ацетилхолін нейронного походження.

Дійсно, було встановлено, що пригнічення біосинтезу ацетилхоліну в центральній нервовій системі підвищує імунну відповідь щурів на еритроцити вівці, а пригнічення ацетилхоліностеразної активності, навпаки, інгібує імунну відповідь [126]. Однак на відміну від адренергічної, холінергічну інервацію лімфоїдних органів анатомічно виявити не вдалося [127]. З огляду на результати експериментів [124], згідно з якими ваготомія зменшувала продукцію фактора некроза пухлин у печінці і, таким чином, пригнічувала генералізоване запалення у відповідь на внутрішньовенне введення ліпополісахариду, можна припустити, що джерелом ацетилхоліну за впливу на імунні процеси є інервація ззовні лімфоїдних органів. Крім того, нервові сигнали можуть опосередковано діяти на продукцію ендogenous ацетилхоліну лімфоцитами.

Отже, вплив на імунні процеси за участі нАХР може бути опосередкований ацетилхоліном як нейронного, так і ендogenous походження. Яке із двох джерел має перевагу, не з'ясовано і потребує подальшого вивчення.

Наведені дані літератури свідчать про наявність нАХР нейронного типу на багатьох типах незбудливих клітин, у т.ч. і на клітинах імунної системи: лімфоцитах та макрофагах. Поступово стає зрозумілим, що нАХР в них відіграють іншу роль, ніж у нейронах, регулюючи як базові, так і спеціалізовані клітинні функції — ділення та імунну відповідь. Зокрема, в лімфоцитах ацетилхолін може бути додатковим медіатором у "спілкуванні" Т- і В-лімфоцитів. Таким чином, збудливі і незбудливі клітини використовують нАХР для здійснення різних функцій. Вірогідно, такі спеціалізовані функції як передача електричного сигналу або регуляція імунної відповіді виникли

еволюційно пізніше, на основі базової ролі ацетилхоліну в регуляції клітинного ділення та міжклітинних контактів.

NEURONAL NICOTINIC RECEPTORS: STRUCTURE AND FUNCTION IN DIFFERENT TYPES OF CELLS

M. V. Skok

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: skok@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

The review deals with the up-to-date literature data on the subunit composition and functions of nicotinic acetylcholine receptors in both excitable (brain and autonomic ganglia) and non-excitable (respiratory epithelium, vascular endothelium, skin, blood) tissues. Special attention is paid to the expression and role of nicotinic receptors in the immune cells.

К е у w o r d s: nicotinic acetylcholine receptor, brain, ganglia, non-excitable cells, lymphocytes.

1. *Barnard E.* // Trends Biol. Sci. 1992. **17**. P. 368–374.
2. *Unwin N.* // Nature. 1995. **373**. P. 37–43.
3. *Boess F., Beroukhim R., Martin I.* // J. Neurochem. 1995. **64**. P. 1401–1405.
4. *Green T., Stouffer K., Lummis S.* // J. Biol. Chem. 1995. **270**. P. 6056–6061.
5. *Lindstrom J.* Ion Channels / Ed. T. Narahashi. New York : Plenum Press. 1996. **4**. P. 377–449.
6. *Paterson D., Nordberg A.* // Progr. Neurobiol. 2000. **61**. P. 75–111.
7. *Skok V. I.* // Autonomic Neurosci. Basic Clin. 2002. **97**. P. 1–11.
8. *Unwin N.* // J. Mol. Biol. 1993. **229**. P. 1101–1124.
9. *Lukas R. J., Changeux J. P., le Novere N. et al.* // Pharmacol. Rev. 1999. **51**. P. 397–401.
10. *Papke R.* // Prog. Neurobiol. 1993. **41**. P. 509–531.
11. *Conroy W., Vernallis A., Berg D.* // Neuron. 1992. **9**. P. 1–20.
12. *Deneris E., Connolly J., Rogers S. et al.* // Trends Pharmacol. Sci. 1991. **12**. P. 34–40.
13. *Le Novere N., Zoli M., Changeux J.-P.* // Eur. J. Neurosci. 1996. **8**. P. 2428–2439.
14. *Girod R., Crabtree G., Ernstrom G. et al.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1999. **868**. P. 578–590.
15. *Lindstrom J., Anand R., Peng X. et al.* // Ibid. 1995. **757**. P. 100–116.
16. *Changeux J.-P.* Fidia Research Foundation: Neuroscience Award Lectures / 1988–1989. **4**. P. 21–168.

17. Galzi J. L., Changeuz J. P. // Neuropharmacology. 1995. **34**. P. 563–582.
18. Schroeder H., de Vos R. A., Jansen E. N. et al. // Neurosci. Lett. 1995. **187**. P. 173–173.
19. Rubboli F., Court J. A., Sala C. et al. // Neurochem. Int. 1994. **25**. P. 69–71.
20. Court J., Clementi F. // Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 1995. **9**. P. 6–14.
21. Wevers A., Jeske A., Lobron C. et al. // Brain Res. 1994. **25**. P. 122–128.
22. Hellstrom-Lindahl E., Mousavi M., Zhang X. et al. // Ibid. 1999. **66**. P. 94–103.
23. Sugaya K., Giacobini E., Chiappinelli V. A. // J. Neurosci. Res. 1990. **27**. P. 349–359.
24. Houghtling R. A., Davila-Garcia M. I., Kellar K. J. // Mol. Pharmacol. 1995. **48**. P. 280–287.
25. Alkondon M., Albuquerque E. X. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993. **265**. P. 1455–1473.
26. Xu W., Gelber S., Orr-Urtreger A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. **96**. P. 5746–5751.
27. Marubio L. M., Arroyo-Jimenez M. M., Cordero-Erausquin M. et al. // Nature. 1999. **398**. P. 805–810.
28. Orr-Urtreger A., Goldner F. M., Saeki M. et al. // J. Neurosci. 1997. **17**. P. 9165–9171.
29. Vetter D. E., Liberman M. C., Mann J. et al. // Neuron. 1999. **23**. P. 93–103.
30. Picciotto M., Zoli M., Lena C. et al. // Nature. 1995. **374**. P. 65–67.
31. Zoli M., Lena C., Picciotto M. R. et al. // J. Neurosci. 1998. **18**. P. 4461–4472.
32. McGehee D. S., Role L. W. // Ann. Rev. Physiol. 1995. **57**. P. 521–546.
33. Buisson B., Bertrand D. // Trends Pharmacol. Sci. 2002. **23**, N 3. P. 130–136.
34. Edwards J. A., Warburton D. M. // Pharmacol. Ther. 1982. **19**. P. 147–164.
35. Linville D. G., Williams S., Raszkievicz J. L. et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993. **267**. P. 440–448.
36. Jones G. M., Sahakian B. J., Levy R. et al. // Psychopharmacology (Berl.). 1992. **180**. P. 485–494.
37. Wesnes K., Warburton D. M. // Pharmacol. Ther. 1983. **5**. P. 189–208.
38. Hindmarch I., Kerr J. S., Sherwood N. // Psychopharmacology (Berl.). 1990. **100**. P. 535–541.
39. Marubio L. M., Changeux J. P. // Eur. J. Pharmacol. 2000. **393**. P. 113–121.
40. Lindstrom J. // Mol. Neurobiol. 1997. **15**. P. 193–222.
41. Newhouse P. A., Sunderland T., Narang P. K. et al. // Psychoneuroendocrinology. 1990. **15**. P. 471–484.
42. Benowitz N. L. // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1996. **36**. P. 597–613.
43. Glushakov A. V., Melishchuk A. I., Skok V. I. // Neurophysiology. 1996. **28**. P. 77–85.
44. Nakasava K. // J. Neurosci. 1994. **14**. P. 740–749.
45. Boorman J. P. B., Groot-Kormelink P. J., Sivilotti L. G. // J. Physiol. 2000. **529**. P. 565–577.
46. Herrero S. J., Garsia-Palomero T., Pintado A. J. // Br. J. Pharmacol. 1999. **127**. P. 1375–1387.
47. Temburni M. K., Blitzblau R. C., Jacob M. H. // J. Physiol. 2000. **525**. P. 21–29.
48. Covernton P., Kojima H., Sivilotti L. et al. // Ibid. 1994. **481**. P. 27–34.
49. Sargent P. B. // Ann. Rev. Neurosci. 1993. **16**. P. 403–443.
50. Conroy W., Berg D. // J. Biol. Chem. 1995. **270**. P. 4424–4431.
51. Bibevski S., Zhou Y. F., McIntosh J. M. et al. // J. Neurosci. 2000. **20**. P. 5076–5082.
52. Chavez-Noriega L. E., Gillespie A., Stauderman K. A. et al. // Neuropharmacology. 2000. **39**. P. 2543–2560.
53. Hogg R. C., Miranda L. P., Craik D. J. et al. // J. Biol. Chem. 1999. **274**. P. 36559–36564.
54. Lukas R. J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1995. **757**. P. 153–168.
55. Skok M. V., Voitenko L. P., Voitenko S. V. et al. // Neuroscience. 1999. **93**, N 4. P. 1437–1446.
56. Glushakov A. V., Voitenko L. P., Skok M. V. et al. // Auton. Neurosci. 2004. **110**, N 1. P. 19–26.
57. Коваль О. М., Скок М. В., Скок В. І. // Нейрофізіологія. 2003. **35**, № 1. С. 9–19.
58. Коваль О. М., Войтенко Л. П., Скок М. В. та ін. // Там само. № 2. С. 99–107.
59. Koval O. M., Voitenko L. P., Skok M. V. et al. // Neurosci Lett. 2004. **365**, N 2. P. 143–146.
60. Corriveau R., Berg D. // J. Neurosci. 1993. **13**. P. 2662–2671.
61. Rust G., Burgunder J.-M., Lauterburg T. E. et al. // Eur. J. Neurosci. 1994. **6**. P. 478–485.
62. Broxton N., Miranda L., Gehrmann J. et al. // Eur. J. Pharmacol. 2000. **390**. P. 229–236.
63. Roth A. L., Shoop R. D., Berg D. K. // Ibid. **393**. P. 105–112.
64. Broide R. S., Leslie F. M. // Mol. Neurobiol. 1999. **20**. P. 1–16.
65. Yu C. R., Role L. W. // J. Physiol. 1998. **509**. P. 651–665.
66. Skok M., Lykhmus E., Bobrovnik S. et al. // J. Neuroimmunology. 2001. **121**, N 1–2. P. 59–66.
67. Voitenko L. P., Voitenko S. V., Skok M. V. et al. // Neuroscience Letters. 2001. **303**, N 1. P. 37–40.
68. Purnyn E. E., Skok M. V., Rikhalsky O. et al. // Neurophysiology. 2002. **34**, N 2–3. P. 223–226.

69. Cuevas J., Adams D. J. // Br. J. Pharmacol. 1994. **111**. P. 663–672.
70. Skok V. I., Groisman S. D., Melnichenko L. V. et al. // JANS. 1991. **35**. P. 211–218.
71. Glushakov A. V., Glushakova H. Y., Skok V. I. // Ibid. 1999. **75**. P. 16–22.
72. Wessler I. K., Kirkpatrick C. J., Racke K. // Clin. Exper. Pharm. Physiol. 1999. **26**. P. 198–205.
73. Wessler I. K., Kirkpatrick C. J. // Pulm. Pharmacol. Ther. 2001. **14**. P. 423–434.
74. Kawashima K., Fujii T., Watanabe Y. et al. // Life Sci. 1998. **62**. P. 1701–1705.
75. Rinner I., Kawashima K., Schauenstein K. // J. Neuroimmunol. 1998. **81**. P. 31–37.
76. Kawashima K., Fujii T. // Pharmacol. Ther. 2000. **86**. P. 29–48.
77. Chini B., Clementi F., Hukovic N. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1992. **89**. P. 1572–1576.
78. Sciamanna M. A., Griesmann G. E., Williams C. L. et al. // J. Neurochem. 1997. **69**. P. 2302–2311.
79. Zia S., Ndoye A., Nguyen V. T. et al. // Res. Commun. Mol. Path. Pharm. 1997. **97**. P. 243–261.
80. Wang Y., Pereira E. F., Maus A. D. et al. // Mol. Pharmacol. 2001. **60**, N 6. P. 1201–1209.
81. Macklin K. D., Maus A. D. J., Pereira E. F. R. et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1998. **287**. P. 435–439.
82. Grando S. A. // J. Inv. Dermatol. 1997. **2**. P. 41–48.
83. Nguyen V. T., Hall L. L., Gallacher G. et al. // J. Dent. Res. 2000. **79**. P. 939–949.
84. Strom T., Sytkowski A., Carpenter C. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1974. **74**. P. 1330–1333.
85. Richman D., Arnason B. // Ibid. 1979. **76**. P. 4632–4635.
86. Rinner I., Schauenstein K. // J. Neuroimmunol. 1991. **34**. P. 165–172.
87. Hellstrom-Lindahl E., Nordberg A. // Ibid. 1996. **68**. P. 139–144.
88. Hiemke C., Stolp M., Reuss S. et al. // Neurosci. Lett. 1996. **214**. P. 171–174.
89. Sato K. Z., Fujii T., Watanabe Y. et al. // Ibid. 1999. **266**. P. 17–20.
90. Engel W. K., Trotter J. L., McFarlin D. E. et al. // Lancet. 1977. **1**. P. 1310–1311.
91. Kirchner T., Tzartos S., Hoppe F. et al. // Amer. J. Pathol. 1986. **130**. P. 268–274.
92. Kawanami S., Kamei H., Otta J. et al. // J. Neurol. 1987. **234**. P. 207–211.
93. Geuder K. I., Marx A., Witzmann V. et al. // Develop. Immunol. 1992. **2**. P. 69–75.
94. Wakkach A., Guyon T., Bruand C. et al. // J. Immunol. 1996. **157**. P. 3752–3760.
95. Navaneetham D., Penn A. S., Howard J. F. et al. // Muscle Nerve. 2001. **24**. P. 203–210.
96. Mihovilovic M., Roses A. // J. Immunol. 1993. **151**. P. 6517–6524.
97. Navaneetham D., Penn A., Howard J. Jr. et al. // Cell. Mol. Biol. 1997. **43**. P. 433–442.
98. Hara Y., Ueno S., Uemich T. et al. // FEBS Lett. 1991. **279**. P. 137–145.
99. Mihovilovic M., Denning S., Mai Y. et al. // J. Neuroimmunology. 1997. **79**. P. 176–184.
100. Toyabe S., Iiai T., Fukuda M. et al. // Immunology. 1997. **92**. P. 201–205.
101. Maslinski W., Laskowska-Bozek H., Ryzewski J. // J. Neurosci. Res. 1992. **31**. P. 336–340.
102. Battaglioli E., Gotti C., Terzano S. et al. // J. Neurochem. 1998. **71**. P. 1261–1270.
103. Lebargy F., Benhammou K., Morin D. et al. // Amer. J. Respir. Crit. Care Med. 1996. **153**. P. 1056–1063.
104. Benhammou K., Lee M., Strook M. et al. // Neuropharmacology. 2000. **39**. P. 2818–2829.
105. Laskowska-Bozek H., Bany U., Burakowski T. // Neuroimmunomodulation. 1996. **3**. P. 247–253.
106. Sopori M. L., Kozak W., Savage S. M. et al. // Psychoneuroendocrinology. 1998. **23**. P. 189–204.
107. Geng Y., Savage S. M., Johnson L. J. et al. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1995. **135**. P. 268–278.
108. Geng Y., Savage S. M., Razani-Boroujerdi S. et al. // J. Immunol. 1996. **156**. P. 2384–2390.
109. Калашник О. М., Лихмус О. Ю., Скок М. В. та ін. // Доп. НАН України. 2000. № 4. С. 171–175.
110. Skok M. V., Kalashnik E. N., Koval L. N. et al. // Mol. Pharmacol. 2003. **64**, N 4. P. 885–889.
111. Holt P. G., Keast D. // Bacteriol. Rev. 1977. **41**. P. 205–216.
112. MacKenzie J. S., MacKenzie I. H., Holt P. G. // J. Hyg. (Lond). 1976. **77**. P. 409–417.
113. Goud S. N., Kaplan A. M., Subbarao B. // Arch. Toxicol. 1992. **66**. P. 164–169.
114. Sopori M. L., Cherian S., Chilukuri R. et al. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1989. **97**. P. 489–499.
115. Savage S. M., Donaldson L. A., Cherian S. // Ibid. 1991. **111**. P. 523–529.
116. Singh S. P., Kalra R., Puttfarcken P. et al. // Ibid. 2000. **164**. P. 65–72.
117. Andersen P., Pedersen D. F., Bach B. et al. // Clin. Exp. Immunol. 1982. **47**. P. 467–473.
118. Burrows B., Halonen M., Barbee R. A. et al. // Amer. Rev. Resp. Dis. 1981. **124**. P. 523–525.
119. Hughes D. A., Haslam P. L., Townsend P. J. et al. // Clin. Exp. Immunol. 1985. **61**. P. 459–466.

120. Heeschen C., Jang J. J., Weis M. et al. // *Nat. Med.* 2001. 7. P. 775–777.
121. Conti-Fine B. M., Navaneetham D., Lei S. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* 2000. **393**. P. 279–294.
122. Mills C. M. // *Int. J. Dermatol.* 1993. **32**. P. 864–865.
123. Brown G. P., Iwamoto G. K., Monick M. M. et al. // *Amer. J. Physiol.* 1989. **256**. P. C260–C264.
124. Borovikova L. V., Ivanova S., Zhang M. et al. // *Nature*. 2000. **405**. P. 458–462.
125. Wang H., Yu M., Amella C.A. et al. // *Ibid.* 2003. **421**. P. 384–388.
126. Rinner I., Kawashima K., Schauenstein K. // *J. Neuroimmunol.* 1998. **81**. P. 31–37.
127. Felten S. Y., Felten D. L. *Psychoneuroimmunology*, 2nd / Eds. R. Ader, D. L. Felten, D. Cohen. San Diego : Academic Press. 1991. P. 21–118.

Отримано 02.09.2003