

## РОЛЬ НИКОТИНУ В РЕГУЛЯЦІІ ПРОЛІФЕРАЦІІ ЛІМФОЦИТІВ

Л. М. КОВАЛЬ, С. І. РОМАНЮК, Д. В. КОЛИБО, М. В. СКОК, С. В. КОМІСАРЕНКО

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

*Изучено влияние никотина на экспрессию никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) и пролиферативную активность в клетках гибридомы и нормальных лимфоцитах мыши. Методом иммуноферментного анализа показано, что никотин регулирует количество nAChR в клетке. Как следует из данных включения триазолила голубого и метода иммуноферментных отпечатков, никотин способствует пролиферации клеток гибридомы и плазматических клеток, сформированных в результате иммунного ответа in vivo. Чувствительность клеток к никотину зависит как от количества nAChR, представленных на мембране, так и от их функциональной активности, на которую, в частности, влияют адгезивные контакты клетки с подложкой. С использованием канального блокатора бензогексония показано, что пролиферативный сигнал через nAChR в клетках гибридомы опосредован открыванием ионного канала. Полученные данные свидетельствуют о про-пролиферативной роли никотина для В-лимфоцитов, что может объяснить развитие лимфопролиферативных заболеваний у курильщиков табака.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а:* лимфоциты, гибридома, никотин, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, пролиферация, бензогексоний.

**П**аління цигарок є причиною захворювань дихальних шляхів, серцево-судинної системи, шлунково-кишкового тракту, а також патологічних змін у шкірі та в імунній системі. Зокрема, паління призводить до пригнічення імунної відповіді на фоні збільшення кількості лімфоцитів у крові – лімфоцитозу [1–3]. Хоча дим цигарок містить понад тисячу компонентів, багато проявів його шкідливої дії пов'язують з наявністю нікотину. Саме нікотин є причиною формування залежності від паління [4]. Дія нікотину на живі клітини опосередкована ацетилхолиновими рецепторами нікотинового типу (nAChR). У нервових і м'язових клітинах ці рецептори відкривають іонні канали за дії ацетилхоліну, що виділяється із синаптичних везикул, і таким чином опосередковують сигнали збудження [5]. У незбудливих клітинах активація нікотинних рецепторів не спричинює утворення електричного потенціалу, але регулює базові клітинні функції, такі як проліферація, адгезія, рухливість [6].

Вплив нікотину було досить детально вивчено на Т-лімфоцитах, в яких сигнал крізь nAChR блокував активацію антигенспецифічного рецептора і призводив до анергізації Т-лімфоцитів і пригнічення імунної відповіді [7–8]. Наявність nAChR на В-лімфоцитах довгий час дискутувалася [9]. Нещодавно ми знайшли nAChR двох субтипів:  $\alpha 4\beta 2$  і  $\alpha 7$  на клітинних лініях В-лімфоцитарного походження – мієломі та гібридомі – і показали, що діяльність цих рецепторів пов'язана

на із процесами клітинної проліферації [10]. Наявність nAChR було визначено і на нормальних В-лімфоцитах миші [11]. Метою даної роботи було детальне вивчення механізму впливу нікотину на клітини гібридомі і на нормальні лімфоцити, що продукують антитіла.

### Матеріали і методи

Мієлому Х63-Ag8, що є вихідною клітинною лінією для злиття гібридом, брали з банку клітин відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна. Гібридому 1D6, яка продукує антитіла проти пептиду 181–192  $\alpha 3$ -субодиниці nAChR, було отримано і охарактеризовано нами раніше [12]. Клітини культивували в середовищі RPMI 1640 з додаванням 20 мМ НЕРЕС, 20 мМ L-глутаміну,  $5 \times 10^{-5}$  М  $\beta$ -меркаптоетанолу, 50 мкг/мл пірувату натрію, 41 мкг/мл інсуліну, 40 мкг/мл гентаміцину і 10% ембріональної сироватки теляти («Sigma-Aldrich», США). Для вивчення впливу нікотину і бензогексонію клітини розсівали в 96- або 48-лункові планшети,  $2,5 \times 10^3$  або  $5 \times 10^3$  клітин на лунку відповідно, і культивували за присутності агоністу чи антагоністу протягом 4 діб. Кількість живих клітин вимірювали методом включення триазолілу блакитного (МТТ, 3-[4,5-диметилтриазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразоліум бромід) («Sigma», США) [13].

Поверхневу експресію nAChR вивчали методом клітинного імуноферментного аналізу (ІФА). Клітини відмивали від культурального середо-

вища центрифугуванням, суспензію клітин у фізіологічному розчині, забуференому фосфатом (ЗФР, рН 7,2 – 7,4) з 0,5% бичачим сироватковим альбуміном (БСА), вносили в лунки 96-лункових планшетів для ІФА (Nunc Maxisorp, Данія),  $1 \times 10^5$  клітин на лунку, і випаровували при 37 °С протягом 18 год. Потому планшети тричі відмивали ЗФР, блокували 1%-м розчином БСА (1 год 37 °С) і обробляли біотинільованими антитілами проти різних субодиниць nAHR, одержаними і охарактеризованими нами раніше [12, 14]. Інкубацію з антитілами (10 – 20 мкг/мл в ЗФР з 0,05% твін 20) проводили протягом 2 год при 37 °С. Після відмиву ЗФР-твіном планшети обробляли кон'югатом екстравідину з пероксидазою 1 год, 37 °С («Sigma», США) і проявляли розчином субстрату, що містив *o*-фенілєндіамін. Світлопоглинання вимірювали при довжині хвилі 490 нм на приладі Stat-Fax 2100 («Awareness Technology», США).

Клітини, що вирощували у флаконах, розділяли на прилиплі до підложки і ті, що знаходилися в суспензії, шляхом механічного струшування. Відрив прилиплених клітин від дна флакона здійснювали інтенсивним піпетуванням. Як суспендовані, так і відірвані від підложки клітини тестували на кількість поверхневого nAHR методом клітинного ІФА і культивували в 96-лункових планшетах за присутності нікотину протягом 4 діб, після чого вимірювали кількість живих клітин методом включення триазолілу блакитного і знову тестували у клітинному ІФА.

Для вивчення впливу адгезії на властивості nAHR клітини інкубували в 96-лункових планшетах,  $5 \times 10^3$  клітин на лунку, за присутності різних доз нікотину. Контрольні клітини тримали у звичайному термостаті, а дослідні обертали у кліностації (ці досліді описано в окремій роботі [15]) або поміщали на основу працюючого кліноста, електричний двигун якого створював певну вібрацію. Через 4 дні культивування підраховували сумарну кількість живих клітин, а також відсоток тих, що не прикріпилися до дна планшета, методом включення триазолілу блакитного. У контрольних і дослідних клітинах порівнювали поверхневу експресію  $\alpha 4$ - і  $\alpha 7$ -субодиниць nAHR методом клітинного ІФА.

Мишей BALB/c (дві групи по 5 тварин) і білих безпородних щурів (дві групи по 10 тварин) утримували у віварії Інституту біохімії протягом 10 місяців. Дослідні групи отримували нікотин з питною водою (миші – 200 мкг/мл, щури – 40 мкг/мл), контрольні тварини споживали чисту воду. Наприкінці експерименту мишей умертвляли цервікальною дислокацією, а щурів – передозуванням ефіру, вилучали їхні

селезінки, еритроцити руйнували осмотичним шоком за допомогою спеціального розчину для лізису («Sigma», США), а білі клітини крові аналізували методом клітинного ІФА, як описано вище, за винятком того, що клітини, висушені на планшетах, додатково пермеабілізували метанолом (30 хв, 4 °С).

Мишей BALB/c (самки віком 6 міс.) імунізували внутрішньочеревинно гемоціаніном равлика («Sigma», США) в дозі 50 мкг на 1 мишу 3 рази з інтервалом у 2 тижні. Першу імунізацію проводили з повним («Calbiochem», США), наступні – з неповним ад'ювантом Фрейнда («DIFCO Laboratories», США). Селезінки вилучали на 5-й день після останньої імунізації. Спленоцити культивували в такому самому середовищі, як і клітини гібридами, в 96-лункових планшетах («Falcon», США),  $5 \times 10^5$  клітин на лунку, з різними дозами нікотину або кобратоксину протягом 5 днів при 37 °С. Кобратоксин було люб'язно надано професором В. І. Цетліним (Інститут біоорганічної хімії ім. М. М. Шемякіна і Ю. А. Овчинникова, Москва, Росія). Для визначення кількості клітин, що секретують антитіла (АСК), клітини перенесли в лунки планшетів з нітроцелюлозними фільтрами («Sigma», США) на дні,  $2 \times 10^5$  клітин на 1 лунку. На фільтрах попередньо адсорбували антиген (розчин гемоціаніну, 10 мкг/мл в ЗФР) і потім блокували 1%-м розчином овальбуміну. Клітини інкубували на фільтрах протягом 3-х днів, після чого фільтри відмивали водою і ЗФР з твіном і обробляли кролячими антитілами проти імуноглобулінів миші («Sigma», США) 1 год при 37 °С. Відбитки АСК проявляли комплексом пероксидаза-анти-пероксидаза в ЗФР-твіні (1 год при 37 °С) і хромогенним субстратом, що містив 0,6 мг/мл 3-3'-діамінобензидину («Sigma», США), 0,013% пероксиду водню і 0,03% хлориду кобальту в 50 мМ трис-НСІ-буфері з рН 7,6. Кількість відбитків підраховували під бінокелем з використанням масштабної мікросітки.

### Результати та обговорення

Дослідження показали, що нікотин впливає на кількість nAHR, які виявляються на поверхні клітин гібридами і міеломи. В більшості випадків інкубація з ніотином призводить до збільшення кількості зв'язаних з поверхнею клітин nAHR-специфічних антитіл (рис. 1, А), а на клітинах міеломи спостерігалось її зменшення (рис. 1, Б). У літературі добре описаний феномен так званої “ап-регуляції” – збільшення кількості nAHR у клітинах, що культивували за присутності нікотину [16], або в мозку та клітинах крові в людей, які палили [17–18]. Було знайдено, що зміни відбуваються переважно на пост-трансляційно-

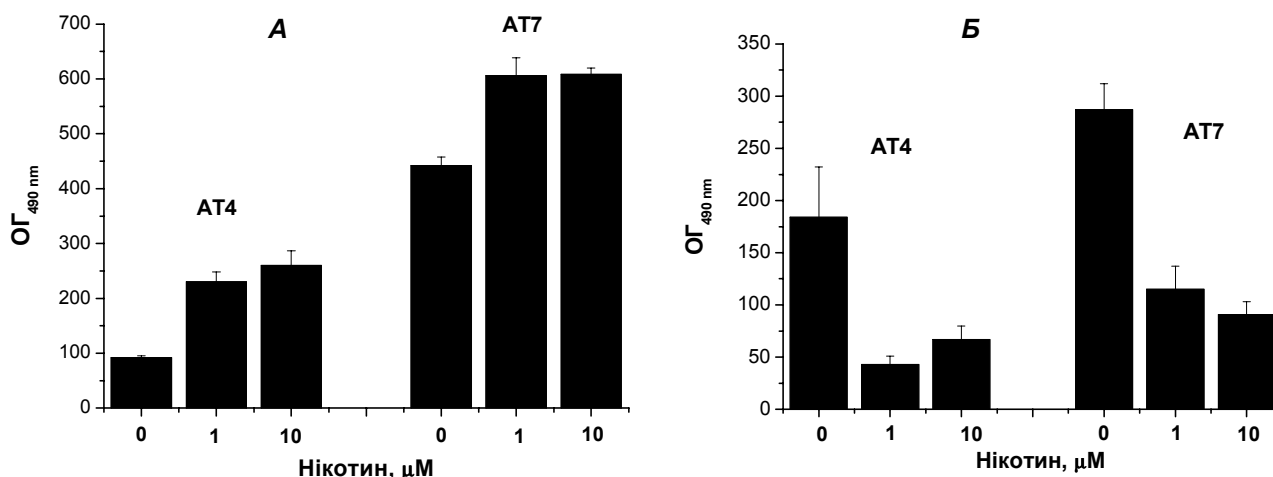


Рис. 1. Зв'язування антитіл проти  $\alpha 4$  (AT4) або  $\alpha 7$  (AT7) субодиниць nAChP з клітинами гібридоми ID6 (А) та мієломи X63-Ag8 (Б) після інкубації з нікотинном протягом 4 діб ( $M \pm m$ ;  $n = 3$ ).

му рівні і можуть бути спричинені прискореним збиранням синтезованих субодиниць, стабілізацією утворених пентамерів і/або їхнім сповільненим катаболізмом [19–20]. Описано і протилежний феномен – “даун-регуляція”, тобто зменшення кількості nAChP під впливом нікотину [21], хоча причини такого ефекту не з'ясовано. Ми припускаємо, що в наших експериментах додавання нікотину призводить до перерозподілу мембранних і внутрішньоклітинних nAChP: стабілізації мембранних форм (збільшення) або їхнього ендцитозу (зменшення), хоча від чого саме залежала спрямованість ефекту нікотину, залишається невідомим.

Фізіологічне пояснення “даун”-регуляторної ролі нікотину було знайдено в експериментах із групами тварин, що хронічно, протягом 10

місяців, отримували нікотин з питною водою. Дозу нікотину для мишей (200 мкг/мл, що відповідає приблизно 2,4 мг/кг ваги) було підібрано таким чином, щоб його концентрація у крові (30–35 нг/мл [22]) відповідала такій у людей, що палять близько 30 цигарок у день (40–42 нг/мл [23]). Миші охоче споживали воду з нікотинном, і загальна кількість nAChP у клітинах їхньої селезінки, за даними клітинного ІФА, не відрізнялася від такої у мишей, які пили чисту воду. На відміну від мишей, щури відмовлялися пити воду з нікотинном (аж до загибелі від спраги) і тільки зменшення його концентрації в п'ять разів (до 40 мкг/мл) дозволило провести експеримент. При цьому кількість nAChP, що виявлялася у клітинах їхньої селезінки, була істотно нижчою, ніж у щурів, що пили чисту воду (рис. 2, Б). Різна

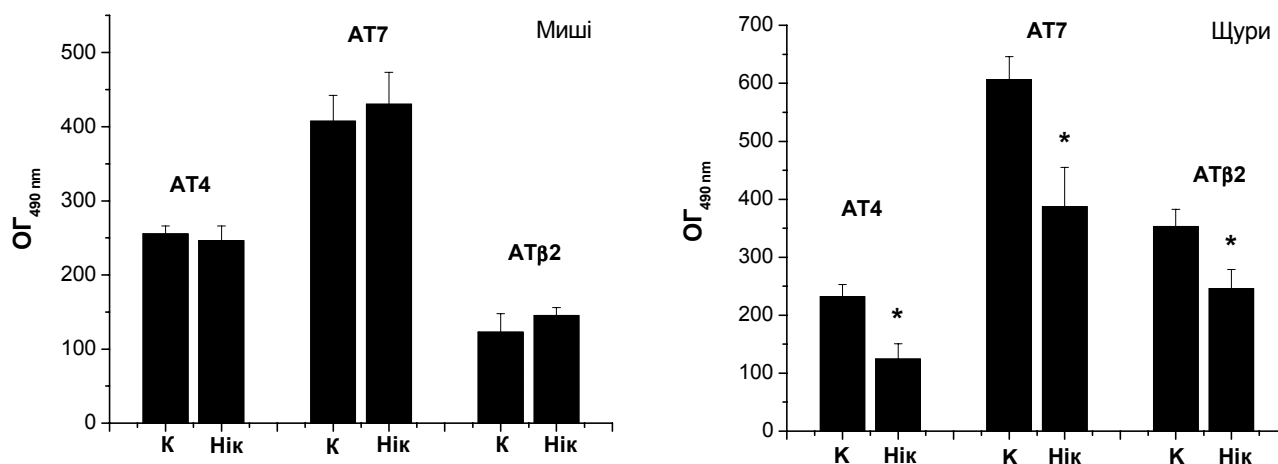


Рис. 2. Зв'язування антитіл проти  $\alpha 4$  (AT4),  $\alpha 7$  (AT7) або  $\beta 2$  (ATβ2) субодиниць nAChP з клітинами селезінки мишей ( $n = 4$ ) і щурів ( $n = 8$ ), які отримували нікотин з питною водою протягом 10 місяців ( $M \pm m$ ), К – контроль, Нік – нікотин.

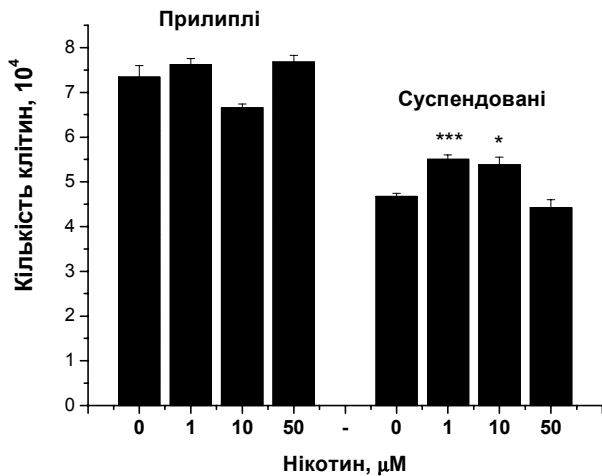


Рис. 3. Кількість клітин гібридоми, взятих із суспензії (“суспендовані”) або механічно відірваних від дна флакона (“прилиплі”) після інкубації з нікотинном протягом 4 діб (вихідна кількість всіх клітин –  $5 \times 10^3$ ;  $M \pm t$ ;  $n = 3$ ).

чутливість мишей і шурів до нікотину, можливо, пояснюється інтенсивністю метаболізму нікотину, що відрізняється у різних видів тварин [24]. Зниження загальної кількості нАХР у шурів, очевидно, було реакцією захисту від токсичної дії нікотину.

Раніше ми знайшли, що рівень нАХР на клітинах гібридоми залежить від інтенсивності їхнього ділення: клітини, що вийшли із клітинного циклу, стали пласкими і міцно прикріплювалися до підложки, мали значно менше нАХР на поверхні, ніж округлі клітини, що інтенсивно

ділилися [10]. Як показали більш детальні дослідження, механічне відривання клітин від підложки стимулювало їхній поділ і водночас підвищувало кількість нАХР на поверхні: через 5 днів інкубації відірвані клітини зв'язували більше нАХР-специфічних антитіл, ніж ті, що були в суспензії ( $OG_{490\text{ нм}}$  0,341 проти 0,253 для  $\alpha 4$ -специфічних антитіл і 0,523 проти 0,376 для  $\alpha 7$ -специфічних антитіл). При цьому нікотин стимулював ділення тільки тих клітин, що були в суспензії (рис. 3), тобто тих, які в момент додавання нікотину мали високий рівень нАХР. Ці дані свідчили про те, що чутливість клітин до нікотину не є постійною, а динамічно змінюється залежно від кількості нАХР на поверхні, що, у свою чергу, залежить від того, знаходиться клітина у фазі інтенсивного ділення або спокою.

У наведених вище експериментах міцне прикріплення до дна культурального флакона було характерним для клітин у стані спокою, з низьким рівнем нАХР. З іншого боку, в описаних нами дослідах з імітованою мікрогравітацією [15] клітини гібридоми, що оберталися у клиностації і не могли прикріпитися до підложки, припиняли поділ і ставали нечутливими до нікотину. Для того, щоб з'ясувати, як адгезія впливає на властивості нАХР, ми провели досліди, в яких прикріплення клітин до дна культурального посуду порушувалось вібрацією. При цьому кількість живих клітин, що не прикріпилися, збільшувалась удвічі (рис. 4, А), ці клітини ділились менше, ніж контрольні, і їхній поділ не стимулювався нікотинном (рис. 4, Б), хоча кількість рецепторів на поверхні майже не змінювалась ( $OG_{490\text{ нм}}$

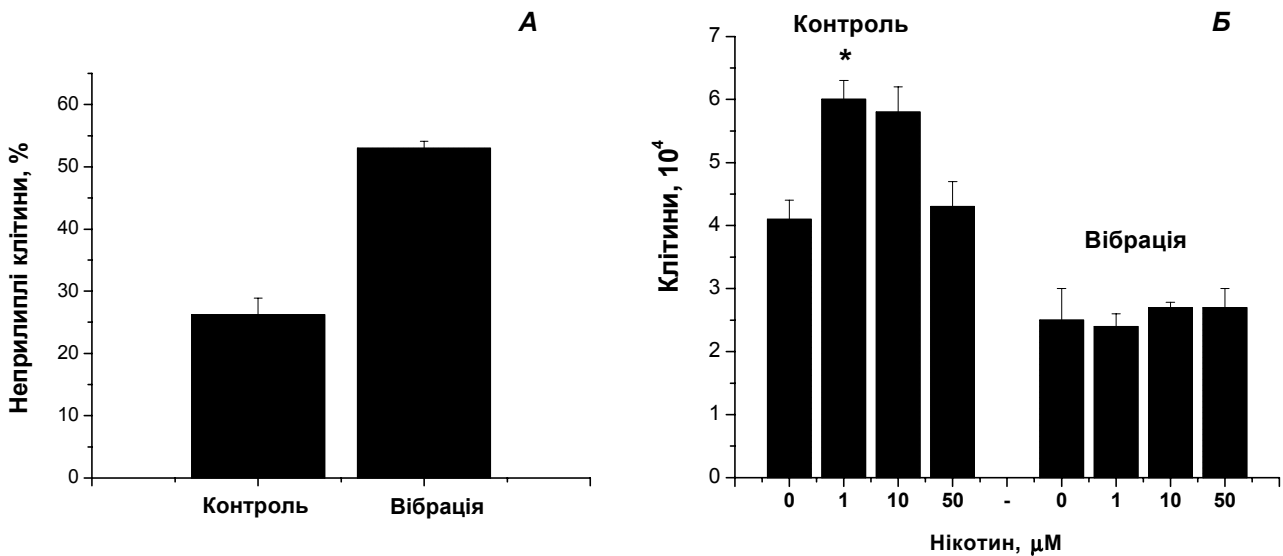


Рис. 4. Частка клітин гібридоми, що не прикріпилися (А) і чутливість до нікотину (Б) клітин, що вирощувалися за нормальних умов (контроль) і в умовах вібрації (вихідна кількість всіх клітин –  $5 \times 10^3$ ;  $M \pm t$ ;  $n = 3$ ).

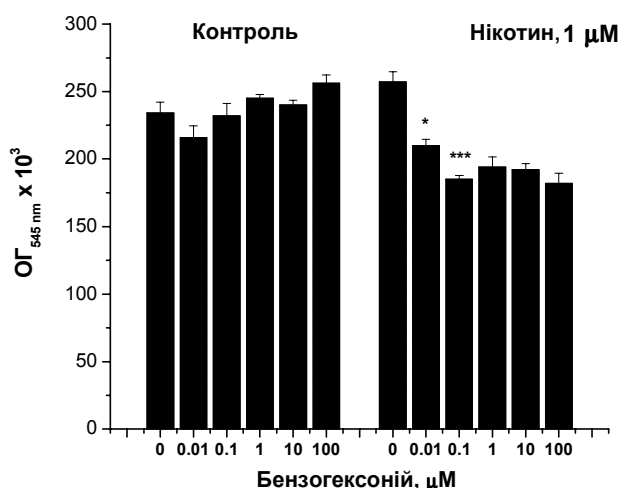


Рис. 5. Вплив бензогексонію на проліферацію клітин гібридами за присутності і у відсутності нікотину ( $M \pm m$ ;  $n = 6$ ).

0,105 проти 0,094 для  $\alpha 4$ -специфічних антитіл і 0,186 проти 0,252 для  $\alpha 7$ -специфічних антитіл). Ці дані збігаються з одержаними за кліностатування і підтверджують, що для нормального циклу проліферації клітинам гібридами необхідні адгезивні контакти з підложкою. Зниження чутливості до нікотину (десенситизація) у клітин, позбавлених таких контактів, свідчить про те, що діяльність нАХР також залежить від адгезивних сигналів, які отримує клітина.

У нервових клітинах функціонування нАХР пов'язано з відкриттям іонного каналу при зв'язуванні ацетилхоліну або нікотину [5]. У попередніх дослідженнях ми показали, що токсини змій, які є конкурентними блокаторами гомо-

мерних нАХР, тобто запобігають зв'язуванню агоніста, пригнічували проліферацію клітин гібридами [10]. Проте одержані дані не відповідали на запитання, чи є необхідним відкриття іонного каналу для передачі проліферативного сигналу? Ми вивчили вплив на проліферацію клітин гібридами специфічного блокатора відкритого каналу нАХР бензогексонію. Як показано на рис. 5, бензогексоній дозозалежно пригнічує проліферативну активність за присутності нікотину і запобігає стимулювальній дії нікотину на проліферацію. У деяких випадках пригнічення спостерігається навіть у відсутності нікотину в культуральному середовищі. Дози бензогексонію, що спричиняють пригнічення проліферації (10–100 нМ), були в межах тих, що блокують канали в нервових клітинах [25]. Ці дані свідчать про те, що проліферативний сигнал через нАХР у клітинах гібридами потребує відкриття іонного каналу. Підсилювальний ефект нікотину пов'язаний саме з тим, що нікотин відкриває канал, який може бути заблокований бензогексонієм. Блокувальний ефект бензогексонію за відсутності нікотину, вірогідно, спостерігається у разі достатньої кількості в культуральному середовищі ацетилхоліну, який продукується самими лімфоцитами [26].

Клітини гібридами є малігнізованою моделлю кінцевої стадії диференціювання В-лімфоцитів – плазматичних клітин, що продукують антитіла. Для того, щоб з'ясувати, як впливає нікотин на проліферацію нормальних плазматичних клітин, ми імунізували мишей білковим антигеном (гемоціаніном равлика) і вилучали клітини селезінки на 5-й день після імунізації, коли в організмі миші завершується перетворення активованих

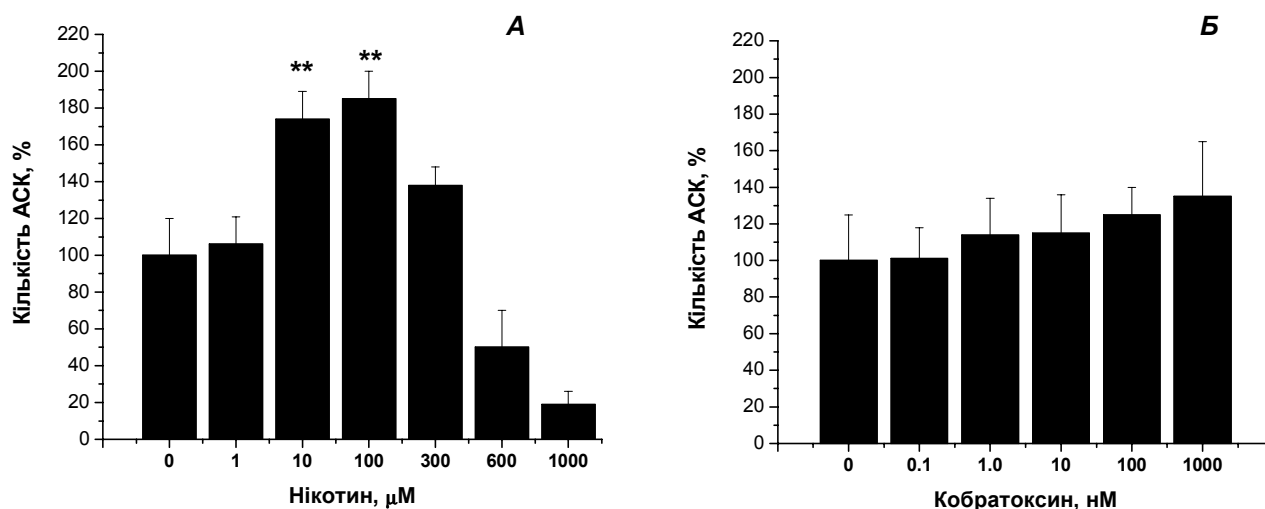


Рис. 6. Вплив нікотину (А) та кобратороксину (Б) на кількість клітин, що секретують антитіла (АСК) проти гемоціаніну в культурі спленоцитів імунізованих мишей. Представлено нормалізовані дані трьох незалежних експериментів ( $M \pm m$ ).

В-лімфоцитів у плазматичні клітини. На цьому етапі плазматичні клітини проходять декілька циклів поділу [27]. Далі клітини інкубували *in vitro* за присутності нікотину або nAChR-специфічного токсину, а потім визначали кількість клітин, що секретують антитіла до гемоціаніну, методом імуноферментних відбитків. Як видно із рис. 6, нікотин дозозалежно підвищує кількість клітин, що продукують антитіла. Кобратоксин, який ефективно пригнічував проліферацію клітин гібридоми [10], не впливав на кількість відбитків. Ці дані свідчать, що сигнал, переданий крізь nAChR під час зв'язування агоніста, сприяє поділу нормальних плазматичних клітин. Відсутність ефекту токсину є показником того, що ендogenous ацетилхолін не впливає на поділ плазматичних клітин або nAChR субтипу  $\alpha 7$  (до яких специфічні використані токсини), не залучені до регуляції проліферації плазматичних клітин.

Виходячи з одержаних в наших експериментах даних, можна дійти таких висновків:

1 – нікотин регулює кількість nAChR, експресованих на клітинах гібридоми і нормальних лімфоцитах щурів;

2 – чутливість клітин гібридоми до дії нікотину залежить як від кількості nAChR, так і від їхньої функціональної активності, на яку, зокрема, впливають адгезивні контакти клітини з підложкою;

3 – нікотин сприяє проліферації клітин гібридоми і нормальних плазматичних клітин;

4 – проліферативний сигнал через nAChR у клітинах гібридоми потребує відкриття іонного каналу.

Загалом, одержані дані свідчать на користь про-проліферативної ролі нікотину для В-лімфоцитів, що може пояснити розвиток лімфопроліферативних захворювань у людей, які палять цигарки [3].

#### THE ROLE OF NICOTINE IN REGULATING LYMPHOCYTE PROLIFERATION

L. M. Koval, S. I. Romanyuk, D. V. Kolybo,  
M. V. Skok, S. V. Komisarenko

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 effect of nicotine on both the expression of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) and proliferation of hybridoma cells and normal mouse lymphocytes has been investigated. By means of immunoenzyme assay, nicotine was shown to regu-

late the number of nAChRs in both hybridoma cells and normal rat splenocytes. According to the data of triazolyl blue inclusion and ELISpot assay, nicotine stimulated proliferation of both hybridoma cells and normal plasma cells generated in the course of immune response *in vivo*. The cell sensitivity to nicotine depended on the number of nAChRs expressed on the membrane, as well as on their functional activity affected, in particular, by adhesive contacts. The use of the open channel blocker benzohexonium revealed that proliferative signal through nAChR in hybridoma cells was mediated by ion channel opening. The data obtained demonstrate the pro-proliferative role of nicotine for B lymphocytes, and may account for the development of lymphoproliferative disorders in tobacco smokers.

**К e y w o r d s:** lymphocytes, hybridoma, nicotine, nicotinic acetylcholine receptors, proliferation, benzohexonium.

1. Andersen P., Pedersen D. F., Bach B., Bonde G. J. // Clin. Exper. Immunol. 1982. **47**. P. 467–473.
2. Hughes D. A., Haslam P. L., Townsend P. J., Turner-Warwick M. // Ibid. 1985. **61**. P. 459–466.
3. Loembe M. M., Lamoureux J., Deslauriers N. et al. // Br. J. Haematol. 2001. **113**. P. 699–705.
4. Marubio L. M., Changeux J. P. // Eur. J. Pharmacol. 2000. **393**. P. 113–121.
5. Paterson D., Nordberg A. // Progr. Neurobiol. 2000. **61**. P. 75–111.
6. Conti-Fine B. M., Navaneetham D., Lei S., Maus A. D. J. // Eur. J. Pharmacol. 2000. **393**. P. 279–294.
7. Sopori M. I., Kozak W., Savage S. M. et al. // Psychoneuroendocrinology. 1998. **23**. P. 189–204.
8. Sato K. Z., Fujii T., Watanabe Y. et al. // Neurosci. Lett. 1999. **266**. P. 17–20.
9. Maslinski W., Laskowska-Bozek H., Ryzewski J. // J. Neurosci. Res. 1992. **31**. P. 336–340.
10. Skok M. V., Kalashnik E. N., Koval L. N. et al. // Mol. Pharmacol. 2003. **64**, N 4. P. 885–889.
11. Калашник О. М., Лухмус О. Ю., Скок М. В., Комісаренко С. В. // Доповіді НАН України. 2000. № 4. С. 171–175.
12. Skok M. V., Voitenko L. P., Voitenko S. V. et al. // Neuroscience. 1999. **93**. P. 1427–1436.
13. Carmichael J., DeGraff W. G., Gazdar A. F. et al. // Cancer Res. 1987. **47**. P. 943–946.
14. Koval O. M., Voitenko L. P., Skok M. V. et al. // Neurosci. Lett. 2004. **365**. P. 143–146.
15. Skok M. V., Koval L. M., Petrova Y. I. et al. // Acta Astronautica. 2005. **56**. P. 721–728.

16. Peng X., Gerzanich V., Anand R., Wang F. // *Mol. Pharmacol.* 1997. **51**. P. 776–784.
17. Perry D. C., Davila-Garcia M. I., Stockmeiner C. A., Kellar K. J. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999. **289**. P. 1549–1552.
18. Benhammou K., Lee M., Strook M. et al. // *Neuropharmacology*. 2000. **39**. P. 2818–2829.
19. Peng X., Gerzanich V., Anand R. et al. // *Mol. Pharmacol.* 1994. **46**. P. 523–530.
20. Pauly J. R., Marks M. J., Robinson S. F. et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996. **278**. P. 361–369.
21. Kimura R., Ushiyama N., Fujii T., Kawashima K. // *Life Sci.* 2003. **72**, N 18–19. P. 2155–2158.
22. Murrin L. C., Ferrer J. R., Zeng W. Y., Haley N. J. // *Ibid.* 1992. **40**. P. 1699–1708.
23. Huston-Lyons D., Kornetsky C. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1992. **41**. P. 755–759.
24. Benowitz N., Prochet H., Jacob P. // In: *Nicotine Psychopharmacology* / Wonnacott S., Russel M., Stolerman I., Eds. Oxford England : Oxford Science Publication. 1990. P. 112–157.
25. Скок В. І., Пасічниченко О. М. // *Фізіол. журн.* 1994. **40**, № 3–4. С. 15–20.
26. Rinner I., Kawashima K., Schauenstein K. // *J. Neuroimmunol.* 1998. **81**. P. 31–37.
27. Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. // *Immunobiology. The Immune System In Health and Disease*, (5<sup>th</sup> edition), New York: Garland Publishing, 2001. 732 p.

Отримано 16.09.04