

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.352.5

ВПЛИВ НІКОТИНУ НА МЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ МІТОХОНДРІЙ: УЧАСТЬ НІКОТИНОВИХ АЦЕТИЛХОЛІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ

Г. Л. ГЕРГАЛОВА, М. В. СКОК

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: gergal71@gmail.com

Вплив нікотину на мітохондрії печінки мишей досліджували методом протокової цитофлуориметрії. Миші вживали нікотин упродовж 65 діб або нікотин додавали до препарату ізольованих мітохондрій. Мітохондрії печінки мишей, які вживали нікотин, мали вірогідно нижчий початковий рівень мембранного потенціалу та меншу гранулярність порівняно з контрольною групою. Передінкубація ізольованих мітохондрій з нікотинном дозозалежно перешкоджала дисипації їхнього мембранного потенціалу у разі внесення в середовище інкубації 0,8 мкМ CaCl_2 . Антагоніст нікотинних рецепторів $\alpha 7$ субтипу ($\alpha 7$ nAChR) метиллікаконітин підсилював ефект нікотину. Початковий рівень мембранного потенціалу та гранулярність ізольованих мітохондрій печінки мишей, яким внутрішньовенно вводили антитіла проти $\alpha 7$ nAChR, були нижчими у порівнянні з контролем. Внесення до середовища інкубації нікотину, холіну, ацетилхоліну або синтетичного агоніста $\alpha 7$ нікотинних рецепторів PNU 282987 пригнічувало акумуляцію Ca^{2+} в мітохондріях. Однак дози агоністів були надто малими для активації іонного каналу $\alpha 7$ nAChR. Зроблено висновок про те, що вживання нікотину погіршує функціональний стан мітохондрій печінки, впливаючи на їх мембранний потенціал та гранулярність, і цей ефект, принаймні частково, опосередкований десенситизацією $\alpha 7$ nAChR.

Ключові слова: ізольовані мітохондрії, нікотин, $\alpha 7$ нікотинний ацетилхоліновий рецептор, протокова цитофлуориметрія, мембранний потенціал, Ca^{2+} .

Нікотин, який здебільшого потрапляє в організм людини під час паління цигарок, порушує природні процеси в дихальних шляхах, шкірі, судинах та імунній системі, що є причиною патологічних змін у цих органах. Разом із цим, показано, що нікотин виявляє протизапальну дію і чинить позитивний вплив при деяких нейродегенеративних захворюваннях, таких як хвороби Паркінсона і Альцгеймера, підвищуючи рівень допаміну в мозку та уповільнюючи процеси дегенерації [1]. Зокрема, протективні ефекти нікотину пов'язують з його впливом на мітохондрії [2], які відіграють головну роль у забезпеченні клітин енергією, контролі внутрішньоклітинних кальцієвих потоків та ініціації апоптозу [3]. Показано, що нікотин впливає на процес мітохондріального дихання [4], запобігає появі вільного цитохрому c [5], знижує вихід супероксидних радикалів [4].

Завдяки ліпофільній природі нікотин може легко потрапляти всередину клітин

та мітохондрій, впливаючи на їхнє функціонування. Однак більшість біологічних ефектів нікотину пов'язують із його дією на специфічні рецептори – рецептори до ацетилхоліну нікотинного типу (nAChR). Вони відносяться до суперродини лігандзалежних іонних каналів, опосередковують швидку синаптичну передачу в м'язових і нервових клітинах [6] і регулюють вивільнення нейротрансмітерів у мозку. Дослідження останніх років довели наявність nAChR на багатьох незбудливих клітинах, включаючи кератиноцити шкіри, епітелій дихальних шляхів, ендотелій судин і клітини імунної системи [7–9]. У своїх попередніх роботах ми вперше показали, що nAChR, які містять субодиницю $\alpha 7$, експресовані на зовнішній мембрані мітохондрій і регулюють процеси ініціації апоптозу шляхом впливу на потенціалзалежні аніонні канали [10]. Метою представленого дослідження було з'ясування ролі $\alpha 7$ nAChR у підтриманні мембранного потенціалу мітохондрій.

Матеріали і методи

Експериментальну частину роботи було проведено на мишах лінії C57Bl/6 (середня маса тіла 20–22 г). Мишей умертвляли цервікальною дислокацією та брали печінку для дослідження.

Для вивчення дії нікотину *in vivo* було сформовано дослідну та контрольну групи мишей (п'ять тварин у кожній). У дослідній групі миші живали нікотин (0,032 г/л питної води) протягом 65 днів.

Для дослідження впливу специфічних антитіл мишам (по п'ять тварин у групі, дві групи експериментальні, третя – контроль) вводили у хвостову вену імуноглобуліни кроля: по 0,2 мг в 0,05 мл фізіологічного розчину на одну ін'єкцію, три дні поспіль. Першій експериментальній групі вводили неспецифічні імуноглобуліни (IgG), другій – $\alpha 7(1-208)$ – специфічні антитіла, очищені на протеїні А, кон'югованому до сефарози 4В.

Препарат ізольованих мітохондрій одержували з печінки методом диференціального центрифугування [11]. Для отримання осаду мітохондрій використовували середовище виділення наступного складу: 10 мМ HEPES, 200 мМ сахароза, 1 мМ EGTA – 1 (pH 7,4). Виділення проводили при 2 °С. Мітохондрії суспендували у середовищі інкубації такого складу: 10 мМ HEPES, 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 0,1 мМ P_i (у вигляді K^+ -фосфатного буфера; pH 7,4), 5 мМ сукцинат натрію (22 °С). Концентрація протеїну в мітохондріях, визначена методом Bradford [12], становила 0,20 мг/мл.

Для оцінки чистоти фракції ізольованих мітохондрій, визначення гранулярності мітохондрій, реєстрації мембранного потенціалу $\Delta\psi$ та рівня іонізованого Ca використовували протоковий цитофлуориметр COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, США) з аргоновим лазером ($\lambda_{збуд.} = 488$ нм) та SYSTEM ПТМ програмним забезпеченням. Протоковий цитофлуориметр дозволяє аналізувати об'єкти за розміром, визначеним за величиною прямого світлорозсіювання (forward scatter, FS); гранулярністю – за боковим (під кутом 90°) світлорозсіюванням (side scatter, SS) та інтенсивністю флуоресцентного сигналу на різних довжинах хвиль у видимому діапазоні спектра.

Експерименти на фракції ізольованих мітохондрій печінки проводили за допомогою протокового цитофлуориметра з використанням попередньо створеного протоколу [13]. Для аналізу обирались події в обмеженій

області, аналіз проб припинявся за умови реєстрації 30 000 подій в цій області.

Оцінку чистоти фракції ізольованих мітохондрій печінки проводили з використанням флуоресцентного маркера 100 нМ 10-ноніл акридин оранжу (NAO) ($\lambda_{збуд.} = 488$ нм, $\lambda_{фл.} = 525$ нм). NAO селективно зв'язується з кардіоліпіном, специфічним фосфоліпідом внутрішньої мембрани мітохондрій [13].

Відносні значення мембранного потенціалу мітохондрій $\Delta\psi$ реєстрували за допомогою потенціалчутливого флуоресцентного зонда 100 нМ тетраметилродамін-метилового ефіру (TMRM; $\lambda_{збуд.} = 540$ нм, $\lambda_{фл.} = 590$ нм). Навантаження ізольованих мітохондрій зондом проводили в 0,5 мл середовища інкубації у темряві протягом 7 хв [14]. Проби аналізували на протоковому цитофлуориметрі. Відносні одиниці флуоресцентного сигналу зонда TMRM розраховували за різницею середніх значень інтенсивності флуоресценції проби до і після внесення 1 мкМ протонифору СССР.

Рівень іонізованого Ca в мітохондріях вимірювали за допомогою флуоресцентного Ca^{2+} -чутливого зонда 1 мкМ Fluo 3 AM ($\lambda_{збуд.} = 506$ нм, $\lambda_{фл.} = 526$ нм) [15]. Навантаження ізольованих мітохондрій Fluo 3 AM проводило в 0,5 мл середовища інкубації у темряві впродовж 30 хв, вимірювання флуоресценції проводили через 2 хв після внесення $CaCl_2$ в середовище інкубації мітохондрій. Дані розраховували як зміну інтенсивності флуоресценції зонда за додавання в середовище інкубації Ca^{2+} у присутності або за відсутності лігандів НАХР.

Статистичні розрахунки здійснювали в режимі програмного забезпечення OriginPro 7.5. Дані представляли у вигляді $M \pm m$. Статистично значущими вважали дані при $P < 0,05$.

У роботі застосовували такі реактиви: HEPES, NAO, протонифор СССР (карбонілціанід-3-хлорфенілгідразон), сукцинат натрію, EGTA, МЛА, PNU 282987, Fluo 3AM (Sigma, США); TMRM (Fluka, Швейцарія). Інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

Результати та обговорення

Мембранний потенціал є важливим показником функціонального стану мітохондрій. Він утворюється внаслідок окисно-відновних реакцій, які відбуваються на внутрішній мембрані мітохондрій і супроводжуються переносом протонів із матриксу мітохондрій в навколишнє середовище, і складає 170–180 мВ.

Мембранний потенціал є рушійною силою для синтезу АТР, що є головною функцією мітохондрій [16]. Вирівнювання мембранного потенціалу у фізіологічних умовах відбувається за рахунок катіонів Ca^{2+} , які надходять в мітохондріальний матрикс із цитозолу клітини. За сучасними уявленнями, Ca^{2+} потрапляє в мітохондрії незбудливих клітин через спеціальну транспортну систему – уніпортер, локалізований на їхній внутрішній мембрані [17]. Щоб дістатись до уніпортеру із цитоплазми, Ca^{2+} має пройти крізь пору зовнішньої мембрани мітохондрій, утворену потенціалзалежним аніонним каналом (voltage-dependent anion channel, VDAC), який підтримує концентрацію міжмембранного Ca^{2+} в межах, достатніх для роботи уніпортера [18]. У попередніх дослідженнях ми показали, що $\alpha 7$ nAХР, локалізований на зовнішній мембрані мітохондрій, взаємодіє з VDAC [10]. Дослідження, проведені в цій роботі, мали визначити внесок nAХР у підтримання мембранного потенціалу мітохондрій та його вплив на накопичення внутрішньомітохондріального Ca^{2+} .

Для дослідження характеристик ізольованих мітохондрій ми застосували метод протокової цитофлуориметрії [13–15]. Попередньо створений робочий протокол [13] дозволив проводити дослідження в області, де 95% визначених подій (часток) зв'язували NAO, що підтверджувало їхнє мітохондріальне походження (рис. 1, А, Б). Передінкубація виділених мітохондрій з потенціалчутливим зондом TMRM генерувала флуоресцентний сигнал, який повністю знімався у разі додавання 1 мкМ протонофору СССР. За внесення в середовище інкубації 0,8 мкМ CaCl_2 відбувалось істотне зміщення положення піку флуоресценції TMRM (рис. 1, В), що було кваліфіковано як дисипація мембранного потенціалу мітохондрій [14].

Ізольовані мітохондрії печінки мишей, які вживали нікотин, мали вірогідно нижчий початковий рівень флуоресценції TMRM порівняно з мітохондріями печінки контрольної групи мишей. Внесення Ca^{2+} до середовища інкубації мітохондрій спричинює менші зміни флуоресценції в дослідному препараті у порівнянні з контрольним (82 проти 93%, рис. 2, А). Крім того, гранулярність, яка характеризує стан внутрішньої мембрани мітохондрій, також вірогідно нижча в мітохондріях мишей дослідної групи порівняно з контролем (рис. 2, Б). Таким чином, вживання нікотину протягом двох місяців суттєво

впливало на функціональний стан мітохондрій печінки мишей: знижувало рівень мембранного потенціалу, змінювало стан внутрішньої мембрани і чутливість до Ca^{2+} .

Ці дані підтверджено при дослідженні дії нікотину на мітохондрії *in vitro*. Як показано на рис. 3, А, внесення нікотину в середовище інкубації мітохондрій не впливає на рівень флуоресценції TMRM. Однак, починаючи з дози в 1 нМ, нікотин перешкоджає дисипації мембранного потенціалу у присутності Ca^{2+} . Аналогічно нікотин впливає і на гранулярність мітохондрій, яка зменшується у разі внесення в середовище Ca^{2+} (рис. 3, Б).

Дози нікотину, які зумовлювали зазначені вище зміни, були замалими для неспецифічної ліпофільної дії на мембрані мітохондрій, тому ми поставили питання про участь $\alpha 7$ nAХР в опосередкуванні цього впливу. Було вивчено ефект нікотину у присутності селективного антагоніста $\alpha 7$ nAХР метиллікаконітину (МЛА). Як показано на рис. 3, В, Г, МЛА не змінює рівень мембранного потенціалу та гранулярності, але суттєво підсилює вплив нікотину, перешкоджаючи дисипації потенціалу та зменшенню гранулярності під дією Ca^{2+} вже у присутності 0,1 нМ нікотину.

Визначені зміни в показниках мембранного потенціалу мітохондрій під дією нікотину вочевидь мали вплинути на рівень внутрішньомітохондріального Ca^{2+} за додавання до середовища інкубації CaCl_2 . Щоб визначити роль в цьому процесі $\alpha 7$ nAХР, ми дослідили вплив специфічних агоністів цього субтипу рецептора на вміст іонізованого Са в мітохондріях за допомогою Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонда Fluo 3AM. Як показано на рис. 4, холін, який є повним селективним агоністом $\alpha 7$ nAХР, знижує концентрацію іонізованого Са подібно до нікотину, приблизно на 20% (рис. 5, А). Аналогічні і дозозалежні ефекти виявляють також інші агоністи $\alpha 7$ nAХР: ацетилхолін та PNU 282987 (рис. 5, Б, В). Антагоніст МЛА не впливає на вміст іонізованого Ca^{2+} та не перешкоджає дії нікотину і холіну (рис. 4, рис. 5, Г).

Нарешті, ми показали, що мітохондрії печінки мишей, яким внутрішньовенно вводили антитіла проти позаклітинного домену $\alpha 7(1-208)$ nAХР, мають нижчий базовий рівень мембранного потенціалу, і цей показник менше змінюється за додавання Ca^{2+} порівняно з контрольними мітохондріями (на 54 проти 85%, рис. 6, А). Початковий показник гранулярності мітохондрій імунізованих мишей вірогідно нижчий за контрольний і прак-

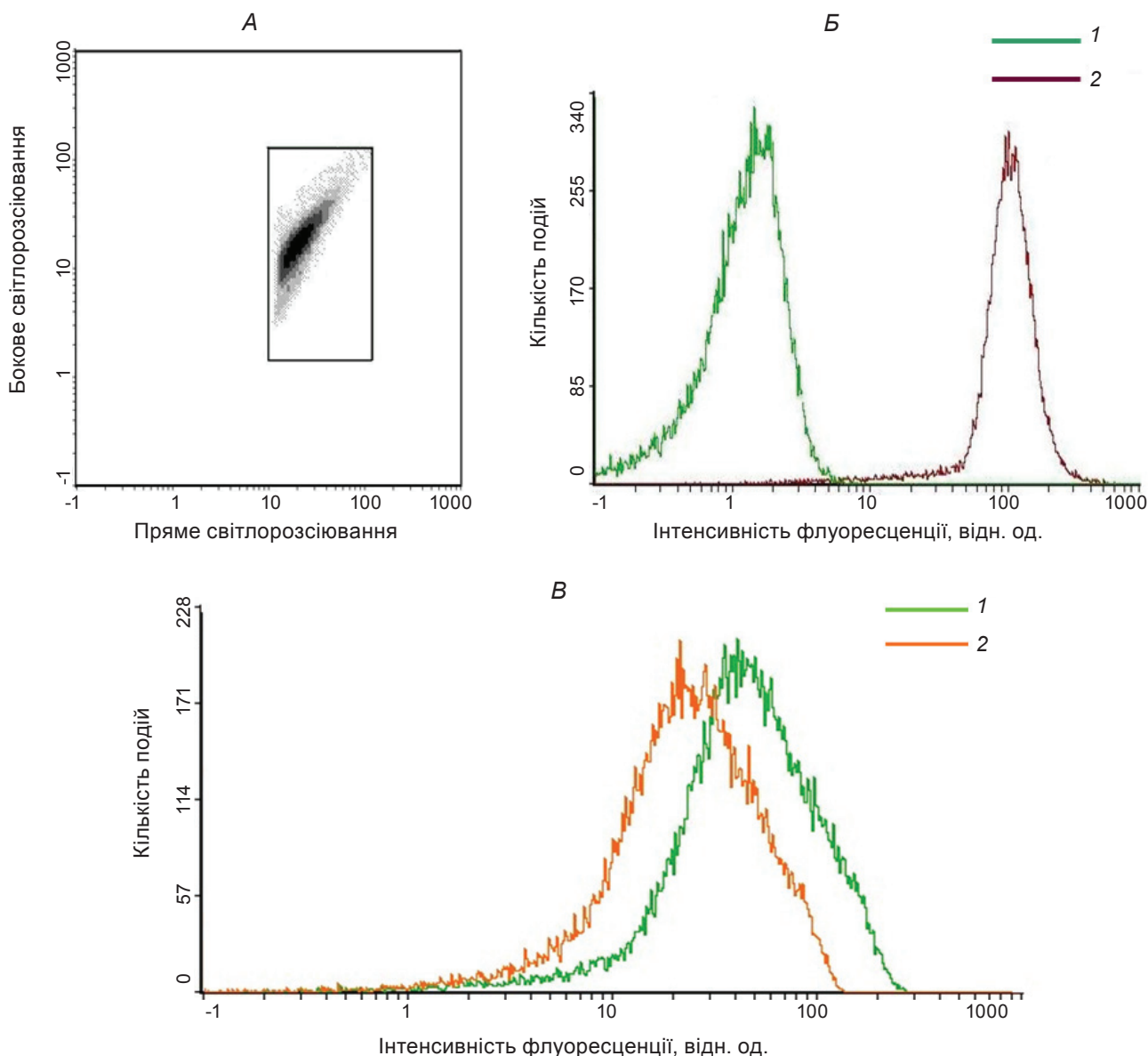


Рис. 1. Характеристика препарату мітохондрій печінки на протоковому цитофлуориметрі: А – виділена область дослідження; Б – тестування чистоти фракції ізольованих мітохондрій: 1 – у стандартному середовищі інкубації (контроль); 2 – до середовища додавали флуоресцентний маркер 100 нМ NAO; В – реєстрація мембранного потенціалу мітохондрій печінки з використанням флуоресцентного зонда – 100 нМ TMRM: 1 – у стандартному середовищі інкубації (контроль); 2 – до середовища додавали 0,8 мкМ Ca^{2+} . Наведено типові криві

тично не змінюється у разі додавання Ca^{2+} (рис. 6, Б). Таким чином, введення антитіл проти позаклітинного домену $\alpha 7$ nAХР спричиняло ефект, подібний до дії хронічного впливу нікотину (рис. 2).

Одержані результати свідчать про те, що $\alpha 7$ nAХР відіграють певну роль у підтриманні мембранного потенціалу мітохондрій та, принаймні частково, опосередковують вплив нікотину на його зміни під дією Ca^{2+} . Ці дані збігаються з опублікованими резуль-

татами Li et al. [19], в яких дисипація мембранного потенціалу мітохондрій, спричинена етанолом, зменшувалася специфічним агоністом $\alpha 7$ nAХР 2,4-диметоксибензилиден анабазеїном; щоправда, в цьому разі ефект агоніста блокувався МЛА.

У наших експериментах дози ацетилхоліну, холіну і нікотину, які впливали на рівень іонізованого Са або мембранного потенціалу мітохондрій, значно нижчі за ті, що активують $\alpha 7$ nAХР, тобто відкривають його іонний

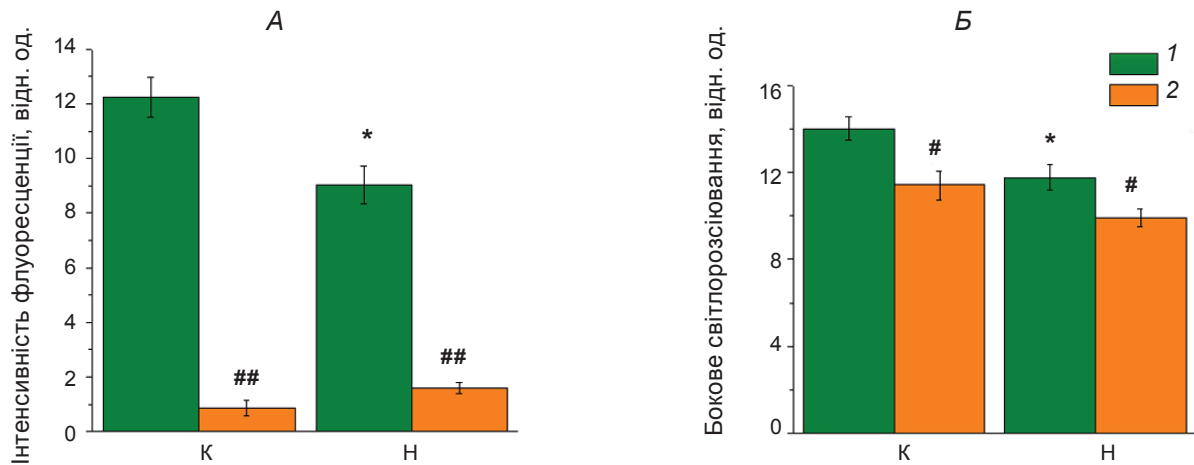


Рис. 2. Рівень мембранного потенціалу (А) та показник гранулярності (Б) мітохондрій печінки мишей: 1 – у стандартному середовищі інкубації (початковий рівень); 2 – до середовища додавали 0,8 мкМ Ca^{2+} . К – контрольна група мишей, Н – група мишей, що вживала нікотин; $M \pm m$, $n = 5$, * $P < 0,05$ (порівняно з контрольною групою), # $P < 0,05$, ## $P < 0,0005$ (порівняно з початковим рівнем)

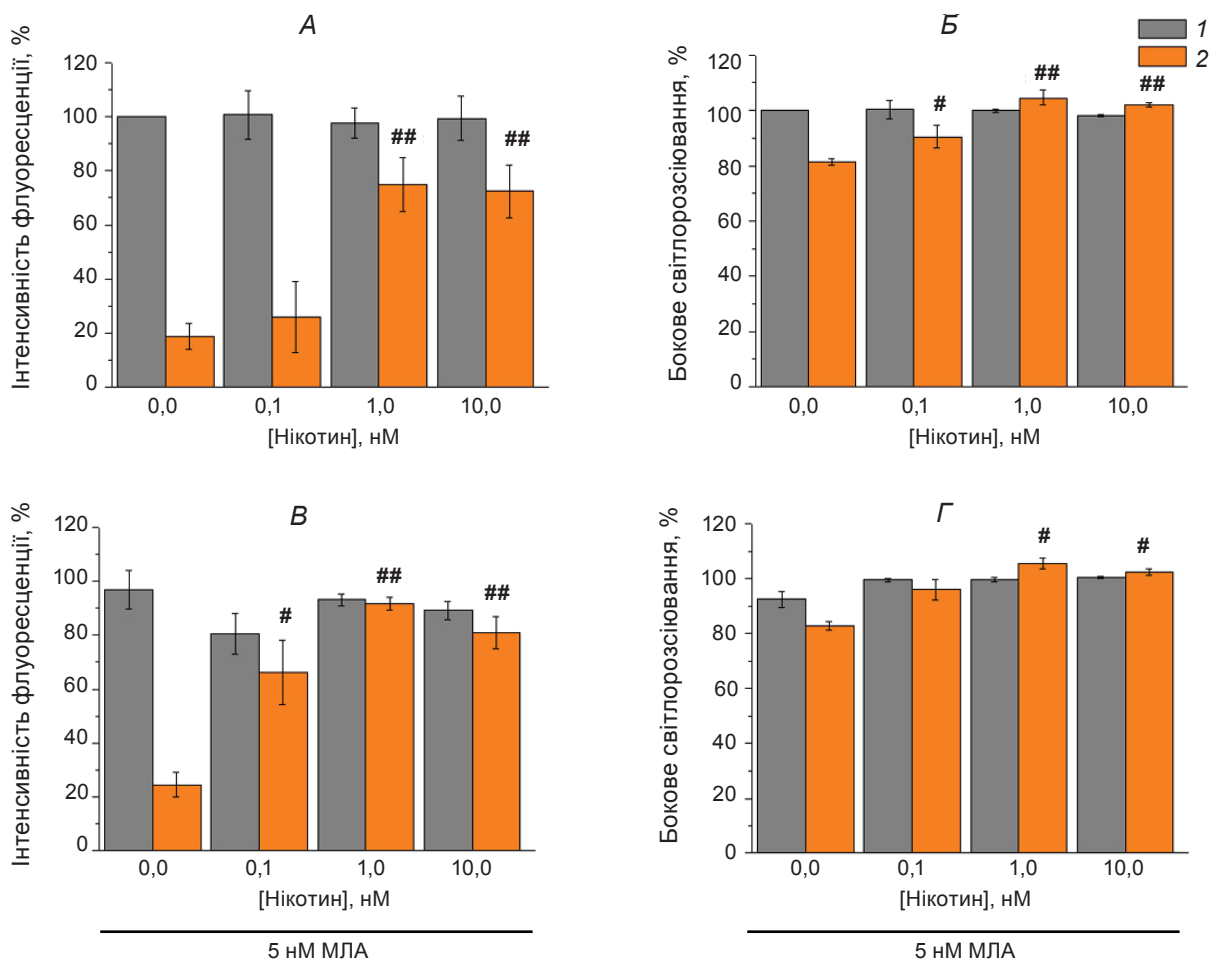


Рис. 3. Рівень мембранного потенціалу (А, В) та показник гранулярності (Б, Г) мітохондрій печінки мишей: 1 – у стандартному середовищі інкубації (початковий рівень); 2 – до середовища додавали 0,8 мкМ Ca^{2+} ; $M \pm m$, $n = 5$, # $P < 0,05$, ## $P < 0,0005$ (порівняно з контролем); за 100% приймали початковий рівень мембранного потенціалу з урахуванням СССР-складової

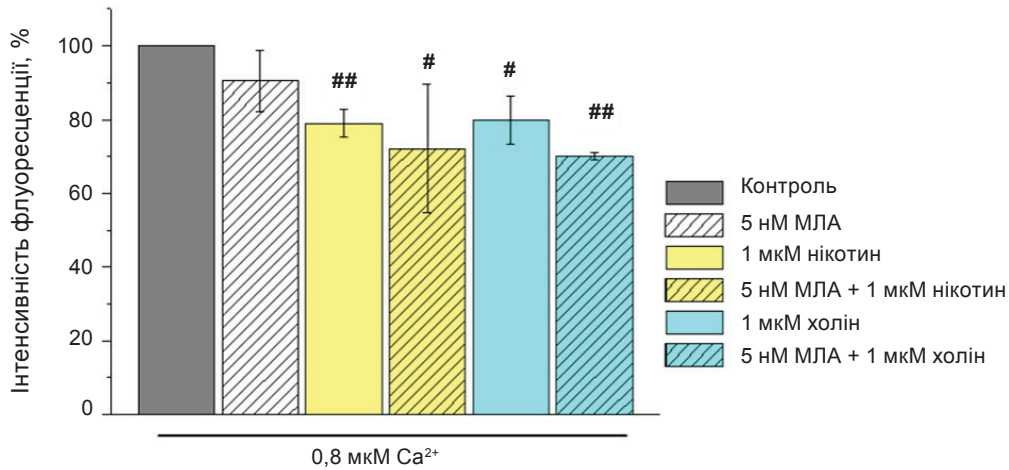


Рис. 4. Вплив агоністів та антагоніста $\alpha 7$ nAХР на рівень Ca^{2+} в мітохондріях печінки; $M \pm t$, $n = 5$, # $P < 0,05$, ## $P < 0,005$ (порівняно з контролем). За 100% приймали рівень іонізованого Са за відсутності у середовищі додатків. Час інкубації з $CaCl_2$ – 2 хв

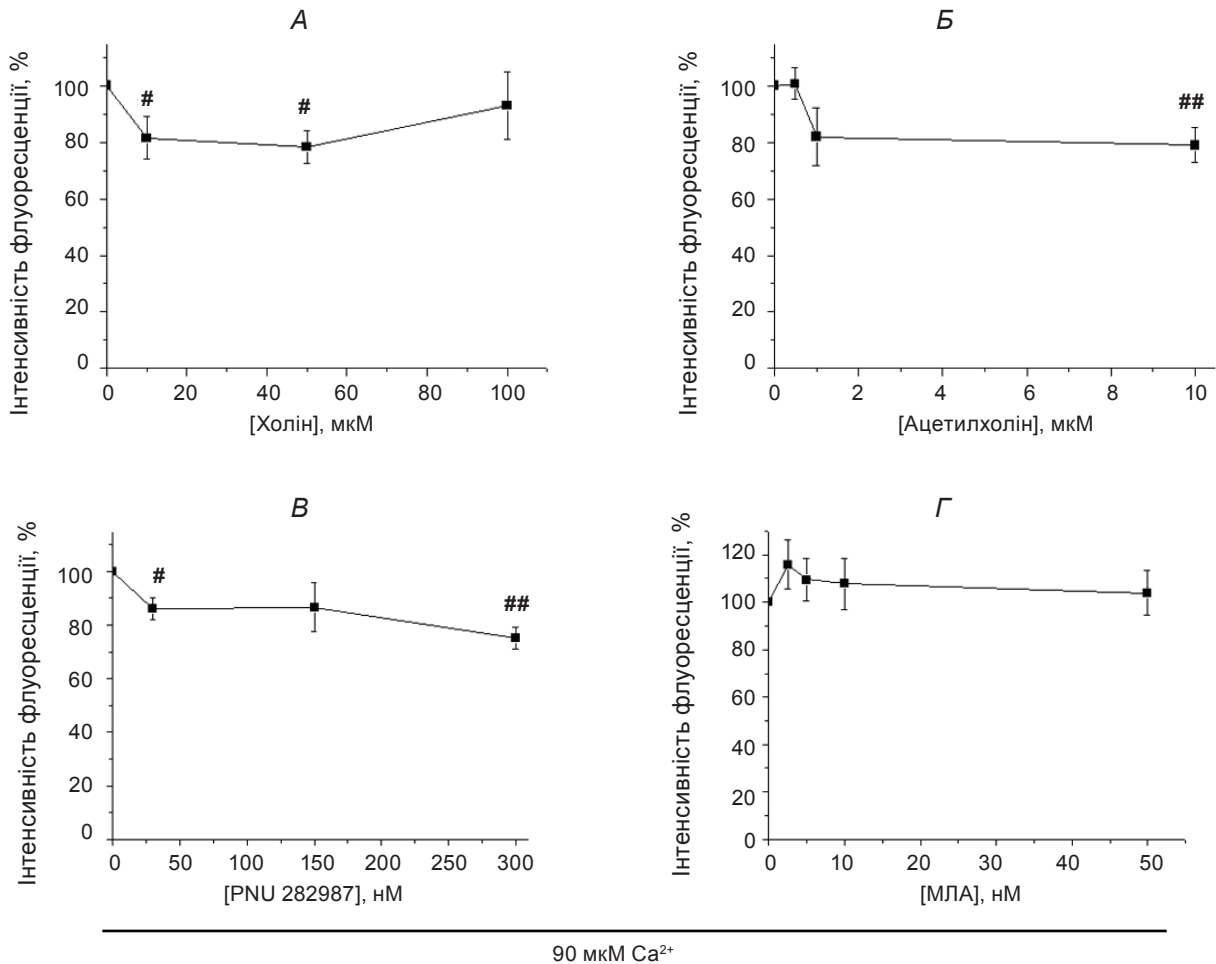


Рис. 5. Вплив агоністів та антагоніста $\alpha 7$ nAХР на рівень Ca^{2+} в мітохондріях печінки мишей: А – у присутності в середовищі інкубації холіну; Б – ацетилхоліну; В – PNU 282987; Г – МЛА; $M \pm t$, $n = 5$, # $P < 0,05$, ## $P < 0,005$ (порівняно з контролем); за 100% приймали рівень Ca^{2+} за відсутності у середовищі додатків. Час інкубації з $CaCl_2$ – 2 хв

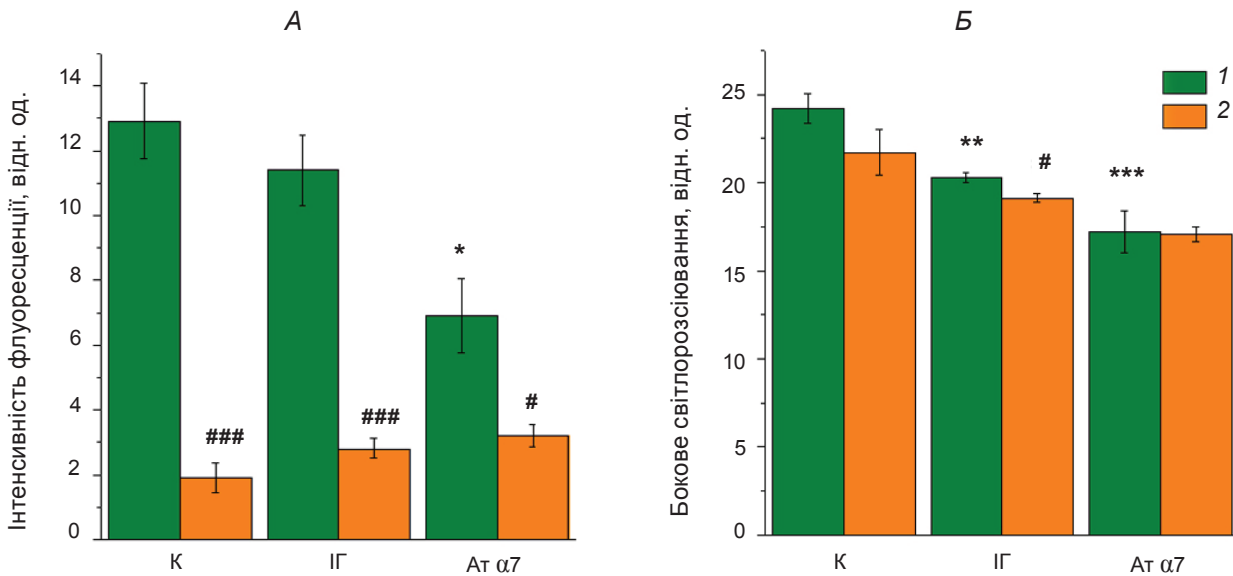


Рис. 6. Рівень мембранного потенціалу (А) та показник гранулярності (Б) мітохондрій печінки мишей: 1 – у стандартному середовищі інкубації (початковий рівень); 2 – до середовища додавали 0,8 мкМ Ca^{2+} . К – контрольна група мишей, ІГ – група мишей, яким вводили неспецифічні імуноглобуліни кроля, Аt $\alpha 7$ – група мишей, яким вводили $\alpha 7(1-208)$ специфічні антитіла кроля; $M \pm m$, $n = 5$, * $P < 0,05$ ** $P < 0,005$ *** $P < 0,0005$ (порівняно з контрольною групою), # $P < 0,05$, ### $P < 0,0005$ (порівняно з початковим рівнем)

канал (таблиця, [20]). Це означає, що наведені ефекти були опосередковані рецептором у десенситизованому стані, і добре пояснює подібну до агоністів дію МЛА на зміни $\Delta\psi$ під впливом Ca^{2+} (рис. 3, А, В). Довгострокова дія нікотину *in vivo* також призводить до десенситизації nAChR [21], що узгоджується з подібністю ефектів, представлених на рис. 2 і 3, та пояснює нікотиноподібну дію антитіл проти $\alpha 7$ nAChR (рис. 6).

Результати представленої роботи свідчать про те, що процеси, які супроводжують десенситизацію мітохондріальних $\alpha 7$ nAChR, впливають на стан внутрішньої мембрани мітохондрій, запобігаючи транспорту Ca^{2+} , що призводить до підтримання мембранного потенціалу мітохондрій і зниження їхньої здатності до накопичення Ca^{2+} . Слід зазначити, що концентрація CaCl_2 (0,8 μM), використана в наших експериментах, є близькою до фізіологічних рівнів Ca^{2+} в цитозолі [17]. Тому 20%-не зниження інтенсивності флуоресценції Fluo 3AM, визначене у присутності нікотину (рис. 4), свідчить про зниження буферної ємності мітохондрій для Ca^{2+} . Подібний ефект спостерігався у присутності інших агоністів $\alpha 7$ nAChR, у тому числі холіну (рис. 5). Холін присутній в цитозолі клітини і його концентрація підтримується за рахунок балан-

Порівняння доз агоністів $\alpha 7$ nAChR

Агоніст	EC50, мкМ [20]	Діючі дози, мкМ
Холін	400–1600	1–10
Ацетилхолін	28–180	10
Нікотин	49–113	0,01

су транспорту ззовні і внутрішньоклітинного метаболізму, в тому числі в мітохондріях, які перетворюють його на бетаїн [22]. У середньому концентрація холіну в цитозолі незбудливих клітин становить 30–50 мкМ [23]. Згідно з нашими даними, це означає, що за фізіологічних умов мітохондріальні $\alpha 7$ nAChR знаходяться у десенситизованому стані, що обмежує ємність мітохондрій як депо Ca^{2+} . Відповідно зміни концентрації холіну в цитозолі можуть впливати на стан мітохондріальних nAChR, що, в свою чергу, впливатиме на функціональний стан мітохондрій. Крім того, за даними протеомного аналізу, мітохондрії містять холінацетилтрансферазу, тобто здатні перетворювати холін на ацетилхолін [24], який є на порядок потужнішим агоністом $\alpha 7$ nAChR, ніж холін (таблиця, [20]). Таким чином, одержані нами дані відкривають новий енд-

генний механізм регуляції функціонування мітохондрій. Вони також показують, що хронічне вживання нікотину погіршує функціональний стан мітохондрій, і цей ефект, принаймні частково, опосередкований $\alpha 7$ nAChR.

**ВЛИЯНИЕ НИКОТИНА
НА МЕМБРАННЫЙ
ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ:
УЧАСТИЕ НИКОТИНОВЫХ
АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

Г. Л. Гергалова, М. В. Скок

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: gergal71@gmail.com

Влияние никотина на митохондрии печени мышей исследовали методом проточной цитофлуориметрии. Мыши употребляли никотин на протяжении 65 сут или никотин добавляли к препарату изолированных митохондрий. Митохондрии печени мышей, которые потребляли никотин, имели достоверно более низкий начальный уровень мембранного потенциала и меньшую гранулярность по сравнению с контрольной группой. Прединкубация изолированных митохондрий с никотином дозозависимо препятствовала диссипации их мембранного потенциала при внесении в среду инкубации 0,8 мкМ CaCl₂. Антагонист никотиновых рецепторов $\alpha 7$ субтипа ($\alpha 7$ nAChR) метилликаконитин усиливал эффект никотина. Начальный уровень мембранного потенциала и гранулярность изолированных митохондрий печени мышей, которым внутривенно вводили антитела против $\alpha 7$ nAChR, были снижены по сравнению с контролем. Внесение в среду инкубации никотина, холина, ацетилхолина или синтетического агониста $\alpha 7$ никотиновых рецепторов PNU 282987 снижало аккумуляцию ионизированного Ca в митохондриях. Однако дозы агонистов были слишком низкими для активации ионного канала $\alpha 7$ nAChR. Сделан вывод о том, что потребление никотина ухудшает функциональное состояние митохондрий, влияя на их мембранный потенциал и гранулярность, и этот эффект, по крайней мере частично, опосредован десенситизацией $\alpha 7$ nAChR.

Ключевые слова: изолированные митохондрии, никотин, никотиновый ацетилхолиновый рецептор $\alpha 7$, проточная цитофлуориметрия, мембранный потенциал, Ca²⁺.

**NICOTINE EFFECTS ON
MITOCHONDRIA MEMBRANE
POTENTIAL: PARTICIPATION
OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE
RECEPTORS**

G. L. Gergalova, M. V. Skok

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: gergal71@gmail.com

S u m m a r y

The effect of nicotine on the mouse liver mitochondria was studied by fluorescent flow cytometry. Mice consumed nicotine during 65 days; alternatively, nicotine was added to isolated mitochondria. Mitochondria of nicotine-treated mice had significantly lower basic levels of membrane potential and granularity as compared to those of the control group. Pre-incubation of the isolated mitochondria with nicotine prevented from dissipation of their membrane potential stimulated with 0.8 μ M CaCl₂ depending on the dose, and this effect was strengthened by the antagonist of $\alpha 7$ nicotinic receptors ($\alpha 7$ nAChR) methyllicaconitine. Mitochondria of mice intravenously injected with the antibodies against $\alpha 7$ nAChR demonstrated lower levels of membrane potential. Introduction of nicotine, choline, acetylcholine or synthetic $\alpha 7$ nAChR agonist PNU 282987 into the incubation medium inhibited Ca²⁺ accumulation in mitochondria, although the doses of agonists were too low to activate the $\alpha 7$ nAChR ion channel. It is concluded that nicotine consumption worsens the functional state of mitochondria by affecting their membrane potential and granularity, and this effect, at least in part, is mediated by $\alpha 7$ nAChR desensitization.

Key words: isolated mitochondria, nicotine, $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, fluorescent flow cytometry, membrane potential, Ca²⁺.

1. Picciotto M. R., Zoli M. // *Front Biosci.* – 2008. – **13**. – P. 492–504.
2. Aliev G., Sevidova D., Lamb B. T. et al. // *Neurol. Res.* – 2003. – **25**, N 6. – P. 665–674.
3. Костюк П. Г., Костюк О. П., Лук'янець О. О. Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структури і функції. – К.: Наук. думка, 2010. – 116 с.
4. Cormier A., Morin C., Zini R. et al. // *Brain Res.* – 2001. – **900**, N 1. – P. 72–79.
5. Xie Y. X., Bezard E., Zhao B. L. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**, N 37. – P. 32405–32412.

6. *Changeux J. P., Bertrand D., Corringier P. J. et al.* // *Brain Res. Rev.* – 1998. – **26**, N 2–3. – P. 198–216.
7. *Conti-Fine B. M., Navaneetham D., Lei S., Maus A. D. J.* // *Eur. J. Pharmacol.* – 2000. – **393**. – P. 279–294.
8. *Koval L., Lykhmu O., Zhmak M. et al.* // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2011. – **43**. – P. 516–524.
9. *Razani-Boroujerdi S., Boyd R. T., Davila-Garcia M. I. et al.* // *J. Immunol.* – 2007. – **179**. – P. 2889–2898.
10. *Гергалова Г. Л., Лихмус О. Ю., Скок М. В.* // *Нейрофизиология.* – 2011. – **43**, № 3. – С. 225–227.
11. *Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Курский М. Д.* // *Биохимия.* – 1985. – **50**, № 8. – С. 1350–1361.
12. *Braidford M. M.* // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
13. *Бабіч Л. Г., Шликов С. Г., Наумова Н. В. та ін.* // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 6. – С. 34–41.
14. *Mattiasson G.* // *Cytometry A.* – 2004. – **60**, N 2. – P. 145–154.
15. *Бабіч Л. Г., Шликов С. Г., Наумова Н. В., Костерин С. О.* // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – **80**, № 4. – С. 51–58.
16. *Ленинджер А.* *Биохимия.* – М.: Мир, 1974. – 957 с.
17. *Báthori G., Csordás G., Garcia-Perez C. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**. – P. 17347–17358.
18. *Pacher P., Thomas A. P., Hajnóczky G.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. – **99**, N 4. – P. 2380–2385.
19. *Li Y., Meyer E. M., Walker D. W. et al.* // *J. Neurochem.* – 2002. – **81**, N 4. – P. 853–858.
20. *Sharples C. G. V., Wonnacott S.* // *Toctris Reviews.* – 2001. – **19**. – P. 1–12.
21. *Lindstrom J.* // *Ion Channels.* – 1996. – **4**. – P. 377–449.
22. *Danne O., Muckel M.* // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2010. – **10**. – P. 159–171.
23. *Alkondon M., Albuquerque E. X.* // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006. – **318**. – P. 268–275.
24. *Pagliarini D. J., Calvo S. E., Chang B. et al.* // *Cell.* – 2008. – **134**. – P. 112–123.

Отримано 22.08.2011